

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 015 621**

51 Int. Cl.:

A61P 27/06 (2006.01)

C07D 231/12 (2006.01)

C07D 231/18 (2006.01)

C07D 403/12 (2006.01)

A61K 31/415 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2020** **E 20213242 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2025** **EP 3845276**

54 Título: **Derivado de beta-aminoácido, inhibidor de cinasa y composición farmacéutica que lo contiene, y uso del mismo**

30 Prioridad:

31.12.2019 US 201962955683 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.05.2025

73 Titular/es:

**INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH
INSTITUTE (100.00%)
No. 195, Sec. 4, Chung Hsing Rd. Chutung
310401 Hsinchu, TW**

72 Inventor/es:

**FU, CHIH-WEI;
LIU, CHIH-PENG;
CHEN, YI-HSUN;
TU, CHIA-MU y
HUNG, CHIU-LIEN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 3 015 621 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivado de beta-aminoácido, inhibidor de cinasa y composición farmacéutica que lo contiene, y uso del mismo

5 Campo técnico de la invención

La presente divulgación se refiere a un compuesto novedoso, y particularmente a un derivado β -aminoácido novedoso, inhibidor de cinasa y composición farmacéutica que contiene el mismo, y usos del mismo.

10 Antecedentes de la invención

Con el fin de mantener el globo ocular en una cierta forma para mantener la función óptica y el metabolismo del ojo, el cuerpo ciliar segregará humor acuoso para realizar este trabajo. Cuando se bloquea la vía de drenaje del humor acuoso y éste se acumula, el resultado será un aumento de la presión intraocular, que es el mayor factor de riesgo de glaucoma.

15

En la actualidad, se sabe que el drenaje del humor acuoso se produce principalmente de las tres formas siguientes: (1) Vía del canal de Schlemm (vía principal, convencional); (2) Vía úvea-esclerótica (pequeña cantidad), aproximadamente 10 %-20 %, y (3) Absorción en la superficie del iris (cantidad menor). Los mecanismos de reducción de la presión intraocular de los fármacos comúnmente usados para el glaucoma son: (a) reducir la producción de humor acuoso, tal como los bloqueadores de los β -receptores, los inhibidores de la anhidrasa carbónica y los agonistas de los α -receptores; y b) aumentar el drenaje del humor acuoso (ruta uveoescleral), tal como los análogos de las prostaglandinas, los agonistas de los receptores alfa, etc.

20

25 La ruta Rho/ROCK (por sus siglas en inglés, respectivamente) desempeña un papel importante en la regulación del citoesqueleto. Los inhibidores de Rho/ROCK pueden regular las funciones del citoesqueleto de actina, la matriz extracelular y las células endoteliales del tubo de Schlemm en el tejido de la malla trabecular, reduciendo por lo mismo la presión intraocular.

30 Actualmente, algunas empresas farmacéuticas han empezado a explorar el impacto de los inhibidores de ROCK en la reducción de la presión intraocular en humanos, y han desarrollado sucesivamente nuevos fármacos. Después de evaluar la seguridad y efectividad clínica en humanos, los actuales inhibidores comerciales de ROCK para reducir la presión intraocular incluyen Ripasudil (K-115) y Netarsudil (AR-13324). En el ensayo clínico de fase III de Ripasudil, se observó que la hiperemia conjuntival leve era la reacción adversa más común, con una incidencia de hasta 75 %, y también se produjeron conjuntivitis y queratitis punteada. Netarsudil (AR-13324) es un compuesto inhibidor del transportador ROCK/norepinefrina (NET, por sus siglas en inglés). Además de actuar como un inhibidor de ROCK, también tiene el efecto de inhibir la norepinefrina y tiene la capacidad de reducir continuamente la presión intraocular, y tiene buena tolerancia local, pero todavía tiene hiperemia conjuntival. Además, Netarsudil (AR-13324) en los ensayos clínicos de fase III ROCKET1 y ROCKET2 (total 1.167 pacientes) no es tan efectivo como el fármaco convencional para el tratamiento del glaucoma Timolol en pacientes con presión intraocular < 25 mmHg, pero en pacientes > 25 mmHg, la efectividad es comparable a Timolol.

35

40

Los inhibidores de ROCK conocidos actualmente siguen teniendo diversos efectos secundarios cuando se aplican para reducir la presión intraocular, y el uso a largo plazo de fármacos de mecanismo único puede provocar el problema de la reducción de la efectividad de los fármacos, lo que imposibilita que los pacientes usen un único fármaco por mucho tiempo. Por lo tanto, sigue siendo necesario desarrollar nuevos fármacos reductores de la presión intraocular con nuevos objetivos o múltiples objetivos para reducir efectivamente la presión intraocular y reducir los efectos secundarios.

45

50 El documento US 2012/135984 A1 describe compuestos, composiciones y métodos para tratar enfermedades y condiciones, en donde un inhibidor de una cinasa, tal como la rho cinasa (ROCK), y un inhibidor de uno o más de los transportadores de monoaminas, tal como NET o SERT (por sus siglas en inglés), actúan en conjunto para mejorar la condición.

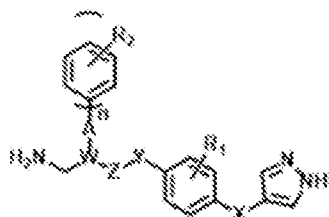
55 El documento WO 2018/094362 A1 se refiere a ciertas amidas y compuestos heterocíclicos y a los usos de estos compuestos para tratar varias enfermedades, incluyendo trastornos autoinmunes, trastornos cardiovasculares, inflamación, trastornos del sistema nervioso central, trastornos tromboticos arteriales, trastornos fibróticos, glaucoma y trastornos neoplásicos.

60 La información completa para prescribir de RHOPRESSA® "RHOPRESSA (solución oftálmica de Netarsudil) Etiqueta, NDA, 208254, ID de referencia: 4194833" describe que el compuesto químico 2,4-dimetilbenzoato de (S)-4-(3-amino-1-(isoquinolin-6-ilamino)-1-oxopropan-2-il)encilo de dimesilato es un inhibidor de la Rho cinasa.

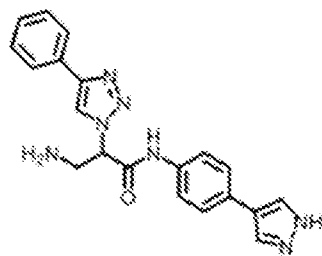
65 Breve descripción de la invención

El invento se define por los atributos de las reivindicaciones independientes.

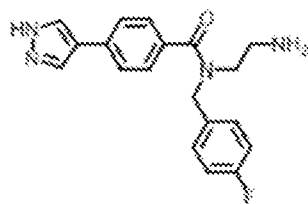
La presente divulgación proporciona un compuesto representado por la Fórmula (I) a (IV), una sal o éster farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato o forma cristalina de los mismos:



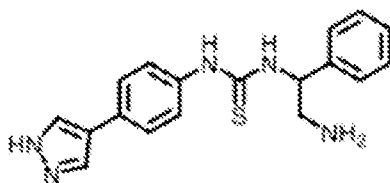
Fórmula (I);



Fórmula (II);



Fórmula (III);

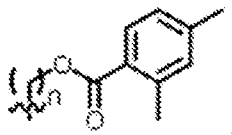


Fórmula (IV).

5

El compuesto representado por las Fórmulas (I) a (IV) es un derivado de β -aminoácido. En la Fórmula (I): X es un enlace simple; Y es NH; Z es C=O, C=S; W es CH; A es un enlace simple, O, OH, OCH₂ o N₃; R₁ es H o F; R₂ es H, F, OH, CF₃, CH₂OH, CHO o

10



y; n es 0 o 1.

15

La presente divulgación también proporciona un inhibidor de cinasa que comprende el compuesto representado por las Fórmulas (I)-(IV), o una sal o éster farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato o forma cristalina de los mismos mencionados anteriormente.

20

La presente divulgación proporciona además una composición farmacéutica que comprende el compuesto representado por las Fórmulas (I)-(IV), o una sal o éster farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato o forma cristalina de los mismos mencionados anteriormente.

25

Asimismo, la presente divulgación proporciona un compuesto representado por las Fórmulas (I)-(IV), o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable de los mismos mencionados anteriormente para su uso como inhibidor de la cinasa.

La presente divulgación también proporciona un uso del compuesto representado por las Fórmulas (I)-(IV), o una sal o éster farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato o forma cristalina de los mismos mencionados anteriormente en la fabricación de un medicamento, en donde el medicamento se usa para una aplicación relacionada *in vivo* que se beneficia de la inhibición de una cinasa, y la cinasa es al menos una seleccionada de un grupo que consiste en: cinasa de cadena ligera de miosina 4; proteína cinasa activada por mitógenos 19; y una proteína cinasa asociada a Rho.

Además, la presente divulgación también proporciona un uso del compuesto representado por las Fórmulas (I)-(IV), o una sal o éster farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato o forma cristalina de los mismos mencionados anteriormente en la fabricación de un medicamento para reducir la presión intraocular.

En las realizaciones siguientes se ofrece una descripción detallada con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de las figuras

La presente invención puede comprenderse mejor al leer la subsecuente descripción detallada y los ejemplos con referencias a los dibujos adjuntos, en donde:

La FIGURA 1A muestra los resultados de las mediciones de la presión intraocular para la administración del compuesto de la presente divulgación con una concentración diferente en ojos de conejo con presión intraocular normal en el Día 1.

La FIGURA 1B muestra los resultados de las mediciones de la presión intraocular para la administración del compuesto de la presente divulgación con diferente concentración en ojos de conejo con presión intraocular normal en el Día 3.

La FIGURA 2 muestra los efectos reductores de la presión intraocular del compuesto de la presente divulgación y de un fármaco comercial en ojos de conejo con presión intraocular normal.

La FIGURA 3A muestra las puntuaciones de la evaluación de la irritación ocular del compuesto de la presente divulgación y de un fármaco comercial.

La FIGURA 3B muestra fotografías de ojos de conejo tratados con el compuesto de la presente divulgación y un fármaco comercial en la evaluación de la irritación ocular.

La FIGURA 3C muestra una fotografía en la que se observa que la córnea de los ojos de conejo administrados con el compuesto de la presente divulgación de forma continua por 7 días no muestra turbidez ni daños en la evaluación de la irritación ocular.

La FIGURA 4 muestra el resultado en prueba en el que en ojos de conejo con presión intraocular normal, la concentración de fármaco del compuesto de la presente divulgación en el tejido objetivo alcanza el efecto objetivo IC₉₀ (por sus siglas en inglés) o más en 8 horas. Para el iris y el cuerpo ciliar, la concentración del Compuesto 20 se mide en unidad ng/g; para el humor acuoso, la concentración del Compuesto 20 se mide en unidad ng/mL.

La FIGURA 5 muestra los resultados de la prueba de margen de seguridad del compuesto de la presente divulgación en ojos de conejo con presión intraocular normal.

La FIGURA 6 muestra los efectos reductores de la presión intraocular del compuesto de la presente divulgación y de un fármaco comercial en macacos con presión intraocular normal.

La FIGURA 7 muestra los efectos reductores de la presión intraocular del compuesto de la presente divulgación y de un fármaco comercial en ojos de conejo con presión intraocular elevada inducida por solución salina hipertónica.

*: prueba t, valor p > 0,05 (en comparación con la solución salina fisiológica); #: prueba t, valor p > 0,05 (en comparación con el vehículo); φ: prueba t, valor p > 0,05 (en comparación con el fármaco comercial (AR-13324)).

La FIGURA 8 muestra los efectos reductores de la presión intraocular del compuesto de la presente divulgación y de un fármaco comercial en ojos de conejo con presión intraocular elevada inducida por perlas magnéticas.

La FIGURA 9 muestra la expresión de la cinasa de cadena ligera de miosina 4 (MYLK-4, por sus siglas en inglés) en ojos de conejo con presión intraocular elevada inducida por perlas magnéticas.

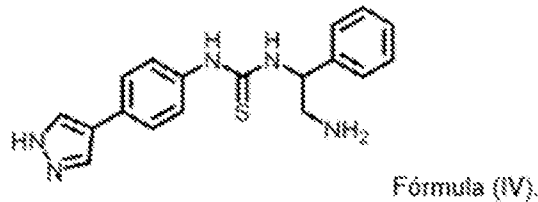
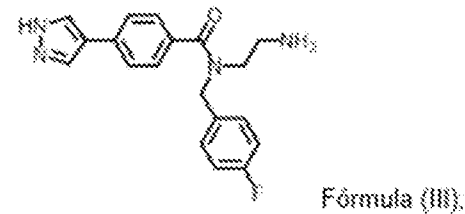
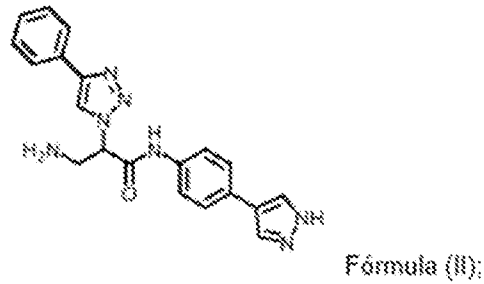
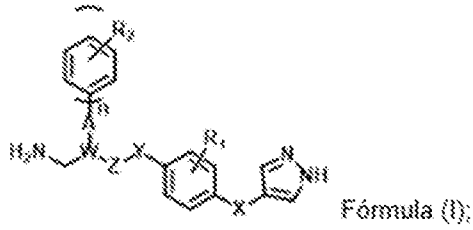
La FIGURA 10 muestra la tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido de ojos de conejo con alta presión intraocular inducida por perlas magnéticas.

Descripción detallada de la invención

En la siguiente descripción detallada se exponen, con fines explicativos, numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de las realizaciones divulgadas. Será evidente, sin embargo, que una o más realizaciones pueden ser practicadas sin estos detalles específicos. En otros casos, las estructuras y dispositivos conocidos se muestran esquemáticamente para simplificar el dibujo. Las referencias a métodos de tratamiento en los párrafos subsecuentes de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) por terapia (o para diagnóstico).

La presente divulgación proporciona un novedoso derivado de β-aminoácido y proporciona una sal o éster farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato o forma cristalina del novedoso derivado de β-aminoácido al mismo tiempo.

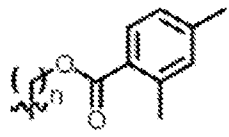
El derivado de β-aminoácido mencionado anteriormente puede comprender un compuesto representado por las Fórmulas (I)-(IV), pero no se limitan a los mismos:



5

El compuesto representado por las Fórmulas (I) a (IV) es un derivado β-aminoácido. En la Fórmula (I) X es un enlace simple; Y es NH; Z es C=O, C=S; W es CH; A es un enlace simple, O, OH, OCH₂, o N₃; R₁ es H o F; R₂ es H, F, OH, CF₃, CH₂OH, CHO o

10

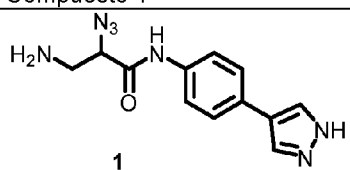
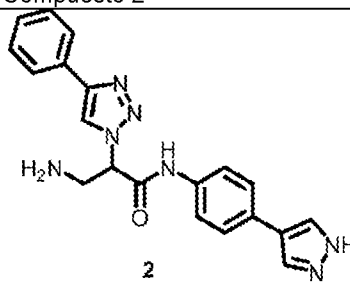
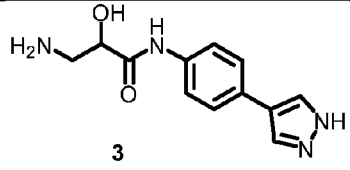
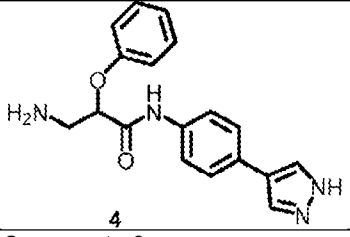
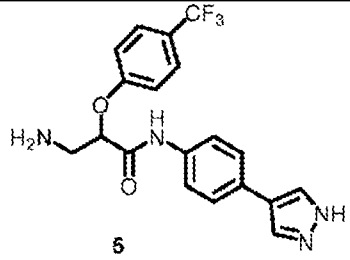
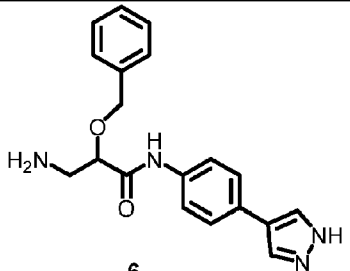
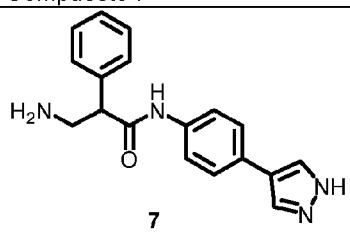
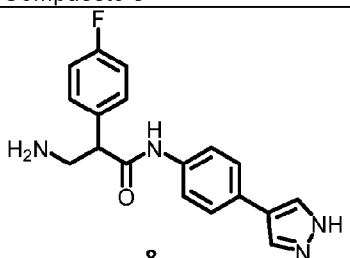
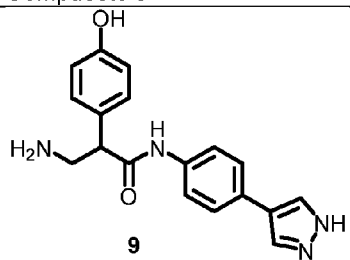
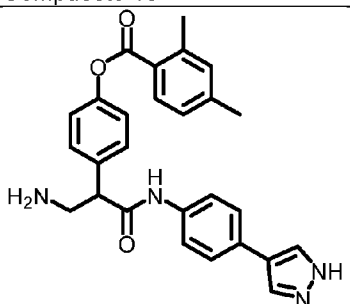


15

y; n es 0 o 1. En la presente divulgación, el compuesto representado por las Fórmulas (I)-(IV) mencionadas anteriormente puede estar presente en forma de los isómeros ópticos individuales, una mezcla de los enantiómeros individuales o un racemato, y puede comprender, pero no se limita a, un compuesto mostrado en la Tabla 1 a continuación.

20

Tabla 1. Los Compuestos 1 a 15, 17 y 19 a 21 son ejemplos de un compuesto representado por las Fórmulas (I)-(IV), mientras que los Compuestos 16 y 18 se incluyen a título ilustrativo y no entran en el alcance de la reivindicación 1.

Número de compuesto	Compuesto 1	Compuesto 2
Estructura	 <p style="text-align: center;">1</p>	 <p style="text-align: center;">2</p>
Número de compuesto	Compuesto 3	Compuesto 4
Estructura	 <p style="text-align: center;">3</p>	 <p style="text-align: center;">4</p>
Número de compuesto	Compuesto 5	Compuesto 6
Estructura	 <p style="text-align: center;">5</p>	 <p style="text-align: center;">6</p>
Número de compuesto	Compuesto 7	Compuesto 8
Estructura	 <p style="text-align: center;">7</p>	 <p style="text-align: center;">8</p>
Número de compuesto	Compuesto 9	Compuesto 10
Estructura	 <p style="text-align: center;">9</p>	 <p style="text-align: center;">10</p>

Número de compuesto	Compuesto 11	Compuesto 12
Estructura	<p style="text-align: center;">11</p>	<p style="text-align: center;">12</p>
Número de compuesto	Compuesto 13	Compuesto 14
Estructura	<p style="text-align: center;">13</p>	<p style="text-align: center;">14</p>
Número de compuesto	Compuesto 15	Compuesto 16
Estructura	<p style="text-align: center;">15</p>	<p style="text-align: center;">16</p>
Número de compuesto	Compuesto 17	Compuesto 18
Estructura	<p style="text-align: center;">17</p>	<p style="text-align: center;">18</p>
Número de compuesto	Compuesto 19	Compuesto 20
Estructura	<p style="text-align: center;">19</p>	<p style="text-align: center;">20</p>
Número de compuesto	Compuesto 21	
Estructura	<p style="text-align: center;">21</p>	

En una realización, el compuesto representado por la Fórmula (I) de la presente divulgación puede ser el Compuesto 7 mencionado anteriormente, que es un compuesto racémico. En otra realización, el compuesto representado por la Fórmula (I) de la presente divulgación puede ser el Compuesto 20 mencionado anteriormente,

que es un compuesto de forma S, y más específicamente, es un enantiómero S.

5 En una realización, el derivado de β -aminoácido novedoso de la presente divulgación mencionado anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del derivado de β -aminoácido novedoso puede tener un efecto de inhibición de una cinasa, pero no se limitan a dentro del mismo. Los ejemplos de las cinasas mencionadas pueden comprender, pero no se limitan a, la cinasa de cadena ligera de miosina 4 (MYLK-4), la proteína cinasa activada por mitógenos 19 (MAPK19, YSK-4, por sus siglas en inglés, respectivamente), una proteína cinasa asociada a Rho (ROCK) o cualquier combinación de las mismas. La proteína cinasa asociada a Rho (ROCK) puede comprender, pero no se limita a, la proteína cinasa asociada a Rho-1 (ROCK-1).

10 En una realización, el derivado de β -aminoácido novedoso de la presente divulgación mencionado anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del derivado de β -aminoácido novedoso puede tener un efecto de inhibición de la cinasa de cadena ligera de miosina 4.

15 Asimismo, el novedoso derivado de β -aminoácido de la presente divulgación mencionado anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del novedoso derivado de β -aminoácido puede tener un efecto inhibitorio de objetivo sinérgico. Por lo tanto, en otra realización, el derivado de β -aminoácido novedoso de la presente divulgación mencionado anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del derivado de β -aminoácido novedoso puede tener un efecto de inhibición de la proteína cinasa activada por mitógenos 19.

20 Además, en otra realización, el derivado de β -aminoácido novedoso de la presente divulgación mencionado anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del derivado de β -aminoácido novedoso puede tener un efecto de inhibición simultánea de la cinasa de cadena ligera de miosina 4 y una proteína cinasa asociada a Rho.

25 También, en otra realización, en otra realización, el derivado de β -aminoácido novedoso de la presente divulgación mencionado anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del derivado de β -aminoácido novedoso puede tener un efecto de inhibición simultánea de la proteína cinasa activada por mitógenos 19 y una proteína cinasa asociada a Rho.

30 Además, el nuevo derivado de β -aminoácido de la presente divulgación mencionado anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del nuevo derivado de β -aminoácido puede tener un efecto de inhibición simultánea de la cinasa de cadena ligera de miosina 4, de la proteína cinasa activada por mitógenos 19 y de una proteína cinasa asociada a Rho.

35 En otra realización, el novedoso derivado de β -aminoácido de la presente divulgación mencionado anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del novedoso derivado de β -aminoácido puede tener un efecto de reducción de la presión intraocular. En una realización específica, el nuevo derivado de β -aminoácido de la presente divulgación mencionado anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del nuevo derivado de β -aminoácido puede conseguir un efecto de reducción de la presión intraocular a través de la cinasa de cadena ligera de miosina 4, la proteína cinasa activada por mitógenos 19, una proteína cinasa asociada a Rho o cualquier combinación de las mismas.

40 Dado que el novedoso derivado de β -aminoácido de la presente divulgación mencionado anteriormente o una sal o éster farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato o forma cristalina del novedoso derivado de β -aminoácido puede tener un efecto de reducción de la presión intraocular, puede aplicarse a un tratamiento y/o prevención de la hipertensión ocular o de una enfermedad con hipertensión ocular. La hipertensión ocular antes mencionada se refiere a un síntoma de presión intraocular mayor a un rango normal. Por ejemplo, la presión intraocular normal humana es de aproximadamente 10-21 mmHg, y la hipertensión ocular es un síntoma de presión intraocular mayor a aproximadamente 21 mmHg, tal como mayor a aproximadamente 22 mmHg, mayor a aproximadamente 25 mmHg, mayor a aproximadamente 30 mmHg, etc., pero no se limitan a dentro del mismo.

45 En una realización, el derivado de β -aminoácido novedoso de la presente divulgación mencionado anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del derivado de β -aminoácido novedoso puede aplicarse a un tratamiento y/o prevención de la hipertensión ocular con una presión intraocular mayor a aproximadamente 25 mmHg, tal como mayor a aproximadamente 30 mmHg.

50 Basado en lo anterior, la presente divulgación también proporciona un inhibidor de cinasa, que puede comprender cualquiera de los derivados de β -aminoácido novedosos de la presente divulgación mencionados anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del derivado de β -aminoácido novedoso, pero no se limitan a dentro del mismo.

55 En el inhibidor de cinasa de la presente divulgación, el nuevo derivado de β -aminoácido de la presente divulgación mencionado anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del

nuevo derivado de β -aminoácido puede tener un efecto de inhibición de una cinasa, y la cinasa descrita en la presente puede comprender, pero no se limitan a, la cinasa de cadena ligera de miosina 4, la proteína cinasa activada por mitógenos 19, una proteína cinasa asociada a Rho o cualquier combinación de las mismas. La proteína cinasa asociada a Rho puede comprender, pero no se limitan a, la proteína cinasa asociada a Rho-1.

En el inhibidor de cinasa de la presente divulgación, en una realización, el derivado de β -aminoácido novedoso de la presente divulgación mencionado anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del derivado de β -aminoácido novedoso puede tener un efecto de inhibición de la cinasa de cadena ligera de miosina 4 y/o proteína cinasa activada por mitógenos 19. En el inhibidor de cinasa de la presente divulgación, en otra realización, el derivado de β -aminoácido novedoso de la presente divulgación mencionado anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del derivado de β -aminoácido novedoso, además de un efecto de inhibición de la cinasa de cadena ligera de miosina 4 y/o de la proteína cinasa activada por mitógenos 19, también puede tener un efecto de inhibición de una proteína cinasa asociada a Rho.

En una realización, el inhibidor de cinasa de la presente divulgación puede comprender el Compuesto 7 anterior (que es un compuesto racémico) o el Compuesto 20 (que es un compuesto en forma de S). En esta realización específica, el inhibidor de cinasa de la presente divulgación puede tener un efecto de inhibición simultánea de la cinasa de cadena ligera de miosina 4, la proteína cinasa activada por mitógenos 19 y una proteína cinasa asociada a Rho.

Adicionalmente, basado en lo anterior, la presente divulgación también puede proporcionar un uso del derivado de β -aminoácido novedoso de la presente divulgación mencionado anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del derivado de β -aminoácido novedoso como un inhibidor de cinasa.

En el uso de la presente divulgación, con respecto a la descripción pertinente para el efecto inhibidor de la cinasa del nuevo derivado de β -aminoácido de la presente divulgación mencionado anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del nuevo derivado de β -aminoácido es el mismo que el descrito anteriormente, y así no se repite en la presente.

En este uso de la presente divulgación, en una realización específica, el derivado de β -aminoácido novedoso de la presente divulgación mencionado anteriormente puede ser el Compuesto 7 anterior (que es un compuesto racémico) o el Compuesto 20 (que es un compuesto de forma S). En esta realización específica, el inhibidor de cinasa mencionado anteriormente puede tener un efecto de inhibición simultánea de la cinasa de cadena ligera de miosina 4, de la proteína cinasa activada por mitógenos 19 y de una proteína cinasa asociada a Rho.

Además, la presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica, que puede comprender, pero no se limita a, cualquiera de los novedosos derivados de β -aminoácidos de la presente divulgación mencionados anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable de los novedosos derivados de β -aminoácidos, pero no se limitan a dentro del mismo.

En la composición farmacéutica de la presente divulgación, con respecto a todos para el efecto inhibidor de cinasa del derivado de β -aminoácido novedoso de la presente divulgación mencionado anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del derivado de β -aminoácido novedoso son los mismos que los descritos anteriormente, y así no se repiten en la presente.

En una realización, la composición farmacéutica de la presente divulgación puede comprender el anterior Compuesto 7 que es un compuesto racémico. En otra realización, la composición farmacéutica de la presente divulgación puede comprender el anterior Compuesto 20 que es un compuesto de forma S.

Además, en una realización, la composición farmacéutica mencionada de la presente divulgación también puede comprender un portador o sal farmacéuticamente aceptable, pero no se limitan a los mismos.

El portador farmacéuticamente aceptable antes mencionado puede comprender, pero no se limita a, un disolvente, un medio de dispersión, un recubrimiento, un agente antibacteriano y antifúngico, o un agente isotónico y retardador de la absorción, etc. que sea adecuado para la administración farmacéutica. La composición farmacéutica puede formularse en formas de dosificación para diferentes vías de administración usando métodos convencionales.

Además, la sal farmacéuticamente aceptable mencionada anteriormente puede comprender, pero no se limita a, sales que incluyen catión inorgánico, tales como sales de metales alcalinos tales como sal de sodio, sal de potasio o sal de amina, tales como sal de metales alcalinotérreos tales como sal de magnesio o sal de calcio, tales como la sal que contiene catión bivalente o tetravalente tal como sal de zinc, sal de aluminio o sal de circonio. Además, la sal farmacéuticamente aceptable puede ser también una sal orgánica, tal como sal de dicitlohexilamina, metil-D-glucamina y sal de aminoácidos tal como arginina, lisina, histidina o glutamina.

Asimismo, la composición farmacéutica de la presente divulgación puede administrarse a un sujeto que la necesite, pero no se limita al mismo. La vía de administración de la composición farmacéutica de la presente divulgación puede incluir vía parenteral, vía oral, por aerosol de inhalación o por depósito implantado, pero no se limita a las mismas. Los métodos parenterales pueden comprender, pero no se limitan a, el untado de la región afectada, la inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinoval, intrasternal, intratecal, intraleaional, el uso oftálmico externo y la inyección intraocular, así como técnicas de infusión, etc.

La forma de uso tópico para untar puede incluir pomada, emulsión, líquido, gel, etc., pero no se limitan a las mismas. Además, la forma de uso externo para los ojos puede incluir, pero no se limita a, gotas para los ojos, pomada para los ojos, gel para los ojos, etc.

El sujeto que necesita que se le administre la composición farmacéutica antes mencionada puede comprender, pero no se limita a, un vertebrado. El vertebrado mencionado puede ser un pez, un anfibio, un reptil, un ave o un mamífero, pero no se limitan a los mismos. Los ejemplos de mamíferos pueden ser, pero no se limitan a, un humano, un orangután, un mono, un caballo, un burro, un perro, un gato, un conejo, una cobaya, una rata y un ratón. En una realización, dicho sujeto puede ser un humano.

En una realización, la composición farmacéutica arriba mencionada de la presente divulgación puede usarse para cualquier aplicación relacionada *in vivo* que se beneficie de la inhibición de una cinasa, tal como beneficiarse del tratamiento y/o prevención de cualquier enfermedad o síntoma que se beneficie de la inhibición de una cinasa, y ejemplos de la cinasa descrita en la presente pueden incluir, pero no se limitan a, cinasa de cadena ligera de miosina 4, proteína cinasa activada por mitógenos 19, una proteína cinasa asociada a Rho, o cualquier combinación de las mismas.

Además, la aplicación *in vivo* mencionada puede incluir, pero no se limita a, una aplicación relacionada con la oftalmología y/o una aplicación relacionada con el pulmón, etc. Los ejemplos de la aplicación relacionada con la oftalmología puede incluir, protección del nervio óptico, y/o prevención y/o tratamiento de la presión intraocular alta, glaucoma, apoplejía ocular, degeneración macular, edema macular, retinopatía diabética, distrofia corneal endotelial de Fuchs (FECD, por sus siglas en inglés), fibrosis corneal o cualquier combinación de las mismas, etc., pero no se limitan las mismas. Entre estos, el glaucoma puede incluir el glaucoma por exfoliación (XFG, por sus siglas en inglés), el glaucoma de ángulo abierto, el glaucoma de ángulo cerrado, el glaucoma secundario, el glaucoma congénito, etc., pero no se limita a los mismos. Además, entre los ejemplos de aplicación relacionados con el pulmón mencionados anteriormente pueden incluirse, pero no se limitan a, la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión pulmonar, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD, por sus siglas en inglés), la fibrosis pulmonar idiopática (IPF, por sus siglas en inglés), el enfisema pulmonar, el cáncer de pulmón o cualquier combinación de los mismos, etc.

Asimismo, la composición farmacéutica de la presente divulgación puede formularse en un preparado farmacéutico, pero no se limita al mismo. En una realización, la composición farmacéutica de la presente divulgación puede formularse en un preparado oftálmico, pero no se limita al mismo. Los ejemplos de la preparación oftálmica mencionada anteriormente pueden incluir, pero no se limitan a, un colirio, una pomada oftálmica, un gel oftálmico, una formulación para inyección intraocular, etc. En una realización específica, la composición farmacéutica de la presente divulgación puede formularse en un colirio.

Además, la presente divulgación también puede proporcionar un uso de cualquiera de los derivados de β -aminoácido novedosos de la presente divulgación mencionados anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del derivado de β -aminoácido novedoso en la fabricación de un medicamento, en donde el medicamento se usa para una aplicación relacionada *in vivo* que se beneficia de la inhibición de una cinasa. Los ejemplos de las cinasas mencionadas anteriormente pueden incluir, pero no se limitan a, la cinasa de cadena ligera de miosina 4, la proteína cinasa activada por mitógenos 19, una proteína cinasa asociada a Rho, o cualquier combinación de las mismas.

En una realización, en el uso antes mencionado de la presente divulgación, lo que se usa es el Compuesto 7, que es un compuesto racémico. En una realización, en el uso antes mencionado de la presente divulgación, lo que se usa es el Compuesto 20, que es un compuesto de forma S.

Asimismo, en el uso mencionado de la presente divulgación, la aplicación *in vivo* anterior puede incluir, pero no se limitan a, una aplicación relacionada con la oftalmología y/o una aplicación relacionada con el pulmón, etc. Los ejemplos de la aplicación relacionada con la oftalmología pueden incluir, protección del nervio óptico, y/o prevención y/o tratamiento de la presión intraocular alta, glaucoma, apoplejía ocular, degeneración macular, edema macular, retinopatía diabética, distrofia corneal endotelial de Fuchs (FECD), fibrosis corneal o cualquier combinación de las mismas, etc., pero no se limitan a dentro del mismo. Entre estos, el glaucoma puede incluir el glaucoma por exfoliación, el glaucoma de ángulo abierto, el glaucoma de ángulo cerrado, el glaucoma secundario, el glaucoma congénito, etc., pero no se limita a los mismos. Además, entre los ejemplos de aplicación relacionados con el pulmón mencionados anteriormente pueden incluirse, pero no se limitan a, la prevención y/o el tratamiento

de la hipertensión pulmonar, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), la fibrosis pulmonar idiopática (IPF), el enfisema pulmonar, el cáncer de pulmón o cualquier combinación de los mismos, etc.

5 En una realización, en el uso antes mencionado de la presente divulgación, la aplicación *in vivo* anterior puede ser la prevención y/o el tratamiento del glaucoma.

10 En el uso antes mencionado de la presente divulgación, en otra realización, un portador o sal farmacéuticamente aceptable puede estar junto con cualquiera de los derivados de β -aminoácido novedosos de la presente divulgación mencionados anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable de los derivados de β -aminoácido novedosos para preparar el medicamento mencionado anteriormente.

15 Con respecto al portador o sal farmacéuticamente aceptable descrito en la presente divulgación, consultar la descripción pertinente del portador o sal farmacéuticamente aceptable en la composición farmacéutica de la presente divulgación anterior, y así no se repite en la presente.

20 Asimismo, la presente divulgación también proporciona un uso de cualquiera de los derivados de β -aminoácido novedosos de la presente divulgación mencionados anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable del derivado de β -aminoácido novedoso en la fabricación de un medicamento para reducir la presión intraocular.

En una realización, en el uso antes mencionado de la presente divulgación, lo que se usa es el Compuesto 7, que es un compuesto racémico. En una realización, en el uso antes mencionado de la presente divulgación, lo que se usa es el Compuesto 20, que es un compuesto de forma S.

25 Asimismo, en una realización, en el uso antes mencionado de la presente divulgación, el medicamento anterior para reducir la presión intraocular puede usarse para prevenir y/o tratar la hipertensión ocular o una enfermedad con hipertensión ocular. En cuanto a las descripciones pertinentes de la hipertensión ocular o una enfermedad con hipertensión ocular, consultar las descripciones anteriores, y así no se repiten en la presente.

30 En una realización, en el uso antes mencionado de la presente divulgación, el medicamento anterior para reducir la presión intraocular puede ser un medicamento para tratar el glaucoma. Los glaucomas mencionados anteriormente pueden incluir, pero no se limitan a, glaucoma por exfoliación, glaucoma de ángulo abierto, glaucoma de ángulo cerrado, glaucoma secundario, glaucoma congénito, etc.

35 Además, en una realización, en el uso antes mencionado de la presente divulgación, el medicamento anterior para reducir la presión intraocular puede ser un preparado oftálmico. Los preparados oftálmicos pueden incluir, pero no se limitan a, un colirio, una pomada oftálmica, un gel oftálmico, una formulación para inyección intraocular, etc. En una realización específica, el medicamento anterior para reducir la presión intraocular puede ser un colirio.

40 En el uso mencionado anteriormente de la presente divulgación, en otra realización, un portador o sal farmacéuticamente aceptable puede estar junto con cualquiera de los derivados de β -aminoácido novedosos de la presente divulgación mencionados anteriormente o una sal o éster, hidrato, solvato o forma cristalina farmacéuticamente aceptable de los derivados de β -aminoácido novedosos para preparar el medicamento para reducir la presión intraocular mencionado anteriormente.

45 Con respecto al portador o sal farmacéuticamente aceptable descrito en la presente divulgación, consultar la descripción pertinente del portador o sal farmacéuticamente aceptable en la composición farmacéutica de la presente divulgación anterior, y así no se repite en la presente.

50 Ejemplos

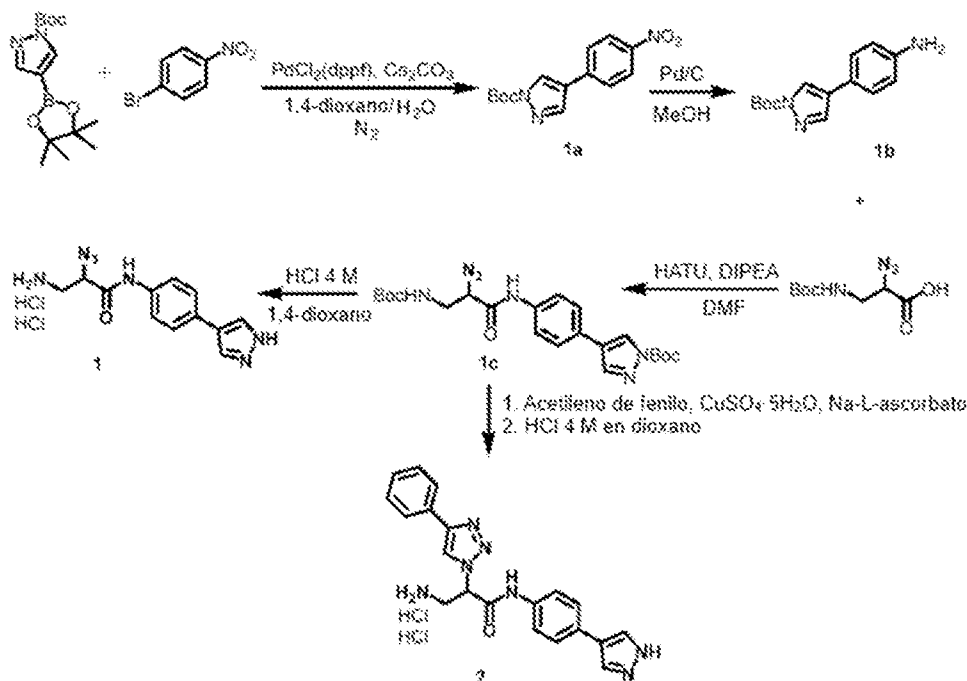
Ejemplo 1

Síntesis de derivados de β -aminoácidos

55 1. Síntesis del Compuesto 1 y del Compuesto 2

El esquema de síntesis del Compuesto 1 y del Compuesto 2 se muestra en el siguiente Esquema 1.

Esquema 1



(1) Ejemplo de síntesis 1

5 A una mezcla de 1-bromo-4-nitrobenzono (210 mg, 1,04 mmol), éster pinacol de ácido 1-Boc-4-pirazoleborónico (305 mg, 1,04 mmol), PdCl₂(dppf) (76 mg, 103,76 μmol, por sus siglas en inglés) y Cs₂CO₃ (676 mg, 2,08 mmol) en un tubo sellado, se inyectó una mezcla disolvente (dioxano/H₂O = 10/1, 6 mL) bajo argón, y posteriormente se agitó la mezcla mencionada a 90 °C por 6 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria, y el residuo se adicionó con agua y se extrajo con EtOAc (15 mL x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El filtrado se concentró y el residuo se purificó por cromatografía tipo flash (EtOAc/Hex = 15 %) sobre gel de sílice para dar *tert*-butil-4-(3-(2-(dimetilamino)etoxi)-4-nitrofenil)-1*H*-pirazol (**1a**) como un sólido blanco (249 mg, 64 %).

15 A una solución de *tert*-butil-4-(3-(2-(dimetilamino)etoxi)-4-nitrofenil)-1*H*-pirazol (**1a**) (360 mg) en MeOH (8 mL), se añadió Pd/C al 10 %, y la mezcla de reacción mencionada se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de globo de H₂ por 1 hora. La mezcla se filtró y el filtrado se evaporó por rotavapor para dar *tert*-butil-(4-amino-3-(2-(dimetilamino)etoxi)fenil)-1*H*-pirazol (**1b**) como un sólido marrón (320 mg, 97 %). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8,44 (s, 1H), 8,27 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 8,06 (s, 1H), 7,69-7,68 (m, 4H), 1,68 (s, 9H), 1,59 (s, 9H).

20 Se disolvieron ácido 2-azido-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propanoico (1,2 eq), HATU (1,5 eq) y DIPEA (2 eq) en DMF (0,1 M); (por sus siglas en inglés, respectivamente), y se añadió dentro del mismo *tert*-butil-(4-amino-3-(2-(dimetilamino)etoxi)fenil)-1*H*-pirazol (**1b**) (1,0 eq) para formar una mezcla y se agitó a temperatura ambiente por 1 hora. La reacción se trabajó con agua y se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se recolectó, se secó sobre Na₂SO₄ y el extracto se condensó a presión reducida. El residuo se purificó con gel de sílice (EtOAc/Hex = 20 %), y se obtuvo el compuesto deseado 4-(4-(2-azido-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**1c**). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8,41 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,58 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,47 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 5,07 (s, 1H), 4,27 (m, 1H), 3,72 (m, 1H), 3,60 (m, 1H), 1,65 (s, 9H), 1,43 (s, 9H).

30 HCl 4 M en 1,4-dioxano (20 eq) y 4-(4-(2-azido-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**1c**) (1 eq) se agitaron a temperatura ambiente por 1 hora. El sólido blanco se recolectó por filtración, se lavó con 1,4-dioxano y DCM (por sus siglas en inglés). El sólido blanco se secó al vacío para dar diclorhidrato de N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-azidopropanamida (**1**). ¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ: 8,30 (s, 2H), 7,67 (m, 2H), 7,55 (m, 2H), 4,76 (m, 1H), 3,57 (dd, J = 13,5, 4,5 Hz, 1H), 3,44 (dd, J = 13,5, 7,5 Hz, 1H), 3,60 (m, 1H).

(2) Ejemplo de síntesis 2

40 En THF (por sus siglas en inglés) y 2-3 gotas de H₂O se agitaron 4-(4-(2-azido-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**1c**) (1 eq), acetileno de fenilo (1,1 eq), sulfato de cobre(II) (0,2 eq) y (+)-Na-L-ascorbato (0,2 eq). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante

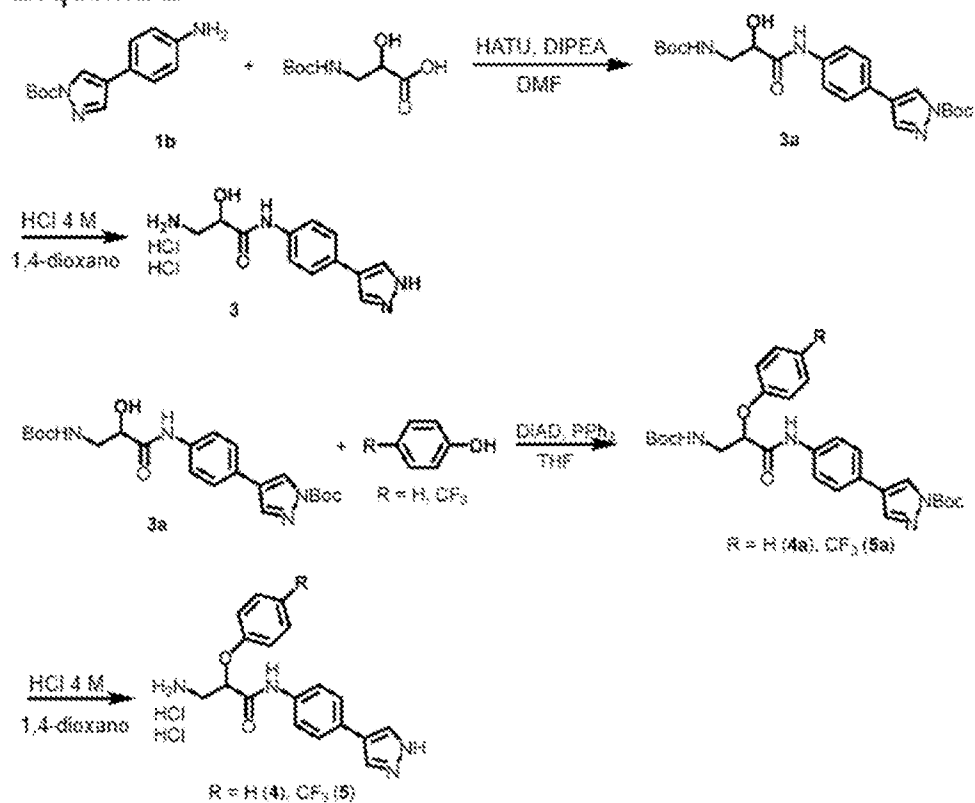
la noche y posteriormente se eliminó el disolvente. El residuo se purificó con gel de sílice (EtOAc/Hex = 20 %), y se obtuvo el compuesto deseado 4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8,98 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,83 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,58 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,46 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,42 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 7,34 (t, J = 7,0 Hz, 1H), 5,61 (s, 1H), 5,15 (s, 1H), 4,10-4,06 (m, 1H), 3,96-3,95 (m, 1H), 1,65 (s, 9H), 1,40 (s, 9H).

El método de preparación del Compuesto **2** fue similar al del Compuesto **1**. La distinción entre los mismos es que el compuesto 4-(4-(2-azido-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo se sustituyó por el compuesto 4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo para obtener el producto diclorhidrato de N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)propanamida (**2**). ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 8,63 (s, 1H), 8,61 (s, 1H), 7,88 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,74 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,67 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,45 (t, J = 8,5 Hz, 2H), 7,37 (t, J = 8,5 Hz, 1H), 5,97 (t, J = 6,0 Hz, 1H), 5,54 (s, 1H), 3,92 (d, J = 6,0 Hz, 2H), 3,34 (s, 2H).

2. Síntesis del Compuesto 3 al Compuesto 5

El esquema de síntesis del Compuesto **3** al Compuesto **5** se muestra en el siguiente Esquema 2.

Esquema 2



(3) Ejemplo de síntesis 3

El método de preparación del Compuesto **3a** fue similar al del Compuesto **1c**. La distinción entre los mismos es que el compuesto ácido 2-azido-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propanoico se sustituyó por el compuesto ácido 3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-hidroxi-propanoico para obtener el producto 4-(4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-hidroxi-propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**3a**). El método de síntesis del producto final diclorhidrato de N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-hidroxi-propanamida (**3**) fue similar al del Compuesto **1**. ¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ: 8,20 (s, 2H), 7,70 (d, J = 8,0, 2H), 7,56 (d, J = 8,0, 2H), 4,64 (dd, J = 8,5, 4,5 Hz, 1H), 3,51 (dd, J = 13,5, 4,5 Hz, 1H), 3,36-3,31 (m, 1H).

(4) Ejemplo de síntesis 4

A una solución de grado cero del Compuesto **3a** (1 eq), fenol (1 eq), PPh₃ (2 eq) en 10 mL de THF, se añadió DIAD (1,5 eq, por sus siglas en inglés) por goteo. La mezcla mencionada se agitó a temperatura ambiente por 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna (EtOAc/Hex

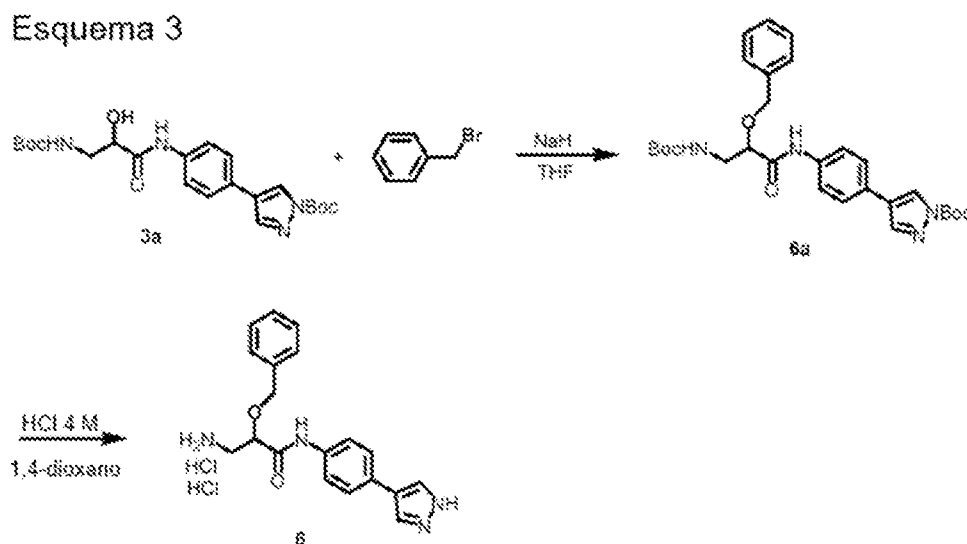
= 10 %) para obtener 4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-fenoxipropanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**4a**), como un aceite. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8,26 (s, 2H), 7,96 (s, 1H), 7,58 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,48 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,35 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 7,09-6,99 (m, 3H), 5,03 (brs, 1H), 4,76 (t, J = 5,0 Hz, 1H), 3,81-3,78 (m, 1H), 3,73-3,70 (m, 1H), 1,68 (s, 9H), 1,45 (s, 9H). El método de síntesis del producto final diclorhidrato de N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-fenoxipropanamida (**4**) fue similar al del Compuesto **1**. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 8,30 (s, 2H), 7,66 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,59 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,36 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,12 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,07 (t, J = 7,0 Hz, 1H), 7,01-6,98 (m, 1H), 3,75-3,66 (m, 1H), 3,60-3,50 (m, 2H).

(5) Ejemplo de síntesis 5

El método de síntesis del compuesto diclorhidrato de N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-(4-(trifluorometil)fenoxi)propanamida (**5**) fue similar al del Compuesto **4**. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 8,14 (br, 2H), 7,68 (d, J = 9,0, 2H), 7,63 (d, J = 6,5, 2H), 7,58 (d, J = 6,5, 2H), 7,26 (d, J = 9,0, 2H), 5,21 (m, 1H), 3,60-3,58 (m, 2H). ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 8,14 (br, 2H), 7,68 (d, J = 9,0, 2H), 7,63 (d, J = 6,5, 2H), 7,58 (d, J = 6,5, 2H), 7,26 (d, J = 9,0, 2H), 5,21 (m, 1H), 3,60-3,58 (m, 2H).

3. Síntesis del Compuesto 6

El esquema de síntesis del Compuesto **6** se muestra en el siguiente Esquema 3.



(6) Ejemplo de síntesis 6

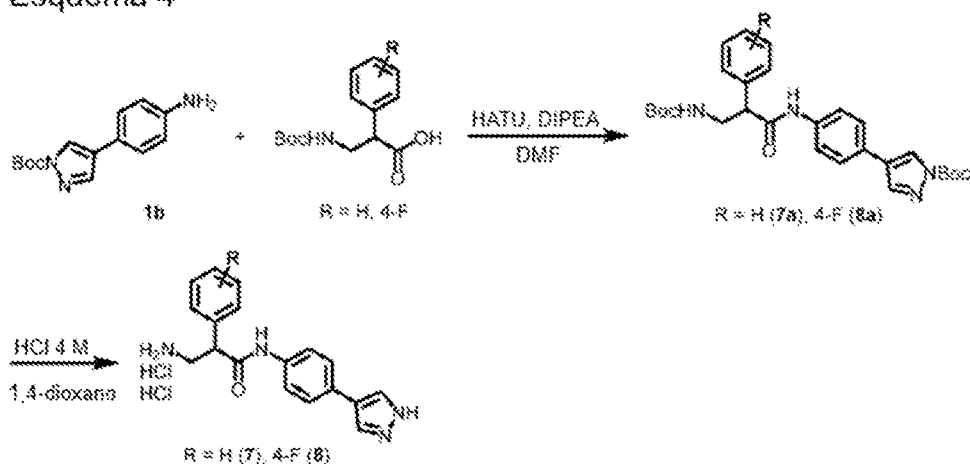
A una solución de grado cero del Compuesto **3a** (1 eq) en 10 mL de THF, se añadió NaH (1,5 eq). La mezcla mencionó encima estuvo barajada en cero grado por 1 hora, y posteriormente se añadió BnBr (1.5 eq) por goteo dentro de la misma. La mezcla de reacción mencionada se agitó a temperatura ambiente por 6 horas. La reacción se trabajó con agua y se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se recolectó y se secó sobre Na₂SO₄, y posteriormente el extracto se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó con gel de sílice (EtOAc/Hex = 5 % a 15 %) para dar el compuesto deseado 4-(2-(benziloxi)-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**6a**). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8,44 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 7,97 (s, 1H), 7,56 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,48 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,41-7,35 (m, 5H), 4,93 (brs, 1H), 4,82 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 4,66 (d, J = 11,0 Hz, 1H), 4,06 (t, J = 5,0 Hz, 1H), 3,65-3,61 (m, 2H), 1,68 (s, 9H), 1,44 (s, 9H).

El método de síntesis del producto final diclorhidrato de N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-(benziloxi)propanoamida (**6**) fue similar al del Compuesto **1**. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 8,46 (s, 2H), 7,69-7,66 (m, 4H), 7,49 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,38 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 7,34-7,31 (m, 1H), 4,78 (d, J = 11,5 Hz, 1H), 4,75 (d, J = 11,5 Hz, 1H), 4,36-4,34 (m, 1H), 3,36-3,31 (m, 2H).

4. Síntesis del Compuesto 7 y del Compuesto 8

El esquema de síntesis del Compuesto **7** y del Compuesto **8** se muestra en el siguiente Esquema 4.

Esquema 4



(7) Ejemplo de síntesis 7

5 Los métodos de preparación de los Compuestos intermedios **7a** y **8a** fueron similares a los del Compuesto **1c**.

El compuesto intermedio 4-(4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-fenilpropanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo **7a** era un polvo blanco. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8,22 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,49 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,42 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 5,14 (s, 1H), 3,90 (m, 1H), 3,65 (m, 1H), 3,55 (m, 1H), 1,64 (s, 9H), 1,40 (s, 9H).

10 El Compuesto intermedio 4-(4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-fluorofenil)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo **8a** era un polvo blanco. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): 8,25 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,53-7,51 (m, 3H), 7,45 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,34 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,05 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H), 5,13 (brs, NH, 1H), 3,92 (s, 1H), 3,65-3,64 (m, 1H), 3,54-3,51 (m, 1H), 1,67 (s, 9H), 1,47 (s, 9H).

15 Los métodos de preparación de los Compuestos finales **7** y **8** fueron similares a los del Compuesto **1**.

20 El compuesto final diclorhidrato de N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-fenilpropanamida (**7**) era un polvo blanco. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 8,55 (br, 2H), 7,69 (d, $J = 8,5$, 2H), 7,63 (d, $J = 8,5$, 2H), 7,47-7,34 (m, 5H), 4,15-4,17 (m, 1H), 3,61 (dd, $J = 12,5$, 9,5 Hz, 1H), 3,25 (dd, $J = 12,5$, 5,5 Hz, 1H), 3,60 (m, 1H).

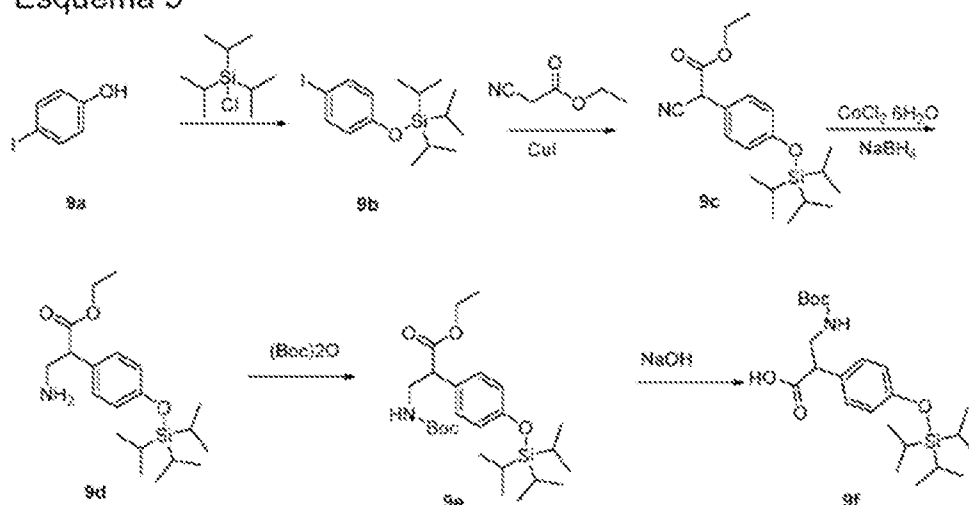
25 El compuesto final diclorhidrato de N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-(4-fluorofenil)propanamida (**8**) era un polvo blanco. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ : 8,07 (s, 2H), 7,42 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,34 (dd, $J = 5,5$, 8,5 Hz, 2H), 7,26 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,08 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H), 4,06 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 3,52 (dd, $J = 7,5$, 13,0 Hz, 1H), 3,33 (dd, $J = 7,5$, 13,0 Hz, 1H).

5. Síntesis del Compuesto 9

(8) Ejemplo de síntesis 8

30 El esquema sintético del Compuesto **9f** se muestra en el siguiente Esquema 5.

Esquema 5



A una solución de yodofenol (**9a**) (100 g, 454,5 mmol) en DCM (1000 mL), se añadió imidazol (68 g, 999,9 mmol), seguido de la adición por goteo de TIPSCI (87,3 g, 454,5 mmol, por sus siglas en inglés). La mezcla mencionada se agitó por 16 horas, se vertió en hielo/agua y se extrajo con DCM. Las fases orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (disolvente de elución: acetato de etilo/éter de petróleo = 1/50) para dar el Compuesto **9b** (170 g, 99,1 %), como un aceite incoloro. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1,05-1,08 (d, 18H), 1,20-1,28 (m, 3H), 6,64-6,66 (m, 2H), 7,47-7,49 (m, 2H).

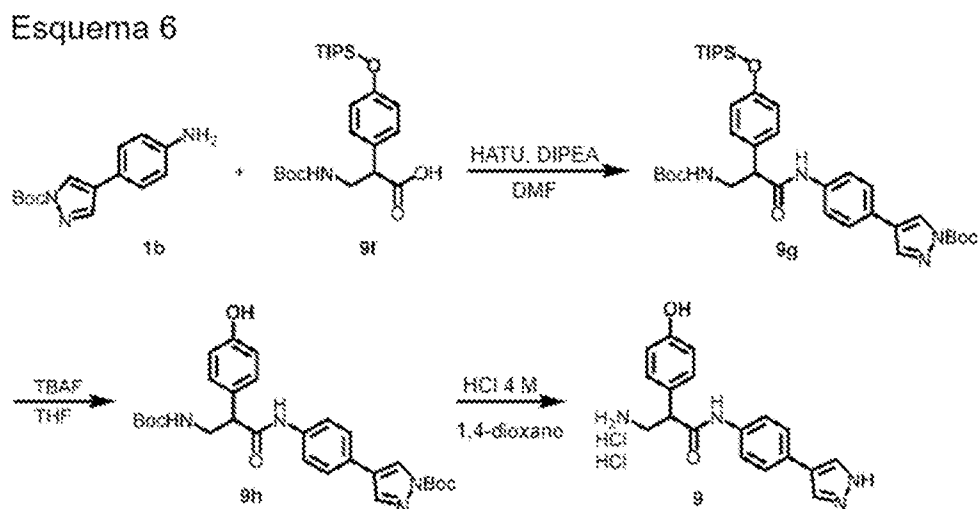
A una solución del Compuesto **9b** (140 g, 372,3 mmol) en dioxano (1500 mL), se añadieron 2-cianoacetato de etilo (63,1 g, 558,8 mmol), ácido picolínico (13,8 g, 111,7 mmol), Cs_2CO_3 (242 g, 744,6 mmol) y CuI (21,2 g, 111,7 mmol). La mezcla mencionada se agitó por 2 horas a 90°C y se filtró. La fase orgánica se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (disolvente de elución: acetato de etilo/éter de petróleo = 1/20) para dar el Compuesto **9c** (44 g, 32,7 %), como un sólido blanco.

A una solución del Compuesto **9c** (22 g, 60,9 mmol) en MeOH/THF (2:1, 660 mL), se añadieron $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (44 g, 184,9 mmol) y NaBH_4 (33 g, 868,4 mmol) a -20°C . La mezcla mencionada se agitó por 30 minutos y se filtró para obtener un filtrado. Al filtrado se añadió $(\text{Boc})_2\text{O}$ (40 g, 183,5 mmol) y se agitó por 0,5 horas a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla mencionada se vertió en hielo/agua y se extrajo con EtOAc . La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (disolvente de elución: acetato de etilo/éter de petróleo = 1/30) para dar el Compuesto **9e** (10,5 g, 35,9 %), como un aceite amarillo. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1,53-1,09 (t, 18H), 1,17-1,28 (m, 6H), 1,42 (s, 9H), 3,46-3,56 (m, 2H), 3,77-3,80 (t, 1H), 4,11-4,18 (m, 2H), 4,82 (s, 1H), 6,81-6,83 (d, 2H), 7,09-7,11 (d, 2H).

A una solución del Compuesto **9e** (10 g, 21,5 mmol) en $\text{EtOH/H}_2\text{O}$ (10:1, 220 mL), se añadió NaOH (2 g, 49,5 mmol) y se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla mencionada anteriormente se neutralizó con HCl 1 N y se extrajo con EtOAc . La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (disolvente de elución: acetato de etilo/éter de petróleo = 1/10) para dar el Compuesto **9f** (2,5 g, 26,6 %), como un sólido blanco. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , por sus siglas en inglés, 400 MHz) δ : 1,08-1,10 (d, 18H), 1,22-1,32 (m, 3H), 1,37 (s, 9H), 3,23-3,28 (m, 1H), 3,42-3,46 (t, 1H), 3,69-3,73 (t, 1H), 6,85-6,87 (d, 3H), 7,16-7,18 (d, 2H).

(9) Ejemplo de síntesis 9

El esquema de síntesis del Compuesto **9** se muestra en el siguiente Esquema 6.



El método de preparación del Compuesto intermedio **9g** fue similar al del Compuesto **1c**.

- 5 El compuesto intermediario 4-(4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-((triiisopropilsil)oxi)fenil)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo **9g**, como un polvo blanco. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): 8,25 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,49 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,44 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,30 (brs, NH, 1H), 7,19 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,87 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 5,17 (brs, NH, 1H), 3,82 (s, 1H), 3,64-3,62 (m, 1H), 3,56-3,53 (m, 1H), 1,67 (s, 9H), 1,43 (s, 9H), 1,30-1,20 (m, 3H), 1,09 (d, J = 7,0 Hz, 18H).

10

A una solución agitada de 4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-((triiisopropilsil)oxi)fenil)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**9g**) (1030 mg, 1,52 mmol) en THF (10 mL), se añadió una solución 1 M de TBAF (por sus siglas en inglés) en THF (3,03 mL, 3,03 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente por 1 hora. La reacción se trabajó con agua y se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se recolectó, se secó sobre Na₂SO₄ y el extracto se condensó a presión reducida. El residuo se purificó con HPLC (por sus siglas en inglés) inversa preparativa (80 % de ACN, por sus siglas en inglés, 20 % de H₂O), y posteriormente se liofilizó para obtener 4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-hidroxifenil)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**9h**) (600 mg, 76 %), como un polvo blanco. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): 8,25 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,50 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,45-7,43 (m, 3H), 7,15 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,81 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 5,26 (brs, NH, 1H), 3,80 (s, 1H), 3,62 (s, 1H), 3,55-3,53 (m, 1H), 1,67 (s, 9H), 1,62 (brs, OH, 1H), 1,43 (s, 9H).

20

El método de preparación del Compuesto **9** final fue similar al del Compuesto **1**.

25

El compuesto final diclorhidrato de N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-(4-hidroxifenil)propanamida (**9**), como un polvo blanco. ¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ: 8,06 (s, 2H), 7,39 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,24 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,20 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,82 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 3,97 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 3,49 (dd, J = 7,5, 13,0 Hz, 1H), 3,30 (dd, J = 7,5, 13,0 Hz, 1H).

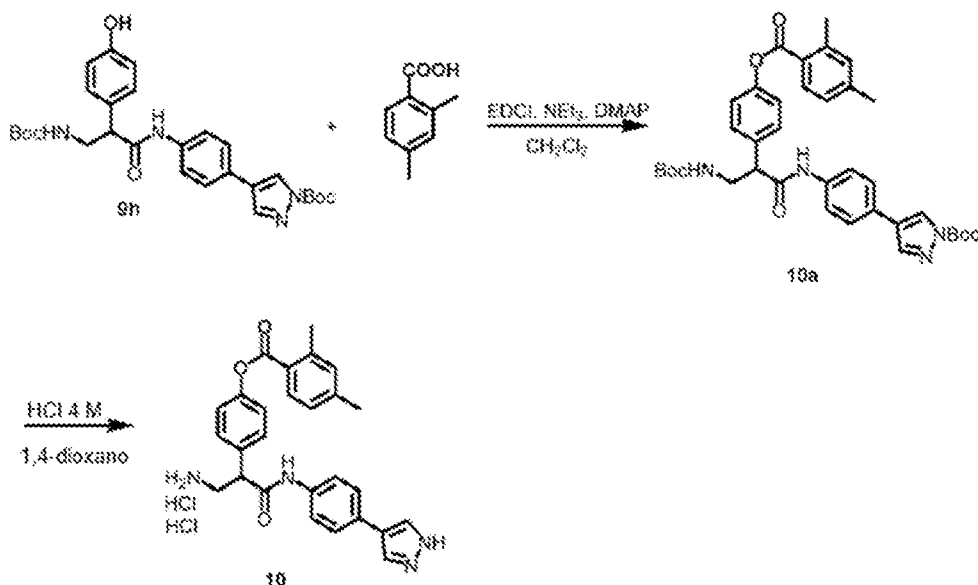
30

6. Síntesis del Compuesto 10

(10) Ejemplo de síntesis 10

El esquema de síntesis del Compuesto **10** se muestra en el siguiente Esquema 7.

Esquema 7



A una solución agitada de 4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-hidroxifenil)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**9h**) (356 mg, 0,68 mmol) y ácido 2,4-dimetilbenzoico (103 mg, 0,68 mmol) y NEt₃ (143 μ L, 1,02 mmol) en CH₂Cl₂ (20 mL), se añadieron EDCI (196 mg, 1,02 mmol) y DMAP (25 mg, 0,21 mmol, por sus siglas en inglés). La mezcla resultante se agitó por 16 horas. La reacción se trabajó con ácido cítrico saturado y se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se recolectó, se secó sobre Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó con HPLC inversa preparativa (100 % de ACN), y posteriormente se liofilizó para obtener

4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-((2,4-dimetilbenzoil)oxi)fenil)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**10a**) (355 mg, 80 %), como un polvo blanco. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): 8,26 (s, 1H), 8,06 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,53 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,52-7,42 (m, 5H), 7,21 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 5,15 (brs, NH, 1H), 3,95 (s, 1H), 3,68-3,67 (m, 1H), 3,58-3,55 (m, 1H), 2,63 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 1,67 (s, 9H), 1,44 (s, 9H).

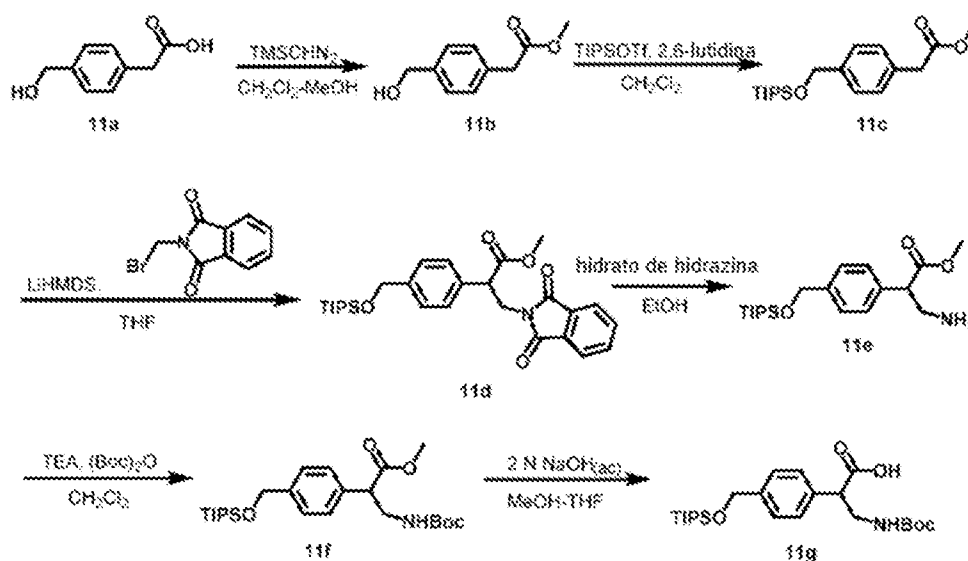
En el vial de 20 mL, se cargó 4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-((2,4-dimetilbenzoil)oxi)fenil)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**10a**) (350 mg, 0,54 mmol) y HCl 4 M en dioxano (2,7 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente por 1 hora. El disolvente se disolvió a presión reducida para dar el producto deseado diclorhidrato de 2,4-dimetilbenzoato de 4-(1-((4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)amino)-3-amino-1-oxopropan-2-il)fenilo (**10**), como un polvo blanco (271 mg, 96 %). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO) δ : 10,47 (s, 1H), 8,08 (brs, 3H), 8,02 (s, 2H), 7,94 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,61 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,53 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,50 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,28 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,19 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 4,18 (dd, J = 5,5, 8,5 Hz, 1H), 3,15-3,06 (m, 1H), 2,52 (s, 3H), 2,34 (s, 3H).

7. Síntesis del Compuesto 11

(11) Ejemplo de síntesis 11

El esquema de síntesis del Compuesto **11g** se muestra en el siguiente Esquema 8.

Esquema 8



A una solución de grado cero de ácido 2-(4-(hidroximetil)fenil)acético (5233 mg, 31,49 mmol) en CH_2Cl_2 (25 mL) y MeOH (6 mL), se añadió por goteo diazometano de TMS (por sus siglas en inglés, 23,6 mL de una solución 2 M en hexanos, 47,23 mmol). Después de 15 minutos, se apagó la reacción añadiendo HOAc (1 mL). La reacción mencionada se diluyó con EtOAc (100 mL) y se lavó con NaHCO_3 saturado (2 x 25 mL) y salmuera (25 mL). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía tipo flash (0 a 33 % de EtOAc/hexanos) para obtener 2-(4-(hidroximetil)fenil)acetato de metilo (**11b**). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,33 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,27 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 4,68 (s, 2H), 3,69 (s, 3H), 3,63 (s, 2H).

A una solución de grado cero de 2-(4-(hidroximetil)fenil)acetato de metilo (**11b**) (5674 mg, 31,49 mmol) en CH_2Cl_2 (50 mL), se añadieron 2,6-lutidina (5,47 mL, 47,23 mmol) y TIPS-OTf (14,48 g, 47,23 mmol, por sus siglas en inglés). Se retiró el baño de hielo y se dejó que la solución se calentara hasta alcanzar la temperatura ambiente y se agitó. Después de 2 horas, la reacción se apagó al añadir NH_4Cl (ac) (50 mL). La reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (100 mL) y se lavó con H_2O (2 x 50 mL) y salmuera (50 mL). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía tipo flash (0 a 5 % de EtOAc/hexanos) para obtener 2-(4-(((triisopropilsilil)oxi)metil)fenil)acetato de metilo (**11c**). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,31 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,24 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 4,82 (s, 2H), 3,69 (s, 3H), 3,62 (s, 2H), 1,21-1,15 (m, 3H), 1,10-1,06 (m, 18H).

A una solución a -78 °C de 2-(4-(((triisopropilsilil)oxi)metil)fenil)acetato de metilo (**11c**) (10,60 g, 31,49 mmol) en THF (50 mL), se añadió por goteo LiHMDS (47,30 mL, 47,23 mmol). Después de 30 minutos, se añadió gota a gota la bromometiltalimida (11,34 g, 47,23 mmol) en THF (50 mL) a la misma temperatura. Se retiró el baño a -78 °C y se dejó que la solución se calentara hasta alcanzar la temperatura ambiente y se agitó. Después de 2 horas, la reacción se apagó al añadir NH_4Cl (ac) (40 mL) y se extrajo con EtOAc (100 mL). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía tipo flash (0 a 10 % de EtOAc/hexanos) para obtener 3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)-2-(4-(((triisopropilsilil)oxi)metil)fenil)propanoato de metilo (**11d**). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,79-7,76 (m, 2H), 7,69-7,67 (m, 2H), 7,30-7,28 (m, 4H), 4,77 (s, 2H), 4,31 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 4,26-4,15 (m, 2H), 3,66 (s, 3H), 1,17-1,06 (m, 3H), 1,05-1,02 (m, 18H).

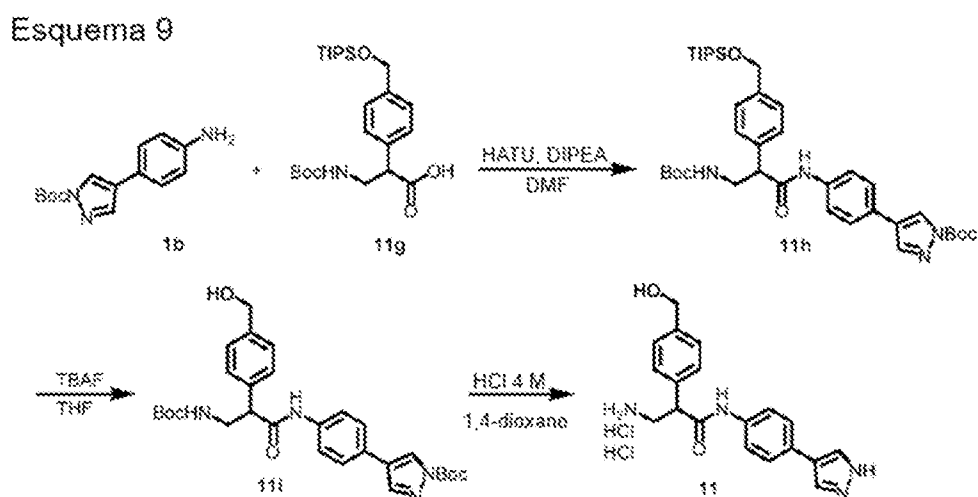
A una solución agitada de 3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)-2-(4-(((triisopropilsilil)oxi)metil)fenil)propanoato de metilo (**11d**) (4,39 g, 8,86 mmol) en MeOH (30 mL) y EtOH (50 mL), se añadió hidrato de hidrazina (2,22 g, 44,29 mmol), y la solución se sometió a reflujo por 2 horas. Los sólidos se filtraron y los disolventes se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía tipo flash (0 a 50 por ciento de EtOAc/hexanos) para obtener 3-amino-2-(4-(((triisopropilsilil)oxi)metil)fenil)propanoato de metilo (**11e**).

A una solución agitada de 3-amino-2-(4-(((triisopropilsilil)oxi)metil)fenil)propanoato de metilo (**11e**) (3,19 g, 8,74 mmol) en CH_2Cl_2 (50 mL), se añadieron TEA (2,44 mL, 17,47 mmol) y $(\text{Boc})_2\text{O}$ (17,47). La solución se agitó a temperatura ambiente por 4 horas y posteriormente se vertió en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{NaHCO}_3$ (ac). Las capas acuosas se extrajeron de nuevo con CH_2Cl_2 , se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía tipo flash (0 a 4 por ciento de EtOAc/hexanos) para obtener 3-(((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-(((triisopropilsilil)oxi)metil)fenil)propanoato de metilo (**11f**). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,32 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,22 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 4,86-4,82 (m, 1H), 4,77 (s, 2H), 3,88-3,83 (m, 1H), 3,68 (s, 3H), 3,63-3,57 (m, 1H), 3,51-3,48 (m, 1H), 1,42 (s, 9H), 1,21-1,14 (m, 3H), 1,10-1,08 (m, 18H).

A una solución de 3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-(((trisiopropilsil)oxi)metil)fenil)propanoato de metilo (**11f**) (2,07 g, 4,44 mmol) en THF/MeOH (1:1, 40 mL), se añadió NaOH (8,88 mL, 17,76 mmol), y se agitó por 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla se neutralizó con HCl 1 N y se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (disolvente de elución: EtOAc/Hexanos = 1/3) para dar ácido 3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-(((trisiopropilsil)oxi)metil)fenil)propanoico (**11g**) (1,84 g, 92 %), como un sólido blanco. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7,35 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,28 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 6,77 (brs, 0,5H), 4,92 (brs, 0,5H), 4,82 (s, 2H), 3,91-3,80 (m, 1H), 3,59-3,50 (m, 2H), 1,46-1,42 (m, 9H), 1,21-1,14 (m, 3H), 1,10-1,08 (m, 18H).

10 (12) Ejemplo de síntesis 12

El esquema de síntesis del Compuesto **11** se muestra en el siguiente Esquema 9.



15

El método de síntesis del Compuesto final **11** fue similar al del Compuesto **9**.

20 El compuesto 4-(4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-(((trisiopropilsil)oxi)metil)fenil)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**11h**) era un polvo blanco. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8,25 (s, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,50 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,45 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,37 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,33-7,31 (m, 3H), 5,15 (brs, 1H), 4,83 (s, 2H), 3,90 (brs, 1H), 3,68 (brs, 1H), 3,58-3,55 (m, 1H), 1,67 (s, 9H), 1,43 (s, 9H), 1,26-1,14 (m, 3H), 1,10-1,08 (m, 18H).

25 El compuesto 4-(4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-(hidroximetil)fenil)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**11i**) era un polvo blanco. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8,25 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,51 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,46-7,44 (m, 3H), 7,39-7,37 (m, 4H), 5,15 (brs, 1H), 3,92 (brs, 1H), 3,67-3,66 (m, 1H), 3,56-3,54 (m, 1H), 1,67-1,64 (m, 10H), 1,43 (s, 9H).

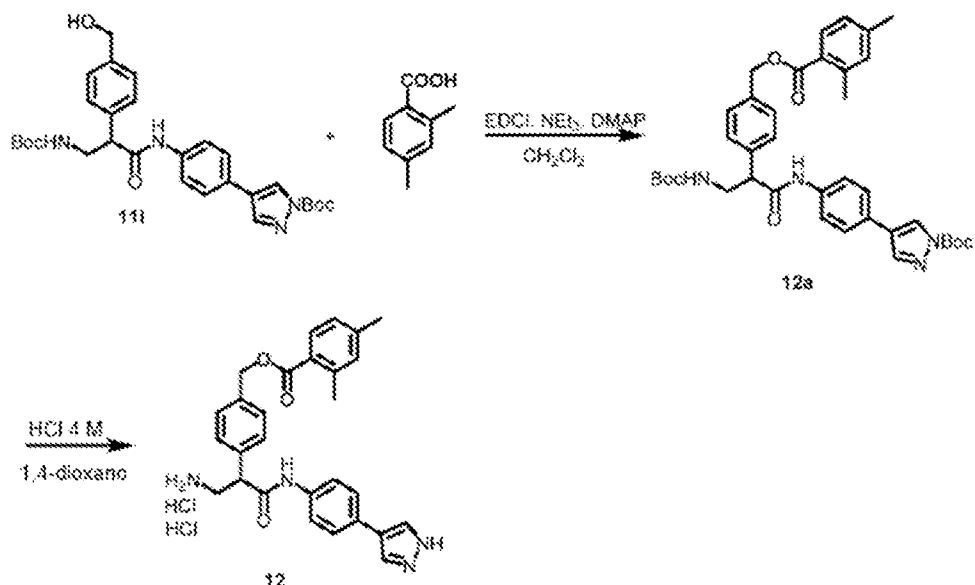
30 El compuesto final diclorhidrato de N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-(4-(hidroximetil)fenil)propenamida (**11**) era un polvo blanco. ¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ: 8,05 (s, 2H), 7,44 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,35 (s, 4H), 7,27 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 4,53 (s, 2H), 4,08 (t, J = 6,5 Hz, 1H), 3,56 (dd, J = 6,5, 13,0 Hz, 1H), 3,36 (dd, J = 6,5, 13,0 Hz, 1H).

8. Síntesis del Compuesto 12

35 (13) Ejemplo de síntesis 13

El esquema de síntesis del Compuesto **12** se muestra en el siguiente Esquema 10.

Esquema 10



El método de síntesis del Compuesto final **12** fue similar al del Compuesto **10**.

- 5 El compuesto 4-(4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-(((2,4-dimetilbenzoil)oxi)metil)fenil)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**12a**) era un polvo blanco. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): 8,25 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,86 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,52 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,46-7,44 (m, 4H), 7,41-7,37 (m, 3H), 7,06-7,03 (m, 3H), 5,31 (s, 2H), 5,14 (brs, 1H), 3,93 (brs, 1H), 3,68-3,67 (m, 1H), 3,59-3,55 (m, 1H), 2,60 (s, 3H), 2,37 (s, 3H), 1,67 (s, 9H), 1,43 (s, 9H).

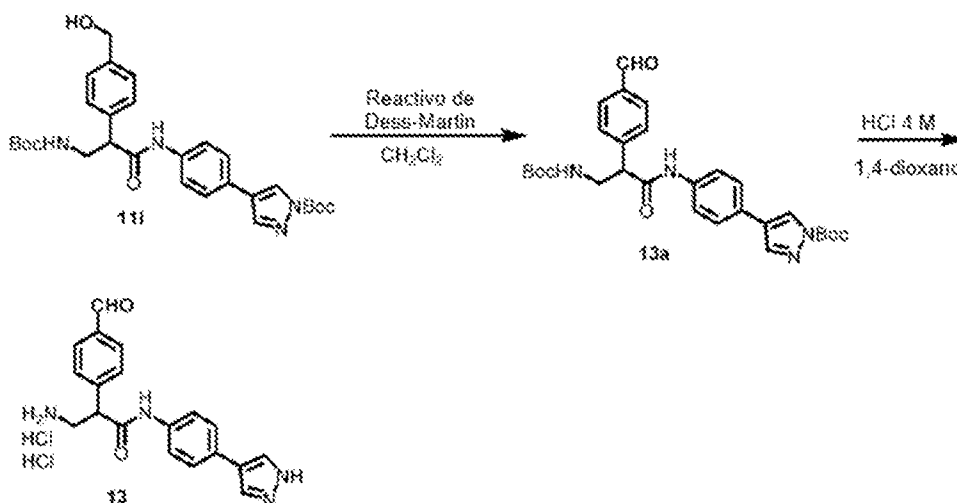
- 10 El compuesto diclorhidrato de 2,4-dimetilbenzoato de 4-(1-((4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)amino)-3-amino-1-oxopropan-2-il)benzilo (**12**) era un polvo blanco. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO) δ: 10,40 (s, NH, 1H), 8,03 (brs, NH, 3H), 8,00 (s, 2H), 7,75 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,58 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,51 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,47-7,44 (m, 4H), 7,12 (s, 1H), 7,09 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,26 (s, 2H), 4,13 (dd, J = 5,5, 9,0 Hz, 1H), 3,07-3,02 (m, 1H), 2,47 (s, 3H), 2,29 (s, 3H).

- 15 9. Síntesis del Compuesto 13

(14) Ejemplo de síntesis 14

- 20 El esquema de síntesis del Compuesto **13** se muestra en el siguiente Esquema 11.

Esquema 11



- 25 A una solución agitada de 4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-(hidroximetil)fenil)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**11i**) (100 mg, 0,19 mmol) en CH₂Cl₂ (10 mL), se añadió el reactivo de Dess-Martin

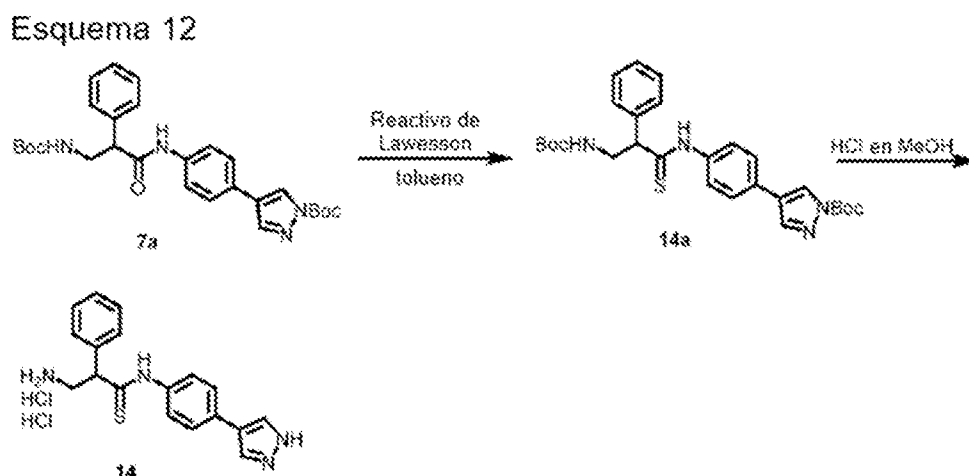
(166 mg, 0,37 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente por 1 hora. El disolvente se evaporó a presión reducida y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna (EtOAc/Hexanos = 25 % a 50 %) para obtener 4-(4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-formilfenil)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**13a**) como un polvo blanco. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): 10,01 (s, CHO, 1H), 8,26 (s, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,88 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,62 (brs, 1H), 7,58-7,53 (m, 4H), 7,46 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 5,12 (brs, 1H), 4,13-4,05 (m, 1H), 3,74-3,70 (m, 1H), 3,60-3,56 (m, 1H), 1,66 (s, 9H), 1,43 (s, 9H).

En el vial de 4 mL, se cargó 4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(4-formilfenil)propanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**13a**) (52 mg, 0,10 mmol) y HCl 4 M en dioxano (1,0 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente por 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar el producto deseado diclorhidrato de N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-(4-formilfenil)propanamida (**13**) (44 mg, 90 %). ¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ: 9,79 (s, CHO, 1H), 7,94 (s, 2H), 7,84 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,53 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,39 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,25 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 4,19 (t, J = 7,0 Hz, 1H), 3,60 (dd, J = 7,0, 12,5 Hz, 1H), 3,38 (dd, J = 7,0, 12,5 Hz, 1H).

10. Síntesis del Compuesto 14

(15) Ejemplo de síntesis 15

El esquema de síntesis del Compuesto **14** se muestra en el siguiente Esquema 12.



Una mezcla de 4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-fenilpropanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**7a**) (506 mg, 1,0 mmol, 1,0 eq) y reactivo de Lawesson (808 mg, 2,0 mmol, 2,0 eq) en tolueno (5 mL) se calentó a 120 °C por 16 horas bajo una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción mencionada anteriormente se enfrió y se concentró para obtener el compuesto bruto 4-(4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-fenilpropanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**14a**) (520 mg, rendimiento: 100 %) que podría usarse para el siguiente paso sin purificación adicional. LCMS (ES, m/z): [M+H]⁺ = 523,3.

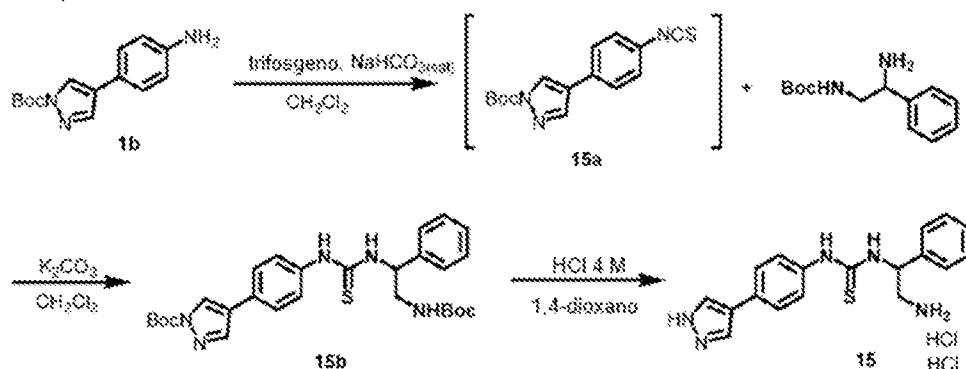
Se disolvió 4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-fenilpropanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**14a**) (520 mg, 1,0 mmol, 1,0 eq) en 1 mL de MeOH para añadirlo a HCl/MeOH (3 M, 5 mL), y se agitó a temperatura ambiente por 3 horas. La mezcla de reacción mencionada se concentró. El residuo se purificó por tipo flash (DCM/MeOH de 100 % a 10 %) para obtener el producto bruto (110 mg), que se cristalizó con DCM y MeOH y se ajustó el pH a 5,0 con HCl 1 N para obtener diclorhidrato de N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-fenilpropanamida (Compuesto **14**) (75 mg, rendimiento: 23 % en dos pasos), como un sólido amarillo. LCMS (ES, m/z): [M+H]⁺ = 323,2. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 12,08 (s, 1H), 8,06-7,99 (m, 5H), 7,77 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,63-7,59 (m, 4H), 7,41-7,31 (m, 3H), 4,54-4,50 (m, 1H), 3,88-3,78 (m, 1H), 3,31-3,24 (m, 1H).

11. Síntesis del Compuesto 15

(16) Ejemplo de síntesis 16

El esquema de síntesis del Compuesto **15** se muestra en el siguiente Esquema 13.

Esquema 13



A la solución de *tert*-butil-(4-amino-3-(2-(dimetilamino)etoxi)fenil)-1*H*-pirazol (200 mg, 0,85 mmol, 1,0 eq) en CH₂Cl₂ (4 mL), se añadió una solución saturada de NaHCO₃ (2 mL, 0,4 M). A continuación, se añadió lentamente el tiofosgeno (97 mg, 0,85 mmol, 1,0 eq) y se agitó por 3 horas. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se disolvió a presión reducida para obtener el producto bruto **15a**. En el residuo **15a**, se añadieron (2-amino-2-feniletil)carbamato de *tert*-butilo (220 mg, 0,85 mmol, 1,0 eq) y K₂CO₃ (235 mg, 1,70 mmol, 2,0 eq) en CH₂Cl₂ (4,0 mL). La reacción se lavó con agua y se extrajo con CH₂Cl₂. La fase orgánica se recolectó y se secó sobre Na₂SO₄, la solución del extracto se condensó a presión reducida. El residuo se purificó con gel de sílice (EtOAc/Hex = 20 %) para obtener el compuesto 4-(4-(3-(2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-1-feniletil)tioureido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**15b**) (353 mg, 85 %) como un sólido amarillo pálido. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8,30 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,98 (s, 1H), 7,63 (s, 1H), 7,57 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,38-7,34 (m, 4H), 7,30-7,24 (m, 3H), 5,63 (s, 1H), 4,85 (s, 1H), 3,55-3,44 (m, 2H), 1,68 (s, 9H), 1,31 (s, 9H).

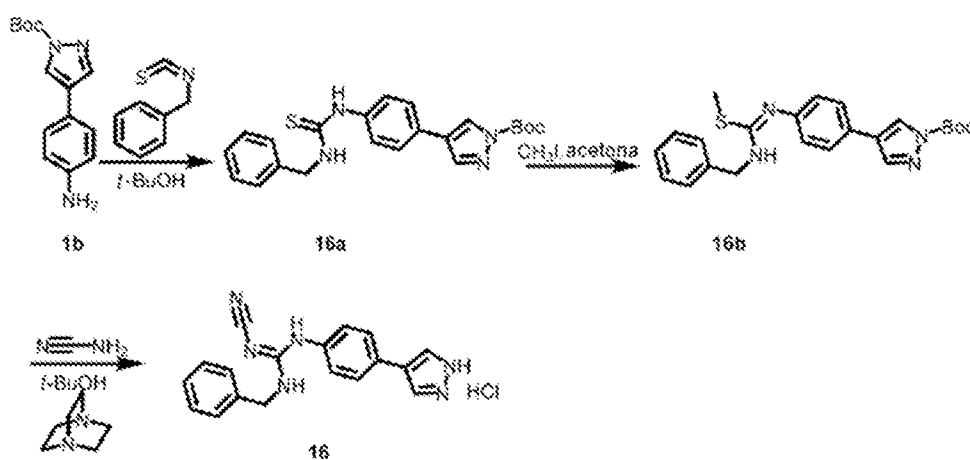
En el vial de 20 mL se cargó el compuesto 4-(4-(3-(2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-1-feniletil)tioureido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**15b**) (353 mg, 0,66 mmol) y HCl 4 M en dioxano (3,3 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente por 1 hora. El disolvente se eliminó a presión reducida para obtener el compuesto diclorhidrato de 1-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-(2-amino-1-feniletil)tiourea (**15**) que se presentó como polvo amarillo pálido (244 mg, 90 %). ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 8,56 (brs, 2H), 7,65 (d, J = 8,0, 2H), 7,60-7,58 (m, 2H), 7,48-7,39 (m, 4H), 7,38-7,37 (m, 1H), 6,08 (dd, J = 9,0, 5,0 Hz, 1H), 3,49 (dd, J = 13,0, 9,0 Hz, 1H), 3,36 (dd, J = 13,0, 5,0 Hz, 1H).

12. Síntesis del Compuesto 16

A título ilustrativo se explica la síntesis del Compuesto 16 que no entra en el alcance de la reivindicación 1. (17) Ejemplo de síntesis 17

El esquema de síntesis del Compuesto **16** se muestra en el siguiente Esquema 14.

Esquema 14



Una mezcla de 4-(4-aminofenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**1b**) (400 mg, 1,54 mmol, 1,0 eq) y (isotiocianatometil)benceno (276 mg, 1,85 mmol, 1,2 eq) en *t*-BuOH (10 mL) se agitó a 85 °C durante la noche bajo N₂. La mezcla de reacción mencionada se enfrió y se concentró. El residuo se purificó por columna de gel de sílice

y se eluyó con acetato de etilo/éter de petróleo (1:1) para obtener 4-(4-(3-benciltioureido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**16a**) (410 mg, rendimiento: 65 %), como un sólido amarillo. LCMS (ES, m/z): [M+H]⁺ = 409,3.

5 Una mezcla de 4-(4-(3-benciltioureido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**16a**) (410 mg, 1,00 mmol, 1,0 eq) y CH₃I (214 mg, 1,51 mmol, 1,5 eq) en acetona (15 mL) se agitó a 30 °C por 3 horas bajo N₂. La mezcla de reacción mencionada se filtró. La torta de filtración se recolectó para obtener 4-(4-(((bencilamino)(metilitio)metileno)amino)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**16b**) (370 mg, rendimiento: 87 %) como un sólido blanco. LCMS (ES, m/z): [M+H]⁺ = 423,3.

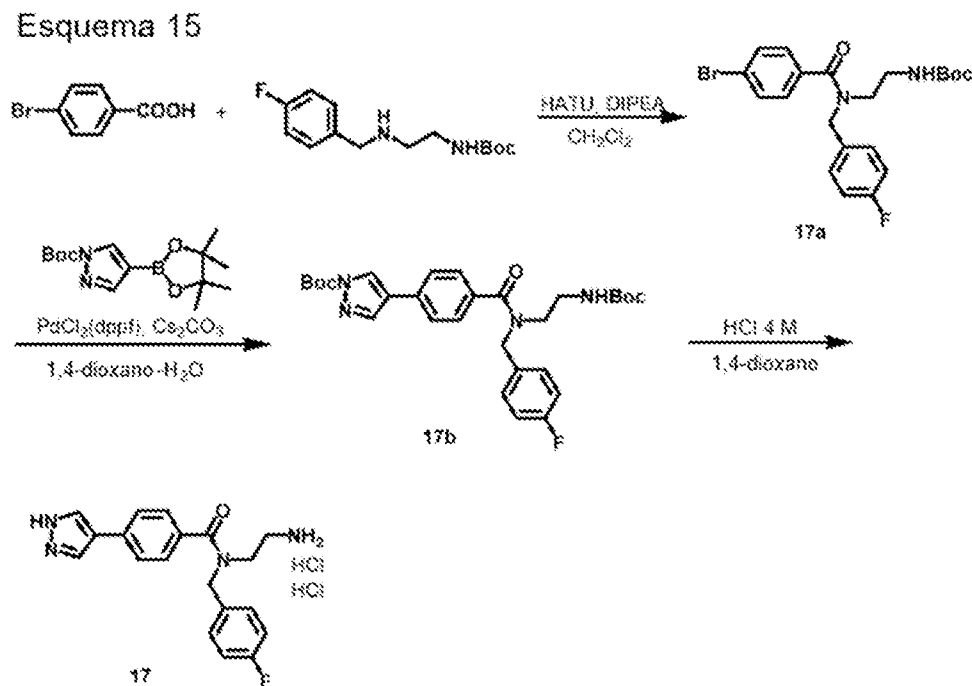
10 Se agitó una mezcla de 4-(4-(((bencilamino)(metilitio)metileno)amino)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**16b**) (370 mg, 0,88 mmol, 1,0 eq), cianamida (110 mg, 2,63 mmol, 3,0 eq) y 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (98 mg, 0,88 mmol, 1,0 eq) en *t*-BuOH (10 mL) se agitó a 90 °C durante la noche bajo N₂ y posteriormente se agitó a 130 °C por 3 horas. La mezcla de reacción mencionada se enfrió y se concentró. El residuo se trató con diclorometano (10 mL) y se filtró. La torta de filtración se purificó por Prep-HPLC (H₂O:CH₃CN = 7:3) para obtener clorhidrato de 1-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-bencil-2-cianoguanidina (**16**) (53 mg, rendimiento: 19 %), como un sólido blanco. LCMS (ES, m/z): [M+H]⁺ = 317,2. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 9,08 (s, 1H), 8,03 (s, 2H), 7,64-7,62 (m, 1H), 7,57 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,32 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 7,28-7,23 (m, 3H), 7,17 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 4,36 (d, J = 5,6 Hz, 2H).

20 13. Síntesis del Compuesto 17

(18) Ejemplo de síntesis 18

El esquema de síntesis del Compuesto **17** se muestra en el siguiente Esquema 15.

25



30 A una solución agitada de ácido 4-bromobenzoico (322 mg, 1,60 mmol) y (2-((4-fluorobencil)amino)etil)carbamato de *tert*-butilo (430 mg, 1,60 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL), se añadieron DIPEA (698 µL, 4,01 mmol) y HATU (732 mg, 1,92 mmol). La mezcla de reacción mencionada se agitó a temperatura ambiente por 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna para obtener (2-(4-bromo-N-(4-fluorobencilo)benzamido)etil)carbamato de *tert*-butilo (**17a**) (537 mg, 75 %) como un aceite. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): 7,53 (s, 1H), 7,31-7,29 (m, 2H), 7,10-7,04 (m, 4H), 5,01-4,75 (m, 1H), 4,53 (s, 2H), 3,58-3,19 (m, 4H), 1,44 (s, 9H).

35 Se añadió una mezcla de (2-(4-bromo-N-(4-fluorobencil)benzamido)etil)carbamato de *tert*-butilo (**17a**) (537 mg, 1,19 mmol), 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (350 mg, 1,19 mmol), PdCl₂(dppf) (87 mg, 0,12 mmol) y Cs₂CO₃ (775 mg, 2,38 mmol) se añadió en un tubo sellado, posteriormente se inyectó dentro del mismo una mezcla disolvente (dioxano/H₂O = 10/1, 6 mL) bajo argón, y la mezcla se agitó a 90 °C por 2 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria, y el residuo se adicionó con agua y se extrajo con EtOAc (15 mL x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El filtrado se concentró y el

40

residuo se purificó por cromatografía tipo flash sobre gel de sílice (EtOAc/Hex = 25 % a 67 %) para dar 4-(4-((2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)etil)(4-fluorobencil)carbamoil)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**17b**) como un polvo blanco (385 mg, 60 %). ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): 8,32 (s, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,47 (s, 2H), 7,14-7,04 (m, 4H), 5,07-4,78 (m, 1H), 4,58 (s, 2H), 3,60-3,33 (m, 4H), 1,68 (s, 9H), 1,45 (s, 9H).

A una mezcla de 4-(4-((2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)etil)(4-fluorobencil)carbamoil)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**17b**) (300 mg, 0,56 mmol) y 1,4-dioxano (1 mL), se añadió HCl 4 M en 1,4-dioxano (2,78 mL). La mezcla de reacción mencionada se agitó a temperatura ambiente por 1 hora. La mezcla de reacción se concentró. El residuo se trató con DCM (6 mL) y se filtró. La torta de filtración se recolectó para obtener diclorhidrato de N-(2-aminoetil)-N-(4-fluorobencil)-4-(1*H*-pirazol-4-il)benzamida (**17**) (200 mg, 87 %) como un sólido amarillo pálido. ¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ: 7,99 (s, 2H), 7,40-7,32 (m, 4H), 7,04-6,97 (m, 4H), 4,41 (s, 2H), 3,64 (s, 2H), 3,06 (s, 2H).

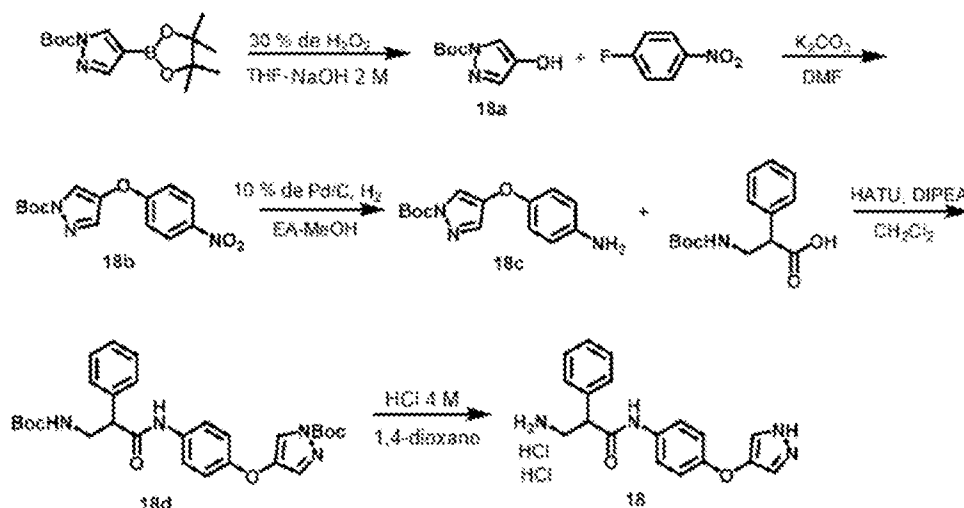
14. Síntesis del Compuesto 18

A título ilustrativo se explica la síntesis del Compuesto 18 que no entra en el alcance de la reivindicación 1.

(19) Ejemplo de síntesis 19

El esquema de síntesis del Compuesto **18** se muestra en el siguiente Esquema 16.

Esquema 16



A una solución agitada de 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (1540 mg, 5,24 mmol) en THF (15 mL) a 0 °C, se añadió NaOH (ac) 2 M (5,24 mL, 10,47 mmol), y posteriormente peróxido de hidrógeno al 30 % (1,19 mL, 10,47 mmol). La mezcla de reacción mencionada se agitó a 0 °C por 30 minutos y posteriormente a temperatura ambiente por 1 hora. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se diluyó con DCM, y se añadió dentro del mismo HCl (ac) 2 M hasta alcanzar un pH 2. La fase orgánica se recolectó y se secó, y el disolvente se disolvió a presión reducida para dar 4-hidroxi-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**18a**) (965 mg, 100 %) como un sólido amarillo. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 9,28 (s, OH, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,45 (s, 1H), 1,52 (s, 9H).

A una solución agitada de 4-hidroxi-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**18a**) (965 mg, 5,24 mmol) y 1-fluoro-4-nitrobenceno (739 mg, 5,24) en DMF (10 mL), se añadió K₂CO₃ (1447 mg, 10,47 mmol). La mezcla de reacción mencionada se agitó a 90 °C por 12 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (EtOAc/Hexano = 10 %) para dar 4-(4-nitrofenoxi)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**18b**) (479 mg, 30 %) como un sólido amarillo. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8,22 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 8,01 (s, 1H), 7,65 (s, 1H), 7,10 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 1,67 (s, 9H).

A una solución de 4-(4-nitrofenoxi)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**18b**) (140 mg, 0,46 mmol) en MeOH (5 mL) y EtOAc (5 mL), se añadió Pd/C al 10 % (49 mg, 0,046 mmol). La mezcla de reacción mencionada se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de globo de H₂ por 2 horas. La mezcla se filtró y el filtrado se evaporó por rotavapor para dar 4-(4-aminofenoxi)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**18c**) (118 mg, 93 %) como un sólido marrón.

A una solución agitada de ácido 3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-fenilpropanoico (114 mg, 0,43 mmol) y 4-(4-aminofenoxi)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (118 mg, 0,43 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL), se añadieron DIPEA

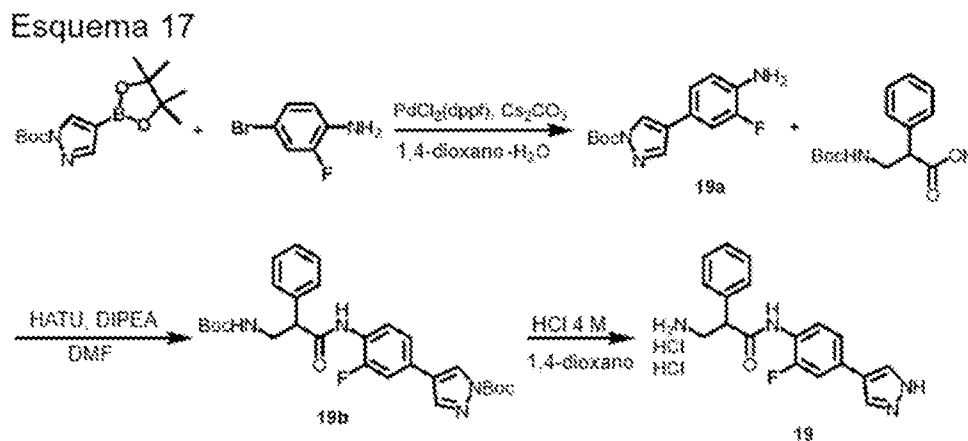
(187 μ L, 1,07 mmol) y HATU (196 mg, 0,51 mmol). La mezcla de reacción mencionada se agitó a temperatura ambiente por 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, posteriormente el residuo se purificó con HPLC inversa preparativa (80 % de ACN, 20 % de H₂O), y posteriormente se liofilizó para obtener 4-(4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-fenilpropanamido)fenoxi)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**18d**) (110 mg, 49 %) como un polvo blanco. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7,79 (s, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,42 (d, = 8,0 Hz, 2H), 7,39-7,29 (m, 5H), 6,98 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 5,15 (brs, 1H), 3,89 (t, J = 5,0 Hz, 1H), 3,70-3,58 (m, 1H), 3,56-3,54 (m, 1H), 1,64 (s, 9H), 1,51 (s, 9H).

A una mezcla de 4-(4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-fenilpropanamido)fenoxi)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**18d**) (110 mg, 0,21 mmol) y 1,4-dioxano (1 mL), se añadió HCl 4 M en 1,4-dioxano (1,05 mL). La mezcla de reacción mencionada se agitó a temperatura ambiente por 1 hora. La mezcla de reacción se concentró. El residuo se trató con DCM (5 mL) y se filtró. La torta de filtración se recolectó para obtener diclorhidrato de N-(4-((1*H*-pirazol-4-il)oxi)fenil)-3-amino-2-fenilpropanamida (**18**) (82 mg, 22 %) como un sólido blanco. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7,84 (s, 2H), 7,54 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,53-7,40 (m, 4H), 7,37-7,34 (m, 1H), 7,02 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 4,13-4,10 (m, 1H), 3,62-3,57 (m, 1H), 3,24 (dd, J = 5,5, 12,5 Hz, 1H).

15. Síntesis del Compuesto 19

(20) Ejemplo de síntesis 20

El esquema de síntesis del Compuesto **19** se muestra en el siguiente Esquema 17.



A una mezcla de 4-bromo-2-fluoroanilina (1211 mg, 6,37 mmol), éster de pinacol del ácido 1-Boc-4-pirazoleborónico (1875 mg, 6,37 mmol), PdCl₂(dppf) (467 mg, 0,64 mmol) y Cs₂CO₃ (4153 mg, 12,75 mmol) en un tubo sellado, se inyectó una mezcla disolvente (dioxano/H₂O = 9/1, 36 mL) bajo argón, y posteriormente se agitó la mezcla a 80 °C por 2 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria, y el residuo se adicionó con agua y se extrajo con EtOAc (30 mL x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El filtrado se concentró y el residuo se purificó por cromatografía tipo flash sobre gel de sílice (EtOAc/Hex = 5 % a 17 %) para dar 4-(4-amino-3-fluorofenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**19a**) como un aceite (1362 mg, 77 %). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8,17 (s, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,15 (dd, J = 2,0, 12,0 Hz, 1H), 7,11 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,80 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 1,67 (s, 9H).

A una solución agitada de ácido 3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-fenilpropanoico (346 mg, 1,31 mmol) y 4-(4-amino-3-fluorofenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**19a**) (362 mg, 1,31 mmol) en DMF (2 mL), se añadieron DIPEA (569 μ L, 3,26 mmol) y HATU (596 mg, 1,57 mmol). La mezcla de reacción mencionada se agitó a temperatura ambiente por 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida, después el residuo se purificó con HPLC inversa preparativa (80 % de ACN, 20 % de H₂O), y posteriormente se liofilizó para obtener 4-(4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-fenilpropanamido)-3-fluorofenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**19b**) (321 mg, 47 %) como un polvo blanco. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 8,32 (t, J = 8,5 Hz, 1H), 8,25 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,42-7,33 (m, 5H), 7,29-7,26 (m, 1H), 7,19 (d, J = 11,5 Hz, 1H), 5,12 (brs, 1H), 3,96 (s, 1H), 3,71-3,68 (m, 1H), 3,60-3,58 (m, 1H), 1,67 (s, 9H), 1,43 (s, 9H).

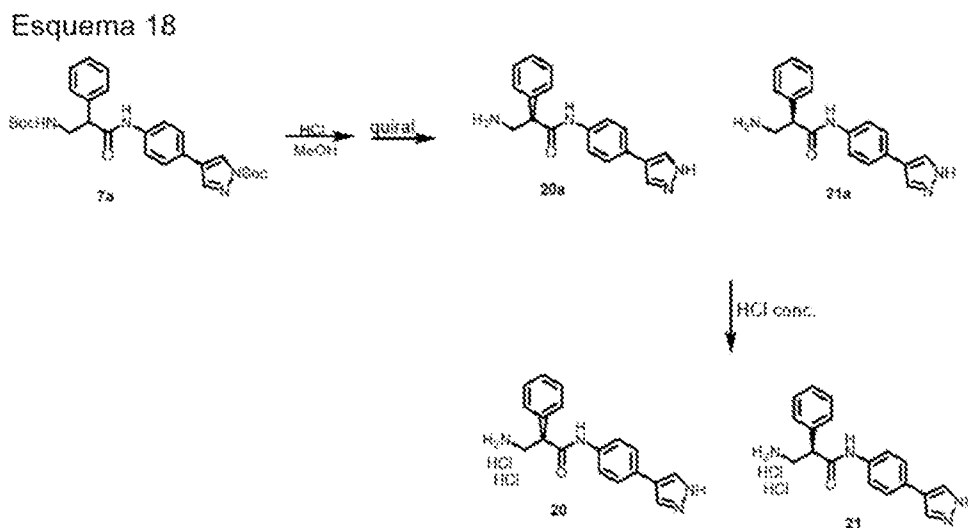
Al 4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-fenilpropanamido)-3-fluorofenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**19b**) (315 mg, 0,60 mmol) disuelto en 1,4-dioxano (1 mL), se añadió HCl 4 M en 1,4-dioxano (4,0 mL). La mezcla de reacción mencionada se sometió a sonicación a temperatura ambiente por 30 minutos. El polvo blanco se recolectó por filtración, se lavó con DCM y se secó para obtener diclorhidrato de 3-amino-N-(2-fluoro-4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-2-fenilpropanamida (**19**) (230 mg, 96 %). ¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ : 8,05 (s, 2H), 7,42-7,38 (m, 6H), 7,28 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 4,18 (t, J = 7,0 Hz, 1H), 3,58 (dd, J = 7,0, 13,0 Hz, 1H), 3,39 (dd, J = 7,0, 13,0 Hz, 1H). LCMS (ES, m/z): [M-2HCl+H]⁺ = 326,1, [M-2HCl+Na]⁺ = 348,1.

16. Síntesis del Compuesto 20 y del Compuesto 21

(21) Ejemplo de síntesis 21

5

El esquema de síntesis del Compuesto 20 y del Compuesto 21 se muestra en el siguiente Esquema 18.



- 10 A una solución de 4-(3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-fenilpropanamido)fenil)-1*H*-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (15 g, 29,6 mmol, 1,0 eq) en MeOH (150 mL), se añadió HCl/MeOH (150 mL). La mezcla mencionada se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentró y el residuo se disolvió en H₂O (50 mL), se ajustó el pH a 9 con solución acuosa de NaHCO₃. La mezcla se filtró y la torta de filtración se secó al vacío para obtener N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-fenilpropanamida (10 g, 100 %) como un sólido blanco. El sólido se purificó mediante resolución quiral para obtener (*S*)-N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-fenilpropanamida (**20a**) y (*R*)-N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-fenilpropanamida (**21a**).
- 15

Condición de separación:

- 20 Columna: ChiralPak AD-H Daicel chemical Industries, Ltd, 250*30 mm, D.I. 10 µm;
Fase móvil A: CO₂ supercrítico; Fase móvil B: MeOH (0,1 % de NH₃:H₂O)
A:B = 60:40 a 50 mL/minuto
Temp. columna: 38 °C
Presión de la boquilla: 10 MPa [100 bar]; Temperatura de la boquilla: 60 °C; Temperatura del evaporador: 20 °C;
25 Temperatura de corte: 25 °C; Longitud de onda: 220 nm

- A una solución de (*S*)-N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-fenilpropanamida en H₂O (10 mL), se añadió HCl concentrado (2 mL), y la mezcla se concentró para obtener diclorhidrato de de (*S*)-N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-fenilpropanamida (**20**) (2,1 g). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10,55 (s, 1H), 8,20 (s, 3H), 8,13 (s, 2H), 7,65-7,29 (m, 9H), 4,22-4,19 (m, 1H), 3,51 (s, 1H), 3,04-3,01 (m, 1H). LCMS: [M+H]⁺ = 307,1.
- 30

- A una solución de (*R*)-N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-fenilpropanamida en H₂O (10 mL) se añadió HCl concentrado (2 mL), y la mezcla se concentró para obtener diclorhidrato de de (*R*)-N-(4-(1*H*-pirazol-4-il)fenil)-3-amino-2-fenilpropanamida (**21**) (2,1 g). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10,50 (s, 1H), 8,16 (s, 3H), 8,11 (s, 2H), 7,64-7,29 (m, 9H), 4,20-4,16 (m, 1H), 3,53-3,48 (m, 1H), 3,06-3,00 (m, 1H). LCMS: [M+H]⁺ = 307,1.
- 35

Ejemplo 2Ensayo de efecto *in vitro*

40

A. Ensayo de inhibición de la proteína cinasa asociada a Rho (ROCK)

Se probó el efecto inhibitor de cada compuesto sintetizado anteriormente sobre la proteína cinasa asociada a Rho (ROCK).

45

A-1. Método

1. El compuesto de prueba 10 mM se diluyó a 1 mM con DMSO, y posteriormente a 300 nM. Netarsudil (AR-13324)

ES 3 015 621 T3

es un fármaco comercial para disminuir la presión intraocular, y AR-13503 es un metabolito activo de AR-13324.

2. El compuesto de prueba de 300 nM mencionado anteriormente se diluyó en serie para obtener compuestos de prueba con concentraciones de 100 nM, 33 nM, 11 nM, 3,7 nM, 1,2 nM y 0,4 nM, respectivamente.

5 3. Se añadió 1 µL del compuesto de prueba diluido en serie mencionado anteriormente a 49 µL del amortiguador de reacción ROCK modificado (amortiguador de clorhidrato Trizma® 0,05 M (pH 7,5) que contiene KCl 0,1 M, MgCl₂ 0,01 M, EGTA 0,1 mM (por sus siglas en inglés) y ROCK-1 2,25 µg/mL) para obtener una muestra de grupo experimental. Se tomó 1 µL de DMSO para añadirlo a 49 µL de un amortiguador de reacción ROCK ajustado para obtener una muestra de grupo de control positivo (valor máximo = 100 %). Se tomó 1 µL de DMSO para añadirlo a 49 µL de un amortiguador (amortiguador de clorhidrato Trizma® 0,05 M (pH 7,5) que contenía 0,1 M KCl, 0,01 M MgCl₂ y 0,1 mM EGTA) para obtener una muestra del grupo de control del vehículo (valor mínimo = 0 %).

10 4. Se añadieron 20 µL de la muestra preparada anteriormente a una placa de 96 pozos de fondo plano, y se añadieron 20 µL del amortiguador ROCK ATP a cada pozo.

5. La placa de 96 pozos mencionada se colocó en un agitador orbital y reaccionó a temperatura ambiente por 90 minutos.

15 6. A continuación, se añadieron 40 µL de solución luminiscente de ensayo de cinasas Kinase-Glo (Promega, RV6712) a la placa de 96 pozos mencionada anteriormente, se colocó la placa de 96 pozos en un agitador orbital y se hizo reaccionar a temperatura ambiente por 10 minutos.

7. El valor de luminiscencia de cada pozo de la placa de 96 pozos se determinó por el lector de microplacas SpectraMax M5, y la tasa de inhibición de ROCK (%) se calculó por la siguiente fórmula.

20 Valor máximo = El valor medido usando el método anterior en ausencia de cualquier compuesto de prueba (El valor medido bajo la condición de que la enzima y el sustrato reaccionaran completamente era el valor máximo)

25 Valor mínimo = El valor medido usando el método anterior en ausencia de enzima (El valor medido en ausencia de reacción de enzima y sustrato fue el valor mínimo)

$$\text{Tasa de inhibición (\%)} = \frac{(\text{Grupo experimental (valor medido en la condición en que se añadió el compuesto de prueba)} - \text{Valor mínimo})}{(\text{Valor máximo} - \text{Valor mínimo})} * 100 \%$$

30 A-2. Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 2 - los Compuestos 16 y 18 que no entran en el alcance de la reivindicación 1 se incluyen a título ilustrativo.

35 Tabla 2.

Compuesto	IC ₅₀ (nM) de ROCK-1
AR-13324	+++++
AR-13503 (un metabolito activo de AR-13324)	+++++
Compuesto 1	+++
Compuesto 2	++++
Compuesto 3	+++
Compuesto 4	+++++
Compuesto 5	+++++
Compuesto 6	++++
Compuesto 7	+++++
Compuesto 8	+++++
Compuesto 9	+++++
Compuesto 10	+++
Compuesto 11	+++++
Compuesto 12	++++
Compuesto 13	+++++
Compuesto 14	+++++
Compuesto 15	+++
Compuesto 16	+
Compuesto 17	+++
Compuesto 18	+
Compuesto 19	++++
Compuesto 20	+++++
Compuesto 21	+++

Nota: +++++ representa IC₅₀ < 1 nM; +++++ representa IC₅₀ = 1-10 nM; ++++ representa IC₅₀ = 10~100 nM; +++ representa IC₅₀ = 100-1000 nM; ++ representa IC₅₀ > 1.000 nM; + representa IC₅₀ > 10.000 nM.

B. Ensayo de inhibición de la cinasa de cadena ligera de miosina 4 (MYLK-4)

ES 3 015 621 T3

El procedimiento experimental se basó en el protocolo de cribado y las condiciones de ensayo del ensayo de unión de cinasa LanthaScreen Eu proporcionados por ThermoFisher Scientific.

B-1. Preparación del material

Se realizó una dilución en serie triple de la solución madre del compuesto de prueba (1 mM) preparada en DMSO al 100 % por 10 veces para determinar la IC₅₀ del compuesto de prueba sobre MYLK-4.

La mezcla de cinasa y anticuerpo se diluyó previamente con amortiguador de cinasa hasta alcanzar una concentración de trabajo 2X.

B-2. Método analítico

1. Se añadieron 3,84 µL de amortiguador de cinasa a una placa plana blanca de 384 pozos (Greiner, Cat. No. 784207), posteriormente se añadieron 8,0 µL de la mezcla de cinasa/anticuerpo mencionada anteriormente, y posteriormente se añadieron 4,0 µL del trazador (AlexaFluor labeled Tracer), y posteriormente se añadieron 160 nL del compuesto de prueba diluido anteriormente a una concentración adecuada, y la placa de cultivo se agitó por 30 segundos.

2. A continuación, la placa de cultivo se colocó a temperatura ambiente y se incubó por 60 minutos; posteriormente, los datos se leyeron y analizaron con un lector de placas de fluorescencia. La relación de emisión del líquido de reacción en cada orificio se calculó usando la siguiente fórmula.

$$\text{Relación de Emisión (ER)} = \frac{\text{Emisión de AF647 (665 nm)}}{\text{Emisión de Europio (615 nm)}}$$

Adicionalmente, en el análisis mencionado se estableció también un grupo de control para el análisis de unión de la cinasa LanthaScreen Eu: 0 % de control de inhibición (0 % de control de desplazamiento): cuya reacción no contenía ningún inhibidor conocido, y se usó como relación de emisión máxima; 100 % de control de inhibición (100 % de control de desplazamiento): que contenía un inhibidor conocido con la concentración más alta, y se usó como relación de emisión mínima; en donde el inhibidor conocido era Sunitinib.

Los componentes de la reacción de análisis de unión a cinasa LanthaScreen Eu se muestran en la Tabla 3. La IC₅₀ del inhibidor conocido, el sunitinib, fue de 19,0 nM, lo que coincidía con el rango de IC₅₀ esperado.

Tabla 3. Los componentes de reacción de análisis de unión a cinasa LanthaScreen Eu.

Componentes de reacción	Concentración (nM)/IC ₅₀ (nM)
Cinasa (MYLK4)	5
Anticuerpo (Eu-anti-GST)	2
Trazador (Tracer 222)	100 (Kd de 173 nM)
Amortiguador A (que contiene HEPES, BRIJ-35, MgCl ₂ y EGTA)	50 mM HEPES (pH 7,5), 0,01 % de BRIJ-35, MgCl ₂ 10 mM y EGTA 1 mM

3. La tasa de inhibición del compuesto de prueba a diferentes concentraciones sobre MYLK-4 podría obtenerse de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{[(ER \text{ 0 \% de control Inhibición} - ER \text{ Muestra}) / (ER \text{ 0 \% de control Inhibición} - ER \text{ 100 \% de control Inhibición})] * 100}$$

4. La IC₅₀ del compuesto de prueba sobre MYLK-4 se calculó mediante los índices de inhibición determinados anteriormente del compuesto de prueba a diferentes concentraciones sobre MYLK-4.

B-3. Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 4 - el Compuesto 16 que no entra en el alcance de la reivindicación 1 se incluye a título ilustrativo.

Tabla 4. IC₅₀ del compuesto de prueba sobre MYLK-4.

Compuesto	IC ₅₀ (nM) de MYLK4
AR-13324	++
AR-13503	+++
Compuesto 1	+++
Compuesto 2	+++
Compuesto 5	+++

ES 3 015 621 T3

Compuesto 6	+++
Compuesto 7	++++
Compuesto 8	++++
Compuesto 10	++
Compuesto 11	+++
Compuesto 12	+++
Compuesto 13	+++
Compuesto 14	+++
Compuesto 15	+++
Compuesto 16	+
Compuesto 17	+
Compuesto 19	+++
Compuesto 20	++++
Compuesto 21	+++
Nota: ++++++ representa $IC_{50} < 1$ nM; +++++ representa $IC_{50} = 1-10$ nM; ++++ representa $IC_{50} = 10-100$ nM; +++ representa $IC_{50} = 100-1000$ nM; ++ representa $IC_{50} > 1.000$ nM; + representa $IC_{50} > 10.000$ nM.	

C. Ensayo del efecto inhibitor sobre YSK-4

5 El procedimiento experimental se basó en el protocolo de cribado de Z'-LYTE y en las condiciones de ensayo facilitadas por ThermoFisher Scientific.

C-1. Preparación del material

10 Se realizó una dilución en serie triple de la solución madre del compuesto de prueba (1 mM) preparada en DMSO al 100 % por 10 veces para determinar la IC_{50} del compuesto de prueba sobre YSK-4.

La mezcla de péptido y cinasa se diluyó previamente con amortiguador de cinasa hasta alcanzar una concentración de trabajo 2X.

15 La solución de ATP (por sus siglas en inglés) se diluyó previamente con amortiguador de cinasa (HEPES 50 mM, pH 7,5, 0,01 % de BRIJ-35, $MgCl_2$ 10 mM, EGTA 1 mM) hasta alcanzar una concentración de trabajo 4X.

20 La solución de reactivo de desarrollo es Novel PKC Lipid Mix, que contiene 2 mg/mL de fosfatidilserina, 0,2 mg/mL de DAG (por sus siglas en inglés) en 20 mM de HEPES, pH 7,4 y 0,3 % de CHAPS (por sus siglas en inglés), y se diluyó previamente 10 veces con amortiguador de desarrollo.

C-2. Método analítico

25 1. Se añadieron 100 nL del compuesto de prueba diluido anteriormente y 2,4 μ L de amortiguador de cinasa a una placa negra de 384 pozos (Corning, Cat. No. 4514), posteriormente se añadieron dentro del mismo 5 μ L de la mezcla de péptidos y cinasas mencionada anteriormente, y después se añadieron dentro del mismo 2,5 μ L de solución de ATP, y se agitó la placa de cultivo por 30 segundos.

2. A continuación, la placa de cultivo se colocó a temperatura ambiente y se incubó por 60 minutos.

30 3. Posteriormente se añadieron 5 μ L de la solución de reactivo de revelado y se agitó la placa de cultivo por 30 segundos en la oscuridad, y posteriormente se leyeron y analizaron los datos con un lector de placas de fluorescencia.

Además, para la cinasa, se preparó el siguiente grupo de control y se colocó en la misma placa de cultivo que la cinasa:

35 (1) 0 % de control de fosforilación (100 % de control de inhibición)

40 La relación de emisión máxima se establece con el 0 % control de fosforilación (100 % de control de inhibición), que no contiene ATP y por lo tanto no presenta actividad cinasa. Este control produce 100 % de péptido escindido en la reacción de desarrollo.

(2) 100 % de control de fosforilación

45 Se usa un péptido fosforilado sintéticamente de la misma secuencia que el péptido sustrato como 100 % de control de fosforilación. Este control produce un porcentaje muy bajo de péptido escindido en la Reacción de Desarrollo.

El porcentaje de fosforilación alcanzado en un pozo de reacción específico (grupo experimental) se calculó basado en el 0 % de control de fosforilación y el 100 % de control de fosforilación.

ES 3 015 621 T3

El sustrato Z'-LYTE usado en la reacción de análisis de unión para la cinasa de cribado Z'-LYTE fue el péptido Ser/Thr 07, y la concentración de ATP en la reacción fue de 5 µM (Km de YSK4). El inhibidor conocido usado como control en este análisis fue la estaurosporina. La IC₅₀ del sistema fue de 12,7 nM, lo que se ajustaba al rango de IC₅₀ esperado. La tasa de inhibición del compuesto de prueba sobre YSK-4 a diferentes concentraciones se calculó basada en el valor medido de cada orificio de acuerdo con la fórmula siguiente, y se calculó por lo mismo la IC₅₀ del compuesto de prueba sobre YSK-4.

$$\text{Corrección de la fluorescencia de fondo} = \frac{\text{Intensidad de fluorescencia}_{\text{muestra}} - \text{Intensidad de fluorescencia}_{\text{control de TCFI}}}{\text{TCFI}}$$

$$\text{Relación de Emisión} = \frac{\text{Emisión de Cumarina (445 nm)}}{\text{Emisión de Fluoresceína (520 nm)}} \text{ (usando valores corregidos para la fluorescencia de fondo)}$$

$$\% \text{ de Fosforilación} = 1 - \frac{(\text{Relación de Emisión} \times F_{100\%} - C_{100\%})}{(C_0\% - C_{100\%}) + [(\text{Relación de Emisión} \times (F_{100\%} - F_0\%))]} \times 100$$

$$\% \text{ de inhibición} = \left(1 - \frac{\% \text{ de Fosforilación}_{\text{Muestra}}}{\% \text{ de Fosforilación}_{\% \text{ de Control de Inhibición}}} \right) \times 100$$

C₁₀₀ %: Señal promedio de emisión de cumarina de 100 % de control de fosforilación

C₀ %: Señal promedio de emisión de cumarina de 0 % de control de fosforilación

F₁₀₀ %: Señal promedio de emisión de fluoresceína de 100 % de control de fosforilación

F₀ %: Señal promedio de emisión de fluoresceína de 0 % de control de fosforilación

DRI: Interferencia de reacción de desarrollo

TCFI: Interferencia de fluorescencia del compuesto de prueba

C-3. Resultados

Los resultados se describen en la Tabla 5 - el Compuesto 16 que no entra en el alcance de la reivindicación 1 se incluye a título ilustrativo.

Tabla 5. IC₅₀ del compuesto de prueba sobre YSK4.

Compuesto	IC ₅₀ de YSK4 (nM)
AR-13324	n.a.
AR-13503	n.a.
Compuesto 1	+
Compuesto 2	+
Compuesto 5	+
Compuesto 6	+
Compuesto 7	++
Compuesto 8	++
Compuesto 10	+
Compuesto 11	++
Compuesto 12	++
Compuesto 13	++
Compuesto 14	++
Compuesto 15	+
Compuesto 16	+
Compuesto 17	+
Compuesto 19	++

Nota: ++++++ representa IC₅₀ < 1 nM; +++++ representa IC₅₀ = 1-10 nM; ++++ representa IC₅₀ = 10-100 nM; +++ representa IC₅₀ = 100-1000 nM; ++ representa IC₅₀ > 1.000 nM; + representa IC₅₀ > 10.000 nM.

De acuerdo con los resultados anteriores, puede saberse que los compuestos sintetizados en la presente divulgación tienen efectos inhibidores sobre ROCK, MYLK-4 y YSK4, y tienen efectos inhibidores sinérgicos de objetivos, especialmente el Compuesto 7 y el Compuesto 20.

Asimismo, dado que actualmente se sabe que mediante la inhibición de la expresión de ROCK, los efectos de protección del nervio óptico (ver, por ejemplo, Rothschild *et al.*, ROCK-1 mediates diabetes-induced retinal pigment epithelial and endothelial cell blebbing: Contribution to diabetic retinopathy. *Scientific Reports*. (2017) 7: 8834, y Tanna *et al.*, Rho Kinase Inhibitors as a Novel Treatment for Glaucoma and Ocular Hypertension. *Ophthalmology*. (2018) 125:1741-1756) y el alivio y/o tratamiento de la presión intraocular elevada (ver, por ejemplo, Tanna *et al.*, Rho Kinase Inhibitors as a Novel Treatment for Glaucoma and Ocular Hypertension. *Ophthalmology*. (2018) 125:1741-1756), glaucoma (ver, por ejemplo, Tanna *et al.*, Rho Kinase Inhibitors as a Novel Treatment for

Glaucoma and Ocular Hypertension. *Ophthalmology*. (2018) 125:1741-1756), accidente cerebrovascular ocular (ver, por ejemplo, Yi *et al.*, Protective Effects of Intravitreal Injection of the Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 in a Rodent Model of Nonarteritic Anterior Ischemic Optic Neuropathy (rAION). *J Ophthalmol*. (2020) 2020: 1485425 y Nourinia R, *et al.* ROCK inhibitors for the treatment of ocular diseases. *Br J Ophthalmol* 2018;102:1-5), degeneración macular (ver, por ejemplo, Sadiq *et al.* Pharmacological agents in development for diabetic macular edema *Int J Retin Vitro* (2020) 6:29), macular edema (2020) 6:29.), edema macular (ver, por ejemplo, Sadiq *et al.* Pharmacological agents in development for diabetic macular edema *Int J Retin Vitro* (2020) 6:29), retinopatía diabética (ver, por ejemplo, Nourinia R, *et al.* ROCK inhibitors for the treatment of ocular diseases. *Br J Ophthalmol* 2018;102:1-5), distrofia corneal endotelial de Fuchs (FECD) (ver, por ejemplo, Okumura *et al.* The ROCK Inhibitor Eye Drop Accelerates Corneal Endothelium Wound Healing *Invest Ophthalmol Vis Sci*. (2013) 54:2439-2502), fibrosis corneal (ver, por ejemplo, Soniecka *et al.*, Substance P induces fibrotic changes through activation of the RhoA/ROCK pathway in an *in vitro* human corneal fibrosis model. *J Mol Med (Berl)*. 2019; 97(10): 1477-1489), etc., los compuestos con el efecto de inhibir ROCK de la presente divulgación mencionados anteriormente, también pueden usarse en aplicaciones relacionadas con la oftalmología, tales como protección del nervio óptico, y/o prevención y/o tratamiento de presión intraocular alta, glaucoma, apoplejía ocular, degeneración macular, edema macular, retinopatía diabética, distrofia corneal endotelial de Fuchs (FECD) y/o fibrosis corneal, etc.

Asimismo, puesto que también se sabe actualmente que por la inhibición de la expresión de ROCK, los efectos de alivio y/o tratamiento de la hipertensión pulmonar (ver, por ejemplo, Zhang *et al.*, Effects of Fasudil on Patients with Pulmonary Hypertension Associated with Left Ventricular Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: A Prospective Intervention Study. *Can Respir J*. (2018) 2018: 314825), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) (ver, por ejemplo, Liu *et al.*, Influence of Rho kinase inhibitor Fasudil on late endothelial progenitor cells in peripheral blood of COPD patients with pulmonary artery hypertension. *Bosn J Basic Med Sci*. (2014) 14(1):40-4), fibrosis pulmonar idiopática (IPF) (ver, por ejemplo, Knipe *et al.*, The Rho Kinase Isoforms ROCK1 and ROCK2 Each Contribute to the Development of Experimental Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. (2018) 58(4): 471-481), enfisema pulmonar (ver, por ejemplo, Bewley *et al.*, Differential Effects of p38, MAPK, PI3K or Rho Kinase Inhibitors on Bacterial Phagocytosis and Efferocytosis by Macrophages in COPD. *PLoS One*. (2016) 11(9): e0163139), cáncer de pulmón (ver, por ejemplo, Vigil *et al.*, ROCK1 and ROCK2 are Required for Non-Small Cell Lung Cancer Anchorage-Independent Growth and Invasion. *Cancer Res*. (2012) 15: 72(20)), etc., los compuestos con efecto de inhibición de ROCK de la presente divulgación mencionados anteriormente, también pueden usarse en aplicaciones relacionadas con el pulmón, tales como la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión pulmonar, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), la fibrosis pulmonar idiopática (IPF), el enfisema pulmonar y/o el cáncer de pulmón, etc.

Las referencias a métodos de tratamiento en los párrafos subsecuentes de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, inhibidores de cinasa, composición farmacéutica y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia o para diagnóstico.

40 Ejemplo 3

Evaluación de la dosis de efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) del modelo de reducción de la presión intraocular en conejo normal

45 A. Compuesto 20

1. Método

Animales: Conejos blancos de Nueva Zelanda machos ($n = 7$ /cada grupo);
 Formulación del compuesto de prueba: 0,01 % de Compuesto 20; 0,03 % de Compuesto 20; 0,1 % de Compuesto;
 Administración: Se infundieron 50 μ L del compuesto de prueba en el ojo derecho (ojo dosificado) y 50 μ L del
 50 vehículo (sin el compuesto de prueba) en el ojo izquierdo (ojo de control) de cada animal de experimentación. Las 3 formulaciones mencionadas se administraron una vez al día por 3 días consecutivos.

La presión intraocular de cada animal se midió con Tono-Vet (iCare) antes de la administración (0 horas) y 2, 4, 6
 55 y 8 horas después de la administración en el Día 1 y el Día 3.

2. Resultados

Los resultados se muestran en la FIGURA 1A y la FIGURA 1B y la Tabla 6 y la Tabla 7.

60

Tabla 6. Resultados de la medición de la presión intraocular en el Día 1.

Concentración del Compuesto 20	Magnitud de la reducción de la presión intraocular (Δ IOP) (mmHg)	Magnitud máxima de la reducción de la presión intraocular	$T_{m\acute{a}x}$ (hora)
0,10 %	-5,3 \pm 0,6	32,2 %	8
0,03 %	-4,3 \pm 1,2	28,3 %	8

0,01 %	-2,9 ± 1,1	18,7 %	6
--------	------------	--------	---

La magnitud máxima de la reducción de la presión intraocular % = (Presión intraocular del ojo de control - Presión intraocular del ojo dosificado)/Presión intraocular del ojo de control *100.

Tabla 7. Resultados de la medición de la presión intraocular en el Día 3.

Concentración del Compuesto 20	Magnitud de la desc de la presión intraocular (Δ IOP) (mmHg)	Magnitud máxima de la reducción de la presión intraocular	T _{máx} (hora)
0,10 %	-5,2 ± 1,3	32,6 %	6
0,03 %	-5,1 ± 1,2	30,5 %	8
0,01 %	-2,7 ± 0,8	15,4 %	6

La magnitud máxima de la reducción de la presión intraocular % = (Presión intraocular del ojo de control - Presión intraocular del ojo dosificado)/Presión intraocular del ojo de control *100.

La FIGURA 1A y la Tabla 6 muestran los resultados de la medición de la presión intraocular en el Día 1 de administración. La FIGURA 1B y la Tabla 7 muestran los resultados de la medición de la presión intraocular en el Día 3 de administración.

Los resultados muestran que el Compuesto 20 exhibe un efecto dependiente de la dosis en la reducción de la presión intraocular, en donde el grupo administrado con 0,03 % de Compuesto 20 y el grupo administrado con 0,1 % de Compuesto 20 tienen magnitud y tendencia similares en la reducción de la presión intraocular.

Además, después de la administración continuada por 3 días, el grupo al que se administró el 0,03 % de Compuesto 20 presentó una ligera acumulación del efecto del fármaco (la reducción de la presión intraocular el día 3 aumentó casi 1 mmHg de promedio en comparación con el Día 1) (ver las Tablas 6 y 7). Este resultado muestra que el Compuesto 20 a una concentración de 0,03 % debería estar cerca del límite de prueba de presión intraocular de este modelo, y así la diferencia acumulativa de efecto medicinal (E_{máx}) mostrada por lo mismo no es significativa.

Los datos presentados en este experimento son los datos en los que se han eliminado los datos no calificados (se han eliminado los conejos blancos con una diferencia de presión intraocular \geq 2 mmHg (n = 1) en los dos ojos el Día 1 y > 5 mmHg en los dos ojos antes de la administración el Día 3 (n = 1)) y se ha eliminado la presión intraocular alta de rebote (n = 3). El valor n de cada grupo \geq 3; además, el valor n del grupo administrado con 0,01 % de Compuesto 20 fue de 6.

Basados en los resultados mencionados anteriormente, se puede saber que la concentración de 0,03 % debería ser la dosis de efecto máximo (E_{máx}) del Compuesto 20 en el modelo de conejo de presión intraocular normal.

B. Compuestos 4, 5, 7, 8, 11, 12 y 14

Usando un método similar al del Compuesto 20, se confirmaron las dosis máximas efectivas de los Compuestos 4, 5, 7, 8, 11, 12 y 14 en un modelo de conejo con presión intraocular normal.

Los resultados muestran que las dosis efectivas máximas de los Compuestos 4, 5, 7 y 8 fueron todas de 1 %, y las dosis efectivas máximas de los Compuestos 11, 12 y 14 fueron de 0,5 %, 0,25 % y 0,5 %, respectivamente.

40 Ejemplo 4

Evaluación del efecto de la disminución de la presión intraocular en un modelo de conejo con presión intraocular normal

45 A. Compuesto 20

1. Materiales y métodos

Animales de experimentación: Conejos blancos de Nueva Zelanda, machos, que pesen más de 2 kg. Los conejos blancos de Nueva Zelanda se adquirieron en Huijun Farm (Changhua, Taiwán). Después de un periodo de cuarentena de una semana, se criaron en MASTER LABORATORY Co., Ltd en condiciones ambientales de 16-22 °C, 30-70 % de humedad relativa (RH, por sus siglas en inglés), 8 horas de día/16 horas de noche.

Método experimental:

(1) Evaluación del efecto de la reducción de la presión intraocular

Después de pesar 12 conejos blancos de Nueva Zelanda (2,0-4,0 kg) y agruparlos (n = 3-6 en cada grupo), se fijaron los conejos blancos con una envoltura. Una vez estabilizado el conejo blanco, se le abrió el párpado inferior

del ojo derecho y se infundieron 50 µL de la muestra de prueba (gotas oftálmicas que contenían 0,1 % o 0,03 % de Compuesto 20) en el saco conjuntival del ojo derecho del conejo blanco, se cerró el párpado y se mantuvo al conejo blanco en estado estable por al menos 2 minutos para evitar que al sacudir la cabeza el conejo blanco las gotas oculares fluyeran fuera del ojo; el ojo izquierdo se administró con vehículo (sin compuesto de prueba) como grupo de control. 0,02 % de AR-13324 se usó como referencia para evaluar la competitividad del efecto medicinal de los compuestos probados. Los puntos temporales de detección de la presión intraocular fueron antes de la administración (0 hora) y 1, 2, 4, 6 y 8 horas después de la administración.

(2) Evaluación de la irritación

Después de medir la presión intraocular, se fotografió la apariencia de los ojos de los conejos y se evaluaron los eventos adversos en la córnea, el iris o la conjuntiva de los ojos de los conejos resultantes de la sustancia de prueba de acuerdo con las directrices de prueba de irritación ocular (OECD/OCDE 405) estipuladas por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, por sus siglas en inglés).

El modo de puntuación de la OECD/OCDE 405 para la córnea, el iris o la conjuntiva se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Nivel de irritación ocular.

Opacidad	Grado de densidad (las lecturas deben realizarse en el área más densa)*
Sin ulceración ni opacidad	0
Áreas dispersas o difusas de opacidad (que no sean un ligero embotamiento del brillo normal); detalles del iris claramente visibles	1
Área translúcida fácilmente discernible; detalles del iris ligeramente oscurecidos	2
Área nacarada; no se aprecian detalles del iris; tamaño de la pupila apenas perceptible	3
Córnea opaca; iris no discernible a través de la opacidad	4
Máximo posible: 4* Debe anotarse el área de opacidad corneal.	

(3) Observación de la córnea

Como muestra de prueba se usaron gotas oftálmicas de 0,1 % de Compuesto 20, mientras que el método experimental fue el mismo que el descrito en el punto anterior "(1) Evaluación del efecto de reducción de la presión intraocular". La administración se realizó de forma continua por 7 días (una vez al día), y posteriormente se observó el estado de la córnea con una lámpara de hendidura.

(4) Análisis del contenido del fármaco candidato en el humor acuoso (AH) después de su administración

Se administró el Compuesto 20 a conejos normales y se confirmó el contenido del compuesto en el humor acuoso en diferentes momentos.

2. Resultados

Los resultados de la evaluación del efecto de reducción de la presión intraocular se muestran en la FIGURA 2.

De acuerdo con la FIGURA 2, se sabe que las gotas oftálmicas que contienen 0,1 % de Compuesto 20 y las gotas oftálmicas que contienen 0,03 % de Compuesto 20 muestran los efectos máximos (E_{\max}) a las 6-8 horas después de la administración, y la magnitud máxima de la reducción de la presión intraocular de los mismos es de aproximadamente 4,4-4,9 mmHg, y la irritación ocular de los mismos es leve.

Además, el resultado también muestra que las gotas oftálmicas que contienen 0,03 % de Compuesto 20 en el modelo de conejo de presión intraocular normal ha alcanzado el máximo efecto de reducción de la presión intraocular.

Los resultados de la evaluación de la irritación ocular se muestran en la FIGURA 3A, FIGURA 3B y la FIGURA 3C.

Basado en la FIGURA 3A y la FIGURA 3B, se sabe que la irritación ocular del Compuesto 20 a la dosis máxima de efecto (0,1 %) sigue siendo menor a la de AR-13324 (0,02 %).

Además, la FIGURA 3C muestra que la córnea sigue libre de daños y turbidez después de la administración continuada por 7 días.

Los resultados del análisis de contenido del Compuesto 20 que se presenta en el iris y el cuerpo ciliar y en el humor acuoso después de su administración se muestran en la FIGURA 4. Para el iris y el cuerpo ciliar, la concentración del Compuesto 20 se midió en la unidad de ng/g; para el humor acuoso, la concentración del Compuesto 20 se midió en la unidad de ng/mL.

De acuerdo con la FIGURA 4, se sabe que tras la administración, el contenido del Compuesto 20 en el humor acuoso puede alcanzar el requisito de inhibición de ROCK.

B. Compuestos 4, 5, 7, 8, 11, 12 y 14

1. Método

(1) Evaluación del efecto de la reducción de la presión intraocular

Usando un método similar al del Compuesto 20, se confirmaron los efectos de reducción de la presión intraocular de los Compuestos 4, 5, 7, 8, 11, 12, 14, 20 y 21 (usando la dosis de efecto máximo) en un modelo de conejo con presión intraocular normal.

(2) Ensayo de margen de seguridad

Se tomó el Compuesto 7 como representativo, se administraron a los ojos de los conejos colirios que contenían 2 % de Compuesto 7 (3 dosis al día, con un intervalo de 3 horas cada vez, y se realizó una observación antes de la administración y 1 hora después de cada administración). Adicionalmente, se administraron a los ojos de los conejos colirios que contenían 0,04 % de Compuesto 7 (una dosis al día, y se realizaron observaciones antes de la administración y 1 hora y 6 horas después de la misma). De acuerdo con las directrices para pruebas de irritación ocular (OECD/OCDE 405) estipuladas por la Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (OECD) mencionadas anteriormente, se evaluó la irritación ocular del Compuesto 7.

2. Resultados

Los resultados de la evaluación del efecto de reducción de la presión intraocular se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Los resultados de la evaluación del efecto de la reducción de la presión intraocular.

Compuesto	Diferencia de presión intraocular (mmHg)/dosis/punto temporal en el que se alcanza el efecto máximo
AR-13324	4,5/1 %/6 horas
Compuesto 4	4,2/1 %/2 horas
Compuesto 5	1,5/1 %/6 horas
Compuesto 7	5,1/1 %/4 horas
Compuesto 8	5,2/1 %/6 horas
Compuesto 11	2,0/0,5 %/1 horas
Compuesto 12	2,0/0,25 %/6 horas
Compuesto 14	2,5/0,5 %/6 horas
Compuesto 20	4,9/0,03 %/8 horas
Compuesto 21	1,3/0,03 %/8 horas

Los resultados del ensayo del margen de seguridad se muestran en la FIGURA 5 y la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados del ensayo del margen de seguridad.

Margen de seguridad	AR-13324	Compuesto 7
Índice terapéutico (TI)	2	3
Puntuación OECD		
	AR-13324 (Índice terapéutico: 2)	Compuesto 7 (Índice terapéutico: 3)
Enrojecimiento	1	1
Quemosis	1	0
Descarga	2	1
Total	4	2

Basado en la FIGURA 5 y la Tabla 10, se sabe que cuando AR-133247 tiene un índice terapéutico de 2, la puntuación total de OECD405 es de 4, y cuando el Compuesto 7 tiene un índice terapéutico de 3, la puntuación total de OECD405 es de 2. Por lo tanto, el margen de seguridad del Compuesto 7 es mejor que el de AR-13324.

Ejemplo 5

Modelo animal de macaco

1. Materiales y métodos

Se administró un colirio que contenía 0,1 % o 0,03 % de Compuesto 20 a macacos normales. 0,02 % de AR-13324 se usó como referencia para evaluar la competitividad del efecto medicinal de los compuestos probados. La presión intraocular de los animales se midió con un tonómetro neumático (Model 30™ Pneumatometer). Fue necesario anestesiarse a los animales antes de medir la presión intraocular. Después de la administración tópica (una vez al día), se midió la presión intraocular de los animales en los puntos temporales establecidos.

2. Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Basado en la FIGURA 6, puede saberse que el Compuesto 20 puede conseguir un efecto de reducción de la presión intraocular equivalente o mejor que el de AR-13324 en macacos con presión intraocular normal sin efectos secundarios evidentes, tales como la conjuntivitis.

Ejemplo 6

Evaluación del efecto de la reducción de la presión intraocular en el modelo de conejo con alta presión intraocular inducida por solución salina hipertónica (modelo de alta presión intraocular aguda)

1. Materiales y métodos

Animales de experimentación: Conejos blancos de Nueva Zelanda, machos, de 2,0-3,0 kg de peso. Los conejos blancos de Nueva Zelanda se adquirieron en una granja de conejos de laboratorio cualificada de Taiwán antes del experimento y se criaron en el Centro de Animales de la Universidad Nacional Chiao Tung.

Muestra de prueba: Colirio con 0,1 % de Compuesto 20

Control negativo 1: Solución salina fisiológica

Control negativo 2: Vehículo sin sustancia de prueba (con 5 % de manitol, 20 mM de ácido bórico y 0,125 % de nonoxinol-9)

Método experimental: se pesaron y agruparon conejos blancos de Nueva Zelanda machos y posteriormente se anestesiaron. Se inyectaron 160 µL de solución salina hipertónica (5 % de NaCl) en los cuerpos vítreos de los ojos izquierdo y derecho del conejo anestesiado, de modo que los ojos de los conejos entraron en un estado de presión intraocular elevada. A continuación, se instilaron 50 µL de solución salina fisiológica (0,9 % de NaCl), un colirio que contenía 0,1 % de Compuesto 20, un vehículo usado para preparar el colirio de Compuesto 20 (sin Compuesto 20) y un colirio que contenía 0,02 % de AR-13324 en los ojos izquierdo y derecho de cada grupo de conejos. Los puntos temporales de detección de la presión intraocular (IOP) fueron antes de la anestesia (0 horas) y 0,5, 1, 1,5, 3 y 5 horas después de la administración. Se usaron solución salina fisiológica y un vehículo sin sustancia de prueba como grupo de control negativo, y un colirio que contenía AR-13324 al 0,02 % se usó como referencia para evaluar el efecto del Compuesto 20 en la reducción de la presión intraocular en un modelo de conejo de hipertensión inducida por solución salina hiperosmótica.

2. Resultados

Los resultados se muestran en la FIGURA 7 y la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados en pruebas de reducción de la presión intraocular en un modelo de conejo de presión intraocular alta.

Conejos con hipertensión ocular transitoria				
	Dosis	Diferencia máxima de presión intraocular (mmHg)	Diferencia máxima de presión intraocular (%)	ABC
Solución salina fisiológica	-	-	-	139,7
AR-13324	0,02 %	-7,7 ± 4,2	-20,8 %	132,9
Vehículo usado para preparar el colirio del Compuesto 20 (sin Compuesto 20)	-	+7,2 ± 5,2	+16,2 %	NA
Compuesto 20	0,1 %	-18,0 ± 6,8	-40,4 %	99,1
Diferencia máxima de presión intraocular: La diferencia entre las lecturas de IOP de un individuo y las lecturas de IOP promedio del grupo de control negativo 1 (solución salina fisiológica) en el punto de tiempo en el que se				

registra la respuesta máxima (*J Ocul Pharmacol Ther.* 2010 Apr;26(2):125-132).

Los resultados muestran que en el modelo de conejo de presión intraocular alta inducida por solución salina hiperosmolar, el colirio que contiene 0,1 % de Compuesto 20 puede reducir la presión intraocular en aproximadamente 18,0 ± 6,8 mmHg, mientras que el colirio que contiene 0,02 % de AR-13324 puede reducir la presión intraocular en aproximadamente 7,7 ± 4,2 mmHg. Muestra que el efecto del Compuesto 20 en la reducción de la presión intraocular es significativamente mejor que la de AR-13324 (prueba t, p > 0,05). Asimismo, en comparación con la solución salina fisiológica, el vehículo no presenta diferencias estadísticamente significativas (prueba t). En comparación con la solución salina fisiológica o el vehículo, el AR-13324 tampoco presenta diferencias estadísticamente significativas (prueba t).

Ejemplo 7

Evaluación de la efectividad de la reducción de la presión intraocular en el modelo de conejo con alta presión intraocular inducida por microperlas magnéticas (modelo de alta presión intraocular con presión intraocular > 30 mmHg)

El glaucoma por exfoliación (XFG) se considera más grave que el glaucoma primario de ángulo abierto. La presión intraocular máxima (38,2 contra 26,9 mmHg), la presión intraocular mínima (24,7 contra 18,4 mmHg) y el cambio medio de la presión intraocular (13,5 contra 8,5 mmHg) en el glaucoma exfoliativo y el glaucoma primario de ángulo abierto presentan diferencias estadísticamente significativas. Asimismo, actualmente no se conocen terapias dietéticas, fármacos u otras intervenciones que puedan prevenir la aparición del síndrome de exfoliación o ralentizar su desarrollo (*Progress in Retinal and Eye Research* Vol. 19, No. 3, pp. 345-368, 2000). De acuerdo con lo anterior, se sabe que la presión intraocular del glaucoma exfoliativo puede alcanzar > 30 mmHg, y actualmente no existe ningún fármaco efectivo para ello, y por consiguiente se proporciona en la presente un modelo de alta presión intraocular con una presión intraocular > 30 mmHg para evaluar la viabilidad del compuesto de la presente divulgación en el tratamiento del glaucoma exfoliativo y la hipertensión ocular con una presión intraocular > 30 mmHg.

A. Compuesto 20

1. Materiales y métodos

Animales de experimentación: Conejos blancos de Nueva Zelanda, machos, peso corporal de 2,0-3,0 kg. Los conejos blancos de Nueva Zelanda se compraron en Huijun Farm (Changhua, Taiwán) antes del experimento y se criaron en el Centro de Animales de la Universidad Nacional Chiao Tung.

Muestra de prueba: Colirio con 0,1 % de Compuesto 20

Control negativo 1: Vehículo sin prueba Compuesto 20 (contiene 5 % de manitol, ácido bórico 20 mM y 0,125 % de nonoxinol-9)

Control negativo 2: Vehículo sin compuesto de prueba AR-13324 (que contiene 4,7 % de D- manitol y 0,05 % de ácido bórico)

Método experimental: Después de pesar y agrupar los conejos blancos de Nueva Zelanda machos, se anestesiaron con 0,2 mL/kg de Zoletil 50. Se inyectaron 50 µL de solución de microperlas magnéticas (50 mg/mL, tamaño de las microperlas magnéticas de 10 µm) en las cámaras oculares anterior izquierda y derecha del conejo bajo anestesia para que los ojos del conejo entraran en un estado de presión intraocular elevada. Después de la inyección en la cámara anterior del ojo, se colocó inmediatamente un anillo magnético de rubidio hierro alrededor del ojo por 10-20 minutos para que las perlas magnéticas bloquearan completamente el tejido de drenaje del humor acuoso. Después de desinfectar el globo ocular con antibióticos, se administró una pomada ocular hidratante para restaurar el globo ocular y se esperó a que aumentara la presión intraocular. Después de aproximadamente 3 días, la presión intraocular puede alcanzar una presión intraocular alta > 30 mmHg, y puede durar al menos 10 días. Después de que la presión intraocular alcanzara el objetivo de presión intraocular > 30 mmHg, el colirio que contenía 0,03 % o 0,1 % de Compuesto 20 (ojo derecho), el vehículo usado para preparar el colirio de Compuesto 20 (sin Compuesto 20) (ojo izquierdo), y el colirio que contenía 0,02 % de AR-13324 (ojo derecho), y el vehículo usado para preparar el colirio de AR-13324 (sin AR-13324) (ojo izquierdo) se infundieron respectivamente una gota (aproximadamente 35 µL) en los ojos izquierdo y derecho de los conejos de cada grupo. Los puntos temporales de detección de la presión intraocular (IOP) fueron antes de la administración (0 hora) y 2, 4, 6 y 8 horas después de la administración. El experimento se realizó por 2 días consecutivos. El colirio que contenía 0,02 % de AR-13324 se usó como referencia para evaluar el efecto del Compuesto 20 en la reducción de la presión intraocular en el modelo de conejo con alta presión intraocular inducida por perlas magnéticas (presión intraocular > 30 mmHg).

2. Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 12 y en la FIGURA 8.

Tabla 12. Resultados en pruebas de reducción de la presión intraocular del Compuesto 20 en un modelo de conejo con alta presión intraocular inducida por perlas magnéticas.

Compuesto 20	Dosis	Diferencia máxima de presión intraocular (mmHg)
AR-13324	0,02 %	4,3 ± 1,4
Compuesto 20	0,03 %	5,7 ± 0,6
	0,1 %	12,1 ± 1,4

5 Los resultados muestran que en el modelo de conejo de alta presión intraocular inducida por perlas magnéticas (el modelo de alta presión intraocular con presión intraocular > 30 mmHg), el colirio que contiene 0,03 % de Compuesto 20 puede reducir la presión intraocular en aproximadamente 5,7 ± 0,6 mmHg (en aproximadamente 15,3 %), y el colirio que contiene 0,1 % de Compuesto 20 puede reducir la presión intraocular en aproximadamente 12,1 ± 1,4 mmHg (en aproximadamente 28,8 %). A saber, el colirio que contiene 0,03 % de Compuesto 20 y el colirio que contiene 0,1 % de Compuesto 20 tienen mejores efectos reductores de la presión intraocular que los que contienen 0,02 % de AR-13324 (reduciendo la presión intraocular en aproximadamente 4,3 ± 1,4 mmHg (reduciendo en aproximadamente 11,0 %)), y el colirio que contiene 0,1 % de Compuesto 20 puede incluso ser más del doble de efectivo que los colirios que contienen 0,02 % de AR-13324.

15 B. Compuesto 7

Usando un método similar al del Compuesto 20, se confirmó el efecto del Compuesto 7 (usando dosis de efecto máximo de 0,5 % y 1 %) en la reducción de la presión intraocular en un modelo de conejo con presión intraocular normal.

20 Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Resultados en pruebas de reducción de la presión intraocular del Compuesto 7 en un modelo de conejo con alta presión intraocular inducida por perlas magnéticas.

Compuesto	Dosis	Diferencia máxima de presión intraocular (mmHg)
AR-13324	0,02 %	3,6 ± 2,1
Compuesto 7	0,5 %	6,7 ± 1,6
	1 %	11,8 ± 0,8

De acuerdo con la Tabla 12, se sabe que en un modelo de conejo de alta presión intraocular inducida por microperlas magnéticas (el modelo de alta presión intraocular con presión intraocular > 30 mmHg), el colirio que contiene 0,5 % de Compuesto 7 y el colirio que contiene 1 % de Compuesto 7 tienen mejores efectos reductores de la presión intraocular que los que contienen 0,02 % de AR-13324, en donde el colirio que contiene 1 % de Compuesto 7 puede ser incluso más de 3 veces tan efectivo como el colirio que contiene 0,02 % de AR-13324.

Ejemplo 8

35 1. Expresión de MYLK-4 en células

(1) Método

40 Células de la malla trabecular humana (HTM, por sus siglas en inglés, Cat. No. 6590) se obtuvieron de ScienCell Research Laboratories. Las células HTM se mantuvieron en medio de células de la malla trabecular (TMCM, por sus siglas en inglés, Cat. No. 6591). TMCM formulado a partir de 500 mL de medio basal, 10 mL de FBS (por sus siglas en inglés, Cat. No. 0010), 5 mL de suplemento de crecimiento celular de la malla trabecular (TMCGS, por sus siglas en inglés, Cat. No. 6592) y 5 mL de solución de penicilina/estreptomicina (P/S, por sus siglas en inglés, Cat. No. 503). Cuando el crecimiento celular alcanzó 70-80 % de saturación, las células HTM se trataron durante la noche con 50 µg/mL de dexametasona (Cat. No. 4902, Sigma).

La expresión de MYLK4 y GAPDH (por sus siglas en inglés) en lisados celulares se analizó por el método de inmunotransferencia tipo Western. La expresión de MYLK4 y GAPDH en lisados celulares se analizó por el método de inmunotransferencia tipo Western. En primer lugar, se recolectaron las células y se lavaron con 1x RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,25 % de ácido desoxicolico, 0,1 % de NP-40, EDTA 1 mM, mezcla de inhibidor de fosfatasa e inhibidor de proteasas). A continuación, los lisados celulares se separaron por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, por sus siglas en inglés) y se transfirieron a una membrana de PVDF (iBlot™ 2 Transfer Stacks, membrana de fluoruro de polivinilideno, por sus siglas en inglés, Invitrogen). Se realizó inmunotransferencia en la membrana con anticuerpos primarios (anticuerpo anti-MYLK4 de ratón (1:1.000, Cat. No. SAB1412951) y anticuerpo anti-GAPDH de ratón (1:1.000, Cat. No. G8795)), en donde GAPDH se usó como control de carga. A continuación, la membrana se lavó 3 veces con 1X TBST. A continuación, la película y el anticuerpo secundario (Cat. No. 111-0350003, Cat. No.111-035-164) se incubaron

por 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se visualizó por un sistema de detección de quimioluminiscencia potenciada (WBKLS0500, Millipore) (Fisher Scientific, EE.UU.).

(2) Resultados

Los resultados se muestran en la FIGURA 9.

De acuerdo con la FIGURA 9, se sabe que el nivel de expresión de MYLK-4 en las células HTM tratadas con dexametasona (células en estado de enfermedad) es mayor al de las células HTM normales.

2. Expresión de MYLK-4 en el tejido objetivo de la enfermedad inducida por microperlas magnéticas

(1) Método

Se inyectaron 50 µL de solución de microperlas magnéticas (50 mg/mL, tamaño de las microperlas magnéticas de 10 µm) en la cámara anterior de los ojos izquierdo y derecho del conejo bajo anestesia, de modo que los ojos del conejo entraron en un estado de presión intraocular elevada. Los conejos blancos no tratados con la solución de perlas magnéticas se usaron como grupo de control. A continuación, se sacrificó a los conejos, se extrajeron los globos oculares y se realizó un análisis histopatológico.

Método de interpretación histopatológica:

Microscopio: MoticEasyScan
Sistema de fotomicrografía: MoticEasyScan

Método de interpretación:

Se encargó a GLOBAL VIEW BIOTECHNOLOGY INC. la realización de la tinción inmunohistoquímica (IHC, por sus siglas en inglés) de secciones de tejido de parafina de globo ocular de conejo y, además de la interpretación de los resultados de la malla trabecular, se proporcionó una hoja de puntuación de los resultados de la interpretación y fotomicrografías de diferentes aumentos.

Después de fijar con formol los tejidos extirpados del globo ocular, se deshidrataron e incrustaron en parafina, y posteriormente se realizaron secciones de tejido en parafina de 3 µm de grosor. Los biomarcadores para la tinción IHC son MYLK-4 y MLC-2.

De acuerdo con los cortes histopatológicos realizados por el espécimen, las lesiones tisulares se observaron y registraron al microscopio 20 veces, 40 veces, 100 veces, 200 veces y 400 veces. De acuerdo con la gravedad de la lesión, el rango de distribución y el porcentaje del tejido que ocupa, se puntúa la lesión basándose en el método de gradación de 5 niveles recomendado por INHAND (Armonización Internacional de la Nomenclatura y los Criterios de Diagnóstico, por sus siglas en inglés): El grado 0 significa que no hay cambios patológicos evidentes y que las lesiones representan menos de 1 % del tejido total; el grado 1 significa que la enfermedad es mínima (1-5 %); el grado 2 significa que la enfermedad es leve (leve, 6 -25 %); el grado 3 representa una enfermedad moderada (moderada, 26-50 %); el nivel 4 representa una enfermedad moderadamente grave (51-75 %); el nivel 5 representa una enfermedad grave (grave/alta, > 76 %).

(2) Resultados

Los resultados de la tinción inmunohistoquímica se muestran en la FIGURA 10, y los resultados de la puntuación se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Resultados de la puntuación de la tinción inmunohistoquímica.

Grupo	Puntuación
Control	0
Presión intraocular elevada	3,3 ± 0,6

De acuerdo con la FIGURA 10 y la Tabla 14, se puede saber que tanto si se trata de células enfermas como de tejidos animales enfermos (ojos de conejo inducidos por perlas magnéticas), el nivel de expresión de MYLK-4 es mayor al de las células y tejidos normales. Por lo tanto, se presume que el compuesto de la presente divulgación con efecto inhibidor de MYLK-4 puede reducir efectivamente la presión intraocular al inhibir MYLK-4 además de por efecto inhibidor de ROCK.

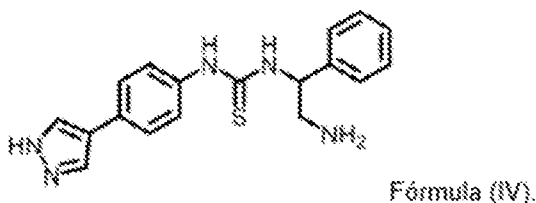
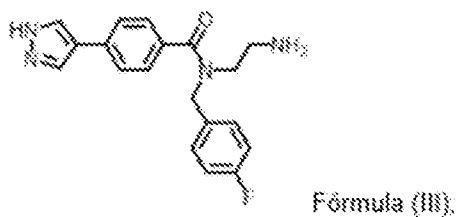
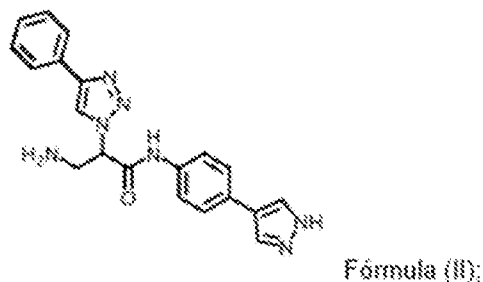
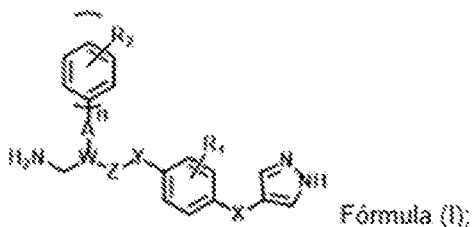
La integración de los resultados experimentales anteriores muestra que, en comparación con el AR-13324 que sólo se dirige a ROCK, el Compuesto 20 de la presente divulgación puede dirigirse simultáneamente a ROCK, MYLK-4 y YSK-4. Además, en el modelo de conejo con presión intraocular alta inducida por solución salina

hipertónica (modelo de presión intraocular alta aguda) y en el modelo de conejo con presión intraocular alta inducida por microperlas magnéticas (modelo de presión intraocular alta con presión intraocular > 30 mmHg), los efectos reductores de la presión intraocular del Compuesto 20 de la presente divulgación son mejores que los de AR-13324. Adicionalmente, el Compuesto 20 de la presente divulgación a la dosis máxima efectiva presenta menor irritación que el AR-13324.

5

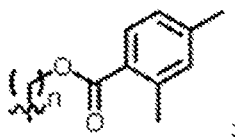
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por cualquiera de las Fórmulas (I)-(IV), o una sal o éster farmacéuticamente aceptable, hidrato, isómeros ópticos individuales, una mezcla de los enantiómeros individuales o un racemato de los mismos:



en donde el compuesto representado por la Fórmula (I) es un derivado de β -aminoácido, y en la Fórmula (I):

- X es un enlace simple;
- Y es NH;
- Z es C=O, C=S;
- W es CH;
- A es un enlace simple, -O-, -OH, -OCH₂- o -N₃;
- R₁ es H o F;
- R₂ es H, F, OH, CF₃, CH₂OH, CHO o

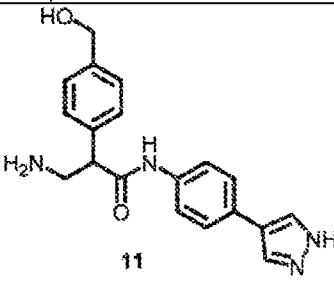
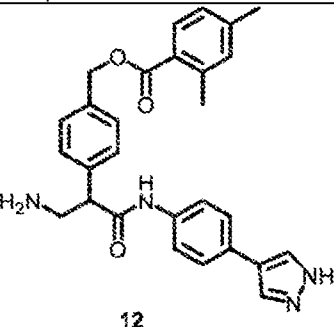
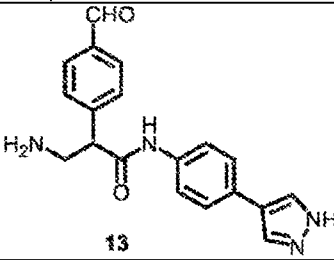
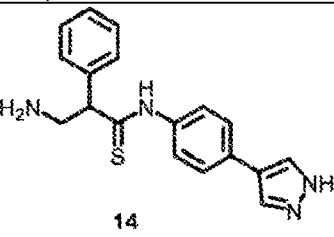
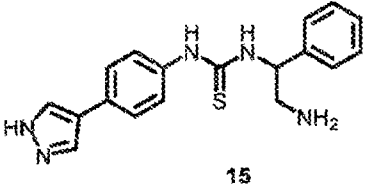
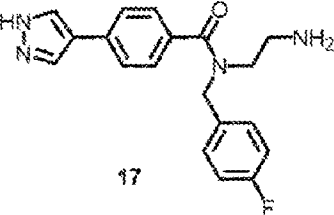
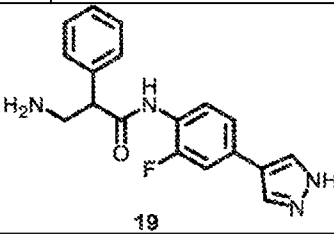
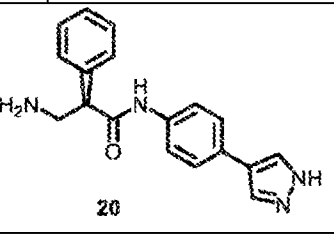
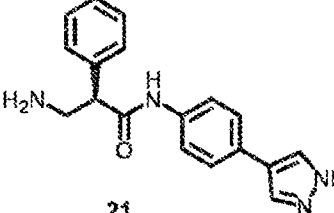


y n es 0 o 1.

2. El compuesto representado por cualquiera de las Fórmulas (I)-(IV), o una sal o éster farmacéuticamente aceptable, hidrato, isómeros ópticos individuales, una mezcla de los enantiómeros individuales o un racemato de los mismos como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el compuesto comprende un compuesto

seleccionado de un grupo que consiste en Compuesto 1 a Compuesto 15, Compuesto 17, y Compuesto 19 a Compuesto 21 como se muestra a continuación:

Número de compuesto	Compuesto 1	Compuesto 2 = Fórmula (II)
Estructura	<p>1</p>	<p>2</p>
Número de compuesto	Compuesto 3	Compuesto 4
Estructura	<p>3</p>	<p>4</p>
Número de compuesto	Compuesto 5	Compuesto 6
Estructura	<p>5</p>	<p>6</p>
Número de compuesto	Compuesto 7	Compuesto 8
Estructura	<p>7</p>	<p>8</p>
Número de compuesto	Compuesto 9	Compuesto 10
Estructura	<p>9</p>	<p>10</p>

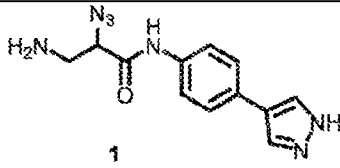
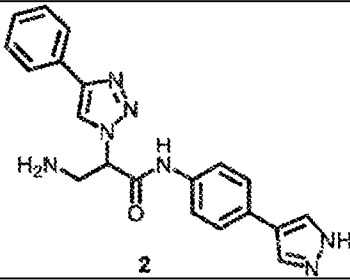
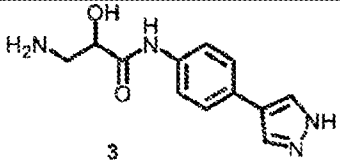
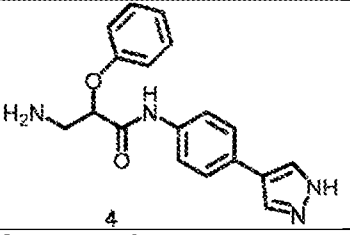
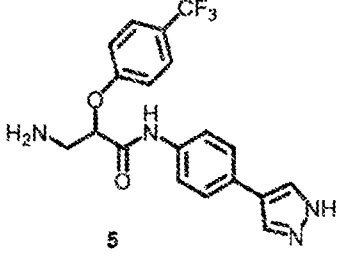
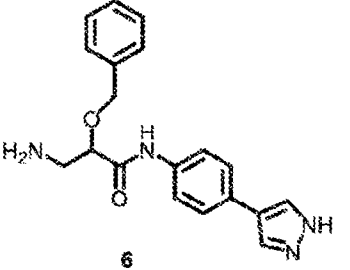
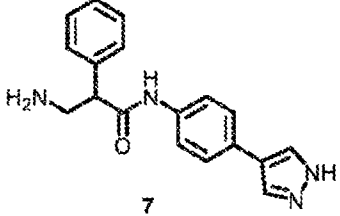
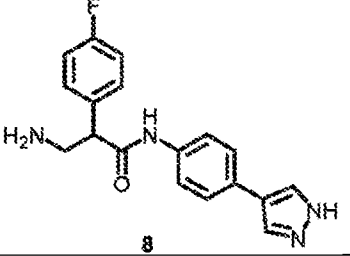
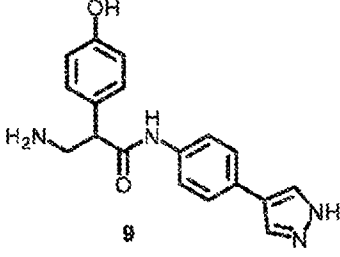
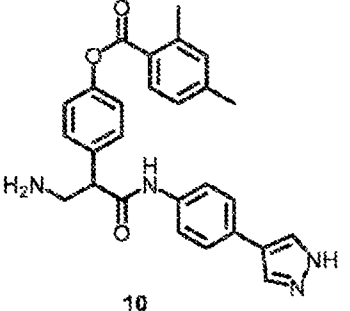
Número de compuesto	Compuesto 11	Compuesto 12
Estructura	 11	 12
Número de compuesto	Compuesto 13	Compuesto 14
Estructura	 13	 14
Número de compuesto	Compuesto 15 = Fórmula (IV)	Compuesto 17 = Fórmula (III)
Estructura	 15	 17
Número de compuesto	Compuesto 19	Compuesto 20
Estructura	 19	 20
Número de compuesto	Compuesto 21	
Estructura	 21	

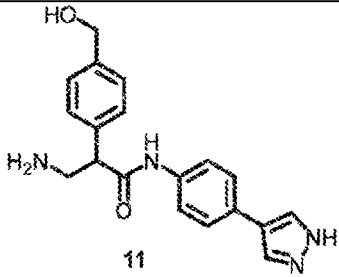
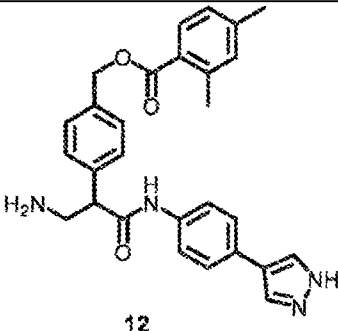
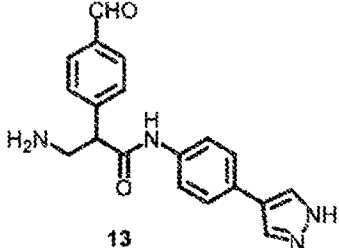
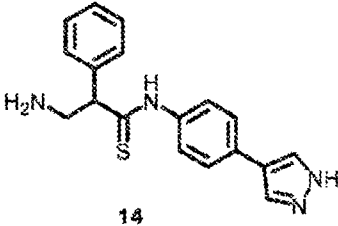
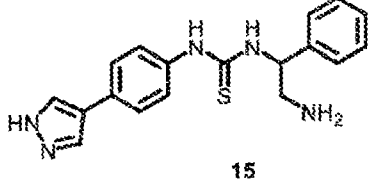
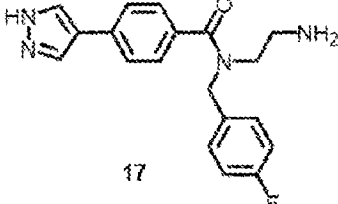
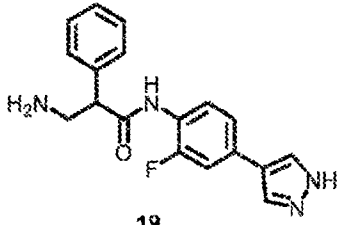
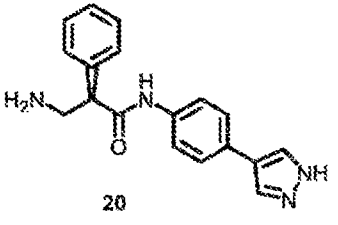
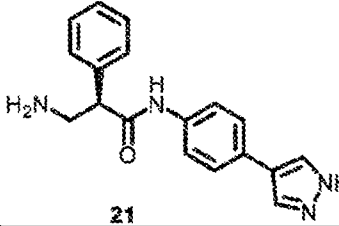
3. Un inhibidor de cinasa, que comprende: el compuesto representado por cualquiera de las Fórmulas (I)-(IV), o una sal o éster farmacéuticamente aceptable, hidrato, isómeros ópticos individuales, una mezcla de los enantiómeros individuales o un racemato de los mismos como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el compuesto es capaz de inhibir la cinasa de cadena ligera de miosina 4 (MYLK-4) y/o la proteína cinasa activada por mitógenos 19 (MAPK19, YSK-4).

5

4. El inhibidor de cinasa como se reivindica en la reivindicación 3, en donde el compuesto está presente en forma de los isómeros ópticos individuales, una mezcla de los enantiómeros individuales o un racemato, y comprende un compuesto seleccionado de un grupo que consiste en el Compuesto 1 al Compuesto 15, el Compuesto 17, y el Compuesto 19 al Compuesto 21 como se muestra a continuación:

10

Número de compuesto	Compuesto 1	Compuesto 2 = Fórmula (II)
Estructura	 1	 2
Número de compuesto	Compuesto 3	Compuesto 4
Estructura	 3	 4
Número de compuesto	Compuesto 5	Compuesto 6
Estructura	 5	 6
Número de compuesto	Compuesto 7	Compuesto 8
Estructura	 7	 8
Número de compuesto	Compuesto 9	Compuesto 10
Estructura	 9	 10

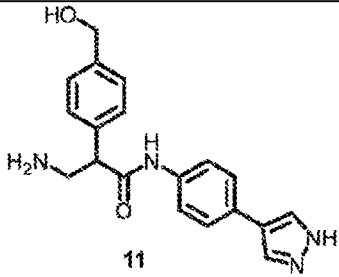
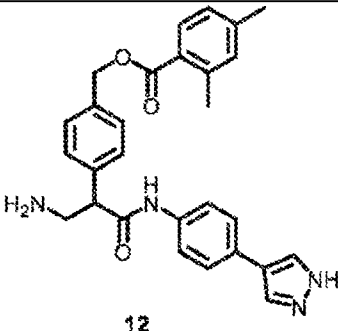
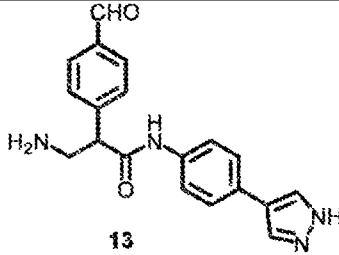
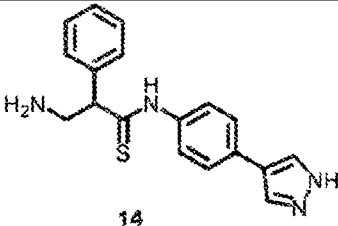
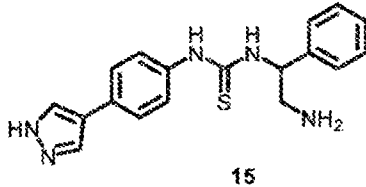
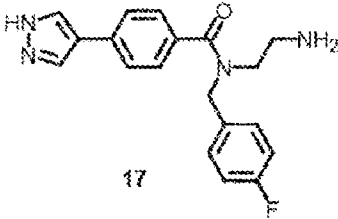
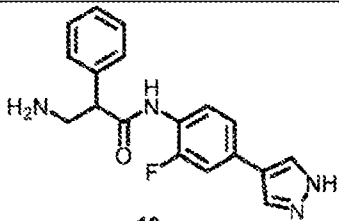
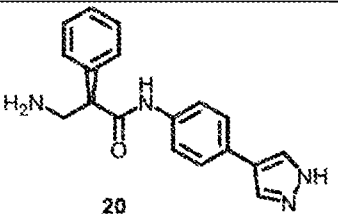
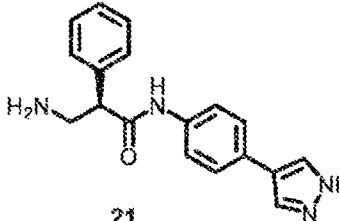
Número de compuesto	Compuesto 11	Compuesto 12
Estructura		
Número de compuesto	Compuesto 13	Compuesto 14
Estructura		
Número de compuesto	Compuesto 15 = Fórmula (IV)	Compuesto 17 = Fórmula (III)
Estructura		
Número de compuesto	Compuesto 19	Compuesto 20
Estructura		
Número de compuesto	Compuesto 21	
Estructura		

5. El inhibidor de cinasa como se reivindica en la reivindicación 3, en donde el compuesto es además capaz de inhibir una proteína cinasa asociada a Rho (ROCK).

5 6. Una composición farmacéutica, que comprende: el compuesto representado por cualquiera de las Fórmulas (I)-(IV), o una sal o éster farmacéuticamente aceptable, hidrato, isómeros ópticos individuales, una mezcla de los enantiómeros individuales o un racemato de los mismos como se reivindica en la reivindicación 1.

10 7. La composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 6, en donde el compuesto está presente en forma de los isómeros ópticos individuales, una mezcla de los enantiómeros individuales o un racemato, y comprende un compuesto seleccionado de un grupo que consiste en el Compuesto 1 al Compuesto 15, el Compuesto 17, y el Compuesto 19 al Compuesto 21 como se muestra a continuación:

Número de compuesto	Compuesto 1	Compuesto 2 = Fórmula (II)
Estructura	<p>1</p>	<p>2</p>
Número de compuesto	Compuesto 3	Compuesto 4
Estructura	<p>3</p>	<p>4</p>
Número de compuesto	Compuesto 5	Compuesto 6
Estructura	<p>5</p>	<p>6</p>
Número de compuesto	Compuesto 7	Compuesto 8
Estructura	<p>7</p>	<p>8</p>
Número de compuesto	Compuesto 9	Compuesto 10
Estructura	<p>9</p>	<p>10</p>

Número de compuesto	Compuesto 11	Compuesto 12
Estructura		
Número de compuesto	Compuesto 13	Compuesto 14
Estructura		
Número de compuesto	Compuesto 15 = Fórmula (IV)	Compuesto 17 = Fórmula (III)
Estructura		
Número de compuesto	Compuesto 19	Compuesto 20
Estructura		
Número de compuesto	Compuesto 21	
Estructura		

8. Una composición farmacéutica para su uso en una aplicación relacionada *in vivo* que se beneficia de la inhibición de una cinasa, que comprende: el compuesto representado por cualquiera de las Fórmulas (I)-(IV), o una sal o éster farmacéuticamente aceptable, hidrato, isómeros ópticos individuales, una mezcla de los enantiómeros individuales o un racemato de los mismos como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la cinasa es al menos una seleccionada de un grupo que consiste en:

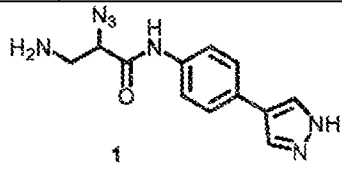
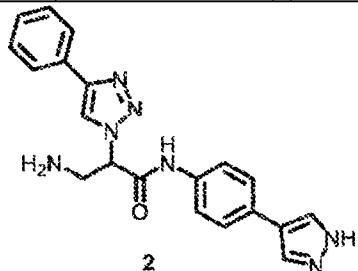
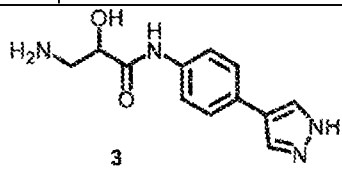
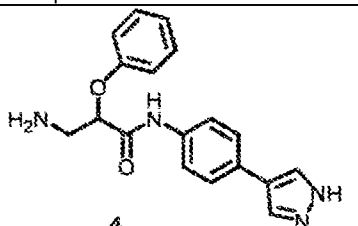
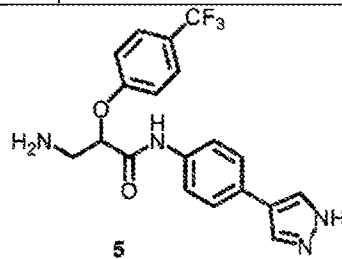
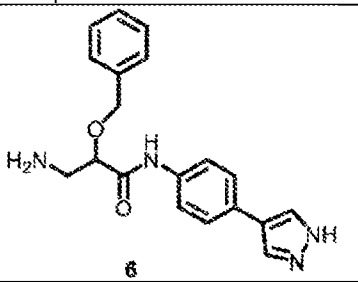
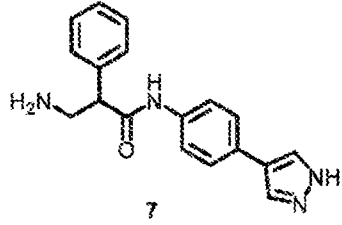
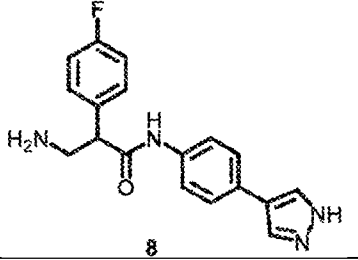
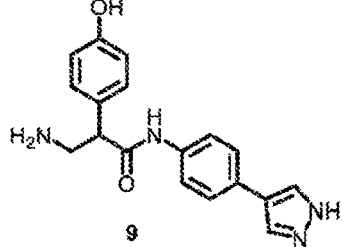
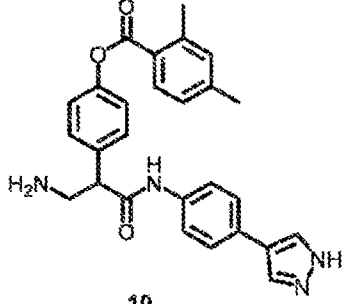
5
10
10

- cinasa de cadena ligera de miosina 4;
- proteína cinasa activada por mitógenos 19; y
- una proteína cinasa asociada a Rho,

en donde la aplicación relacionada *in vivo* comprende una aplicación relacionada con la oftalmología o una aplicación relacionada con el pulmón.

9. La composición farmacéutica para su uso como se reivindica en la reivindicación 8, en donde el compuesto está

presente en forma de los isómeros ópticos individuales, una mezcla de los enantiómeros individuales o un racemato, y comprende un compuesto seleccionado de un grupo que consiste en el Compuesto 1 al Compuesto 15, el Compuesto 17, y el Compuesto 19 al Compuesto 21 como se muestra a continuación:

Número de compuesto	Compuesto 1	Compuesto 2 = Fórmula (II)
Estructura	 <p style="text-align: center;">1</p>	 <p style="text-align: center;">2</p>
Número de compuesto	Compuesto 3	Compuesto 4
Estructura	 <p style="text-align: center;">3</p>	 <p style="text-align: center;">4</p>
Número de compuesto	Compuesto 5	Compuesto 6
Estructura	 <p style="text-align: center;">5</p>	 <p style="text-align: center;">6</p>
Número de compuesto	Compuesto 7	Compuesto 8
Estructura	 <p style="text-align: center;">7</p>	 <p style="text-align: center;">8</p>
Número de compuesto	Compuesto 9	Compuesto 10
Estructura	 <p style="text-align: center;">9</p>	 <p style="text-align: center;">10</p>

Número de compuesto	Compuesto 11	Compuesto 12
Estructura		
Número de compuesto	Compuesto 13	Compuesto 14
Estructura		
Número de compuesto	Compuesto 15 = Fórmula (IV)	Compuesto 17 = Fórmula (III)
Estructura		
Número de compuesto	Compuesto 19	Compuesto 20
Estructura		
Número de compuesto	Compuesto 21	
Estructura		

5 10. La composición farmacéutica para uso como se reivindica en la reivindicación 8 o 9, en donde la aplicación relacionada con la oftalmología comprende la protección del nervio óptico, y/o la prevención y/o el tratamiento de la presión intraocular alta, el glaucoma, el accidente cerebrovascular ocular, la degeneración macular, el edema macular, la retinopatía diabética, la distrofia corneal endotelial de Fuchs (FECD) y/o la fibrosis corneal.

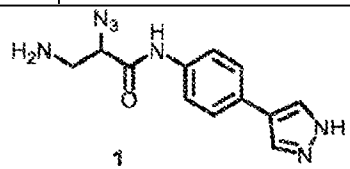
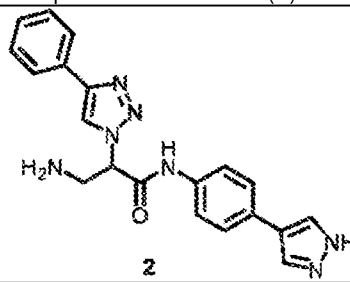
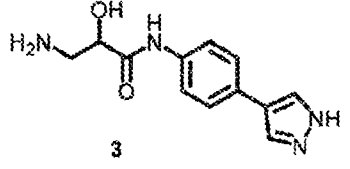
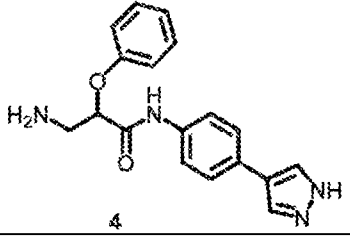
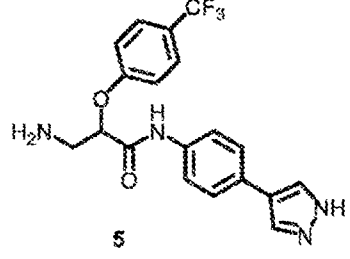
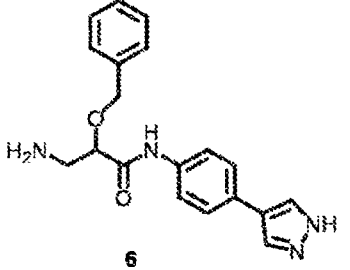
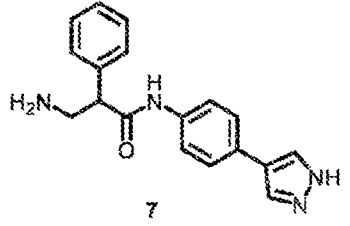
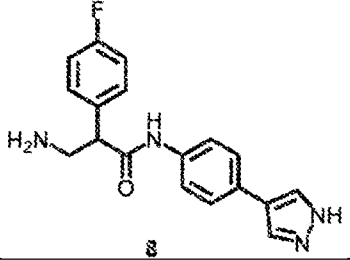
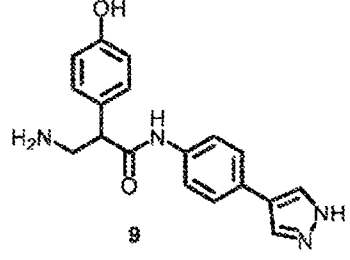
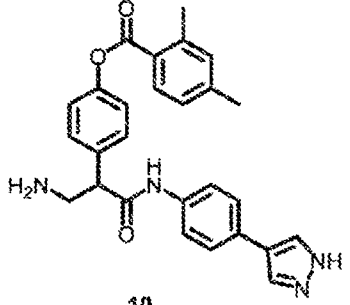
10 11. La composición farmacéutica para uso como se reivindica en la reivindicación 8 o 9, en donde la aplicación relacionada con el pulmón comprende la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión pulmonar, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), la fibrosis pulmonar idiopática (IPF), el enfisema pulmonar y/o el cáncer de pulmón.

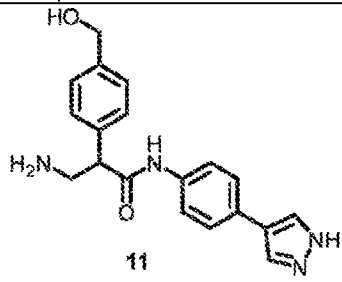
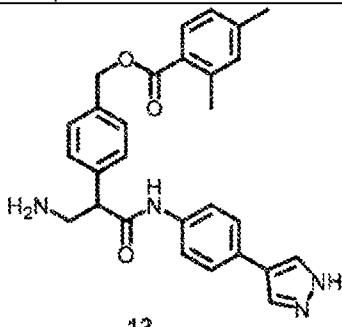
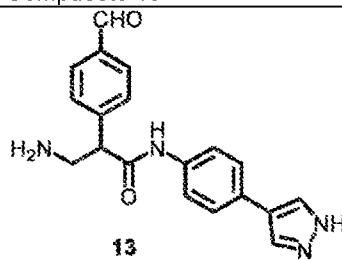
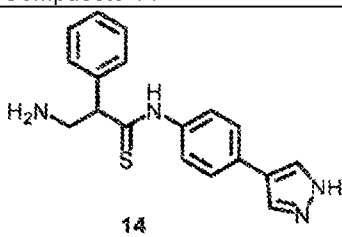
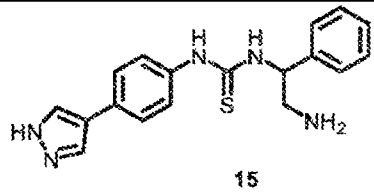
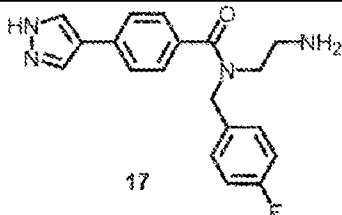
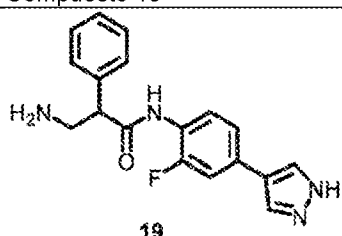
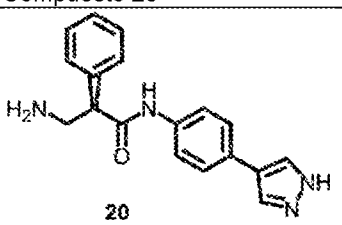
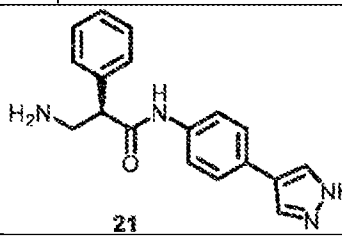
12. Una composición farmacéutica para su uso en la reducción de la presión intraocular, que comprende: el compuesto representado por cualquiera de las Fórmulas (I)-(IV), o una sal o éster farmacéuticamente aceptable, hidrato, isómeros ópticos individuales, una mezcla de los enantiómeros individuales o un racemato de los mismos

como se reivindica en la reivindicación 1.

13. La composición farmacéutica para su uso como se reivindica en la reivindicación 12 en donde el compuesto está presente en forma de los isómeros ópticos individuales, una mezcla de los enantiómeros individuales o un racemato, y comprende un compuesto seleccionado de un grupo que consiste en el Compuesto 1 al Compuesto 15, Compuesto 17, y Compuesto 19 al Compuesto 21 como se muestra a continuación:

5

Número de compuesto	Compuesto 1	Compuesto 2 = Fórmula (II)
Estructura	 1	 2
Número de compuesto	Compuesto 3	Compuesto 4
Estructura	 3	 4
Número de compuesto	Compuesto 5	Compuesto 6
Estructura	 5	 6
Número de compuesto	Compuesto 7	Compuesto 8
Estructura	 7	 8
Número de compuesto	Compuesto 9	Compuesto 10
Estructura	 9	 10

Número de compuesto	Compuesto 11	Compuesto 12
Estructura	 <p>11</p>	 <p>12</p>
Número de compuesto	Compuesto 13	Compuesto 14
Estructura	 <p>13</p>	 <p>14</p>
Número de compuesto	Compuesto 15 = Fórmula (IV)	Compuesto 17 = Fórmula (III)
Estructura	 <p>15</p>	 <p>17</p>
Número de compuesto	Compuesto 19	Compuesto 20
Estructura	 <p>19</p>	 <p>20</p>
Número de compuesto	Compuesto 21	
Estructura	 <p>21</p>	

14. La composición farmacéutica para uso como se reivindica en la reivindicación 12 o 13, en donde la composición farmacéutica usada para reducir la presión intraocular es un medicamento para tratar el glaucoma.

DIBUJOS

Día 1

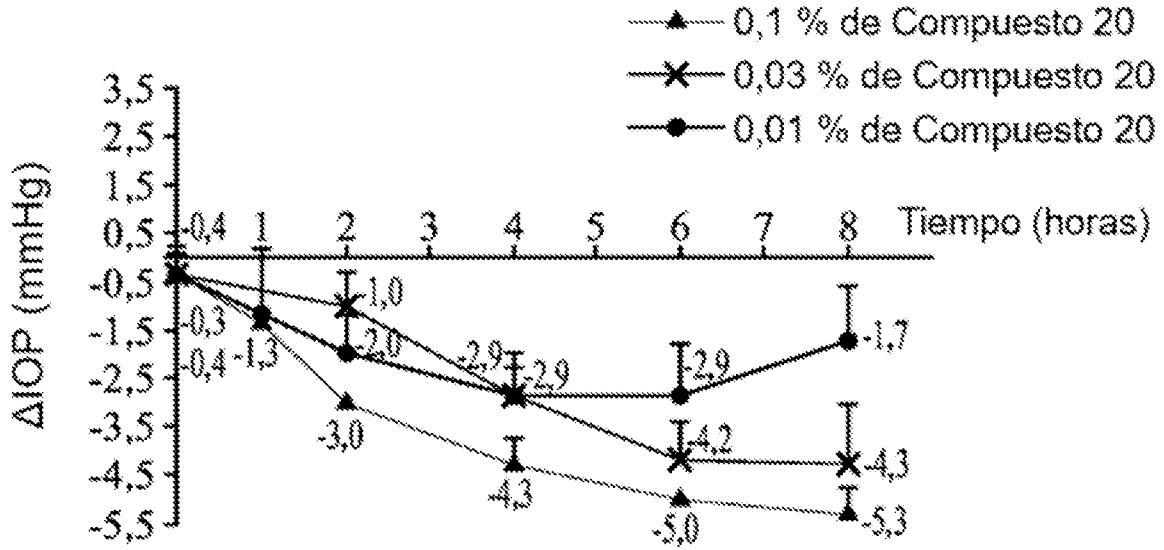


Figura 1A

Día 3

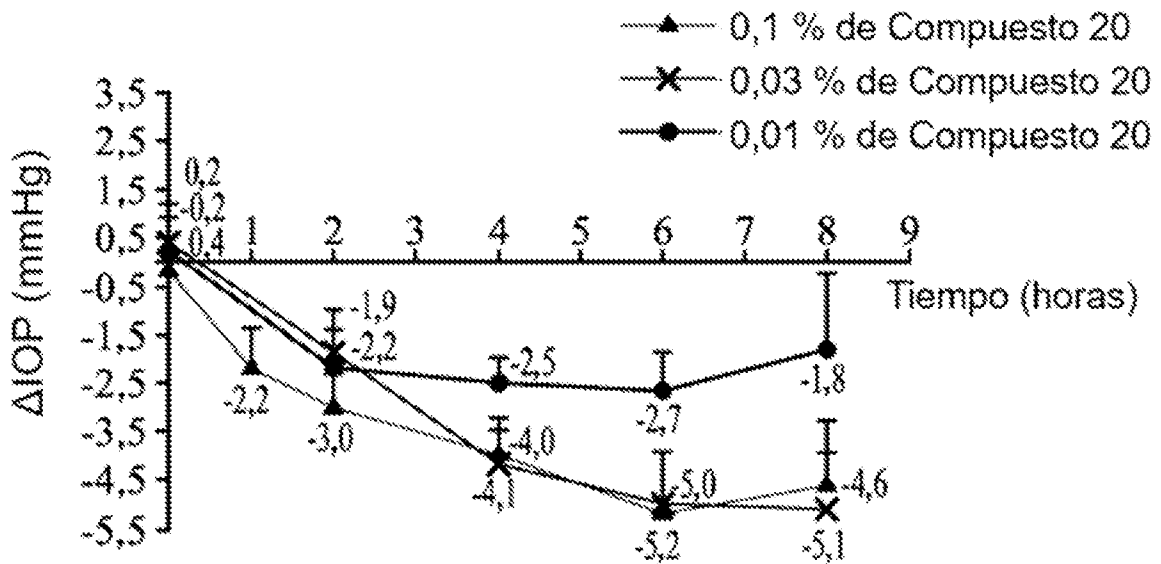


Figura 1B

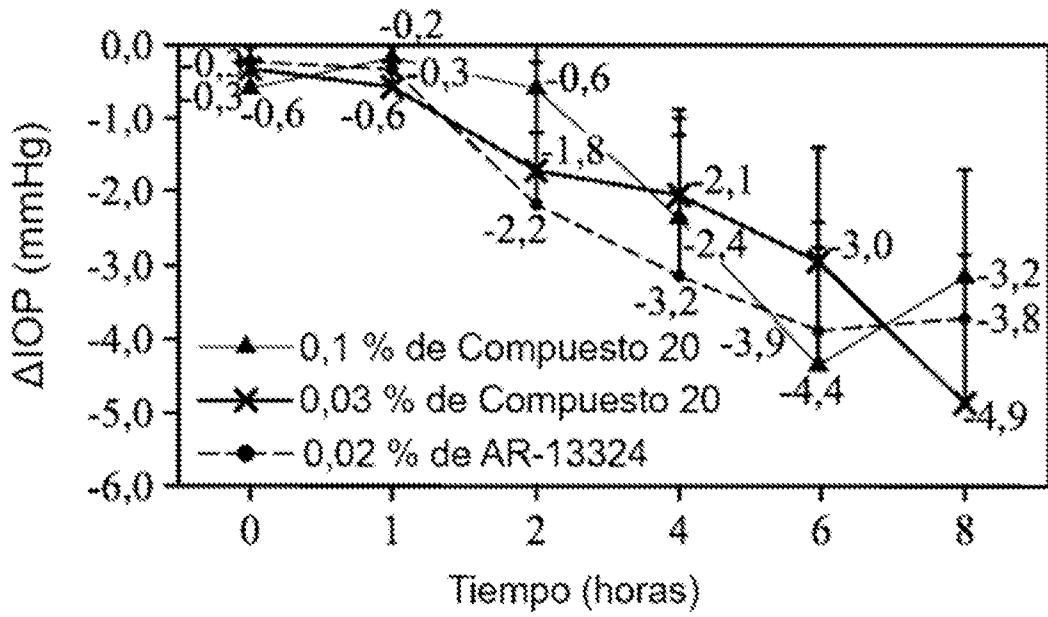


Figura 2

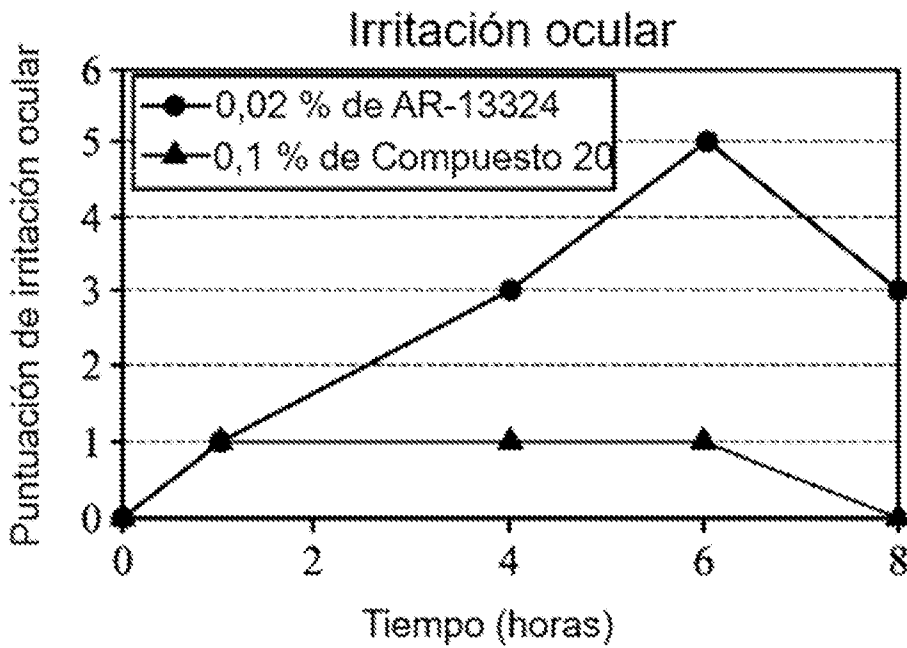
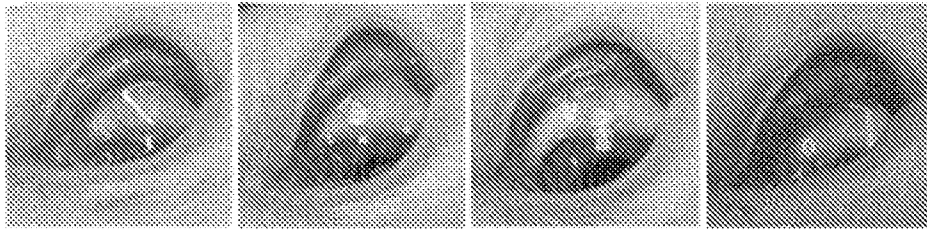
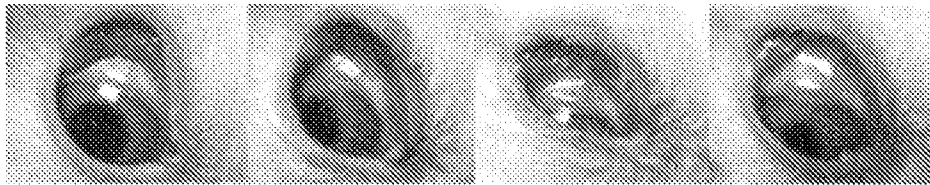


Figura 3A

0,1 % de Compuesto 20



0,02 % de AR-13324



1 hora

4 horas

6 horas

8 horas

Figura 3B

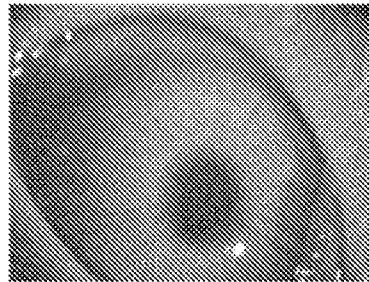


Figura 3C

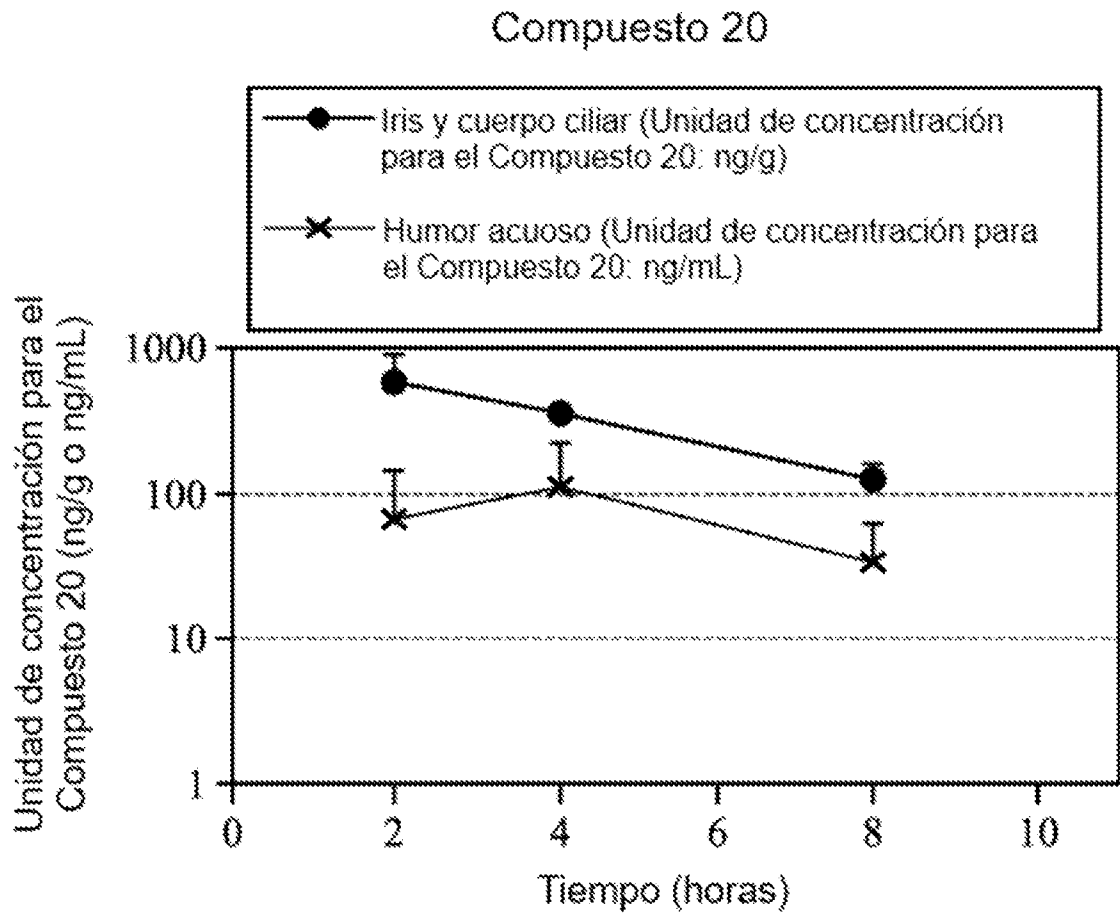


Figura 4

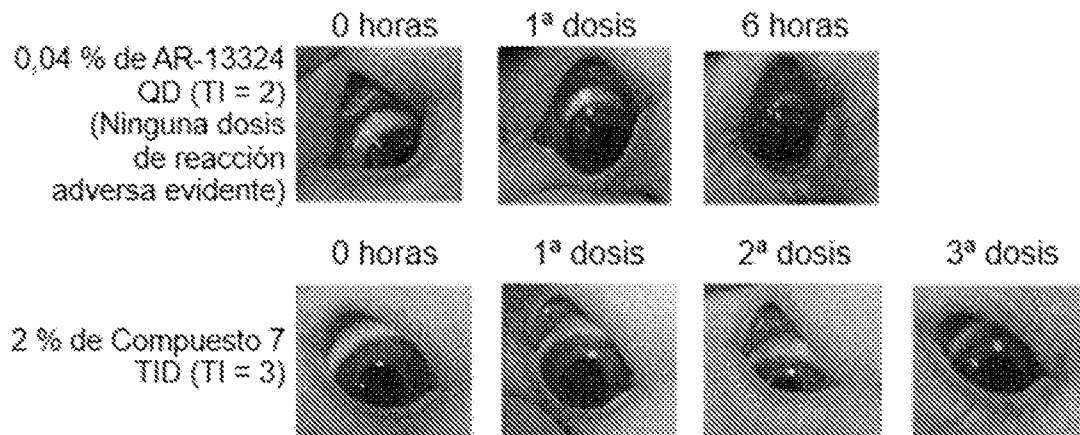


Figura 5

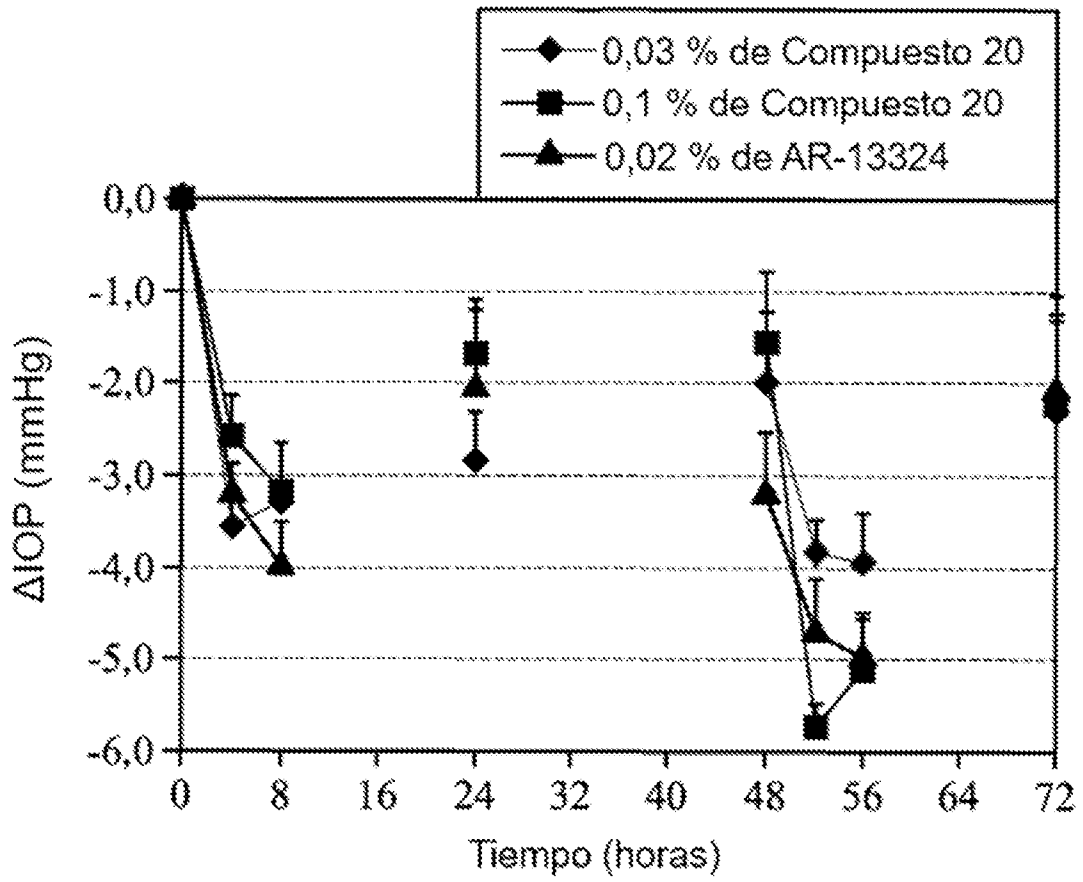


Figura 6

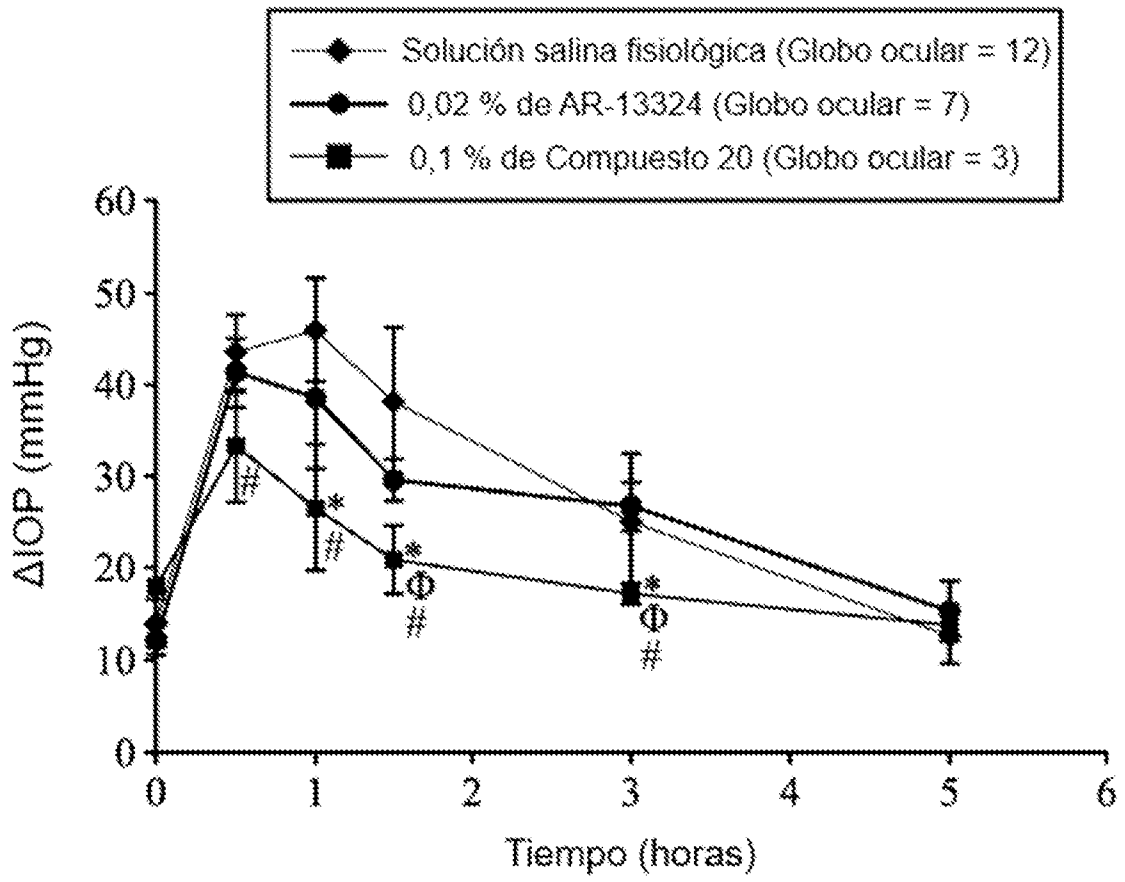


Figura 7

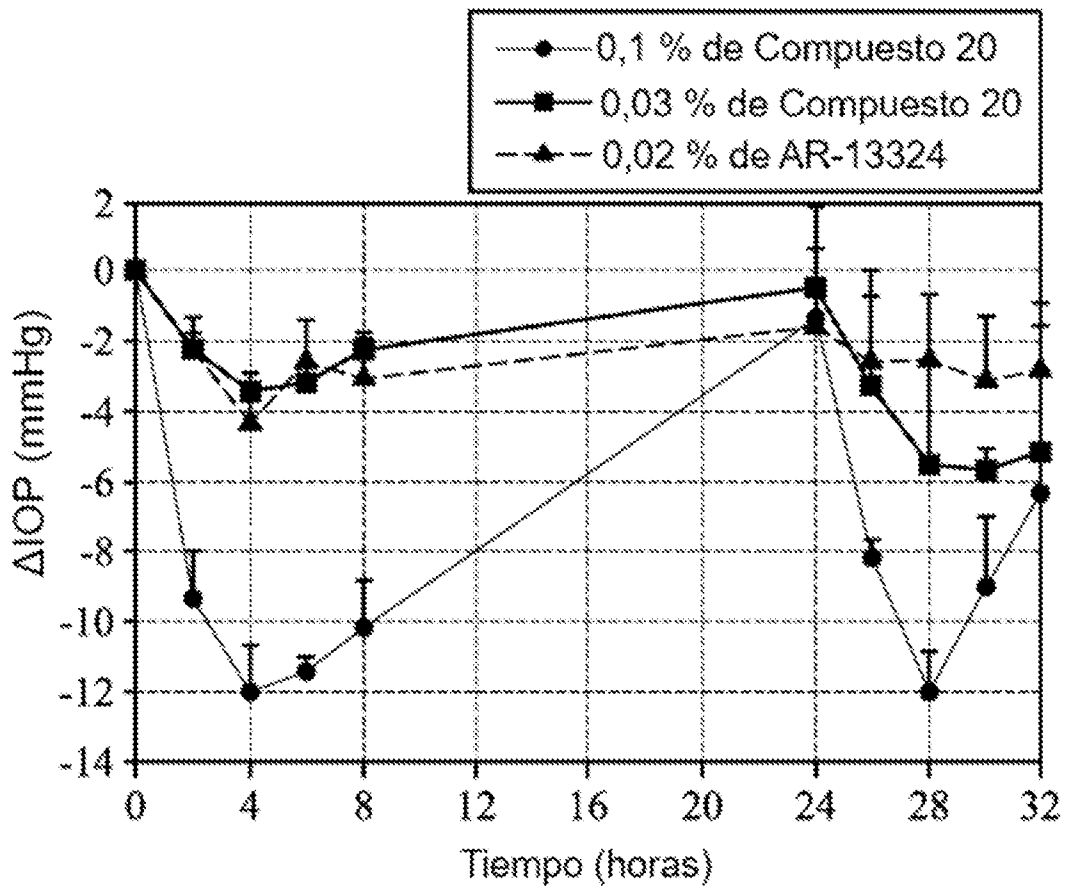


Figura 8

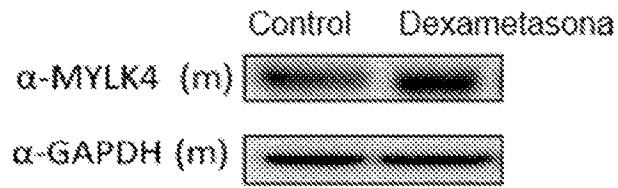


Figura 9

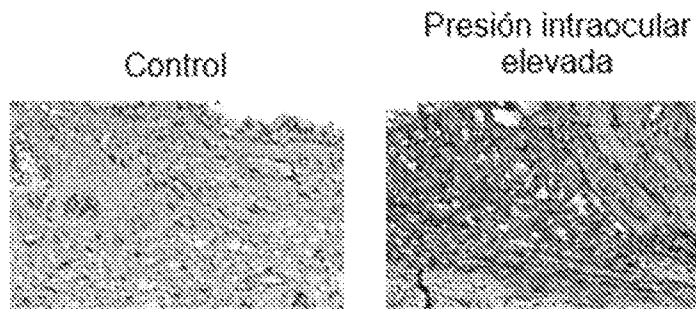


Figura 10