

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 695**

51 Int. Cl.:

C07D 413/14 (2006.01)

A61K 31/4725 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2020** **PCT/KR2020/005134**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2020** **WO20213970**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2020** **E 20791861 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024** **EP 3939976**

54 Título: **Profármaco de inhibidor de caspasas**

30 Prioridad:

19.04.2019 KR 20190046027

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

02.10.2024

73 Titular/es:

LG CHEM, LTD. (100.0%)
128, Yeoui-daero,
Yeongdeungpo-gu, Seoul 07336, KR

72 Inventor/es:

CHOI, SEI HYUN;
SONG, JEONG UK;
PARK, AH BYEOL;
KIM, JUNG JOON y
PARK, HYUN SEO

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 980 695 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

Profármaco de inhibidor de caspasas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un derivado de isoxazolina que tiene un resto lactona como profármaco de inhibidor de caspasas y a una composición farmacéutica que comprende el mismo.

10 **Antecedentes de la técnica**

Las caspasas son un tipo de enzimas y son cisteína proteasas que existen como tetrámero $\alpha_2\beta_2$. Los inhibidores de caspasas interfieren con la actividad de estas caspasas, regulando de ese modo la inflamación o apoptosis provocada por la acción de las caspasas. Las enfermedades en las que pueden eliminarse o aliviarse los síntomas mediante la administración de estos compuestos incluyen osteoartritis, artritis reumatoide, artritis degenerativa, trastorno óseo destructivo, enfermedades hepáticas provocadas por el virus de la hepatitis, hepatitis aguda, hepatocirrosis, daños cerebrales provocados por el virus de la hepatitis, insuficiencia hepática fulminante humana, septicemia, rechazo de trasplante de órgano, enfermedad cardíaca isquémica, demencia, accidente cerebrovascular, disfunción cerebral debida al sida, diabetes, úlcera gástrica, etc.

Entre los compuestos que tienen diversas estructuras conocidos como inhibidores de caspasas, se presentaron derivados de isoxazolina como solicitudes de patente coreana n.º 10-2004-0066726, 10-2006-0013107 y 10-2008-0025123. Además, se divulgó un profármaco de un inhibidor de caspasas basado en un derivado de isoxazolina en la publicación internacional n.º WO 2007/015931 (solicitante: Vertex Pharmaceuticals Incorporated, EE. UU.). El documento KR 2006-0094868 A también divulga derivados de isoxazolina usados como inhibidores de caspasas y composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos.

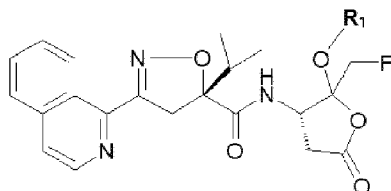
Divulgación de la invención30 **Problema técnico**

La presente invención está destinada a mejorar la biodisponibilidad mediante el desarrollo de un profármaco de un derivado de isoxazolina que tiene la estructura de fórmula 2 que es un inhibidor eficaz contra caspasas. Además, el inhibidor de caspasas de fórmula 2 tiene alta solubilidad en agua y alta hidrofilia, por lo que puede ser ventajoso para el desarrollo de formulaciones orales, pero puede suponer una desventaja en el desarrollo de formulaciones de acción prolongada. De este modo, la presente invención está destinada a desarrollar una forma de profármaco del inhibidor de caspasas de fórmula 2 que tenga hidrofobia para ser ventajoso para formulaciones de acción prolongada.

40 **Solución al problema**

Con el fin de lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona un compuesto de la siguiente fórmula 1, o un isómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

45 [Fórmula 1]



en la que

50 R_1 representa alquilo, cicloalquilo, arilo o $-C(O)R_2$;

R_2 representa alquilo, cicloalquilo, arilo, arilalquilo o heteroarilo que incluye uno o más heteroátomos seleccionados de N, O y S; y

55 el alquilo, el cicloalquilo, el arilalquilo y el heteroarilo están opcionalmente sustituidos, y el sustituyente puede ser uno o más seleccionados de grupo alquilo, cicloalquilo, hidroxilo, halo, haloalquilo, acilo, amino, alcoxilo, carboalcoxilo, carboxilo, carboxiamino, ciano, nitro, tiol, ariloxilo, sulfoxilo y guanido.

60 El compuesto de fórmula 1 según la presente invención puede formar una sal farmacéuticamente aceptable. Una sal

farmacéuticamente aceptable puede incluir una sal de adición de ácido que se forma a partir de un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico y ácido yodhídrico; un ácido orgánico tal como ácido tartárico, ácido fórmico, ácido cítrico, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido glucónico, ácido benzoico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido maleico y ácido salicílico; o ácido sulfónico tal como ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido p-toluenosulfónico, que forman una sal de adición de ácido no tóxica que incluye un anión farmacéuticamente aceptable. Además, una sal de ácido carboxílico farmacéuticamente aceptable incluye la sal con un metal alcalino o un metal alcalinotérreo tal como litio, sodio, potasio, calcio y magnesio; sales con aminoácido tal como lisina, arginina y guanidina; una sal orgánica tal como diciclohexilamina, N-metil-D-glucamina, tris(hidroximetil)metilamina, dietanolamina, colina y trietilamina. El compuesto de fórmula 1 según la presente invención puede convertirse en sus sales mediante métodos convencionales.

Mientras tanto, puesto que el compuesto de fórmula 1 según la presente invención puede tener un centro de carbono asimétrico y un plano o eje asimétrico, puede existir como isómero E o Z, isómero R o S, mezclas racémicas o mezclas diastereoisoméricas y cada diastereoisómero, todos los cuales están dentro del alcance de la presente invención.

En el presente documento, a menos que se indique lo contrario, el término "el compuesto de fórmula 1" se usa para significar todos los compuestos de fórmula 1, incluyendo los isómeros y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En el presente documento, se usan los siguientes conceptos que definen los sustituyentes para definir el compuesto de fórmula 1.

El término "halógeno" o "halo" significa fluoruro (F), cloro (Cl), bromo (Br) o yodo (I).

El término "alquilo" significa hidrocarburos lineales o ramificados, puede incluir un enlace sencillo, un doble enlace o un triple enlace, y es preferiblemente alquilo C₁-C₁₀. Los ejemplos de alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *i*-butilo, *tert*-butilo, acetileno, vinilo, trifluorometilo, y similares.

El término "cicloalquilo" significa hidrocarburos de anillo individual o condensado parcial o completamente saturados, y es preferiblemente cicloalquilo C₃-C₁₀. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, y similares.

A menos que se defina lo contrario, el término "alcoxilo" significa alquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.

El término "arilo" significa hidrocarburos aromáticos, preferiblemente arilo C₅-C₁₂, más preferiblemente arilo C₆-C₁₀. Los ejemplos de arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, y similares.

El término "heteroarilo" significa hidrocarburos aromáticos de 3 a 12 miembros, más preferiblemente de 5 a 10 miembros, que forman un anillo individual o condensado, que pueden condensarse con benzo o cicloalquilo C₃-C₈, que incluyen uno o más heteroátomos seleccionados de N, O y S como miembro de anillo. Los ejemplos de heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, piridinilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirazinilo, oxadiazolilo, isoxadiazolilo, tetrazolilo, triazolilo, indolilo, indazolilo, isoxazolilo, oxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, furanilo, benzofuranilo, imidazolilo, tiofenilo, benzotiazol, bencimidazol, quinolinilo, indolinilo, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolilo, 3,4-dihidroisoquinolinilo, tiazolopiridilo, 2,3-dihidrobenzofurano, 2,3-dihidrotiofeno, 2,3-dihidroindol, benzo[1,3]dioxina, cromano, tiocromano, 1,2,3,4-tetrahidroquinolina, 4H-benzo[1,3]dioxina, 2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxina, 6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidina, y similares.

Arilalquilo, alquilarilo y heteroarilalquilo significan grupos que se forman mediante la combinación del arilo y alquilo o del heteroarilo y alquilo mencionados anteriormente. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, bencilo, tiofenometilo, pirimidinometilo, y similares.

Según una realización de la presente invención, en la fórmula 1, R₁ representa alquilo C₁-C₈ o -C(O)R₂; y R₂ representa alquilo C₁-C₂₀, arilo C₆-C₁₀ o aril C₆-C₁₀-alquilo C₁-C₇.

Según otra realización de la presente invención, en la fórmula 1, R₁ representa alquilo C₁-C₅ o -C(O)R₂; R₂ representa alquilo C₁-C₁₅, arilo C₆-C₁₀ o aril C₆-C₁₀-alquilo C₁-C₅; y el sustituyente es alquilo o haloalquilo.

Los compuestos de fórmula 1 representativos según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes compuestos:

acetato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-il;

propionato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-

oxotetrahidrofuran-2-ilo;

isobutirato de (2R,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

pivalato de (2R,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

3-metilbutanoato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

3,3-dimetilbutanoato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

palmitato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

benzoato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

4-(trifluorometil)benzoato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

2-fenilacetato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

(5R)-N-((3S)-2-etoxi-2-(fluorometil)-5-oxotetrahidrofuran-3-il)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamida; y

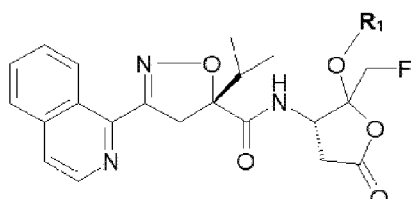
(5R)-N-((3S)-2-(fluorometil)-2-metoxi-5-oxotetrahidrofuran-3-il)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamida.

Los términos y las abreviaturas usados en el presente documento conservan sus significados originales a menos que se indique lo contrario.

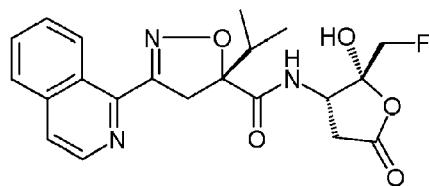
La presente invención también proporciona un método para preparar el compuesto de fórmula 1. A continuación en el presente documento, se explica el método para preparar el compuesto de fórmula 1 basándose en reacciones a modo de ejemplo con el fin de ilustrar la presente invención. Sin embargo, un experto en la técnica podría preparar el compuesto de fórmula 1 mediante diversos métodos basándose en la estructura de fórmula 1, y debe interpretarse que tales métodos están dentro del alcance de la presente invención. Es decir, el compuesto de fórmula 1 puede prepararse mediante los métodos descritos en el presente documento o combinando diversos métodos divulgados en la técnica anterior, que debe interpretarse que están dentro del alcance de la presente invención. Por consiguiente, un método para preparar el compuesto de fórmula 1 no se limita a los siguientes métodos.

El compuesto de fórmula 1 de la presente invención puede prepararse a partir del compuesto de fórmula 2 según el método del siguiente esquema de reacción 1. El compuesto de fórmula 1, que es un profármaco, puede sintetizarse mediante el uso del compuesto de fórmula 2 y un derivado de cloruro de acilo, trietilamina (Et_3N), DMAP (4-dimetilaminopiridina) y disolvente de diclorometano (DCM), o después de sintetizar el producto intermedio mediante el uso del compuesto de fórmula 2 y ácido p-tosílico, trimetoximetano, etanol o metanol, y el compuesto sintetizado haciendo reaccionar hidróxido de litio, agua y THF se usa en ácido disolvente de diclorometano y trifluoroacético.

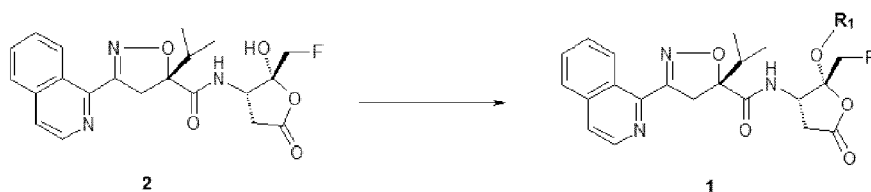
[Fórmula 1]



[Fórmula 2]



[Esquema de reacción 1]



5

2

1

Un compuesto no descrito específicamente en el método de preparación de la presente memoria descriptiva es un compuesto conocido o un compuesto que puede sintetizarse fácilmente a partir de un compuesto conocido mediante un método de síntesis conocido o un método similar.

10

El compuesto de fórmula 1 obtenido mediante los métodos anteriores puede separarse o purificarse a partir de los productos de reacción mediante métodos convencionales tales como recristalización, ionóforesis, cromatografía en columna de gel de sílice o cromatografía de intercambio iónico.

15 Tal como se explicó anteriormente, los compuestos según la presente invención, los materiales de partida o los productos intermedios para la preparación de los mismos pueden prepararse mediante una variedad de métodos, que debe interpretarse que están dentro del alcance de la presente invención con respecto a la preparación del compuesto de fórmula 1.

20 El compuesto de fórmula 1 según la presente invención puede usarse como profármaco de inhibidor de caspasas. Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de inflamación o apoptosis que comprende el compuesto de fórmula 1, o un isómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como principio activo, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

25 Las enfermedades a modo de ejemplo que pueden prevenirse o tratarse mediante la composición farmacéutica según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aquellas seleccionadas del grupo que consiste en enfermedades asociadas con la apoptosis, enfermedades inflamatorias, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis degenerativa y trastornos óseos destructivos.

30 En la presente invención, una "composición farmacéutica" puede incluir otros componentes tales como portadores, diluyentes, excipientes, etc., además del principio activo de la presente invención. Por consiguiente, la composición farmacéutica puede incluir portadores, diluyentes, excipientes farmacéuticamente aceptables o combinaciones de los mismos, si es necesario. La composición farmacéutica facilita la administración de compuestos al cuerpo. Diversos métodos para administrar los compuestos incluyen, pero no se limitan a, administración oral, mediante inyección, en aerosol, parenteral y local.

35

En el presente documento, un "portador" significa un compuesto que facilita la adición de compuestos a la célula o al tejido. Por ejemplo, el dimetilsulfóxido (DMSO) es un portador convencional que facilita la administración de muchos compuestos orgánicos a células o tejidos vivos.

40

En el presente documento, un "diluyente" significa un compuesto que no sólo estabiliza una forma biológicamente activa, sino que se diluye en el disolvente que disuelve los compuestos. Una sal disuelta en tampón se usa como diluyente en este campo. Un tampón convencionalmente usado es una solución salina tamponada con fosfato que imita la forma de sal en el fluido corporal. Puesto que una disolución tampón puede controlar el pH de la disolución a baja concentración, un diluyente tampón apenas modifica la actividad biológica de los compuestos.

45

En el presente documento, "farmacéuticamente aceptable" significa una propiedad tal que no altera ni la actividad biológica ni la propiedad física de los compuestos.

50 Los compuestos según la presente invención pueden formularse como diversas formas de dosificación administradas farmacéuticamente. En la preparación de la composición farmacéutica de la presente invención, un componente activo, específicamente el compuesto de fórmula 1 o un isómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se mezcla con portadores farmacéuticamente aceptables seleccionados teniendo en cuenta la forma de dosificación que va a prepararse. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede

formularse como inyecciones, preparaciones orales, y similares, según sea necesario.

La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse en forma de dosificación oral, forma de inyección o forma de parche, pero puede no estar limitada a las mismas.

El compuesto de la presente invención puede formularse mediante métodos convencionales usando portadores y excipientes farmacéuticos conocidos e insertarse en recipientes de una o múltiples unidades. Las formulaciones pueden ser disolución, suspensión o emulsión en aceite o disolvente acuoso e incluyen agentes de dispersión, agentes de suspensión o agentes de estabilización convencionales. Además, el compuesto puede ser, por ejemplo, una forma de polvo seco que se disuelve en agua libre de pirógenos esterilizada antes de su uso. El compuesto de la presente invención puede formularse en supositorios mediante el uso de una base para supositorios convencional tal como manteca de cacao u otros glicéridos. Las formas sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, pastillas, polvos y gránulos. Se prefieren las cápsulas y los comprimidos. Los comprimidos y las pastillas tienen preferiblemente un recubrimiento entérico. Las formas sólidas se fabrican mezclando los compuestos de la presente invención con al menos un portador seleccionado de diluyentes inertes tales como sacarosa, lactosa o almidón, lubricantes tales como estearato de magnesio, agentes disgregantes, aglutinantes, y similares.

En el caso de formulaciones parenterales, habitualmente se usa agua esterilizada y también puede(n) estar comprendido(s) otro(s) componente(s) tal(es) como un adyuvante de disolución. Las formulaciones para inyección, por ejemplo, suspensión a base de aceite o a base de agua esterilizada para inyección, pueden prepararse según técnicas conocidas mediante el uso de agentes de dispersión, agentes de humectación o agentes de suspensión apropiados. Los disolventes útiles para este propósito incluyen agua, solución de Ringer y disolución de NaCl isotónica, y como disolvente o medio de suspensión también se usan convencionalmente aceites inmovilizados esterilizados. Para este propósito puede usarse cualquier aceite inmovilizado no irritante, incluyendo monoglicéridos y diglicéridos, y para una formulación para inyección pueden usarse ácidos grasos tales como un ácido oleico. En el caso de formulaciones percutáneas, como portador puede usarse un agente potenciador de la penetración y/o un agente de humectación adecuado, opcionalmente en combinación con aditivo(s) no irritante(s) adecuado(s) para la piel. Como tales aditivos, pueden seleccionarse aquellos útiles para potenciar la administración a través de la piel y/o preparar la composición deseada. La formulación percutánea puede administrarse de diversas maneras, por ejemplo, tal como un parche transdérmico, un tratamiento local o una pomada.

El compuesto o la composición farmacéutica que comprende el mismo según la presente invención puede administrarse en combinación con otros fármacos, por ejemplo, otros inhibidores de caspasas y/o profármacos de inhibidores de caspasas.

La dosis del compuesto de fórmula 1 según la presente invención se determina por la receta de un médico teniendo en cuenta el peso corporal, la edad y la afección específica del paciente y la gravedad de la enfermedad. Cuando el compuesto de la presente invención se administra con propósitos clínicos, la dosis diaria total que va a administrarse al huésped en una dosis única o en dosis independientes está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 5 a 500 mg/kg de peso corporal, pero el nivel de dosis específico para un paciente específico puede variar dependiendo del peso, el sexo, el estado de salud, la dieta, el momento de administración del fármaco, el método de administración, la tasa de excreción, la mezcla de fármacos, la gravedad de la enfermedad, etc., del paciente.

En el presente documento, el término "tratamiento" se usa para significar impedir, retardar o mejorar el avance de enfermedades en un sujeto que muestra síntomas de las enfermedades.

Efectos ventajosos de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo compuesto que tiene la estructura de fórmula 1, que es un profármaco de un derivado de isoxazolina, que es un inhibidor de caspasas, que tiene la estructura de fórmula 2. Es decir, el compuesto de fórmula 1 actúa como profármaco de un inhibidor de caspasas. El compuesto profármaco que tiene la estructura de fórmula 1 se convierte en la forma activa del inhibidor de caspasas de fórmula 2 mediante una isoenzima esterasa en el cuerpo. Estos compuestos profármacos presentan ventajas con respecto al inhibidor de caspasas de fórmula 2 en cuanto a farmacocinética. Específicamente, el compuesto profármaco de fórmula 1 presenta una mayor durabilidad del fármaco en comparación con el inhibidor de caspasas de fórmula 2. Además, debido a que el compuesto profármaco de fórmula 1 puede convertirse en el inhibidor de caspasas de fórmula 2 mediante una enzima degradante en el cuerpo humano y presenta hidrofobia por sí mismo, puede ser adecuado para una formulación de acción prolongada.

Breve descripción de los dibujos

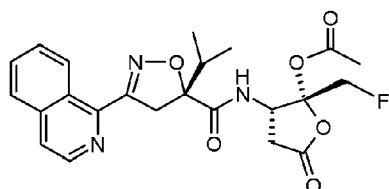
La figura 1 es un gráfico que representa los resultados de la prueba de hidrólisis del compuesto de fórmula 1 preparado según el ejemplo de la presente invención.

La figura 2 es un gráfico que representa los resultados de la prueba de farmacocinética de los compuestos de fórmula 1 preparados según los ejemplos de la presente invención.

Modo para la invención

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá en más detalle a través de ejemplos de preparación y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son sólo ilustrativos, y el alcance de la presente invención no se limita a los mismos.

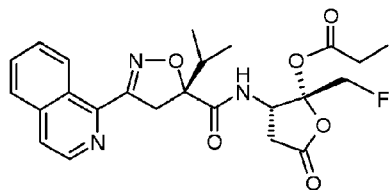
Ejemplo 1: acetato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo



Se disolvió el compuesto de fórmula 2 (5,0 g, 12,0 mmol) en diclorometano (50 ml) y luego se añadieron al mismo cloruro de acetilo (0,94 ml, 13,2 mmol, 1,1 equiv.), trietilamina (2,52 ml, 18,0 mmol, 1,5 equiv.) y 4-dimetilaminopiridina (0,15 g, 1,2 mmol, 0,1 equiv.) mientras se mantenía la temperatura de 5 °C o inferior. Se agitó la mezcla de reacción a 25 °C durante aproximadamente 2 horas y se terminó la reacción mediante la adición de disolución de hidrogenocarbonato de sodio acuoso al 10 % (25 ml). Después de añadir agua (25 ml) y agitar, se separó la fase orgánica y se destiló a presión reducida. Se recrystalizó la mezcla obtenida en una mezcla 1:5 de acetato de etilo y hexano (EtOAc:hexano=1:5) para obtener 3,0 g (rendimiento: 54 %) del compuesto del título.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,12 (d, 1H), 8,55 (d, 1H), 7,87 (d, 1H), 7,74-7,69 (m, 3H), 7,08 (d, 1H), 5,22 (m, 1H), 4,69 (d, 2H), 4,03 (d, 1H), 3,83 (d, 1H), 2,97 (m, 2H), 2,38 (m, 1H), 2,18 (s, 3H), 1,05 (dd, 6H)

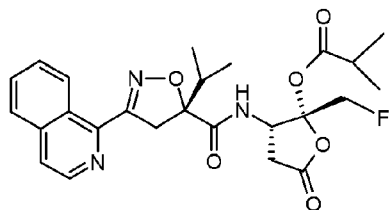
Ejemplo 2: propionato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo



Se disolvió el compuesto de fórmula 2 (1,0 g, 2,4 mmol) en diclorometano (20 ml) y luego se añadieron al mismo cloruro de propionilo (0,23 ml, 2,65 mmol, 1,1 equiv.), trietilamina (0,5 ml, 3,61 mmol, 1,5 equiv.) y 4-dimetilaminopiridina (0,03 g, 0,24 mmol, 0,1 equiv.) mientras se mantenía la temperatura de 5 °C o inferior. Se agitó la mezcla de reacción a 25 °C durante aproximadamente 2 horas y se terminó la reacción mediante la adición de disolución de hidrogenocarbonato de sodio acuoso al 10 % (10 ml). Después de añadir agua (10 ml) y agitar, se separó la fase orgánica y se destiló a presión reducida. Se separó en columna la mezcla obtenida mediante el uso de una mezcla 1:2 de acetato de etilo y hexano (EtOAc:hexano=1:2) para obtener 0,25 g (rendimiento: 23 %) del compuesto del título.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,12 (d, 1H), 8,55 (d, 1H), 7,87 (d, 1H), 7,74-7,69 (m, 3H), 7,08 (d, 1H), 5,22 (m, 1H), 4,69 (d, 2H), 4,03 (d, 1H), 3,83 (d, 1H), 2,98 (m, 2H), 2,45 (m, 2H), 2,37 (m, 1H), 1,20 (t, 3H), 1,05 (dd, 6H)

Ejemplo 3: isobutirato de (2R,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo

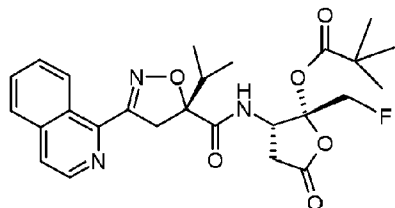


Se disolvió el compuesto de fórmula 2 (1,0 g, 2,4 mmol) en diclorometano (20 ml) y luego se añadieron al mismo cloruro de isobutirilo (0,73 g, 2,65 mmol, 1,1 equiv.), trietilamina (0,5 ml, 3,61 mmol, 1,5 equiv.) y 4-dimetilaminopiridina (0,03 g, 0,24 mmol, 0,1 equiv.) mientras se mantenía la temperatura de 5 °C o inferior. Se

agitó la mezcla de reacción a 25 °C durante aproximadamente 2 horas y se terminó la reacción mediante la adición de disolución de hidrogenocarbonato de sodio acuoso al 10 % (10 ml). Después de añadir agua (10 ml) y agitar, se separó la fase orgánica y se destiló a presión reducida. Se separó en columna la mezcla obtenida mediante el uso de una mezcla 1:2 de acetato de etilo y hexano (EtOAc:hexano=1:2) para obtener 0,06 g (rendimiento: 5 %) del compuesto del título.

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 9,12 (d, 1H), 8,55 (d, 1H), 7,88 (d, 1H), 7,74-7,69 (m, 3H), 7,09 (d, 1H), 5,25 (m, 1H), 4,69 (d, 2H), 4,03 (d, 1H), 3,83 (d, 1H), 2,95 (m, 2H), 2,63 (m, 1H), 2,38 (m, 1H), 1,26 (dd, 6H), 1,05 (dd, 6H)

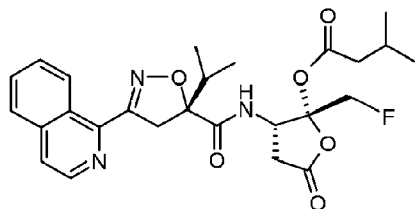
Ejemplo 4: pivalato de (2R,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo



Se disolvió el compuesto de fórmula 2 (0,5 g, 1,2 mmol) en diclorometano (20 ml) y luego se añadieron al mismo cloruro de pivaloilo (0,17 g, 1,4 mmol, 1,1 equiv.) y 4-dimetilaminopiridina (0,29 g, 2,4 mmol, 2,0 equiv.) mientras se mantenía la temperatura de 5 °C o inferior. Se agitó la mezcla de reacción a 25 °C durante aproximadamente 2 horas y se terminó la reacción mediante la adición de disolución de hidrogenocarbonato de sodio acuoso al 10 % (10 ml). Después de añadir agua (10 ml) y agitar, se separó la fase orgánica y se destiló a presión reducida. Se recristalizó la mezcla obtenida en una mezcla 1:5 de acetato de etilo y hexano (EtOAc:hexano=1:5) para obtener 0,1 g (rendimiento: 17 %) del compuesto del título.

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 9,11 (d, 1H), 8,55 (d, 1H), 7,88 (d, 1H), 7,71 (m, 3H), 7,11 (d, 1H), 5,26 (m, 1H), 4,68 (d, 2H), 4,02 (d, 1H), 3,83 (d, 1H), 2,95 (m, 2H), 2,39 (m, 1H), 2,27 (s, 2H), 1,28 (s, 9H), 1,05 (dd, 6H)

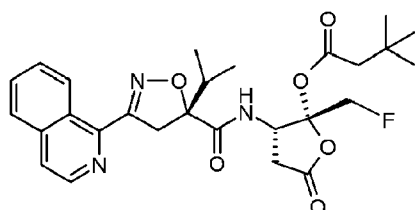
Ejemplo 5: 3-metilbutanoato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo



Se disolvió el compuesto de fórmula 2 (0,5 g, 1,2 mmol) en diclorometano (20 ml) y luego se añadieron al mismo cloruro de isovalerilo (0,17 g, 1,4 mmol, 1,1 equiv.), trietilamina (0,18 g, 1,8 mmol, 1,5 equiv.) y 4-dimetilaminopiridina (0,015 g, 0,12 mmol, 0,1 equiv.) mientras se mantenía la temperatura de 5 °C o inferior. Se agitó la mezcla de reacción a 25 °C durante aproximadamente 2 horas y se terminó la reacción mediante la adición de disolución de hidrogenocarbonato de sodio acuoso al 10 % (10 ml). Después de añadir agua (10 ml) y agitar, se separó la fase orgánica y se destiló a presión reducida. Se recristalizó la mezcla obtenida en una mezcla 1:5 de acetato de etilo y hexano (EtOAc:hexano=1:5) para obtener 0,13 g (rendimiento: 17 %) del compuesto del título.

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 9,11 (d, 1H), 8,52 (d, 1H), 7,86 (d, 1H), 7,71 (m, 3H), 7,11 (d, 1H), 5,23 (m, 1H), 4,71 (d, 2H), 4,04 (d, 1H), 3,83 (d, 1H), 2,95 (m, 2H), 2,35 (m, 1H), 2,28 (d, 2H), 2,15 (m, 1H), 1,05 (dd, 12H)

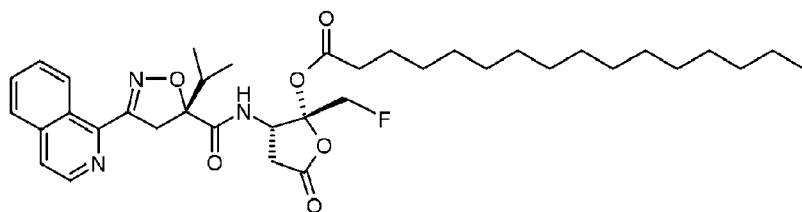
Ejemplo 6: 3,3-dimetilbutanoato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo



Se disolvió el compuesto de fórmula 2 (0,5 g, 1,2 mmol) en diclorometano (20 ml) y luego se añadieron al mismo cloruro de t-butilacetilo (0,19 g, 1,4 mmol, 1,1 equiv.), trietilamina (0,18 g, 1,8 mmol, 1,5 equiv.) y 4-dimetilaminopiridina (0,015 g, 0,12 mmol, 0,1 equiv.) mientras se mantenía la temperatura de 5 °C o inferior. Se agitó la mezcla de reacción a 25 °C durante aproximadamente 2 horas y se terminó la reacción mediante la adición de disolución de hidrogenocarbonato de sodio acuoso al 10 % (10 ml). Después de añadir agua (10 ml) y agitar, se separó la fase orgánica y se destiló a presión reducida. Se recristalizó la mezcla obtenida en una mezcla 1:5 de acetato de etilo y hexano (EtOAc:hexano=1:5) para obtener 0,14 g (rendimiento: 23 %) del compuesto del título.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,12 (d, 1H), 8,55 (d, 1H), 7,88 (d, 1H), 7,71 (m, 3H), 7,13 (d, 1H), 5,23 (m, 1H), 4,71 (d, 2H), 4,04 (d, 1H), 3,83 (d, 1H), 2,95 (m, 2H), 2,35 (m, 1H), 2,27 (s, 2H), 1,05 (dd, 15H)

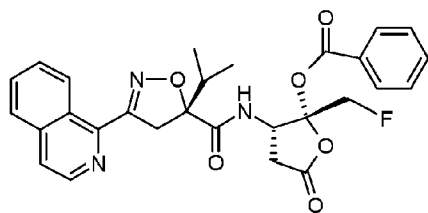
Ejemplo 7: palmitato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo



Se disolvió el compuesto de fórmula 2 (1,0 g, 2,4 mmol) en diclorometano (20 ml) y luego se añadieron al mismo cloruro de palmitoilo (0,73 g, 2,65 mmol, 1,1 equiv.), trietilamina (0,5 ml, 3,61 mmol, 1,5 equiv.) y 4-dimetilaminopiridina (0,03 g, 0,24 mmol, 0,1 equiv.) mientras se mantenía la temperatura de 5 °C o inferior. Se agitó la mezcla de reacción a 25 °C durante aproximadamente 2 horas y se terminó la reacción mediante la adición de disolución de hidrogenocarbonato de sodio acuoso al 10 % (10 ml). Después de añadir agua (10 ml) y agitar, se separó la fase orgánica y se destiló a presión reducida. Se separó en columna la mezcla obtenida mediante el uso de una mezcla 1:2 de acetato de etilo y hexano (EtOAc:hexano=1:2) para obtener 0,11 g (rendimiento: 7 %) del compuesto del título.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,12 (d, 1H), 8,55 (d, 1H), 7,88 (d, 1H), 7,74-7,69 (m, 3H), 7,09 (d, 1H), 5,23 (m, 1H), 4,69 (d, 2H), 4,03 (d, 1H), 3,83 (d, 1H), 2,95 (m, 2H), 2,41 (m, 2H), 2,38 (m, 1H), 1,68 (m, 2H), 1,35-1,24 (m, 24H), 1,05 (dd, 6H), 0,88 (t, 3H)

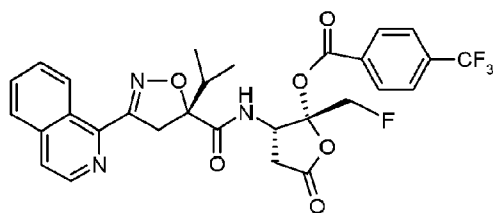
Ejemplo 8: benzoato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo



Se disolvió el compuesto de fórmula 2 (0,5 g, 1,2 mmol) en diclorometano (20 ml) y luego se añadieron al mismo cloruro de benzoilo (0,17 g, 1,4 mmol, 1,1 equiv.), trietilamina (0,18 g, 1,8 mmol, 1,5 equiv.) y 4-dimetilaminopiridina (0,15 g, 1,2 mmol, 1,0 equiv.) mientras se mantenía la temperatura de 5 °C o inferior. Se agitó la mezcla de reacción a 25 °C durante aproximadamente 2 horas y se terminó la reacción mediante la adición de disolución de hidrogenocarbonato de sodio acuoso al 10 % (10 ml). Después de añadir agua (10 ml) y agitar, se separó la fase orgánica y se destiló a presión reducida. Se recristalizó la mezcla obtenida en una mezcla 1:5 de acetato de etilo y hexano (EtOAc:hexano=1:5) para obtener 0,14 g (rendimiento: 22 %) del compuesto del título.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,13 (d, 1H), 8,55 (d, 1H), 8,03 (d, 2H), 7,85 (d, 1H), 7,70 (m, 3H), 7,63 (t, 1H), 7,48 (m, 2H), 7,09 (d, 1H), 5,23 (m, 1H), 4,81 (d, 2H), 4,03 (d, 1H), 3,74 (d, 1H), 3,08 (m, 2H), 2,20 (m, 1H), 0,97 (dd, 6H)

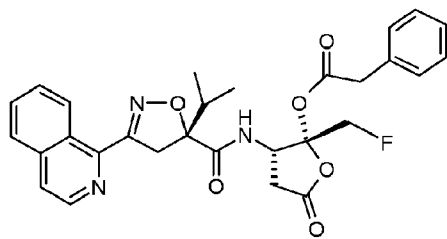
Ejemplo 9: 4-(trifluorometil)benzoato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo



Se disolvió el compuesto de fórmula 2 (0,5 g, 1,2 mmol) en diclorometano (20 ml) y luego se añadieron al mismo cloruro de 4-trifluorometilbenzoilo (0,30 g, 1,4 mmol, 1,1 equiv.) y 4-dimetilaminopiridina (0,29 g, 2,4 mmol, 2,0 equiv.) mientras se mantenía la temperatura de 5 °C o inferior. Se agitó la mezcla de reacción a 25 °C durante aproximadamente 2 horas y se terminó la reacción mediante la adición de disolución de hidrogenocarbonato de sodio acuoso al 10 % (10 ml). Después de añadir agua (10 ml) y agitar, se separó la fase orgánica y se destiló a presión reducida. Se recrystalizó la mezcla obtenida en una mezcla 1:5 de acetato de etilo y hexano (EtOAc:hexano=1:5) para obtener 0,1 g (rendimiento: 13 %) del compuesto del título.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,12 (d, 1H), 8,55 (d, 1H), 8,14 (d, 2H), 7,88 (d, 1H), 7,74 (m, 3H), 7,85 (m, 2H), 7,09 (d, 1H), 5,26 (m, 1H), 4,82 (d, 2H), 4,03 (d, 1H), 3,83 (d, 1H), 3,08 (m, 2H), 2,19 (m, 1H), 0,82 (dd, 6H)

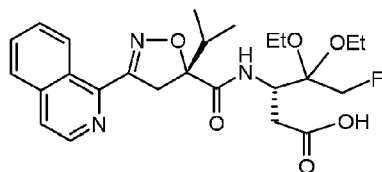
Ejemplo 10: 2-fenilacetato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo



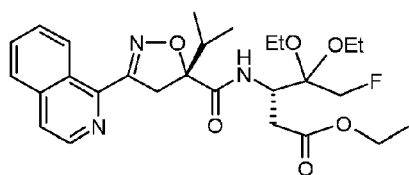
Se disolvió el compuesto de fórmula 2 (0,5 g, 1,2 mmol) en diclorometano (20 ml) y luego se añadieron al mismo cloruro de fenilacetilo (0,22 g, 1,4 mmol, 1,1 equiv.), trietilamina (0,18 g, 1,8 mmol, 1,5 equiv.) y 4-dimetilaminopiridina (0,015 g, 0,12 mmol, 0,1 equiv.) mientras se mantenía la temperatura de 5 °C o inferior. Se agitó la mezcla de reacción a 25 °C durante aproximadamente 2 horas y se terminó la reacción mediante la adición de disolución de hidrogenocarbonato de sodio acuoso al 10 % (10 ml). Después de añadir agua (10 ml) y agitar, se separó la fase orgánica y se destiló a presión reducida. Se recrystalizó la mezcla obtenida en una mezcla 1:5 de acetato de etilo y hexano (EtOAc:hexano=1:5) para obtener 0,3 g (rendimiento: 51 %) del compuesto del título.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,12 (d, 1H), 8,55 (d, 1H), 7,88 (d, 1H), 7,74-7,69 (m, 3H), 7,37 (m, 2H), 7,30 (m, 3H), 7,09 (d, 1H), 5,23 (m, 1H), 4,69 (d, 2H), 4,03 (d, 1H), 3,83 (d, 1H), 3,74 (s, 2H), 2,95 (m, 2H), 2,38 (m, 1H), 1,05 (dd, 6H)

Ejemplo de preparación 1: ácido (S)-4,4-dietoxi-5-fluoro-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)pentanoico



(Etapa A) (S)-5-Fluoro-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-4-oxopentanoato de etilo

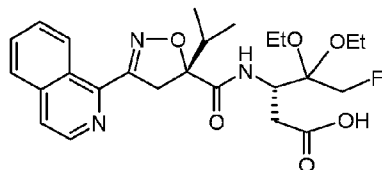


Se hizo reaccionar el compuesto de fórmula 2 (500 mg, 1,2 mmol) con ácido p-tosílico (114 mg, 0,6 mmol),

trietoximetano (20 ml, 120 mmol) y etanol (20 ml) bajo reflujo durante 6 días. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente, se añadió a la misma disolución de cloruro de amonio saturado y se extrajo con acetato de etilo. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio, se concentró y se purificó mediante el uso de MPLC para obtener el compuesto del título (230 mg, 37 %).

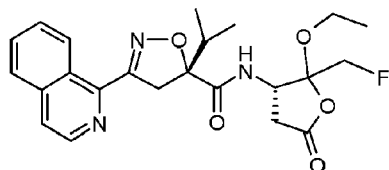
^1H -RMN (CDCl_3) δ 9,15 (d, 1H), 8,54 (d, 1H), 7,84 (d, 1H), 7,75 ~ 7,64 (m, 3H), 4,75 ~ 4,86 (m, 1H), 4,53 (dd, 1H), 4,42 (dd, 1H), 4,02 (d, 1H), 3,97 ~ 3,67 (m, 5H), 3,57 ~ 3,50 (m, 3H), 2,71 (dd, 1H), 2,52 ~ 2,36 (m, 2H), 1,18 ~ 0,97 (m, 15H)

(Etapla B) Ácido (S)-4,4-dietoxi-5-fluoro-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)pentanoico



A (S)-5-fluoro-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-4-oxopentanoato de etilo (230 mg, 0,44 mmol) e hidróxido de litio (31,9 mg, 1,33 mmol), se le añadieron agua (1,12 ml) y tetrahidrofurano (THF, 0,28 ml) y se llevó a cabo la reacción a 40 °C durante 3 horas. Se enfrió el reactante hasta temperatura ambiente, se concentró a presión reducida, se añadió hidróxido de sodio 1 N y se lavó la fase acuosa con tolueno. Luego, se añadió ácido clorhídrico 6 N para ajustar el pH a 3, seguido de extracción usando diclorometano. Se secó la fase orgánica extraída sobre sulfato de sodio y se filtró a presión reducida para obtener el compuesto del título. Se usó el compuesto del título obtenido en la siguiente reacción sin purificación adicional.

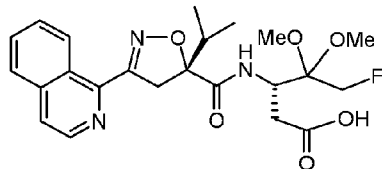
Ejemplo 11: (5R)-N-((3S)-2-etoxi-2-(fluorometil)-5-oxotetrahidrofuran-3-il)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamida



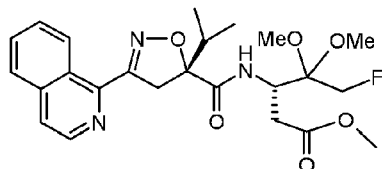
A ácido (S)-4,4-dietoxi-5-fluoro-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)pentanoico (200 mg, 0,38 mmol), se le añadieron ácido trifluoroacético (0,5 ml) y diclorometano (5 ml) a 0 °C y se agitaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de agitar durante 2 horas, se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y se obtuvo el compuesto del título (92 mg, 54 %) a través de MPLC.

^1H -RMN (CDCl_3) δ 9,11 (d, 1H), 8,56 (d, 1H), 7,86 (d, 1H), 7,75 ~ 7,64 (m, 3H), 7,38 (d, 1H), 4,94 (q, 1H), 4,66 (s, 1H), 4,54 (s, 1H), 4,09 (d, 1H), 4,02 (d, 1H), 3,90 ~ 3,67 (m, 3H), 2,92 (dd, 1H), 2,59 (dd, 1H), 2,36 (p, 1H), 1,29 ~ 1,19 (m, 4H), 1,06 (t, 6H)

Ejemplo de preparación 2: ácido (S)-5-fluoro-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-4,4-dimetoxipentanoico

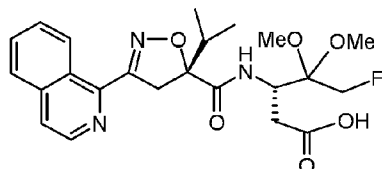


(Etapla A) (S)-5-Fluoro-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-4,4-dimetoxipentanoato de metilo



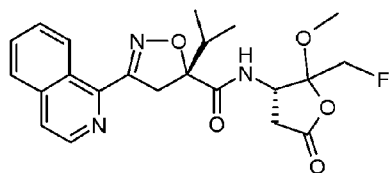
Se hizo reaccionar el compuesto de fórmula 2 (1 g, 2,4 mmol) con ácido p-tosílico (229 mg, 1,2 mmol), trietoximetano (10 ml, 90 mmol) y metanol (20 ml) bajo reflujo durante 4 días. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente, se añadió a la misma disolución de cloruro de amonio saturado y se extrajo con acetato de etilo. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio, se concentró y se purificó mediante el uso de MPLC para obtener el compuesto del título (561 mg, 49 %).

(Etapa B) Ácido (S)-5-fluoro-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-4,4-dimetoxipentanoico



A (S)-5-fluoro-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-4,4-dimetoxipentanoato de metilo (562 mg, 1,18 mmol) e hidróxido de litio (134 mg, 5,59 mmol), se le añadieron agua (3,42 ml) y THF (0,85 ml) y se llevó a cabo la reacción a 40 °C durante 4 horas. Se enfrió el reactante hasta temperatura ambiente, se concentró a presión reducida, se añadió hidróxido de sodio 1 N y se lavó la fase acuosa con tolueno. Luego, se añadió ácido clorhídrico 6 N para ajustar el pH a 3, seguido de extracción usando diclorometano. Se secó la fase orgánica extraída sobre sulfato de sodio y se filtró a presión reducida para obtener el compuesto del título. Se usó el compuesto del título obtenido en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Ejemplo 12: (5R)-N-((3S)-2-(fluorometil)-2-metoxi-5-oxotetrahidrofuran-3-il)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamida



A ácido (S)-5-fluoro-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-4,4-dimetoxipentanoico (441 mg, 0,9 mmol), se le añadieron ácido trifluoroacético (0,5 ml) y diclorometano (5 ml) a 0 °C y se agitaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de agitar durante 2 horas, se concentró la mezcla a presión reducida y se obtuvo el compuesto del título (196 mg, 51 %) a través de MPLC.

¹H-RMN (CDCl₃) δ 9,12 (d, 1H), 8,56 (d, 1H), 7,86 (d, 1H), 7,75 ~ 7,64 (m, 3H), 7,40 (d, 1H), 4,91 (q, 1H), 4,66 (dd, 1H), 4,54 (dd, 1H), 4,08 (d, 1H), 4,80 (d, 1H), 3,35 (s, 3H), 2,90 (dd, 1H), 2,56 (dd, 1H), 2,36 (p, 1H), 1,06 (t, 6H)

Ejemplo experimental 1: prueba de hidrólisis mediante hidrolasa del compuesto profármaco de fórmula 1

Se prepararon diversas carboxilesterasas humanas recombinantes (CE1b, CE1c y CE2) con el fin de confirmar la tendencia de hidrólisis del profármaco por la carboxilesterasa (CE) que es una hidrolasa. La concentración inicial de enzima proporcionada por el fabricante era de 5 mg/ml, que se diluyó 1/50 en tampón fosfato de potasio 100 mM para obtener una disolución de proteína de 100 µg/ml. Para el compuesto del ejemplo 1, que es un compuesto profármaco que va a someterse a prueba, se usó una disolución de reserva de DMSO de 5 mg/ml como disolución de trabajo, que se diluyó 1/100 en acetonitrilo para obtener una disolución con una concentración de 50 µg/ml, y se diluyó nuevamente hasta una concentración de 1/100 en tampón fosfato de potasio 100 mM para obtener una disolución de fármaco con una concentración final de 500 ng/ml. Luego, se mezcló 1:1 cada disolución preparada anteriormente para iniciar la reacción enzimática, y se recogieron 50 µl de cada muestra a los 0 y 10 minutos. Se desproteinizaron las muestras con acetonitrilo que contenía un patrón interno (PI) y se centrifugaron, y se inyectó el sobrenadante en un dispositivo de CL-EM/EM para el análisis. Mediante la corrección del área de pico obtenida del profármaco con el área de pico del PI, se obtuvo la respuesta de pico en el momento de la recogida de cada muestra, y se convirtió la razón residual (% restante) en comparación con el valor inicial. Además, mediante la corrección del área de pico obtenida del compuesto de fórmula 2 con el área de pico del PI, se obtuvo la respuesta de pico en el momento de la recogida de cada muestra, y se confirmó la generación en función del tiempo (figura 1).

Como profármaco de fórmula 1, se realizaron adiciones conocidas del compuesto de ejemplo 1 con isozima CE recombinante humana y se midió la razón residual después de la reacción durante 60 minutos, confirmando que se perdió la mayor parte del profármaco. Tal resultado se analiza como que el compuesto del ejemplo 1 se hidrolizó por una esterasa presente en el sistema de reacción y se convirtió en un compuesto de fórmula 2, que es el fármaco

original. Se halló que la contribución a estos cambios entre cada isozima CE recombinante humana era mayor por CE1b y CE1c que por CE2.

Ejemplo experimental 2: prueba de farmacocinética en ratones

Para las pruebas PK de inyección subcutánea (s.c.) de los compuestos de los ejemplos 1, 4 y 9 como compuesto profármaco de fórmula 1, se prepararon ratones C57BL6 de aproximadamente 7 semanas de edad, y se llevó a cabo una separación en grupos asignando 3 animales por compuesto de administración. Debido a que era un caso de inyección subcutánea, no se realizó ayuno. El día de la administración, se preparó una disolución de fármaco a una concentración de 5 mg/ml mediante el uso de metilcelulosa (MC) al 0,5 % como vehículo y se inyectó por vía subcutánea en una cantidad de 10 ml por kg de peso corporal de cada individuo para preparar una dosis final de 50 mg/kg. A las 1, 2, 4, 6, 8, 24 y 48 horas después de la administración, se extrajo sangre a través de la vena orbital y se agrupó la sangre de cada uno de los tres animales por grupo en un tubo de heparina. Se centrifugó la muestra de sangre obtenida a 15.000 rpm durante 2 minutos para separar el plasma, y se tomaron 50 µl y se almacenaron congelados a -20 °C. El día del análisis, se descongeló la muestra a temperatura ambiente y se llevó a cabo la desproteínización con 200 µl de acetonitrilo, que era un total de 4 veces el volumen almacenado. En este momento, el acetonitrilo contenía un patrón interno y ácido fórmico (FA) al 5 %. Para preparar una curva de calibración, se prepararon disoluciones en acetonitrilo (que incluían PI y FA al 5 %) con concentraciones conocidas de 0,1, 0,5, 5, 50 y 500 ng/ml, respectivamente, y se desproteinizó el suero del blanco con 4 veces el volumen de acetonitrilo tal como antes para preparar una curva de calibración de 0,4 - 2.000 ng/ml final. Después de inyectar 0,5 µl del sobrenadante obtenido después de la desproteínización en el dispositivo de CL-EM/EM, se corrigió el área de pico del compuesto de fórmula 2 con el área de pico de PI para obtener la respuesta de pico en cada punto de recogida de muestra, y se convirtió la concentración a través de una curva de calibración. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos ($C_{\text{máx}}$, $T_{\text{máx}}$, $AUC_{\text{última}}$, $t_{1/2}$, etc.) a través de un método de análisis no compartimental usando WinNonlin 8.1 para el valor de concentración en sangre en función del tiempo para cada grupo de administración. Se compararon las características farmacocinéticas de cada compuesto comparando los cambios de exposición y semivida por el grupo de administración de fármaco.

En el caso de inyección subcutánea de un profármaco del compuesto de fórmula 2, que es el fármaco original, el valor máximo de concentración de fármaco en sangre del compuesto de fórmula 2 disminuyó (figura 2). Las características observadas en el caso de administrar el profármaco son ventajosas en cuanto a la expresión de efectos secundarios provocados por la alta concentración en sangre porque hay una pequeña diferencia en la concentración de fármaco. Además, se espera que tenga ventajas con respecto a la administración directa del fármaco original para mantener la concentración eficaz requerida para la expresión de eficacia y lograr la eficacia deseada.

Los parámetros farmacocinéticos del fármaco original, que es un metabolito medido en el plasma de ratones después de la administración subcutánea de los compuestos de los ejemplos 1, 4 y 9, que son los compuestos profármacos de fórmula 1, se representan en la tabla 1 a continuación.

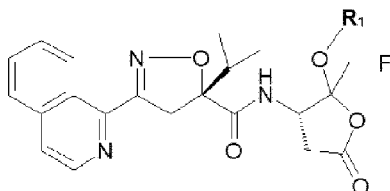
[Tabla 1]

	Fórmula 2	Ejemplo 1	Ejemplo 4	Ejemplo 9
	Media	Media	Media	Media
$C_{\text{máx}}$ (µg/ml)	12,50	3,08	1,70	0,41
$T_{\text{máx}}$ (h)	1	1	1	1
$AUC_{\text{última}}$ (h×µg/ml)	24,02	22,44	7,11	2,72

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la siguiente fórmula 1, o isómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

[Fórmula 1]



en la que

R₁ representa alquilo, cicloalquilo, arilo o -C(O)R₂;

R₂ representa alquilo, cicloalquilo, arilo, arilalquilo o heteroarilo que incluye uno o más heteroátomos seleccionados de N, O y S; y

el alquilo, el cicloalquilo, el arilalquilo y el heteroarilo están opcionalmente sustituidos, y el sustituyente puede ser uno o más seleccionados de grupo alquilo, cicloalquilo, hidroxilo, halo, haloalquilo, acilo, amino, alcoxilo, carboalcoxilo, carboxilo, carboxiamino, ciano, nitro, tiol, ariloxilo, sulfoxilo y guanido.

2. Compuesto, o isómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 1, en el que

R₁ representa alquilo C₁-C₈ o -C(O)R₂; y

R₂ representa alquilo C₁-C₂₀, arilo C₆-C₁₀ o aril C₆-C₁₀-alquilo C₁-C₇.

3. Compuesto, o isómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 1, en el que

R₁ representa alquilo C₁-C₅ o -C(O)R₂;

R₂ representa alquilo C₁-C₁₅, arilo C₆-C₁₀ o aril C₆-C₁₀-alquilo C₁-C₅; y

el sustituyente es alquilo o haloalquilo.

4. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona del siguiente grupo:

acetato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

propionato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

isobutirato de (2R,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

pivalato de (2R,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

3-metilbutanoato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

3,3-dimetilbutanoato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

palmitato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

benzoato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

4-(trifluorometil)benzoato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-

5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

2-fenilacetato de (2S,3S)-2-(fluorometil)-3-((R)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamido)-5-oxotetrahidrofuran-2-ilo;

(5R)-N-((3S)-2-etoxi-2-(fluorometil)-5-oxotetrahidrofuran-3-il)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamida; y

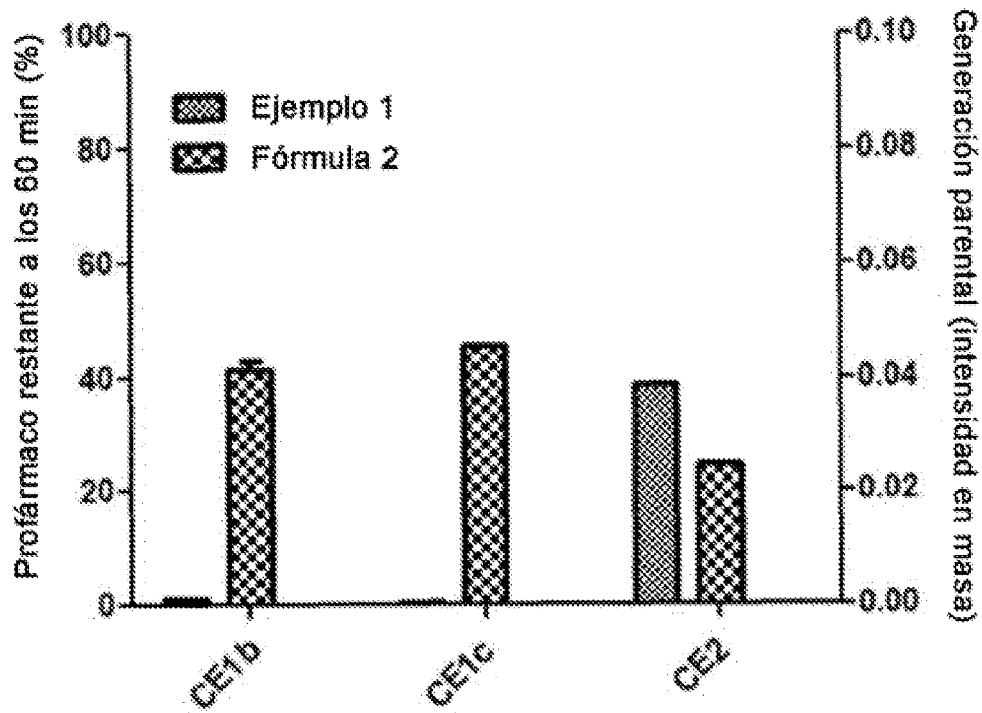
(5R)-N-((3S)-2-(fluorometil)-2-metoxi-5-oxotetrahidrofuran-3-il)-5-isopropil-3-(isoquinolin-1-il)-4,5-dihidroisoxazol-5-carboxamida.

5. Composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de inflamación o apoptosis que comprende el compuesto de fórmula 1, o un isómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, como principio activo, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

6. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, que se formula en forma de dosificación oral, forma de inyección o forma de parche.

7. Composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada de enfermedades asociadas con la apoptosis, enfermedades inflamatorias, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis degenerativa y trastornos óseos destructivos, que comprende el compuesto de fórmula 1, o un isómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, como principio activo, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

