



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 310 143**

⑫ Número de solicitud: 200701717

⑬ Int. Cl.:

C07D 303/48 (2006.01)

C07K 5/06 (2006.01)

A61K 31/336 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

A61P 33/06 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **15.06.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2008**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.12.2008

⑰ Solicitante/s: **Universitat Jaume I**
Avda. de Vicent Sos Baynat, s/n
12006 Castellón de la Plana, Castellón, ES

⑱ Inventor/es:
González Adelantado, Florenci Vicent;
Rodríguez Pastor, Santiago y
Izquierdo Ferrer, Javier

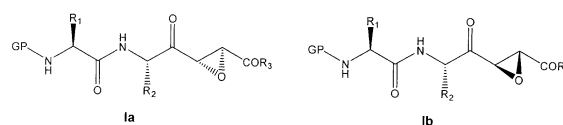
⑲ Agente: **Zea Checa, Bernabé**

⑳ Título: **Inhibidores de cisteína proteasas.**

㉑ Resumen:

Inhibidores de cisteína-proteasas.

Compuestos diastereoisoméricos sustancialmente puros de fórmula Ia, alternativamente Ib, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos o un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, incluyendo hidratos, donde GP es un grupo protector; R₁ es un radical seleccionado del grupo que consiste en fenilmetilo, 4-hidroxi-fenilmetilo, (1H-indol-3-il) metilo y (1H-imidazol-4-il)metilo; R₂ es un radical seleccionado del grupo que consiste en H, CH₃, CH₂SH, CH₂OH, CH₂Ph, CH₂CO₂H, CH₂CONH₂, CH(OH)CH₃, CH(CH₃)CH₂CH₃, CH(CH₃)₂, CH₂CH(CH₃)₂, (CH₂)₂SCH₃, (CH₂)₂CO₂H, (CH₂)CONH₂, (CH₂)₃NHC(NH)NH₂, (CH₂)₄NH₂, imidazol-4-ilmetilo, 4-hidroxi-fenilmetilo, (1H-indol-3-il)metilo, (1H-imidazol-4-il)metilo y (CH₂)_n-Ar; y R₃ es un radical seleccionado del grupo que consiste en O(C₁-C₄)alquilo, O(C₂,C₄) alquenilo, -O(C₂-C₄)alquinilo, -O(C₁-C₄)alquilo-Ar, OAr, -NR^aAr, N(R^a)[(C₁-C₄)alquilo-Ar], y -NR^aOAr y N(R^a)[O(C₁-C₄) alquilo Ar]. Dichos compuestos son inhibidores de las cisteína-proteasas cruzaína, rhodesaína y falcipaína, y por tanto, útiles en el tratamiento y/o prevención de patologías tales como la enfermedad de Chagas, la tripanosomiasis africana o la malaria.



ES 2 310 143 A1

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de cisteína-proteasas.

- 5 La presente invención se refiere a nuevos inhibidores de cisteína-proteasas, así como intermedios y procedimientos útiles para su preparación, y a composiciones farmacéuticas que los contienen.

Estado de la técnica anterior

- 10 La tripanosomiasis y la malaria son enfermedades parasitarias mayoritarias en países en vías de desarrollo.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad tropical causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* que afecta entre 16 y 18 millones de personas en Latinoamérica donde causa 50.000 muertes por año. Se estima que el 25% de la población de Latinoamérica (90 millones) está en riesgo de contraer la enfermedad (Weekly Epidemiological Record, World Health Organization, 2000, 2:10-12).

20 La tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño afecta a alrededor de medio millón de personas del África subsahariana, se calcula que 66 millones de personas en 36 países están en riesgo de contraerla. La variante oriental de la enfermedad está causada por el protozoo *Trypanosoma brucei rhodesiense* y la occidental por *Trypanosoma brucei gambiense*, el agente transmisor es en ambos casos la mosca tse-tse, muy extendida por todo África.

25 Por otra parte, la malaria está causada por protozoos del género *Plasmodium*, principalmente *Plasmodium falciparum* y se transmite a las personas a través del mosquito anopheles. La malaria afecta a casi el 40% de la población mundial donde más de tres mil millones están en riesgo, se da en unos cien países de áreas tropicales muy deprimidas de África, Asia y Latinoamérica. Más del 90% de los casos y el 80% de las muertes se dan en el África tropical (World Malaria Report 2005).

30 No existe a día de hoy ninguna vacuna para la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, los fármacos empleados (benznidazole y nifurtimox) sólo sirven en las etapas tempranas, muestran baja eficacia y efectos secundarios indeseados. Por otro lado, el único fármaco disponible para la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño es el melarsoprol que consiste en un compuesto de arsénico tóxico que se suministra con su antídoto y que expone a un 10% de riesgo de encefalopatía arsénica, por ello unos mil pacientes mueren cada año a causa de la toxicidad del fármaco. Recientemente, se ha desarrollado la eflornithina para el tratamiento de la enfermedad que, a pesar de que ha

35 mostrado ser efectiva y ser bien tolerada, presenta muchas desventajas.

Finalmente, aunque existen algunos fármacos para prevenir la enfermedad de la malaria como la cloroquina y la mefloquina, éstos muestran efectos secundarios y no existe ninguno que garantice la protección total.

40 La enfermedad de Chagas, la tripanosomiasis africana y la malaria tienen un ciclo infeccioso parecido en el que un agente transmisor (insecto) transmite el agente patógeno al hombre. Todos los agentes patógenos de estas enfermedades poseen una actividad enzimática esencial común para su ciclo de vida, la actividad cisteína-proteasa: cruzaína en *Trypanosoma cruzi*, rhodesaína en *T. Brucei* y falcipaína en *Plasmodium falciparum* (Caffrey, C.R. et al, *Mol. Biochem. Parasitol.* 2001, vol. 1, pp. 61-73).

45 Una línea de investigación reciente dirigida a la búsqueda de fármacos para estas enfermedades se basa en la inhibición de las cisteína-proteasas mencionadas, de manera que la síntesis de inhibidores de estas enzimas podría dar lugar a nuevos fármacos con los cuales combatir las enfermedades, especialmente como alternativa a la terapia tradicional en organismos resistentes (McKerrow, J.H. et al, *Bioorg. Med. Chem.* 1999, vol. 7, pp. 639-644).

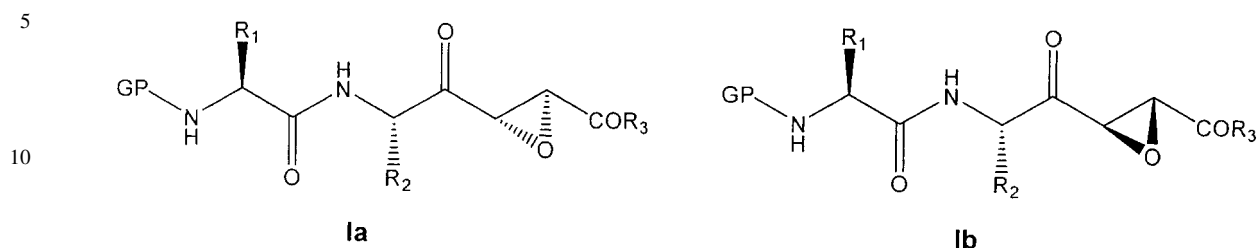
50 En este sentido, se han desarrollado varios inhibidores irreversibles de cisteína-proteasas basados en péptidos, como por ejemplo halometil cetonas, diazometanos, derivados de epoxisuccinilo, y derivados de sulfonas vinílicas (Otto, H. et al, *Chem. Rev.* 1997, vol. 97, pp.133-171). Una desventaja de las clorometil cetonas es su elevada reactividad (reaccionan con serina-proteasas y otras moléculas que contienen grupos SH) y consecuente falta de selectividad de modo que resultan tóxicas *in vivo*. Para incrementar la selectividad y reducir la reactividad de estos compuestos, se han desarrollado otras moléculas menos reactivas, como por ejemplo las monofluoro metil cetonas (Rasnack, D., *Anal. Biochem.* 1985, vol. 149, pp. 461-465) y epoxiderivados (Roush, W.R. et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, pp. 2809-2812). Sin embargo, estos compuestos no son efectivos *in vivo* debido a su baja biodisponibilidad.

60 Así, a pesar de los esfuerzos invertidos en investigación en el pasado, el tratamiento de estas enfermedades parasitarias está lejos de ser satisfactorio. Por tanto, el desarrollo de nuevos compuestos para el tratamiento de estas enfermedades es todavía de gran interés.

Explicación de la invención

65 Los inventores han encontrado nuevos compuestos inhibidores de las cisteína-proteasas cruzaína, rhodesaína y falcipaína; que son además selectivos frente a la cathepsina B humana.

Así, un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto diastereoisomérico sustancialmente puro de fórmula Ia, alternativamente Ib, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos o un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, incluyendo hidratos,



donde GP es un grupo protector;

R_1 es un radical seleccionado del grupo que consiste en fenilmetilo, 4-hidroxifenilmetilo, (1*H*-indol-3-il)metilo y (1*H*-imidazol-4-il)metilo;

R_2 es un radical seleccionado del grupo que consiste en -H, -CH₃, -CH₂SH, -CH₂OH, -CH₂Ph, -CH₂CO₂H, -CH₂CONH₂, -CH(OH)CH₃, -CH(CH₃)CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH(CH₃)₂, -(CH₂)₂SCH₃, -(CH₂)₂CO₂H, -(CH₂)CONH₂, -(CH₂)₃NHC(NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, imidazol-4-ilmetilo, 4-hidroxifenilmetilo, (1*H*-indol-3-il)metilo, (1*H*-imidazol-4-il)metilo y -(CH₂)_n-Ar; y

R_3 es un radical seleccionado del grupo que consiste en -O(C₁-C₄)alquilo, -O(C₂-C₄)alqueno, -O(C₂-C₄)alquino, -O(C₁-C₄)alquilo-Ar, -OAr, -NR^aAr, -N(R^a)[(C₁-C₄)alquilo-Ar], -NR^aOAr y -N(R^a)[O(C₁-C₄)alquilo-Ar];

donde n representa un valor seleccionado entre 2 y 3;

Ar es un radical de carbono o nitrógeno de un anillo conocido carbocíclico aromático monocíclico de 5 a 6 miembros o bicíclico de 8 a 10 miembros, que contiene opcionalmente de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, S y O, y que puede estar opcionalmente sustituido por uno o más radicales seleccionados independientemente del grupo que consiste en -OH, -CHO, -SH, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -(C₁-C₄)alquilo opcionalmente sustituido por uno o más radicales seleccionados independientemente del grupo que consiste en -F, -Cl, -Br y -OH; -O(C₁-C₄)alquilo opcionalmente sustituido por uno o más radicales seleccionados independientemente del grupo que consiste en -F, -Cl, -Br y -OH; -CO(C₁-C₄)alquilo, -OCO(C₁-C₄)alquilo, -S(C₁-C₄)alquilo, -SO(C₁-C₄)alquilo, -SO₂(C₁-C₄)alquilo, -SO₂O(C₁-C₄)alquilo, -OSO₂(C₁-C₄)alquilo, -NR^aR^b, -CONR^aR^b; y

R^a y R^b representan independientemente un radical -H o -(C₁-C₄)alquilo.

Algunos compuestos de la invención de fórmula Ia, alternativamente Ib, además de los centros quirales indicados, pueden poseer otros centros quirales que pueden dar lugar a diversos estereoisómeros. Son objeto de la presente invención cada uno de los estereoisómeros individuales así como sus mezclas.

Asimismo, algunos de los compuestos de la presente invención pueden presentar isomería cis/trans. Son objeto de la presente invención cada uno de los isómeros geométricos así como sus mezclas.

Los compuestos de la invención de fórmula Ia, alternativamente Ib, son inhibidores de una cisteína-proteasa seleccionada del grupo que consiste en cruzafina, rhodesafina y falcipafina.

Por ello, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto diastereoisomérico sustancialmente puro de fórmula Ia, alternativamente Ib, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos o un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, incluyendo un hidrato, junto con cantidades apropiadas de excipientes farmacéuticamente aceptables.

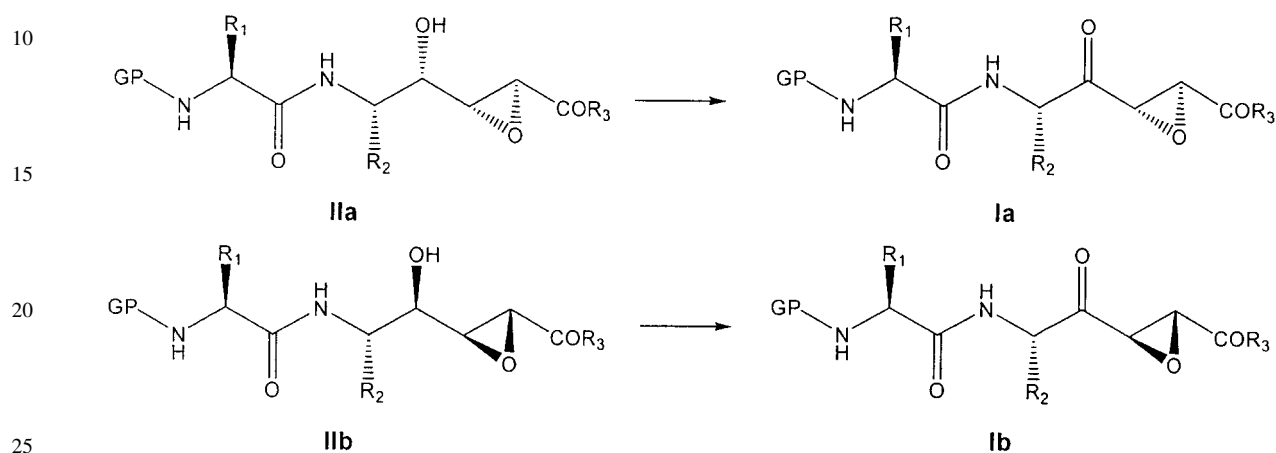
Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de la invención de fórmula Ia, alternativamente Ib, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades mediadas por la inhibición de una cisteína-proteasa seleccionada del grupo que consiste en cruzafina, rhodesafina y falcipafina.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de la invención de fórmula Ia, alternativamente Ib, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Chagas o la tripanosomiasis africana. Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de la invención de fórmula Ia, alternativamente Ib, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la malaria.

La invención también está relacionada con un método para el tratamiento y/o prevención de un mamífero, incluyendo un humano, que padece o es susceptible de padecer una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en la

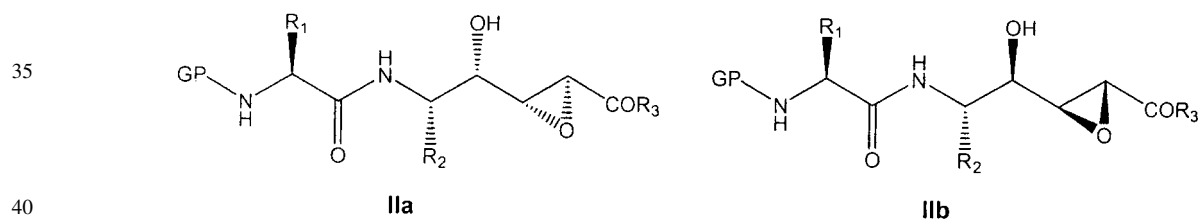
enfermedad de Chagas, la tripanosomiasis africana y la malaria. Dicho método comprende la administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención de fórmula Ia, alternativamente Ib, junto con excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de preparación de los compuestos de la invención de fórmula Ia, alternativamente Ib, que comprende la oxidación de un compuesto de fórmula IIa, alternativamente IIb, con un agente oxidante adecuado:



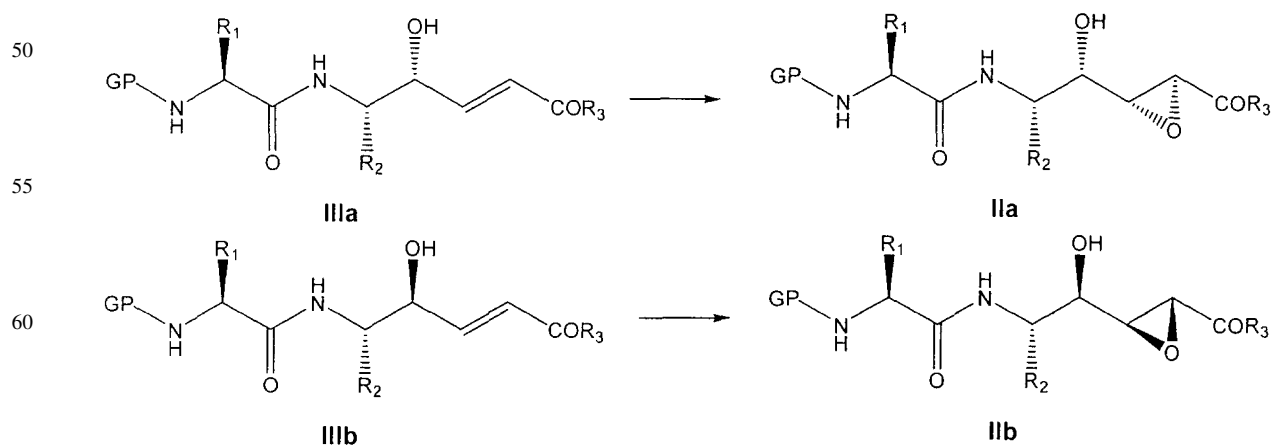
donde GP, R₁, R₂ y R₃ tienen el significado indicado anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto diastereoisomérico intermedio de fórmula IIa, alternativamente IIb, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, incluyendo hidratos,



donde GP, R₁, R₂ y R₃ tienen el significado indicado anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un compuesto de la invención de fórmula IIa, alternativamente IIb, que comprende la epoxidación de un compuesto de fórmula IIIa, alternativamente IIIb, con un agente epoxidante adecuado:



donde GP, R₁, R₂ y R₃ tienen el significado indicado anteriormente.

ES 2 310 143 A1

En las definiciones anteriores, el término (C₁-C₄)alquilo significa un radical de una cadena hidrocarbonada saturada lineal o ramificada que contiene de 1 a 4 átomos de carbono. Ejemplos incluyen entre otros los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *sec*-butilo y *terc*-butilo.

5 El término (C₂-C₄)alqueno significa un radical de una cadena hidrocarbonada insaturada lineal o ramificada que contiene de 1 a 4 átomos de carbono y al menos un doble enlace. Ejemplos incluyen entre otros los grupos etenilo, propenilo, isopropenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo y 1,3-butadienilo.

10 El término (C₂-C₄)alquino significa un radical de una cadena hidrocarbonada insaturada lineal o ramificada que contiene de 1 a 4 átomos de carbono y al menos un triple enlace. Ejemplos incluyen entre otros los grupos etinilo, propinilo, isopropinilo, 1-butinilo, 2-butinilo y 3-butinilo.

15 La expresión “opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes” significa la posibilidad de un grupo de estar sustituido por uno o más, preferiblemente por 1, 2, 3 ó 4 sustituyentes, siempre que dicho grupo disponga de 1, 2, 3 ó 4 posiciones susceptibles de ser sustituidas.

20 Ar es un radical de carbono o nitrógeno de un anillo conocido carbocíclico aromático monocíclico de 5 a 6 miembros o bicíclico de 8 a 10 miembros, que contiene opcionalmente de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, S y O, y que puede estar opcionalmente sustituido según se ha indicado anteriormente. Ejemplos de radicales Ar incluyen, sin limitación, tiofenilo, furanilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, isoxazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, fenilo, piridinilo, pirazinilo, piridazinilo, pirimidinilo, triazinilo, tienofuranilo, tienopirrolilo, pirrolopirazolilo, benzotiofenilo, benzofuranilo, indolilo, isoindolilo, benzimidazolilo, benzotiazolilo, imidazopiridinilo, pirazolopiridinilo, isoquinolinilo, quinolinilo, quinolizinilo, naftiridinilo, quinazolinilo, quinoxalilo y naftilo.

25 En el contexto de esta invención, el término “compuesto diastereoisomérico sustancialmente puro” significa un compuesto con suficiente exceso diastereoisomérico para su preparación a escala industrial, lo cual depende de cada caso concreto como decidirá el experto en la materia. En la mayoría de los casos, un exceso diastereoisomérico superior al 95% es suficiente.

30 Aunque la presente invención incluye todos los compuestos arriba mencionados, una realización particular de la invención se refiere a un compuesto diastereoisomérico sustancialmente puro de fórmula Ia, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo un hidrato.

35 En otra realización particular, en un compuesto diastereoisomérico sustancialmente puro de fórmula Ia, alternativamente Ib, R₁ representa fenilmetilo; R₂ es un radical -(CH₂)_n-Ar; R₃ es un radical seleccionado del grupo que consiste en -(C₁-C₄)alquilo, -(C₁-C₄)alquilo-Ar, -OAr, n representa 2; y Ar es un radical de carbono de un anillo conocido carbocíclico aromático monocíclico de 5 a 6 miembros, que contiene opcionalmente de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, S y O.

40 En otra realización particular, en un compuesto de la invención de fórmula Ia, alternativamente Ib, GP es un radical seleccionado del grupo que consiste en benciloxicarbonilo, morfolinocarbonilo y *N*-metilcarbonilo; R₁ es un radical fenilmetilo, R₂ es un radical 2-feniletilo y R₃ es un radical -(C₁-C₄)alquilo.

45 En otra realización particular, en un compuesto de la invención de fórmula Ia, alternativamente Ib, GP es un radical benciloxicarbonilo; R₁ es un radical fenilmetilo, R₂ es un radical 2-feniletilo y R₃ es un radical etoxilo.

50 Como se ha mencionado anteriormente, la invención también se refiere a los intermedios de fórmula IIa, alternativamente IIb, a sus sales farmacéuticamente aceptables y a sus solvatos farmacéuticamente aceptables, incluyendo hidratos.

55 Así, otra realización particular se refiere a un intermedio diastereoisomérico sustancialmente puro de fórmula IIa, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo un hidrato.

60 En otra realización particular, en un en un compuesto de la invención de fórmula IIa, alternativamente IIb, R₁ representa fenilmetilo; R₂ es un radical -(CH₂)_n-Ar; R₃ es un radical seleccionado del grupo que consiste en -(C₁-C₄)alquilo, -(C₁-C₄)alquilo-Ar, -OAr, n representa 2; y Ar es un radical de carbono de un anillo conocido carbocíclico aromático monocíclico de 5 a 6 miembros, que contiene opcionalmente de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, S y O.

65 En otra realización particular, en un compuesto de la invención de fórmula IIa, alternativamente IIb, GP es un radical seleccionado del grupo que consiste en benciloxicarbonilo, morfolinocarbonilo y *N*-metilcarbonilo; R₁ es un radical fenilmetilo, R₂ es un radical 2-feniletilo y R₃ es un radical -(C₁-C₄)alquilo.

En otra realización particular, en un compuesto de la invención de fórmula IIa, alternativamente IIb, GP es un radical benciloxicarbonilo; R₁ es un radical fenilmetilo, R₂ es un radical 2-feniletilo y R₃ es un radical etoxilo.

Además, todas las posibles combinaciones de las realizaciones mencionadas arriba forman también parte de la invención.

Los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más nitrógenos básicos y por tanto pueden formar sales con ácidos, tanto orgánicos como inorgánicos, que forman también parte de la presente invención. Ejemplos de dichas sales incluyen: sales con ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido iodhídrico, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico; y sales con ácidos orgánicos, como ácido metanosulfónico, ácido trifluorometanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido acético o ácido maleico, entre otros. Los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más protones ácidos y por tanto podrían formar sales con bases, que forman también parte de la presente invención. Ejemplos de dichas sales incluyen: sales con cationes inorgánicas como sodio, potasio, calcio, magnesio, litio, aluminio, zinc, etc.; sales formadas con aminas farmacéuticamente aceptables como amoníaco, alquilaminas, hidroxialquilaminas, lisina, arginina, *N*-metilglucamina, procaina y similares. No hay limitación en la naturaleza de dichas sales, en el supuesto de que cuando se usen con fines terapéuticos sean farmacéuticamente aceptables. Las sales se pueden preparar por tratamiento del compuesto de fórmula Ia, Ib, Ila o I Ib con una cantidad suficiente del ácido o la base deseados para dar la sal de una forma convencional. Las sales de los compuestos de fórmula Ia, Ib, Ila o I Ib se pueden transformar a su vez en otras sales de compuestos de fórmula Ia, Ib, Ila o I Ib respectivamente, por intercambio de iones mediante una resina de intercambio iónico.

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas. La formulación escogida depende de la naturaleza del compuesto administrado y de la vía de administración. Se pueden utilizar distintas vías de administración, por ejemplo administración oral o tópica.

Las composiciones sólidas para la administración oral incluyen comprimidos, granulados y cápsulas. El método de preparación puede basarse en mezcla simple, granulación seca o granulación húmeda del principio activo con excipientes. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes, agentes aglutinantes, disgregantes, y agentes lubricantes. Los comprimidos pueden estar recubiertos con excipientes adecuados para retrasar su disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal o para mejorar sus propiedades organolépticas o su estabilidad. El principio activo puede también ser incorporado por recubrimiento sobre pellets inertes mediante el uso de polímeros filmógenos naturales o sintéticos.

En el caso de utilizar cápsulas de gelatina blanda, el principio activo se mezcla con agua o con medio oleoso. Las suspensiones orales de polvos y granulados se pueden preparar mediante la adición de agua, mezclando el principio activo con agentes dispersantes o humectantes; suspensantes y conservantes. También pueden añadirse otros excipientes, por ejemplo edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

Como formas líquidas para la administración oral se pueden incluir emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires que contienen diluyentes inertes comúnmente utilizados. Dichas composiciones pueden también contener coadyuvantes como agentes humectantes, suspensantes, edulcorantes, aromatizantes, conservantes y reguladores de pH.

El compuesto puede también ser formulado para su aplicación tópica. Formulaciones tópicas incluyen cremas, lociones, geles, ungüentos, polvos, soluciones y parches en las que el compuesto se encuentra dispersado o disuelto en excipientes adecuados.

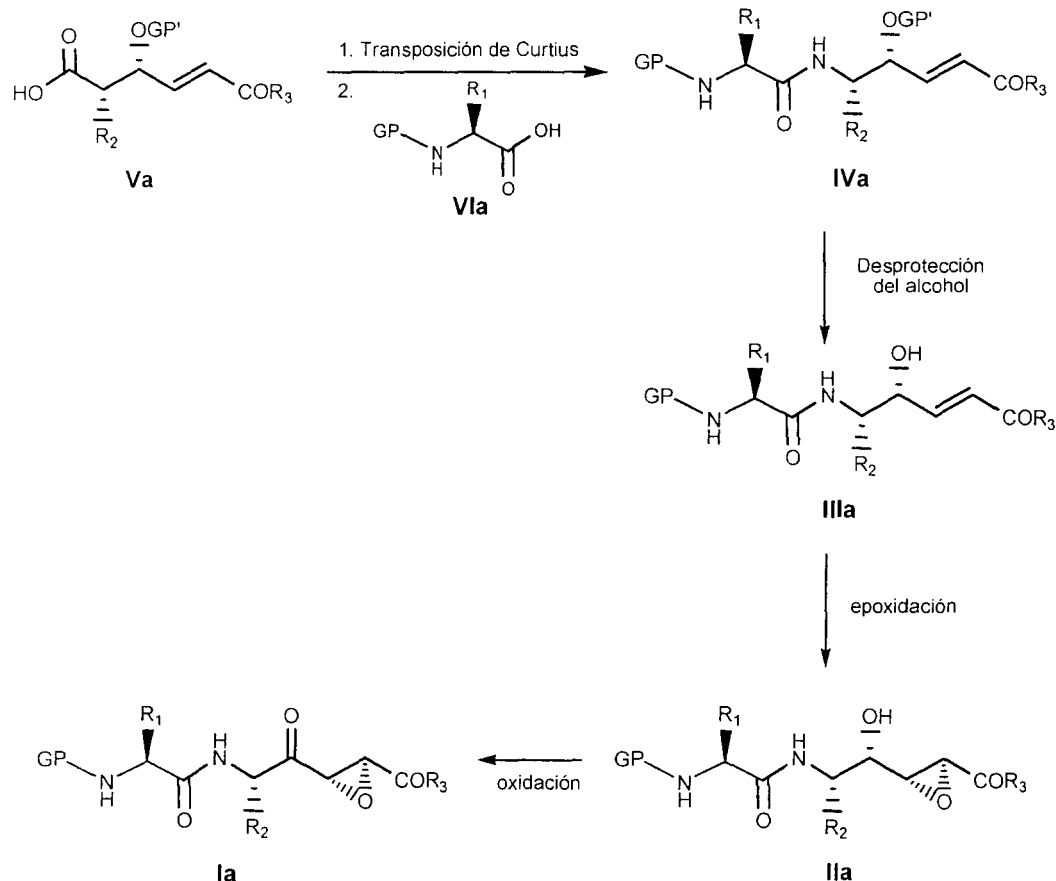
Los compuestos diastereoisoméricos sustancialmente puros de fórmula Ia, alternativamente Ib, se pueden preparar mediante los procedimientos descritos a continuación. Como será evidente para un experto en la materia, el método preciso utilizado para la preparación de un compuesto dado puede variar en función de su estructura química.

Si no se especifica lo contrario, los significados de las variables GP, R₁, R₂ y R₃ son los indicados anteriormente.

Asimismo, en alguno de los procedimientos indicados puede ser necesario o conveniente proteger los grupos reactivos o lábiles mediante grupos protectores convencionales. Tanto la naturaleza de dichos grupos protectores como los procedimientos para su introducción y eliminación son bien conocidos y forman parte del estado de la técnica (Greene T.W. y Wuts P.G.M., "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 3rd edition, 1999). Algunos ejemplos de grupos protectores de una función amino que pueden emplearse son los grupos 9-fluorenilmetoxi-carbonilo (Fmoc), *tert*-butoxicarbonilo (Boc), bencilo (Bn), benciloxicarbonilo (Cbz), trifluoroacetilo (TFA), morfolinocarbonilo y *N*-metilcarbonilo. Los grupos hidroxilo pueden protegerse por ejemplo con grupos trimetilsililo (TMS), *tert*-butildimetilsililo (TBS) o tetrahidropiranilo (THP). La reacción de desprotección de los grupos anteriores se realiza en condiciones habituales en síntesis orgánica, como las descritas en la referencia arriba mencionada.

Un compuesto diastereoisomérico sustancialmente puro de fórmula Ia puede obtenerse por oxidación de un compuesto de fórmula Ila. Esta reacción se lleva a cabo en presencia de un agente oxidante, como por ejemplo el peryo-

dinano de Dess-Martin, en un disolvente adecuado, como por ejemplo diclorometano, a una temperatura adecuada, preferiblemente temperatura ambiente.

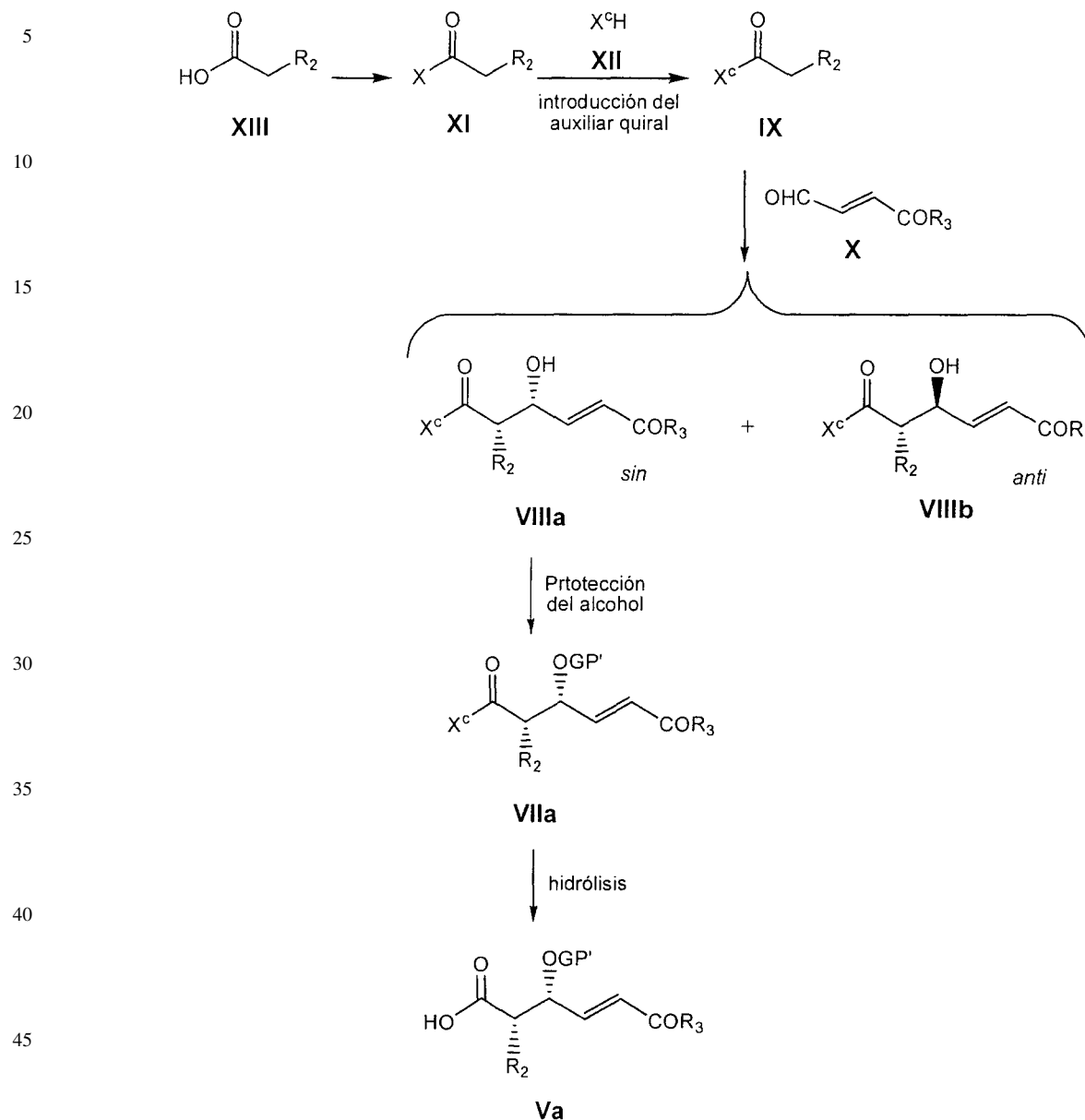


Un compuesto de fórmula IIa puede obtenerse mediante una reacción de epoxidación de un alcohol alílico de fórmula IIIa. Esta reacción se lleva a cabo en presencia de un agente epoxidante, como *tert*-butilhidroperóxido de litio, en un disolvente adecuado, como por ejemplo tetrahidrofurano, a una temperatura adecuada, preferiblemente temperatura ambiente. En estas condiciones se obtiene mayoritariamente el epoxialcohol sin con respecto el grupo hidroxilo (Rodríguez, S. *et al*, *Tetrahedron* 2006, pp.11112-11123).

Un compuesto de fórmula IIIa puede prepararse a partir de un ácido carboxílico de fórmula Va, donde GP' es un grupo protector de hidroxilo, por ejemplo *tert*-butilidimetilsililo, mediante una secuencia de varias etapas. En una primera etapa, el grupo ácido carboxílico del compuesto de fórmula Va se transforma en un grupo amino mediante una transposición de Curtius. Esta reacción puede llevarse a cabo con difenilfosforilazida, en presencia de una base, como por ejemplo trietilamina, en un disolvente adecuado, como por ejemplo *N,N*-dimetilformamida, a una temperatura adecuada, preferiblemente temperatura ambiente, formándose un isocianato intermedio. Alternativamente, el isocianato intermedio puede formarse haciendo reaccionar el ácido carboxílico de fórmula Va con cloroformiato de metilo y posteriormente azida sódica. El tratamiento acuoso del isocianato obtenido intermedio a temperatura adecuada, preferiblemente a 100°C, da lugar a una amina primaria.

En una segunda etapa, se convierte la amina obtenida en la primera etapa en una amida de fórmula IVa por reacción con un aminoácido de fórmula VIa con el grupo amino convenientemente protegido en caso necesario, por ejemplo protegido con el grupo benciloxycarbonilo. Esta reacción puede llevarse a cabo en presencia de un agente condensante adecuado como por ejemplo *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida o dicitohexilcarbodiimida opcionalmente en presencia de 1-hidroxibenzotriazol, o bien en presencia de una base adecuada, tal como 4-dimetilaminopiridina o piridina, en el seno de un disolvente adecuado, tal como diclorometano o dimetilformamida.

Un compuesto de fórmula Va puede obtenerse a partir de un compuesto de fórmula XIII siguiendo la ruta sintética que se indica en el siguiente esquema:



50 El ácido carboxílico de fórmula XIII se convierte en un derivado acilado de fórmula XI donde X representa halógeno, preferiblemente cloro, mediante reacción con un agente halogenante, por ejemplo cloruro de tionilo, en un disolvente adecuado, como por ejemplo benceno, a una temperatura adecuada, preferiblemente calentando.

55 Posteriormente, el compuesto de fórmula XI se convierte en un compuesto de fórmula IX por reacción con un compuesto de fórmula XII, donde X^c representa un auxiliar quiral, como por ejemplo (S)-4-bencil-2-tioxotiazolidin-3-ilo. Esta reacción se lleva a cabo en presencia de una base, como por ejemplo trietilamina o 2,6-lutidina y opcionalmente en presencia de triflato de *tert*-butildimetilsililo (TBSOTf), en un disolvente adecuado, como por ejemplo diclorometano o sin disolvente y a una temperatura adecuada, por ejemplo temperatura ambiente.

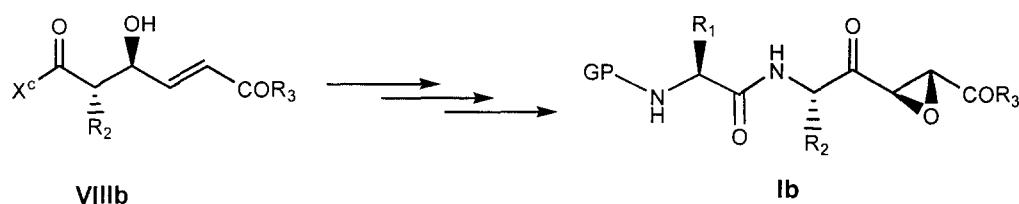
60 La reacción aldólica asimétrica entre la cetona de fórmula IX y un aldehído de fórmula X da lugar a los aldoles *sin* y *anti* de fórmulas VIIa y VIIb respectivamente, de estereoquímica absoluta definida y separables mediante cromatografía. Esta reacción se puede llevar a cabo, por ejemplo, según se indica en Evans, D.A. *et al*, Org. Lett. 2002, vol. 4, pp. 1127-1130; Evans, D.A. *et al*, J. Am. Chem. Soc. 2002, vol. 124, pp. 392-393 y Evans, D.A. *et al*, J. Am. Chem. Soc. 1981, vol. 103, pp. 2127-2129. Cuando X^c es un radical (S)-4-bencil-2-tioxotiazolidin-3-ilo y la reacción se lleva a cabo según se describe en Evans, D.A. *et al*, Org. Lett. 2002, 4, 1127, se obtiene mayoritariamente el compuesto de fórmula VIIb.

Tras separar los compuestos de fórmula VIIIa y VIIIb, el grupo hidroxilo del compuesto de fórmula VIIIa se puede proteger para dar un compuesto de fórmula VIIa, donde GP' representa un grupo protector, por ejemplo *tert*-butilidimetilsililo. Esta reacción se lleva a cabo en condiciones bien conocidas para el experto, como por ejemplo las descritas en Greene T.W. y Wuts P.G.M, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 3rd edition, 1999.

La hidrólisis de un compuesto de fórmula VIIa da lugar a un compuesto de fórmula Va. Esta reacción se puede llevar a cabo en presencia de peróxido de hidrógeno y de una base, como por ejemplo hidróxido de litio, en un disolvente adecuado, como por ejemplo una mezcla de tetrahidrofurano-agua y a una temperatura adecuada, preferiblemente temperatura ambiente.

Los compuestos XIII, XII, X y VIa son comerciales o pueden obtenerse fácilmente mediante métodos convencionales.

Un compuesto diastereoisomérico sustancialmente puro de fórmula Ib puede obtenerse de manera análoga a la obtención de un compuesto de fórmula Ia a partir del correspondiente aldol de fórmula VIIIb:



Además, un compuesto de fórmula Ia, alternativamente Ib, puede transformarse en otro compuesto de fórmula Ia, alternativamente Ib. Por ejemplo, un compuesto de fórmula Ia, alternativamente Ib, donde R₃ representa -O(C₁-C₄) alquilo, -O(C₁-C₄)alquilo-Ar o -OAr puede transformarse en un compuesto de fórmula Ia, alternativamente Ib, donde R₃ representa -NHAr o -NH-OAr, mediante reacciones bien conocidas por el experto en la materia. Asimismo las reacciones de interconversión de un radical R₃ en otro radical R₃ pueden también llevarse a cabo sobre cualquiera de los intermedios de los compuestos de la invención de fórmula Ia, alternativamente Ib.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos.

Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Ejemplos

Todos los disolventes usados en las reacciones se destilaron en el momento de ser utilizados mediante agentes desecantes adecuados. Los espectros de ¹H-RMN y de ¹³C-RMN se registraron en disolución de CDCl₃ (¹H, 7.24 ppm; ¹³C 77.0 ppm) a 30°C en un espectrómetro de 300 MHz Mercury Varian o un 500 MHz Innova Varian RMN en los Serveis Centrals d'Instrumentació Científica de la Universitat Jaume I. Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas QTOF I (quadrupole-hexapole-TOF) con interface ortogonal Z-spray-electrospray (Micromass, Manchester, UK). Los espectros de IR se registraron en películas aceitosas sobre pastillas de NaCl en un espectrómetro Perkin-Elmer 2000 FT-IR. Para las cromatografías de columna se empleó EM Science Silica Gel 60 mientras que las TLC se realizaron con folios de aluminio cargados con silica E. Merck (Kieselgel 60, F₂₅₄, 0.25 mm). Excepto en los casos indicados, todas las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera de nitrógeno con agitación magnética.

En los ejemplos descritos a continuación se han utilizado las siguientes abreviaciones:

AcOEt: acetato de etilo

AMC: 7-Amino-4-metil coumarina

Arg: L-Arginina

4-DMAP: 4-*N,N*-dimetilaminopiridina

DMSO: dimetilsulfóxido

DTT: ditiotreititol

ES 2 310 143 A1

Et₃N: trietilamina

Et₂O: dietil éter

5 Hex: hexano

HPhe: L-Homofenilalanina

Phe: L-Fenilalanina

10

TBHP: *tert*-butilhidroperóxido

TBSOTf: triflato de *tert*-butildimetilsililo

15

THF: tetrahidrofurano

TMSCI: cloruro de trimetilsililo

TX-100: tritón-X (hidróxido de trimetilbencilamonio)

20

Z: benciloxicarbonil

Intermedio XI.1 (R₂ = 2-feniletilo; X = Cl): *Cloruro de 4-fenilbutanoilo*

25

Una disolución de ácido 4-fenilbutírico (18.76 g, 114.23 mmol) en benceno (147 mL) se trató con cloruro de tionilo (25.27 mL, 348 mmol) y la mezcla resultante se reflujo durante 2 h, entonces el solvente se eliminó bajo vacío y el aceite marrón resultante se sometió al siguiente paso sin ninguna purificación.

30

Intermedio IX.1 (R₂ = 2-feniletilo, X^c: (S)-4-bencil-2-tioxotiazolidin-3-ilo): *1-((S)-4-bencil-2-tioxotiazolidin-3-il)-4-fenilbutan-1-ona*

35

Una disolución enfriada en baño de hielo de (S)-4-bencil-2-tioxotiazolidin-3-ona (18.37 g, 87.87 mmol) en CH₂Cl₂ (266 mL) se trató con Et₃N (2 eq) y después con cloruro de 4-fenilbutanoilo (Intermedio XI.1, 114.23 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 12 días y luego se paró con salmuera y se extrajo con CH₂Cl₂, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice usando mezclas Hex:AcOEt de polaridad creciente (95:5, 9:1, 8:2, 7:3 y 6:4) dio lugar a 24 g (70%) de un aceite amarillo.

40

¹³C-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 201.06, 173.73, 141.53, 136.56, 129.44, 128.88, 128.53, 128.36, 127.19, 125.96, 68.53, 37.93, 36.79, 35.11, 31.90, 26.43.

45

Intermedios VIIIA.1 (*sin*) y VIIIB.1 (*anti*) (R₂ = 2-feniletilo, R₃ = etoxilo, X^c: (S)-4-bencil-2-tioxotiazolidin-3-ilo): *(2E,4R,5S)-5-((4S)-4-Benzil-2-tioxotiazolidin-3-carbonil)-7-fenil-4-hidroxihept-2-enoato de etilo* y *(2E,4S,5S)-5-((4S)-4-Benzil-2-tioxotiazolidin-3-carbonil)-7-fenil-4-hidroxihept-2-enoato de etilo*

50

MgBr·EtO₂ (440.47 mg, 1.71 mol) se introdujo en un matraz de dos bocas con un agitador magnético usando la caja seca. Luego se añadieron secuencialmente una disolución de 1-((S)-4-bencil-2-tioxotiazolidin-3-il)-4-fenilbutan-1-ona (Intermedio IX.1, 4.79 g, 13.12 mmol) en AcOEt (33 mL), (E)-3-formilacrilato de etilo (Intermedio X.1 (R₃ = etoxilo), 5.04 g, 39.35 mmol), Et₃N (4.02 mL, 28.86 mmol) y TMSCI (2.83 mL, 22.30 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 12 días. Pasado este tiempo, el crudo se filtró a través de gel de sílice usando Et₂O como eluyente y se concentró bajo vacío. El crudo resultante se disolvió en THF (200 mL) y se trató con 1M HCl acuoso (46 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h, luego se paró con NaHCO₃ sólido, se filtró y se concentró. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice usando mezclas Hex:AcOEt de polaridad creciente (8:2, 1:1, 1:2, 1:4 y 1:7) dio lugar a los dos compuestos deseados en forma de aceites amarillos (peso de los dos compuestos conjuntamente: 3.80 g (60%)).

60

Intermedio VIIIA.1 (*sin*): ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.20-7.35 (m, 10H), 6.94 (1H, dd, J= 15.5 y 3.5 Hz), 6.14 (1H, dd, J= 15.5 y 1.0 Hz), 5.14 (1H, m), 4.73 (1H, m), 4.46 (1H, m), 4.08 (3H, m), 3.31 (1H, dd, J= 12.0 y 7.5 Hz), 3.08 (1H, dd, J= 13.0 y 3.5 Hz), 2.94 (1H, dd, J= 13.5 y 10.5 Hz), 2.80 (1H, m), 2.60 (m, 2H), 2.45 (1H, m), 2.15 (m, 1H), 1.85 (m, 1H), 1.22 (3H, t, J= 7.0 Hz).

65

Intermedio VIIIB.1 (*anti*): ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.10-7.25 (m, 10H), 6.84 (1H, dd, J= 15.5 y 3.5 Hz), 6.03 (1H, dd, J= 15.5 y 1.0 Hz), 5.24 (1H, m), 4.83 (1H, m), 4.55 (1H, m), 4.17 (3H, m), 3.24 (1H, dd, J= 11.0 y 6.5 Hz), 3.03 (1H, dd, J= 13.5 y 4.0 Hz), 2.91 (1H, dd, J= 13.0 y 10.0 Hz), 2.76 (2H, m), 2.57 (m, 1H), 2.12 (m, 1H), 2.03 (m, 1H), 1.19 (3H, t, J= 7.0 Hz).

ES 2 310 143 A1

Intermedios VIIa.1 (*sin*) y VIIb.1 (*anti*) (R_2 = 2-feniletilo, R_3 = etoxilo, X^c : (*S*)-4-bencil-2-tioxotiazolidin-3-ilo, GP' : *terc*-butildimetilsililo): (2*E*,4*R*,5*S*)-5-((4*S*)-4-Benzil-2-tioxotiazolidin-3-carbonil)-4-*terc*-butildimetilsililo-7-fenilhept-2-enoato de etilo y (2*E*,4*S*,5*S*)-5-((4*S*)-4-Benzil-2-tioxotiazolidin-3-carbonil)-4-*terc*-butildimetilsililo-7-fenilhept-2-enoato de etilo

Una disolución del aldol (intermedio VIIIb.1, 3.63 g, 8.05 mmol) enfriada a -70°C en CH₂Cl₂ (80 mL) se trató con 2,6-lutidina (3.75 mL, 32.19) y TBSOTf (5.53 mL, 24.15 mmol). La mezcla resultante se agitó a dicha temperatura durante 5.5 h. Luego se paró con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y se extrajo con CH₂Cl₂, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice usando mezclas Hex:AcOEt de polaridad creciente (7:3 y 1:1) dio lugar a 4.47 g (93%) de un aceite amarillo, correspondiente al intermedio VIIb.1.

Siguiendo un procedimiento análogo al descrito anteriormente pero utilizando como producto de partida el intermedio VIIa.1, se obtuvo el producto VIIa.1.

Intermedio VIIa.1 (*sin*): IR δ 3063, 3027, 2954, 2930, 2857, 1718, 1659, 1604, 1496, 1471, 1455, 1365, 1341, 1262, 1193, 1161, 1135, 1083, 1039, 983, 939, 883, 838, 779, 747, 701, 667 cm⁻¹.

Intermedio VIIb.1 (*anti*): IR δ 3063, 3027, 2930, 2857, 1716, 1659, 1604, 1496, 1455, 1367, 1341, 1159, 1038, 984, 837, 779, 746, 701, 667 cm⁻¹.

Intermedios Va.1 (*sin*) y Vb.1 (*anti*) (R_2 = 2-feniletilo, R_3 = etoxilo, GP' : *terc*-butildimetilsililo): Ácido (*E*,2*S*,3*R*)-5-(etoxicarbonil)-3-*terc*-butildimetilsililo-2-fenilpent-4-enoico y Ácido (*E*,2*S*,3*S*)-5-(etoxicarbonil)-3-*terc*-butildimetilsililo-2-fenilpent-4-enoico

A una disolución del aldol protegido (intermedio VIIb.1, 2.02 g, 4.98 mmol) en THF-H₂O (3:1) (50 mL) enfriada en baño de hielo se le añadió gota a gota H₂O₂ (30%) (3.08 mL, 29.90 mmol) y luego una disolución de LiOH (238 mg, 9.96 mmol) en agua (2 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Pasado este tiempo la reacción se paró con Na₂SO₃ (1.6M solución acuosa) (8 mL) y se agitó durante 20 min, luego se concentró bajo vacío y la disolución acuosa resultante se extrajo con CH₂Cl₂, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice usando mezclas Hex:AcOEt de polaridad creciente (7:3, 6:4 y 1:1) dio lugar a 1.86 g (83%) de un aceite amarillo-pálido, correspondiente al intermedio Vb.1.

Siguiendo un procedimiento análogo al descrito anteriormente pero utilizando como producto de partida el intermedio VIIa.1, se obtuvo el producto Va.1.

Intermedio Va.1 (*sin*): ---

Intermedio Vb.1 (*anti*): ¹HRMS *m/z* calcd. para C₂₂H₃₄O₅SiNa [M+Na⁺]: 429.2073, encontrado: 429.2099.

Intermedios IVa.1 (*sin*) y IVb.1 (*anti*) (GP = benciloxycarbonilo, R_1 = bencilo, R_2 = 2-feniletilo, R_3 = etoxilo, GP' : *terc*-butildimetilsililo): (2*E*,4*R*,5*S*)-5-((2*S*)-2-Benciloxycarbonilamino-3-fenilpropionilamino)-4-*terc*-butildimetilsililo-7-fenilhept-2-enoato de etilo y (2*E*,4*S*,5*S*)-5-((2*S*)-2-Benciloxycarbonilamino-3-fenilpropionilamino)-4-*terc*-butildimetilsililo-7-fenilhept-2-enoato de etilo

Una disolución del ácido carboxílico (intermedio Vb.1, 969 mg, 2.38 mmol) en acetona-H₂O (12 mL) enfriada en baño de hielo se trató con Et₃N (389 μ L, 2.79 mmol) y luego con cloroformiato de metilo (247 μ L, 3.19 mmol). La mezcla resultante se agitó a esta temperatura durante 1.5 h. Luego se añadió una disolución de NaN₃ (309 mg, 4.76 mmol) en agua (1.5 mL) y la mezcla se agitó enfriada en baño de hielo durante 4 h, luego se vertió en un embudo de decantación y se extrajo con Et₂O, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró.

El aceite amarillo resultante se disolvió en tolueno (12 mL) y se reflujo durante 35 min, luego se concentró bajo vacío y el crudo se sometió al siguiente paso sin ninguna purificación.

Después una disolución del crudo anterior y (*S*)-benciloxycarbonilfenilalanina (911 mg, 3.05 mmol) en CH₂Cl₂ (35 mL) enfriada en baño de hielo se trató con 4-DMAP (71 mg, 0.58 mmol). La mezcla resultante se agitó a dicha temperatura durante 1.5 h y luego a temperatura ambiente durante 6 h. Luego la mezcla se concentró bajo vacío. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice usando mezclas Hex:AcOEt de polaridad creciente (6:4) dio lugar a 752 mg (48%) de un aceite, correspondiente al intermedio IVb.1.

Siguiendo un procedimiento análogo al descrito anteriormente pero utilizando como producto de partida el intermedio Va.1, se obtuvo el producto IVa.1.

Intermedio IVa.1 (*sin*): ¹³C-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 173.91, 165.43, 147.09, 141.25, 136.03, 129.00, 128.45, 127.92, 126.77, 125.50, 122.10, 73.98, 68.60, 60.13, 49.00, 36.43, 32.65, 31.17, 30.34, 25.23, 13.73, -4.63, -5.44.

ES 2 310 143 A1

Intermedio IVb.1 (*anti*): IR δ 3321, 3027, 2929, 2858, 1719, 1659, 1535, 1497, 1455, 1366, 1260, 1174, 1130, 1031, 837, 778, 746, 698 cm^{-1} .

- 5 Intermedios IIIa.1 (*sin*) y IIIb.1 (*anti*) (GP = benciloxycarbonilo, R_1 = bencilo, R_2 = 2-feniletilo, R_3 = etoxilo): (2E,4R,5S)-5-((2S)-2-Benciloxycarbonilamino-3-fenil-propionilamino)-7-fenil-4-hidroxihept-2-enoato de etilo y (2E,4S,5S)-5-((2S)-2-Benciloxycarbonilamino-3-fenilpropionilamino)-7-fenil-4-hidroxi-hept-2-enoato de etilo

10 A una disolución de compuesto protegido (intermedio IVb.1, 725 mg, 1.10 mmol) in THF (11 mL) enfriado en baño de hielo se añadió fluoruro de tetra-*n*-butilamonio (1M en THF) (5.5 mL, 5.5 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 7.5 h. Pasado este tiempo, el solvente se eliminó bajo vacío y el crudo resultante se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando mezclas Hex:AcOEt de polaridad creciente (1:1) dando lugar a 467 mg (78%) de un sólido blanco, correspondiente al intermedio IIIb.1.

- 15 Siguiendo un procedimiento análogo al descrito anteriormente pero utilizando como producto de partida el intermedio IVa.1, se obtuvo el producto IIIa.1.

Intermedio IIIa.1 (*sin*): ^{13}C -RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 171.98, 166.44, 156.39, 145.97, 141.32, 136.69, 136.27, 129.00, 128.45, 127.92, 126.77, 125.60, 73.36, 67.50, 60.76, 54.07, 38.73, 32.64, 30.67, 14.44.

- 20 Intermedio IIIb.1 (*anti*): IR δ 3438, 3309, 3029, 2927, 1690, 1642, 1532, 1495, 1455, 1385, 1369, 1302, 1258, 1219, 1190, 1135, 1041, 971, 911, 873, 750, 700, 673 cm^{-1} .

- 25 Intermedios IIa.1 (*sin-sin*) y IIb.1 (*anti-sin*): (GP = benciloxycarbonilo, R_1 = bencilo, R_2 = 2-feniletilo, R_3 = etoxilo): (2S,3R)-3-[(1S,2S)-2-((2S)-2-Benciloxycarbonilamino-3-fenilpropionilamino)-4-fenil-1-hidroxibutil]oxirano-2-carboxilato de etilo y (2R,3S)-3-[(1R,2S)-2-((2S)-2-Benciloxycarbonilamino-3-fenilpropionilamino)-4-fenil-1-hidroxibutil]oxirano-2-carboxilato de etilo

- 30 A una disolución de TBHP (3.3M en tolueno, preparado según Hill, J.G.; Rossiter, B.E.; Sharpless, B.; *J. Org. Chem.* 1983, 48, 3607-3608; 616 μL , 2.34 mmol) en THF (5 mL) enfriada a -78°C se añadió etil litio (0.5M en benceno/ciclohexano (9/1)) (3.43 mL, 1.72 mmol). La mezcla resultante se agitó a -78°C durante 15 min y luego una disolución del ester insaturado (intermedio IIIb.1, 425 mg, 0.78 mmol) en THE (3 mL) se añadió gota a gota y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. Luego se añadió Na_2SO_3 (120 mg) de una vez y se agitó durante 15 min. Posteriormente se diluyó con una diolución acuosa saturada de NH_4Cl y se extrajo con Et_2O (3 x 30 mL), las fases orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron y se concentraron. El aceite crudo resultante se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando mezclas Hex:AcOEt de polaridad creciente (7:3), (6:4), (1:1), (1:2) y AcOEt) dando lugar a 175 mg de un sólido blanco, correspondiente al intermedio IIb.1.

- 40 Siguiendo un procedimiento análogo al descrito anteriormente pero utilizando como producto de partida el intermedio IIIa.1, se obtuvo el producto IIa.1.

Intermedio IIa.1 (*sin-sin*): HRMS m/z calcd. para $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_5\text{SiNa}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$]: 429.2073, encontrado: 429.2099.

- 45 Intermedio IIb.1 (*anti-sin*): ^{13}C -RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 171.73, 168.60, 155.81, 141.11, 136.46, 136.06, 129.31, 129.27, 128.87, 128.83, 128.57, 128.52, 128.36, 128.27, 127.14, 126.14, 70.71, 67.26, 61.80, 58.49, 56.63, 53.05, 51.29, 50.05, 38.06, 33.07, 32.40, 32.30, 32.24, 29.72, 14.14.

- 50 Compuestos Ia.1 y Ib.1 (GP = benciloxycarbonilo, R_1 = bencilo, R_2 = 2-feniletilo, R_3 = etoxilo): (2S,3S)-3-[(2S)-2-((2S)-2-Benciloxycarbonilamino-3-fenilpropionilamino)-4-fenilbutiril]oxirano-2-carboxilato de etilo y (2R,3R)-3-[(2S)-2-((2S)-2-Benciloxycarbonilamino-3-fenilpropionilamino)-4-fenilbutiril]oxirano-2-carboxilato de etilo

- 55 Una disolución del epoxialcohol (intermedio IIb, 50 mg, 0.09 mmol) en CH_2Cl_2 (3 mL) enfriada en baño de hielo se trató con piridina (36 μL , 0.45 mmol) y el peryodinano de Dess-Martin (169 mg, 0.45 mmol).

- La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Luego se paró con una disolución saturada acuosa de $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, se diluyó con Et_2O , luego se extrajo con Et_2O (3x20 mL), las fases orgánicas se lavaron (salmuera), se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron. El crudo se purificó a través de cromatografía sobre gel de sílice usando mezclas Hex:AcOEt de polaridad creciente (8:2, 7:3, 6:4, 1:1 y AcOEt) para dar 34 mg (68%) de un sólido blanco, correspondiente al intermedio IIb.1.

- 65 Siguiendo un procedimiento análogo al descrito anteriormente pero utilizando como producto de partida el intermedio IIIa.1, se obtuvo el producto IIa.1.

Compuesto Ia.1: HRMS m/z calcd. para $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{O}_5\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$]: 581.2264, encontrado: 581.2251.

Compuesto Ib.1: HRMS m/z calcd. para $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{O}_5\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$]: 581.2264, encontrado: 581.2258.

Estudios de inhibición enzimática

Se analizó la actividad inhibidora de los compuestos de las enzimas cruzaina (proteasa del tipo Cathepsina L de *Trypanosoma cruzi* recombinante sin dominio C Terminal purificada), rhodasaína (proteasa de tipo cathepsina L) y catepsina B humana (TbCatB).

Cruzaína (4 nM), rhodasaína (4 nM), o TbCat B (40 nM) se incubaron con un compuesto de fórmula Ia o Ib en un tampón de acetato sódico 100 mM (pH 5.5), 0.001% TX-100, y 10 mM DTT (tampón A) durante 5 min en un volumen de 100 μ L a temperatura ambiente. Se añadió un volumen de 200 μ L de Z-Phe-Arg-AMC (Bachem, K_m (cruzaína) = 1 μ M; K_m (rhodasaína) = 1 μ M; y K_m (TbCat B) = 50 μ M) a la reacción enzima-inhibidor para dar una concentración de sustrato de 10 μ M. El aumento de fluorescencia (excitación a 355 nm y emisión a 460 nm) se siguió con un espectrofluorímetro automatizado microtiter plate robotizado (Molecular Devices SpectraMax Flexstation) durante 5 min. Esta cantidad de enzima y sustrato dio actividades similares para todos los enzimas, con un consumo de sustrato menor de 5% durante el ensayo. Se prepararon diluciones stock 20 mM de un compuesto de fórmula Ia o Ib en DMSO, y se prepararon diluciones seriadas a una concentración adecuada en 10% DMSO.

Sobre 10 μ L de un compuesto de fórmula Ia o Ib en una placa de 96 pocillos usando el robot Plate Mate Plus (la concentración final DMSO fue de 0.5%) se añadieron 40 μ L de tampón. Las placas se cubrieron hasta que un volumen igual de tampón que contenía enzima (50 μ L) se añadió para empezar la incubación de inhibidor enzima (5 min a temperatura ambiente).

Para cada ensayo se realizaron controles de disolvente solo y disolvente con un inhibidor irreversible conocido K11777 (*N*-metilpiperazin-Phe-HPhe-(CH=CHSO₂Ph) en series de dilución de 10 veces empezando a una concentración de 100 μ M hasta 1 nM. Cruzaína y rhodasaína se examinaron con un compuesto de fórmula Ia o Ib a 100 nM, mientras que TbCat B con inhibidor a 1000 nM.

Determinación de los valores IC₅₀

Los inhibidores para cruzaina y rhodasaína se incubaron con un compuesto de fórmula Ia o Ib a una concentración de 10 a 10000 nM (y de 500 nM a 10000 nM para Tb Cat B) y se hicieron diluciones secuenciales en DMSO.

Estos ensayos se realizaron usando pipetas multicanal para repartir el inhibidor en los 96 pocillos. Se realizaron controles de enzima, enzima en DMSO y enzima con el inhibidor irreversible conocido K11777 (*N*-metilpiperazin-Phe-HPhe-(CH=CHSO₂Ph), de Arris Pharmaceuticals Inc., South San Francisco, CA) para cada uno de los ensayos. Los compuestos que presentaron valores de IC₅₀ menores de 1 μ M se analizaron más adelante. Los datos de inhibición para otros enzimas se determinaron de forma similar: rec rhodasaína a 4 nM de enzima y 10 μ M de Z-Phe-Arg-AMC (K_m 1 μ M) en tampón A; y rec TbCat B a 40 nM de enzima y 10 μ M Z-Phe-Arg-AMC (K_m = 60 μ M) en tampón A.

En la siguiente tabla se muestran los valores de inhibición correspondientes a *Trypanosoma brucei brucei* (Tbb), cruzaina, rhodasaína y cathepsina B y sus valores de IC₅₀.

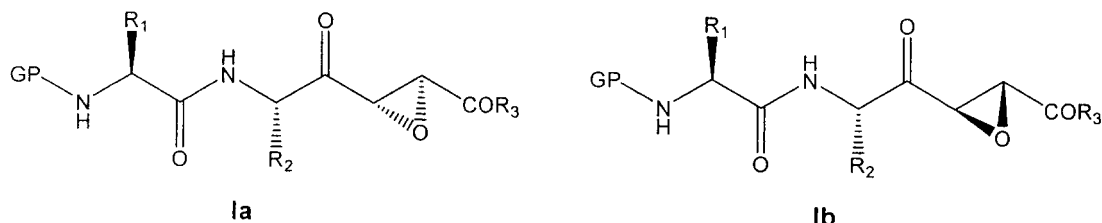
| Ejemplo | Tbb | % inhibition (DMSO) | | | IC ₅₀ (nM) | | |
|---------|-----|---------------------|------------|---------|-----------------------|------------|---------|
| | | Cruzaína | Rhodasaína | TbCat B | Cruzaína | Rhodasaína | TbCat B |
| Ia.1 | 42% | 93% | 98% | 51% | 20 | 3,5 | >>1000 |
| Ib.1 | -2% | 55% | 80% | 47% | 50 | 30 | 400 |

Los compuestos Ia.1 y Ib.1 son muy activos frente a rhodasaína y cruzaina pero no para la cathepsina B lo que denota su selectividad.

La efectividad de los compuestos de la invención también se puede comprobar mediante ensayos celulares o modelos animales *in vivo*. Los modelos animales de trypanosomiasis, enfermedad de Chagas y malaria son conocidos en el estado de la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto diastereoisomérico sustancialmente puro de fórmula Ia, alternativamente Ib, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos o un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, incluyendo un hidrato,



donde GP es un grupo protector;

R_1 es un radical seleccionado del grupo que consiste en fenilmetilo, 4-hidroxifenilmetilo, (1*H*-indol-3-il)metilo y (1*H*-imidazol-4-il)metilo;

R_2 es un radical seleccionado del grupo que consiste en -H, -CH₃, -CH₂SH, -CH₂OH, -CH₂Ph, -CH₂CO₂H, -CH₂CONH₂, -CH(OH)CH₃, -CH(CH₃)CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH(CH₃)₂, -(CH₂)₂SCH₃, -(CH₂)₂CO₂H, -(CH₂)₂CONH₂, -(CH₂)₃NHC(NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, imidazol-4-ilmetilo, 4-hidroxifenilmetilo, (1*H*-indol-3-il)metilo, (1*H*-imidazol-4-il)metilo y -(CH₂)_n-Ar; y

R_3 es un radical seleccionado del grupo que consiste en -O(C₁-C₄)alquilo, -O(C₂-C₄)alqueno, -O(C₂-C₄)alquino, -O(C₁-C₄)alquilo-Ar, -OAr, -NR^aAr, -N(R^a)[(C₁-C₄)alquilo-Ar], -NR^aOAr y -N(R^a)[O(C₁-C₄)alquilo-Ar];

donde n representa un valor seleccionado entre 2 y 3;

Ar es un radical de carbono o nitrógeno de un anillo conocido carbocíclico aromático monocíclico de 5 a 6 miembros o bicíclico de 8 a 10 miembros, que contiene opcionalmente de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, S y O, y que puede estar opcionalmente sustituido por uno o más radicales seleccionados independientemente del grupo que consiste en -OH, -CHO, -SH, -NO₂, -CN, -F, -Cl, -Br, -(C₁-C₄)alquilo opcionalmente sustituido por uno o más radicales seleccionados independientemente del grupo que consiste en -F, -Cl, -Br y -OH; -O(C₁-C₄)alquilo opcionalmente sustituido por uno o más radicales seleccionados independientemente del grupo que consiste en -F, -Cl, -Br y -OH; -CO(C₁-C₄)alquilo, -OCO(C₁-C₄)alquilo, -S(C₁-C₄)alquilo, -SO(C₁-C₄)alquilo, -SO₂(C₁-C₄)alquilo, -SO₂O(C₁-C₄)alquilo, -OSO₂(C₁-C₄)alquilo, -NR^aR^b, -CONR^aR^b; y

R^a y R^b representan independientemente un radical —H o -(C₁-C₄)alquilo.

2. Compuesto según la reivindicación 1 de fórmula Ia, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo un hidrato.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde GP es un radical seleccionado del grupo que consiste en benciloxicarbonilo, morfolinocarbonilo y *N*-metilcarbonilo; R_1 es un radical fenilmetilo, R_2 es un radical 2-feniletilo y R_3 es un radical -O(C₁-C₄)alquilo.

4. Compuesto según la reivindicación 3, donde GP es un radical benciloxicarbonilo; R_1 es un radical fenilmetilo, R_2 es un radical 2-feniletilo y R_3 es un radical etoxilo.

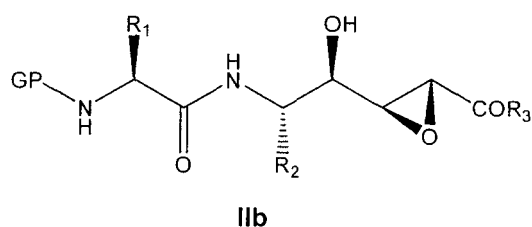
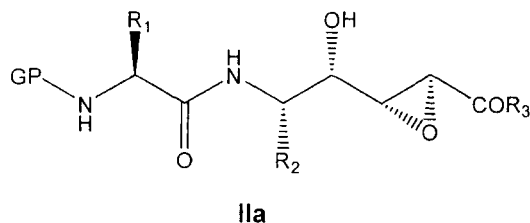
5. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo un hidrato junto con cantidades apropiadas de excipientes farmacéuticamente aceptables.

6. Uso de un compuesto definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades mediadas por la inhibición de una cisteína-proteasa seleccionada del grupo que consiste en cruzafina, rhodesaina y falcipaina.

7. Uso de un compuesto definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Chagas o la tripanosomiasis africana.

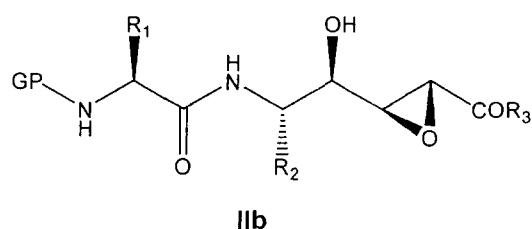
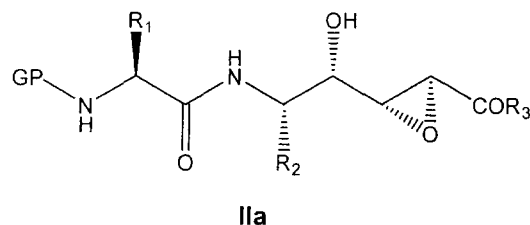
8. Uso de un compuesto definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la malaria.

9. Procedimiento de preparación de un compuesto diastereoisomérico sustancialmente puro de fórmula Ia, alternativamente Ib, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, incluyendo un hidrato, que comprende la oxidación de un compuesto de fórmula IIa, alternativamente IIb con un agente oxidante adecuado:



donde GP, R₁, R₂ y R₃ tienen el significado indicado en la reivindicación 1.

10. Compuesto diastereoisomérico de fórmula IIa, alternativamente IIb, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos o un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, incluyendo un hidrato,



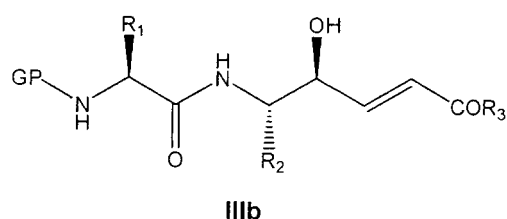
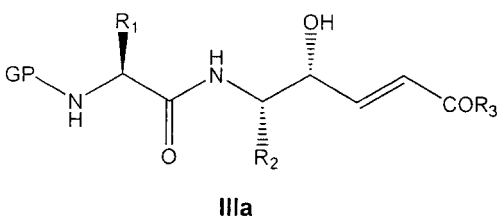
donde GP, R₁, R₂ y R₃ tienen el significado indicado en la reivindicación 1.

11. Compuesto según la reivindicación 10 de fórmula IIa, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo un hidrato.

12. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11 donde GP es un radical seleccionado del grupo que consiste en benciloxicarbonilo, morfolinocarbonilo y N-metilcarbonilo; R₁ es un radical fenilmetilo, R₂ es un radical 2-feniletilo y R₃ es un radical -O(C₁-C₄)alquilo.

13. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 donde GP es un radical benciloxicarbonilo; R₁ es un radical fenilmetilo, R₂ es un radical 2-feniletilo y R₃ es un radical etoxilo.

14. Procedimiento de preparación de un compuesto diastereoisomérico de fórmula IIa, alternativamente IIb, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, incluyendo un hidrato, que comprende la epoxidación de un compuesto de fórmula IIIa o IIIb respectivamente con un agente epoxidante adecuado:



donde GP, R₁, R₂ y R₃ tienen el significado indicado en la reivindicación 1.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 310 143

⑫ Nº de solicitud: 200701717

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 15.06.2007

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| A | ROUSH, W.R. et al. "Design and synthesis of dipeptidyl a',b'-Epoxy ketones, potent irreversible inhibitors of the cysteine protease cruzain". Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1998, Volumen 8, páginas 2809-2812. Ver página 2809, figura. | 1-14 |
| A | SPALTENSTEIN, A. et al. "Design and Synthesis of Novel Protease Inhibitors. Tripeptide a',b'-Epoxyketones as Nanomolar Inactivators of the Proteasome". Tetrahedron Letters, 1996, Volumen 37, Número 9, páginas 1343-1346. Ver página 1344, esquema 1. | 1-14 |
| A | DRAHL, C. et al. "Protein-Reactive Natural Products". Angewandte Chemie International Edition, 2005, Volumen 44, páginas 5788-5809. Ver página 5794, apartado 2.3. | 1-14 |
| A | GROLL, M. et al. Crystal Structure of Epoxomicin:20S Proteasome Reveals a Molecular Basis for Selectivity of a',b'-Epoxyketone Proteasome Inhibitors". Journal of the American Chemical Society, 2000, Volumen 122, páginas 1237-1238. | 1-14 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

04.11.2008

Examinador

G. Esteban García

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D 303/48 (2006.01)

C07K 5/06 (2006.01)

A61K 31/336 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

A61P 33/06 (2006.01)