

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

Desde que en 1989 fue identificada por primera vez la $\alpha_4\beta_1$ (ó VLA-4) por Hemler y Takada¹, la industria farmacéutica empezó a desarrollar programas para la identificación, la síntesis y la evaluación de sustancias con actividad antagonista de la VLA-4.

Actualmente existen dos aproximaciones potencialmente terapéuticas de antagonistas de la VLA-4: los anticuerpos monoclonales del receptor VLA-4, y los antagonistas péptidicos y no-péptidicos sintéticos.

El **Natalizumab** (Antegren[®])² es un anticuerpo monoclonal (Mab) humanizado anti- α_4 , que se une a las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_4\beta_7$ desarrollado por Protein Design Labs a partir de un anticuerpo murínico anti- α_4 . Este compuesto ha sido elegido como candidato para el tratamiento de la esclerosis múltiple y la enfermedad inflamatoria del intestino por Elan y Biogen. A principios de 2003, se han publicado los primeros resultados de un ensayo clínico sobre 213 pacientes con esclerosis múltiple³ tratados con **Natalizumab**. Como se observa en la figura 1, la administración de **Natalizumab** resultó altamente eficaz:

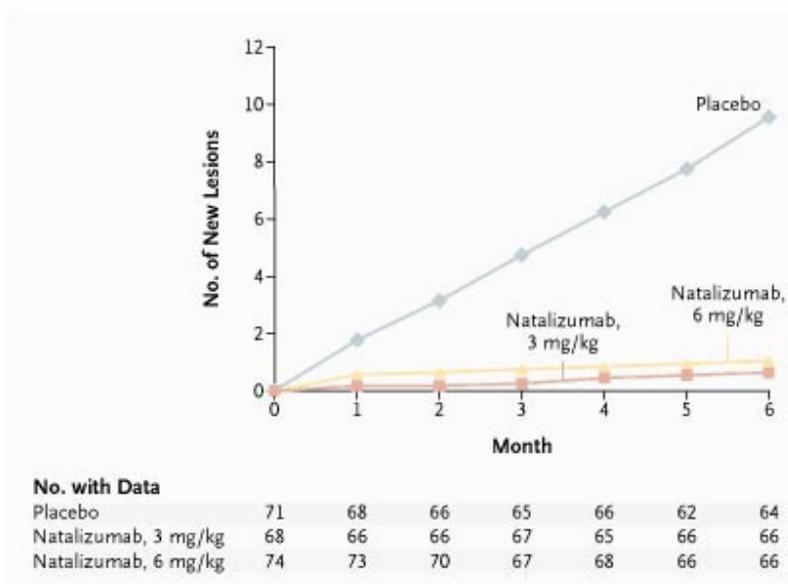


Figura 1

¹ Hemler, M.E., Takada, Y.; *European Patent Application. Publication n° 330,526*

² Sorbera, L.A., Rabasseda, M.L., *Drugs of Future*, 25 (9), 2000, 917-21

³ Miller, D.H., et al.; *N.Engl.J.Med.*, 348, 2003, 15-23

En la misma fecha se publicaron los resultados de otro ensayo clínico sobre 248 pacientes con enfermedad de Crohn⁴ tratados con **Natalizumab**. En la figura 2, vemos resumidos los resultados de la eficacia del **Natalizumab** en esta patología

Table 2. Rates of Remission and Clinical Response.*

Week	Placebo (N=63)	1 Infusion of 3 mg of Natalizumab/kg (N=68)	2 Infusions of 3 mg of Natalizumab/kg (N=66)	2 Infusions of 6 mg of Natalizumab/kg (N=51)
	<i>no. of patients (%)</i>			
Remission				
Week 2	6 (10)	10 (15)	13 (20)	6 (12)
P value		0.328	0.127	0.745
Week 4	9 (14)	21 (31)	19 (29)	15 (29)
P value		0.02	0.027	0.028
Week 6 (primary end point)	17 (27)	20 (29)	29 (44)	16 (31)
P value		0.757	0.030	0.533
Week 8	10 (16)	19 (28)	27 (41)	22 (43)
P value		0.107	<0.001	<0.001
Week 12	17 (27)	19 (28)	28 (42)	20 (39)
P value		0.992	0.042	0.122
Response				
Week 2	19 (30)	31 (46)	36 (55)	22 (43)
P value		0.081	0.004	0.136
Week 4	18 (29)	32 (47)	41 (62)	27 (53)
P value		0.029	<0.001	0.006
Week 6	24 (38)	40 (59)	47 (71)	29 (57)
P value		0.022	<0.001	0.039
Week 8	22 (35)	38 (56)	44 (67)	28 (55)
P value		0.018	<0.001	0.028
Week 12	27 (43)	34 (50)	40 (61)	33 (65)
P value		0.503	0.033	0.018

* Remission was defined by a score of less than 150 on the Crohn's Disease Activity Index. A response was defined by a decrease in the score of at least 70 points from base line. P values are for the comparison with the placebo group.

Figura 2

Dentro del descubrimiento de *moléculas pequeñas* como inhibidores de la unión VCAM-1/VLA-4, los esfuerzos se han centrado principalmente en el desarrollo de derivados peptídicos basados en la secuencia de aminoácidos LDV y por otra parte derivados N-acilfenilalanínicos.

A continuación haremos un repaso de las propiedades biológicas de las *moléculas pequeñas* más avanzadas.

A partir de la identificación de la secuencia de aminoácidos ILDVP como el fragmento mínimo que retenía la actividad del segmento CS-1 de la fibronectina, los investigadores de Biogen llevaron a cabo un estudio en el cual introducían variaciones en el residuo N-terminal de este fragmento peptídico. El resultado fue la introducción

⁴ Ghosh, S., et al.; *N.Engl.J.Med.*, 348, 2003, 24-32

del grupo MPUPA (*2-MethylPhenylUreido Phenyl Acetic group*) con un incremento considerable de la actividad. Este grupo MPUPA fue adoptado por numerosos equipos de investigación constituyendo una familia de compuestos. Dentro de este grupo de moléculas destaca el **Bio-1211**⁵ de Biogen

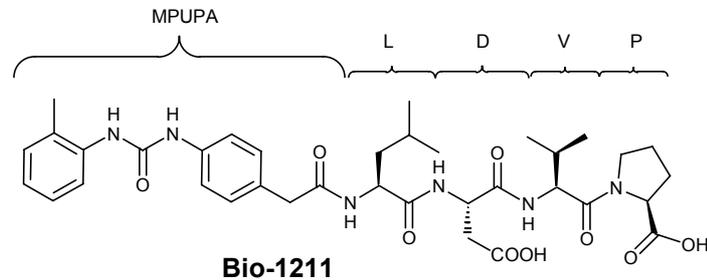


Figura 3

y el **IVL-745**⁶ de Aventis

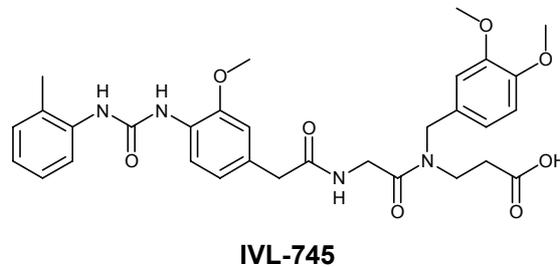


Figura 4

El **Bio-1211** es un inhibidor altamente selectivo que presenta una $CI_{50} = 4$ nM en un ensayo de adhesión entre células *Jurkat* y el segmento CS-1 de la fibronectina, y una $CI_{50} = 1$ nM en un ensayo de unión entre VLA-4 expresado en células *Jurkat* a VCAM-1. Es aproximadamente 500 veces selectivo para VLA-4 sobre $\alpha_4\beta_7$ y es inactivo en ensayos de unión para $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_{11b}\beta_{IIIa}$, y $\alpha_L\beta_2$. Este compuesto después de ser administrado en una dosis simple de 0,1 mg/Kg a una oveja sensibilizada con *Ascaris suum*, inhibe la fase temprana y virtualmente elimina la fase tardía del aumento de resistencia bronquial después de 24 horas de ser administrada.⁵

El **Bio-1211** fue licenciado a Merck & Co, que lo introdujo en un estudio clínico para el tratamiento del asma. Sin embargo, sus malos resultados de eficacia en los estudios de fase II hizo que fuese abandonado.⁷

El **IVL-745** es el compuesto más avanzado de esta familia. Este compuesto es un potente inhibidor de la adhesión entre células Ramos-fibronectina y entre células

⁵ Adams, S.P., et al.; *J. Med. Chem.*, 42, **1999**, 920-34

⁶ Resultados presentados por Aventis en la International Conference of the American Thoracic Society en Toronto (mayo 5-10, **2000**) y recogidos en DailyDrugsNews.com

⁷ Tilley, J.W, Sidduri, A.; *Drugs of Future*, 26 (10), **2001**, 985-99824

Ramos-VCAM-1, con muy poco efecto sobre las integrinas $\alpha_5\beta_1$ o $\alpha_4\beta_7$.⁶ Ha demostrado ser activo en un modelo de inflamación en el pulmón en rata con el producto administrado intratraquealmente a 3 y 10 mg/kg. La duración del efecto es de 8 h. El **IVL-745** ha sido seleccionado para iniciar el estudio de fase IIa⁸ por vía inhalatoria.

Las N-acilfenilalaninas son el segundo grupo de derivados que más ha avanzado. El core de la fenilalanina parece ser crucial para la actividad y tolera un gran rango de sustituyentes en la posición 4 del anillo aromático y en el átomo de nitrógeno.⁹ A diferencia de los LDV-miméticos, los cuales suelen ser altamente selectivos para la VLA-4, varios miembros de esta familia son inhibidores tanto de la VLA-4/VCAM-1 como de la $\alpha_4\beta_7$ /MadCAM.⁷

Los primeros y más potentes derivados de esta familia fueron una serie de tiaprolil-tirosino ésteres y éteres, de entre los cuales el **CT-5219** un 2,6-diclorobencil éter, desarrollado por Celltech Chiroscience, es el inhibidor más potente en un ensayo de adhesión de células *Jurkat*/VCAM-1 (CI_{50} =35 nM)¹⁰

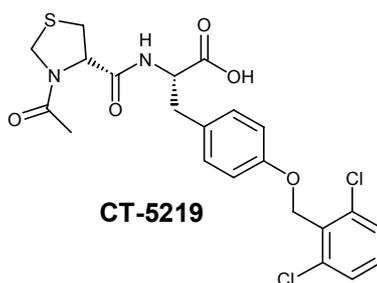


Figura 5

Es un compuesto inactivo frente a otras integrinas excepto a $\alpha_4\beta_7$ (CI_{50} =190 nM) y es muy estable frente a las esterasas del plasma. Administrado a ovejas por vía intravenosa en dosis de 0,03 a 3 mg/kg inhibe tanto la fase temprana como la fase tardía del aumento de resistencia bronquial después de ser administrado el antígeno de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, presenta una biodisponibilidad muy baja por vía oral tanto en rata como en oveja y se elimina muy rápidamente, especialmente en rata.¹¹

El compuesto designado como **TR-14035**, de Tanabe

⁸ Aventis.com

⁹ Tilley, J.W. et al.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, **2000**, 729-733

¹⁰ Porter, R.J. et al.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, **2000**, 997-999

¹¹ Archibald, J.C. et. al; Discovery of Potent, Selective, Orally-active, Small molecule Antagonists of VLA-4, Poster en la International Conference of the American Thoracic Society en Toronto (mayo 5-10, **2000**)

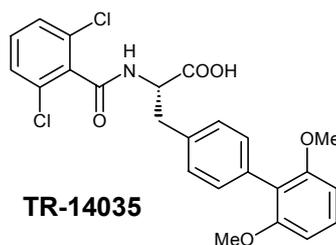


Figura 6

presenta una estructura con más lipofilicidad, lo cual se traduce en una mejor biodisponibilidad: $F = 60\%$ y $t_{1/2} = 5$ h en rata y $F = 25\%$ y $t_{1/2} = 2,5$ h en perro. Al igual que ocurre en muchas moléculas derivadas de la N-acilfenilalanina, el **TR-14035** presenta un aclaramiento muy rápido, principalmente a través de la excreción biliar. El **TR-14035** presenta una $CI_{50} = 56$ nM en un ensayo de adhesión entre VLA-4 en células *Jurkat* y CS-1 y una $CI_{50} = 6$ nM en un ensayo para $\alpha_4\beta_7$ con células RPMI y CS-1. Estos datos hacen del **TR-14035** un compuesto dual, incluso es un inhibidor más potente de la adhesión $\alpha_4\beta_7$ /MadCAM.¹²

El **TR-14035** ha sido licenciado a GlaxoSmithKline (GSK) a escala mundial,⁶ excepto ciertas partes de Asia y ha sido denominado como **SB-683698**.¹³ Se ha completado la fase I y se espera que comience la fase II para asma, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoidea y esclerosis múltiple en 2002-2003.¹³

Recientemente Roche ha comunicado a través de su página web¹⁴ que tienen un compuesto, el **R-411**, para desarrollar un estudio en fase II. Ni la estructura ni datos sobre esta molécula han sido publicados por la multinacional suiza, aunque alguna publicación¹⁵ se ha aventurado a proponer una estructura, ésta no parece muy fiable.

Si bien éstos son los compuestos más avanzados que han presentado las diferentes compañías, existen multinacionales como Merck & Co., Roche, Pfizer, Aventis o Bayer involucradas activamente en el desarrollo de nuevos fármacos antagonistas de la VLA-4 como demuestra el gran número de publicaciones y patentes presentadas. No obstante, no han comunicado la existencia de otras moléculas en fase clínica y sí problemas farmacocinéticos (bajas biodisponibilidades y rápido aclaramiento) en sus compuestos más activos.

Además Merck ha establecido programas de colaboración con otras compañías como Elan, Biogen o Athena, lo cual evidencia aún más su interés en esta línea de investigación.

¹² Sircar, I. et al.; 220th ACS Natl. Meet. (Aug. 22-26, New Orleans) 1999, Abst MEDI-59

¹³ Gsk.com

¹⁴ Roche.com

¹⁵ *Expert Opin. Ther. Patents*, **2002**, 12, 755-757.

2. DISEÑO

2.1 INTRODUCCIÓN

El diseño molecular está encaminado, en una primera fase, a obtener lo que se llama un compuesto líder o *lead compound*. Este líder es un compuesto prototipo que tiene una actividad farmacológica y biológica moderada pero que además de requerir un incremento de la actividad puede tener otras características indeseables, por ejemplo: alta toxicidad, otras actividades biológicas, insolubilidad, problemas de metabolismo, etc. La estructura del compuesto líder es entonces modificada mediante síntesis en la segunda fase del diseño molecular (*lead modification* o modificación del líder) para minimizar o eliminar las propiedades no deseadas y mejorar la actividad.

Hay una extensa variedad de aproximaciones para identificar un compuesto líder, si bien se pueden dividir en dos grupos:

- métodos aleatorios: basados en *screenings* o cribados amplios sin o con mínima intelectualización del problema
- y métodos racionales, donde una vez identificado el sistema bioquímico relacionado con el proceso patológico (receptor-agonista o enzima-sustrato) se incorpora al conocimiento estructural de las moléculas implicadas en el proceso de diseño. Si se conoce la estructura del receptor biológico, se puede llevar a cabo el diseño racional basado en estructura mediante técnicas de *docking*, mecánica y dinámica molecular, etc. Si esta estructura se desconoce, se puede realizar diseño indirecto. En caso de conocerse la estructura del ligando natural de dicho receptor, esta puede ser utilizada como guía para el diseño de nuevas moléculas. Cuando se desconocen ambas estructuras (ligando y receptor) el diseño se lleva a cabo sobre la base de las moléculas sintetizadas más activas.

Nuestro sistema bioquímico es la **integrina $\alpha_4\beta_1$** , un receptor de membrana que media procesos de adhesión celular y los ligandos proteínicos naturales: el VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) y la fibronectina, mediante el segmento III-CS que cae dentro del péptido CS-1, con los cuales se une.

La estructura de la VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) no se conoce. La única estructura de integrina disponible es la resuelta muy recientemente por Arnaout et. al.,¹⁶ en la que se cristalizó y se obtuvo por difracción de rayos X la estructura del segmento extracelular de la integrina $\alpha_v\beta_3$. Por lo tanto el diseño de sus antagonistas se basará en el estudio de los ligandos naturales o sintéticos con los que interacciona dicho receptor.

¹⁶ Arnaout, M. A., et al.; *Science*, 294, **2001**, 339-345

Mientras la estructura química de la fibronectina permanece hoy día sin resolver, sí que se conoce la mínima secuencia necesaria para la unión con la VLA-4: ILDVP.¹⁷ En el caso del VCAM-1, la estructura cristalina de los dominios 1 y 2, zona donde se da la interacción con la VLA-4, ha sido resuelta mediante difracción de rayos X por dos grupos independientes.¹⁸ Esta estructura tridimensional de los dominios resueltos está disponible en Internet en el *Protein Data Bank* (PDB).¹⁹

De la resolución de este ligando (que se expone en la Figura 7), se ve que la zona de unión o *binding* se encuentra en una protuberancia que queda expuesta al exterior comunicando dos hojas- β , es el llamado *CD-loop*. De esta forma podemos visualizar el *CD-loop*, cuya estructura primaria es R₃₆TQID₄₀SP₄₂LN, y sus vecindades espaciales.

Así pues, a diferencia de las integrinas como la $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{11b}\beta_3$, o $\alpha_V\beta_3$, que reconocen siempre la secuencia RGD independientemente de cuales sean los ligandos con los que establecen la unión, la $\alpha_4\beta_1$ se une a diferentes secuencias primarias en función del ligando.²⁰

Si analizamos ambas secuencias de unión, ILDVP en la fibronectina y QIDSP en el VCAM-1, vemos que son esencialmente isósteras.

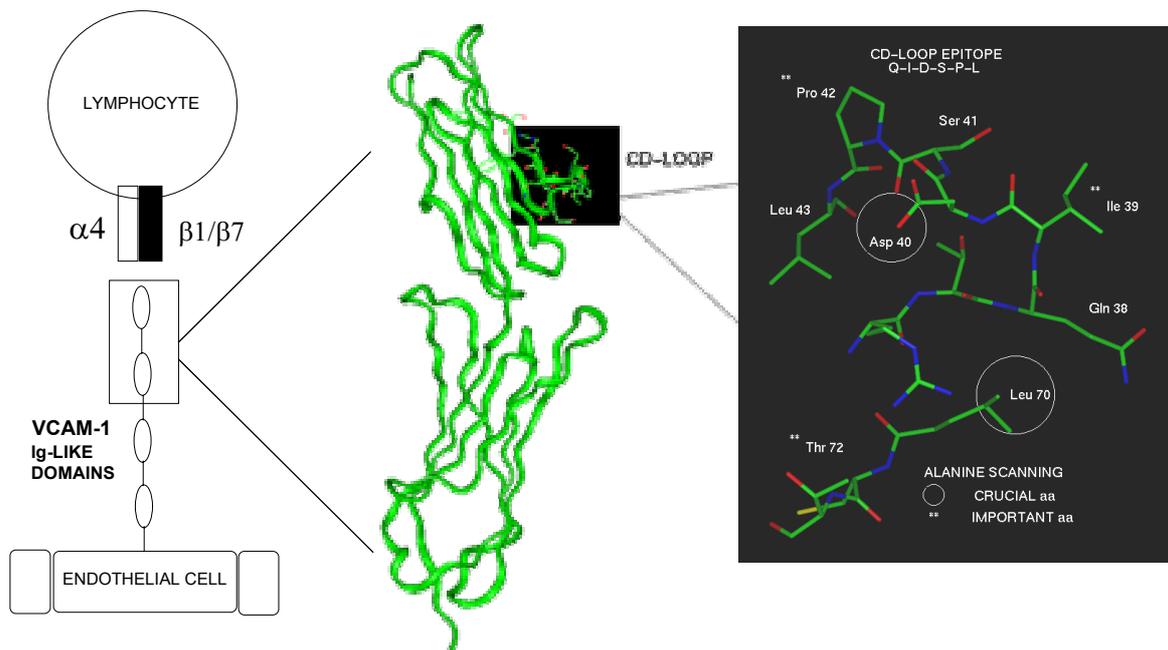


Figura 7

¹⁷ Komoriya, A.; *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 15075-79

¹⁸ a) Wang, J. H., et. al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92(12), 5714-18 b) Jones, E. Y., et. al.; *Nature* **1995**, 539-544

¹⁹ rcsb.org

²⁰ Cox, D; *Drug News & Perspectives* 8 (4), **1995**, 197-205

Estudios de mutagénesis dirigida sobre el *CD-loop* del VCAM-1 han confirmado que la Pro₄₂, el Asp₄₀ y la Ile₃₉ cuando son mutados a Ala inactivan la unión, incluso a concentraciones elevadas de Mn⁺².²¹ Esto mismo sucede con la Leu₇₀, fuera del *CD-loop* pero en la vecindad espacial. Sobre el papel de la Arg₃₆ existen dudas acerca de su importancia en la unión entre el VCAM-1 y la VLA-4. Por un lado los científicos de Genentech^{21a} mediante estudios de mutagénesis destacan la necesidad de este aminoácido para la unión, mientras que un equipo del Institute of Medicinal Microbiology de la Technical University of Munich^{21b}, también han publicado un estudio en el que mutaban la Arg₃₆ a alanina y la unión no se veía afectada.

2.2 DISEÑO RACIONAL DE PEPTIDOMIMETICOS ANTAGONISTAS DE LA VLA-4: ANTECEDENTES

En 1990, Tanabe patentó una serie de péptidos cíclicos que inhibían la unión del CS-1 de la fibronectina a la VLA-4.²² El compuesto más potente descrito en este trabajo era la molécula de la figura 8, pero no era selectiva y también inhibía la unión a la $\alpha_5\beta_1$,

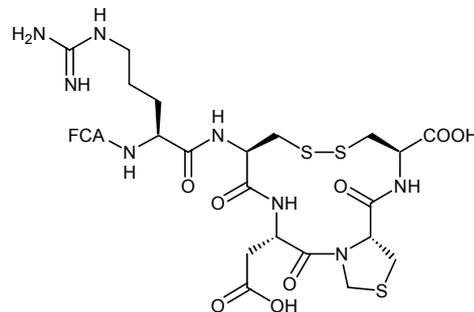


Figura 8

Genentech, en un proceso de optimización e identificación de las zonas funcionales de estos péptidos cíclicos en la unión con la $\alpha_4\beta_1$, llegó a estructuras tales como las siguientes²³

²¹ a) Chiu, H.H. et al.; *J. Immunol* **1995**, 155 (11), 5257-67 b) Kilger, G., Clements, J., Holzmann, B.; *Int. Immunol* **1997**, 9 (2), 219-26

²² Cardarelli, P. M.; *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 20352-9

²³ Jackson et. al.; *J. Med. Chem.*, 40, **1997**, 3359-68

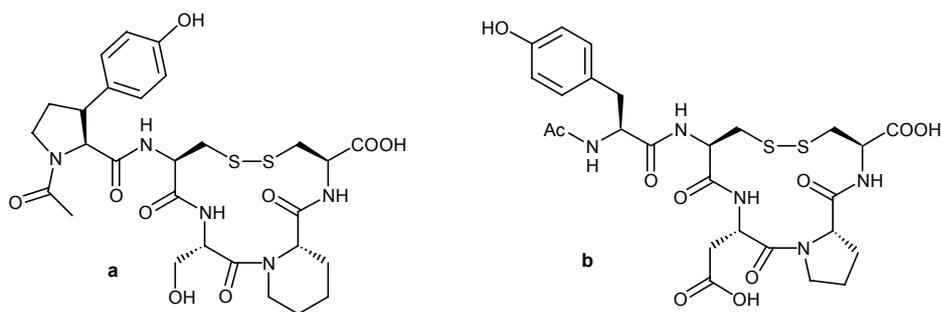


Figura 9

mucho más activas que el patrón inicial de Tanabe. Además de este estudio se extrajeron importantes conclusiones a nivel estructural. Las más importantes son:

- que el residuo Asp no es importante para la unión
- que el ácido carboxílico de la Cys es importante
- que la secuencia Asp-Pro podía ser reemplazada por espaciadores lineales

Roche tomó la estructura **b** de la figura 9 como punto de partida de su estudio estructura-actividad (SAR), y añadió que la Pro contribuye a la unión a través de una interacción hidrofóbica con la VLA-4.²⁴

Teniendo en cuenta todo esto, Roche diseñó reemplazamientos del dipéptido Asp-Pro los cuales incorporan una porción hidrofóbica capaz de mimetizar la interacción de la prolina. Además contienen un espaciador adecuado que orienta dicha porción correctamente, manteniendo la geometría del péptido cíclico.

De esta manera, Roche presentó otro péptido cíclico, representado en la figura 10,

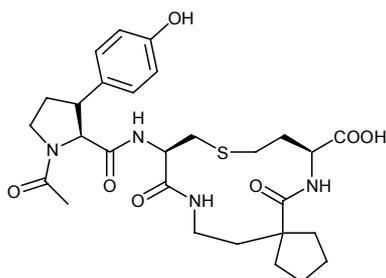
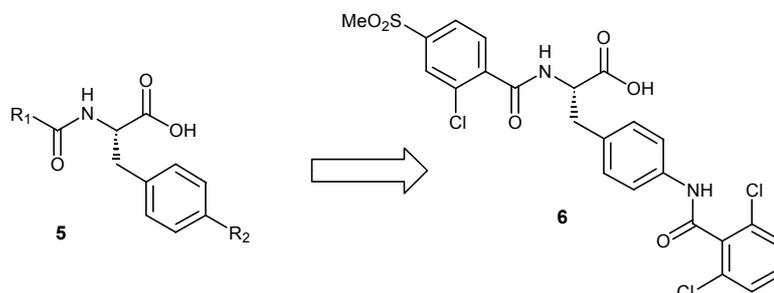


Figura 10

en el que además se tenía en cuenta la cabeza usada por Genentech, y se sustituía el puente disulfuro, potencialmente problemático desde el punto de vista farmacocinético y de estabilidad.

Paralelamente, Roche mediante *screening* de librería, encontró varios líderes que contenían un ácido carboxílico y un grupo guanidino separados por un espaciador.²⁵

De la optimización de estos líderes resultó una serie de potentes péptidomiméticos lineales como antagonistas de la VLA-4.



Esquema 1

Al igual que las anteriores compañías, Celltech²⁶ desarrolló péptidos cíclicos tomando como punto de partida el compuesto de Tanabe (figura 8). Lo primero que hicieron fue cambiar el residuo Arg por grupos lipófilos como el del siguiente compuesto

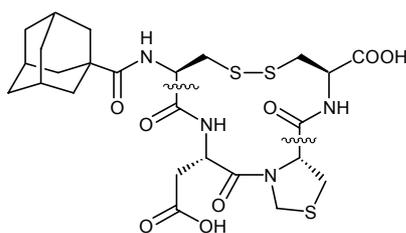


Figura 11

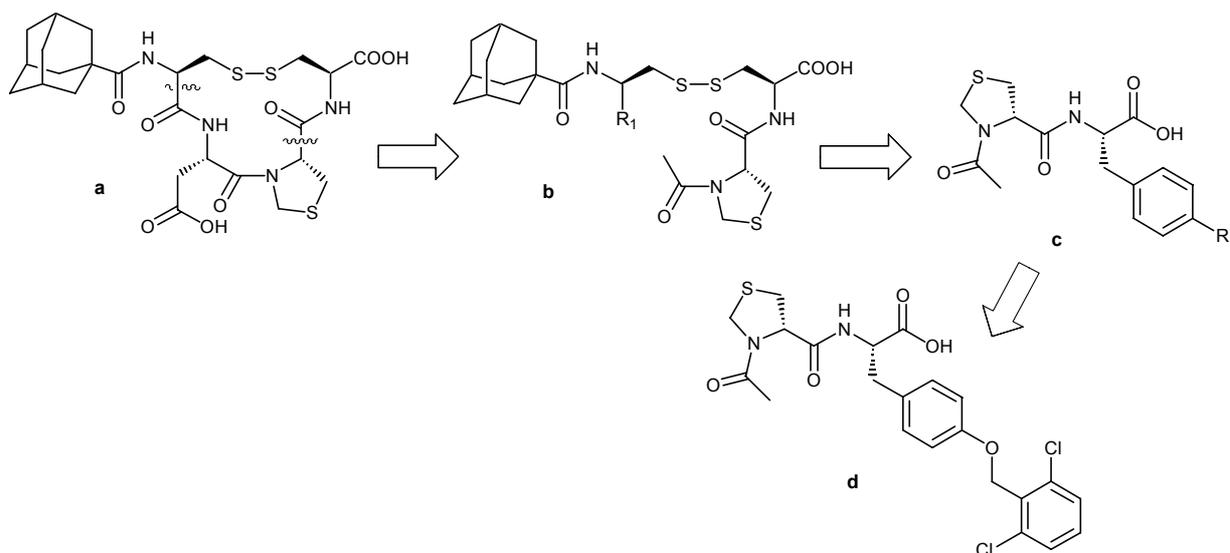
y se tomó como punto de partida del SAR y la subsecuente identificación de antagonistas de la VLA-4,

En este estudio estructura-actividad, Celltech preparó moléculas pequeñas a partir de la apertura del compuesto anterior (figura 11), por los puntos señalados generando la serie de compuestos del esquema 2

²⁴ Fotouhi, N. et al; *Bioorg. Med. Chem. Let.* 10, **2000**, 1171-73

²⁵ Tilley, J. W. et al.; *Exp. Opin. Ther. Patents*, **1999**,9 (10), 1443-46

²⁶ Porter, J. et al.; *Bioorg. Med. Chem. Let.* 10, **2000**, 993-95



Esquema 2

Una característica que presentan estos compuestos es la presencia de una fenilalanina o una tirosina (igual que Roche), como núcleo central de la molécula, unida a través de una amida o un metiléter a un grupo hidrofóbico (normalmente un anillo bencénico 2,6-diclorosustituido)²⁷ en la posición 4 del anillo aromático. Este hecho estructural se ha repetido en numerosos antagonistas de la VLA-4 que han aparecido posteriormente, llegando a formar una clase de derivados diferenciada.

Los investigadores de Tanabe-Seiyaku introdujeron una novedad con el **TR-14035**²⁸ al unir directamente el fenilo central de la fenilalanina o otro anillo bencénico con un grupo aceptor de puente de hidrógeno en posición *orto*.

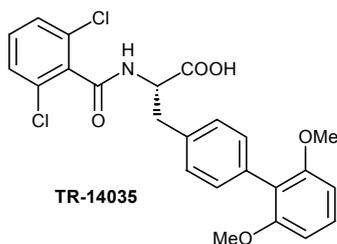


Figura 12

De la colaboración de Elan y American Home Products se desarrolló una serie de fenilalaninas en las que el N-sustituyente de la fenilalanina era una prolina N-arilsulfonil sustituida. El **CT-767**²⁹ se presenta como el compuesto más avanzado de esta serie

²⁷ Tilley, J.W, Sidduri, A.; *Drugs of Future*, 26 (10), **2001**, 985-998

²⁸ Sircar, I. et al. ; *Bioorg. Med. Chem.* 10, **2002**, 2051-66

²⁹ Sarantakis, D. et al.; *220th ACS Natl. Meet.* (Aug. 20-24, Washington D.C.) **2000**, Abst MEDI-137

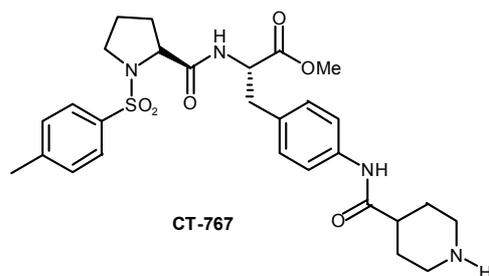


Figura 13

Merck también ha utilizado ampliamente esta cabeza en numerosos compuestos incorporando un bifenilo con un aceptor de puente de hidrógeno³⁰ al estilo del **TR-14035** en sus compuestos más desarrollados. Como el siguiente compuesto de la figura 14

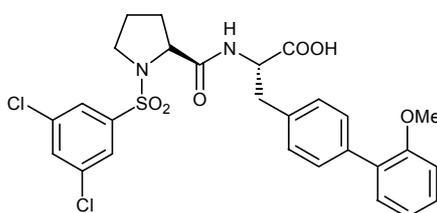


Figura 14

Si bien las N-acilfenilalaninas constituyen una familia importante de antagonistas de la VLA-4 existe otra gran familia de compuestos que son los derivados que mimetizan la secuencia LDV y que contienen la agrupación MPUPA.

Partiendo del fragmento GPEILDVPST del segmento CS-1 de la fibronectina se llegó a la secuencia mínima que retenía la actividad: ILDVP.

Los científicos de Biogen partieron del péptido N-(4-hidroxifenilacetil)-LDV y mediante modificación racional del residuo N-terminal llegaron a la molécula de la figura 15

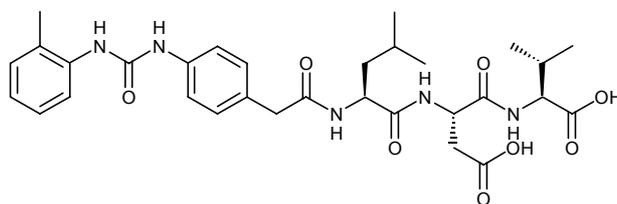


Figura 15

que supuso un incremento importante de la actividad de estos derivados.³¹ El decisivo papel de la subestructura MPUPA queda patente al ser adoptada por numerosas

³⁰ Hagmann, W. K., et. al.; *Bioorg. Med. Chem. Let.* 11, **2001**, 2709-13

³¹ Zimmerman, C.N.; *Exp. Opin. Ther. Patents*, **1999**,9 (2), 129-33

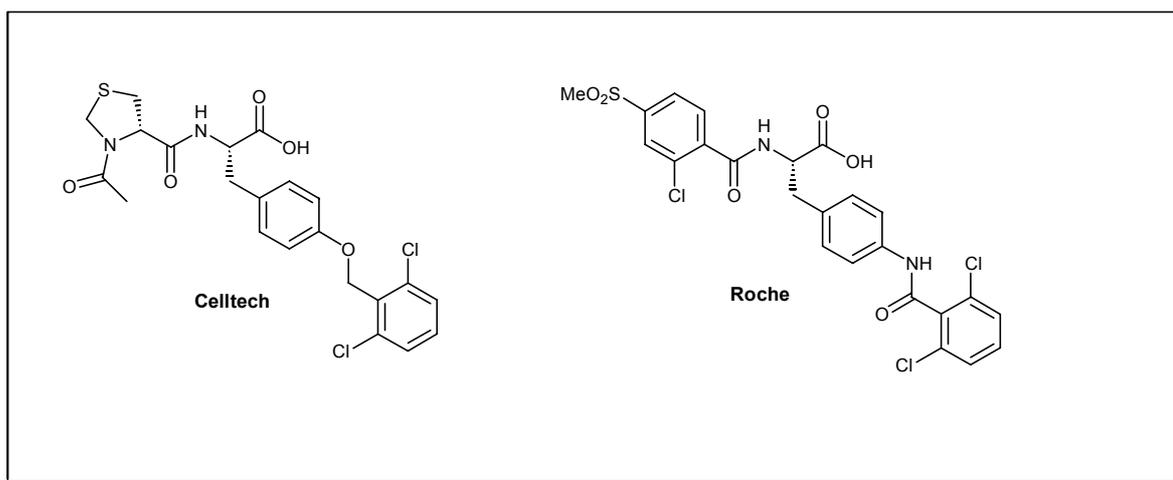


Figura 18

De dichos análisis conformacionales globales realizados con el campo de fuerzas Merck (SPARTAN[®])³⁴, se detectan tres familias de conformeros para cada una. Una de ellas orienta la cadena lipofílica a una zona sin solapamiento claro con ningún residuo del *CD-loop* o zona colindante, así que se centra la atención en los otros dos grupos de conformeros que son los que se muestran en la figura 19.

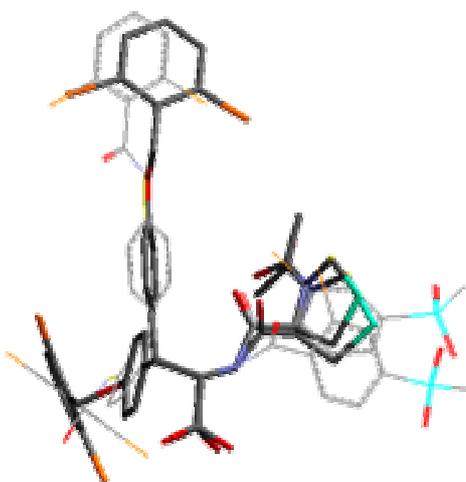


Figura 19

Concretamente, la primera familia de conformaciones (68,8 kcal/mol) del patrón Celltech comparada con el *CD-loop* se ve que solapa muy bien el ácido con el Asp₄₀, la tiazolidina con la cadena lateral de Ile₃₉ y el fenilo terminal con la Leu₇₀ (figura 20).

³⁴ PC Spartan Pro 1.0.5 (Wavefunction Inc.)

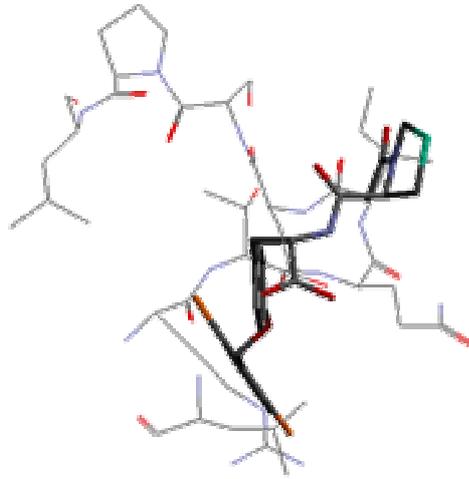


Figura 20

Por otro lado la segunda familia (73,8 kcal/mol) solapa muy bien el ácido con el Asp₄₀, la tiazolidina con la cadena lateral de Ile₃₉ y el fenilo terminal con la Pro₄₂.

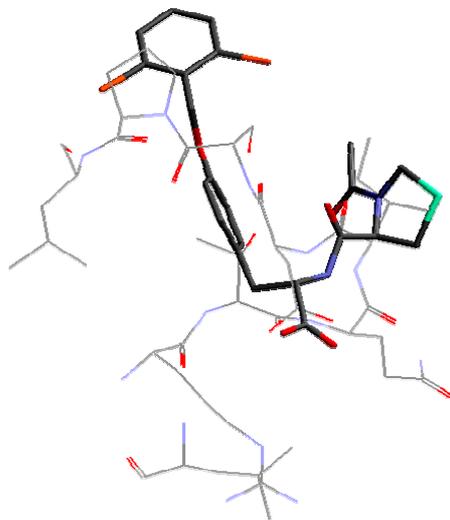


Figura 21

Así pues, no está clara cual es la zona lipofílica a la cual se pretende acceder. Sin embargo, la aparición de una patente de compuestos de Celltech con doble enlace (movimiento restringido) donde reivindican tanto los de conformación Z como E supone una aclaración del tema.

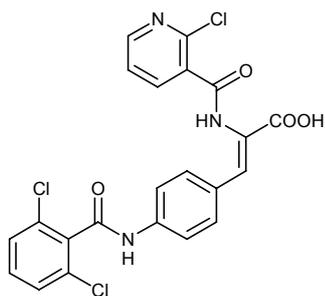


Figura 22

El análisis de estas estructuras revela que la familia de conformeros es mucho más restringida. En la figura 23, se muestra mínimo global (94,7 kcal/mol) del isómero Z y varios conformeros de hasta 5 kcal/mol por encima de éste.

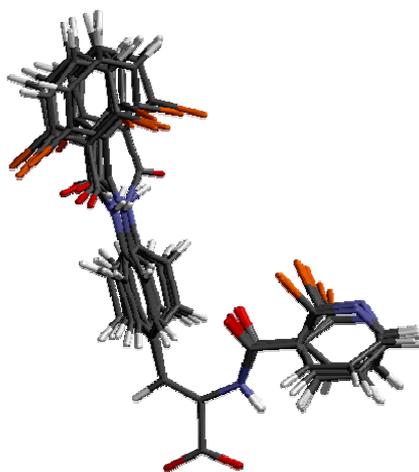
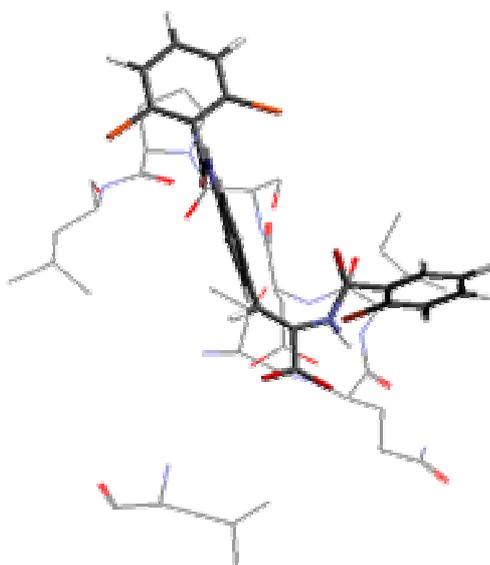


Figura 23

De dicho análisis se deduce que sólo los compuestos Z presentan una familia de conformeros que solapan adecuadamente con el *CD-loop* y sitúan el fenilo sobre la Pro_{42} .

Figura 24



Se observa que el grupo carbonilo del radical 2,6-diclorobenzoilo se sitúa en las proximidades del grupo carbonilo de la Pro₄₂ de igual manera que el grupo éter en el derivado de Celltech (figura 21)

Por lo tanto, una posible secuencia a mimetizar sería la Asp₄₀-Ile₃₉-Pro₄₂ del *CD-loop*

Si analizamos la estructura tridimensional del **TR-14035** solapado con el *CD-loop*

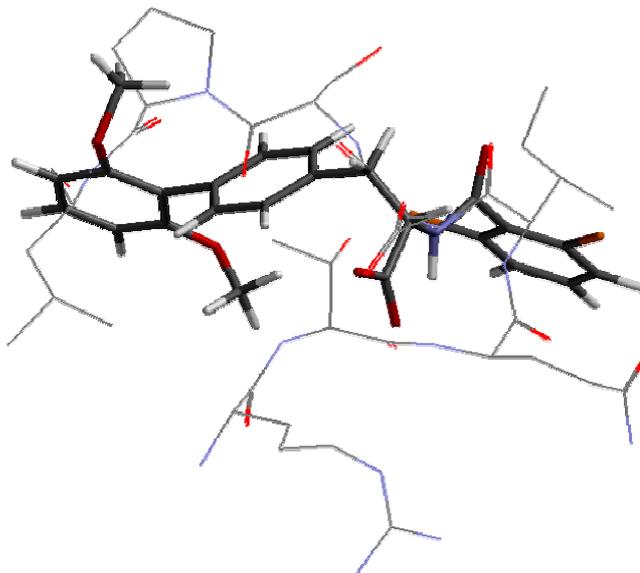


Figura 25

se ve que orienta un grupo –OMe del bifenido sobre la Pro₄₂, pudiendo alojar el Me- en la cavidad hidrofóbica que ocupa la prolina y el –O- ejercer de nuevo de aceptor de puente de hidrógeno como lo debe hacer el carbonilo del enlace amida (Pro₄₂-Ile₄₃) sobre el cual lo solapamos. Pensamos que la presencia de un grupo aceptor de puente de hidrógeno en esta región es clave y lo tendremos en cuenta en el diseño de nuestros derivados. Además, según este modelo, el fenilo central haría las funciones de un espaciador que orienta adecuadamente los grupos funcionales que intervienen en la unión.

El análisis de superposición (figura 26) entre el *CD-loop* y un conformero de mínima energía del compuesto de Merck de la figura 14 del apartado 2.2, situaría el bifenido igual que lo hace el **TR-14035**, y la cabeza (3,5-diclorobencenosulfonilprolina) de la molécula se solaparía a lo largo de lo que denominamos zona oeste del *CD-loop*. De esta manera, uno de los cloros de este fenilo podría ejercer de grupo hidrófobo imitando a la Ile₃₉, el carbonilo del enlace amida entre la prolina y la fenilalanina ejercería la función de aceptor de puente de hidrógeno como el carbonilo del *CD-loop* que une la Ile₃₉-Asp₄₀. Finalmente, el grupo –SO₂- también actuaría de aceptor de puente de hidrógeno igual que el enlace amida Ile₃₉-Gln₃₈.

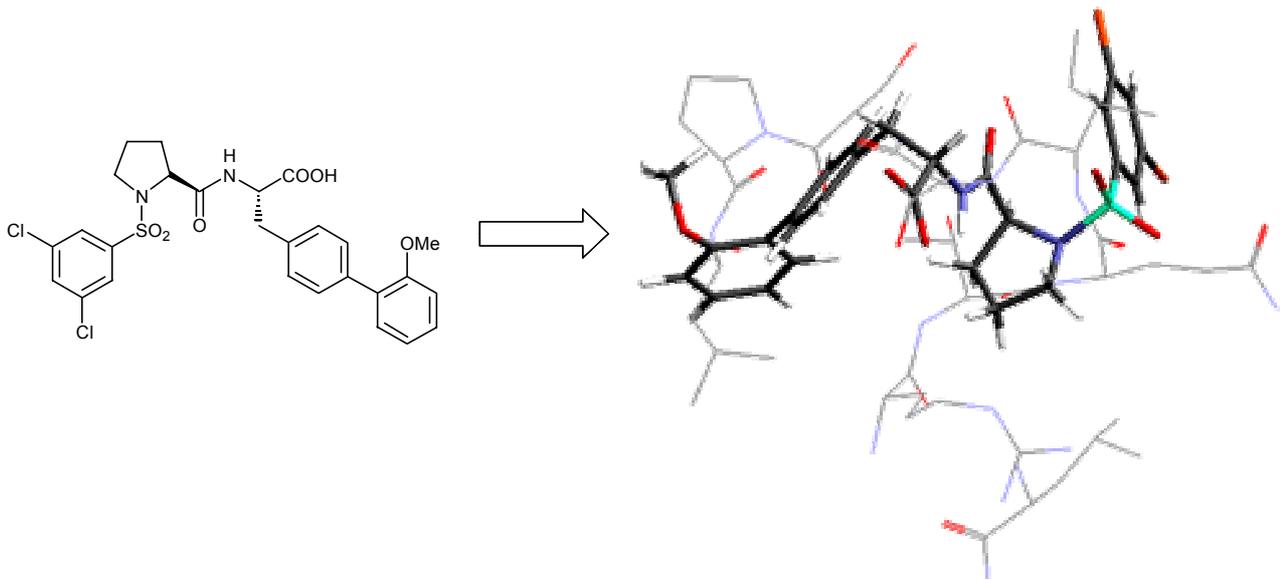


Figura 26

El mismo análisis conformacional se llevó a cabo con el compuesto de Biogen destacado en la patente WO 99/61421 (figura 27)

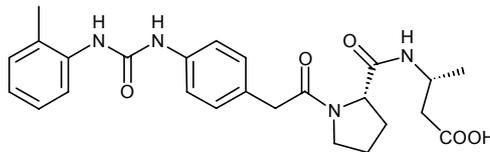


Figura 27

Se llega a la conclusión de que si solapa el ácido con el Asp₄₀ y el residuo del aminoácido central con la Ile₃₉, igual que en los patrones anteriores, entonces el resto de la cadena que lleva el MPUPA no puede dirigirse hacia la Pro₄₂, sino en sentido contrario hacia la Leu₇₀. Con el solapamiento que se muestra en la figura 28, la urea del MPUPA estaría mimetizando la Arg₃₆ (que habíamos mencionado como importante por mutagénesis) y el anillo aromático terminal del MPUPA a la Thr₇₂.

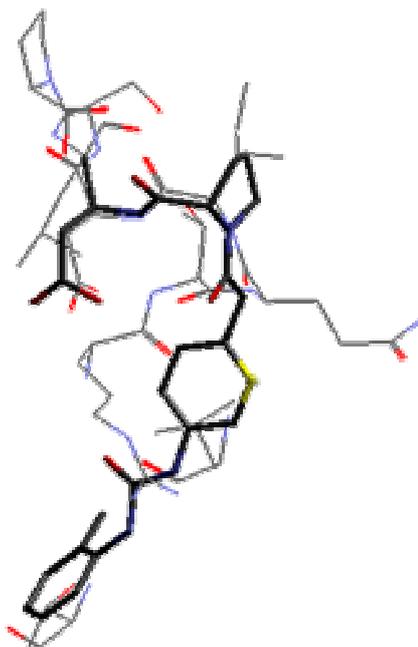


Figura 28

Por lo tanto, nuestra conclusión es que las familias de compuestos que contienen el radical MPUPA y las N-acilfenilalaninas constituyen grupos homogéneos entre sí y químicamente diferenciados, probablemente porque están uniéndose a regiones vecinas pero diferentes de la VLA-4.

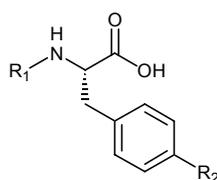
3. OBJETIVOS: DISEÑO Y SINTESIS DE NUEVAS ESTRUCTURAS

Durante los últimos años, el Área de I+D de Laboratorios J. Uriach & Cía S.A. sigue atentamente la evolución de las nuevas dianas terapéuticas que se relacionan con los procesos inflamatorios. En este campo, la integrina VLA-4 es sin duda una de las dianas más novedosas y atractivas dado su potencial terapéutico en enfermedades inflamatorias crónicas.

Estos hechos sumados a nuestra experiencia anterior en el campo de las integrinas, nos animó a iniciar una línea de Investigación en el campo de los antagonistas de la VLA-4. Se decidió diseñar y preparar compuestos teniendo en cuenta las dos aproximaciones comentadas con el fin de obtener un primer líder antagonista de la VLA-4, por un lado moléculas peptidomiméticas de la secuencia LDV y por otro lado derivados tipo N-acilfenilalanina.

Nos marcamos como objetivo de esta tesis doctoral el desarrollo de nuevos compuestos que actúen como potentes antagonistas de la VLA-4. Tomando como referencia los derivados de la fenilalanina más activos de las otras compañías nos proponemos sintetizar un grupo de moléculas con una actividad *in vitro* similar a la de estos patrones y con una diversidad estructural tal que permita un posterior estudio atendiendo a sus propiedades farmacocinéticas, que junto la alta unión a proteínas, es uno de los principales inconveniente de dichos compuestos de referencia.

Si analizamos los compuestos N-acilfenilalanínicos, de estructura general



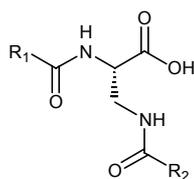
lo primero que nos llamó la atención es la función del fenilo central de la fenilalanina, y queríamos saber si interaccionaba con alguna región hidrofóbica de la $\alpha_4\beta_1$, o meramente tenía una función de elemento de rigidez capaz de alojar correctamente el radical R_2 , tal y como parece indicar nuestro modelo de interacción creado mediante *molecular modelling*.

De esta forma decidimos aportar nuevas estructuras cambiando el anillo aromático central por otros espaciadores, suponiendo de esta forma que no hay coordinación entre éste y la VLA-4. De la supresión de este anillo aromático,

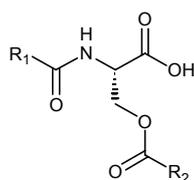
esperamos reducir la unión a proteínas que era también uno de los objetivos marcados al inicio de este trabajo.

Como resultado de un primer *screening* sobre un grupo inicial de compuestos llevado a cabo en la compañía, se identificaron unos *hits* o compuestos de actividad incipiente cuyos núcleos centrales se clasificaron en los siguientes tipos de estructuras:

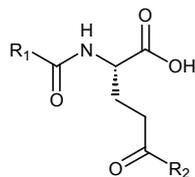
1. Derivados del ácido 2,3-diaminopropiónico (DAP)



2. Derivados de la serina (Ser)



3. Derivados del ácido glutámico (Glu)



En los tres grupos de moléculas, la distancia entre R_2 y el resto de funcionalidades de la molécula son prácticamente iguales.

Como ya cambiábamos el anillo central de la fenilalanina, la naturaleza del sustituyente R_1 decidimos dejarla fija en esta primera aproximación a nuevas moléculas. De entre los diferentes trabajos sobre moléculas derivadas de la fenilalanina analizados, elegimos como N-sustituyente las prolinas (N-sulfonil)-arilsustituidas, desarrolladas por Merck y las compañías con las cuales tiene pactos de colaboración, debido a que son las que presentan una mayor versatilidad y robustez en cuanto a conservación de la actividad. Es por ello que como R_1 tomaremos:

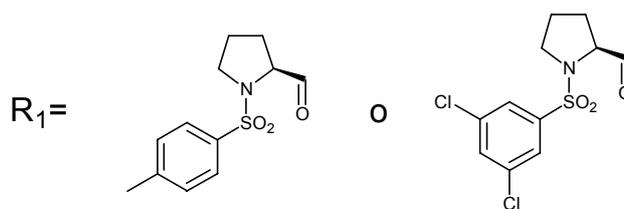


Figura 29

La tercera zona que nos queda por definir es el sustituyente R_2 . Para ello se opta por probar una serie de aminas cíclicas diferentemente sustituidas, generando las consiguientes ureas, carbamatos y amidas.

De la síntesis de derivados de este tipo de compuestos y su evaluación farmacológica, se obtuvieron varios líderes, lo cual confirmaba que nuestra suposición era válida y el fenilo central podría ser solamente un espaciador, que podía ser sustituido por otros elementos de rigidez. El resultado de este proceso de búsqueda de un líder, sirvió de base para este segundo capítulo de la presente tesis doctoral, donde se reporta la síntesis de una serie de compuestos que incorporan una piperidina o piperazina 4-sustituida como elemento R_2 . La estructura general que se propuso explorar en el presente trabajo era la representada en la figura 30:

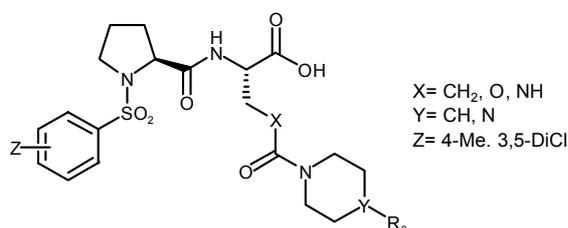


Figura 30

A la hora de determinar la naturaleza de R_3 y basándonos en el estudio realizado mediante *molecular modelling* (apartado 2), decidimos introducir un grupo metileno diferentemente sustituido, lo cual pensamos que otorgaría una libertad de rotación en esta zona de la molécula necesaria para su interacción con el receptor. De esta forma la fórmula general anterior quedará más restringida:

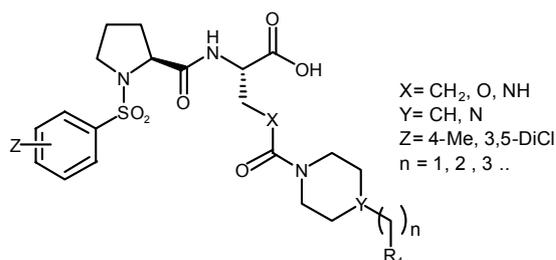


Figura 31

Estas nuevas estructuras presentan un nuevo espaciador, N-carbonilpiperidina o piperazina, que sustituye al anillo aromático de la Phe de los patrones y que aloja el sustituyente R_4 en un espacio determinado. Para definir el grupo R_4 volvemos a nuestro estudio de modelado molecular y nos fijamos en las características estructurales que presentan los sustituyentes en posición 4 de la Phe de la serie de patrones analizados. De este análisis se deducen que se requieren heteroátomos más o menos electronegativos capaces de actuar como aceptores de puentes de hidrógeno y un radical hidrofóbico.

A parte de estas funciones que podrían participar en la interacción con el receptor, podrían haber otras que quedaran orientadas hacia el solvente y cuya misión sería modular las propiedades fisicoquímicas globales.

En primer lugar se pensó en preparar derivados cíclicos saturados de la 4-aminometilpiperidina, dado que la rigidez proporcionada por el anillo puede fijar la posición del aceptor de puente de hidrógeno (carbonilo) y en caso de ser la disposición adecuada la actividad se vería incrementada (figura 32)

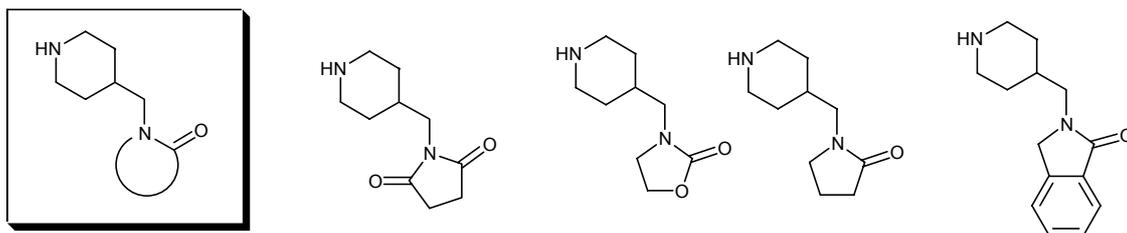


Figura 32

De igual modo que al fijar la posición de los grupos aceptores de puente de hidrógeno e hidrofóbicos podemos aumentar la actividad, también es cierto que podemos obtener el efecto contrario si esta no es la disposición adecuada. Por este motivo se decidió preparar derivados acilados lineales con una gran capacidad de rotación, dando más opción a colocar adecuadamente las funcionalidades que puedan intervenir en la unión:

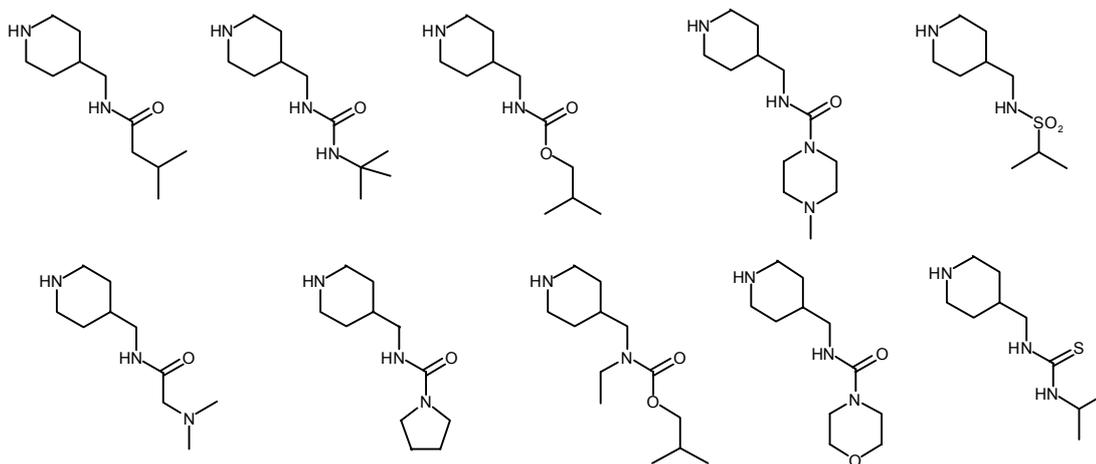
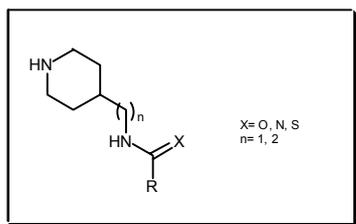


Figura 33

A continuación propusimos derivados análogos pero sin el carbonilo con el propósito de utilizar el átomo de nitrógeno como aceptor de puente de hidrógeno, por lo que se prepararon las aminas siguientes:

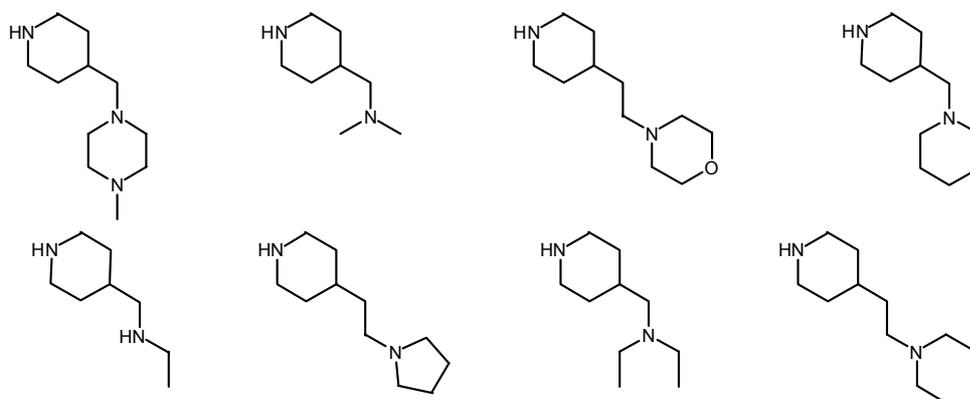
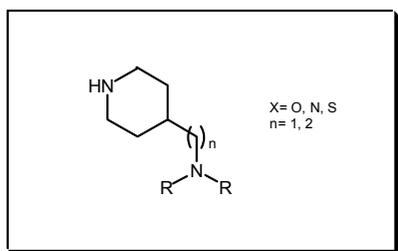


Figura 34

Dentro de las acilfenilalaninas estudiadas vimos que muchas de ellas presentan un carbamato como sustituyente en la posición 4 más o menos alejada del anillo aromático. Es por esto que decidimos incorporar una serie de carbamatos a nuestros compuestos. Se pensó en preparar tanto carbamatos cíclicos como lineales. Se prepusieron los siguientes:

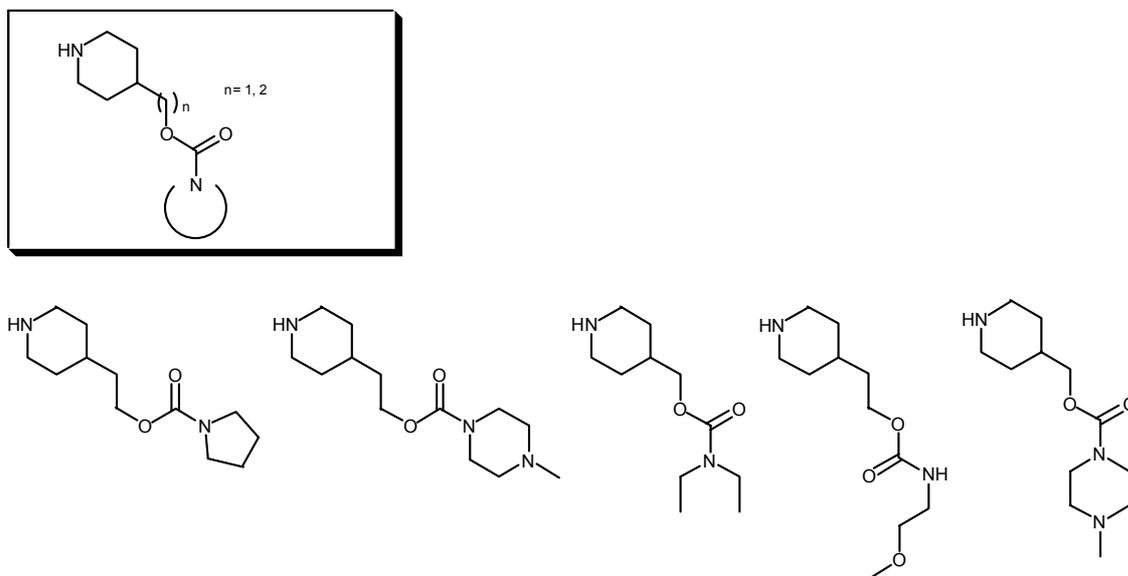


Figura 35

También preparamos nuevas alquilpiperidinas con heterociclos aromáticos nitrogenados que pudieran realizar esta función de aceptor de puente de hidrógeno

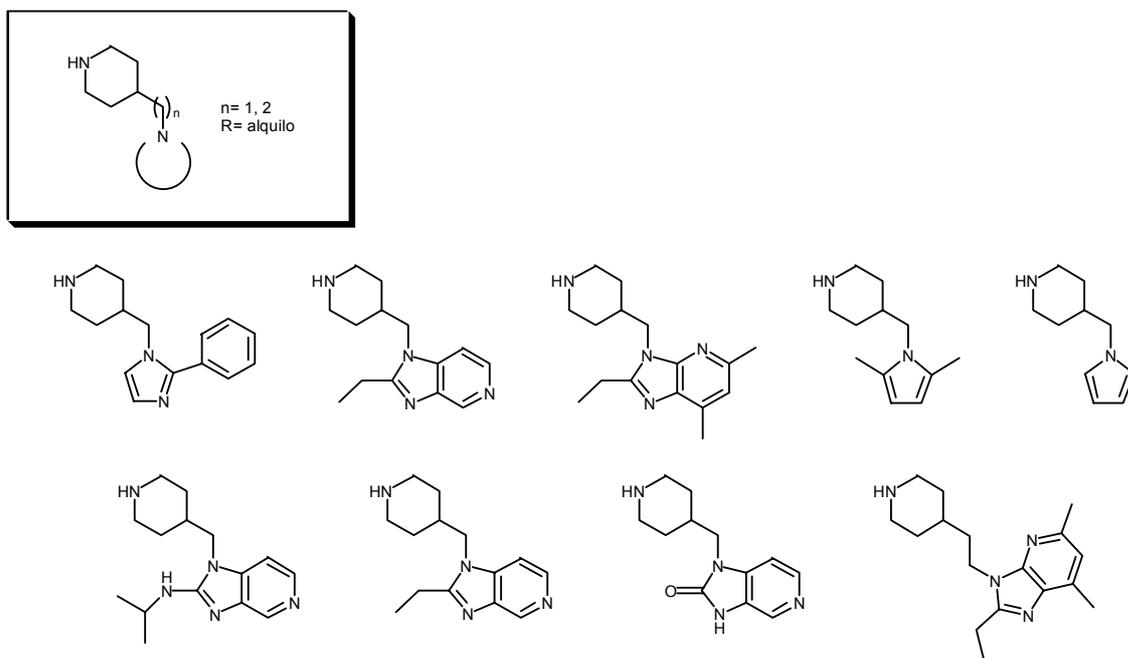


Figura 36

Dentro de esta misma idea se diseñaron compuestos donde el heterociclo fuera una piridina

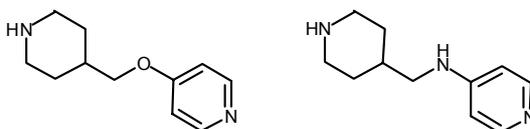


Figura 37

Y finalmente preparamos algunas piperazinas 4-sustituidas para ver la influencia de este segundo nitrógeno en el núcleo central,

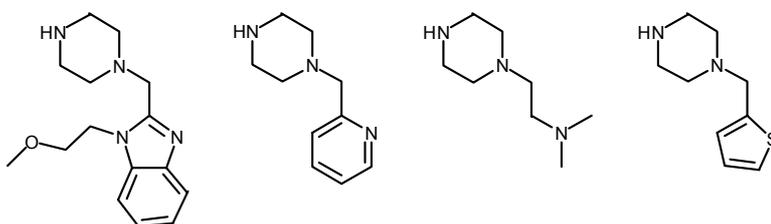


Figura 38

Con la finalidad de asegurar la patentabilidad de nuestros nuevos compuestos, se realizó un estudio de las patentes solicitadas por las diferentes compañías involucradas en este tipo de compuestos. De igual manera que nos había pasado en otras líneas de investigación sobre integrinas, la mayoría de patentes en esta línea presentan fórmulas generales muy amplias aunque sólo se ejemplifican subestructuras concretas. Por este motivo existen muchas patentes que solapan sus reivindicaciones en fórmulas generales si bien sus compuestos ejemplificados son muy diferentes. El resultado de nuestro exhaustivo estudio nos confirmó que habíamos diseñado compuestos patentables.

4. SÍNTESIS

Las moléculas diseñadas, basándose en los resultados del cribado o *screening* sobre un grupo inicial de compuestos y en el estudio por *molecular modeling* o modelado molecular del ligando natural y de los compuestos más activos de otras compañías, son derivados de tres aminoácidos: de la serina, del ácido (S)-2,3-diaminopropiónico y del ácido glutámico. Para su síntesis se realizó un análisis retrosintético de las posibles vías de preparación, y se evaluó la viabilidad de cada una de ellas.

La valoración de las diferentes vías de síntesis la hacemos teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- menor número de pasos sintéticos
- síntesis convergentes antes que lineales
- reacciones mejor referenciadas y descritas con mejores rendimientos
- coste de los reactivos
- reacciones de rendimiento más bajo, si es posible, al inicio de la ruta

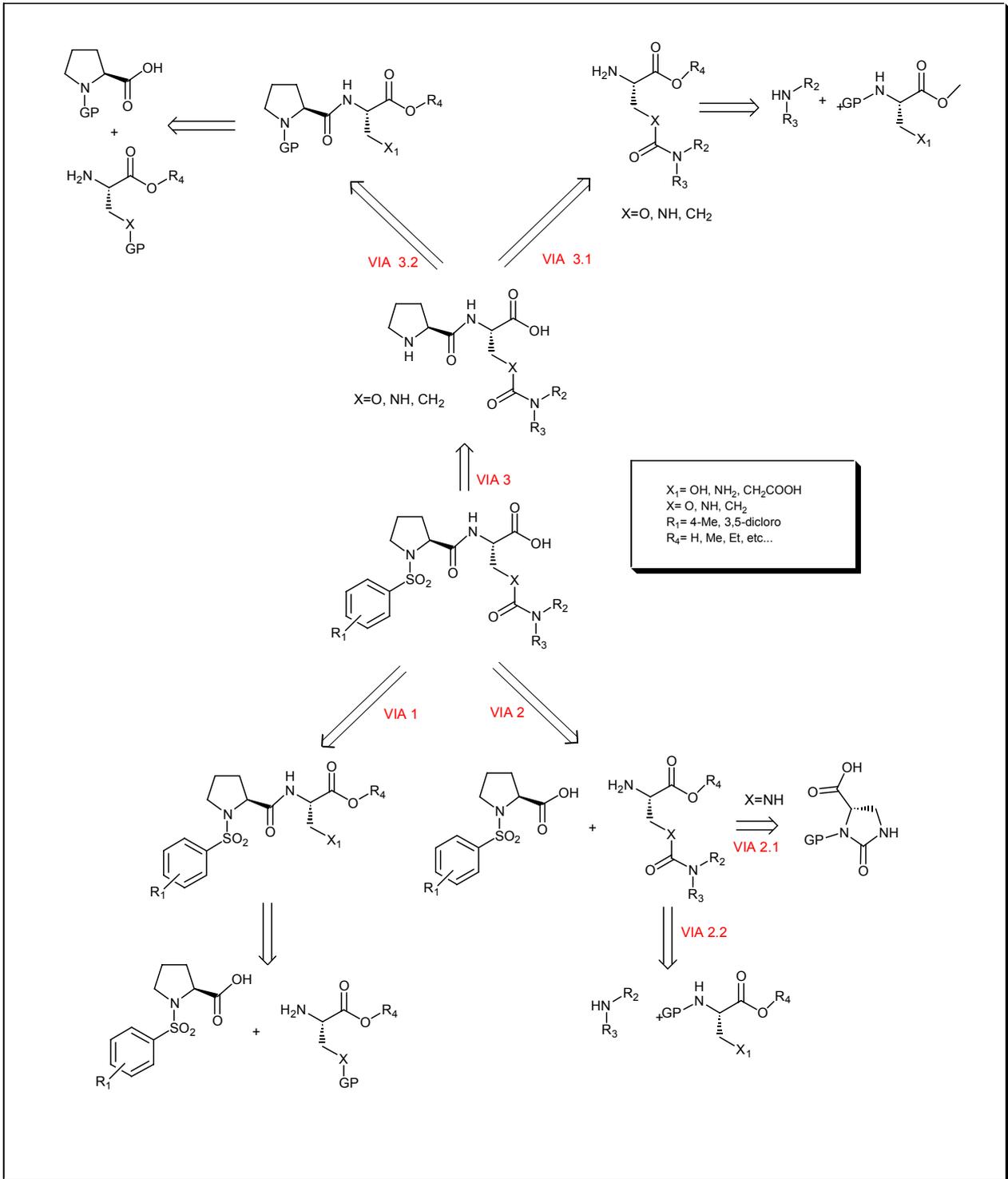
Dada la naturaleza peptídica de estos compuestos las desconexiones más razonables son las que se exponen en el esquema 3 de la página siguiente.

Como la variedad estructural que introducimos en cada uno de los tres tipos de moléculas que nos proponemos sintetizar, reside en las aminas $-N(R_2R_3)$, pensamos que lo más conveniente resultaría preparar una parte común de la molécula lo más elaborada posible, e introducir la diversidad en los pasos finales de la síntesis.

El inconveniente que presentan tanto la vía 2 como la vía 3 de síntesis, es la introducción en los pasos finales de sintones comunes a todas las moléculas. Además si se sigue la vía 3, el paso final de la síntesis es la sufonilación de una amina, lo cual supone que deberíamos proteger/desproteger las posibles aminas presentes en los radicales R2 y R3, deberíamos llevar la prolina protegida durante todos los pasos, con lo que aumentamos los pasos de síntesis.

La vía 2 presenta además del inconveniente de llevar a cabo una reacción similar en el paso final, el inconveniente de tratarse de la formación de una amida con un ácido α,α -disustituido (lo cual requiere condiciones especiales para obtener un rendimiento aceptable) como paso previo al final.

Esquema 3



Debido a estos razonamientos, la ruta más viable *a priori* era la vía 1. Se trata de una síntesis convergente donde se prepara un intermedio común (que se puede preparar en gran cantidad) formado por una N-arilsulfonilprolina y el aminoácido central. Paralelamente se preparan las diferentes aminoras que habíamos diseñado y se acoplan a este intermedio generando los consiguientes carbamatos, amidas o ureas deseados. Finalmente se hidroliza el ácido si este estuviese en forma de éster.

No obstante, también valoramos la vía 2, ya que puede presentar ventajas como ya veremos en el caso de derivados de la serina en la formación del grupo carbamato.

4.1 SÍNTESIS DE LAS AMINAS NHR_2R_3 .

En primer lugar empezamos preparando las aminas propuestas en el apartado de diseño, siguiendo metodologías descritas en la literatura. Algunas de ellas estaban disponibles en nuestro laboratorio, como por ejemplo el compuesto **1** que ya habíamos utilizado anteriormente¹ durante el desarrollo del Máster en Química Experimental, y las aminas **2** y **3**, que habían sido utilizadas en otras líneas de investigación de Uriach

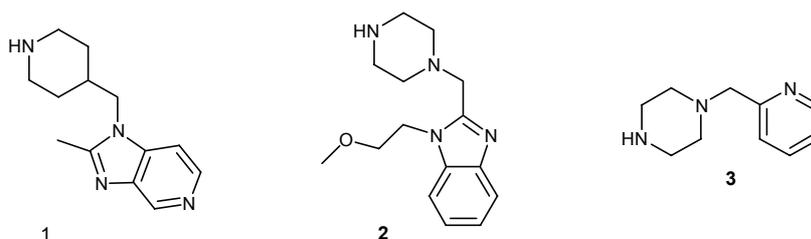
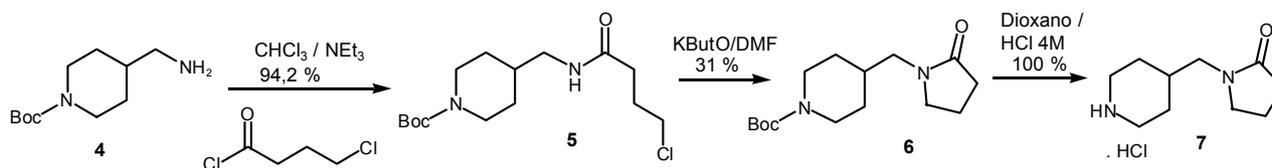


Figura 39

4.1.1 Síntesis del hidrocloreto de 4-(2-oxopirrolidin-1-ilmetil)piperidina (**7**) y del hidrocloreto de 4-[(2-oxazolidin-3-il)metil]piperidina (**10**).

Para la síntesis de las aminas **7** y **10** se partió de la 1-*tert*-butoxicarbonil-4-(aminometil)piperidina (**4**). Este intermedio se funcionalizó para obtener la amida **5** y el carbamato **8** con el cloruro del ácido 4-clorobutanoico y con el cloroformiato de 2-cloroetilo respectivamente. A continuación, **5** se cicló a la pirrolidinona **6** mediante una alquilación intramolecular con KBut^tO en DMF ² con un rendimiento modesto (31 %) y **8** a la oxoazolidinona **10** con NaH en DMF , siguiendo una metódica descrita por V. Gotor.³ El paso final se repitió en la obtención de la mayoría de las piperidinas y piperazinas que preparamos. Se trata de la desprotección de la amina secundaria del heterociclo que está en forma de carbamato *tert*-butílico (Boc) mediante un tratamiento con una solución de $\text{HCl}_{(\text{gas})}$ en dioxano 4N, que nos proporciona dichas aminas directamente como hidroclouros.

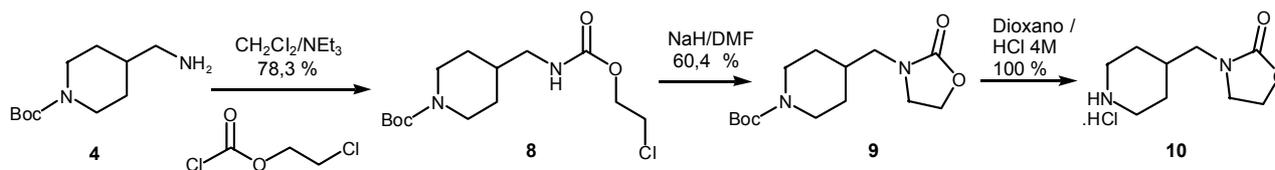


Esquema 4

¹ Carceller, E., Merlos, M., Giral M., Balsa, D., García-Rafanell, J., Forn, J.; *J. Med. Chem.* **39**, **1996**, 487-93

² Rusedill, J.T.; *J. Org. Chem.* **36**, **21**, **1971**, 3071-76

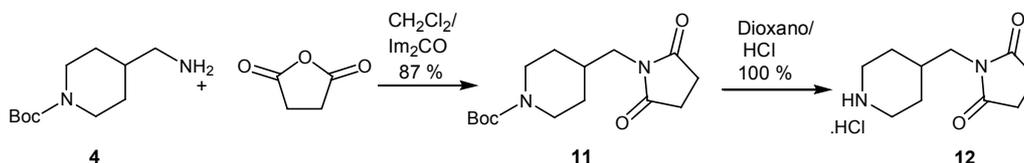
³ Sánchez, V.M., Rebolledo, F., Gotor, V.; *J. Org. Chem.* **64**, **5**, **1999**, 1464-70



Esquema 5

4.1.2 Síntesis del hidrocloreto de 4-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)metil]piperidina (12)

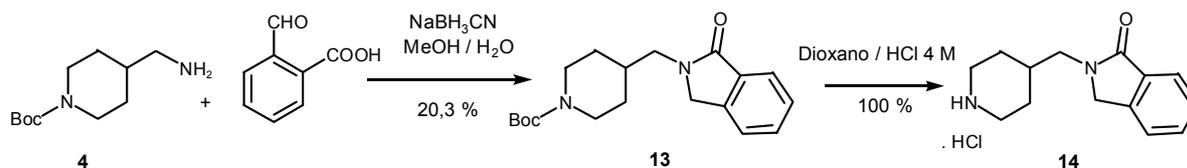
A partir del compuesto **4** se preparó la diimida **11** por reacción con el anhídrido succínico y dos equivalentes de N,N'-carbonildiimidazol (CDI), indicando que la reacción se desarrolla en dos etapas de acilación, tal y como describen los investigadores de Roche⁴ en la preparación de una serie de antagonistas de la VLA-4. La desprotección de **11** nos lleva al compuesto deseado **12**.



Esquema 6

4.1.3 Síntesis del hidrocloreto de 2-(4-piperidilmetil)isoindolin-1-ona (14)

Una de las vías descritas en la literatura para la síntesis de las isoindolin-1-onas N-sustituidas es mediante la condensación "one-pot" de un 2-formilbenzoato de alquilo y una amina primaria mediante una aminación reductiva y posterior formación de la amida a partir del éster (como forma activada del ácido) y de la amina creada.^{38,5} Nuestro grupo de investigación había incorporado a esta metódica el uso del ácido 2-formilbenzoico, en lugar de su éster, como producto de partida. El *driving-force* o fuerza motriz de esta reacción es la formación de una amida intramolecular, dando un anillo de tamaño 5, aunque el ácido no esté activado. Siguiendo pues, las condiciones experimentales descritas por nuestro equipo se preparó el compuesto **14**



Esquema 7

⁴ Tilley, J.W., Kaplan, G., Rowan, K., Schwinge, V., Wolitzky, B.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, **2001**, 1-4

⁵ Ocain, D.T. et al.; *J. Med. Chem.* **35**, **1992**, 823-832

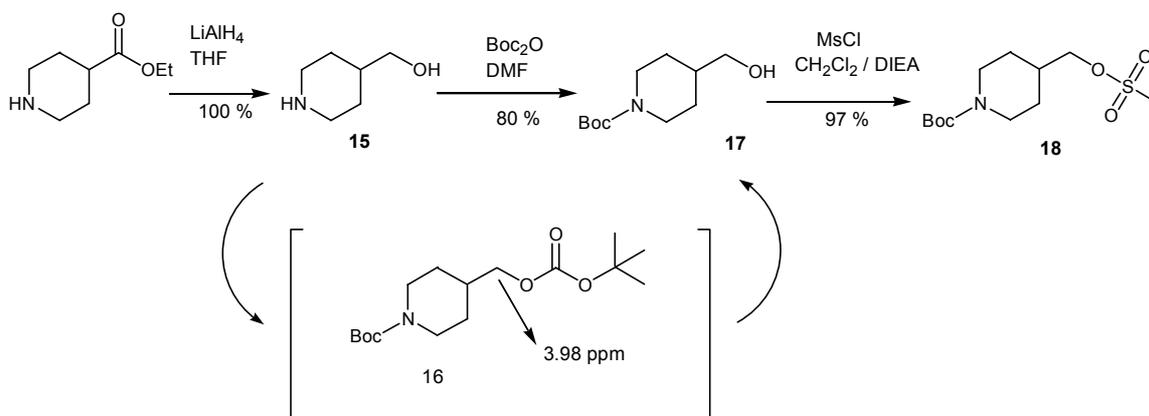
4.1.4 Síntesis del trihidrocloruro de 1-metil-4-[(4-piperidil)metil]piperazina (27), del dihidrocloruro de *N*-[2-(4-piperidil)etil]morfolina (28), del dihidrocloruro de 4-(dimetilaminometil)piperidina (29), del dihidrocloruro de 4-[2-(1-pirrolidinil)etil]piperidina (30), del dihidrocloruro de 4-(1-piperidilmetil)-piperidina (31), del dihidrocloruro de 4-(2-dietilaminoetil)piperidina (32), del trihidrocloruro de 1-[2-(dimetilamino)etil]piperazina (35) y del dihidrocloruro de 4-(dietilaminometil)piperidina (37).

Las aminas terciarias diseñadas se prepararon bien por alquilación de la amina secundaria simétrica o bien mediante aminación reductiva. Como agente alquilante se opta por preparar mesilatos.

4.1.4.1 Síntesis de las aminas terciarias vía alquilación

4.1.4.1.1 Síntesis del mesilato de (1-*tert*-butoxicarbonilpiperidin-4-il)metilo (18)

Partiendo del isonipecotato de etilo, se redujo a alcohol **15** con LiAlH_4 en condiciones estándar. Hay que destacar la importancia del tratamiento en esta reacción. En primer lugar, la interrupción de la reacción se llevó a cabo mediante la adición gota a gota de 150 mL/mol de una solución de $\text{H}_2\text{O}:\text{THF}$ (1:2), y a continuación una solución de NaOH 1N en una relación molar 1:3 respecto al éster. De esta forma precipitaron las sales de aluminio y litio que fueron filtradas sin que se formase una emulsión difícil de separar. La solución se concentró y se obtuvo un crudo que se usó directamente sin purificar en el paso siguiente.



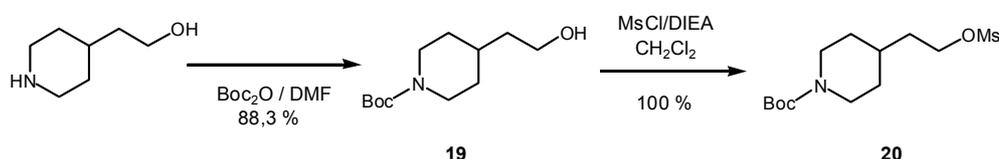
Esquema 8

El alcohol **15** se protegió con Boc_2O en DMF. La reacción se controló a las 18 h mediante CCF y se observaron al menos tres productos. Por otro lado, el espectro de

^1H -RMN del crudo presentaba una señal a 3.98 ppm que correspondía al $-\text{CH}_2-$ en α al oxígeno. Este desplazamiento corresponde al carbonato **16**, producto mayoritario de la reacción. Por este motivo se agitó la solución en NaOH 1N/MeOH/THF durante dos días y se obtuvo el compuesto deseado con un rendimiento del 80 %. Finalmente el alcohol **17** se mesiló con cloruro de metanosulfonilo en CH_2Cl_2 con un rendimiento del 97 %.

4.1.4.1.2 Síntesis del mesilato de 2-(1-*tert*-butoxicarbonilpiperidin-4-il)etilo (**20**)

Siguiendo una metódica similar a la anterior preparamos el mesilato **20** a partir del (4-piperidin)etanol (comercial). Si bien en este caso la protección de la amina transcurrió sin la formación del carbonato intermedio.



4.1.4.1.3 Preparación de las aminas

La alquilación de aminas secundarias mediante mesilatos es una reacción ampliamente descrita con una gran variedad de condiciones experimentales. Siguiendo las condiciones usadas por Kajino⁶ *et. al.* se intentó alquilar paralelamente la morfolina y la N-metilpiperazina en presencia de NEt_3 y el mesilato **18**. En ambos casos se recuperaron los productos de partida.

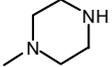
Entonces decidimos usar condiciones más enérgicas y generamos el anión en NaH/THF siguiendo la cita de Firestone⁷ *et. al.*, pero volvimos a recuperar los productos de partida.

Cuando cambiamos el disolvente y usamos NMP/ NEt_3 la N-metilpiperazina se alquiló después de dos días a 85 °C con un rendimiento del 62 %, si bien la morfolina siguió sin reaccionar.

⁶ Kajino, M., Shibouta, Y., Nishikawa, K., Meguro, K.; *Chem. Pharm. Bull* (11), 39, **1991**, 2896-2905

⁷ a) Firestone, R. A.; Pisano, J. M., Falck, J.R., McPhaul, M. M., Krieger, M.; *J. Med. Chem.* 27, **1984**, 10 37-43. b) Tahri, A., Buysens, K.J., Eycken, E.V., Hoornaert, G.J., Vandenberghe, D.M.; *Tetrahedron* 54, 43, **1998**, 13211-2

Tabla 1.2 Alquilación aminas secundarias

Mesilato	Amina	Rdto. (%)	Comp. Boc	Comp. HCl
18		69,7	23	29
18		81,1	21	27
20		77	24	30
18		100	25	31
20		85	26	32

Las desprotecciones de todas estas aminas en dioxano/HCl 4M condujeron a los correspondientes hidroclouros con un rendimiento cuantitativo.

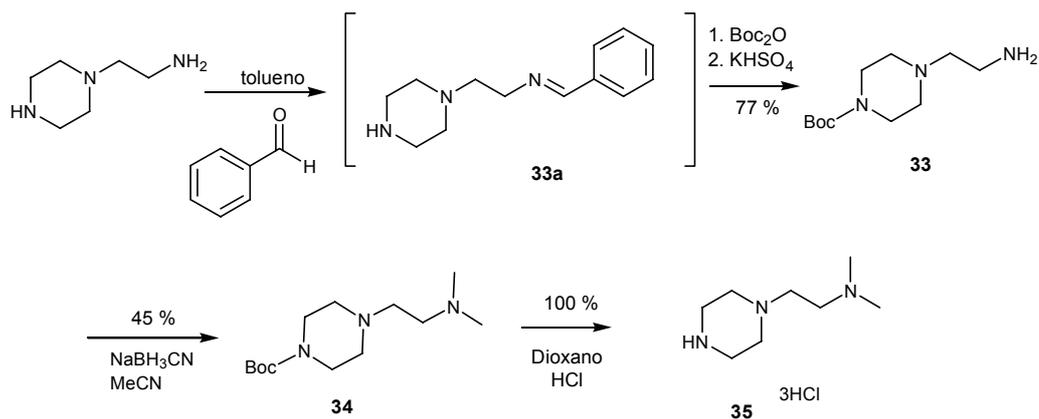
4.1.4.2 Síntesis de las aminas secundarias vía aminación reductiva.

Alternativamente, el compuesto **23** se preparó a partir de la 1-*tert*-butoxicarbonil-4-(aminometil)piperidina (**4**), mediante aminación reductiva con paraformaldehído y NaBH₃CN siguiendo las condiciones descritas por Borch¹⁰ para la metilación de aminas primarias y secundarias.

Si bien el rendimiento (9 %) fue inferior al referenciado en la literatura y al obtenido vía alquilación de la dimetilamina, el resultado resultó interesante para obtener el intermedio **34**.

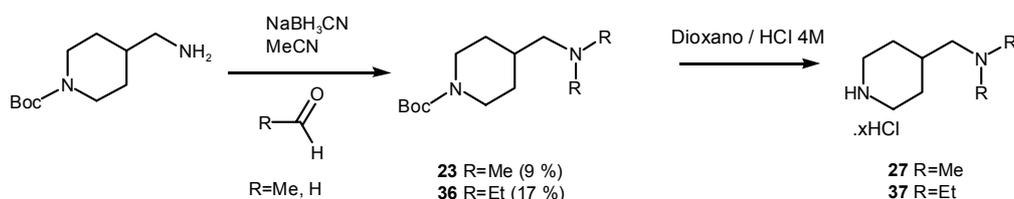
Para la preparación de la amina **34** partimos de la 1-(2-aminoetil)piperazina. Con el fin de proteger la amina secundaria con Boc₂O preparamos la imina **33a** con benzaldehído de forma que se bloqueó regioselectivamente la primaria de dicho compuesto. A continuación se obtuvo el carbamato **33** usando condiciones estándares. Este intermedio se sometió a la mencionada aminoreducción con paraformaldehído y NaBH₃CN con un rendimiento del 45 %. La amina **35** se obtuvo en forma de hidrocloruro igual que el resto.

¹⁰ Borch, R.F., Hassid, A. I.; *J. Org. Chem.* 37,10, **1972**, 1673-74



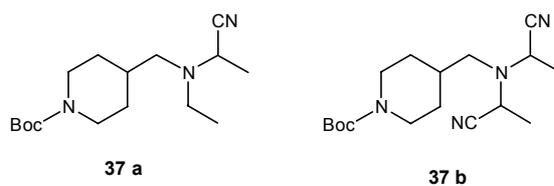
Esquema 11

De forma similar al compuesto **35** se preparó el **37** pero utilizando acetaldehído en lugar de paraformaldehído, y se obtuvo un rendimiento del 17 %.



Esquema 12

Dado los bajos rendimientos de estas aminoreducciones, investigamos los subproductos formados y vimos que la reacción secundaria más importante era la adición de CN^- sobre la imina dando lugar a los subproductos **37 a** y **37 b**

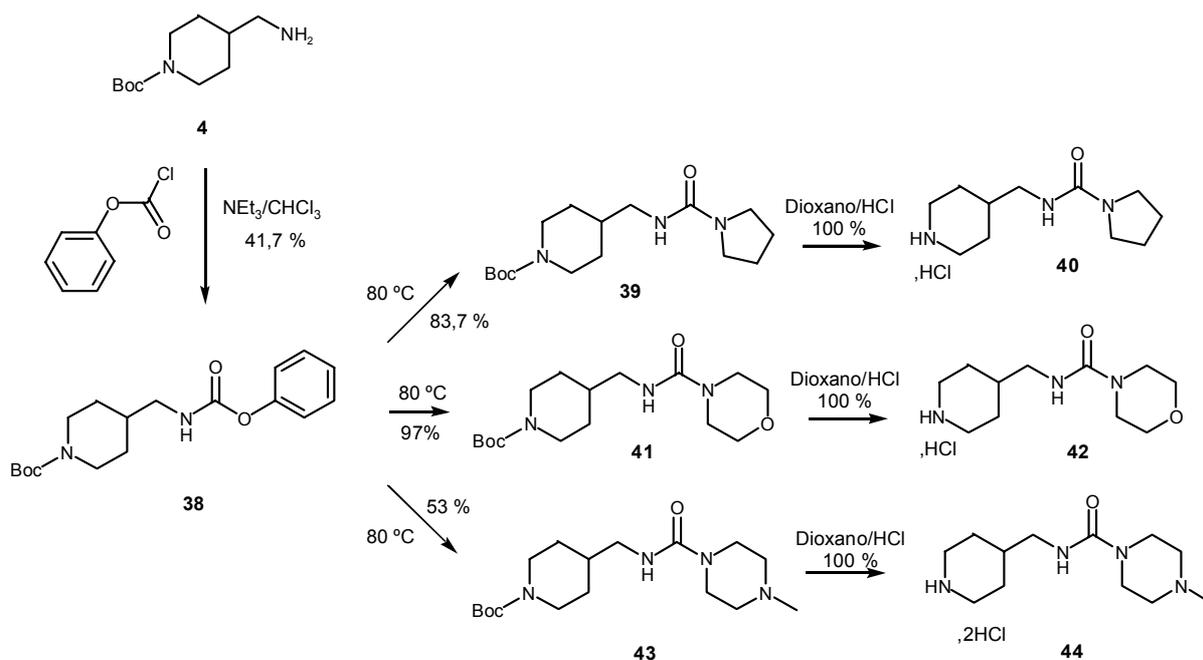


Esquema 13

4.1.5 Preparación de las ureas: síntesis de hidroclicuro de 4-(1-pirrolidinilcarbonilaminometil)piperidina (**40**), del hidroclicuro de 4-(4-morfolinilcarbonilaminometil)piperidina (**42**), y del dihidroclicuro de 4-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonilaminometil]piperidina (**44**).

Las piperidinas que habían de contener la función 4-metilureido, se prepararon vía la formación del carbamato de fenilo **38** intermedio, preparado a partir de la amina **4** y

cloroformiato de fenilo siguiendo una metódica ampliamente descrita¹¹ si bien el rendimiento no fue muy elevado (41,7 %). A continuación usando la amina secundaria (líquida en todos los casos) como reactivo y como disolvente se desplazaba nucleofílicamente el fenol para conseguir la urea correspondiente con excelentes rendimientos. La obtención de las aminas pretendidas se llevó a cabo como siempre mediante la desprotección final en dioxano/HCl_(g).



4.1.6 Síntesis del hidrocloreto de 4-[(isobutanoilamino)metil]piperidina (50), del hidrocloreto de *N*-*tert*-butil-*N'*-(4-piperidilmetil)urea (51), del hidrocloreto de (4-piperidilmetil)carbamato de isobutilo (52), del hidrocloreto de *N*-(4-piperidilmetil)isopropansulfonamida (53), y del hidrocloreto de *N*-isopropil-*N'*-(4-piperidilmetil)tiourea (54)

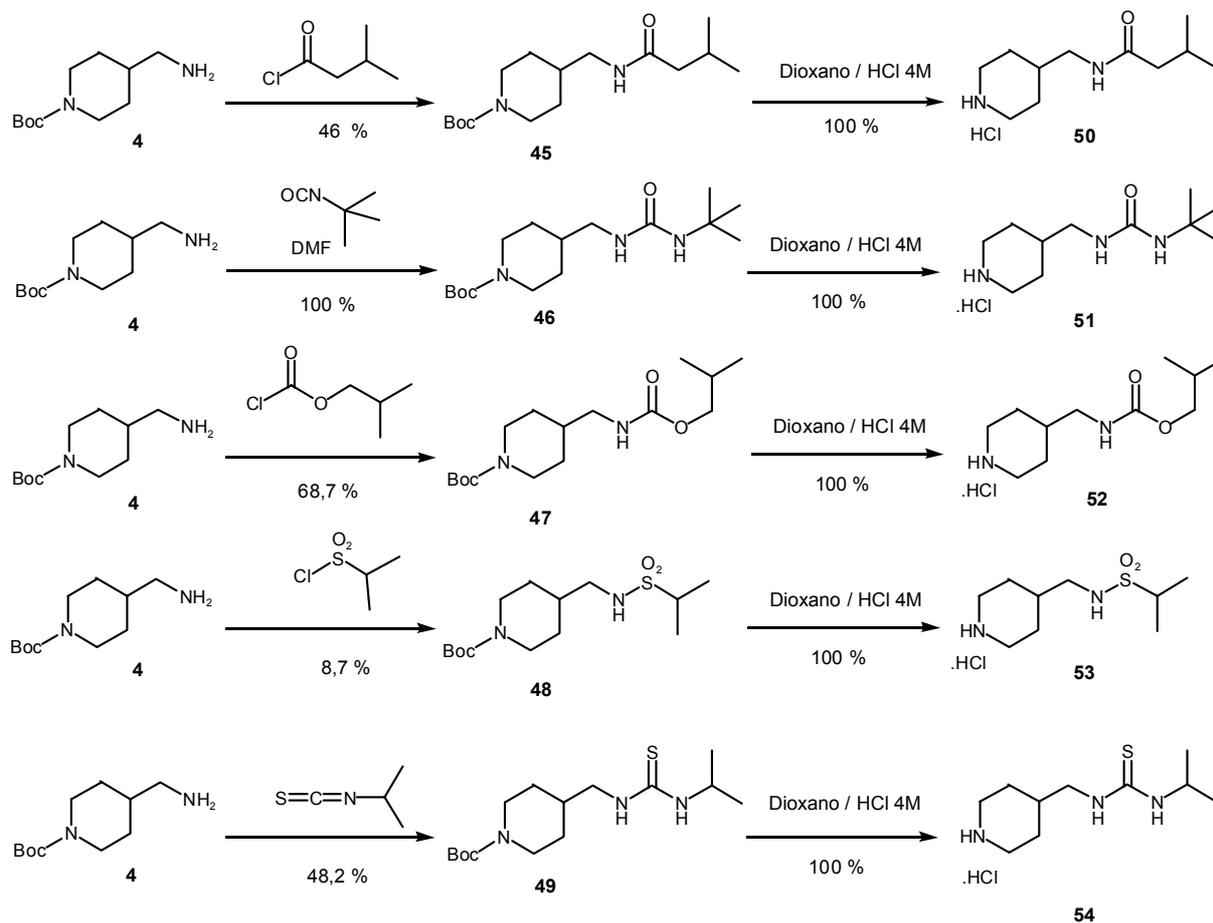
Mediante acilación del compuesto **4** con el correspondiente agente acilante y posterior desprotección en dioxano/HCl se obtuvieron los compuestos del enunciado.

Llama la atención el bajo rendimiento que tuvimos en la obtención de la sulfonamida **48**. Dado que era una reacción sencilla *a priori*, sospechamos de la fiabilidad del cloruro de isopropilsulfonilo, ya que hacía tiempo que estaba en el laboratorio. Por otro lado, los resultados obtenidos durante el proceso de alquilación mediante mesilatos en el apartado 4.1.4.1.3, nos hicieron sospechar de la reactividad

¹¹ Thavonekham, B.; *Synthesis* (10), **1997**, 1189-94

de la amina **4**, en el sentido de que al estar β -disustituida resulta más impedida de lo que pensábamos.

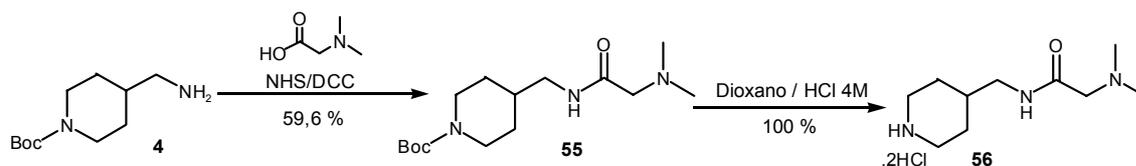
Como en todos los casos que obtuvimos una cantidad de producto suficiente para seguir con la síntesis, no probamos ninguna vía alternativa más.



Esquema 15

4.1.7 Síntesis del dihidrocloruro de 2-dimetilamino-*N*-(4-piperidilmetil)acetamida (**56**).

La amida **55** se sintetiza mediante la condensación del éster activado de la *N,N*-dimetilglicina con *N*-hidroxisuccinimida y DCC, siguiendo la metodología de Anderson¹² *et al.* en la síntesis clásica de péptidos, y la amina **4**. El rendimiento es de un 60% para este primer paso y cuantitativo en el proceso de liberación del *tert*-butoxicarbonilo.

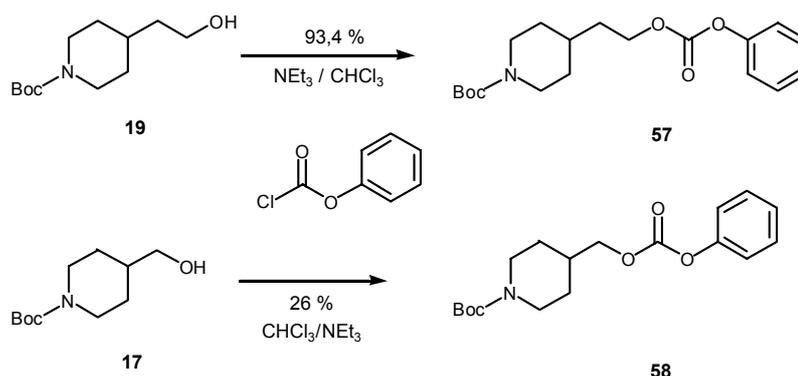


Esquema 16

¹² Anderson, G.W., Zimmerman, J.E., Callahan, M.F.; *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, **1964**, 1839-42

4.1.8 Síntesis de los carbamatos: síntesis del hidrocloreto de 4-[2-(1-pirrolidinilcarboniloxi)etil]piperidina (65), del dihidrocloreto de 4-[2-[(4-metilpiperazin-1-il)carboniloxi]etil]piperidina (66), del hidrocloreto de 4-[2-[(2-metoxietil)aminocarboniloxi]etil]piperidina (67), del dihidrocloreto de 4-[[4-(4-metilpiperazin-1-il)carboniloxi]metil]piperidina (68), del hidrocloreto de 4-[(dietilaminocarboniloxi)metil]piperidina (69), de la 4-[2-[[4-(piridin-4-il)piperazin-1-il]carboniloxi]etil]piperidina (70), del dihidrocloreto de 4-[2-[[4-(4-fenilpiperazin-1-il)carboniloxi]etil]piperidina (75), de la 4-[2-[(4-metilpiperidin-1-il)carboniloxi]etil]piperidina (76), de la 4-[2-[[4-(etoxicarbonil)piperazin-1-il]carboniloxi]etil]piperidina (77), y de la 4-[2-[[4-metil[1,4]diazepan-1-il]carboniloxi]etil]piperidina (78).

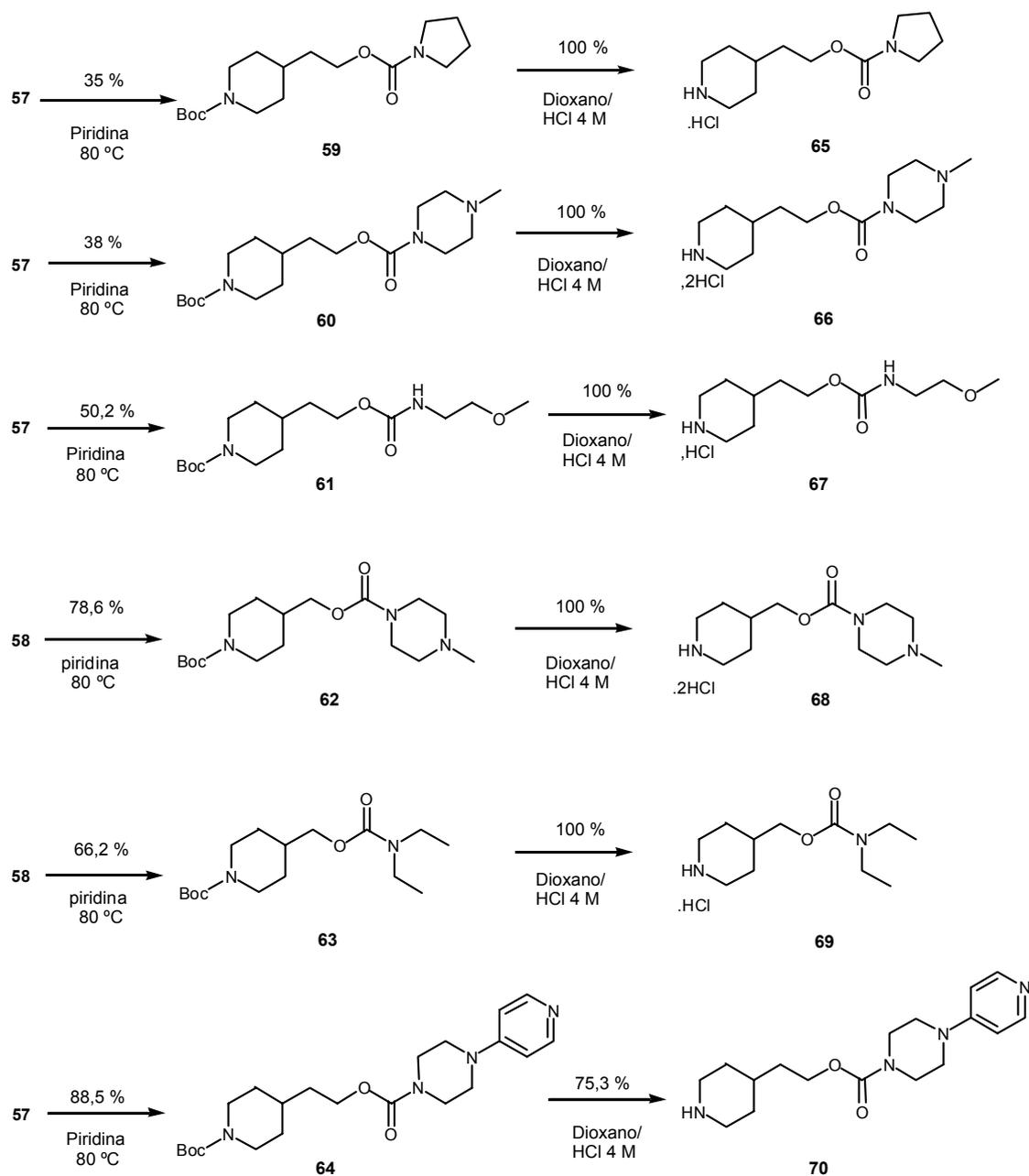
De modo similar a la preparación de las ureas del apartado 4.1.5, se prepararon los carbonatos de fenilo de los correspondientes piperidinalcoholes protegidos **17** y **19**:



Esquema 17

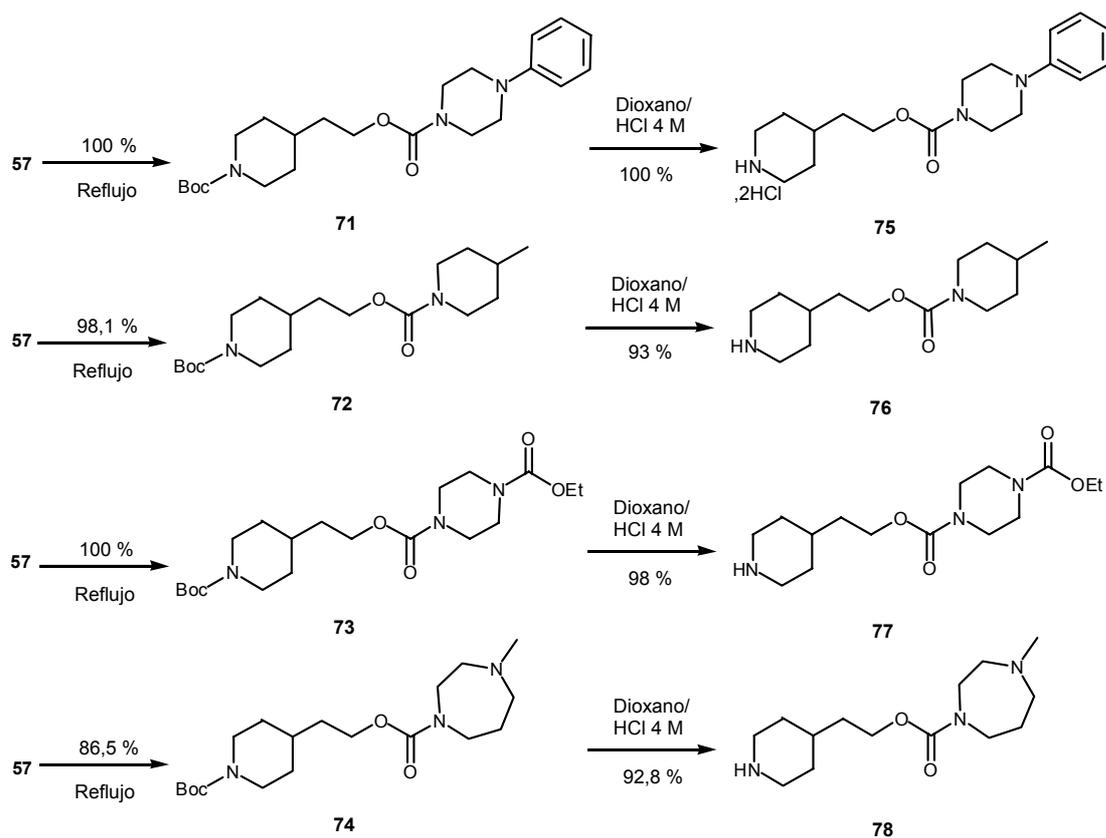
Una vez más el alcohol **17** más impedido dio mucho peor resultado que el **19** que no presentaba ningún impedimento estérico.

El carbonato intermedio se hizo reaccionar con la amina correspondiente en piridina siguiendo la metódica clásica de preparación de carbamatos por sustitución del fenol por la amina.⁴⁵ La reacción se siguió por CCF y se reveló en I_2 . De este modo después de desproteger en dioxano/HCl se obtuvieron los compuestos deseados:



Esquema 18

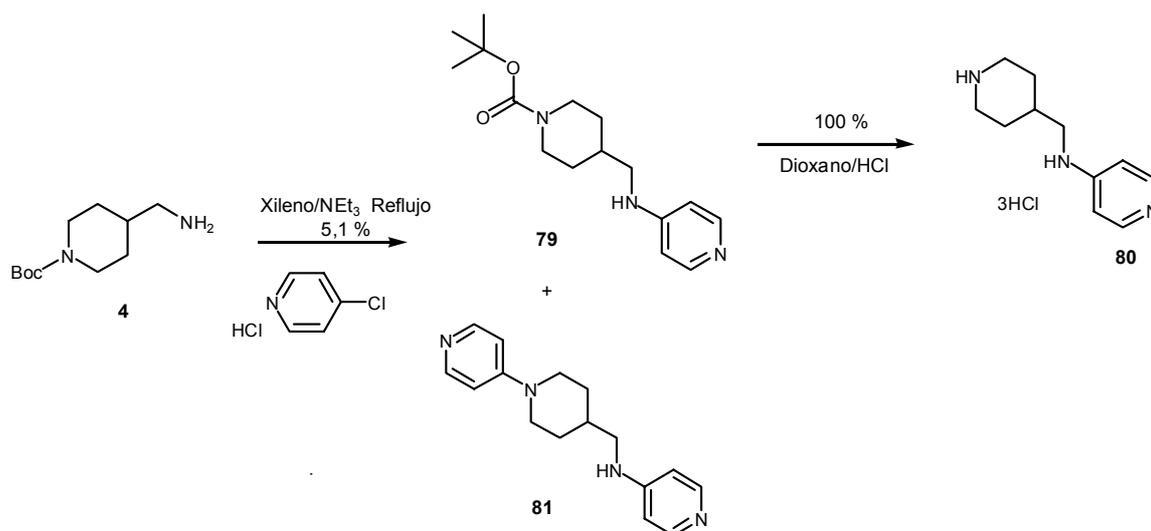
Los siguientes carbamatos, los preparamos mediante desplazamiento del fenol directamente por la amina sin otro disolvente que esta misma, tal y como hacíamos en la preparación de las ureas del apartado 4.1.5. El rendimiento en estos casos fue prácticamente cuantitativo.



Esquema 19

4.1.9 Síntesis del trihidrocloruro de 4-(4-piridilaminometil)piperidina (80)

Durante la elaboración del Máster en Química Experimental se estudiaron diferentes condiciones experimentales con el objetivo de optimizar la sustitución nucleófila sobre 4-cloropiridinas con aminas secundarias. Se obtuvieron elevados rendimientos cuando la reacción tenía lugar en xileno a reflujo en presencia de NEt_3 durante 72 h. Se empleó esta metódica usando como nucleófilo la amina **4** y el resultado fue muy inferior al esperado. El problema fue la alta temperatura empleada, esto propició la desprotección de **4** y se formó el subproducto **81**.

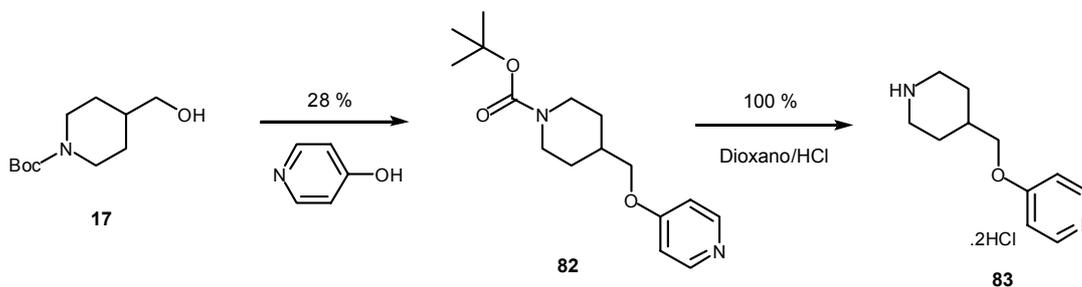


Esquema 20

Se aislaron 0,2 g del intermedio **79** lo cual nos permitió seguir con la síntesis y obtener el compuesto deseado **80**. No obstante, dado nuestro interés en esta reacción, probamos otras condiciones experimentales con tal de ser aplicada a sustratos que contengan el grupo Boc. Para ello se sustituyó el disolvente y bajamos la temperatura de reacción a 120 °C. Tanto en NMP con DIEA (2 eq.) como en n-BuOH con DIEA (2 eq.) se recuperaron los productos de partida.

4.1.10 Síntesis del dihidrocloruro de 4-(4-piridiloximetil)piperidina (**83**)

El compuesto **82** se preparó partiendo del intermedio **17** y la 4-hidroxipiridina mediante una reacción de Mitsunobu con azodicarboxilato de dietilo (DEAD) y PPh₃ siguiendo la metódica descrita por Wityak *et. al.*¹³

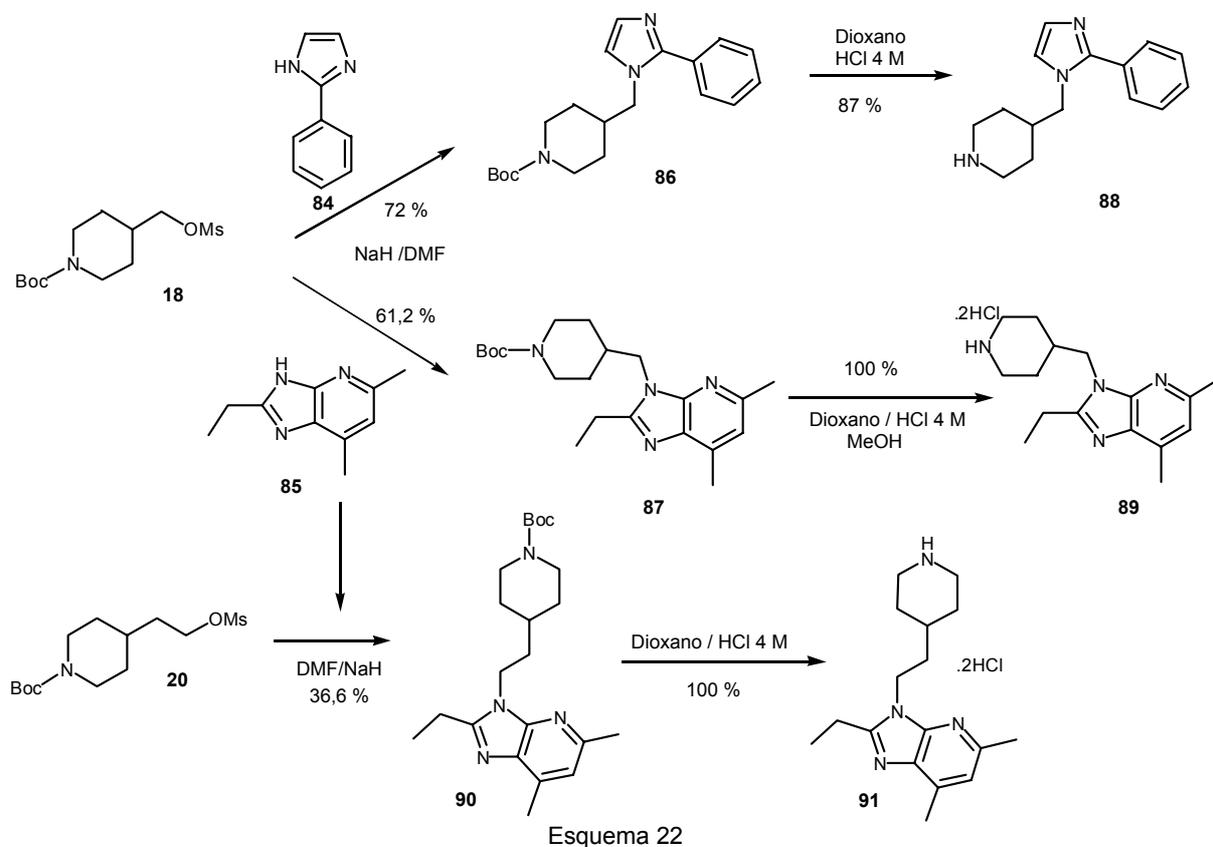


Esquema 21

¹³ Witya, K. et al., *J. Med. Chem* **40**, **1997**, 50-60

4.1.11 Síntesis del 2-fenil-1-[(4-piperidil)metil]imidazol (**88**), del dihidrocloruro de 2-etil-5,7-dimetil-3-(piperidin-4-ilmetil)imidazo[4,5-*b*]piridina (**89**), y del dihidrocloruro de 2-etil-5,7-dimetil-3-[2-(piperidin-4-il)etil]imidazo[4,5-*b*]piridina (**91**).

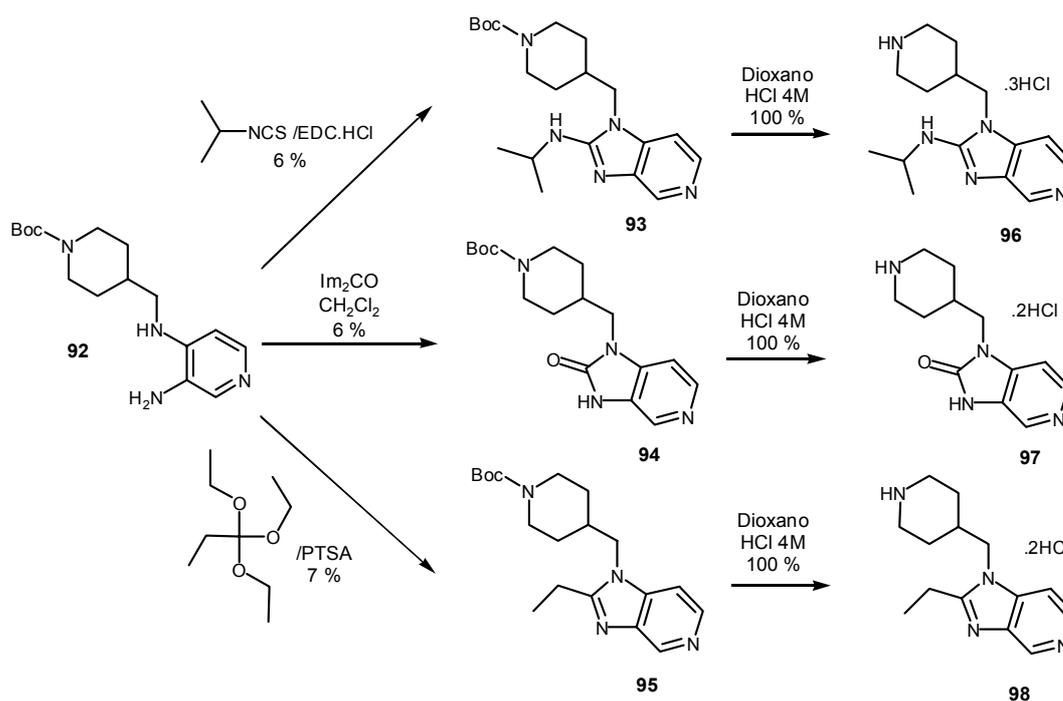
Para la preparación de estos derivados utilizamos los mesilatos **18** y **20** preparados anteriormente y los heterociclos **84** y **85** que son comerciales. El 2-fenilimidazol se desprotonó con NaH en THF y se intentó alquilar con el mesilato **18**, pero se recuperaron los productos de partida. Cuando repetimos la operación usando DMF como disolvente el rendimiento fue de un 72 %, por lo que el resto de alquilaciones se realizaron en este disolvente. Dada la simetría de la molécula, la regioselectividad no es problema. No sucede lo mismo con la imidazopiridina **85**. Almansa¹⁴ *et al.*, dentro de nuestro equipo de investigación había comprobado que el heterociclo **85** se alquilaba regioselectivamente en la posición 3, bajo las mismas condiciones experimentales. De esta manera obtuvimos los heterociclos alquilados convenientemente. El esquema sintético, incluida la desprotección de la piperidina es el siguiente:



¹⁴ Almansa, C., Gómez, L.A., Cavalganti, F.L., Arriba, A.F., Rodríguez, R., Carceller, E., García-Rafanell, J., Forn, J.; *J. Med. Chem.* **39**, **1996**, 2197-2206

4.1.12 Síntesis del trihidrocloruro de 2-isopropilamino-1-(4-piperidilmetil)-imidazo[4,5-c]piridina (96), del dihidrocloruro de 3H-2-oxo-1-(4-piperidilmetil)imidazo[4,5-c]piridina (97), del dihidrocloruro de 2-etil-1-(4-piperidilmetil)imidazo[4,5-c]piridina (98) y del dihidrocloruro de 2-propil-1-(4-piperidilmetil)imidazo[4,5-c]piridina (100).

En el laboratorio disponíamos, además de la imidazopiridina **1**, de varios intermedios de su síntesis, como la piperidilpiridina **92**. A partir de este intermedio se prepararon los tres compuestos del enunciado. En primer lugar se preparó el compuesto **93** por condensación con el isopropil isotiocianato según la metodología de Gudmundsson *et al.*¹⁵, mientras que el derivado **94** que implicaba la formación de una urea se consiguió mediante la inserción de un carbonilo con N,N'-carbonildiimidazol siguiendo el procedimiento descrito por Cooper¹⁶ *et al.* Finalmente se obtuvo el derivado **95** mediante condensación con trietil ortopropionato catalizada con p-TsOH, tal y como describe Abe¹⁷ *et al.*



Esquema 23

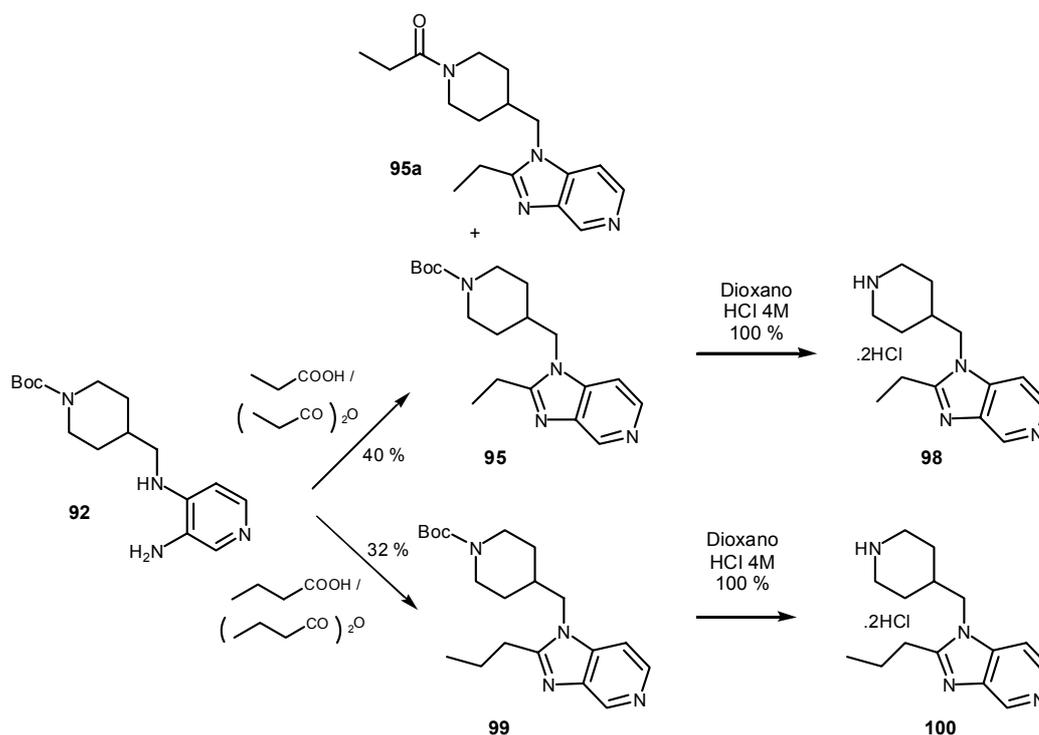
Los rendimientos de las tres ciclaciones fueron muy bajos. Cooper y colaboradores también habían descrito la formación de imidazo[4,5-c]piridinas mediante ciclocondensación de diaminopiridinas con una mezcla de anhídrido alquílico y su

¹⁵ Gudmundsson, K.S.; *J. Med. Chem.* **43**, **2000**, 2464-72

¹⁶ Cooper, K., Fray, M.J., Parry, M.J., Richardson, K., Steele, J.; *J. Med. Chem.* **35**, **1992**, 3115-29

¹⁷ Abe, N., Ishikawa, N., Hayashi, T., Miura, Y.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1990**, 63,1617-22

equivalente ácido.⁵⁰ Se repitió el compuesto **98** siguiendo esta metodología con la diaminopiridina **92** y anhídrido propiónico/ácido propiónico. Se obtuvo un rendimiento del 40 % debido a que el grupo protector *tert*-butoxicarbonilo no resistía las condiciones de reacción. Se aisló el subproducto **95a** lo cual confirmaba este hecho. Estas condiciones también las aplicamos para la obtención del compuesto **100**, pero utilizando anhídrido y ácido butanoico. En este caso el rendimiento fue del 32 %, si bien no aislamos el subproducto análogo al **95a**. Finalmente liberamos el grupo *tert*-butoxicarbonilo y obtuvimos los hidrocloruros de las aminas **98** y **100**.

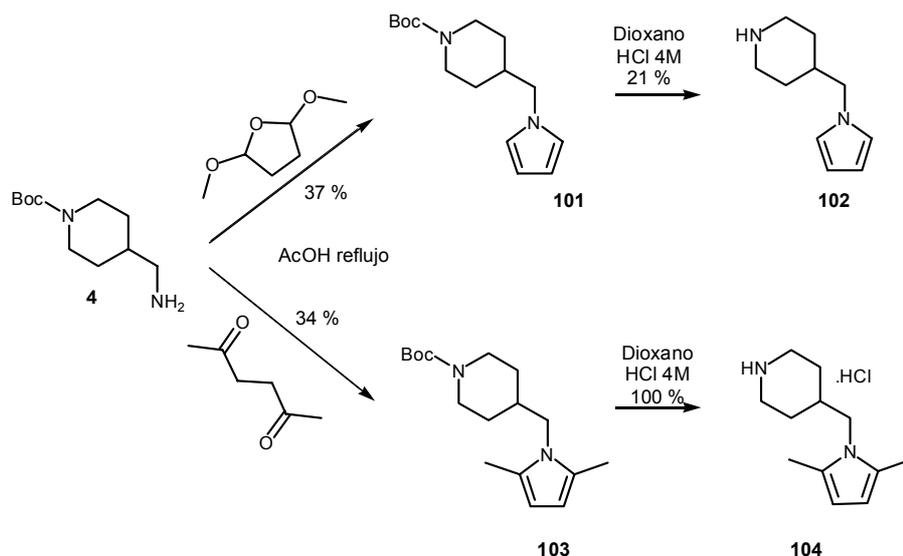


Esquema 24

4.1.13 Síntesis de la 4-(1-pirrolilmetil)piperidina (**102**) y del hidrocloruro de 4-[(2,5-dimetilpirrol-1-il)metil]piperidina (**104**)

El 2,5-dimetoxitetrahydrofurano se empleó como equivalente sintético del succinaldehído para preparar el pirrol **101** a partir de la amina **4** por condensación y deshidratación en AcOH a reflujo siguiendo una metodología descrita en la literatura,¹⁸ mientras que para obtener el pirrol **103** se emplearon las mismas condiciones pero partiendo de la 2,5-hexanodiona.

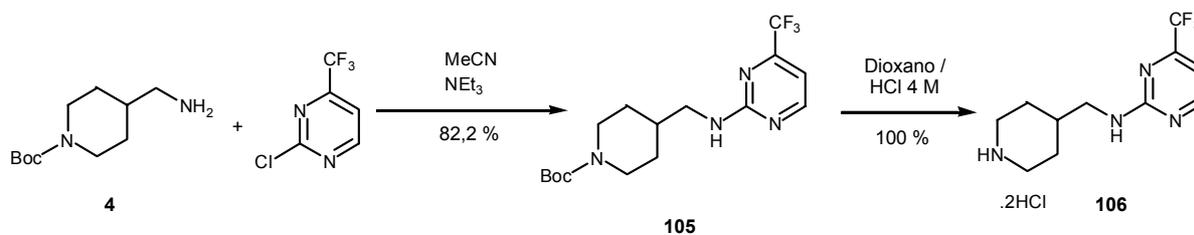
¹⁸ Elworthy, T.R. et al.; *J. Med. Chem.* **40**, **1997**, 2674-87



Esquema 25

4.1.14 Síntesis del dihidrocloruro de 2-[(4-piperidilmetil)amino]-4-(trifluorometil)-pirimidina (106)

La sustitución nucleófila aromática sobre 2-cloropirimidinas está ampliamente descrito en la literatura.¹⁹ La metódica más usual consiste en hacer reaccionar la 2-cloropirimidina con la amina en presencia de NEt_3 en acetonitrilo a temperatura ambiente. Así es como se obtuvo el derivado **105**, precursor del compuesto deseado **106**.



Esquema 26

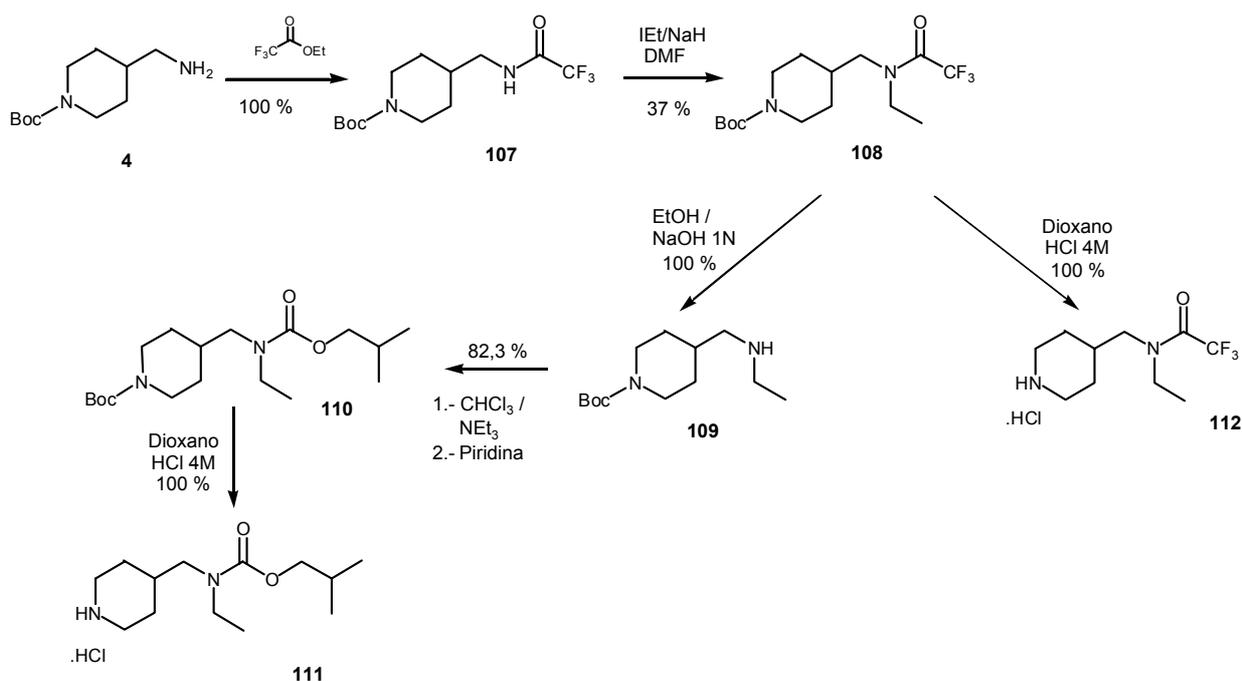
4.1.15 Síntesis del hidrocloreuro de *N*-etil-*N*-(4-piperidilmetil)carbamato de isobutilo (111) y el hidrocloreuro de *N*-etil-*N*-(4-piperidilmetil)trifluoroacetamida (112)

La amina **4** se protegió en forma de trifluoroacetamida **107** con trifluoroacetato de etilo,²⁰ y se alquiló con IEt después de haber generado el anión con NaH . A partir

¹⁹ Nugiel, D.A., Lyndon, A.M., Corbett, J. F.; *J. Org. Chem.*, 62,1, 1997, 201-203

²⁰ King, R.P., Krespan, C.G.; *J. Org. Chem.*, 39, 9, 1974, 1315-36

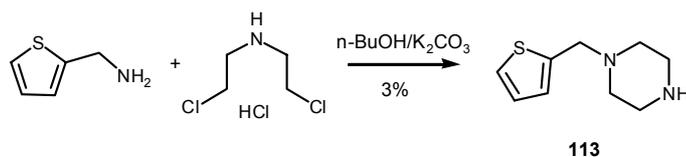
de este intermedio común **108**, una parte se derivó para obtener el carbamato **111**. Para ello se desprotegió la trifluoroacetamida en medio básico y la amina **109** resultante se aciló con el cloroformiato de isobutilo. Después de desproteger en dioxano/HCl se obtuvo el compuesto deseado. Por otro lado una parte del intermedio **108** se desprotegió en medio ácido y se mantuvo el grupo protector trifluoroacetamida para obtener la amina **112**.



Esquema 27

4.1.16 Síntesis de la 1-(2-tienilmetil)piperazina (**113**)

La 1-(2-tienilmetil)piperazina (**113**) la preparamos directamente a partir de la condensación del hidrocloreto de bis-(2-cloroetil)amina con el 2-(aminometil)tiofeno y K_2CO_3 en $n\text{-BuOH}$ a reflujo, siguiendo el método de Prelog y Blazer.²¹ Se obtuvieron 280 mg del compuesto deseado, lo cual significaba un rendimiento del 3 %, sin embargo suficiente para nuestros propósitos.



Esquema 28

²¹ Jain, P.C.; *J. Med. Chem.* 10, **1967**, 812-15

4.2 SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS DEL ÁCIDO GLUTÁMICO

Siguiendo la idea inicial de la ruta sintética convergente diseñada, debíamos preparar paralelamente las aminas y los intermedios N-arilsulfonilproililglutámicos. Para ello funcionalizamos primero la S-prolina con el cloruro de sulfonilo adecuado, y seguidamente acoplaremos el ácido obtenido con el derivado del ácido glutámico más conveniente. Finalmente se acoplaron a la cadena lateral del aminoácido las aminas preparadas anteriormente para obtener los compuestos finales deseados.

4.2.1 Preparación de la N-(3,5-diclorobencenosulfonil)-L-prolina (115)

Del análisis de los compuestos presentados por otras compañías como antagonistas de la VLA-4, habíamos concluido que gran número de ellos presentaban una N-tosilprolina o una 3,5-diclorosulfonilprolina como elemento común, unidas a una gran variedad de sustituyentes.

De los dos ácidos a preparar, el primero (**114**) está disponible comercialmente,

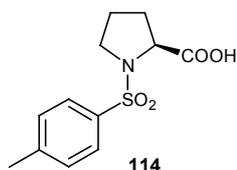
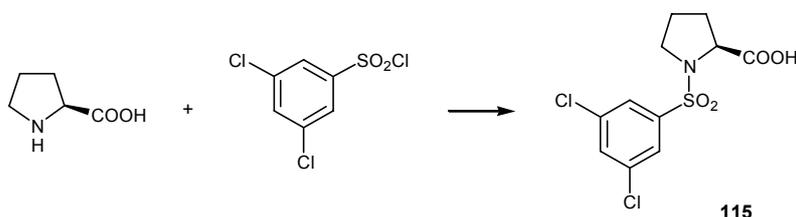


Figura 40

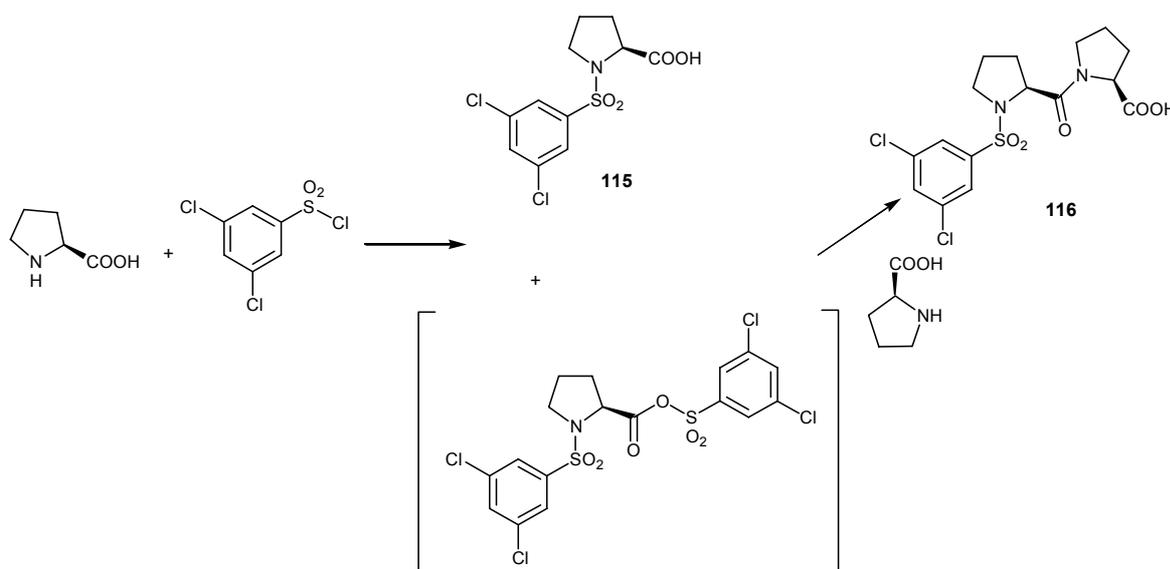
mientras que el ácido **115** lo deberemos preparar por sulfonilación directa de la prolina en medio básico (condiciones de Schotten-Baumann).²²



Inicialmente esta reacción la llevamos a cabo disolviendo la (S)-prolina y 1 equivalente de NaOH en dioxano/H₂O (2:1) a 0 °C. Sobre esta solución se adicionó el cloruro de sulfonilo y finalmente se añadió otro equivalente de NaOH. Después de 18 h

²² Jordis, V. et al.; *Synthesis* 10, **1990**, 923-930

se extrajo a pH=2 con AcOEt y se obtuvo un crudo con una sola señal en CCF y con un peso cuantitativo. No obstante el espectro de $^1\text{H-RMN}$ indica que hay una mezcla 1:1 aproximadamente del producto **115** y de la impureza **116**. La procedencia de este subproducto se puede deber a la formación de la amida vía “anhídrido mixto” con el cloruro de sulfonilo que es una metódica muy referenciada para la obtención de amidas.²³



Esquema 30

Los productos se separan mediante recristalización en AcOEt con un rendimiento de entre el 45 y el 55 % del ácido **115**.

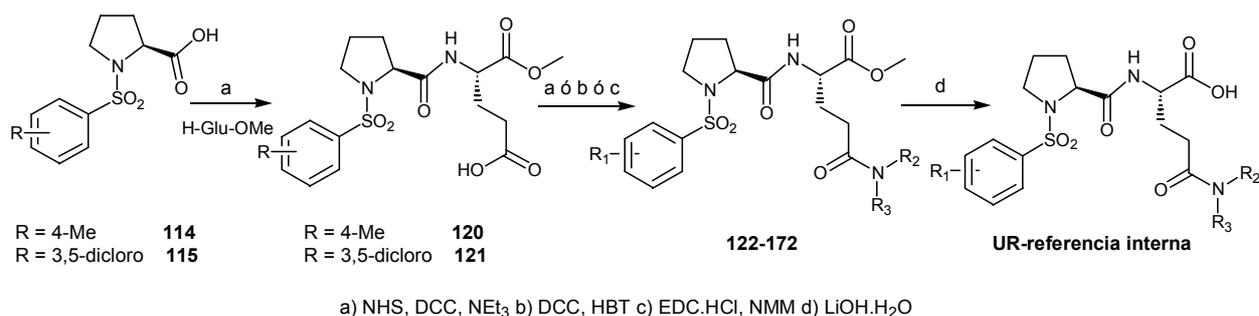
Dado que el rendimiento no era muy bueno empleando el método antes comentado, para una etapa *a priori* sencilla, vimos que en la literatura estaba referenciada la acilación y sulfonilación de aminoácidos en diferentes bases, siendo el Na_2CO_3 la que mejores garantías ofrecía.²⁴ Por esto se llevó a cabo la reacción en dioxano/ H_2O y 2,5 equivalentes de Na_2CO_3 y se obtuvo un rendimiento de entre el 80 y el 90 % en las diferentes ocasiones que lo llevamos a cabo.

4.2.2 Acoplamiento entre la N-arilsulfonilprolina y el ácido glutámico

Una vez tenemos preparados los derivados sulfonilados de la prolina (**114** y **115**) se deben acoplar al intermedio del ácido glutámico más adecuado. Para ello existen diferentes posibilidades y decidimos evaluarlas.

²³ Yamamoto, H. et al.; *Bioorg. Med. Chem.* 8, 5, **2000**, 1159-70

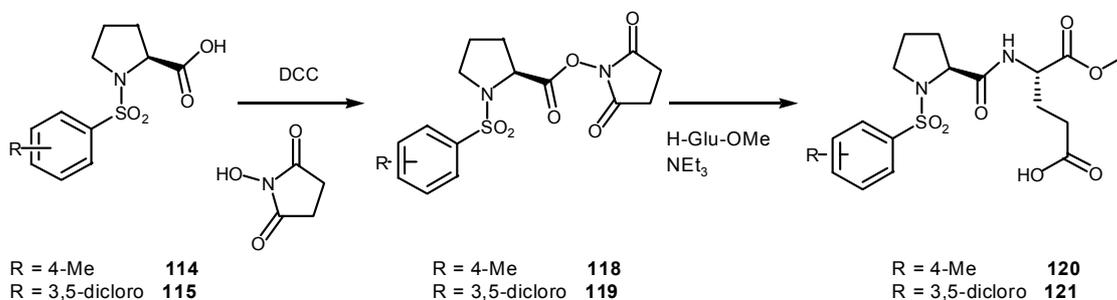
Un intermedio adecuado para nuestro propósito es el éster 1-metílico del ácido L-glutámico **117** (H-Glu-OMe). Este aminoácido tiene libre la amina, lo cual nos permitiría acoplarla con la sulfonilprolina y también el ácido de la cadena lateral que después acoplaríamos con las diferentes aminas que hemos preparado en el apartado 4.1. El esquema sintético quedaría completado con la hidrólisis final del éster metílico del ácido glutámico en medio básico, según el siguiente esquema



Esquema 31

Dada la presencia de un ácido libre en el H-Glu-OMe (**117**) la formación de la amida entre los ácidos **114** y **115** y el aminoácido **117** se puede hacer en dos etapas: previamente se prepara una forma activada de la sulfonilprolina, tal como un cloruro de ácido o un éster mixto con N-hidroxisucinimida y a continuación se hace reaccionar este intermedio con el aminoácido que hará la función de espaciador. En este caso no se usan agentes de acoplamiento tales como carbodiimidas ya que competirían los dos ácidos presentes en el medio de reacción por dicho reactivo.

Optamos por preparar los intermedios activados con la N-hidroxisucinimida **118** y **119** igual que hicimos en el apartado 4.1.7, en lugar de preparar los cloruros de ácido. El rendimiento global del acoplamiento con el H-Glu-OMe fue del 80 al 85 % en las diferentes operaciones que llevamos a cabo.



Esquema 32

²⁴ a) Dziadulewicz, T.J.R. et al.; *J. Med. Chem.*, 45, **2002**, 2160-72. B) Braish, T. F., Fox, D. E.; *J. Org. Chem.*, 55, **1990**, 1684-87

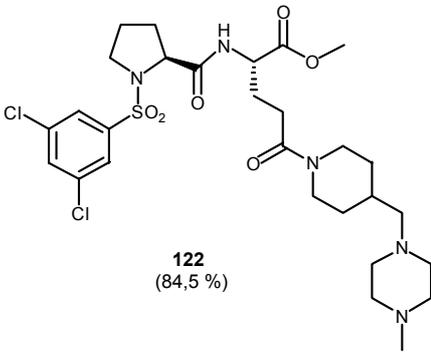
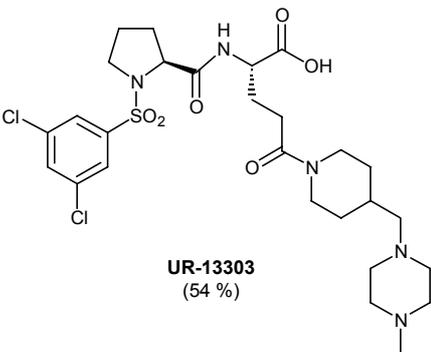
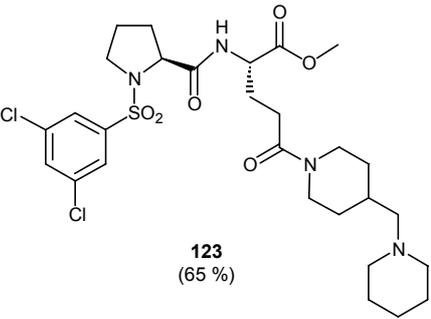
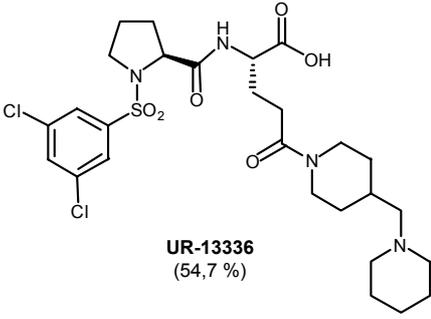
4.2.3 Obtención de los URs finales

Una vez formados los ácidos intermedios **120** y **121** los acoplamos a las diferentes aminas preparadas en el apartado 4.1 con el fin de realizar un estudio estructura-actividad entre las diferentes posibilidades.

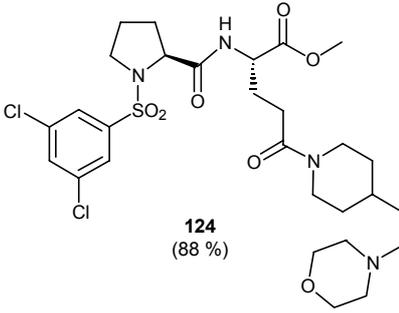
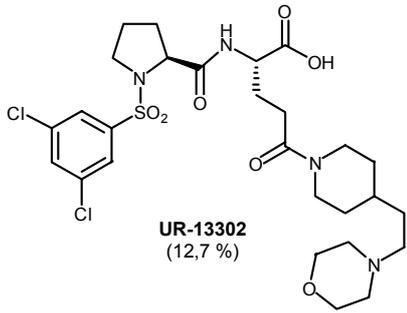
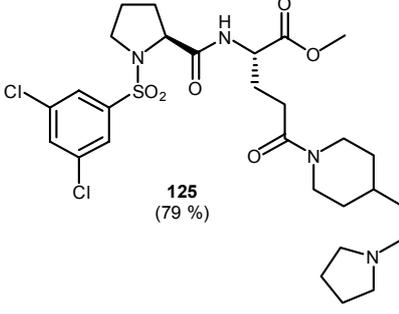
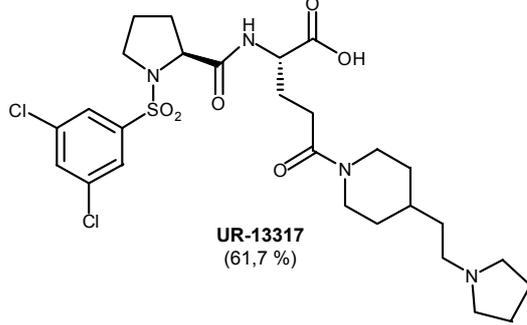
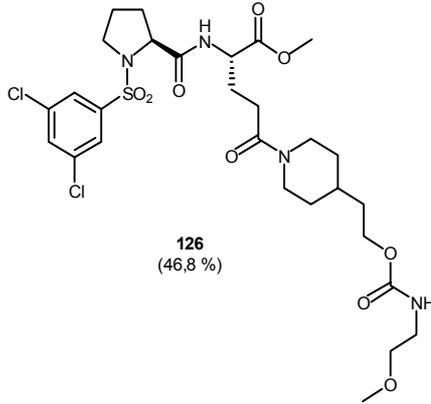
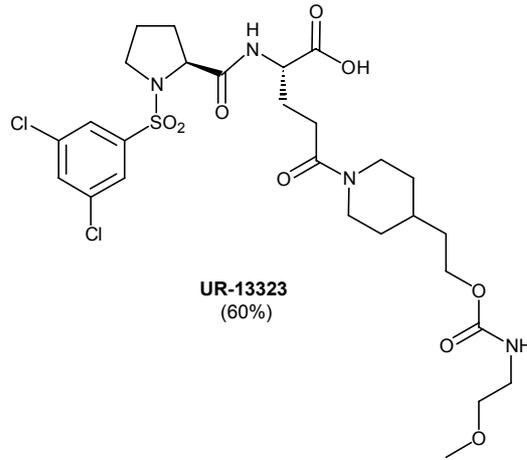
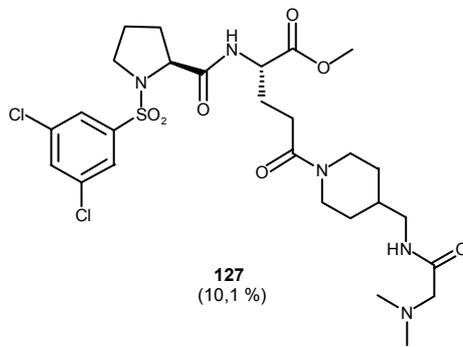
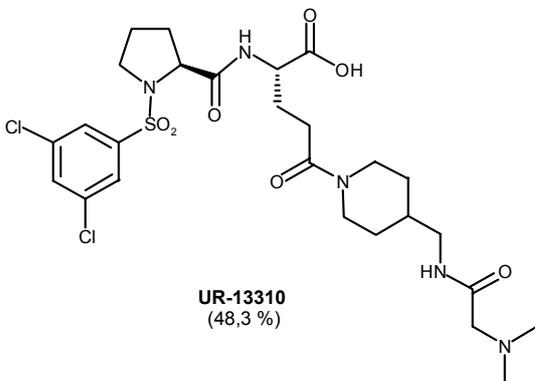
Este acoplamiento se puede llevar a cabo, en principio con multitud de agentes de acoplamiento tal y como demuestra la amplia literatura existente al respecto.²⁵ Dado que la vía sintética basada en la formación del intermedio con N-hidroxisuccinimida nos había dado tan buenos resultados, decidimos aplicarla a la formación de este segundo enlace amida.

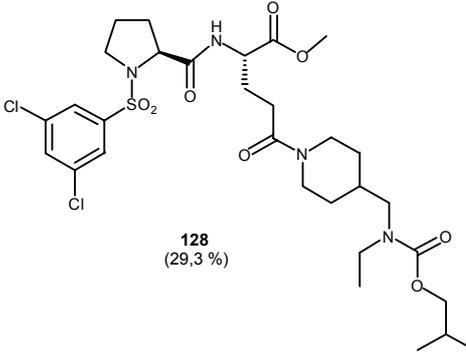
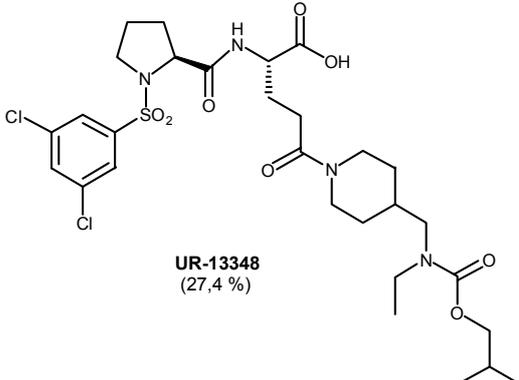
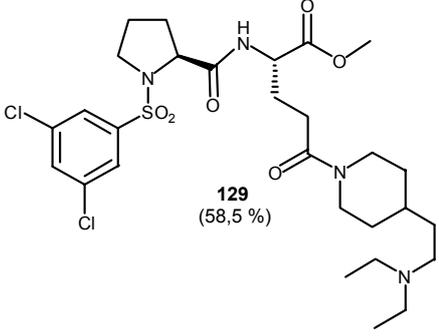
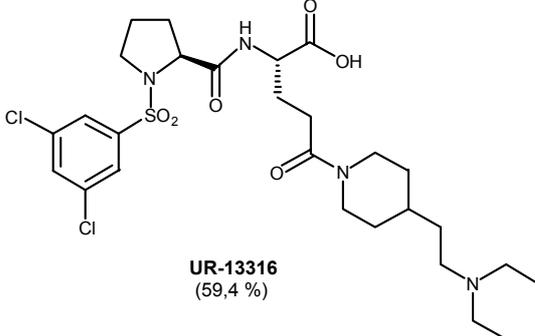
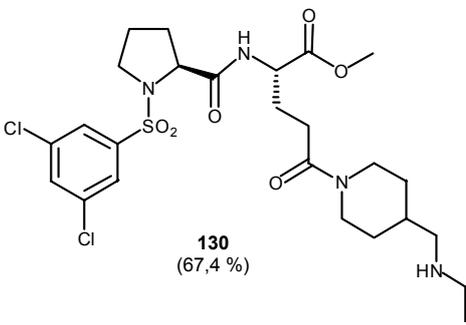
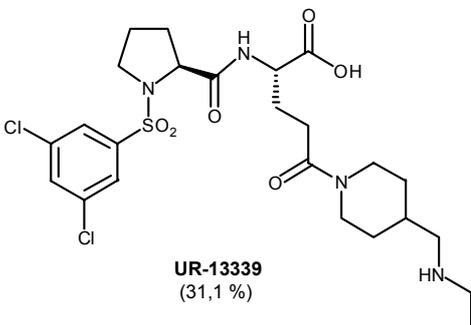
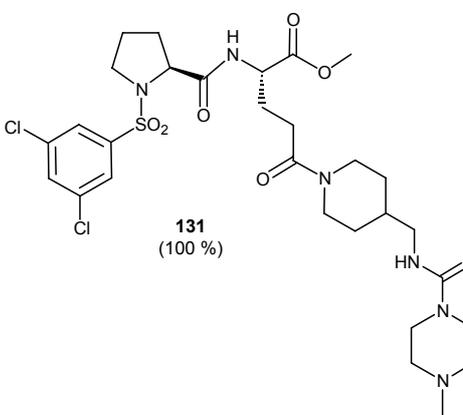
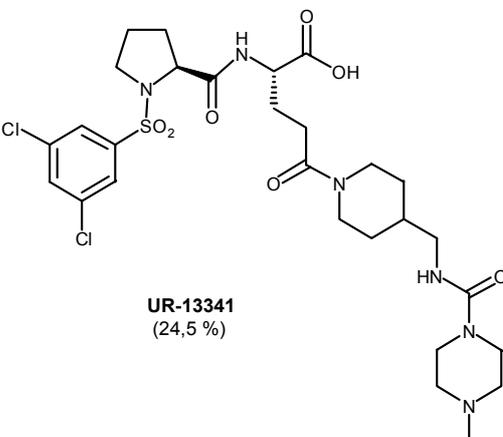
Se prepararon 19 compuestos siguiendo esta metódica, tal y como se resume en la tabla de resultados 2.1. Una vez formadas las amidas, los ésteres metílicos se hidrolizaron con 2 equivalentes de LiOH.H₂O en una mezcla H₂O/THF 1:1. En la siguiente tabla se resumen los compuestos obtenidos por esta vía así como los rendimientos obtenidos tanto en la etapa de formación de la amida como la de la hidrólisis.

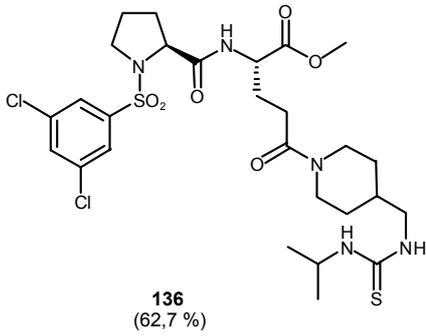
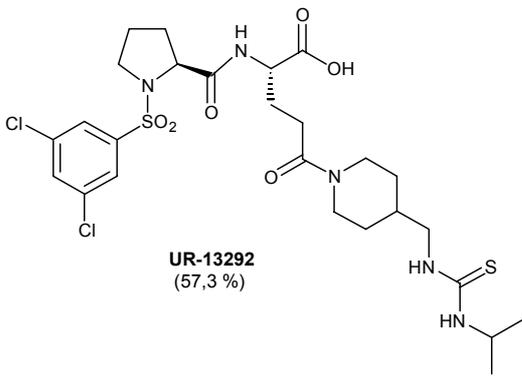
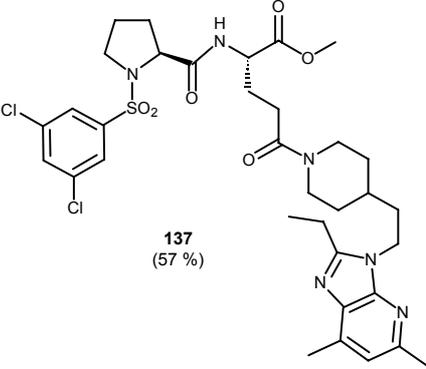
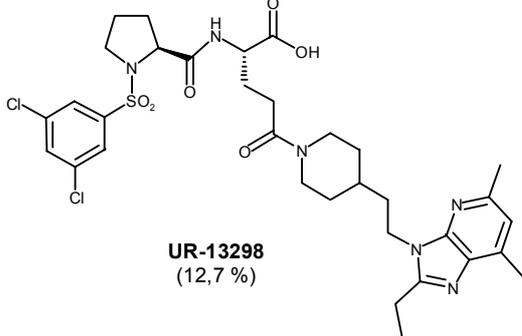
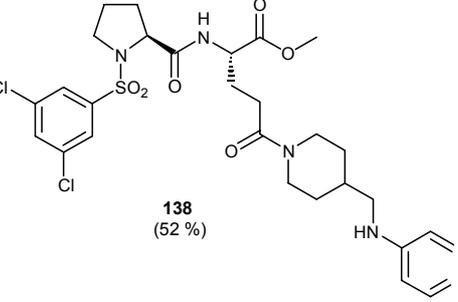
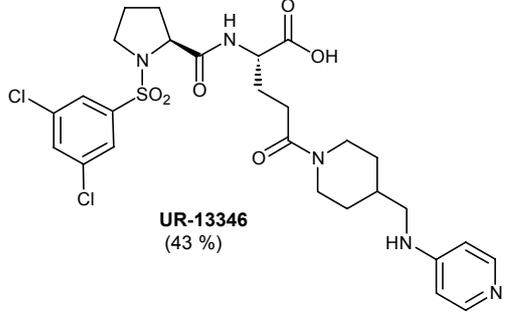
Tabla 2.1 Formación de amidas vía NHS-DCC

Ácido	Amina	Ester (Rdto. Acoplamiento)	UR (Rdto. Hidrólisis)
121	27	 <p>122 (84,5 %)</p>	 <p>UR-13303 (54 %)</p>
121	31	 <p>123 (65 %)</p>	 <p>UR-13336 (54,7 %)</p>

²⁵ Larock, R.C.; Comprehensive Organic Transformations, 2nd Edition, 1999, Wiley-VCH

Ácido	Amina	Ester (Rdto. Acoplamiento)	UR (Rdto. Hidrólisis)
121	28	 <p>124 (88 %)</p>	 <p>UR-13302 (12,7 %)</p>
121	30	 <p>125 (79 %)</p>	 <p>UR-13317 (61,7 %)</p>
121	67	 <p>126 (46,8 %)</p>	 <p>UR-13323 (60%)</p>
121	56	 <p>127 (10,1 %)</p>	 <p>UR-13310 (48,3 %)</p>

Ácido	Amina	Ester (Rdto. Acoplamiento)	UR (Rdto. Hidrólisis)
121	111	 <p>128 (29,3 %)</p>	 <p>UR-13348 (27,4 %)</p>
121	32	 <p>129 (58,5 %)</p>	 <p>UR-13316 (59,4 %)</p>
121	112	 <p>130 (67,4 %)</p>	 <p>UR-13339 (31,1 %)</p>
121	44	 <p>131 (100 %)</p>	 <p>UR-13341 (24,5 %)</p>

Ácido	Amina	Ester (Rdto. Acoplamiento)	UR (Rdto. Hidrólisis)
121	54	 <p>136 (62,7 %)</p>	 <p>UR-13292 (57,3 %)</p>
121	91	 <p>137 (57 %)</p>	 <p>UR-13298 (12,7 %)</p>
121	80	 <p>138 (52 %)</p>	 <p>UR-13346 (43 %)</p>

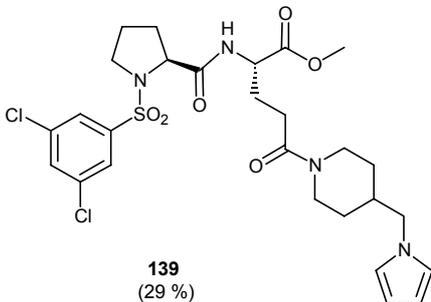
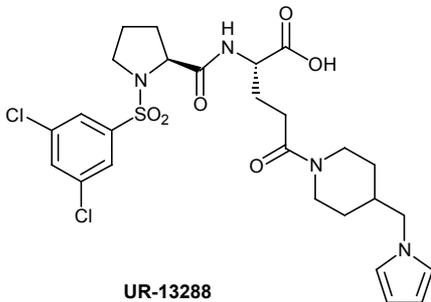
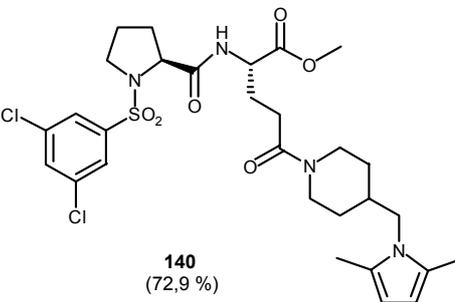
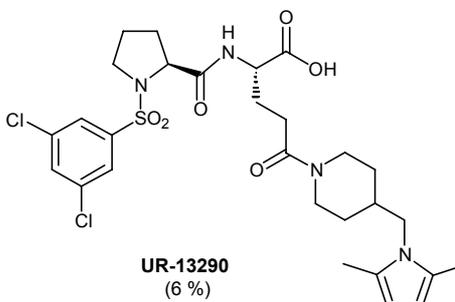
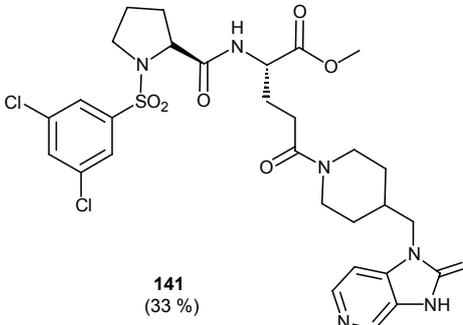
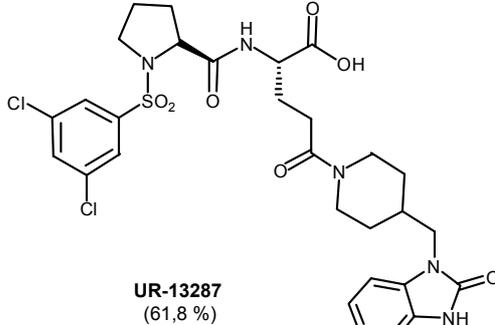
El **UR-13339** se preparó a partir del ácido **121** y la amina **112** que se encontraba protegida en forma de trifluoroacetamida. La hidrólisis en LiOH además de hidrolizar el éster metílico, también liberó la amina protegida obteniéndose el compuesto descrito.

No obstante, la formación de la amida en dos etapas resulta más laboriosa que la formación de la amida directamente con un agente condensante, si bien está justificada en aquellos casos en que se conoce o se prevé la dificultad de uno de los reactivos para reaccionar. Si no es el caso y además interesa una cierta celeridad en

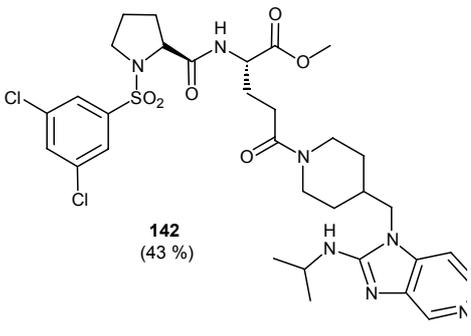
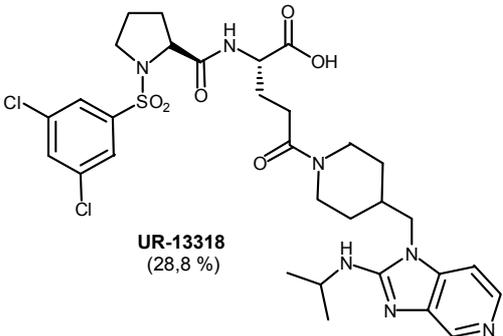
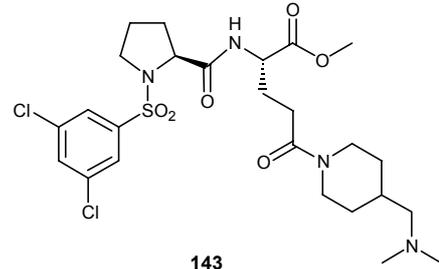
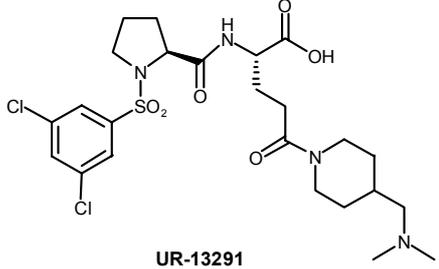
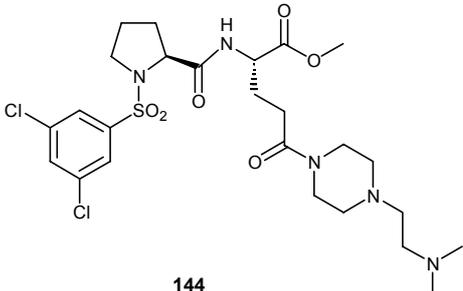
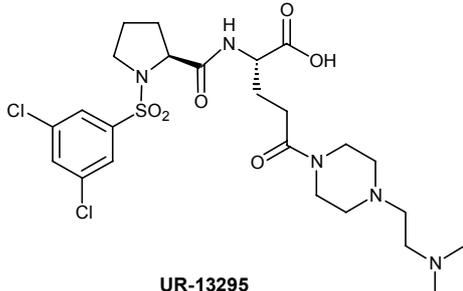
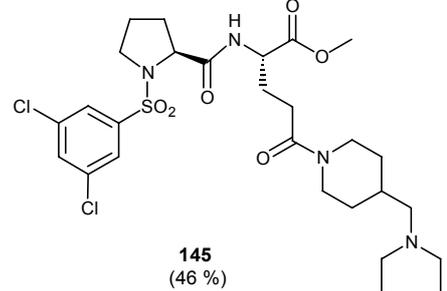
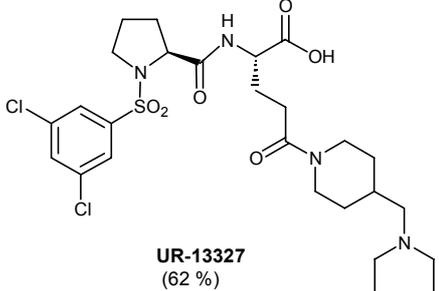
la obtención de productos finales, resulta más conveniente el uso de agentes de acoplamiento que nos permitan realizar el coupling en una sola etapa. Por este motivo decidimos preparar los siguientes derivados con DCC y 1-hidroxibenzotriazol (HBT) tal y como reportaron König y Geiger²⁶ en 1970 para la síntesis de péptidos.

Los resultados obtenidos usando esta metódica se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 2.2 Formación de amidas vía DCC-HBT

Ácido	Amina	Ester (Rdto. Acoplamiento)	UR (Rdto. Hidrólisis)
121	102	 <p>139 (29 %)</p>	 <p>UR-13288 (57 %)</p>
121	104	 <p>140 (72,9 %)</p>	 <p>UR-13290 (6 %)</p>
121	97	 <p>141 (33 %)</p>	 <p>UR-13287 (61,8 %)</p>

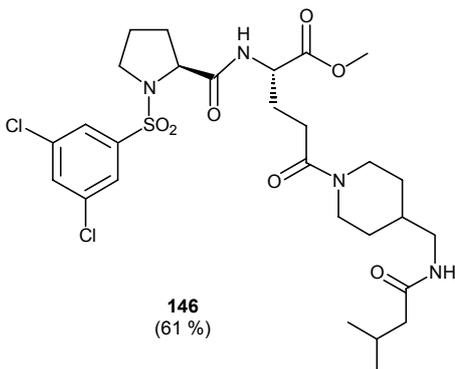
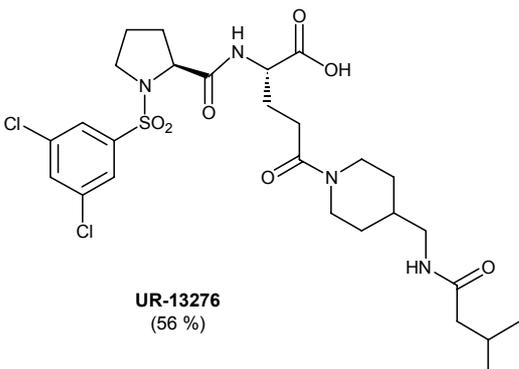
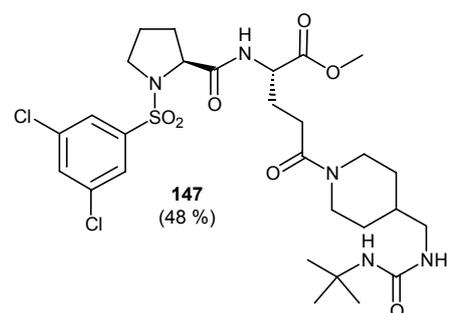
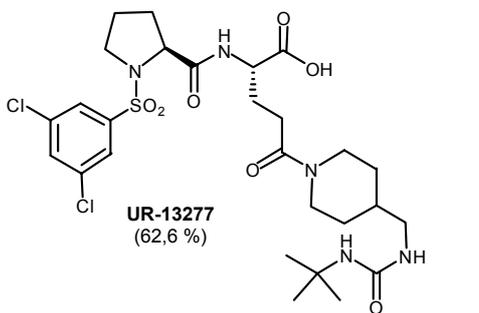
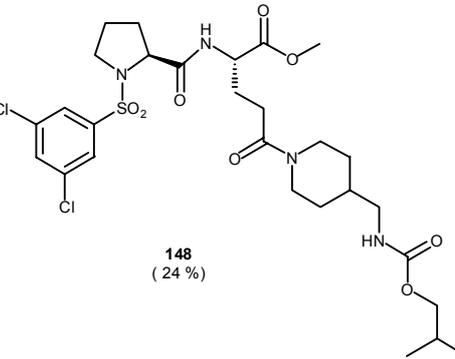
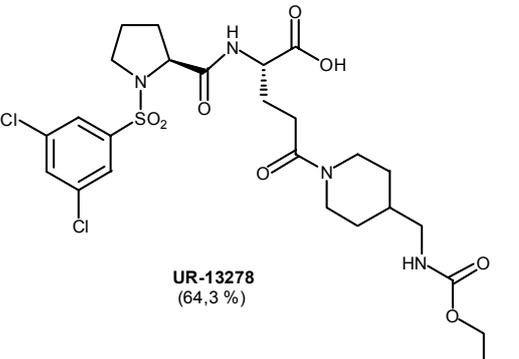
²⁶ König, W., Geiger, R.; Ver. *Dtsch. Chem. Ges.*, 103, 1970, 788

Ácido	Amina	Ester (Rdto. Acoplamiento)	UR (Rdto. Hidrólisis)
121	96	 <p>142 (43 %)</p>	 <p>UR-13318 (28,8 %)</p>
121	29	 <p>143 (54 %)</p>	 <p>UR-13291 (74,5 %)</p>
121	35	 <p>144 (38 %)</p>	 <p>UR-13295 (25 %)</p>
121	37	 <p>145 (46 %)</p>	 <p>UR-13327 (62 %)</p>

El uso de la DCC tiene como inconveniente principal la eliminación de la urea que se forma como subproducto de la reacción, ya que aunque mayoritariamente se elimina por filtración es difícil de eliminar completamente (incluso mediante cromato-

grafía en columna). Por este motivo decidimos probar la EDC.HCl²⁷(hidrocloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) como agente de acoplamiento ya que la urea que se origina como subproducto es soluble en agua y por lo tanto fácilmente de eliminar durante el tratamiento. Los resultados que se obtuvieron de este forma son los siguientes:

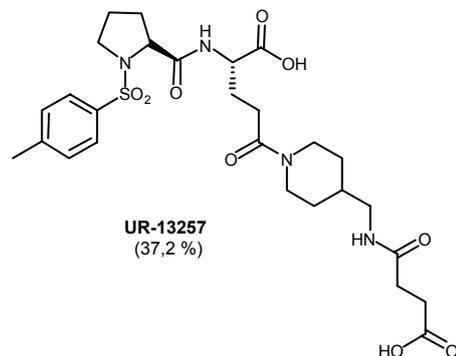
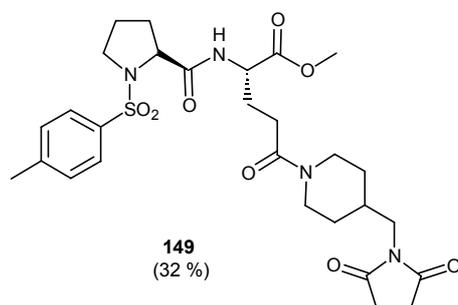
Tabla 2.3 Formación de amidas vía EDC.HCl-HBT

Ácido	Amina	Ester (Rdto. Acoplamiento)	UR (Rdto. Hidrólisis)
121	50	 <p>146 (61 %)</p>	 <p>UR-13276 (56 %)</p>
121	51	 <p>147 (48 %)</p>	 <p>UR-13277 (62,6 %)</p>
121	52	 <p>148 (24 %)</p>	 <p>UR-13278 (64,3 %)</p>

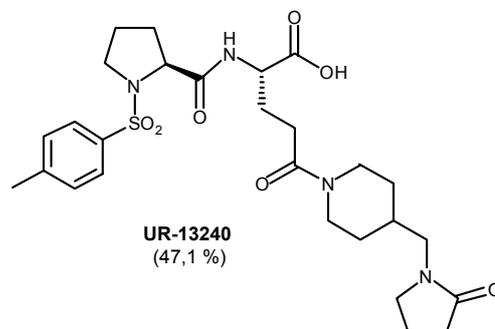
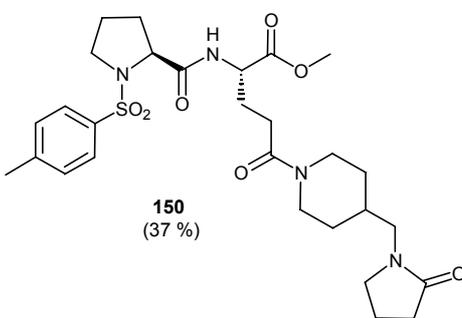
²⁷ Duggan, M.E. et. al.; *J.Med.Chem.*, 43,20, **2000**, 3736-45

Ácido	Amina	Ester (Rdto. Acoplamiento)	UR (Rdto. Hidrólisis)
-------	-------	----------------------------	-----------------------

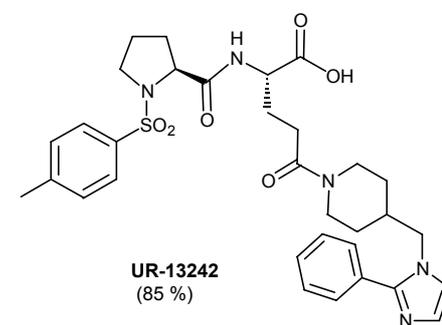
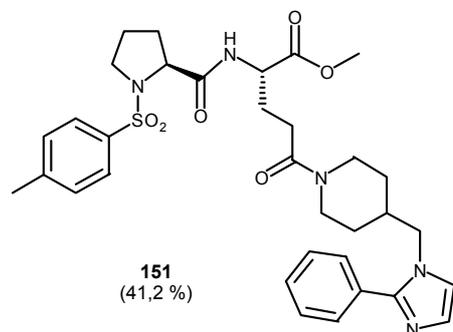
120 12



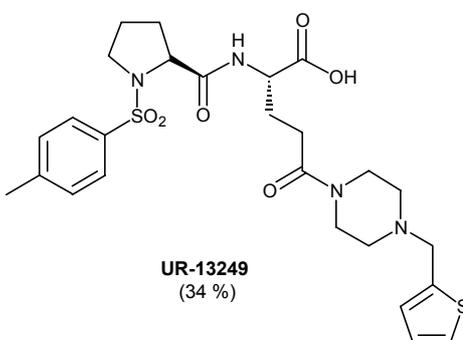
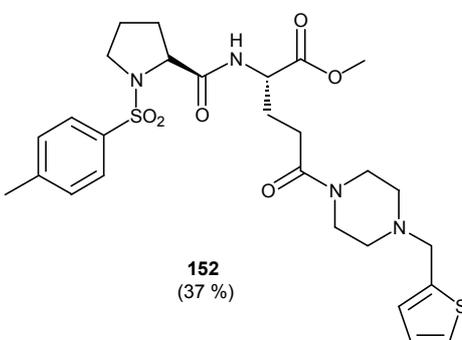
120 7



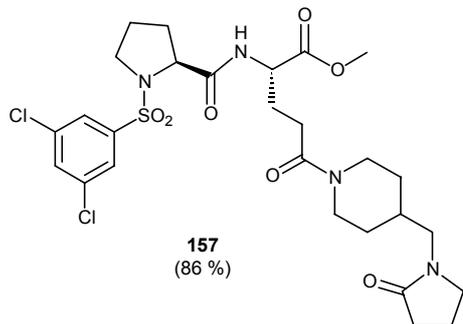
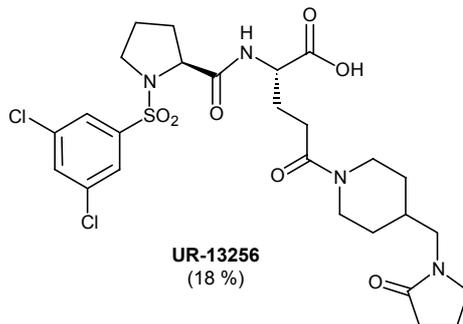
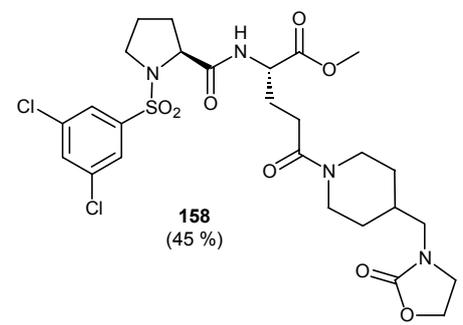
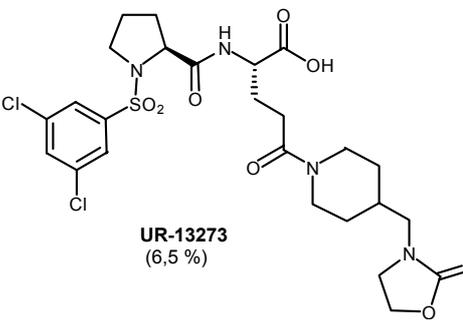
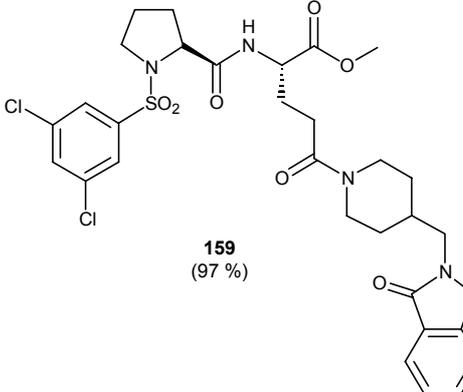
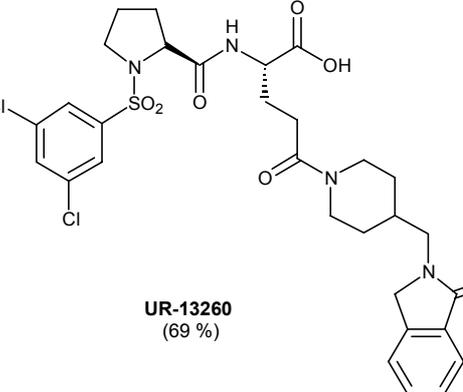
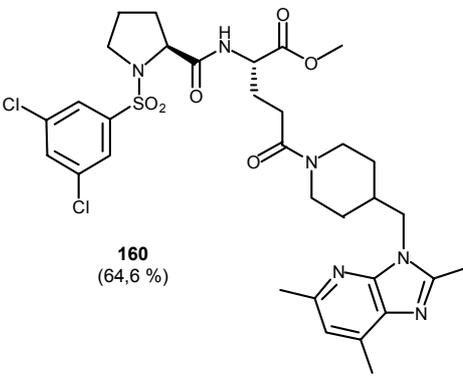
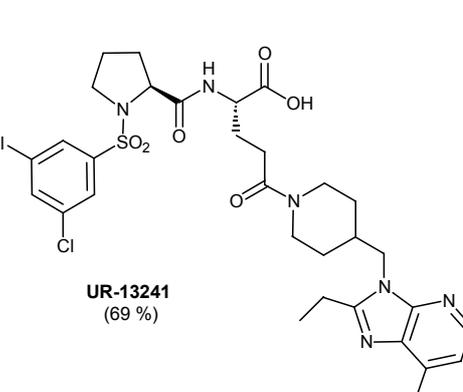
120 88

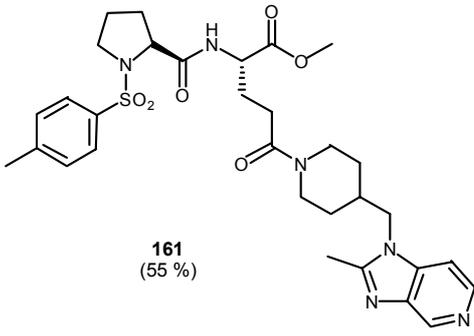
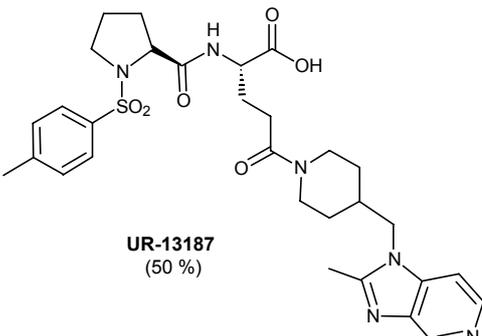
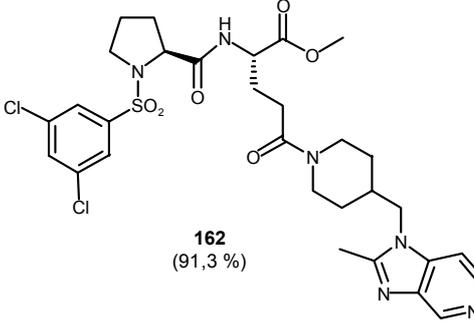
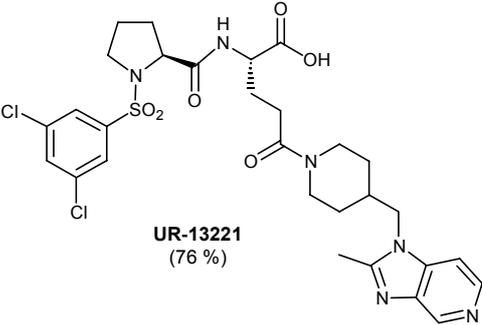


120 113



Ácido	Amina	Ester (Rdto. Acoplamiento)	UR (Rdto. Hidrólisis)
120	106	<p>153 (33 %)</p>	<p>UR-13244 (43,3 %)</p>
120	2	<p>154 (50 %)</p>	<p>UR-13245 (9,7 %)</p>
120	14	<p>155 (56 %)</p>	<p>UR-13247 (46,7 %)</p>
120	3	<p>156 (57 %)</p>	<p>UR-13246 (36,7 %)</p>

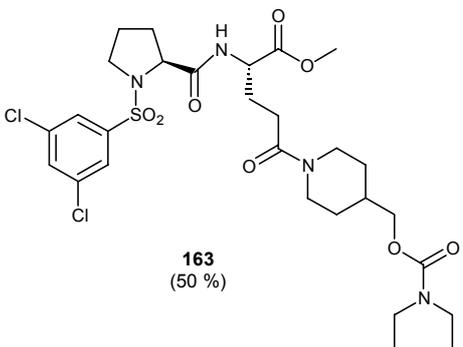
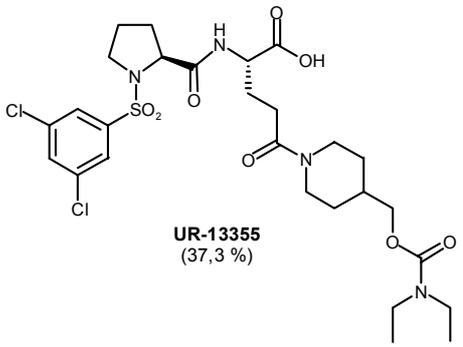
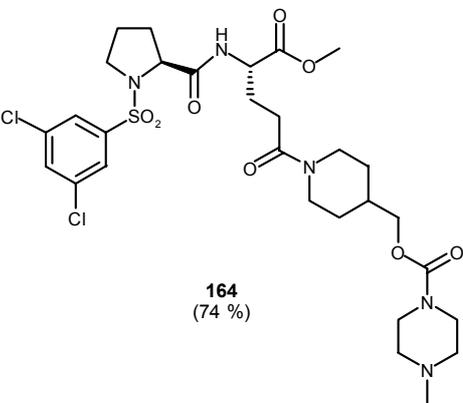
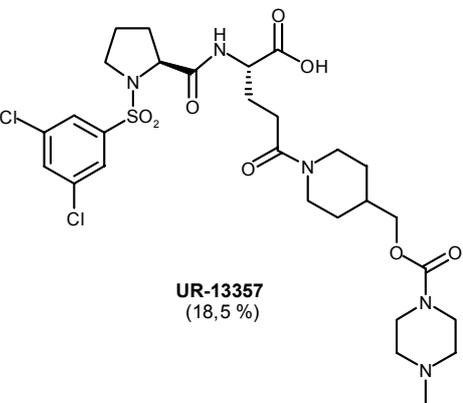
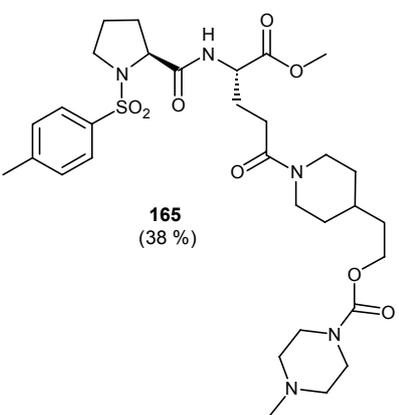
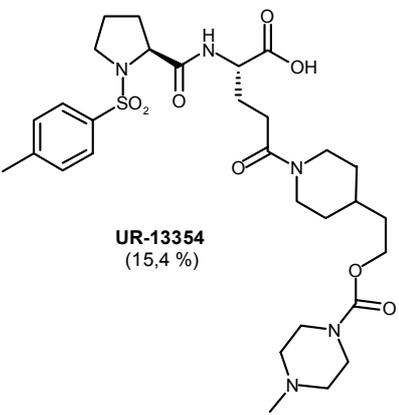
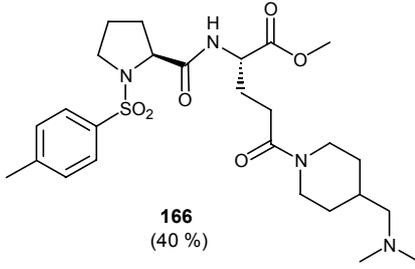
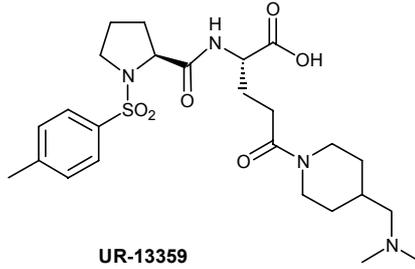
Ácido	Amina	Ester (Rdto. Acoplamiento)	UR (Rdto. Hidrólisis)
121	7	 <p>157 (86 %)</p>	 <p>UR-13256 (18 %)</p>
121	10	 <p>158 (45 %)</p>	 <p>UR-13273 (6,5 %)</p>
121	14	 <p>159 (97 %)</p>	 <p>UR-13260 (69 %)</p>
121	89	 <p>160 (64,6 %)</p>	 <p>UR-13241 (69 %)</p>

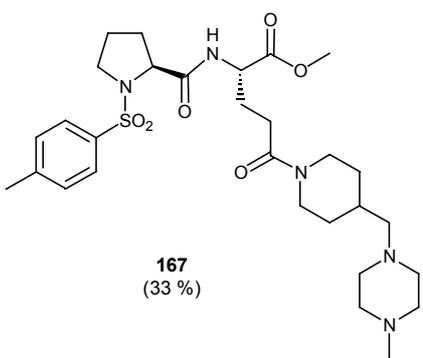
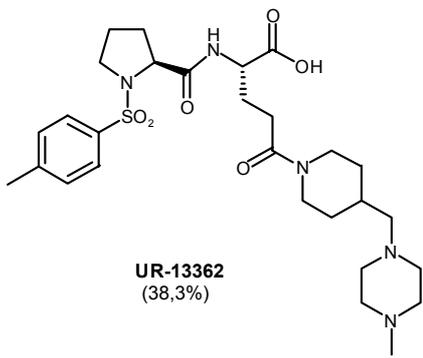
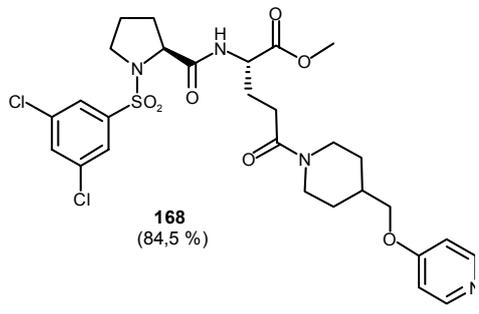
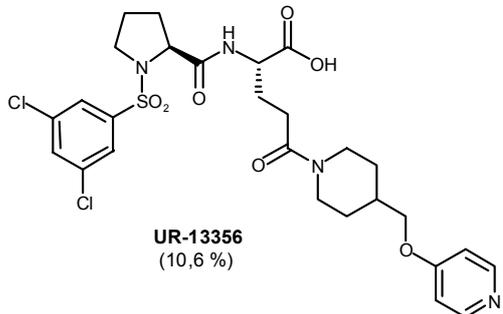
Ácido	Amina	Ester (Rdto. Acoplamiento)	UR (Rdto. Hidrólisis)
120	1	 <p>161 (55 %)</p>	 <p>UR-13187 (50 %)</p>
121	1	 <p>162 (91,3 %)</p>	 <p>UR-13221 (76 %)</p>

Durante la hidrólisis del éster **149** se produjo también la hidrólisis de la succinimida terminal, tal y como se vio al analizar por $^1\text{H-RMN}$ y HPLC-MS el compuesto obtenido. Este diácido que denominamos **UR-13257**, si bien no era el producto que pretendíamos conseguir en principio, decidimos también evaluarlo farmacológicamente ya que es un compuesto que cumple los requisitos estructurales exigidos. Además de esta forma obtuvimos información sobre la poca estabilidad de estas succinimidas.

Los siguientes derivados del ácido glutámico se obtuvieron preparando los intermedios con N-hidroxisuccinimida tal y como habíamos hecho con los primeros compuestos de esta serie, pero usando como agente condensante EDC.HCl en lugar de la DCC. De esta manera pretendíamos aprovechar la eficacia que proporciona este intermedio en la formación de amidas con la facilidad en el tratamiento que nos ofrece la EDC. Se ensayaron estas condiciones experimentales con seis compuestos, y si bien el tratamiento fue sencillo tal y como preveíamos, los rendimientos no fueron superiores a los obtenidos con las metódicas anteriores y se quedaron en un 50 % de media.

Tabla 2.4 Formación de amidas vía EDC.HCl-NHS

Ácido	Amina	Ester (Rdto. Acoplamiento)	UR (Rdto. Hidrólisis)
121	69	 <p>163 (50 %)</p>	 <p>UR-13355 (37,3 %)</p>
121	68	 <p>164 (74 %)</p>	 <p>UR-13357 (18,5 %)</p>
120	66	 <p>165 (38 %)</p>	 <p>UR-13354 (15,4 %)</p>
120	29	 <p>166 (40 %)</p>	 <p>UR-13359 (32 %)</p>

Ácido	Amina	Ester (Rdto. Acoplamiento)	UR (Rdto. Hidrólisis)
120	27	 <p>167 (33 %)</p>	 <p>UR-13362 (38,3%)</p>
121	83	 <p>168 (84,5 %)</p>	 <p>UR-13356 (10,6 %)</p>

Los **UR-13322**, y **UR-13308** fueron compuestos que tuvimos que sintetizar varias veces dado que fueron seleccionados por el Departamento de *Screening* para realizar diferentes tests *in vivo* de actividad y de absorción.

La primera vez que preparamos el **UR-13308** lo hicimos utilizando DCC y HBT como agentes de condensación entre la amina **98** y el ácido **121**. El acoplamiento en estas condiciones tuvo lugar con un moderado 53 % de rendimiento.

Cuando nos planteamos una segunda síntesis de estos compuestos decidimos cambiar el sistema de condensación. Durante las últimas décadas se han desarrollado una gran variedad de sistemas de activación de ácidos carboxílicos para preparar ésteres y amidas. Destinados en principio a su uso en química en fase sólida, son agentes de una gran eficacia, por lo que algunos de ellos han extendido su uso en síntesis en solución. Durante la nueva preparación del **UR-13308** decidimos usar uno de estos agentes de acoplamiento: el N-[(1*H*-benzotriazol-1-il)-(dimetilamino)metilén]-N-metilmetanaminio hexafluorofosfato N-óxido (HBTU). La estructura de este reactivo ha sido recientemente elucidada²⁸ ya que originariamente se formuló como un sal de uronio y no como una sal de guanidinio (figura 41)

²⁸ Abdelmoty, I., Carpino, L.A., Albericio, F., Foxman, B. M., Kates, S.A.; *Letf. Pept. Sci.* **1994**, 1, 57.

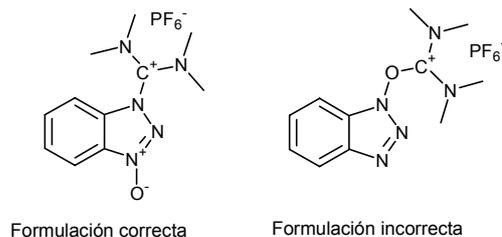


Figura 41

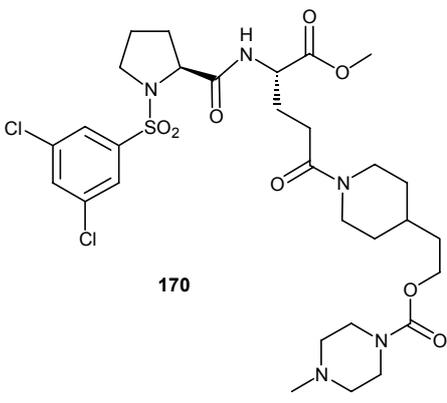
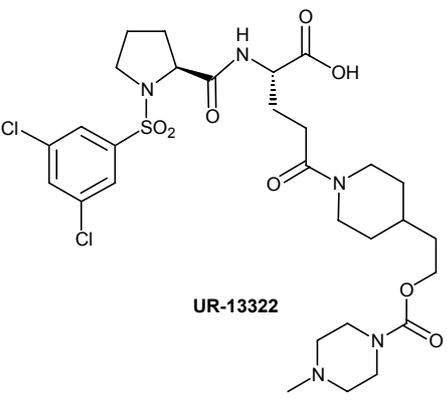
El resultado fue la obtención de la amida **169** con un 86,5 % de rendimiento, muy superior al obtenido con DCC/HBT. La hidrólisis del éster para obtener el **UR-13308** transcurrió con un 56,2 % de rendimiento similar al 55 % que obtuvimos en la primera síntesis

Tabla 2.5 Síntesis del UR-13308

Ácido	Amina	Acoplamiento	Hidrólisis
121	98	169	UR-13308
DCC/HBT		53 %	55 %
HBTU		86,5 %	56,2 %

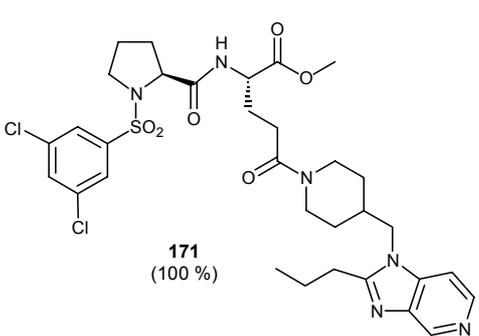
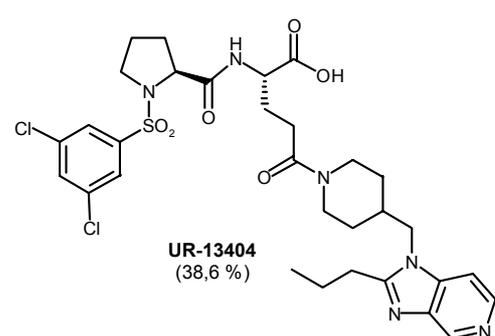
El **UR-13322** se preparó en la primera ocasión preparando el intermedio activado con la N-hidroxisucinimida y DCC del ácido **121** y el posterior acoplamiento con la amina **66**. La amida **170** no se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice y el crudo obtenido dio un peso prácticamente cuantitativo. La hidrólisis en LiOH del éster metílico se quedó en un 34,4 % a partir del crudo anterior. Debido al buen rendimiento del HBTU se repitió la amida **170** con este método de activación, y el rendimiento fue del 99 % después de purificar la amida mediante cromatografía sobre gel de sílice. La hidrólisis se desarrolló con un 51,5 % de rendimiento.

Tabla 2.6 Síntesis del UR-13322

Ácido	Amina	Acoplamiento	Hidrólisis
121	66	 <p>170</p>	 <p>UR-13322</p>
NHS/DCC		100 %	34,4 %
HBTU		99 %	51,5 %

En vista del buen resultado que nos había dado el HBTU en la preparación de amidas, los **UR-13404** y **UR-13495** se prepararon empleando esta metodología. Los resultados para la hidrólisis y para el acoplamiento son los descritos en la siguiente tabla:

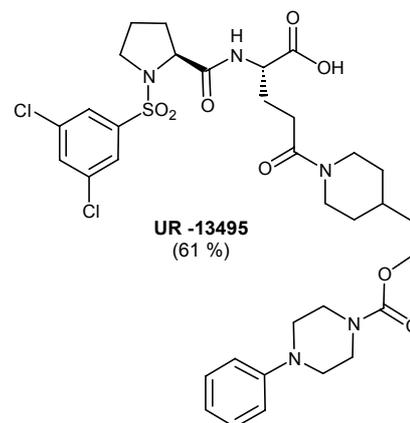
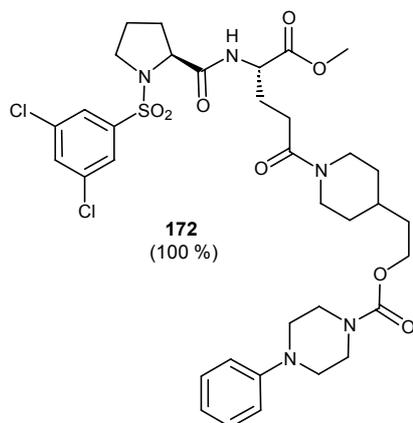
Tabla 2.7 Formación de amidas vía HBTU

Ácido	Amina	Ester (Rdto. Acoplamiento)	UR (Rdto. Hidrólisis)
121	100	 <p>171 (100 %)</p>	 <p>UR-13404 (38,6 %)</p>

Ácido	Amina	Ester (Rdto. Acoplamiento)	UR (Rdto. Hidrólisis)
-------	-------	----------------------------	-----------------------

121

75

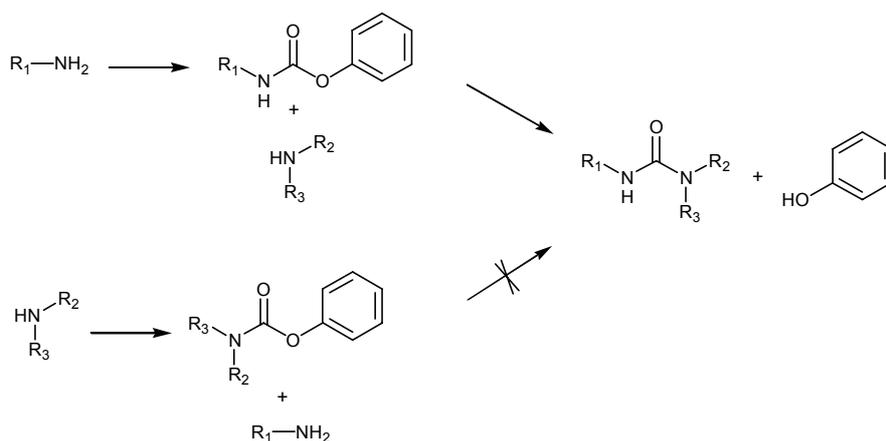


4.3 DERIVADOS DEL ÁCIDO (S)-2,3-DIAMINOPROPIONICO (DAP)

Los derivados del ácido (S)-2,3-diaminopropiónico (DAP) diseñados suponen la formación de una urea trisustituida en la cadena lateral de dicho aminoácido. Al abordar el diseño de la síntesis de estos compuestos, nos sorprendió la escasa literatura existente sobre este tema, más aún, cuando tanto las ureas trisustituidas como los derivados del ácido (S)-2,3-diaminopropiónico forman parte de un elevado número de fármacos: en una búsqueda sobre fármacos en cualquier fase clínica en la base de datos Integrity[®] de Prous Science²⁹ encontramos 4263 compuestos con ureas terciarias y 394 que contenían la funcionalidad DAP. Sin embargo tan solo 4^{30,31,32,33} compuestos (todos ellos en fase de *Drug Discovery*) eran ureas trisustituidas del DAP.

4.3.1 Antecedentes

Tanto por la experiencia del grupo como por la bibliografía existente sabíamos que las ureas trisustituidas, en general, podían sintetizarse a partir de la formación del carbamato de fenilo⁴⁵ (o del carbamato de p-nitrofenilo³⁴) de la amina primaria y posterior desplazamiento de éste por la amina secundaria. Sin embargo, si se formaba el carbamato de fenilo con la amina secundaria, la amina primaria no era capaz de desplazar el fenol, y la reacción no funcionaba⁴⁵ (Esquema 33).



Esquema 33

²⁹ www.integrity.prous.com

³⁰ Duggan, M. E., Hartmann, G. D., Hoffman, W., Ihle, N. C.; WO 98/18461

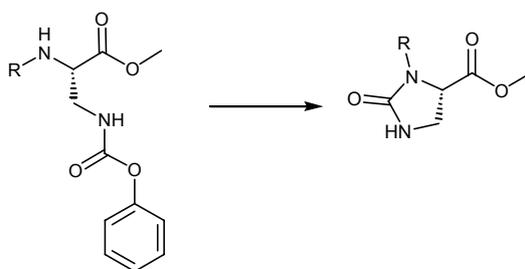
³¹ Smyth, M. S.; Rose, J.; Mehrotra, M. M.; Heath, J.; Ruhter, G.; Schotten, T.; Seroogy, J.; Volkots, D.; Pandey, A.; Scarborough, R. M.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, **2001**, 1289-1292

³² Takahashi, T. et al.; WO 02/24697

³³ Mehrotra, M.M.; Heath, J.; Pandey, A.; 219th ACS Natl. Meet. 2000 Abst. MEDI 183

³⁴ Yoon, H., et al.; *Org. Prep. Proc. Int.*, 28(2), **1996**, 173-177

Esta aproximación sintética, no obstante, no era aplicable a la preparación de los derivados del DAP que pretendíamos obtener, ya que el carbamato de fenilo intermedio preparado a partir de la amina primaria sería susceptible de formar una imidazolidinona tal y como está referenciado³⁵ (Esquema 34)



Esquema 34

Para los derivados del DAP tan solo algunas patentes describían la formación de este tipo de ureas.³⁶ Dentro de estas patentes el método más usual era el empleo de fosgeno para crear un cloruro de carbamoilo intermedio con la amina secundaria y éste es el que actúa como agente acilante sobre la amina primaria de la cadena lateral del DAP N-acil sustituido. Estas reacciones suelen hacerse borboteando fosgeno gas sobre una solución de amina secundaria y a menudo a temperatura elevada.

A finales de los años 80, Eckert *et. al.*³⁷ destacaron el uso del trifosgeno (bis(triclorometil)carbonato), como un sustituto del fosgeno seguro y fácil de manejar.

En 1994, Randad y Majer³⁸, describieron la formación de ureas asimétricas con diferentes aminoácidos en presencia de trifosgeno y DIEA en CH₂Cl₂. Inicialmente su intención era preparar ureas simétricas pero vieron que el primer equivalente de amina se consumía rápidamente para dar un intermedio no polar que en su caso al ser aminas primarias generaban el isocianato (detectado por IR), y cuando usaban aminas secundarias se obtenía el cloruro de carbamoilo. Este intermedio reaccionaba lentamente con el segundo equivalente de amina y de esta manera ampliaron la metodología a la preparación de ureas asimétricas con unos rendimientos excelentes.

Si bien Randad y Majer estudiaban la formación de ureas asimétricas con trifosgeno en diferentes substratos no aplicaban esta metodología a derivados del DAP y si preparaban diferentes ureas con aminoácidos comprobando que no se producía racemización del centro quiral en ningún caso.

³⁵ Cook, G. R., et al.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38, **1999**, 110-113

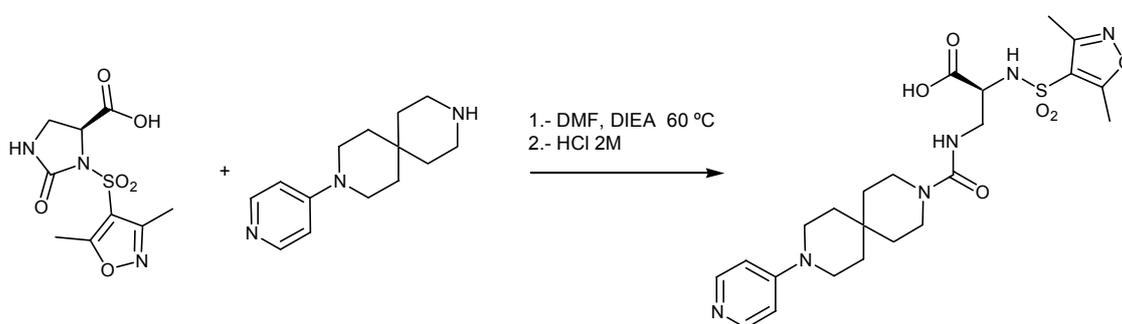
³⁶ a) Faull, A. W., Mayo, C. M., Preston, J., Stocker, A.; WO/9610022, b) Floyd, D., Loots, M. J.; US H642 (Statutory Inventor Registration), c) Zahler, R., Koster, W. H., Slusarchyk, W. A.; EP 138407

³⁷ Eckert, H., Foster, B.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 26, **1987**, 894

³⁸ Randad, R. S., Majer, P.; *J. Org. Chem.*, 59, **1994**, 1937-1938

En 1996 Duggan *et al.* de Merck & Co. (USA)⁶⁴ en una patente de antagonistas de la $\alpha_v\beta_3$ o del receptor de la vitronectina, preparaban ureas trisustituidas del DAP. Las preparaban añadiendo una solución de trifosgeno (0,33 eq.) en CH_2Cl_2 sobre una solución de la amina secundaria (1 equiv.) y DIEA (1,2 eq.). Acabada la adición se agitaba 20 minutos y se adicionaba una solución del derivado del DAP (1 eq.) y DIEA (2,4 ev.) en CH_2Cl_2 . En esta patente no daban rendimientos de la operación.

Recientemente, investigadores de Lilly y COR Therapeutics encabezados por R. M. Scarborough obtenían una urea trisustituida derivada del DAP cuya finalidad era su uso como antagonista de la GPIIb-IIIa mediante apertura nucleófila de una imidazolidinona con una amina secundaria en DMF y DIEA⁶⁴ (Esquema 35)

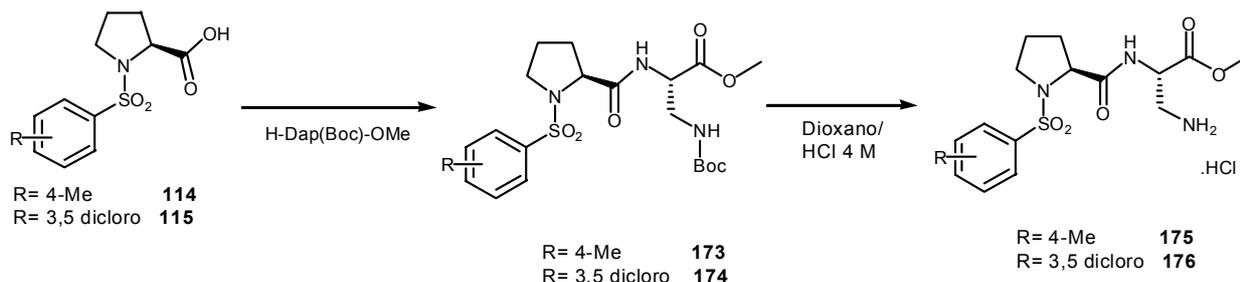


Esquema 35

4.3.2. Preparación de los derivados del DAP

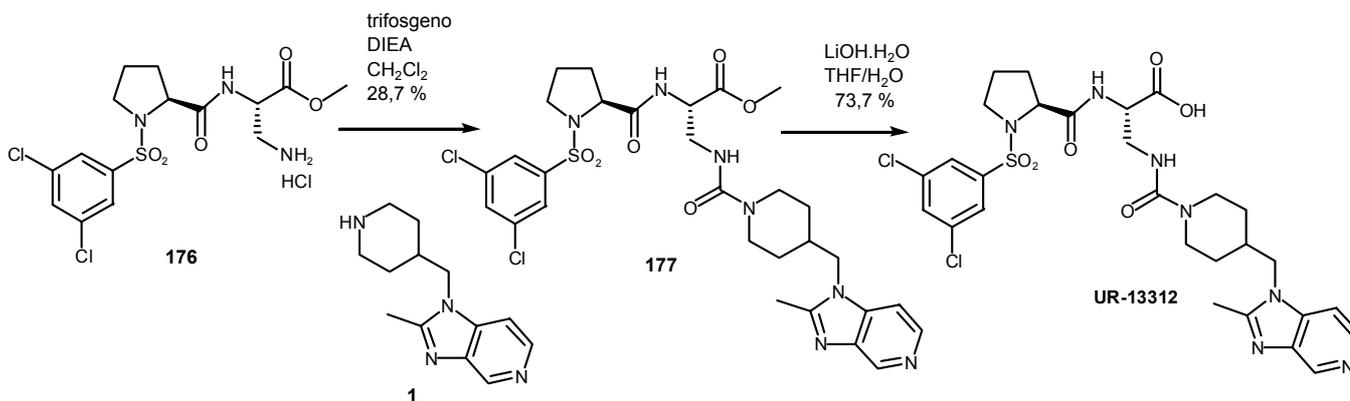
De acuerdo con estos precedentes decidimos preparar una serie de ureas trisustituidas siguiendo la VÍA 1 del esquema general 3. Esto implica un planteamiento similar al adoptado en la síntesis de los derivados del ácido glutámico. En primer lugar preparamos los intermedios comunes **175** y **176** (esquema 36), y a partir de aquí se fueron introduciendo las diferentes aminas con las que se generaron las consiguientes ureas.

Partiendo de los ácidos **114** y **115** se formaron las amidas **173** y **174** utilizando la metodología descrita en el apartado 4.2.2, es decir, activando dichos ácidos con DCC y N-hidroxisuccinimida para acoplarlos con el H-DAP(Boc)-OMe.HCl (compuesto comercial, Bachem, 5 g, 480 CHF). Este acoplamiento da un rendimiento del 80 %. Después de desproteger el grupo Boc, se obtuvieron las aminas **175** y **176**.



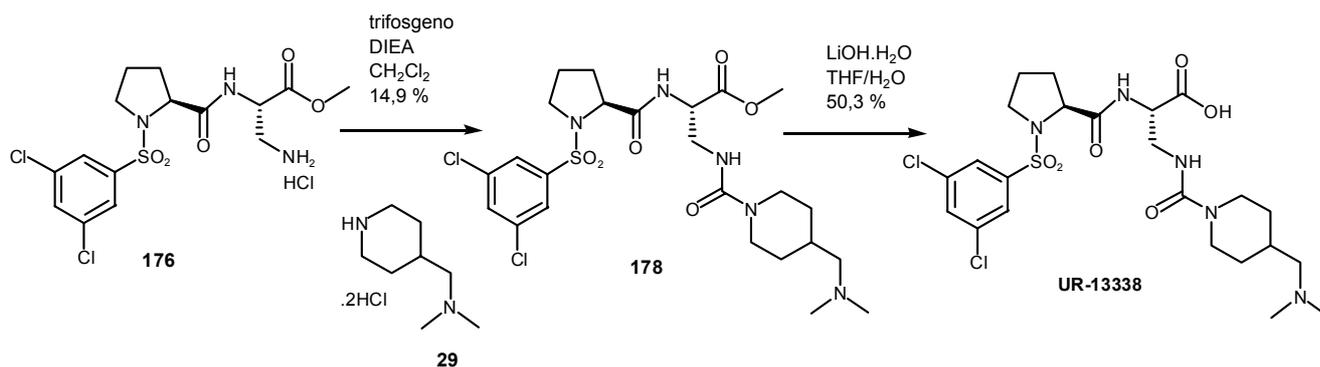
Esquema 36

Siguiendo la metodología de los investigadores de Merck & Co. preparamos el **UR-13312** mediante la formación de la urea **177** a partir de la amina **1** y el intermedio **176**, que al ser hidrocloreto necesitó 1 equivalente adicional de DIEA, con un rendimiento del 28,7 %. La urea formada se hidrolizó como el resto de la serie con 2 equivalentes de LiOH.H₂O en una mezcla de THF/H₂O 1:1. El producto se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice del crudo de reacción concentrado a pH=7 (de igual manera que se realizó con su análogo derivado del ácido glutámico, el **UR-13221**) utilizando como eluyente CHCl₃:MeOH 25 %.



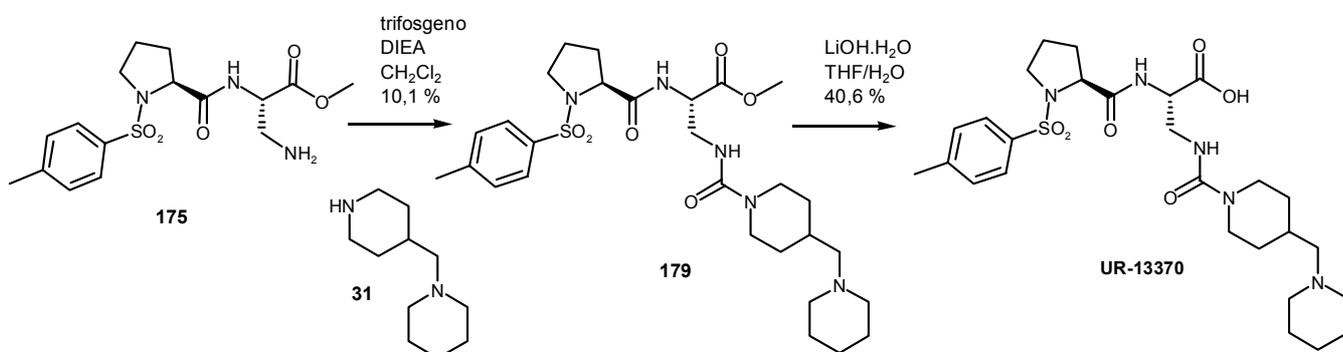
Esquema 37

De forma análoga preparamos el **UR-13338**, partiendo de la amina **29**, que es dihidrocloreto, y del intermedio **176**, obtuvimos la urea **178** con un rendimiento del 15 % aproximadamente. La hidrólisis final en LiOH nos proporcionó el **UR-13338** después de purificarlo mediante cromatografía sobre gel de sílice pero utilizando como eluyente CHCl₃:MeOH:NH₃ (10:2:0,5).



Esquema 38

La causa de los bajos rendimientos obtenidos, especialmente en esta última operación, podía estar relacionada con el hecho de utilizar aminas en forma de hidrocloreuro y con la cantidad de DIEA extra introducida en el medio de reacción. Con el fin de valorar esta hipótesis, en la preparación del **UR-13370** liberamos tanto la amina **175** como la **31** con NaHCO₃ (sat). De esta manera, siguiendo la misma metódica pero con las aminas libres obtuvimos la urea **179** con un rendimiento del 10 %. Posteriormente se hidrólizó el éter metílico y se purificó para obtener 19 mg del **UR-13370**.



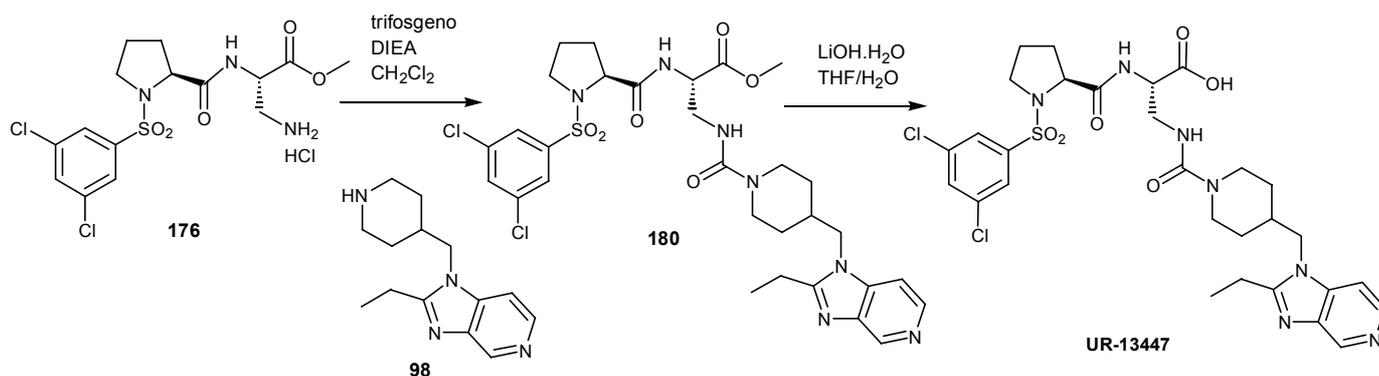
Esquema 39

Dado que lejos de mejorar nuestros rendimientos en la formación de ureas, estos empeoraban, decidimos probar las condiciones experimentales descritas por Randad y Majer, las cuales invertían el orden de adición de la amina secundaria y el trifosgeno. En esta metódica se disolvía primero el trifosgeno en CH₂Cl₂ y entonces le añadían gota a gota la solución de la amina secundaria (libre o hidrocloreuro).

Se utilizó este procedimiento a partir de 1 equivalente de la amina **98** dihidrocloreuro. Para ello se disolvieron 0,4 equivalentes de trifosgeno en CH₂Cl₂ y sobre esta solución se añadió la amina **98** con 4 equivalentes de DIEA en CH₂Cl₂, bajo atmósfera de argón. Se agitó 30 min a temperatura ambiente y se adicionó una

solución que contenía 1 equivalente de la amina **176** y 3 equivalentes de DIEA en CH_2Cl_2 . Después de tratar y purificar la reacción no se obtuvo el producto final deseado.

Sin embargo cuando llevamos a cabo la misma reacción pero partiendo de la amina **98** libre se obtuvieron 23 mg de la urea **180**, lo que supone un rendimiento del 7 %. Después de hidrolizar el éster metílico con LiOH se obtuvo el **UR-13447**.



Esquema 40

Con este resultado concluimos que las condiciones experimentales descritas por Randad y Majer no nos suponían ninguna mejora en la obtención de ureas trisustituidas así que decidimos probar otras posibilidades.

4.3.3 Formación de ureas vía apertura nucleófila de imidazolidinonas

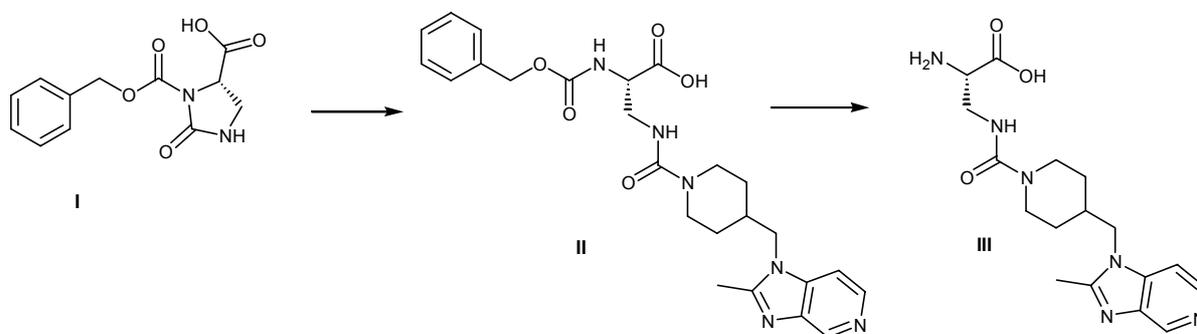
Habíamos comentado que uno de los motivos por los cuales no utilizábamos intermedios tipo carbamato de fenilo para generar ureas era la formación intramolecular de una imidazolidinona (apartado 4.3.1). Con más motivo rehusamos utilizar en primera instancia intermedios que conllevaran la formación de un isocianato en esta posición. Sin embargo en el apartado 4.3.1 habíamos comentado que Scarborough y colaboradores describían como una N-sulfonilimidazolidinona podría ser abierta nucleófilicamente por una amina secundaria para formar una urea trisustituida derivada del DAP. Esta es la única referencia encontrada para esta reacción y no hay ejemplos de aperturas de N-carboniloxiimidazolidinonas ni de N-carbonilimidazolidinonas.

Así bien, a pesar de no existir precedentes, decidimos intentar la síntesis de la urea **177** (que con un 28,7 % de rendimiento era nuestro mejor resultado) utilizando la

metódica de Scarborough y colaboradores con la finalidad de mejorar este rendimiento y de esta manera ampliar las posibilidades de esta reacción.

El artículo original sólo indica que se lleva a cabo la reacción en DMF en presencia de DIEA y calentando a 60 °C. Pero no indica la relación molar ni el tiempo de reacción.

Partiendo del ácido (S)-2-oxo-1-benciloxycarbonilimidazolidina-5-carboxílico (I), (esquema 41), como sustrato se ensayaron las primeras condiciones experimentales. Esto supone una nueva vía de síntesis de los derivados del DAP, ya que generaríamos una urea intermedia derivada del DAP con el grupo amino protegido con el grupo Z. Este se debería desproteger mediante cualquiera de los métodos descritos para ello, y en ese momento la amina preparada sería susceptible de ser derivatizada mediante el acoplamiento con los diferentes ácidos **114** y **115**.



Esquema 41

Nosotros introdujimos 1 equivalente de la imidazolidinona I, 1 equivalente de amina **1** liberada y 1 equivalente de DIEA en DMF y calentamos a 90 °C durante 18 h. El crudo de reacción se analizó mediante HPLC-MS siguiendo las condiciones generales descritas en la parte experimental y solo se detectaron los productos de partida y nada del producto II pretendido. Esto hace pensar que la imidazolidinona I es muy estable y difícil de atacar nucleófilamente.

Si bien las primeras condiciones ensayadas para esta reacción no nos dieron los resultados esperados, decidimos insistir en la optimización de esta nueva vía de formación de ureas derivadas del DAP, dado nuestro interés en esta serie de compuestos.

Puesto que sospechábamos que se trataba de una reacción que necesitaba unas condiciones más enérgicas y animados por los buenos resultados que nos ha dado en nuestro laboratorio el uso del microondas en sistemas que necesitan largos tiempos de reacción con temperatura elevada, pensamos que esta metodología sería aplicable a nuestro propósito de apertura nucleófila de imidazolidinonas.

Los primeros aparatos de microondas que fueron utilizados para acelerar reacciones orgánicas, en los años 80,³⁹ eran simples aparatos domésticos. Pronto, los buenos resultados de estos sistemas, propiciaron el desarrollo de equipos enfocados exclusivamente para su uso en síntesis orgánica. Los beneficios del uso de microondas respecto a las condiciones clásicas de calentamiento, se podrían resumir en los siguientes: (1) elevadas velocidades de reacción, (2) mejores rendimientos, (3) elevada homogeneidad en la distribución de la temperatura, (4) estereo- o regioselectivades elevadas, (5) reducción de subproductos, (6) reducción del volumen de disolvente, incluso en muchos casos no es necesario el uso de disolvente, (7) formación de productos que no se consiguen con métodos convencionales y (8) mejora y simplificación de muchos métodos de síntesis clásicos.⁴⁰ En general se produce una modificación de los parámetros de activación ($\Delta H^\ddagger \downarrow$, $\Delta S^\ddagger \downarrow$, etc..), es decir el campo del microondas actúa disminuyendo la energía de activación de la reacción.⁴¹

Existen dos maneras de irradiar en un sistema de microondas: mediante **aplicador monomodo**, donde se enfocan las ondas electromagnéticas en una dimensión muy precisa, lo cual permite una distribución homogénea del campo electromagnético, o mediante **aplicador multimodo**, donde las ondas electromagnéticas se distribuyen heterogéneamente por toda la cavidad del aparato.⁴²

En nuestro laboratorio disponemos de un equipo de microondas multimodo Milestone Ethos Synth, con el cual hemos realizado todos nuestros experimentos.

Decidimos introducir en nuestro aparato una mezcla de amina libre **1**, imidazolidinona **I** y DIEA en DMF de igual composición a la que habíamos preparado anteriormente, y aplicar una secuencia de tiempos y temperaturas (detallada en la tabla 3.1) utilizada por nuestro equipo para reacciones que requieren altas temperaturas:

Tabla 3.1

Intervalo	Tiempo	Temperatura	Potencia
1	1 min 30 seg	130 °C	435 W
2	40 min	140 °C	442 W

El análisis por HPLC-MS de este crudo nos reveló la presencia de un 24 % del producto deseado. Este mismo crudo se volvió a introducir en el microondas y se aplicó la siguiente rutina:

³⁹ a) Gedye, R. et al.; *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 279-282, b) Giguere, R. et al.; *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4945-4948

⁴⁰ Larhed, M., Hallberg, A.; *Drug Discovery Today*, (6), 8, **2001**, 406-416

⁴¹ Loupy, A., et al.; *Pure and Applied Chemistry*, 73, 1, **2001**, 193-198

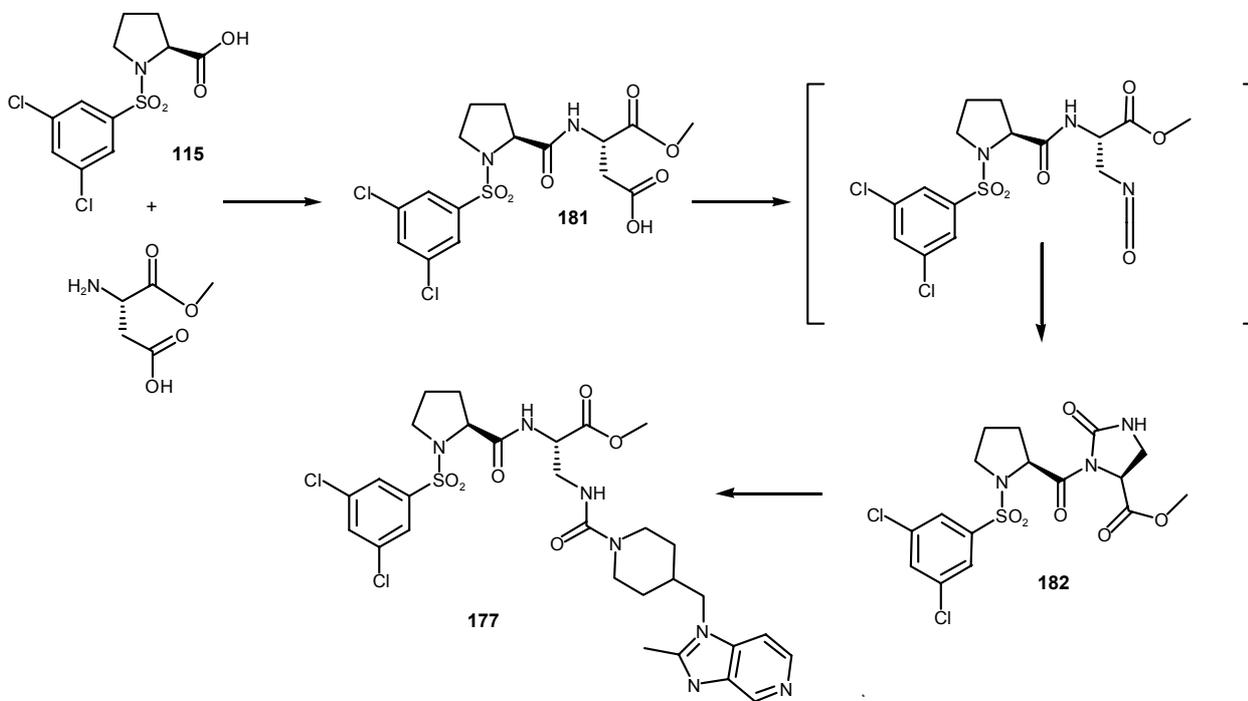
Tabla 3.2

Intervalo	Tiempo	Temperatura	Potencia
1	1 min 30 seg	140 °C	465 W
2	40 min	150 °C	470 W

sin embargo en el posterior análisis de este crudo, no sólo no aumentamos la cantidad de producto deseado, sino que se perdió el 24 % que habíamos obtenido. Este hecho está referenciado en muchas metódicas que hacen uso del microondas, donde un exceso de condiciones enérgicas puede descomponer la molécula.⁴³

Estos resultados nos hicieron pensar en retomar nuestra vía de síntesis original, donde introducíamos la amina sobre el derivado del DAP convenientemente funcionalizado. En lugar de utilizar la imidazolidinona **I** como producto de partida sintetizamos el intermedio **182**. Esto suponía una novedad adicional, ya que la imidazolona **182** contenía un éster metílico y no un ácido carboxílico como sucedía en los ejemplos anteriores, por lo que los resultados podían ser también diferentes (se podía formar una amida).

El compuesto **182** se preparó mediante el acoplamiento del ácido **115** y el éster 1-metílico del ácido L-aspártico o H-Asp-OMe, tal y como habíamos hecho con el H-Glu-OMe en el apartado 4.2.2, es decir con N-hidroxisuccinimida y DCC con un rendimiento del 94 %.



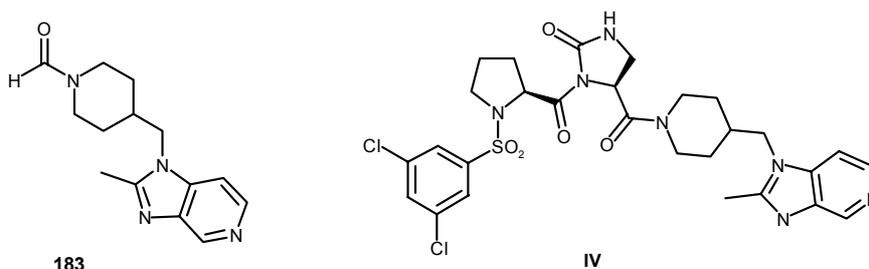
Esquema 42

⁴² Wathey, B.; *Drug Discovery Today*, (7), 6, **2002**, 373-380

⁴³ Loupy, A., et al.; *Synthesis*, (9), **1998**, 1213-1234

El ácido **181** se sometió a una transposición de Curtius con difenilfosforilazida (DPPA)⁴⁴ y se generó un isocianato intermedio que cicló intramolecularmente para obtener la imidazolidinona deseada **182** en un rendimiento prácticamente cuantitativo.

La apertura nucleófila de la imidazolidinona **182** con 1 equivalente de la amina **1** liberada, DIEA y DMF, se llevó a cabo en el microondas aplicando la secuencia de la tabla 3.1. Después de analizar por HPLC-MS el crudo se detectó un 45 % de la urea **177**. Como en el experimento anterior, decidimos volver a introducir el crudo en el microondas y le aplicamos la secuencia descrita en la tabla 3.2. También en este caso el resultado fue negativo y el nuevo crudo presentaba tan solo un 23,7 % del compuesto **177**. Antes de dar por definitivo este resultado, ensayamos unas nuevas condiciones, por un lado se introdujeron 1,5 equivalentes de la amina **1** y se aplicó directamente la rutina de la tabla 3.2. El análisis del crudo indicaba un 70 % de producto deseado, mezclado con amina **1** y la formilamina **183** mientras que no se detectaba nada de la amida IV, posible subproducto de este tipo de reacción



Después del tratamiento y la posterior purificación mediante cromatografía sobre gel de sílice, obtuvimos el compuesto **177** en un rendimiento del 53,7 %. Finalmente se obtuvo el **UR-13312** después de hidrolizar el éster metílico con LiOH.H₂O tal y como habíamos hecho en la anterior síntesis, con un 75 % de rendimiento.

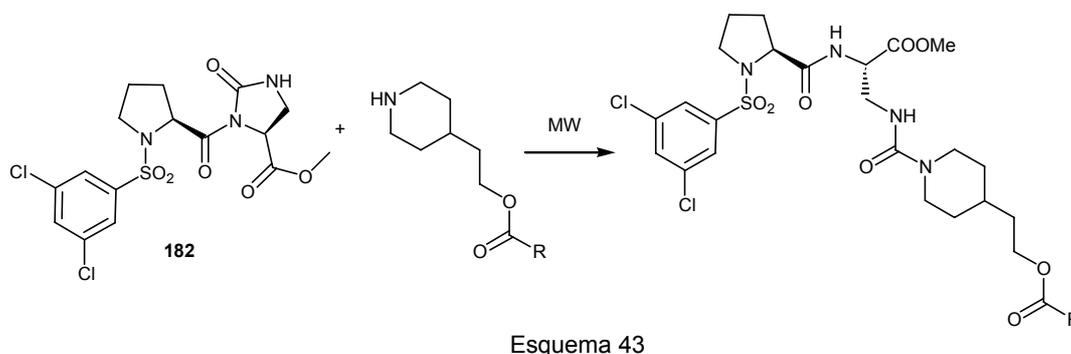
Sobre este compuesto comprobamos que el nuevo método de síntesis realmente no afectase a la quiralidad de la molécula. Se realizaron las rotaciones ópticas del **UR-13312** generado vía trifosgeno y vía apertura de la imidazolidinona **182** y obtuvimos rotaciones ópticas del mismo orden:

Tabla 3.3

UR-13312	$[\alpha]_{20}$ (c=1, MeOH)
Vía trifosgeno	-57 °
vía imidazolidinona 182	-60 °

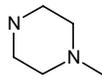
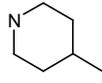
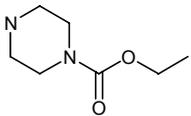
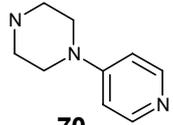
⁴⁴ Olsen, R. K., Hennen, W. J., Wardle, R. B.; *J. Org. Chem.* 47, **1982**, 4605-4610

El excelente resultado obtenido con el uso del microondas en la formación de ureas hizo que decidiéramos preparar una serie de ureas empleando dicha metodología. A partir del precursor **182** y una serie de 4-[2-(heterociclocarboniloxi)]piperidinas, según el esquema 43 de síntesis, se repitieron las condiciones descritas en la tabla 3.2 para la apertura nucleófila de dicho intermedio.



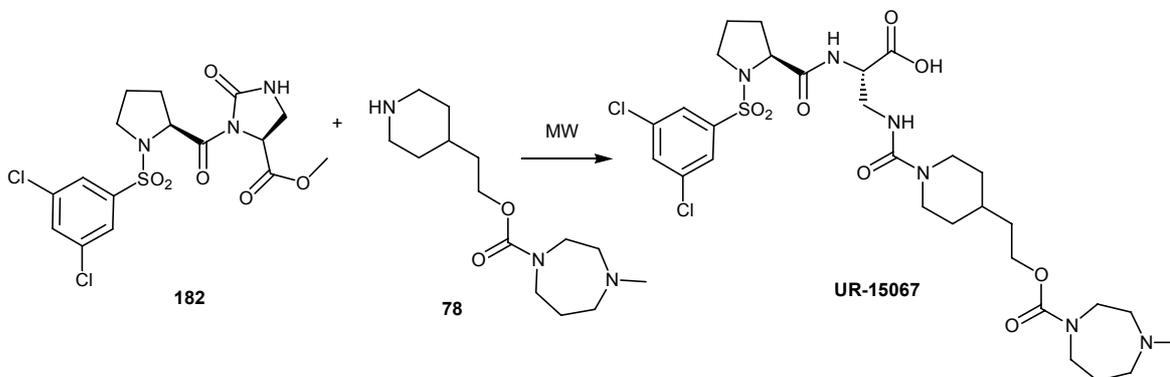
Los resultados tanto para la formación de las ureas como de las consiguientes hidrólisis son los detallados a continuación:

Tabla 3.4

R	Rdto. Urea (%)	Rdto. Hidrólisis (%)	UR
 66	184 (41,5 %)	60,5 %	UR-13442
 76	185 (51,3 %)	58,7 %	UR-15064
 77	186 (28,2 %)	27,3 %	UR-15068
 70	187 (33,3 %)	69 %	UR-15069

Cuando llevamos a cabo la misma reacción de apertura de la imidazolidinona **182** con la amina **78**, se produjo la hidrólisis del éster metílico en el mismo paso, con lo que se obtuvo directamente el **UR-15067**. La explicación de este hecho solamente puede

encontrarse en el tratamiento de la reacción donde pudieron darse unas condiciones básicas durante un tiempo más prolongado que en el resto de compuestos, y por este motivo se produjo la hidrólisis del éster en este caso concreto.



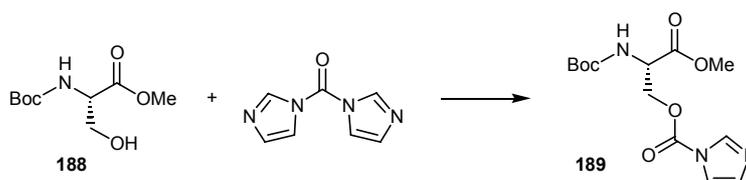
Los resultados de esta serie de compuestos se sitúan de media entre un 30 y 50 % de rendimiento. De esta manera podemos concluir, que de entre las diferentes vías de síntesis que hemos empleado para la formación de las ureas, la que transcurre a partir de la apertura de la imidazolidinona **182** en el microondas, es claramente la más favorable. Los rendimientos obtenidos al aplicar esta metodología los consideramos muy buenos vistas las dificultades que conllevan la preparación de este tipo de ureas y dado que no existen comparaciones directas con experimentos convencionales. Se abre una nueva vía que además de mejorar los resultados anteriores es potencialmente optimizable y dar unos resultados mejores a los obtenidos en esta primera ocasión.

4.4 DERIVADOS DE LA SERINA

La síntesis de carbamatos a partir del grupo hidroxilo de la serina y aminas secundarias, es una reacción escasamente referenciada en la literatura. Los trabajos realizados al respecto han seguido dos aproximaciones diferentes: por un lado mediante la formación de cloruro de carbamoilo a partir de la amina secundaria y fosgeno⁴⁵ que se emplea como agente acilante de la serina, o por otro lado la formación de un intermedio acilado de la serina el cual se somete a un desplazamiento nucleofílico en presencia de la amina secundaria.^{46,47,48,49}

Como hemos comentado en el apartado 4.3 para la formación de ureas cuando el precursor era el ácido (s)-2,3-diaminopropiónico, el uso de fosgeno en el laboratorio es desaconsejable y procuramos evitar su uso siempre que sea posible, por ese motivo la segunda aproximación nos parece más apropiada.

Los autores que optaban por la activación de la serina, utilizaban principalmente N,N'-carbonildiimidazol (CDI) para este primer paso. Lecouvey y Leroux⁸² describen la formación del intermedio **189** a partir de Boc-Ser-OMe y CDI con un 91 %



Esquema 45

Los autores preparaban este compuesto haciendo reaccionar 1 mmol de CDI y 1 mmol de Boc-Ser-OMe en 15 mL de MeCN durante 12 h a temperatura ambiente.

La formación de especies activadas de la serina, presenta el inconveniente de la inestabilidad de estos intermedios, ya que la acidez del protón α -aminoácido provoca fácilmente una reacción de β -eliminación en presencia de una base, y genera el consiguiente derivado α,β -insaturado (esquema 46), siendo ésta una reacción de eliminación extensamente descrita en la literatura.

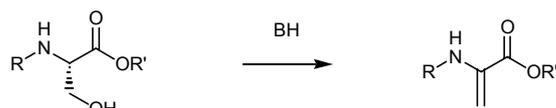
⁴⁵ a) Bergel, F., Wade, R.; *J. Chem. Soc.*, **1959**, 941-945, b) Bergel, F., Wade, R.; *J. Chem. Soc.*, **1967**, 592-595

⁴⁶ Lubell, W., Rapoport, H.; *J. Org. Chem* **54**, **16**, **1989**, 3824-3831

⁴⁷ Wulff, G., Böhnke, H., Klinken, H. T.; *Liebigs Ann. Chem.*, **1988**, 501-505

⁴⁸ Lecouvey, M., Leroux, Y.; *Synth. Commun.*, **30**(1), **2000**, 23-30

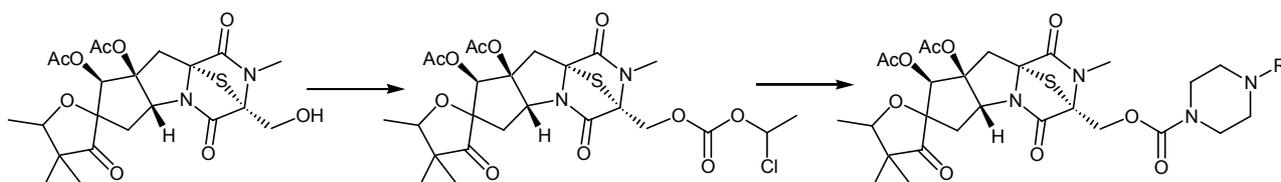
⁴⁹ Harada, S., Funabashi, Y., Horiguchi, T., Iinuma, S., Tanida, S.; *J. Antibiot.*, **47**, **11**, **1994**, 1202-1218



Esquema 46

La Boc-Ser-OMe es susceptible de sufrir β -eliminación en diferentes medios de reacción: EDC/CuCl,⁵⁰ MsCl⁵¹ o TosCl/NEt₃,⁵² PPh₃/DEAD,⁵³ DBU,⁵⁴ etc. incluso en CDI/NEt₃.⁵⁵ Lecouvey y Leroux no utilizan NEt₃ y por lo tanto pueden aislar el producto con un alto rendimiento.

La otra metódica descrita para formar un intermedio estable de la serina es la propuesta por Harada y colaboradores,⁸³ de Takeda Chemical Industries, en una síntesis de antibióticos, donde usaban el cloroformiato de α -cloroetilo como agente activante (esquema 47). Estos investigadores disolvían el precursor derivado de la serina en diclorometano y 1,5 equivalentes de piridina a 0 °C. Se adicionaba cloroformiato de α -cloroetilo (1,2 equivalentes) y se hacía reaccionar 2,5 h a temperatura ambiente. El rendimiento de este primer paso era del 97 %



Esquema 47

A continuación este intermedio se sometía al desplazamiento nucleofílico con piperazinas N-sustituidas y reportaban rendimientos cercanos al 70 % para este paso de síntesis. En este caso no podía haber β -eliminación y por lo tanto, los rendimientos eran elevados. No obstante es una alternativa a tener en cuenta para preparar carbamatos derivados de la serina.

Decidimos emplear la metódica desarrollada Lecouvey y Leroux que describía la formación del compuesto **189** partiendo de la L-serina.HCl. Ésta se protegía en forma de Boc-Ser-OMe (**188**) mediante Boc₂O en CHCl₃ y NEt₃ con un 88 % de rendimiento.

⁵⁰ a) Biagini, S. C. G., Gibson, S. E., Keen, S. P.; *J.Chem.Soc.Perkin Trans.1*, 16, **1998**, 2485-2500

b) Srivastava, V. P., Roberts, M., Holmes, T., Stammer, C. H.; *J.Org.Chem.*, 54, 25, **1989**, 5866-5870.

⁵¹ Carlstroem, A. S., Frejd, T.; *Synthesis*; 6; **1989**; 414-418

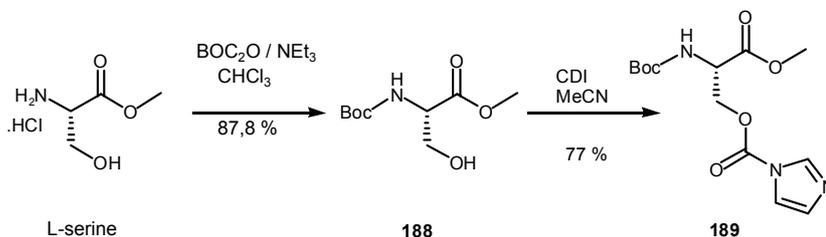
⁵² Gibson, S. E., Guillo, N., Middleton, R., Thuilliez, A., Tozer, M.; *J.Chem.Soc.Perkin Trans.1*, 4; **1997**, 447-456

⁵³ Costerousse, G., Cagniant, A., Teutsch, G.; *Bull.Soc.Chim.Fr.*, 1, **1988**, 151-159

⁵⁴ Goodall, K., Parsons, A.; *Tetrahedron Lett.*; 36, 18, **1995**, 3259-3260

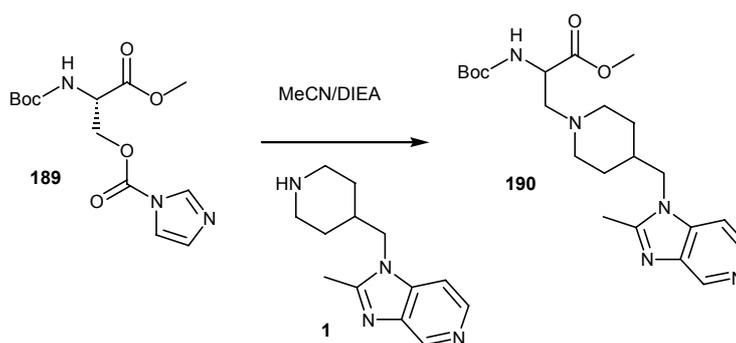
⁵⁵ Andruszkiewicz, R., Czerwinski, A.; *Synthesis*, 11, **1982**, 968-969

A continuación se preparó el intermedio **189** siguiendo la referencia indicada. Solamente tratamos la mitad de la reacción según la metódica descrita por los autores. Esta porción se analizó, y se cuantificó el rendimiento de la operación que se cifró en un 77 %. La mitad sin tratar que se encontraba en forma de solución en acetonitrilo, se usó para el paso siguiente.



Esquema 48

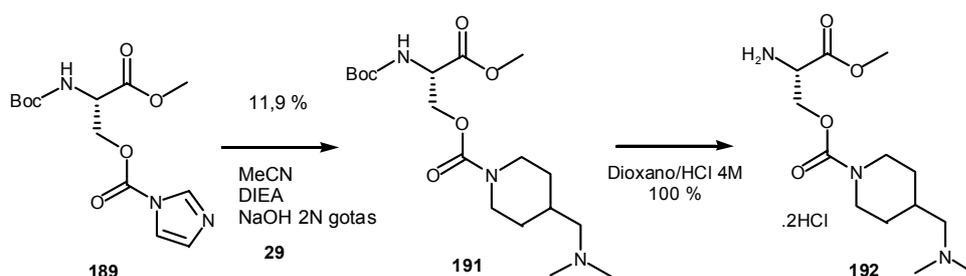
En primer lugar, sobre una solución de la amina **1** en DIEA y acetonitrilo, se adicionó la solución que contenía el intermedio **189**, pero en lugar de obtener el carbamato pretendido, solamente se obtuvo la amina **190**.



Esquema 49

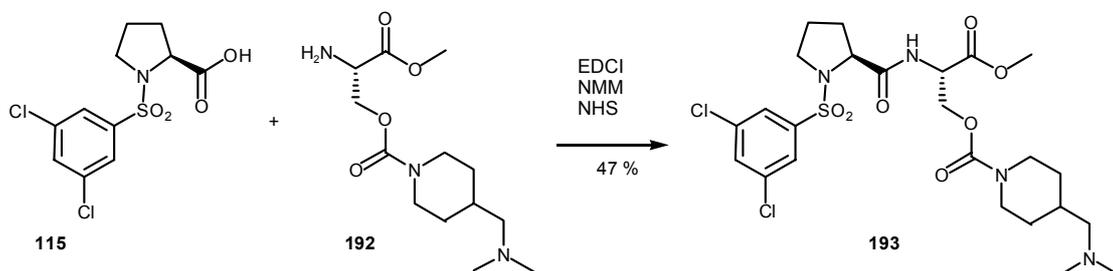
Este resultado nos confirmó la facilidad con la que el intermedio **189** eliminaba para formar el derivado α,β -insaturado que a su vez se adiciona fácilmente sobre la amina **1** para formar el compuesto descrito **190**.

Paralelamente realizamos la misma operación pero con la amina **29**. En este caso si que obtuvimos el carbamato deseado, aunque con un moderado 12 % de rendimiento. El carbamato **191** se desprotegió con dioxano/HCl 4M con un rendimiento cuantitativo.



Esquema 50

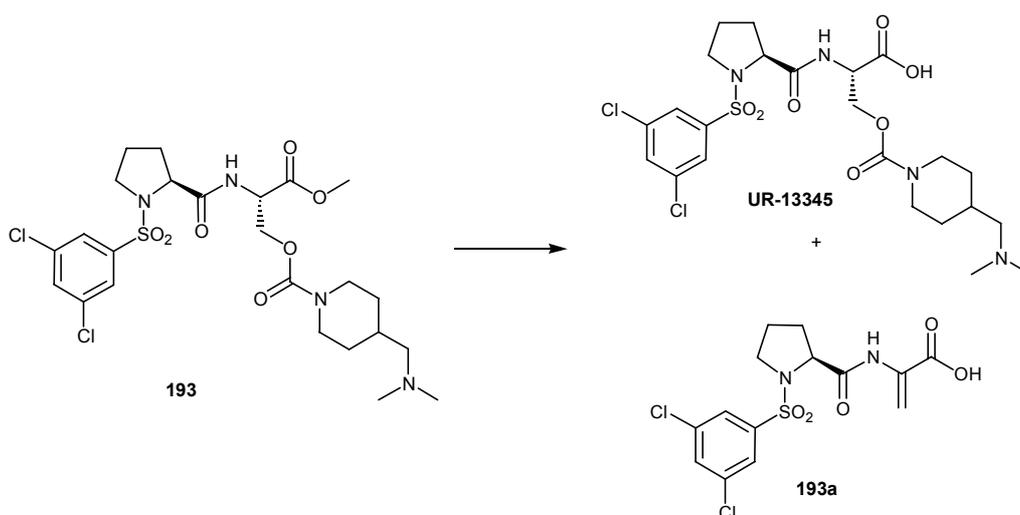
La amina **192** se acopló con el ácido **115** utilizando EDCI.HCl y N-hidroxisuccinimida como sistema de acoplamiento tal y como habíamos descrito hecho en el apartado 4.2 con un 47 % de rendimiento.



Esquema 51

Finalmente el éster **193** se hidrolizó siguiendo la metodología general empleada hasta el momento, es decir, 2 equivalentes de LiOH.H₂O en THF/H₂O. El análisis por HPLC-MS del crudo de reacción revela la presencia de una gran proporción del subproducto de eliminación **193a**. Este hecho indica que los carbamatos de la serina también son productos inestables en medio básico y precursores de ácidos α,β -insaturados. Por este motivo consideramos a este tipo de derivados como no aconsejables para un posterior desarrollo farmacológico desde el punto de vista de la estabilidad.

El **UR-13345** lo obtuvimos purificando a través de un cartucho de sílica Supelco Supelclean LC-Si. En primer lugar eluimos con CHCl₃:MeOH 20 % y se recogió el producto de eliminación **193a** (y otras impurezas minoritarias), y seguidamente se eluyó con una mezcla CHCl₃:MeOH:NH₃ 10:3:1 y obtuvimos 6 mg del **UR-13245**.



Esquema 52

4.5 OBTENCIÓN DE LOS PRODUCTOS FINALES

El paso final de esta secuencia sintética tal y como hemos indicado se trataba de una hidrólisis del éster metílico en medio básico (con 2 equivalentes del $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ en $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$). Si bien son unas condiciones de hidrólisis muy referenciadas⁵⁶ y que deberían ser cuantitativas, los rendimientos en la obtención de los productos finales deseados son en algunos casos bajos y unos pocos muy bajos. Esto se debe principalmente a las dificultades de aislamiento que en algunos casos se dieron.

Con los medios de análisis a nuestra disposición, podemos afirmar que realmente la hidrólisis del éster es prácticamente cuantitativa tal como era previsible, que no suelen quedar productos de partida en el medio de reacción, y que normalmente tampoco se ven subproductos generados en el medio básico de la reacción al tratarse de condiciones muy suaves. Los espectros de protón de las moléculas finales no revelaban la presencia de impurezas orgánicas, y los cromatogramas de HPLC-MS obtenidos en las condiciones descritas en la parte experimental, tampoco indican la presencia de impurezas por encima de un 10 %. Por lo tanto las técnicas de purificación que empleamos estaban destinadas a separar del medio de reacción el LiCl formado al añadir HCl para protonar los ácidos preparados. La presencia de esta sal en el producto final la cuantificaremos mediante el análisis elemental de dichos compuestos (siempre que disponíamos de cantidad de muestra suficiente).

Al tratarse de moléculas destinadas a un *screening* o cribado primario, que han superado los análisis referenciados (^1H -RMN, HPLC-MS) ajustamos las fórmulas moleculares de los URs finales suponiendo LiCl y H_2O (son productos higroscópicos en muchos casos) como impurezas con el fin de obtener un peso molecular aproximado. Este dato es necesario para preparar las soluciones en DMSO que se usarán en el *screening*. No dábamos tanta importancia a discernir si teníamos diferentes proporciones de LiCl y H_2O , solamente si una molécula fuese seleccionada para estudios posteriores y fuesen necesarios nuevos lotes, nos interesaríamos en estos aspectos.

4.5.1 Técnicas de aislamiento y purificación

Dadas las diferentes naturalezas de los compuestos obtenidos no podemos desarrollar un método de purificación común a todos ellos. Por otro lado el LiCl es una

⁵⁶ Chen, Y.; Bilban, M.; Foster, C. A.; Boger, D. L.; *J.Amer.Chem.Soc.*, 19; **2002**, 5431-5440.

sal relativamente soluble en disolventes orgánicos o mezclas de estos (CHCl_3 :MeOH 10 %). Así dependiendo del carácter ácido-base de cada compuesto optamos por un método de purificación u otro.

Todos los compuestos preparados presentan un ácido carboxílico con un $\text{pK}_a = 3-4$ y por otro lado las diferentes aminas acopladas a la cadena lateral de cada aminoácido pueden contener funcionalidades básicas como aminas secundarias o terciarias de $\text{pK}_a = 9-10$ o heterociclos con diferentes pK_a en función de la naturaleza de estos.

En el caso de que este segundo fragmento de la molécula solo contenga grupos funcionales neutros, el compuesto final será un ácido y puede obtenerse por precipitación y filtración en medio acuoso ácido. De esta forma se obtuvieron los URs de la tabla 4.1 con unos rendimientos de entre el 60 y el 80 % en la mayoría de los casos.

Tabla 4.1. Ácidos precipitados

UR	pH	Rdto.	Fórmula teórica	Fórmula exp.
13260	2	69	$\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$	$\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_7\text{S} \cdot \text{LiCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
13240	2	47	$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$	$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_7\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$
13276	2	56	$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$	$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_7\text{S} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
13277	2	62,6	$\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$	$\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_7\text{S} \cdot \text{LiCl} \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$
13278	2	64,3	$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$	$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_8\text{S} \cdot \text{LiCl}$
13296	2	59	$\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2$	$\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2$
13292	2	57,3	$\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2$	$\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2 \cdot 0,75\text{LiCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
13299	2	60	$\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$	$\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$
13323	2	60	$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_9\text{S}$	$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_9\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$
13324	2	59,8	$\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_8\text{S}$	$\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_8\text{S} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
13332	2	27,6	$\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$	$\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_7\text{S} \cdot 2\text{H}_2\text{O} \cdot 0,75\text{LiCl}$
13355	2	37,3	$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$	$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_8\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$
15064	4	58,7	$\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_8\text{S}$	$\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_8\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$

El problema de este método de purificación es que el LiCl coprecipita con el ácido deseado cuando trabajamos con soluciones acuosas concentradas. En algunos casos como en la obtención del **UR-13332** el rendimiento fue especialmente bajo (27,6 %) dado que el LiCl coprecipitaba incluso con soluciones acuosas diluidas y se tuvo que repetir la operación varias veces. Debido a que trabajamos con poca cantidad de muestra se desestimaron purificaciones adicionales de los compuestos obtenidos de

esta forma y se cuantificó el LiCl mediante análisis elemental y se tuvo en cuenta para calcular las concentraciones de las soluciones de producto preparadas para su estudio farmacológico.

A parte de purificar por precipitación, con otros URs con carácter ácido probamos a purificar mediante cromatografía sobre gel de sílice y evaluar este sistema de purificación. Se utilizó gel de sílice SDS Chromagel 60 a C.C. (230-400 mesh) y como eluyentes mezclas de CHCl_3 :MeOH de polaridad creciente según se detalla en la parte experimental. Los resultados se resumen en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Acidos columnados

UR	ph	Rdto.	Fórmula teórica	Fórmula exp.
13256	2	18	$\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$	$\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_7\text{S}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$
13247	2	46,7	$\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$	$\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}\cdot \text{H}_2\text{O}$
13257	3-4	20	$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}$	$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}\cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}\cdot \frac{1}{2}\text{CHCl}_3$
15068	4	27,3	$\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_{10}\text{S}$	$\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_{10}\text{S}$

Como puede observarse aunque ninguno de ellos contiene LiCl los rendimientos son mucho más bajos y muy variables en función del sustrato cromatografiado, debido seguramente a problemas de solubilidad.

Los URs que incorporan una funcionalidad básica en la subestructura aportada por la amina, poseen un carácter de aminoácido por lo que su aislamiento y purificación difieren al de los ácidos anteriores.

Como metódica general se eliminó el disolvente orgánico del medio de reacción y se llevó la solución acuosa a un pH que se acercara lo más posible al punto isoeléctrico del aminoácido en solución y en el caso que precipitase se filtraría. Para hallar el punto isoeléctrico aproximado se fue añadiendo HCl diluido hasta observar el máximo de turbidez en la solución. En ningún caso se observó turbidez y aún menos precipitado, por lo que se consideró que el punto isoeléctrico debería ser 7 aproximadamente, tomando este punto como la media entre los diferentes pKas de los grupos ácidos y básicos que contienen las moléculas.⁵⁷

Las soluciones a pH=7 se concentraron a sequedad y los crudos se cromatografiaron directamente sobre gel de sílice SDS Chromagel 60 a C.C. (230-400 mesh) tal como se describe en las condiciones experimentales. Los resultados obtenidos fueron:

⁵⁷ Voet, D., Voet, J.G.; *Bioquímica*, Ediciones Omega S.A., 1990

Tabla 4.3. Aminoácidos columnados

UR	pH	Rdto.	Fórmula teórica	Fórmula exp.
13246	6-7	36,7	C ₂₇ H ₃₅ N ₅ O ₆ S	C ₂₇ H ₃₅ N ₅ O ₆ S.2LiCl.4H ₂ O
13303	8	54	C ₂₇ H ₃₉ Cl ₂ N ₅ O ₆ S	C ₂₇ H ₃₉ Cl ₂ N ₅ O ₆ S.H ₂ O
13302	7	12,7	C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₇	C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₇ .0.75LiCl.H ₂ O
13310	7	48,3	C ₂₆ H ₃₇ Cl ₂ N ₅ O ₇ S	C ₂₆ H ₃₇ Cl ₂ N ₅ O ₇ S.2H ₂ O
13316	7	59,4	C ₂₇ H ₄₀ Cl ₂ N ₄ O ₆ S	C ₂₇ H ₄₀ Cl ₂ N ₄ O ₆ S.H ₂ O
13317	7	61,7	C ₂₇ H ₃₈ Cl ₂ N ₄ O ₆ S	C ₂₇ H ₃₈ Cl ₂ N ₄ O ₆ S.H ₂ O
13322	7	51,5	C ₂₉ H ₄₁ Cl ₂ N ₅ O ₈ S	C ₂₉ H ₄₁ Cl ₂ N ₅ O ₈ S.1,75LiCl
13336	7	54,7	C ₂₇ H ₃₈ Cl ₂ N ₄ O ₆ S	C ₂₇ H ₃₈ Cl ₂ N ₄ O ₆ S.H ₂ O
13339	7	31,1	C ₂₄ H ₃₄ Cl ₂ N ₄ O ₆ S	C ₂₄ H ₃₄ Cl ₂ N ₄ O ₆ S.2,75LiCl
13341	7	24,5	C ₂₈ H ₄₀ Cl ₂ N ₆ O ₇ S	C ₂₈ H ₄₀ Cl ₂ N ₆ O ₇ S.1.5H ₂ O
13291	6-7	74,5	C ₂₄ H ₃₄ Cl ₂ N ₄ O ₆ S	C ₂₄ H ₃₄ Cl ₂ N ₄ O ₆ S.H ₂ O
13327	6-7	62	C ₂₆ H ₃₈ Cl ₂ N ₄ O ₆ S.	C ₂₆ H ₃₈ Cl ₂ N ₄ O ₆ S.0.75LiCl.0.5H ₂ O
13338	7	50,3	C ₂₃ H ₃₃ Cl ₂ N ₅ O ₆ S	C ₂₃ H ₃₃ Cl ₂ N ₅ O ₆ S.H ₂ O
15067	7	10	C ₂₉ H ₄₂ Cl ₂ N ₆ O ₈ S	C ₂₉ H ₄₂ Cl ₂ N ₆ O ₈ S.3H ₂ O
15069	7	69	C ₃₂ H ₄₁ Cl ₂ N ₇ O ₈ S	C ₃₂ H ₄₁ Cl ₂ N ₇ O ₈ S.H ₂ O

Este sistema de purificación presentaba una alta variabilidad en cuanto a los rendimientos obtenidos dada las diferencias entre sustratos. No solo teníamos casos de bajo rendimiento sino que en algunos compuestos coelúa el LiCl debido a la polaridad del eluyente. Como en el caso anterior los productos así obtenidos presentaban la pureza requerida para su evaluación farmacológica y no se repurificaron para eliminar las sales contaminantes.

No obstante necesitábamos un sistema de purificación menos variable y que eliminara la única impureza que prácticamente nos aparecía: el LiCl. Decidimos probar a cromatografiar usando fase reversa una serie de compuestos de tipo aminoácido. Se utilizaron cartuchos precompactados Supelco Supelclean LC-18 los cuales se acondicionaban primero con MeOH y luego con H₂O. A continuación se introducía la muestra disuelta en H₂O y se eluía con H₂O. Se supone que en esta primera elución el compuesto orgánico se quedaba retenido en el cartucho y las sales, más polares, eran eluidas. Seguidamente se hacía eluir con MeOH y se recogía el producto orgánico. Este método de purificación se empleó en los siguientes compuestos:

Tabla 4.4. Aminoácidos Supelco

UR	pH	Rdto.	Fórmula teórica	Fórmula exp.
13346	7	43	$C_{26}H_{31}Cl_2N_5O_7S$	$C_{26}H_{31}Cl_2N_5O_7S.H_2O$
13354	7	15,4	$C_{30}H_{45}N_5O_8S$	$C_{30}H_{45}N_5O_8S.1,5H_2O$
13357	7	18,5	$C_{28}H_{39}Cl_2N_5O_8S$	$C_{28}H_{39}Cl_2N_5O_8S.1,5H_2O$
13356	7	10,6	$C_{27}H_{32}Cl_2N_4O_7S$	$C_{27}H_{32}Cl_2N_4O_7S.LiCl$
13362	7	38,3	$C_{28}H_{43}N_5O_6S$	$C_{28}H_{43}N_5O_6S.2H_2O$
13359	7	32	$C_{25}H_{38}N_4O_6S$	$C_{25}H_{38}N_4O_6S.H_2O$
13312	7	73,7	$C_{28}H_{33}Cl_2N_7O_6S$	$C_{28}H_{33}Cl_2N_7O_6S.H_2O$

A pesar de las expectativas creadas alrededor de este método de purificación, dado los buenos rendimientos obtenidos con el **UR-13212**, los demás resultados estuvieron muy por debajo de lo esperado. Por un lado los mejores rendimientos se quedaron alrededor del 35-45 % (**UR-13359**, **UR-13346**) y por otro lado algunos productos eran tan polares que se recogían en las fracciones acuosas y tuvieron que ser repurificados varias veces (caso de los **UR-13354**, **UR-13357**) con lo que el rendimiento fue inferior. Algunos como los **UR-13356** y **UR-13362** quedaron impurificados con LiCl. Este último fue posteriormente cromatografiado mediante fase normal y se obtuvo el compuesto libre de sales.

El **UR-13348** fue purificado de forma diferente al resto. Al tratarse de un compuesto ácido fue precipitado y filtrado de un medio acuoso a pH=2. Pero el análisis elemental reveló que prácticamente contenía todo el LiCl generado en el proceso de acidificación. Por este motivo se decidió probar la cromatografía en fase reversa (cartucho Supelco Supelclean LC-18) para un compuesto ácido. La muestra se solubilizó a pH=8 y se hizo eluir con H_2O y $NaHCO_3$ 0,2 M. Seguidamente se pasó una solución de HCl/H_2O a pH=2 (para protonar la muestra orgánica supuestamente retenida en el cartucho de fase reversa) y finalmente MeOH para eluir el producto deseado. El análisis del **UR-13348** reveló que no contenía LiCl pero, como mostraba el espectro de 1H -RMN, sí tenía fase reversa procedente del cartucho Supelco Supelclean, como consecuencia de haber trabajado en el límite de pH (2-8) especificado para este tipo de columnas. Para su eliminación se suspendió en MeOH y se filtró a través de una placa porosa, con lo que el **UR-13348** se obtuvo con un rendimiento global del 27,4 %.

Tabla 4.5. Ácidos Supelco

UR	pH	Rdto.	Fórmula teórica	Fórmula exp.
13348	2	27,4	C ₂₉ H ₄₂ Cl ₂ N ₄ O ₈ S	C ₂₉ H ₄₂ Cl ₂ N ₄ O ₈ S.2H ₂ O

Dentro de esta clasificación en función de la manera de purificar los compuestos en la que hemos diferenciado entre sustancias ácidas y sustancias de tipo aminoácido debemos añadir un tercer grupo que son aquellas que contienen heterociclos de carácter ligeramente básico. En principio la idea es la misma, intentar encontrar el punto isoeléctrico de cada compuesto. En caso de que la molécula en este punto sea insoluble en H₂O se aislaría mediante su filtración y caso contrario la cromatografiaríamos siguiendo los ejemplos anteriores.

Los compuestos que precipitaron fueron los siguientes:

Tabla 4.6. Heterociclos precipitados

UR	pH	Rdto.	Fórmula teórica	Fórmula exp.
13241	5-6	69	C ₃₂ H ₄₀ Cl ₂ N ₆ O ₆ S	C ₃₂ H ₄₀ Cl ₂ N ₆ O ₆ S.H ₂ O
13244	4-5	43,3	C ₂₈ H ₃₅ F ₃ N ₆ O ₆ S	C ₂₈ H ₃₅ F ₃ N ₆ O ₆ S.H ₂ O
13298	7	12,7	C ₃₃ H ₄₂ Cl ₂ N ₆ O ₆ S	C ₃₃ H ₄₂ Cl ₂ N ₆ O ₆ S.1/7CHCl ₃

Mientras que los que tuvieron que ser purificados mediante cromatografía fueron los siguientes:

Tabla 4.7. Heterociclos columnado

UR	pH	Rdto	Fórmula teórica	Fórmula exp.
13187	7	50	C ₃₀ H ₃₈ N ₆ O ₆ S	C ₃₀ H ₃₈ N ₆ O ₆ S.0.75LiCl.H ₂ O
13245	7	9,7	C ₃₃ H ₄₄ N ₆ O ₇ S	C ₃₃ H ₄₄ N ₆ O ₇ S.2H ₂ O
13290	3	6	C ₂₆ H ₃₂ Cl ₂ N ₄ O ₆ S	C ₂₆ H ₃₆ Cl ₂ N ₄ O ₆ S.H ₂ O.0.5LiCl
13308	7	56,2	C ₂₈ H ₃₆ Cl ₂ N ₄ O ₆ S.	C ₂₈ H ₃₆ Cl ₂ N ₄ O ₆ S.1.25LiCl.2.5H ₂ O
13287	6-7	61,8	C ₂₈ H ₃₂ Cl ₂ N ₆ O ₇ S	C ₂₈ H ₃₂ Cl ₂ N ₆ O ₇ S.LiCl.H ₂ O
13318	6-7	28,8	C ₃₁ H ₃₉ Cl ₂ N ₇ O ₆ S	C ₃₁ H ₃₉ Cl ₂ N ₇ O ₆ S.3H ₂ O
13404	5	38,6	C ₃₁ H ₃₉ Cl ₂ N ₆ O ₆ S	C ₃₁ H ₃₉ Cl ₂ N ₆ O ₆ S.2LiCl.H ₂ O
13495	5	61	C ₃₄ H ₄₃ Cl ₂ N ₅ O ₈ S	C ₃₄ H ₄₃ Cl ₂ N ₅ O ₈ S.H ₂ O

En este último tipo de moléculas, el LiCl se eluía fácilmente a la polaridad necesaria para obtener los compuestos, por lo que muchos de ellos contenían cantidades variables de LiCl.

4.6 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

Todos los compuestos finales preparados para su evaluación farmacológica como antagonistas de VLA-4, así como todos los intermedios necesarios para su obtención se caracterizaron estructuralmente mediante las técnicas espectroscópicas que en cada caso fueron necesarias. En la mayoría de los casos esta caracterización se hizo mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear y HPLC-MS. La descripción de estos resultados se encuentra detallada en la parte experimental del presente trabajo.

Las moléculas denominadas URs así como sus precursores los ésteres metílicos presentan espectros de protón complejos, donde muchas señales se encuentran solapadas y la asignación correcta es difícil basándose en este único experimento. Con el fin de poder interpretar estos espectros correctamente se llevó a cabo la asignación completa de ^1H y ^{13}C del derivado del ácido glutámico **UR-13249** y se realizaron los experimentos en dos dimensiones que a continuación se detallan brevemente:⁵⁸

- **HSQC** (Heteronuclear Single Quantum Coherence), se trata de un doble experimento INEPT. Este experimento correlaciona protones con los heteronúcleos con los que está directamente enlazados. Se basa en la transferencia de magnetización del protón al heteronúcleo, o sea, de un núcleo sensible a uno menos sensible a través de la interacción debida al acoplamiento escalar vía secuencia INEPT. Hay marcaje durante el tiempo de evolución (t_1) con la frecuencia del heteroátomo y a continuación una transferencia de la magnetización marcada con la frecuencia del heteronúcleo nuevamente al protón vía un “reverse” INEPT. La detección de protón se da durante el tiempo de relajación (t_2).
- **HSQC-TOCSY** es un experimento de detección inversa híbrido, que consiste en una secuencia de pulsos inicial igual al HSQC seguida de una secuencia TOCSY. De esta manera además de correlacionar protones con los heteronúcleos con los que está directamente enlazado mediante el HSQC durante la segunda etapa (TOCSY) la magnetización se propaga vía todo el sistema de *spin* homonuclear acoplado vía J(HH) y quedan definidos los acoplamientos entre los diferentes protones.
- El **HSQC-editing** es un experimento HSQC en el que se edita la multiplicidad del carbono, entendiendo que editar en este contexto se refiere a expresar la

⁵⁸ Braun, S., Kalinowski, H-O., Berger, S.; *100 and More Basic NMR Experiments*. VCH Publishers, New York 1996

multiplicidad en términos de fase: fase negativa (para CH_2) o fase positiva (para CH_3 o CH).

- El **HMBC** (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) es un experimento de correlación heteronuclear en 2 dimensiones diseñado para la identificación de protones con carbonos que están separados por más de un enlace. La secuencia de pulsos utiliza coherencias de cero y múltiple cuanta entre protones y carbonos J-acoplados para identificar cada protón con la frecuencia de un carbono remoto.

Para esta asignación del **UR-13249** se tabulan, basándose en la numeración arbitraria de la **figura 42**, los desplazamientos químicos de protón (^1H) y de carbono (^{13}C) obtenidos en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker Avance DPX-300 operando a 300,13 MHz y 75,47 MHz respectivamente. Los desplazamientos químicos (ppm) se referencian internamente a la señal de disolvente (CD_3OD)

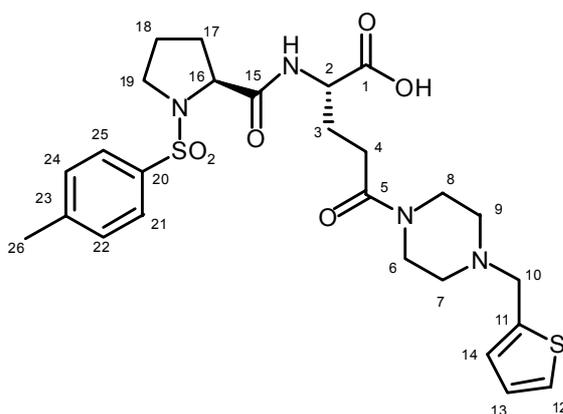


Figura 42

Interpretación de la tabla

Nº:	Numeración arbitraria de ^1H y ^{13}C
$\delta(^1\text{H})$ ppm:	desplazamiento químico en ppm para los protones unidos al carbono n
$m(\text{J}_{\text{H-H}})$:	multiplicidad de la señal para el protón y constante de acoplamiento si es interpretable
$\delta(^{13}\text{C})$ ppm:	desplazamiento químico en ppm para el carbono n
Correlaciones:	correlaciones heteronucleares a larga distancia ^1H - ^{13}C observadas en el experimento HMBC para los protones unidos al carbono n.

Asignación estructural **UR-13249**

Nº	$\delta(^1\text{H})$ ppm		$\delta(^{13}\text{C})$ ppm		Correlaciones heteronucleares a larga distancia (nº C)		Observaciones
		m(J _{H-H})					
1	-	-	177.52	-C-	2		
2	4.33	m	54.79	-CH-	3,1		
3	2.3/1.95	m	29.15	-CH ₂ -	5		Tocsy: 2,4
4	2.54	m	30.24	-CH ₂ -	5		Tocsy: 2,3
5	-	-	173.36	-C-	3,4/ ¿6,8?		
6	3.6	m		-CH-	5?		¹³ C → ¿8?
7	2.54	m	53.66	-CH ₂ -	10		7?
8	3.6	m		-CH ₂ -	5?		¹³ C → ¿6?
9	2.54	m	53.23	-CH-	10		9?
10	3.81	s	57.22	-CH ₂ -	7,9,11,14		
11	-	-	140.23	-C-	12,13,14		
12	7.32	dd	126.90	-CH-	13,14		
13	6.95	dd	128.63	-CH-	12,11		
14	6.93	dd	127.72	-CH-	11,12		
15	-	-	174.18	-C-	17		
16	4.15	m	63.38	-CH-	17,18		Tocsy: 18,17,19
17	1.86/1.83	m	31.85	-CH ₂ -	16,18		Tocsy: 18,19,16
18	1.86/1.56	m	25.77	-CH ₂ -	16,17,18		Tocsy: 19,17,16
19	3.56/3.23	m	50.33	-CH ₂ -	18,17		Tocsy: 18,17,16
20	-	-	135.24	-C-	21,22,24,25		
21	7.78	d(8.2 Hz)	128.95	-CH-	-Ph		
22	7.42	d(8.2 Hz)	131.07	-CH-	-Ph		
23	-	-	145.74	-C-	21,22,24,25,26		
24	7.42	d(8.2 Hz)	131.07	-CH-	-Ph		
25	7.78	d(8.2 Hz)	128.95	-CH-	-Ph		
26	2.44	s	21.54	-CH ₃	22,24,23		

La estrategia para la asignación se ha basado en utilizar el experimento HSQC-TOCSY (figura 43) para detectar sistemas de protones acoplados, facilitando la interpretación la dispersión que la segunda dimensión ¹³C, provoca en los multipletes solapados del ¹H.

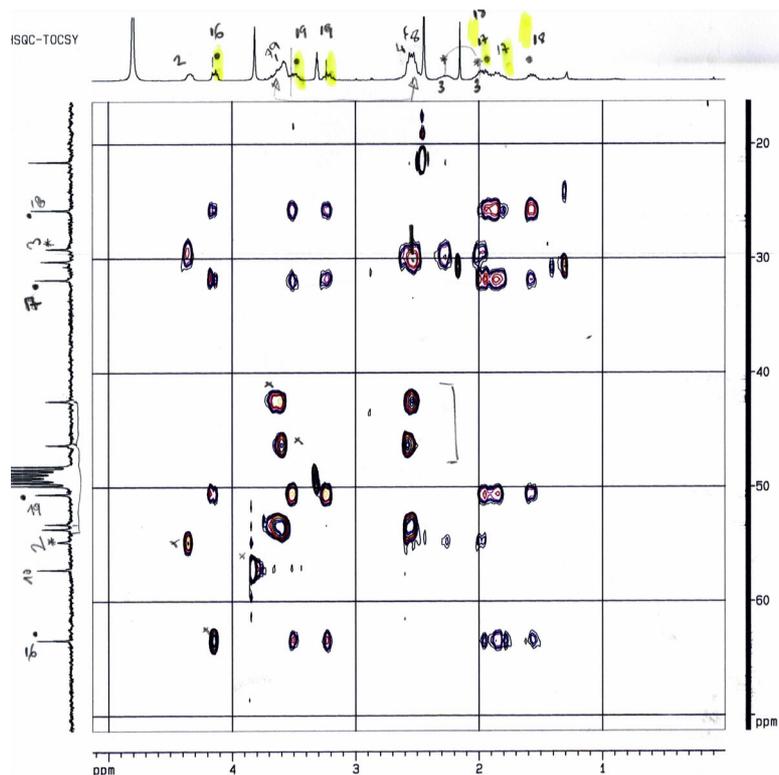


Figura 43: HSQC-TOCSY

Los experimentos heteronucleares de correlación a un enlace (HSQC) (figura 44) han servido para determinar a que carbono está enlazado cada protón y el HMBC (figura 45), para confirmar la cadena carbonada y asignar los carbonos cuaternarios.

De esta forma podremos asignar el resto de compuestos al tener resueltas las zonas más complejas del espectro como eran las cadena carbonadas de la prolina (17-18-19) y del glutámico (3-4) donde los diferentes grupos de protones diastereotópicos se solapan.

Elegimos el **UR-13249** para su asignación completa porque no posee anillo de piperidina sino que posee una piperazina. Esto descongestiona la zona de mayor densidad de señales (1.6-2.5 ppm) y permite una interpretación más rápida. Una vez asignadas todas las señales de esta molécula, la interpretación de los espectros del resto de derivados de esta serie es más sencilla.

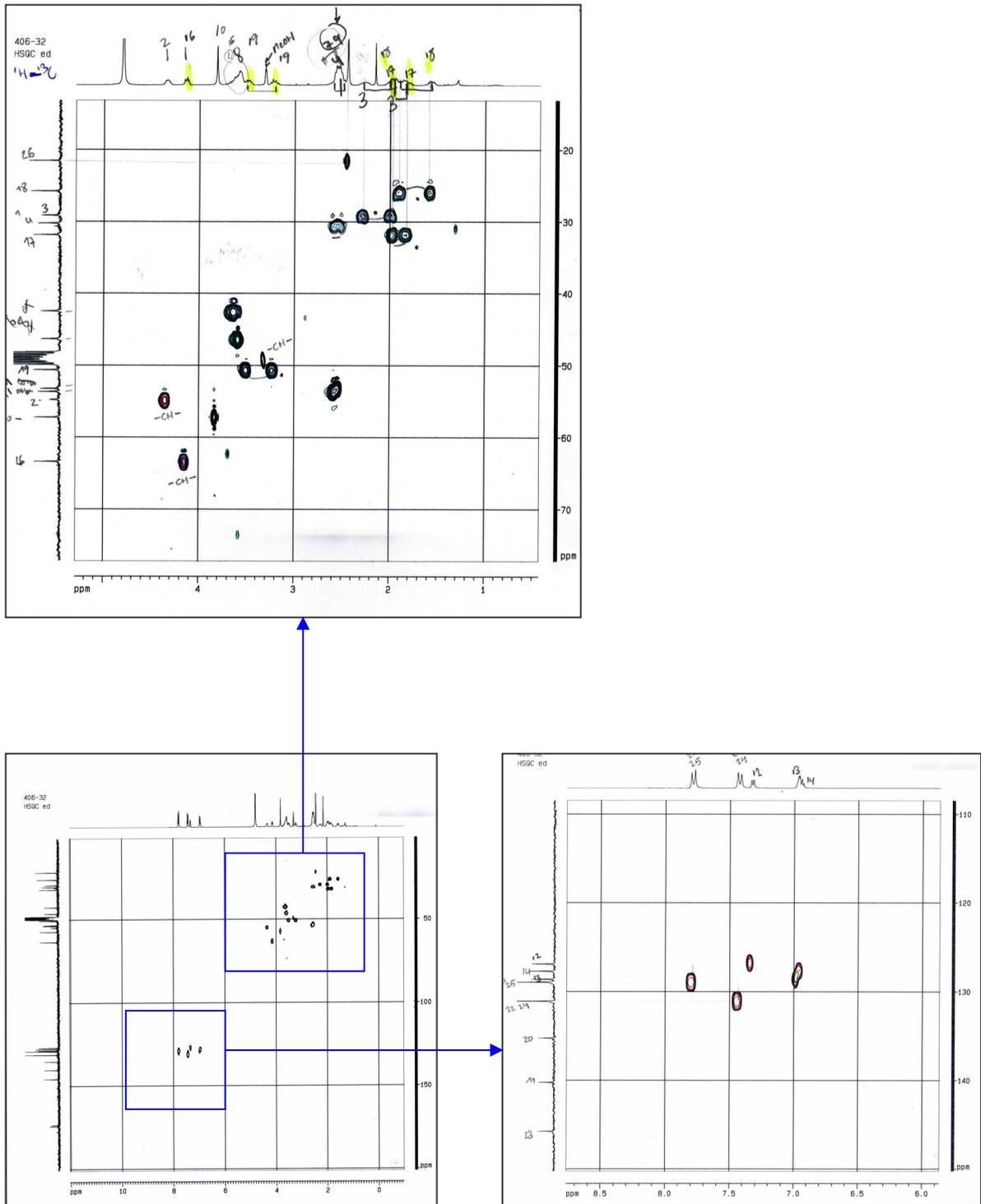
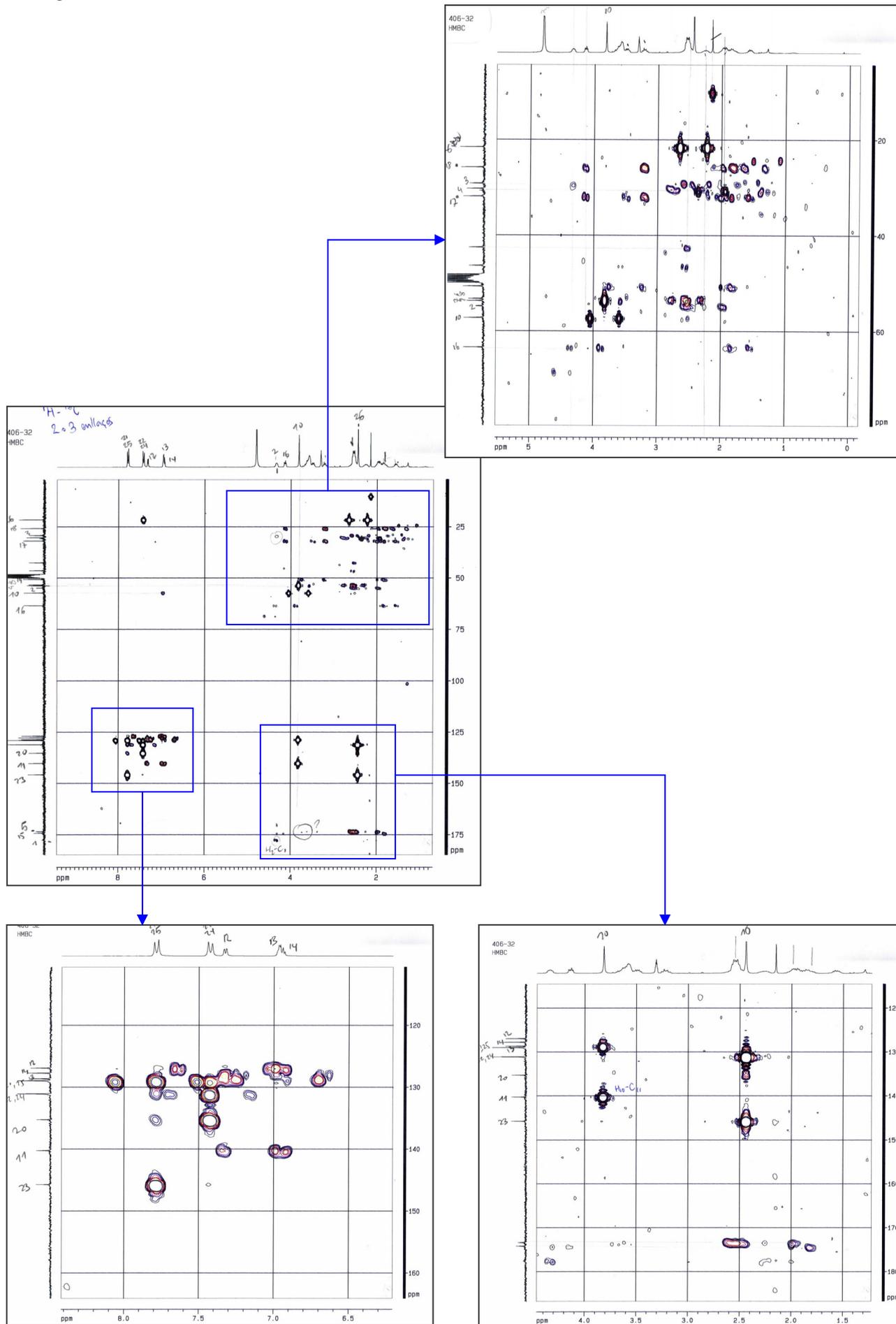


Figura 44: HSQC

Figura 45: HMBC



Una vez determinados los protones de los residuos de la prolina y del ácido glutámico, para confirmar la asignación de los protones del anillo de la piperidina en el resto de compuestos que no contenían piperazina como el UR analizado, nos fue útil la asignación del subproducto **95a** obtenido en el apartado 4.1.12.

$\delta(^1\text{H})$ ppm		
Nº		m($J_{\text{H-H}}$)
1	1.17	t($J=7.5$ Hz)
2	2.36	q($J=7.5$ Hz)
3-5	4.75	m
	4.01	
	2.96	
	2.48	
4-6	1.66	m
	1.31	
7	2.12	m
8	4.03	m
9	7.25	d($J=5.8$ Hz)
10	8.42	d($J=5.8$ Hz)
11	9.06	S
12	2.93	q($J=7.3$ Hz)
13	1.51	t($J=7.3$ Hz)

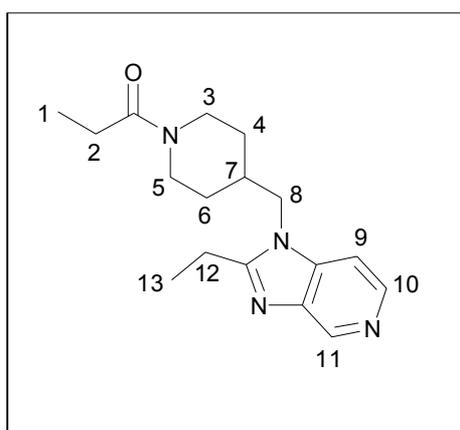


Figura 46

De esta asignación comprobamos un hecho que vemos en todos los derivados del ácido glutámico que contienen una piperidina como elemento espaciador, los cuatro protones 3 y 5, en α al enlace amida tienen desplazamientos químicos diferentes como resultado del equilibrio conformacional derivado de la restricción rotacional de este enlace que presenta un equilibrio entre dos formas resonantes de la molécula.

En los derivados de la serina y del ácido 2,3-diaminopropiónico, los protones 3 y 5 de la piperidina que están en α al enlace carbamato o urea respectivamente, presentan dos grupos de señales correspondientes a 2 protones cada uno: a 4-4.1 y 3.5-3.7 en el caso del DAP y a 4.4 y 4.1 en el caso de la serina.

El otro hecho destacable en el compuesto **95a**, es la multiplicidad del $-\text{CH}_2-$ número 8. En principio sería de esperar que fuese un doblete pero se presenta como multiplete. Si observamos la señal en detalle, vemos que en realidad se tratan de dos

dobletes con una diferencia de desplazamiento muy pequeña, con una J no calculable en un experimento de primer orden.

Esta duplicación de la señal del metileno en la posición 4 de la piperidina, así como otras señales en función de la molécula, es un hecho que observamos en diferentes compuestos de esta serie. Concretamente los URs y compuestos intermedios que presentan señales dobladas en el espectro de $^1\text{H-RMN}$ son los siguientes⁵⁹:

Compuestos con señales dobladas
UR-13187
161 (éster del UR-13187)
UR-13221
162 (éster del UR-13221)
UR-13292
136 (éster del UR-13292)
UR-13296
135 (éster del UR-13296)
UR-13308
169 (éster del UR-13308)
UR-13346
138 (éster del UR-13346)

Tomamos el **UR-13187** para investigar sobre la causa de este efecto de señales dobladas. Pretendíamos aclarar si se trataba de varias conformaciones de un mismo compuesto o si se trataba de alguna impureza que habíamos arrastrado durante la síntesis de los compuestos y no habíamos sabido detectar ni eliminar.

Por otro lado, el cromatograma de HPLC-MS de este compuesto presenta dos picos con tiempos de retención 5,11 min(62 %) y 5,30 min (38 %) con idéntico espectro de masas tanto en cuanto a pico molecular (PM=611) como en cuanto a fragmentación se refiere. Tan solo el **UR-13221** presentó un efecto similar, mientras que los otros compuestos con señales dobladas, presentaban un solo pico en el HPLC.

⁵⁹ La interpretación y asignación de estas señales dobladas para cada compuesto se encuentra detallada en la Parte Experimental.

En primer lugar asignamos todas las señales del espectro de protón del **UR-13187** bajo el supuesto de que nos encontramos ante la primera situación: un caso de equilibrio entre dos conformaciones de un mismo compuesto generadas por una rotación restringida sobre enlaces simples, las cuales deberían ser interconvertibles a una determinada temperatura llamada **temperatura de coalescencia**.⁶⁰

Numeramos arbitrariamente el **UR-13187**:

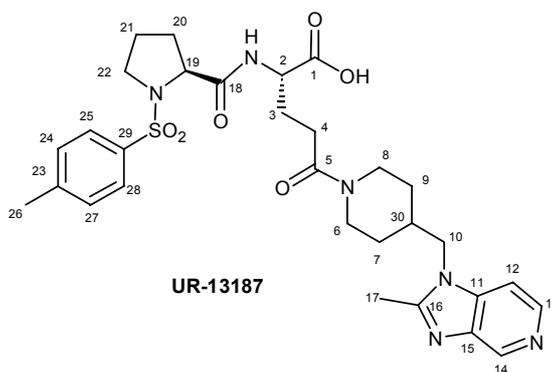


Figura 47

En el espectro de resonancia de protón (figura 48), una vez asignadas las señales igual que en los ejemplos anteriores, vemos que las señales que claramente resultan dobladas serían el protón 2, el protón 13, el metileno 10 y el metilo 17.

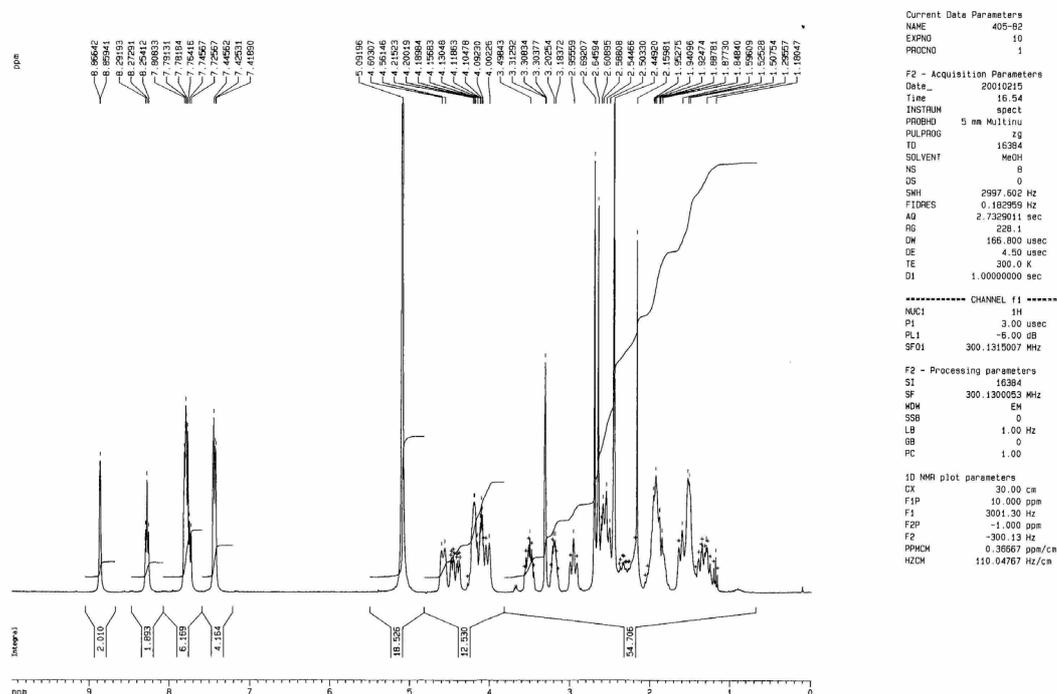


Figura 48

⁶⁰ Friebolin, H.; *Basic One and Two Dimensional NMR Spectroscopy*. 2nd Edn. VCH Publishers, New York 1993

Mediante el análisis del espectro **HSQC-editing** de este compuesto observamos que las señales dobladas en el espectro de protón se corresponden cada una con un solo carbono en el espectro de ^{13}C . Dicho espectro presenta 30 señales lo cual nos puede indicar que podría tratarse de un equilibrio conformacional de un mismo compuesto y que dichas conformaciones presentarían el mismo espectro de ^{13}C y no observaríamos un desdoblamiento de señales tal y como si sucede en el espectro de protón. Aunque existen ejemplos en los que se observan equilibrios conformacionales mediante experimentos de $^{13}\text{C}^{61}$, lo más habitual es que dichas diferencias de desplazamiento no se observen. Bajo esta suposición asignamos las señales del espectro.

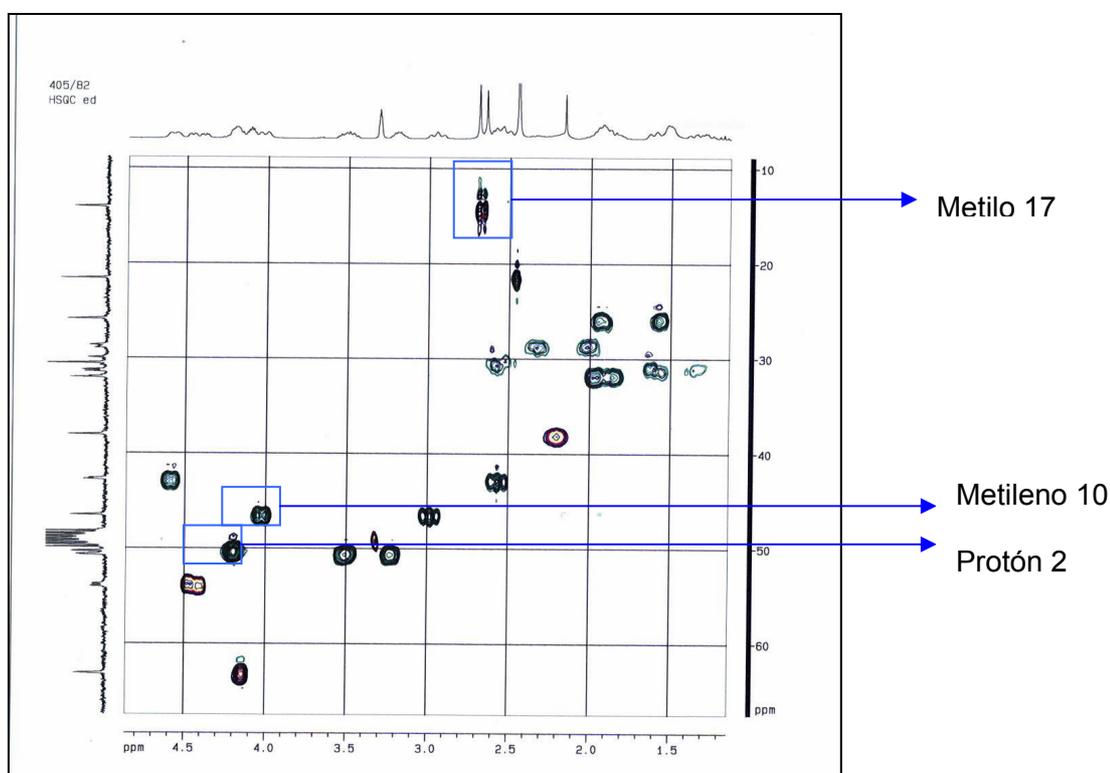


Figura 49

Este experimento nos muestra la multiplicidad de las señales dobladas y también coinciden con la suposición realizada de tratarse de un solo compuesto: la señal asignada al metileno 10 presenta fase negativa ($-\text{CH}_2-$), la asignada al protón 2 fase positiva ($-\text{CH}-$ o CH_3) y la del metilo 17 también fase positiva.

No obstante este experimento si bien nos es muy útil para asignar señales, no descarta la posibilidad de tener dos compuestos diferentes y las señales de ^{13}C de uno de ellos coincidir con las del otro. Para resolver esta situación llevamos a cabo diferentes espectros de protón a diferentes temperaturas y observamos si se

⁶¹ Crimella, T.; Orlandi, R.; Anders, U.; Stradi, R; *Arneim.-Forsch./Drug Res.* 44 (II), **1994**, 1405-1410

producían cambios en las señales que habíamos de elucidar, y si nos era posible hallar la temperatura de coalescencia.

El resultado se expone en la siguiente gráfica:

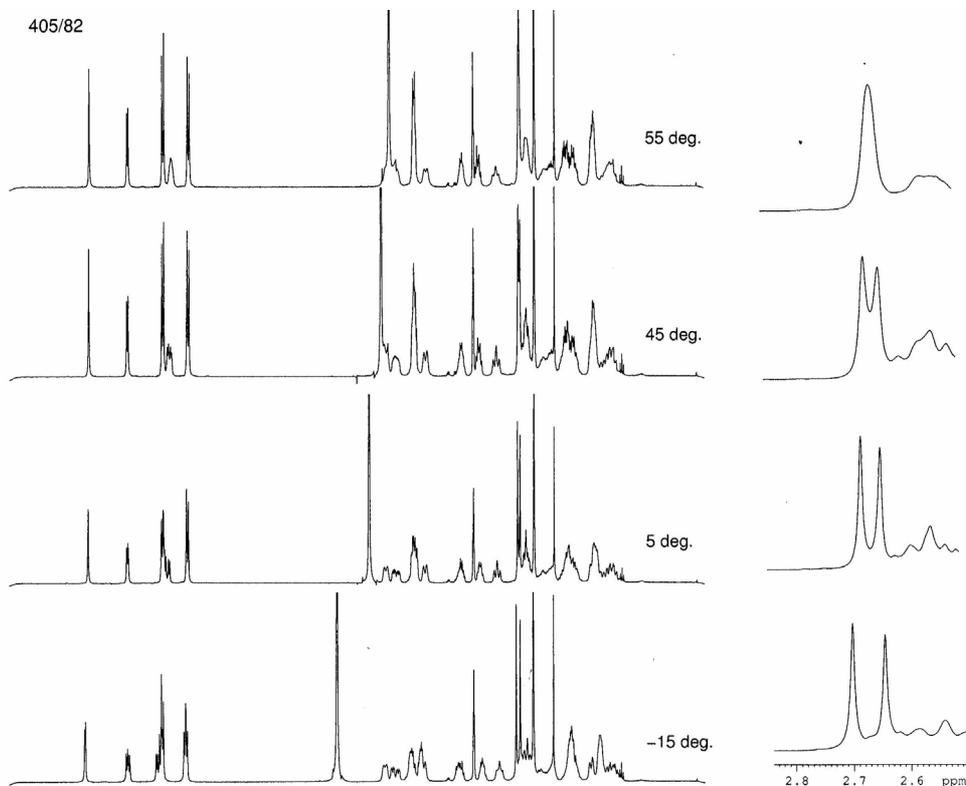


Figura 50

Calentamos la muestra hasta 55 °C, temperatura a la cual claramente el metilo 17 se presenta como una sola señal singulete que es lo que esperábamos, el protón 13 es un doblete como le corresponde y el protón 2 a 45 °C se ve como una sola señal pero a 55 °C queda solapado con la señal de disolvente.

El resultado de este experimento finalmente nos confirma nuestra hipótesis de que estamos ante un caso de dos conformaciones que se interconvierten a 55 °C, que es la temperatura de coalescencia de este compuesto.

5. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

5.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Las moléculas sintetizadas en este capítulo se sometieron a evaluación farmacológica como antagonistas de la integrina VLA-4 en el Departamento de *Screening* de J.Uriach & Cía S.A. Los ensayos llevados a cabo son del tipo *in vitro* y se realizaron los dos tests que a continuación se describen.

Inhibición de la adhesión celular dependiente de VLA-4

La inhibición de la adhesión celular dependiente de VLA-4 se ensaya mediante la evaluación de la interacción por un lado (test 1) entre el péptido CS-1 (H-CLHGPEILDVPST-CONH₂) y por otro (test 2) entre VCAM-1 y células Jurkat (línea de linfocitos T que expresan la integrina VLA-4 de forma activada pero no la integrina $\alpha_4\beta_7$) después de la preincubación de dichas células con los compuestos a estudiar.

1.- Preparación de las placas (recubiertas de CS-1 o VCAM-1)

Se emplean placas de 96 pocillos (Costar 3925). Se adicionan 200 μ L de albúmina bovina sérica al 2% (BSA, Sigma A-4503) por pocillo y se incuba la placa durante 2 horas a 37 °C. Se elimina la solución y se lava la placa dos veces con 200 μ L de solución salina tamponada con fosfato (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) (Gibco 14190-094). A continuación se añaden 200 μ L de una solución 10 μ g/mL de 3-(2-piridilditio)propanoato de *N*-succinimidilo (SPDP, Sigma P-3415) y se incuba a 37 °C durante 30 minutos. Se elimina la solución sobrante y se lava dos veces con 200 μ L de PBS. A continuación se añaden 200 μ L de una solución 25 μ g/mL (equivalente a 5 μ g/pocillo) del péptido CS-1, sintetizado por química convencional en fase sólida y purificado por HPLC o del VCAM-1. Su identidad está determinada por análisis elemental y espectrometría de masas. Esta placa se incuba a 37 °C durante 2 horas y a continuación a 4 °C durante toda la noche.

2.- Línea celular Jurkat: cultivo y marcaje con fluorescencia

Las células Jurkat se mantienen mediante pases repetidos a una densidad de 2×10^5 a $1,5 \times 10^6$ células/mL en medio RPMI 1640 (Gibco 21875-034) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FCS, Gibco 10270-106).

Se extraen 50×10^6 células, se centrifugan (1200 rpm, 10 min, temperatura ambiente) y se elimina el medio. Se resuspenden en 5 mL de RPMI sin suero y se

agregan 10 μL de una solución 1 mM del fluoróforo calceína.AM (Molecular Probes, C-3100). Se incuba la suspensión durante 30 min a 37 °C en un lugar protegido de la luz agitando ocasionalmente. Se agregan 40 mL de RPMI para parar el marcaje y se centrifuga (1200 rpm, 10 min, temperatura ambiente). Se elimina el medio y se lavan las células marcadas con 40 mL de RPMI para eliminar la sonda no incorporada. Finalmente se resuspenden las células en un volumen necesario de RPMI con 10% FCS para obtener 8×10^6 cel/mL.

3.- Experimento de adhesión

Se lava la placa con PBS (2 lavados de 200 μL cada uno) y se bloquea con 200 μL de BSA al 1% por pocillo durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente.

Los productos de estudio están disueltos en dimetilsulfóxido a una concentración de 10 mM y se preparan diluciones de los mismos en medio RPMI con 10% FCS. Se preincuban los productos con las células Jurkat durante 30 minutos a 37 °C, de manera que la concentración de los productos oscila entre 10 μM y 1 nM, la densidad celular es 4×10^6 cel/mL y la concentración máxima de dimetilsulfóxido es 0,1%.

Se agregan 100 μL por pocillo de la mezcla célula-producto (densidad celular, 4×10^5 cel/poc). En los pocillos control se omite el producto y en los blancos se omiten las células o el CS-1 o el VCAM-1. La placa se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente en lugar protegido de la luz. La placa se lava con RPMI (2 lavados de 200 μL) y se agregan 100 μL de PBS. La placa se lee con un lector de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 485 nm y 530 nm de emisión.

La adhesión máxima (100%) viene determinada por la media de intensidad de fluorescencia (IF) de los pocillos control y la mínima por los blancos. Los porcentajes de inhibición de la adhesión se calculan mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición} = 100 - \frac{\text{IF}_{\text{producto}} - \text{IF}_{\text{blanco}}}{\text{IF}_{\text{control}} - \text{IF}_{\text{blanco}}} \times 100$$

En los casos en que es conveniente calcular la CI_{50} (concentración que inhibe al 50%) se estudian un mínimo de seis concentraciones del producto y los porcentajes de inhibición se ajustan a una curva dosis-respuesta de pendiente variable.

5.2 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

Los primeros compuestos evaluados fueron la serie de derivados del ácido glutámico que se corresponden con la fórmula general I de la figura 51, donde R representa un radical que contiene uno o varios anillos aromáticos

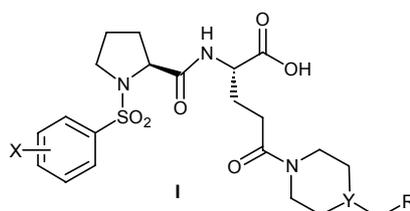
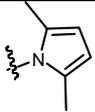
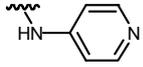
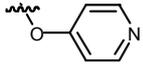
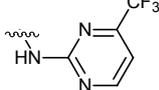
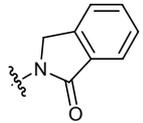
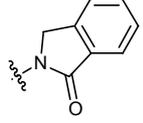
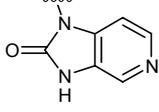
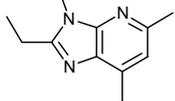
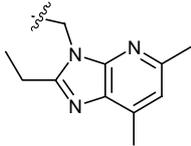
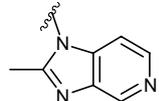


Figura 51

Los resultados son los expresados en la tabla 5.1:

Tabla 5.1 Inhibición de la adhesión celular dependiente de VLA-4.

Comp.	X	Y	R	VLA-4/CS-1 Cl ₅₀ (nM) ^a	VLA-4/VCAM-1 Cl ₅₀ (nM) ^a
BIO-1211				45,7±31	1059,3±673
TR-14035				4,9±2,4	137,6±88,4
UR-13246	4-Me	N		101±83	>1.000
UR-13249	4-Me	N		247±69	>3.000
UR-13245	4-Me	N		48±28	>3.000
UR-13288	3,5-diCl	CH		33	436

Comp.	X	Y	R	VLA-4/CS-1 Cl ₅₀ (nM) ^a	VLA-4/VCAM-1 Cl ₅₀ (nM) ^a
UR-13290	3,5-diCl	CH		89±23	878±113
UR-13346	3,5-diCl	CH ₂		13±0,1	485±114
UR-13356	3,5-diCl	CH ₂		305±10,3	1422±65,1
UR-13242	4-Me	CH		198±97	2023±1382
UR-13244	3,5-diCl	CH ₂		193±42	>3000
UR-13247	4-Me	CH		67±40	2242
UR-13260	3,5-diCl	CH		32±15	474
UR-13287	3,5-diCl	CH		22±6	221
UR-13241	3,5-diCl	CH		45±42	535±228
UR-13298	3,5-diCl	CH		13,3±7	252,4±172
UR-13187	4-Me	CH		57±37	223±175

^aValores de Cl₅₀ calculados como la media de 1,2 ó 3 determinaciones

En general, hemos observado que el test con VCAM-1 da Cl₅₀ más altas que con CS-1. Como mínimo encontramos una diferencia de un orden de magnitud, pero en diversos casos la diferencia es mucho mayor, incluyendo los compuestos de referencia.

Al analizar estos resultados, se pone de manifiesto que las nuevas funciones de piperazil y piperidinilamidas son espaciadores adecuados dado que tenemos varios compuestos con actividades comparables a las de los patrones.

Los datos expresados en la tabla 5.1, muestran que los derivados que contienen el ciclo de piperazina a pesar de mostrar actividad en el ensayo de adhesión entre CS-1 y VLA-4, presentan una actividad baja en el test sobre VCAM-1.

En este primer grupo de compuestos, también se comprueba que la sustitución en la prolina afecta a la actividad ya que los sustituyentes 3,5-dicloro son 5 veces más activos que los 4-Me, si comparamos el **UR-13247** y **UR-13260**, por ejemplo. Investigadores de Merck ya habían observado este hecho, y afirmaban que si bien el grupo arilsulfonilo interaccionaba con la VLA-4, su sustitución no es crítica para la actividad.⁹⁶

Los compuestos más destacados de este grupo son:

- el **UR-13260** y el **UR-13287**, que presentan un grupo carbonilo y probablemente está estableciendo un puente de hidrógeno con la integrina
- los **UR-13287**, **UR-13241**, **UR-13298**, y **UR-13187** que contienen heterociclos nitrogenados que pueden actuar como funcionalidades aceptoras de puentes de hidrógeno. Estas moléculas son tan activas como las mencionadas en el punto anterior. Un dato interesante es el proporcionado por la imidazopiridina **UR-13187** que con un 4-Me tiene elevada actividad ($Cl_{50}=223\pm 175$ nM en VCAM-1/VLA-4)
- compuestos como los **UR-13298** y **UR-13241**, en los que el heterociclo está separado por uno o dos metilenos del anillo de piperidina presentan actividades del mismo orden.

Dado el interesante resultado de actividad exhibido por el **UR-13187**, el siguiente grupo de moléculas evaluadas fueron la serie de imidazopiridinas de fórmula general II (figura 52), con el fin de explorar el alcance de esta subestructura.

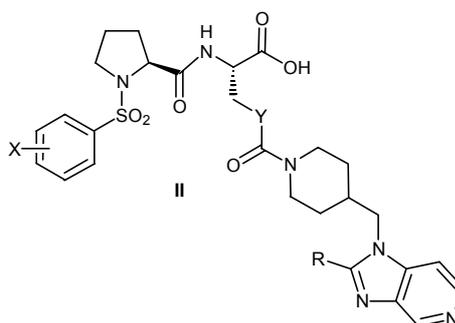


Figura 52

Los resultados fueron los siguientes:

⁹⁶ Hagmann, W.K., Yang, G. X., et al.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, **2002**, 1497-1500

Tabla 5.2 Inhibición de la adhesión celular dependiente de VLA-4.

Comp.	X	Y	R	VLA-4/CS-1 Cl ₅₀ (nM) ^a	VLA-4/VCAM-1 Cl ₅₀ (nM) ^a
BIO-1211				45,7±31	1059,3±673
TR-14035				4,9±2,4	137,6±88,4
UR-13187	4-Me	CH ₂	Me	57±37	223,0±175
UR-13221	3,5-diCl	CH ₂	Me	15±12	188,3±130
UR-13308	3,5-diCl	CH ₂	Et	19,7±13.3	194±52
UR-13404	3,5-diCl	CH ₂	Pr	49,8±3	547,7
UR-13312	3,5-diCl	NH	Me	7,7±7.6	14±2
UR-13447	3,5-diCl	NH	Et	4,6±0.1	26,4

^aValores de Cl₅₀ calculados como la media de 1,2 ó 3 determinaciones

Como era de esperar el **UR-13221** presenta una afinidad por la integrina VLA-4 mayor que la de su homólogo N-proliltolsil derivado el **UR-13187**. El **UR-13221** muestra una excelente actividad en los dos ensayos realizados (Cl₅₀=15±12 nM en CS-1/VLA-4 y Cl₅₀=188±130 nM en VCAM-1/VLA-4).

El estudio estructura-actividad (SAR) llevado a cabo alrededor de la posición 2 de la imidazopiridina, demuestra que pueden ser alojadas diferentes cadenas alquílicas sin que la actividad se vea afectada significativamente. Así mientras los compuestos que contienen una cadena alquílica como un metilo (**UR-13221**) o un etilo (**UR-13308**) son prácticamente equipotentes, cuando esta sustitución es un propilo (**UR-13404**), la actividad empieza a decaer ligeramente. Este hecho es importante a la hora de modular las propiedades fisicoquímicas de un determinado compuesto, dado que una pequeña variación en la estructura química puede no afectar seriamente a la actividad pero puede ser crucial para mejorar la permeabilidad del compuesto, por ejemplo.

En esta serie de compuestos, se observó un salto de actividad muy importante en los derivados del ácido (S)-2,3-diaminopropiónico (DAP) respecto a los derivados del ácido glutámico. El **UR-13312** ($CI_{50}=7,7\pm 7,6$ nM en CS-1/VLA-4 y $CI_{50}=14\pm 2$ nM en VCAM-1/VLA-4) y el **UR-13447** ($CI_{50}=4,6\pm 0,1$ nM en CS-1/VLA-4 y $CI_{50}=26,4$ nM en VCAM-1/VLA-4) son potentes antagonistas de la VLA-4, superiores en actividad a compuestos de otras compañías como el **TR-14035** ($CI_{50}=137\pm 88,4$ nM en VCAM-1/VLA-4) o el **BIO-1211** ($CI_{50}=1059,3\pm 673$ nM en VCAM-1/VLA-4).

La elevada actividad de estos compuestos, suponemos que es debida a que los derivados del DAP adoptan una conformación más rígida, pudiendo contribuir a ello un puente de hidrógeno intramolecular entre el NH de la urea y el grupo carboxilato (figura 53)

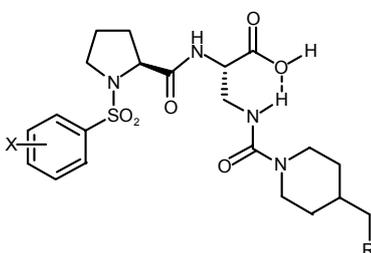


Figura 53

Tanto los derivados del ácido glutámico y especialmente los derivados del DAP, parecen adecuar correctamente el radical imidazopiridina para interactuar con la VLA-4, así como otros grupos funcionales que pueden intervenir en la unión con la integrina.

Una de las primeras conclusiones extraídas de los datos expresados en la tabla 5.1, era que el grupo carbonilo, presente en varios sustituyentes (R) en la posición 4 de la piperidina, podría ejercer un cierto efecto en la mejora de la actividad. Las actividades de los compuestos que contenían este tipo de radical, como ureas, carbamatos, amidas, sulfonamidas o tioureas según la formula III de la figura 54, se recogen en la siguiente tabla:

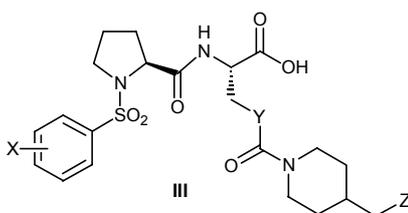
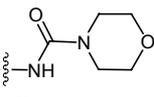
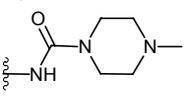
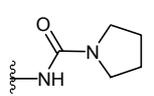
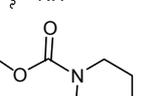
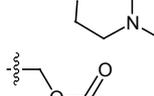
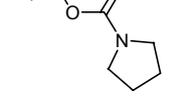
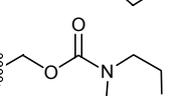
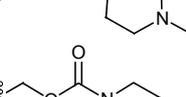


Figura 54

Tabla 5.3 Inhibición de la adhesión celular dependiente de VLA-4.

Comp.	X	Y	Z	VLA-4/CS-1 Cl ₅₀ (nM) ^a ó % Inhibición ^b	VLA-4/VCAM-1 Cl ₅₀ (nM) ^a ó % Inhibición ^b
BIO-1211				45,7±31	1059,3±673
TR-14035				4,9±2,4	137,6±88,4
UR-13276	3,5-diCl	CH ₂		58	2137
UR-13277	3,5-diCl	CH ₂		23	1983
UR-13292	3,5-diCl	CH ₂		166	
UR-13278	3,5-diCl	CH ₂			1915
UR-13296	3,5-diCl	CH ₂		11,6±	2195
UR-13257	4-Me	CH ₂		97/60/34	
UR-13310	3,5-diCl	CH ₂		100/97/39	
UR-13323	3,5-diCl	CH ₂		3,5	882±527
UR-13355	3,5-diCl	CH ₂		99/99/34	
UR-13348	3,5-diCl	CH ₂		127,6±29,8	

Comp.	X	Y	Z	VLA-4/CS-1 Cl ₅₀ (nM) ^a ó % Inhibición ^b	VLA-4/VCAM-1 Cl ₅₀ (nM) ^a ó % Inhibición ^b
UR-13240	4-Me	CH ₂		188±45	2329±1042
UR-13256	3,5-diCl	CH ₂		37±3	1292±624
UR-13273	3,5-diCl	CH ₂		17±21	307±182
UR-13324	3,5-diCl	CH ₂		33±19	1405±441
UR-13341	3,5-diCl	CH ₂		122	1373±634
UR-13332	3,5-diCl	CH ₂		99/96/62	89/20/8
UR-13357	3,5-diCl	CH ₂		98/95/55	
UR-13299	3,5-diCl	CH ₂		2,3±2	970±156
UR-13322	3,5-diCl	CH ₂		26±6,6	254±183
UR-13442	3,5-diCl	NH		9,8±1	75,6±24,5
UR-13354	4-Me	CH ₂		99/95/28	

^aValores de Cl₅₀ calculados como la media de 1,2 ó 3 determinaciones ^b% de inhibición a concentraciones de 10/1/0,1 nM

De los resultados de estas evaluaciones, se deduce que los compuestos que a parte de la función carbonílica contenían diferentes cadenas alquílicas más o menos ramificadas (**UR-13276** a **UR-13348** siguiendo el orden de la tabla), presentaron una buena actividad en el test sobre CS-1 pero mostraron una actividad muy discreta en el selectivo test sobre la VCAM-1. Por otro lado, cuando el grupo amida pertenece a una estructura cíclica la actividad aumenta considerablemente (**UR-13260** y **UR-13287** de la tabla 5.1 y especialmente el carbamato **UR-13273** tabla 5.3).

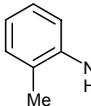
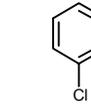
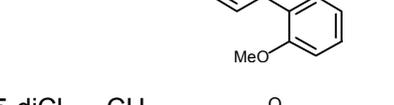
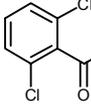
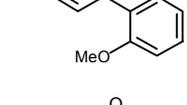
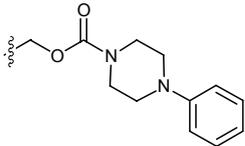
El siguiente paso fue evaluar los compuestos que alojaban el carbonilo fuera de la estructura cíclica. En este grupo de compuestos se prepararon carbamatos y ureas

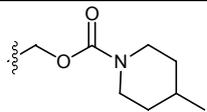
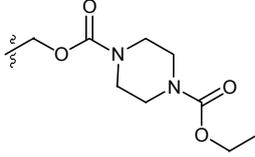
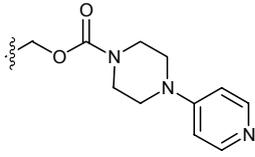
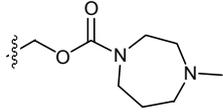
que unían la 4-metilpiperidina o 4-etilpiperidina con radicales cíclicos. Los resultados en el test sobre VCAM-1 demostraron ser muy sensibles a la naturaleza del radical que acompaña al grupo carbonilo, siendo la 4-metilpiperazina en el **UR-13322** el que confirió más actividad. En este grupo se reafirmó que:

- los 3,5-diclorobencenosulfonil derivados eran más activos que los 4-metilbencenosulfonil derivados (**UR-13322** vs **UR-13354**)
- los derivados del DAP presentan una afinidad por la VLA-4 superior a la de los derivados del ácido glutámico (**UR-13442** vs **UR-13322**)
- la diferencia de distancias, entre los grupos funcionales que intervienen en la unión, proporcionadas por la 4-metilpiperidina o la 4-etilpiperidina (**UR-13357** vs **UR-13322**) puede modular la actividad pero no es crítica, y por lo tanto cabe una cierta flexibilidad en este parámetro

La alta actividad mostrada por el **UR-13442** ($Cl_{50}=75,6\pm 24,5$ nM en VCAM-1/VLA-4), acompañada por las mejoras sintéticas introducidas en la obtención de los derivados del ácido (S)-2,3-diaminopropiónico, nos llevó a preparar una serie de carbamatos análogos al **UR-13442** con el fin de profundizar en las posibilidades de esta estructura. Los resultados proporcionados por estas moléculas son los resumidos en la tabla 5.4

Tabla 5.4 Inhibición de la adhesión celular dependiente de VLA-4.

Comp.	X	Y	Z	VLA-4/CS-1 Cl_{50} (nM) ^a	VLA-4/VCAM-1 Cl_{50} (nM) ^a
BIO-1211				45,7±31	1059,3±673
TR-14035				4,9±2.4	137,6±88,4
UR-13495	3,5-diCl	CH ₂		135,4±19,4	2387,5±683,8

Comp.	X	Y	Z	VLA-4/CS-1 Cl ₅₀ (nM) ^a	VLA-4/VCAM-1 Cl ₅₀ (nM) ^a
UR-15064	3,5-diCl	NH		79,1±9,9	1004,7±543,5
UR-15068	3,5-diCl	NH		41,5±1	529,6±197
UR-15069	3,5-diCl	NH		5,6±0,5	210,2±58,2
UR-15067	3,5-diCl	NH		33,7±8	523,3±359,1

^aValores de Cl₅₀ calculados como la media de 1,2 ó 3 determinaciones

Todos estos compuestos son potentes antagonistas de la integrina VLA-4 con actividades del mismo orden que los compuestos de la competencia. Esta conservación de la actividad en estructuras químicamente diferentes nos ofrece la posibilidad de realizar un posterior estudio estructura-propiedades fisicoquímicas (SPR) que complemente a este estudio estructura-actividad (SAR).

Finalmente, probamos la serie de compuestos que no tenían función carbonílica como sustituyente en el radical piperidina, sino que tenían básicamente aminas secundarias y terciarias como sustituyente. Estos compuestos son los que se ajustan a la fórmula general **IV** de la figura 55:

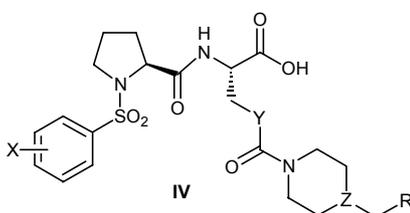
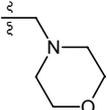


Figura 55

Los resultados de la evaluación *in vitro* de estos compuestos son los siguientes:

Comp.	X	Y	Z	R	VLA-4/CS-1 Cl ₅₀ (nM) ^a ó % Inhibición ^b	VLA-4/VCAM-1 Cl ₅₀ (nM) ^a ó % Inhibición ^b
UR-13362	4-Me	CH ₂	CH		96/95/52	
UR-13302	3,5-diCl	CH ₂	CH		0,5	1058±82

^aValores de Cl₅₀ calculados como la media de 1,2 ó 3 determinaciones ^b% de inhibición a concentraciones de 10/1/0,1 nM

En esta serie encontramos derivados como el **UR-13327**, **UR-13339**, **UR-13336**, y el **UR-13303** que consiguen actividades importantes y son compuestos muy diferentes del resto de series evaluadas. Estas moléculas no contienen grupos carbonílicos capaces de actuar como aceptores de puentes de hidrógeno, sino que esta función seguramente debe de ser desarrollada por la amina terciaria, ya que a pesar de ser considerados como pobres aceptores de puentes de hidrógeno, probablemente se aloja en la misma zona del receptor.

Tenemos compuestos con radicales que contienen una amina terciaria formando parte de un ciclo saturado, como el **UR-13303** (Cl₅₀= 196±108 nM en VCAM-1/VLA-4), o con radicales que contienen una amina terciaria no cíclica como el **UR-13338** (Cl₅₀= 193 nM en VCAM-1/VLA-4) que presentan una actividad similar a patrones como el **TR-14035**.

En la serie de dimetilamino derivados (**UR-12391**, **UR-13359**, **13338**, y **UR-13345**) se reafirman las conclusiones de nuestro SAR en cuanto a sustitución del arilsulfonilo de la prolina y en cuanto a la naturaleza del aminoácido del spacer central. En esta serie de derivados se evaluó también el derivado de la serina (**UR-13345**) que resultó ser mas activo que el análogo derivado del glutámico pero no superó al derivado del DAP. Este hecho acompañado de los problemas de estabilidad que hemos comentado en la parte experimental, nos hicieron desestimar la preparación de más compuestos de este tipo.

6. CONCLUSIONES

Tal como se pretendía, se han preparado 61 nuevos compuestos para su evaluación como antagonistas de la integrina VLA-4. Estos compuestos se han diseñado teniendo en cuenta un modelo desarrollado por la sección de *Molecular Modelling*, a partir de un análisis de superposición y minimización energética de las moléculas que se toman como patrones y su similitud con la región del ligando natural VCAM-1 que interviene en la unión (*CD-loop*).

Se ha desarrollado un esquema de síntesis convergente común para la preparación de dos de las tres familias de compuestos diseñados: derivados del ácido glutámico, y del ácido (S)-2,3-diaminopropiónico, a partir del acoplamiento de unos intermedios claves (**120**, **121**, **175**, y **176**) y una serie de piperazinas y piperidinas 4-sustituídas (NHR₂N₃) preparadas para tal propósito.

Concretamente se han preparado 46 aminas NHR₂R₃ siguiendo una metodología sintética variada, para llevar a cabo estos acoplamientos con los intermedios claves.

La preparación de los derivados del ácido glutámico se ha optimizado y se han conseguido rendimientos excelentes a partir del acoplamiento de los ácidos intermedios **120** y **121** y las aminas NHR₂R₃ usando HBTU como agente condensante.

Las ureas derivadas del ácido (S)-2,3-diaminopropiónico se preveían difíciles de sintetizar dada la escasa literatura publicada al respecto y dada la existencia del grupo amida del α -aminoácido. Se obtuvieron compuestos a partir de los intermedios **175** y **176** y las correspondientes aminas NHR₂R₃ usando trifosgeno con rendimientos modestos (20 % de media). Finalmente se desarrolló una metodología específica para estos compuestos a partir de la apertura nucleofílica de la imidazolidinona **182** con las aminas NR₂R₃ usando radiación de microondas. El método ha resultado ser altamente regioselectivo y se ha mantenido intacto el centro quiral. Los rendimientos se elevaron hasta un 40-50 % de media, lo cual abre una nueva vía de síntesis de este tipo de compuestos y la introducción de la tecnología del microondas en la preparación de ureas derivadas del ácido (S)-2,3-diaminopropiónico.

Se ha preparado un compuesto derivado de la serina. Se han encontrado las condiciones necesarias para la obtención de esta molécula que se presumía especialmente difícil (al activar el grupo hidroxilo junto a la acidez del protón α -aminoácido la β -eliminación estaba muy favorecida). El esquema sintético es diferente al resto y supone la incorporación del ácido derivado de la prolina **115** al intermedio

192 al final de la síntesis. La hidrólisis básica final ha puesto de manifiesto la inestabilidad de estos derivados tal y como habíamos anticipado.

Todos los compuestos se han caracterizado adecuadamente mediante técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) de protón y HPLC-MS. El **UR-13249** se tomó como ejemplo de referencia y sobre este compuesto se llevó a cabo un análisis estructural exhaustivo. Se realizaron experimentos de RMN como el HSQC, HSQC-TOCSY y el HSQC-editing.

Los compuestos que presentaban desdoblamiento de señales en el espectro de protón fueron objeto de un estudio con el fin de elucidar si nos encontrábamos ante un caso de varias conformaciones de un mismo compuesto o ante impurezas no identificadas. Tomando como ejemplo el **UR-13187** y mediante experimentos de resonancia de protón a diferentes temperaturas hemos demostrado que tenemos compuestos con diferentes conformaciones no interconvertibles a temperatura ambiente.

Los compuestos preparados han sido evaluados farmacológicamente. Varios compuestos han conseguido actividades del orden e incluso superiores a las de los compuestos de otras compañías como el **BIO-1211** o el **TR-14035**. Entre las moléculas más activas se hallan el **UR-13287**, el **UR-13312**, el **UR-13447**, el **UR-13322**, el **UR-13442**, y el **UR-13338**.

Del estudio estructura-actividad (SAR) de las moléculas sintetizadas se han deducido importantes hechos estructurales, siendo el más importante la confirmación de que el anillo central de los compuestos N-fenilalanínicos desarrollados por las compañías de la competencia no es crucial para la actividad. El haber encontrado buenas actividades en las piperidinas y piperazinas nos permite concluir, que el fenilo de la fenilalanina probablemente está actuando como espaciador y por lo tanto puede ser sustituido por otros radicales. Esto abre un amplio campo de nuevos compuestos que pueden actuar como antagonistas de la VLA-4.

Los compuestos que hemos destacado han sido incluidos en un programa de ADMET (Absorption Distribution Metabolism Excretion Toxicology) del cual se seleccionarán, si cumplen las propiedades exigidas, los candidatos para iniciar un estudio preclínico dentro de la Unidad de Drug Discovery de J.Uriach & Cía.