prolina, L-(2-metil)prolina, ácido L-pipecolínico, ácido L-azetidine-2-carboxilic, ácido L-indolin-2-carboxílico, ácido L-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, ácido L-tiiazolidin-4-carboxílico, ácido L-(5,5-dimetil)tiazolidin-4-carboxílico, ácido L-tiamorfolin-3-carboxílico, glicina, 2-*tert*-butilglicina, D,L-fenilglicina, L-alanina, α-metilalanina, *N*-metil-L-fenilalanina, L-difenilalanina, sarcosina, D,L-fenilsarcosina, β-*tert*-butil éster del ácido L-aspártico, γ-*ter*-butil éster del ácido L-glutámico, L-(*O*-bencil)serina, ácido 1-aminociclopropanocarboxílico ácido, 1-aminociclobutanocarboxílico, acid 1-aminociclopentanocarboxílico (cicloleucina), 1- ácido aminociclohexanocarboxílico, L-serina y similares. Si se desea, los correspondientes esters del ácido carboxílico de los aminoácidos de la Fórmula III, tales como los ésteres metílicos, los ésteres etílicos y similares, se pueden utilizar en la reacción antes descripta con el cloruro de sulfonilo IV. La posterior hidrólisis del grupo éster del ácido carboxílico usando reactivos y condiciones normales, por ejemplo, tratamiento con un hidróxido de metal alcalino en un solvente inerte tal como metanol/agua, permite obtener el aminoácido N-sulfonilo V.

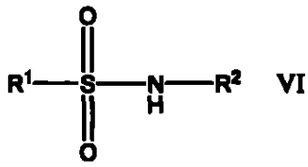
De forma simular, los cloruros de sulfonilo de la Fórmula IV usados en las reacciones arriba descriptas son compuestos conocidos o compuestos que se pueden preparar a partir de compuestos conocidos mediante procedimientos de síntesis convencionales. Estos compuestos típicamente se preparan a partir del correspondiente ácido sulfónico, por ejemplo, a partir de compuestos de la fórmula R^1-SO_3H, usando tricloruro de fósforo y pentacloruro de fósforo. Esta reacción generalmente se lleva a cabo poniendo en contacto el ácido sulfónico con alrededor de 2 a 5 equivalentes

molares de tricloruro de fósforo y pentacloruro de fósforo, ya sea puro o en un solvente inerte, tal como diclorometano, a una temperatura comprendida entre alrededor de 0EC y alrededor de 80EC durante aproximadameante 1 a 48 horas para obtener el cloruro de sulfonilo. Alternativamente, los cloruros de sulfonilo de la Fórmula IV se pueden preparer a partir del correspondiente compuesto tiol, por ejemplo, a partir de compuestos de la fórmula R^1-SH, tratando el tiol con cloro (Cl_2) y agua bajo condiciones de reacción convencionales.

Los ejemplos de cloruros de sulfonilo adecuados para usar en esta invención incluyen, pero no se limitan a, cloruro de metanosulfonilo, cloruro de 2-propanosulfonilo, cloruro de 1-butanosulfonilo, cloruro de bencenosulfonilo, cloruro de 1-naftalenosulfonilo, cloruro de 2-naftalenosulfonilo, cloruro de *p*-toluenosulfonilo, cloruro de α-toluenosulfonilo, cloruro de 4-acetamidobencenosulfonilo, cloruro de 4-amidinobencenosulfonilo, cloruro de 4-*ter*-butilbencenosulfonilo, cloruro de 4-bromobencenosulfonilo, cloruro de 2-carboxibencenosulfonilo, cloruro de 4-cianobencenosulfonilo, cloruro de 3,4-diclorobencenosulfonilo, cloruro de 3,5-diclorobencenosulfonilo, cloruro de 3,4-dimetoxibencenosulfonilo, cloruro de 3,5-ditrifluorometilbencenosulfonilo, cloruro de 4-fluorobencenosulfonilo, cloruro de 4-metoxibencenosulfonilo, cloruro de 2-metoxicarbonilbencenosulfonilo, cloruro de 4-metilamidobencenosulfonilo, cloruro de 4-nitrobencenosulfonilo, cloruro de 4-tioamidobencenosulfonilo, cloruro de 4-trifluorometilbencenosulfonilo, cloruro de 4-trifluorometoxibencenosulfonilo, cloruro de 2,4,6-trimetilbencenosulfonilo, cloruro de 2-feniletanosulfonilo, cloruro de 2-tiofenosulfonilo, cloruro de

5-cloro-2-tiofenosulfonilo, cloruro de 2,5-dicloro-4-tiofenosulfonilo, cloruro de 2-tiazolasulfonilo, cloruro de 2-metil-4-tiazolasulfonilo, cloruro de 1-metil-4-imidazolasulfonilo, cloruro de 1-metil-4-pirazolasulfonilo, cloruro de 5-cloro-1,3-dimetil-4-pirazolasulfonilo, cloruro de 3-piridinasulfonilo, cloruro de 2-pirimidinasulfonilo y similares. Si se desea, en vez del cloruro de sulfonilo, en la reacción anterior para formar los aminoácidos sulfonilo de la Fórmula V se puede utilizar un fluoruro de sulfonilo, un bromuro de sulfonilo o un ácido sulfónico anhídrido.

Los aminoácidos *N*-sulfonilo intermedios de la Fórmula V también se pueden preparar haciendo reaccionar una sulfonamida de la Fórmula VI:

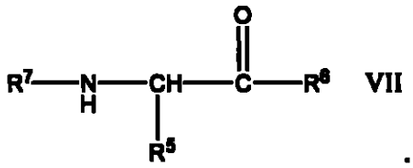


VI

con un derivado del ácido carboxílico de la Fórmula $L(R^3)CHCOOR^y$ donde L es un grupo saliente, tal como cloro, bromo, iodo, mesilato, tosilato y similares, y R^y es hidrógeno o un grupo alquilo. Esta reacción típicamente se lleva a cabo poniendo en contacto la sulfonamida VI con al menos un equivalente, preferentemente 1,1 a 2 equivalentes, del derivado del ácido carboxílico en presencia de una base adecuada, tal como la trietilamina, en un solvente inerte, tal como DMF, a una temperatura comprendida entre alrededor de 24EC y alrededor de 37EC durante aproximadamente 0,5 a 4 horas. Esta reacción también se describe en Zuckermann *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, *114*, 10646-10647. Los derivados del ácido carboxílico preferidos para utilizar en esta reacción son los ésteres de los ácidos α-cloro y α-bromocarboxílicos tales como el bromoacetato de *ter*-butilo y similares.

Cuando en esta reacción se emplea un éster de un ácido carboxílico, el grupo éster luego se hidroliza usando procedimientos convencionales para obtener un aminoácido *N*-sulfonilo de la Fórmula V.

Luego los compuestos de la presente invención se preparan acoplando el aminoácido *N*-sulfonilo de la Fórmula V con un derivado de aminoácido de la VII:



VII

Típicamente esta reacción de acoplamiento se lleva a cabo utilizando reactivos de acoplamiento bien conocidos tales como las carbodiimidas, el reactivo BOP (hexafluorofosfonato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)fosfonio) y similares. Las carbodiimidas incluyen, a modo de ejemplo, diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1-(3-dimetilamino-propil)-3-etilcarbodiimida (EDC) y similares. Si se desea, también se pueden usar formas soportadas por polímeros de los reactivos de acoplamiento carbodiimidas, por ejemplo, aquellas descriptas en *Tetrahedron Letters*, **34**(48), 7685 (1993). Además, para facilitar la reacción de acoplamiento se pueden utilizar los promotores conocidos, tales como la N-hidroxisuccinimida, la 1-hidroxibenzotriazola y similares.

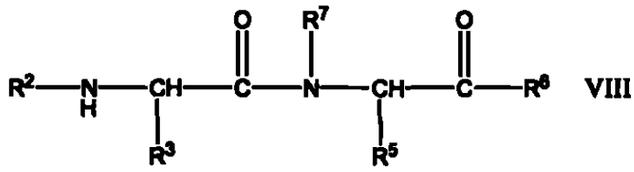
Esta reacción de acoplamiento típicamente se lleva a cabo poniendo el contacto el *N*-sulfonilaminoácido V con alrededor de 1 a 2 equivalentes del reactivo de acomplamiento y al menos un equivalente, preferentemente entre alrededor de 1 y alrededor de 1,2 equivalentes, del derivado de aminoácido VII en un solvente inerte tal como diclorometano, cloroformo, acetonitrilo, tetrahidrofurano, *N*,*N*-dimetilformamido y similares.

Generalmente, esta reacción se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre alrededor de 0EC y alrededor de 37EC durante alrededor de 12 a 24 horas. Una vez completada la reacción, el compuesto de la presente invención se recupera mediante métodos convencionales, incluyendo la neutralización, la extracción, la precipitación, la cromatografía, la filtración y similares.

Alternativamente, el aminoácido *N*-sulfonilo V se puede convertir en un haluro de ácido y acoplar el haluro de ácido con el derivado de aminoácido VII para obtener los compuestos de la presente invención. El haluro de ácido de V se puede preparar poniendo en contacto V con un haluro de ácido inorgánico, tal como el cloruro de tionilo, el tricloruro de fósforo, el tribromuro de fósforo o el pentacloruro de fósforo, o preferentemente, con cloruro de oxalilo bajo condiciones convencionales. Generalmente, esta reacción se lleva a cabo usando alrededor de 1 a 5 equivalentes molares del haluro de ácido inorgánico o cloruro de oxalilo, ya sea puro o en un solvente inerte, tal como diclorometano o tetracloruro de carbono, a una temperatura comprendida entre alrededor de 0EC y alrededor de 80EC durante alrededor de 1 a 48 horas. En esta reacción también se puede usar un catalizador, tal como DMF. Luego el haluro de ácido del aminoácido *N*-sulfonilo V se pone en contacto con al menos un equivalente, preferentemente entre alrededor de 1,1 y alrededor de 1,5 equivalentes, de derivado de aminoácido VII en un solvente inerte, tal como diclorometano, a una temperatura comprendida entre alrededor de -70EC y alrededor de 40EC durante alrededor de 1 24 horas. Preferentemente, esta reacción se lleva a cabo en presencia de una base adecuada para neutralizar el ácido generado durante la reacción. Las bases adecuadas incluyen, a modo de

ejemplo, las aminas terciarias, tales como la trietilamina, la diisopropiletilamina, la *N*-metilmorfolina y similares. Alternativamente, la reacción se puede llevar a cabo bajo condicoines tipo Schotten-Baumann usando un álcali acuoso, tal como el hidróxido de sodio y similares. Una vez completada la reacción, el compuesto de la presente invención se recupera mediante métodos convencionales, incluyendo la neutralización, la extracción, la precipitación, la cromatografía, la filtración y similares.

Alternativamente, los compuestos de la presente invención se pueden preparar primer formando un derivado de diaminoácido de la VIII:



VIII

Los derivados de diaminoácido de la Fórmula VIII se pueden preparar fácilmente acoplando un aminoácido de la Fórmula III con un derivado de aminoácido de la Fórmula VII usando las técnicas de acoplamiento de aminoácidos y reactivos convencionales, tales como las carbodiimidas, reactivo BOP y similares, tal como se describió anteriormente. Luego el diaminoácido VIII se puede sulfonatar usando un cloruro de sulfonilo de la Fórmula IV y usando los procedimientos de síntesis antes descriptos para obtener un compuesto de la presente invención.

Los derivados de aminoácido de la Fórmula VII empleados en las reacciones anteriores son compuestos conocidos o compuestos que se pueden preparar a partir de compuestos conocidos mediante procedimientos de síntesis convencionales. Por ejemplo, los derivados de aminoácido de la Fórmula VII se pueden preparar C-alquilando dietil 2-acetamidomalonato disponible comercialmente (Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, USA) con un

alquilo o un haluro de alquilo sustituido. Esta reacción típicamente se lleva a cabo tratando el dietil 2-acetamidomalonato con al menos un equivalente de etóxido de sodio y al menos un equivalente de un alquilo o un haluro de alquilo sustituido en etanol en reflujo durante alrededor de 6 a 12 horas. El malonato C-alquilado resultante luego se desacetiliza, hidroliza y decarboxila por calentamiento en ácido clorhídrico en reflujo durante alrededor de 6 a 12 horas para obtener el aminoácido, típicamente bajo la forma de la sal de hidrocloruro.

Los ejemplos de derivados de aminoácido de la Fórmula VII adecuados para usar en las anteriores reacciones incluyen, pero no se limitan a, L-tirosina, éster metílico de L-3,5-diiodotirosina, L-3-iodotirosina, β-(4-hidroxi-naftil-1-il)-L-alanina, éster metílico de β-(6-hidroxi-naft-2-il)-L-alanina y similares. Si se desea, obviamente, también se pueden emplear otros ésteres o amidas de los compuestos arriba descriptos.

Para facilitar su síntesis, los compuestos de la presente invención típicamente se preparan como un éster, por ejemplo, donde R^6 es un grupo alcoxilo o un grupo alcoxilo sustituido y similares. Si se desea, el grupo éster se puede hidrolizar usando condiciones y reactivos convencionales para obtener el correspondiente ácido carboxílico. Típicamente, esta reacción se lleva a cabo tratando el éster con al menos un equivalente de un hidróxido de metal alcalino, tal como hidróxido de litio, sodio o potasio, en un solvene inerte tal como metanol o mezclas de metanol y agua, a una temperatura comprendida entre alrededor de 0EC y alrededor de 24EC durante alrededor de 1 a 10 horas. Alternativamente, los esteres bencílicos se pueden remover por hidrogenolisis usando un catalizador de paladio, tal como paladio en carbono. Los ácidos carboxílicos resultantes se pueden

acoplar, si se desea, con aminas tales como el éster etílico de β-alanina, hidroxiaminas tales como la hidroxilamina y la *N*-hidroxisuccinimida, alcoxiaminas y alcoxiaminas sustituidas tales como *O*-metilhidroxilamina y *O*-bencilhidroxilamina, y similares, usando reactivos de acoplamiento y condiciones convencionales como las antes descriptas.

Como será evidente para las personas expertas en la técnica, otros grupos funcionales presentes en cualquiera de los sustituyentes de los compuestos de la presente invención se pueden modificar o derivatizar fácilmente antes o después de las reacciones de acoplamiento arriba descriptas usando procedimientos de síntesis conocidos. Por ejemplo, un grupo nitro presente en un sustituyente de un compuesto de la presente invención o un intermediario del mismo se puede reducir fácilmente por hidrogenación en presencia de un catalizador de paladio, tal como paladio en carbono, para obtener el correspondiente grupo amino. Esta reacción típicamente se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre alrededor de 20EC y alrededor de 50EC durante un período de entre alrededor de 6 y alrededor de 24 horas en un solvente inerte tal como el metanol. Los compuestos que tienen un grupo nitro en, por ejemplo, el sustituyente R^3, se pueden preparar, por ejemplo, usando un derivado de 4-nitrofenilalanina y similares en las reacciones de acoplamiento arriba descriptas.

De manera similar, un grupo piridilo se puede hidrogenar en presencia de un catalizador de paladio, tal como óxido de platino, en un solvente ácido para obtener el correspondiente análogo de piperidinilo. Generalmente, esta reacción se lleva a cabo tratando el compuesto de piridina con hidrógeno a una presión comprendida entre alrededor de 20 psi y alrededor de 60 psi, preferentemente alrededor de 40 psi, en presencia del catalizador

747

a una temperatura comprendida entre alrededor de 20EC y alrededor de 50EC durante alrededor de 2 a 24 horas en un solvente ácido, tal como una mezcla de metanol y ácido clorhídrico acuoso. Los compuestos que tienen un grupo piridil se pueden preparar fácilmente usando, por ejemplo, derivados de β-(2-piridil)-, β-(3-piridil)- o β-(4-piridil)-L-alanina en las reacciones de acoplamiento arriba descriptas.

Además, cuando un sustituyente de un compuesto de la presente invención o un intermediario del mismo contiene un grupo amino primario o secundario, tales grupos amino se pueden derivatizar aún más, ya sea antes o después de las reacciones de acoplamiento arriba descriptas, para obtener, a modo de ejemplo, amidas, sulfonamidas, ureas, tioureas, carbamatos, aminas secundarias o terciarias y similares. Los componentes que tienen un grupo amino primario en dicho sustituyente se pueden preparar, por ejemplo, por reducción del correspondiente compuesto nitro como se describió anteriormente. Alternativamente, estos compuestos se pueden preparar usando un derivado de aminoácido de la Fórmula VII derivado de lisina, 4-aminofenilalanina y similares en las reacciones de acoplamiento antes descriptas.

A modo de ilustración, un compuesto de la presente invención o cualquier intermediario de los mismos que tiene un sustituyente que contiene un grupo amino primario o secundario se puede N-acilar fácilmente usando reactivos acilantes y condiciones convencionales para obtener la correspondiente amida. Esta reacción de acilación típicamente se lleva a cabo tratando el compuesto de amino con al menos un equivalente, preferentemente entre alrededor de 1,1 y alrededor 1,2 equivalentes, de un ácido carboxílico en presencia de un reactivo de acoplamiento tal como una

carbodiimida, reactivo BOP (hexafluorofosfonato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)-fosfonio) y similares, en un solvente inerte, tal como diclorometano, cloroformo, acetonitrilo, tetrahidrofurano, *N,N*-dimetilformamida y similares, a una temperatura comprendida entre alrededor de 0EC y alrededor de 37EC durante alrededor de 4 a 24 horas. Preferentemente, se utiliza un promotor, tal como *N*-hidroxisuccinimida, 1-hidroxibenzotriazol y similares, para facilitar la reacción de acilación. Los ejemplos de los ácidos carboxílicos adecuados para usar en esta reacción incluyen, pero no se limitan a, *N-ter*-butiloxicarbonilglicina, *N-ter*-butiloxicarbonil-L-fenilalanina, ácido *N-ter*-butiloxicarbonil-L-aspártico éster bencílico, ácido benzoico, ácido *N-ter*-butiloxicarbonilisonipecótico, ácido *N*-metilisonipecótico, ácido *N-ter*-butiloxicarbonilnipecótico, ácido *N-ter*-butiloxicarbonil-L-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolina y similares.

Alternativamente, un compuesto de la presente invención o un intermediario de los mismos que contiene un grupo amino primario o secundario se puede *N*-acilar usando un haluro de acilo o un ácido carboxílico anhídrido para formar la correspondiente amida. Esta reacción típicamente se lleva a cabo poniendo en contacto el compuesto de amino con al menos un equivalente, preferentemente entre alrededor de 1,1 y alrededor de 1,2 equivalentes, del haluro de acilo o ácido carboxílico anhídrido en un solvente inerte tal como diclorometano, a una temperatura comprendida entre alrededor de -70EC y alrededor de 40EC durante alrededor de 1 a 24 horas. Si se desea, se puede utilizar un catalizador de la acilación tal como la 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina para promover la reacción de acilación. Preferentemente la reacción de acilación se lleva a

cabo en presencia de una base adecuada para neutralizar el ácido generado durante la reacción. Las bases adecuadas incluyen, a modo de ejemplo, las terciaria aminas, tales como la trietilamina, la diisopropiletilamina, la *N*-metilmorfolina y similares. Alternativamente, la reacción se puede llevar a cabo bajo condiciones tipo Schotten-Baumann usando un álcali acuoso tal como hidróxido de sodio y similares.

Los ejemplos de haluros de acilo y ácidos carboxílicos anhidros que son adecuados para utilizar en esta reacción incluyen, pero no se limitan a, cloruro de 2-metilpropionilo, cloruro de trimetilacetilo, cloruro de fenilacetilo, cloruro de benzoilo, cloruro de 2-bromobenzoilo, cloruro de 2-metilbenzoilo, cloruro de 2-trifluorometilbenzoilo, cloruro de isonicotinoilo, cloruro de nicotinoilo, cloruro de picolinoilo, anhídrido acético, anhídrido succínico y similares. Los cloruros de carbamilo, tales como el cloruro de *N,N*-dimetilcarbamilo, el cloruro de *N,N*-dietilcarbamilo y similares, también se pueden utilizar en esta reacción para obtener ureas. De manera similar, los dicarbonatos, tales como el dicarbonatao de di-*ter*-butilo, se pueden usar para obtener carbamatos.

De manera similar, un compuesto de la presente invención o un intermediario de los mismos que contiene un grupo amino primario o secundario se puede N-sulfonatar para formar una sulfonamida usando haluro de sulfonilo o ácido sulfónico anhidro. Los haluros de sulfonilo y los ácidos sufónicos anhidros adeucados para usar en esta reacción incluyen, pero no se limitan a, cloruro de metanosulfonilo, cloruro de clorometanosulfonilo, cloruro de *p*-toluenesulfonilo, anhídrido trifluorometanosulfónico y similares. De manera similar, los cloruros de

sulfamoilo, tales como el cloruro de dimetilsulfamoilo, se pueden usar para obtener sulfamidas (por ejemplo, >N-SO_2-N<).

Además, un grupo amino primario y secundario presente en un sustituyente de un compuesto de la presente invención o un intermediario de los mismos se puede hacer reaccionar con un isocianato o un a tioisocianato para obtener una urea o tiourea, respectivamente. Esta reacción típicamente se lleva a cabo poniendo en contacto el compuesto amino con al menos un equivalente, preferentemente entre alrededor de 1,1 y alrededor de 1,2 equivalentes, del isocianato o tioisocianato en un solvente inerte, tal como tolueno y similares, a una temperatura comprendida entre alrededor de 24EC y alrededor de 37EC durante alrededor de 12 a 24 horas. Los isocianatos y tioisocianatos usados en esta reacción están disponibles comercialmente o se pueden preparar a partir de compuestos disponibles comercialmente usando procedimientos de síntesis conocidos. Por ejemplo, isocianatos y tioisocianatos se preparan fácilmente haciendo reaccionar la amina adecuada con fosgeno o tiofosgeno. Los ejemplos de isocianatos y tioisocianatos adecuados para usar en esta reacción incluyen, pero no se limitan a, etil isocianato, *n*-propil isocianato, 4-cianofenil isocianato, 3-metoxifenil isocianato, 2-feniletil isocianato, metil tioisocianato, etil tioisocianato, 2-feniletil tioisocianato, 3-fenilpropil tioisocianato, 3-(*N*,*N*-dietilamino)propil tioisocianato, fenil tioisocianato, bencil tioisocianato, 3-piridil tioisocianato, fluorescein isotiocianateo(isómero L) y similares.

Además, cuando un compuesto de la presente invención o un intermediario de los mismos contiene un grupo amino primario o secundario, el grupo amino se puede alquilar reductivamente usando

aldehídos o cetonas para formar un grupo amino secundario o terciario. Esta reacción típicamente se lleva a cabo poniendo en contacto el compuesto amino con al menos un equivalente, preferentemente entre alrededor de 1,1 y alrededor de 1,5 equivalentes, de un aldehído o cetona y al menos un equivalente basado en el compuesto amino de un agente reductor metálico híbrido, tal como el cianoborohidrido sódico, en un solvente inerte tal como metanol, tetrahidrofurano, mezclas de los mismos y similares, a una temperatura comprendida entre alrededor de 0EC y alrededor de 50EC durante alrededor de 1 a 72 horas. Los aldehídos y cetonas adecuadas para usar en esta reacción incluyen, a modo de ejemplo, el benzaldehído, el 4-clorobenzaldehído el valeraldehído y similares.

De manera similar, cuando un compuesto de la presente invención o un intermediario de los mismos tiene un sustituyente que contiene un grupo hidroxilo, el grupo hidroxilo se puede modificar o derivatizar adicionalmente ya sea antes o después de las reacciones de acoplamiento arriba indicadas para obtener, a modo de ejemplo, éteres, carbamatos y similares. Los compuestos de las Fórmulas I y II que tienen un grupo hidroxilo en el sustituyente R^5, por ejemplo, se pueden preparar usando un derivado de aminoácido de la Fórmula VII derivado de la tirosina y similares en las reacciones arriba descriptas.

A modo de ejemplo, un compuesto de la presente invención o un intermediario de los mismos que tiene un sustituyente que contiene un grupo hidroxilo se puede *O*-alquilar fácilmente para formar éteres. Esta reacción de *O*-alquilación típicamente se lleva a cabo poniendo en contacto el compuesto de hidroxilo con un álcali o una base metálica de tierra alcalina adecuada, tal como carbonato de potasio, en un solvente inerte, tal

como acetona, 2-butanona y similares, para formar la sal alcalina o la sal metálica de tierra alcalina del grupo hidroxilo. Esta sal generalmente no está aislada, sino que se hace reaccionar *in situ* con al menos un equivalente de un haluro de alquilo o alquilo sustituido o sulfonato, tal como cloruro, bromuro, iodiduro, mesilato o tosilato de alquilo, para obtener el éter. Generalmente, esta reacción se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre alrededor de 60EC y alrededor de 150EC durante alrededor de 24 a 72 horas. Preferentemente, se añade una cantidad catalítica de ioduro de sodio o potasio a la mezcla de reacción cuando en la misma se emplea un cloruro o bromuro de alquilo.

Los ejemplos de haluros de alquilo o alquilo sustituido y sulfonatos adecuados para usar in esta reacción incluyen, pero no se limitan a, *ter*-butil bromoacetata, *N-ter*-butil cloroacetamida, 1-bromoetilbenceno, etil α-bromofenilacetato, cloruro de 2-(*N*-etil-*N*-fenilamino)etilo, cloruro de 2-(*N,N*-etilamino)etilo, cloruro de 2-(*N,N*-diisopropilamino)etilo, cloruro de 2-(*N,N*-dibencilamino)etilo, cloruro de 3-(*N,N*-etilamino)propilo, cloruro de 3-(*N*-bencil-*N*-metilamino)propilo, *N*-(2-cloroetil)morfolina, cloruro de 2-(hexametileneimino)etilo, cloruro de 3-(*N*-metilpiperazine)propilo, 1-(3-clorofenil)-4-(3-cloropropil)piperazina, cloruro de 2-(4-hidroxi-4-fenilpiperidine)etilo, tosilato de *N-ter*-butiloxicarbonil-3-piperidinemetilo y similares.

Alternativamente, un grupo hidroxilo presente en un sustituyente de un compuesto de la presente invención o un intermediario de los mismos se puede *O*-alquilar usando la reacción de Mitsunobu. En esta reacción, un alcohol, tal como el 3-(*N,N*-dimetilamino)-1-propanol y similares, se hace reaccionar con entre alrededor de 1,0 y alrededor de 1,3 equivalentes de

trifenilfosfina y entre alrededor de 1,0 y alrededor de 1,3 equivalentes de dietil azodicarboxilato en un solvente inerte, tal como tetrahidrofurano, a una temperatura comprendida entre alrededor de -10EC y alrededor de 5EC durante alrededor de 0,25 a 1 hora. Luego se agregan entre alrededor de 1,0 y alrededor de 1,3 equivalentes de un compuesto hidroxilo, tal como éster metílico de *N-ter*-butiltirosina, y la mezcla de reacción se agita a una temperatura de entre alrededor de 0EC y alrededor de 30EC durante alrededor de 2 a 48 horas para obtener el producto *O*-alquilado.

De manera similar, un compuesto de la presente invención o un intermediario de los mismos que contiene un grupo aril hidroxilo se puede hacer reaccionar con un ioduro de arilo para obtener un éter de diarilo. Generalmente, esta reacción se lleva a cabo formando la sal de metal alcalino del grupo hidroxilo usando una base adecuada, tal como hidruro de sodio, en un solvente inerte tal como xileno a una temperatura de entre alrededor de -25EC y alrededor de 10EC. Luego la sal se trata con entre alrededor de 1,1 y alrededor de 1,5 equivalentes de complejo bromuro cuproso sulfuro de dimetilo a una temperatura comprendida entre alrededor de 10EC y alrededor de 30EC durante alrededor de 0,5 a 2,0 horas, seguido de entre alrededor de 1,1 y alrededor de 1,5 equivalentes un ioduro de arilo, tal como 2-iodobenzoato de sodio y similares. A continuación la reacción se calienta a una temperatura de entre alrededor de 70EC y alrededor de 150EC durante aproximadamente 2 a 24 horas para obtener el éter de diarilo.

Adicionalmente, un complejo que contiene hidroxilo también se puede derivatizar fácilmente para formar un carbamato. En un método para preparar tales carbamatos, un compuesto de hidroxilo de la presente

invención o un intermediario de los mismos se pone en contacto con entre alrededor de 1,0 y alrededor de 1,2 equivalentes de 4-nitrofenil cloroformato en un solvente inerte, tal como diclorometano, a una temperatura comprendida entre alrededor de -25EC y alrededor de 0EC durante aproximadamente 0,5 a 2,0 horas. Tratando el carbonato resultante con un exceso, preferentemente entre alrededor de 2 y alrededor de 5 equivalentes, de una trialquilamina, tal como la trietilamina, durante aproximadamente 0,5 a 2 horas, seguido de alrededor de 1,0 a alrededor de 1,5 equivalentes de una amina primaria o secundaria se obtiene el carbamato. Los ejemplos de aminas adecuadas para usar en in esta reacción incluyen, pero no se limitan a, piperazina, 1-metilpiperazina, 1-acetilpiperazina, morfolina, tiomorfolina, pirrolidina, piperidina y similares.

Alternativamente, en otro método para preparar carbamatos, un compuesto que contiene hidroxilo se pone en contacto con entre alrededor de 1,0 y alrededor de 1,5 equivalentes de un cloruro de carbamilo en un solvente inerte, tal como diclorometano, a una temperatura comprendida entre alrededor de 25EC y alrededor de 70EC durante aproximadamente 2 a 72 horas. Típicamente, esta reacción se lleva a cabo en presencia de una base adecuada para neutralizar el ácido generado durante la reacción. Las bases adecuadas incluyen, a modo de ejemplo, las aminas terciarias, tales como la trietilamina, la diisopropiletilamina, la *N*-metilmorfolina y similares. Además, al menos un equivalente (basado en el compuesto de hidroxilo) de 4-(*N*,*N*-dimetilamino)piridina preferentemente se agrega a la mezcla de reacción para facilitar la misma. Los ejemplos de cloruros de carbamilo adecuados para usar in esta reacción incluyen, a modo de

ejemplo, el cloruro de dimetilcarbamilo, el cloruro de dietilcarbamilo y similares.

De manera similar, cuando un compuesto de la presente invención o un intermediario de los mismos contiene un grupo hidroxilo primario o secundario, tales grupos hidroxilos se pueden convertir fácilmente en un grupo saliente y ser desplazados para formar, por ejemplo, aminas, sulfuros y fluoruros. Por ejemplo, los derivados de la 4-hidroxi-L-prolina se pueden convertir en los correspondientes derivados 4-amino, 4-tio o 4-fluoro-L-prolina mediante desplazamiento nucleofílico del grupo hidroxilo derivatizado. Generalmente, cuando en estas reacciones se utilice un compuesto quiral, la estequiometría del átomo de carbono unido al grupo hidroxilo está típicamente invertida.

Estas reacciones típicamente se llevan a cabo, en primer término, convirtiendo el grupo hidroxilo en un grupo saliente, tal como un tosilato, mediante tratamiento del compuesto de hidroxilo con al menos un equivalente de un haluro de sulfonilo, tal como cloruro de *p*-toluenosulfonilo y similares, in piridina. Esta reacción generalmente se lleva a cabo a una temperatura de entre alrededor de 0EC y alrededor de 70EC durante aproximadamente 1 y 48 horas. El tosilato resultante luego se puede desplazar fácilmente con azuro de sodio, por ejemplo, poniendo en contacto el tosilato con al menos un equivalente azuro de sodio en un solvente inerte, tal como una mezcla de *N,N*-dimetilformamida y agua, a una temperatura comprendida entre alrededor de 0EC y alrededor de 37EC durante aproximadamente 1 a 12 horas para obtener el correspondiente compuesto de azido. El grupo azido luego se puede reducir, por ejemplo,

mediante hidrogenación usando un catalizador de paladio en carbono para obtener el compuesto (-NH_2) amino.

De manera similar, un grupo tosilato se puede desplazar fácilmente por un tiol para formar un sulfuro. Esta reacción típicamente se lleva a cabo poniendo en contacto el tosilato con al menos un equivalente de un tiol, tal como tiofenol, en presencia de una base adecuada, tal como 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), en un solvente inerte, tal como *N*,*N*-dimetilformamida, a una temperatura de entre alrededor de 0EC y alrededor de 37EC durante aproximadamente 1 a 12 horas para obtener el sulfuro. Además, tratando un tosilato con morfolinosulfur trifluoruro en un solvente inerte, tal como diclorometano, a una temperatura comprendida entre alrededor de 0EC y alrededor de 37EC durante aproximadamente 12 a 24 horas se obtiene el correspondiente compuesto fluoro.

Además, un compuesto de la presente invención o un intermediario de los mismos que tiene un sustituyente que contiene un grupo iodoarilo, por ejemplo, cuando R^5, de la Fórmula I o II, es un grupo (4-iodofenil)metilo, se puede convertir fácilmente, ya sea antes o después de las reacciones de acoplamiento arriba descriptas, en un compuesto biarilo. Típicamente, esta reacción se lleva a cabo tratando el compuesto iodoarilo con entre alrededor de 1,1 y alrededor de 2 equivalentes de un ioduro de aril-cinc, tal como el ioduro de 2-(metoxicarbonil)fenil-cinc, en presencia de un catalizador de paladio, tal como tetra(trifenilfosfina)paladio, in en un solvente inerte, tal como tetrahidrofurano, a una temperatura comprendida entre alrededor de 24EC y alrededor 30EC hasta que la reacción esté completa. Esta reacción también se describe, por ejemplo, in Rieke, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1445.

En algunos casos, los compuestos de la presente invención o sus intermediarios pueden contener sustituyentes que tienen uno o más átomos de azufre. Estos átomos de azufre estarán presentes, por ejemplo, cuando el aminoácido de la Fórmula III empleado en la reacción anterior se derive del ácido L-tiazolidin-4-carboxílico, el ácido L-(5,5-dimetil)tiazolidin-4-carboxílico, el ácido L-tiamorfolin-3-carboxílico y similares. Cuando están presentes, estos átomos de azufre se pueden oxidar ya sea antes o después de las reacciones de acoplamiento arriba descriptas para obtener un compuesto sulfóxido o sulfona usando reactivos y condiciones de reacción convencionales. Los reactivos adecuados para oxidar un compuesto sulfuro incluyen, a modo de ejemplo, el peróxido de hidrógeno, el ácido 3-cloroperoxibenzoico (MCPBA), el periodato de sodio y similares. La reacción de oxidación típicamente se lleva a cabo poniendo en contacto el compuesto de sulfuro con entre alrededor de 0,95 y alrededor de 1,1 equivalentes del reactivo oxidante en un solvente inerte, tal como diclorometano, a una temperatura comprendida entre alrededor de -50EC y alrededor de 75EC durante aproximadamente 1 a 24 horas. El sulfóxido resultante luego se puede oxidar nuevamente para obtener la correspondiente sulfona poniendo en contacto el sulfóxido con al menos un equivalente adicional de un reactivo oxidante, tal como peróxido de hidrógeno, MCPBA, permanganato de potasio y similares. Alternativamente, la sulfona se puede preparar directamente poniendo en contacto el sulfuro con al menos dos equivalentes, y preferentemente un exceso, del reactivo oxidante. Estas reacciones se describen en March, "*Advanced Organic Chemistry*", 4ta Ed., pp. 1202-1202, Wiley Publishers, (1992).

Como se describió en párrafos precedentes, los compuestos de la presente invención que tienen un sustituyente R^2 diferente a un hidrógeno se pueden preparar usando un aminoácido *N*-sustituido de la Fórmula III, tal como sarcosina, *N*-metil-L-fenilalanina y similares, en las reacciones de acoplamiento arriba descriptas. Alternativamente, estos compuestos se pueden preparar por *N*-alquilación de una sulfonamida de las Fórmulas I o V (donde R^2 es hidrógeno) usando procedimientos de síntesis convencionales. Típicamente, esta reacción de *N*-alquilación se lleva a cabo poniendo el contacto la sulfonamida con al menos un equivalente, preferentemente 1,1 a 2 equivalentes, de un haluro de alquilo o alquilo sustituido en presencia de una base adecuada, tal como carbonato de potasio, en un solvente inerte, tal como acetona, 2-butanona y similares, a una temperatura comprendida entre alrededor de 25EC y alrededor de 70EC durante aproximadamente 2 a 48 horas. Los ejemplos de los haluros de alquilo o alquilo sustituido adecuados para usar in esta reacción incluyen, pero no se limitan a, el ioduro de metilo y similares.

Además, las sulfonamidas de las Fórmulas I o V en las cuales R^2 es hidrógeno y R^1 es un grupo 2-alcoxicarbonilarilo se pueden ciclizar intermolecularmente para formar derivados de 1,2-benzoisotiazol-3-ona o sus análogos. Esta reacción típicamente se lleva a cabo tratando una sulfonamida, tal como el éster bencílico de *N*-(2-metoxicarbonilfenilsulfonil)glicina-L-fenilalanina, con entre alrededor de 1,0 y 1,5 equivalentes de una base adecuada, tal como un hidruro de metal alcalino, en un solvente inerte, tal como tetrahidrofurano, a una temperatura comprendida entre alrededor de 0EC y alrededor de 30EC durante

aproximadamente 2 a 48 horas para obtener el derivado ciclizado de la 1,2-benzoisotiazol-3-ona.

Finalmente, los compuestos de las Fórmulas I o II en los cuales Q es -C(S)NR^7- se preparan usando un derivado de amino tianoácido en lugar del aminoácido III en los procedimientos de síntesis arriba descriptos. Estos derivados de amino tionoácido se pueden preparar mediante los procedimientos descriptos en Shalaky *et al.*, *J. Org. Chem.*, 61:9045-9048 (1996) y Brain *et al.*, *J. Org. Chem.*, 62:3808-3809 (1997) y las referencias allí citadas.

4.1.2. Preparados farmacéuticos de los compuestos

En general, los compuestos de la presente invención se administrarán en una cantidad terapéuticamente efectiva mediante cualquiera de los modos de administración aceptados para estos compuestos. Los compuestos se pueden administrar por una variedad de vías, incluyendo, pero sin limitarse a, la vía oral, parenteral (por ejemplo, subcutánea, subdural, intravenosa, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial, o vías de administración intralesionales), tópica, intranasal, localizada (por ejemplo, aplicación quirúrgica o supositorio quirúrgico), rectal y pulmonar (por ejemplo, aerosoles, inhalación o polvos). En consecuencia, estos compuestos son efectivos como preparaciones tanto inyectables como orales. Los compuestos se pueden administrar de forma continua por infusión o por inyección en bolus. Preferentemente, los compuestos se administran por vías parenterales. Más preferentemente, los compuestos se administran por vías intravenosas. Estas preparaciones se preparan de una manera conocida por los expertos en la técnica farmacéutica.

La cantidad de compuestos de la presente invención, es decir, el principio activo, dependerá de diversos factores tales como, la severidad de la enfermedad, es decir, la condición o enfermedad asociada con desmielinización o la parálisis asociada con desmielinización a tratar, la edad y el estado de salud general del sujeto, la potencia del compuesto utilizado, la vía y la forma de administración, y otros factores.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o en animales de laboratorio, por ejemplo, para determinar la LD_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación entre la dosis tóxica y la dosis con efectos terapéuticos es el índice terapéutico, el cual se puede expresar como la relación LD_{50}/ED_{50}. Se prefieren los compuestos que exhiben índices terapéuticos elevados.

Los datos obtenidos de los ensayos en cultivo celular y estudios en animales se pueden utilizar para formular un rango de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos está preferentemente comprendida dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen el ED_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación utilizada y la vía de administración empleada.

Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos en cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración circulante en plasma que incluya la IC_{50} (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra la

inhibición semi-máxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Esta información se puede utilizar para determinar con mayor precisión dosis que sean útiles en humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta eficiencia. El nivel efectivo en sangre de los compuestos de la presente invención es preferentemente mayor o igual que 10 ng/ml.

La cantidad de la preparación farmacéutica administrada al paciente dependerá de lo que se administra, el propósito de la administración, por ejemplo profilaxis o terapia, el estado del paciente, el modo de administración y factores similares. En las aplicaciones terapéuticas, las preparaciones se administran a un paciente que ya padece una enfermedad en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente efectiva." Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la enfermedad que se está tratando así como del juicio del médico que atiende al paciente, dependiendo de factores tales como la severidad de la inflamación, la edad, peso y estado general del pacientes y factores similares.

Las preparaciones administradas a un paciente tienen la forma de las preparaciones farmacéuticas arriba descriptas. Estas preparaciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, o se pueden esterilizar por filtración. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para su uso tal como son, o liofilizadas, siendo la preparación liofilizada combinada con un vehículo acuoso estéril antes de su administración. El pH de las preparaciones del compuesto típicamente estarán comprendidas entre 3 y 11, más preferentemente entre 5 y 9 y más

preferentemente entre 7 y 8. Se deberá entender que el uso de algunos de los excipientes, vehículos estabilizadores arriba mencionados resultará en la formación de sales farmacéuticas.

El compuesto activo es efectivo en un amplio rango de dosificaciones y generalmente se administra en una cantidad farmacéutica o terapéuticamente efectiva. La dosificación terapéutica de los compuestos de la presente invención variará de acuerdo con, por ejemplo, el uso particular para el cual se realiza el tratamiento, el modo de administración del compuesto, la salud y el estado del paciente, y el juicio del médico que prescribe el compuesto. Por ejemplo, para administración intravenosa, la dosis típicamente estará en el rango comprendido entre alrededor de 20 μg u alrededor de 500 μg por kilogramo de peso corporal, preferentemente entre alrededor de 100 μg y alrededor de 300 μg por kilogramo de peso corporal. Los rangos de dosificación adecuados para administración intranasal generalmente son de entre alrededor de 0,1 pg y 1 mg por kilogramo de peso corporal. Se pueden extrapolar dosis efectivas a partir de curvas dosis-respuesta obtenidas usando sistemas de ensayo modelo *in vitro* o en animales. Típicamente, el médico administrará el compuesto hasta llegar a una dosis que logre el efecto deseado.

Cuando son empleados como fármacos, los compuestos de la presente invención habitualmente se administran en forma de preparaciones farmacéuticas. Esta invención también incluye preparaciones farmacéuticas, las cuales contienen, como principio activo, uno o más de los compuestos de la presente invención, asociados con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Típicamente el excipiente usado es uno adecuado para su administración a sujetos

humanos u otros mamíferos. Al elaborar las preparaciones de esta invención, el principio activo generalmente se mezcla con un excipiente, se diluye con un excipiente, o se colocan dentro de un vehículo que puede tener la forma de una cápsula, sachet, papel o cualquier otro recipiente. Cuando el excipiente sirve como disolvente, éste puede ser un material sólido, semi-sólido o líquido, que actúa como vehículo, portador o medio para el principio activo. Por lo tanto, las preparaciones pueden ser en forma de comprimidos, grageas, polvos, cápsulas, sachets, cachets, elíxires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (en forma de sólido o en un medio líquido), ungüentos conteniendo, por ejemplo, hasta 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos envasados de forma estéril.

En la elaboración de una preparación puede ser necesario moler el compuesto activo para lograr el tamaño de partícula adecuado antes de combinarlo con los demás ingredientes. Si el compuesto activo es sustancialmente insoluble, habitualmente se lo muele hasta tener un tamaño de partícula inferior al tamiz 200. Si el compuesto activo es sustancialmente soluble en agua, normalmente el tamaño de partícula se ajusta moliendo hasta lograr una distribución sustancialmente uniforme en la preparación, por ejemplo alrededor de tamiz 40.

Algunos de ejemplos de excipientes adecuados incluyen la lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma acacia, fosfato de calcio, alginatos, goma de tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua destilada, jarabe de maíz y metil celulosa. Las preparaciones adicionalmente pueden contener:

agentes lubricantes tales como el talco, el esterarato de magnesio y el aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsificantes y agentes de suspensión; agentes conservantes tales como benzoatos de metilo y propilhidroxilo; agentes edulcorantes; y agentes saborizantes. Empleando procedimientos conocidos en la técnica, las preparaciones de la presente invención se pueden formular de manera que provean que liberen el principio activo en forma rápida, sostenida o retardada luego de su administración al paciente.

La cantidad de compuesto activo en la preparación farmacéutica y la forma de dosificación unitaria de la misma se pueden modificar o ajustar ampliamente dependiendo de la aplicación particular, el modo de introducción, la potencia del compuesto particular y la concentración deseada. El término "formas de dosificación unitarias" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en combinación con un excipiente farmacéuticamente adecuado. La concentración del compuesto terapéuticamente activo puede variar entre alrededor de 1 mg/ml y 1 g/ml.

Preferentemente, el compuesto se puede formular para su administración parenteral en un vehículo inerte adecuado, tal como una solución salina fisiológica estéril. Por ejemplo, la concentración del compuesto en la solución portadora típicamente es de entre alrededor de 1 a 100 mg/ml. La dosis administrada será determinada por la vía de administración. Las vías de administración preferidas incluyen la administración parenteral o intravenosa. Una dosis terapéuticamente efectiva es una dosis efectiva para

765

producir una disminución significativa de la desmielinización y un aumento significativo de la remielinización. Preferentemente, la cantidad es suficiente para producir una cantidad de remielinización estadísticamente significativa en un sujeto.

A modo de ejemplo, para elaborar preparaciones sólidas tales como comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una preparación previa sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se dice que estas preparaciones previas son homogéneas, significa que el principio activo está distribuido de forma uniforme en la preparación de modo que la preparación se puede subdividir fácilmente en formas de dosificación unitaria igualmente efectivas tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Luego esta preparación previa sólida se subdivide en formas de dosificación uniforme del tipo arriba descripto conteniendo, por ejemplo, de 0,1 a alrededor de 500 mg del principio activo de la presente invención. Los comprimidos o píldoras de la presente invención pueden estar recubiertos o elaborados de alguna otra forma que provea una forma de dosificación con la ventaja de la acción prolongada. Por ejemplo, la cápsula o píldora puede comprender un componente de dosis interior y uno de dosis exterior, estando este último formulado como un envolvente del primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica, la cual sirve para resistir la desintegración en el estómago y permitir que el componente interior pase intacto al duodeno o que se demore su liberación. Para estas capas o recubrimientos entéricos se puede utilizar una variedad de materiales, incluyendo algunos ácidos poliméricos

y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como el shellac, el alcohol cetílico y el acetato de celulosa.

Las formas líquidas en las cuales las preparaciones de la presente invención se pueden incorporar para su administración oral o inyectable incluyen las soluciones acuosas, jarabes saborizados, suspensiones acuosas u oleosas, y emulsiones saborizadas con aceites comestibles tales como aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de maní, como así también los elíxires y otros vehículos farmacéuticos similares.

Las preparaciones para inhalación o insuflación incluyen las soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o en una mezcla de los mismos, y los polvos. Las preparaciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se describió en párrafos precedentes. Las preparaciones se pueden administrar por la vía respiratoria oral o nasal o para un efecto localizado o sistémico. Las preparaciones preferentemente en disolventes farmacéuticamente aceptables se pueden nebulizar usando gases inertes. Las soluciones nebulizadas se pueden inhalar directamente del dispositivo nebulizador, o bien el dispositivo nebulizador se puede fijar a una mascarilla facial, o a un respirador mecánico de presión positiva intermitente. Las preparaciones en solución, suspensión o polvo se pueden administrar preferentemente por vía oral o nasal, por medio de dispositivos que entregan la preparación de forma adecuada.

Los compuestos de esta invención se pueden administrar en una forma de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen las matrices semipermeables de polímeros

hidrófobos sólidos que contienen la proteína, matrices que tienen la forma de, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen los poliésteres, los hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) según se describe en Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277 (1981) y en Langer, *Chem. Tech.* 12: 98-105 (1982) o poli(vinil alcohol)), polilactidas (Patente Estadounidense No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gama etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, *Biopolymers* 22: 547-556, 1983), vinil acetato de etileno no degradable (Langer *et al.*, *supra*), copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (es decir microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico y ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988).

Los compuestos de esta invención se pueden administrar en una forma de liberación sostenida, por ejemplo una inyección depot, implantes o bomba osmótica, que se pueden formular de manera tal de permitir una liberación sostenida del principio activo. Los implantes para las formulaciones de liberación sostenida son conocidas en la técnica. Los implantes se pueden formular como, incluyendo pero sin limitarse a, microesferas, escamas, con polímeros biodegradables o no biodegradables. Por ejemplo, los polímeros de ácido láctico y/o ácido glicólico forman un polímero erosionable que es bien tolerado por el huésped. El implante se coloca próximo al sitio de depósitos de proteína (por ejemplo, el sitio de formación de depósitos amiloideos asociados con los trastornos neurodegenerativos), de manera que la concentración de ingrediente activo es mayor en dicho sitio en relación con el resto del cuerpo.

Los siguientes ejemplos ilustran preparaciones farmacéuticas de la presente invención.

Ejemplo de Formulación 1

Se preparan cápsulas de gelatina dura que contienen los siguientes ingredientes:

Ingrediente	Cantidad (mg/cápsula)
Principio activo	30.0
Almidón	305.0
Estearato de magnesio	5.0

Estos ingredientes se mezclan y con ellos se llenan cápsulas de gelatina dura en cantidades de 340 mg.

Ejemplo de Formulación 2

Se prepara un una formula para comprimidos usando los siguientes ingredientes:

Ingrediente	Cantidad (mg/cápsula)
Principio activo	25.0
Celulosa microcristalina	200.0
Dióxido de silicona coloidal	10.0
Ácido esteárico	5.0

Los componentes se mezclan y se comprimen para formar comprimidos, cada uno de los cuales tiene un peso de 240 mg.

Ejemplo de Formulación 3

Se prepara una formulación para inhalador en forma de polvo seco que contiene los siguientes componentes:

Ingrediente	Peso %
Principio activo	5
Lactosa	95

La mezcla activa se combina con la lactosa, y la mezcla se dispone en un dispositivo para inhalar polvos secos.

Ejemplo de Formulación 4

Se preparan comprimidos, cada uno de ellos conteniendo 30 mg de principio activo, de la siguiente manera:

Ingrediente	Cantidad (mg/cápsula)
Principio activo	30.0 mg
Almidón	45.0 mg
Celulosa microcristalina	35.0 mg
Polivinilpirrolidona (como solución en agua al 10%)	4.0 mg
Sodio almidón carboximetilo	4.5 mg
Estearato de magnesio	0.5 mg
Talco	1.0 mg
Total	120 mg

El principio activo, el almidón y la celulosa se hacen pasar a través de un tamiz No. 20 U.S. y se mezclan cuidadosamente. La solución de polivinil-pirrolidona se mezcla con los polvos resultantes, los cuales luego se hacen pasar a través de un tamiz No. 16 U.S. Los gránulos así producidos se secan a una temperatura de entre 50° y 60°C y se hacen pasar a través de un tamiz No. 16 U.S. Luego el sodio almidón carboximetilo, el estearato de magnesio y el talco, previamente pasados a través de un tamiz No. 30 U.S., se añaden a los gránulos, los cuales luego de mezclarlos se comprimen en una máquina para obtener comprimidos, cada uno de los cuales pesa 150 mg.

Ejemplo de Formulación 5

Se preparan cápsulas, cada una de ellas conteniendo 40 mg de medicamento, de la siguiente manera:

Ingrediente	Cantidad (mg/cápsula)
Principio activo	40.0 mg
Almidón	109.0 mg
Estearato de magnesio	1.0 mg
Total	150.0 mg

El principio activo, la celulosa, el almidón y el estearato de magnesio se mezclan, se hacen pasar a través de un tamiz No. 20 U.S., y con esto se llenan cápsulas de gelatina dura con cantidades de 150 mg.

Ejemplo de Formulación 6

Se preparan supositorios, cada uno de ellos conteniendo 25 mg de principio activo, de la siguiente manera:

Ingrediente	Cantidad
Principio activo	25 mg
Glicéridos de ácidos grasos saturados	hasta 2000 mg

El principio activo se hace pasar a través de un tamiz No. 60 U.S. y se suspende en los glicéridos de ácido graso saturado previamente fundidos usando el calor mínima necesario. Luego la mezcla se vierte en un molde para supositorios con una capacidad nominal de 2.0 g y se deja enfriar.

Ejemplo de Formulación 7

Se preparan suspensiones, cada una de ellas conteniendo 50 mg de medicamento por dosis de 5.0 ml, de la siguiente manera:

Ingrediente	Cantidad
Principio activo	50.0 mg
Goma xantato	4.0 mg
Carboximetil celulosa de sodio (11%)	
Celulosa microcristalina (89%)	50.0 mg
Sacarosa	1.75 g
Benzoato de sodio	10.0 mg
Saborizante y colorante	q.v.
Agua destilada	hasta 5.0 ml

El medicamento, la sacarosa y la goma xantato se mezclan se hacen pasar a través de un tamiz No. 10 U.S., y luego se mezclan con una solución previamente preparada con la celulosa microcristalina y la carboximetil celulosa de sodio en agua. El benzoato de sodio, el saborizante y el

colorante se diluyen con un poco del agua y se añaden con agitación. Luego se añade agua en cantidad suficiente para producir el volumen deseado.

Ejemplo de Formulación 8

Cápsulas de gelatina dura, cada uno de ellos conteniendo 15 mg de principio activo, se preparan de la siguiente manera:

Ingrediente	Cantidad (mg/cápsula)
Principio activo	15.0 mg
Almidón	407.0 mg
Estearato de magnesio	3.0 mg
Total	425.0 mg

El principio activo, la celulosa, el almidón y el estearato de magnesio se mezclan, se hacen pasar a través de un tamiz No. 20 U.S., y con esto se llenan cápsulas de gelatina dura en cantidades de cápsulas in 560 mg.

Ejemplo de Formulación 9

Se puede preparar una formulación intravenosa de la siguiente manera:

Ingrediente	Cantidad
Principio activo	250.0 mg
Solución salina isotónica	1000 ml

Las preparaciones de compuestos terapéuticos generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa para solución intravenosa o un frasco que tenga un tapón que se pueda perforar con la aguja de una jeringa hipodérmica u otro elemento similar.

Ejemplo de Formulación 10

Se puede preparar una formulación para aplicación tópica de la siguiente manera:

Ingrediente	Cantidad
Principio activo	1-10 g
Cera emulsionante	30 g
Parafina líquida	20 g
Parafina blanca blanda	hasta 100 g

La parafina blanca blanda se calienta hasta su fusión. Se incorpora la parafina líquida y la cera emulsionante y se agita hasta su disolución. Se añade el principio activo y se continua agitando hasta la dispersión. Luego la mezcla se enfría hasta estar sólida.

Otra formulación preferida usada en los métodos de la presente invención emplea dispositivos de administración transdermal ("parches"). Estos parches transdermales se pueden usar para proveer una infusión continua o discontinua de los compuestos de la presente invención en cantidades controladas. La elaboración y el uso de parches transdermales para la administración de agentes farmacéuticos son conocidos en la técnica. *Ver*, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5.023.252, otorgada el 11 de Junio de 1991, incorporada a la presente por referencia. Estos parches se pueden elaborar para administrar los agentes farmacéuticos de forma continua, pulsátil o a solicitud.

Cuando se desea o resulta necesario introducir la composición farmacéutica en el cerebro se pueden utilizar técnicas de colocación directas o indirectas. Las técnicas directas generalmente implican la

colocación de un catéter en el sistema ventricular del huésped para trasponer la barrera hemato-encefálica. Uno de estos sistemas de administración implantables usados para transportar factores biológicos a regiones anatómicas específicas se describe en la Patente Estadounidense No. 5.011.472, la cual se incorpora a la presente por referencia.

Las técnicas indirectas, que son en general preferidas, generalmente implican formular las preparaciones para proveer una latentización de la droga por la conversión de drogas hidrofílicas en drogas solubles en lípidos. La latentización generalmente se logra bloqueando los grupos hidroxilo, carbonilo, sulfato y amina primario presentes en la droga para hacer la droga más soluble en lípidos y de fácil transporte a través de la barrera hemato-encefálica. Alternativamente, la administración de drogas hidrofílicas se puede mejorar mediante la infusión intra-arterial de soluciones hipertónicas que pueden abrir la barrera hemato-encefálica transitoriamente.

De acuerdo con un aspecto de la invención, el compuesto se puede administrar solo, como una combinación de compuestos, en combinación con anticuerpos remielinizantes o anti-alfa-4, o en combinación con un agente anti-inflamatorio, que típicamente se utiliza para tratar los trastornos y enfermedades asociados con la desmielinización. Cuando se los aplica en combinación, los compuestos pequeños se pueden administrar en la misma formulación que estos otros compuestos o preparaciones, o en una formulación separada. Cuando se los aplica en combinaciones, los agentes remielinizantes se pueden administrar antes de, después de, o simultáneamente con otros compuestos y preparaciones.

Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención son adecuadas para ser utilizadas en una variedad de sistemas de administración de fármacos. Formulaciones adecuadas para usar con la presente invención se encuentran en *Remington's Pharmaceutical Sciences,* Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17° ed. (1985).

A fin de mejorar la vida media en suero, los compuestos se pueden encapsular, introducir en el lumen de liposomas, preparar en forma de coloides, o bien se pueden emplear otras técnicas convencionales que le proveen a los compuestos una mayor vida media en suero. Existe una variedad de métodos disponibles para preparar liposomas, como se describe en, por ejemplo, Szoka *et al.*, Patentes Estadounidenses Nos. 4.235.871, 4.501.728 y 4.837.028, cada una de las cuales se incorpora a la presente por referencia.

Polímeros conjugados

Los compuestos de la presente invención se pueden formular y administrar en forma de polímeros conjugados. Los polímeros conjugados pueden presentar beneficios con respecto a los polímeros no conjugados, tales como una mejor solubilidad y estabilidad.

Como tal, las moléculas de un solo polímero se pueden emplear para conjugar con los compuestos de la presente invención, aunque también se contempla que se pueden unir moléculas de más de un polímero. Los compuestos conjugados de la presente invención pueden ser útiles en aplicaciones tanto *in vivo* como en aplicaciones no -*in vivo*. Además, se deberá entender que el polímero conjugado puede utilizar cualquier otro grupo, porción u otra especie conjugada, según sea apropiada para la aplicación final. A modo de ejemplo, puede ser útil en algunas aplicaciones

para unirse de forma covalente al polímero como una porción funcional que le proporciona al polímero resistencia a la degradación por UV, o antioxidación, u otras propiedades o características. También a modo de ejemplo, en algunas aplicaciones puede resultar ventajoso funcionalizar el polímero para volverlo reactivo y permitir que se una en forma cruzada a una molécula de fármaco y para mejorar diversas propiedades o características del material conjugado en su conjunto. En consecuencia, el polímero puede contener cualquier funcionalidad, grupos remitentes, enlaces u otras estructuras constitutivas que no impiden la eficacia de los compuestos conjugados de la presente invención para el propósito que se pretende.

Ejemplos de polímeros que pueden ser útiles para lograr estas características se describen *supra*, así como en PCT WO 01/54690 (de Zheng *et al.*) incorporada por referencia en su totalidad. El polímero puede estar acoplado a los compuestos de la presente invención (preferentemente por vía de una porción "linker") para formar enlaces estables que no sean significativamente divisibles por las enzimas humanas. En general, para que un enlace no sea "significativamente" divisible se requiere que no más de alrededor del 20% de los enlaces que conectan el polímero y los compuestos de la presente invención a los cuales el polímero está unido se dividan dentro de un período de 24 horas, medido de acuerdo con las técnicas estándares de la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Los compuestos de la presente invención se conjugan más preferentemente a través de un grupo reactivo terminal en el polímero, aunque las conjugaciones también se pueden ramificar a partir de grupos

reactivos no terminales. En la presente el polímero con el o los grupos reactivos se denomina "polímero activado". El grupo reactivo reacciona selectivamente con grupos reactivos de los compuestos de la presente invención. El o los polímeros activados se reacciona de manera que el enlace pueda ocurrir en cualquier grupo funcional disponible en los compuestos de la presente invención. Los grupos amino, carbono, grupos carboxílicos libres, los grupos carbonilo adecuadamente activados, hidroxilo, guanidilo, porciones de carbohidrato oxidadas, amino, carbono y mercapto de los compuestos de la presente invención (si están disponibles) se pueden usar como sitios de fijación.

En general, se emplean entre alrededor de 1,0 y alrededor de 10 moles de polímero activado por mol de compuesto de la presente invención, dependiendo de su concentración. La cantidad final es un equilibrio entre la maximización de la extensión de la reacción y la minimización de las modificaciones no específicas del producto y, a la vez, la definición de fórmulas químicas que mantengan una actividad óptima y a la vez optimicen la vida media de los compuestos de la presente invención. Preferentemente, se mantiene como mínimo alrededor del 50% de la actividad biológica de los compuestos de la presente invención, y más preferentemente se mantiene el 100%.

Las reacciones se pueden llevar a cabo mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica y usado para reaccionar materiales biológicamente activos con polímeros inertes. Generalmente, el proceso implica preparar un polímero activado y luego reaccionar los compuestos de la presente invención con el polímero activado para producir un compuesto soluble adecuado para preparar formulaciones. Esta reacción de

modificación se puede realizar aplicando diferentes métodos, los cuales pueden constar de uno o más pasos. Las sustancias poliméricas incluidas en la presente son preferentemente solubles en agua a temperatura ambiente. Una lista no limitante de tales polímeros incluye los homopolímeros de óxido de polialquileno, tales como el polietilengligol (PEG) o los glicoles de polipropileno, polioles polioxietilenados, sus copolímeros y sus copolímeros en bloque, siempre que se mantenga la solubilidad en agua de los copolímeros en bloque.

En la práctica preferida de la presente invención, residuos polialquilenglicol de los C_1-C_4 alquil-polialquilen-glicoles, preferentemente polietilenglicol (PEG), o residuos poli(oxi)alquilen-glicol de tales glicoles se incorporan ventajosamente a los sistemas de polímeros de interés. Así, el polímero al cual se fijan los compuestos de la presente invención puede ser un homopolímero de polietilenglicol (PEG) o es un poliol polioxietilado, siempre que en todos los casos el polímero sea soluble en agua a temperatura ambiente. Ejemplos no limitantes de tales polímeros incluyen los homopolímeros de óxido de polialquileno tales como el PEG o polipropilen-glicoles, los glicoles polioxietilenados, sus copolímeros y copolímeros en bloque, siempre que se mantenga la solubilidad en agua del copolímero en bloque. Los ejemplos de los polioles polioxietilados incluyen, pero no se limitan a, el glycerol polioxietilado, el sorbitol polioxietilado, la glucosa polioxietilada o similares. El "backbone" del glicerol es el mismo que ocurre naturalmente en, por ejemplo, animales y humanos en mono-, di- y triglicéridos. Por lo tanto, esta ramificación no se vería necesariamente como un agente extraño en el organismo.

Los expertos en la técnica entenderán que la anterior lista es meramente

ilustrativa, y que se contemplan todos los materiales poliméricos que tienen las cualidades aquí descriptas. No es necesario que el polímero tenga un determinado peso molecular en particular, pero se prefiere que el peso molecular esté comprendido entre alrededor de 300 y 100.000, más preferentemente entre 10.000 y 40.000. En particular, los tamaños de 20.000 o mayores son los más efectivos para impedir la pérdida del producto por filtración en los riñones.

En la técnica se conoce al polietilenglicol (PEG) y a los óxidos de polialquileno (PAO) relacionados como adjuntos útiles para la preparación de fármacos. Ver por ejemplo, PCT WO 93/24476. El PEG también se ha conjugado en proteínas, péptidos y enzimas para aumentar la solubilidad en agua y la vida en circulación *in vivo* como así también para reducir la antigenicidad. Ver, por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 5.298.643 y 5.321.095, ambas de Greenwald *et al.* PCT WO 93/24476 describe el uso de una unión éster para enlazar de forma covalente una molécula orgánica a polietilenglicoles solubles en agua. Así, los compuestos de la invención preferentemente se administran como derivados de polietilenglicol (PEG).

En consecuencia, los compuestos o conjugados de esta invención pueden contener uno o más sustituyentes polietilenglicol (PEG) fijados de forma covalente a los mismos. Estos conjugados exhiben una vida media en suero mejorada en relación con los compuestos que no tiene sustituyentes polietilenglicol. Sin limitarse a cualquier teoría en particular, se cree que la vida media en suero mejorada está asociada con la conjugación covalente de al menos una entidad polietilenglicol en la estructura del compuesto.

El término "PEG" se refiere a los polímeros que comprenden múltiples unidades oxialquileno. Estos polímeros están opcionalmente mono-

recubiertos con un sustituyente preferentemente seleccionado entre alquilo, arilo, alquilo sustituido y arilo sustituido. Entre estos polímeros se incluyen los polímeros de polioxialquileno recubiertos con diamino, los cuales en la técnica se conocen como Jeffaminas®. Además, estos polímeros opcionalmente pueden contener una o más unidades no-oxialquilenadas tales como los poli[di(etilenglicol)adipatos, los dioles de poli[di(etilenglicol) ftalato y similares disponibles comercialmente,

Derivados de PEG significa un copolímero de polietilenglicol en el cual una o ambas terminales de los grupos hidroxilo que se encuentra en el propio polietilenglicol han sido modificadas. Los ejemplos de modificaciones adecuadas incluyen reemplazar uno o ambos grupos hidroxilo por grupos funcionales alternativos, los cuales pueden ser protegidos o no protegidos, con ligandos de bajo peso molecular o por otra molécula o polímero. La modificación de los grupos terminales hidroxilo en el polietilenglicol se puede lograr haciendo reaccionar el polietilenglicol con compuestos que contienen grupos funcionales reactivos complementarios, incluyendo los grupos funcionales que son capaces de reaccionar con los grupos hidroxilo del polietilenglicol. Los derivados de PEG de los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más sustituyentes polietilenglicol (PEG) unidos covalentemente a los mismos mediante un grupo de fijación ("linker").

"Grupo de fijación" o "linker" se refiere a un grupo o unos grupos que unen covalentemente un compuesto no PEG-sustituido de la presente invención con uno o más grupos PEG. Cada grupo de fijación puede ser ya sea quiral o aquiral, lineal, ramificado o cíclico, y puede ser homogéneo o heterogéneo en su contenido atómico (por ejemplo, grupos de fijación que

contienen sólo átomos de carbono o grupos de fijación que contienen átomos de carbono además de uno o más heteroátomos presentes en el grupo de fijación.

El o los grupos PEG se unen covalentemente al grupo de fijación usando las técnicas empleadas convencionalmente en la química, permitiendo una unión covalente del grupo PEG al grupo de fijación. A su vez, el grupo de fijación puede estar unido covalentemente a los compuestos de la presente invención que de otro modo no son PEG-sustituidos. Las reacciones químicas con que se obtienen estas uniones son conocidas en la técnica. Estas reacciones químicas involucran el uso de grupos funcionales complementarios en el grupo de fijación, el compuesto no PEG-sustituido de la presente invención y los grupos PEG. Preferentemente, los grupos funcionales complementarios en el grupo de fijación se seleccionan en relación con los grupos funcionales que están disponibles en el grupo PEG para unirse o que se pueden ser introducidos al grupo PEG para la unirse.

En este caso también, estos grupos funcionales complementarios son conocidos en la técnica.

Estos polímeros tienen un peso molecular promedio de entre alrededor de 100 y 100.000; preferentemente entre alrededor de 1000 y 50.000; más preferentemente entre alrededor de 10.000 y alrededor de 40.000.

5. <u>Inmunoglobulinas</u>

En una realización específica, los agentes de la presente invención son inmunoglobulinas que al ser administradas a un paciente inhiben la desmielinización y/o promueven la remielinización y/o reducen la parálisis. Estas inmunoglobulinas se pueden seleccionar entre las inmunoglobulinas que se unen selectivamente a una integrina alfa-4 o un dímero que contiene

integrina alfa-4, tal como alfa-4 beta-1, o ligan VCAM-1. Preferentemente, las inmunoglobulinas ligan alfa-4 beta-1 e inhiben la actividad de la alfa-4 beta-1. Las inmunoglobulinas son preferentemente anticuerpos o fragmentos de los mismos.

El término "anticuerpos" incluye las inmunoglobulinas completas tales como la IgG1 (o cualquier clase de la IgG) o ola IgM, o inhibidores derivados de anticuerpos, tales como el natalizumab (Antegren®).

El término "anticuerpo homólogo" incluye los anticuerpos intactos que consisten en cadenas livianas y pesadas de inmunoglobulina unidas por medio de enlaces disulfuro. El término "anticuerpos homólogos" también abarca una proteína que contiene uno o más polipéptidos seleccionados de las cadenas livianas de inmunoglobulina, las cadenas pesadas de inmunoglobulina y los fragmentos de las mismas que son capaces de ligar uno o más antígenos (por ejemplo, integrina o ligando de integrina.) Los polipéptidos componentes de un anticuerpo homólogo compuesto por más de un polipéptido opcionalmente pueden tener enlaces disulfuro u otros tipos de enlaces cruzados covalentes. En consecuencia, "anticuerpo homólogo" abarca las inmunoglobulinas intactas de los tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como también los subtipos de las mismas, por ejemplo, IgG1), en las cuales las cadenas livianas de la inmunoglobulina pueden ser tipo kapa o lambda. "Anticuerpo homólogos" también abarca las porciones de anticuerpos intactos que mantienen la especificidad para la ligación del antígeno, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fv, fragmentos scFv, monómeros o dímeros de cadena liviana o pesada, o mezclas de los mismos.

Cuando el agente de la presente invención es un anticuerpo, el anticuerpo preferido es un anticuerpo monoclonal. En contraste con las preparaciones con anticuerpo policlonal, las cuales típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epitopos, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único epitopo en el antígeno. Una segunda ventaja de los anticuerpos monoclonales es que se sintetizan utilizando medios que no están contaminados por otras inmunoglobulinas, por ejemplo, por sistema de despliegue en fagos o aislamiento a partir de un hibridoma. Aunque la presente invención abarca tanto anticuerpos policlonales como anticuerpos monoclonales como agentes de la presente invención, se prefieren los anticuerpos monoclonales ya que éstos son altamente específicos, y por lo tanto la invención se discute fundamentalmente en términos de anticuerpos monoclonales.

"Anticuerpos nativos e inmunoglobulinas" generalmente son glicoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150.000 Daltons, compuestas por dos cadenas livianas (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena liviana está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y liviana también tiene puentes disulfuro intracadena uniformemente separados. Cada cadena pesada tiene en uno de sus extremos un dominio variable (V_H) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena liviana tiene un dominio variable (V_L) en uno de sus extremos y un dominio constante en el otro; el dominio constante de la cadena liviana está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena liviana está alineado con el

dominio variable de la cadena pesada. Se cree que ciertos residuos de aminoácido forman una interfase entre los dominios variables de las cadenas liviana y pesada (Chothia *et al.*, 1985, *J. Mol. Biol.*, 186: 651-63; Novotny *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4592-6).

Además, se pueden identificar otros anticuerpos utilizando las técnicas disponibles en la ciencia. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden producir utilizando tecnología de despliegue en fagos. Luego se aislan fragmentos del anticuerpo, que se ligan selectivamente a una integrina alfa-4 o a un dímero que contiene una integrina alfa-4. Ejemplos de métodos preferidos para producir estos anticuerpos mediante sistemas de despliegue en fagos se describen en las Patentes Estadounidenses Nos. 6.225.447; 6.180.336; 6.172.197; 6.140.471; 5.969.108; 5.885.793; 5.872.215; 5.871.907; 5.858.657; 5.837.242; 5.733.743 y 5.565.332.

En la presente el término anticuerpo "variante" se refiere a una molécula de inmunoglobulina cuya secuencia aminoacídica difiere de la secuencia aminoacídica de un anticuerpo "padre" en virtud de una adición, deleción y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácido en la secuencia del anticuerpo padre. El anticuerpo o inmunoglobulina padre puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo primatizado® o cualquier fragmento de anticuerpo. En la realización preferida, el variante contiene una o más sustituciones de aminoácidos en una o más regiones hipervariables del anticuerpo padre. Por ejemplo, el variante puede contener al menos, por ejemplo, entre uno y diez, y preferentemente entre alrededor de dos y alrededor de cinco, sustituciones en una o más regiones hipervariables del

anticuerpo padre. En general, la secuencia aminoacídica del variante tendrá al menos un 75% de identidad de secuencia con las secuencias del dominio variable de las cadenas pesada o livianas del anticuerpo padre, más preferentemente al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, más preferentemente al menos un 90%, y más preferentemente al menos un 95%. En la presente, la identidad u homología con respecto a esta secuencia se define como el porcentaje de residuos aminoacídicos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos del anticuerpo padre, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencias. No se considerará que ningún terminal-N, terminal-C o extensiones, deleciones o inserciones en la secuencia del anticuerpo afectan la identidad u homología de las secuencias. El variante retiene la capacidad de ligar el receptor y preferentemente tiene propiedades superiores a las del anticuerpo padre. Por ejemplo, el variante puede tener una mayor afinidad de ligación, mejor capacidad para activar el receptor, etc. Para analizar estas propiedades, se debe comparar una forma Fab del variante con una forma Fab del anticuerpo padre o una forma del variante de longitud completa con una forma de longitud completa del anticuerpo padre. El anticuerpo variante de particular interés en la presente es uno que mejora al menos alrededor de 10 veces, preferentemente al menos alrededor de 20 veces, y más preferentemente al menos alrededor de 50 veces, la actividad biológica en comparación con el anticuerpo padre. En la presente el "anticuerpo padre" es uno que es codificado por una secuencia aminoacídica usada para la preparación del variante. Preferentemente, el anticuerpo padre tiene una región marco humana y tiene una región o regiones constantes de

anticuerpo humano. Por ejemplo, el anticuerpo padre puede ser un anticuerpo humanizado o humano. Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son los materiales que interferirían con los usos terapéuticos o diagnósticos del anticuerpo, y pueden incluir las enzimas, las hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En las realizaciones preferidas el anticuerpo se purificará (1) hasta lograr más del 95% en peso de anticuerpo según lo determinado mediante el método Lowry, y más preferentemente más de 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia aminoacídica N-terminal o interna usando un secuenciador centrífugo, o (3) hasta su homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductores usando una tinción de azul de Coomassie o, preferentemente, plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, por lo general los anticuerpos aislados se prepararán mediante al menos un paso de purificación.

5.1. Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales también se pueden producir usando los métodos convencionales de la tecnología del hibridoma o la ingeniería genética. Estos métodos se han utilizado ampliamente para producir líneas celulares híbridas que secretan elevados niveles de anticuerpos monoclonales contra numerosos antígenos específicos, y también se pueden usar para producir los anticuerpos monoclonales de la presente invención. Por ejemplo, los ratones (por ejemplo, los ratones Balb/c) se pueden

inmunizar con un epitopo antigénico de la alfa-4 por inyección intraperitoneal. Luego de transcurrido tiempo suficiente para lograr una respuesta inmunológica, los ratones se sacrifican y se obtienen las células del vaso y se fusionan con las células de mieloma, utilizando técnicas conocidas en la ciencia. Las células fusionadas resultantes, hibridomas, luego se cultivan en un medio selectivo, y las células sobrevientes se cultivan en un medio similar usando condiciones de dilución limitantes. Luego de su clonación y reclonación, se pueden aislar hibridomas que secretan anticuerpos (por ejemplo, de las clases IgG o IgM o la subclase IgG1) que se ligan selectivamente a la alfa-4 o dímero que contiene una integrina alfa-4 meta. Para producir agentes para uso humano específico, posteriormente los monoclonales aislados se pueden usar para producir anticuerpos quiméricos y humanizados. También se pueden preparar anticuerpos que son anticuerpos anti-peptídicos. Tales anticuerpos anti-peptídicos se prepararían contra los péptidos de la integrina alfa-4.

El término "quimérico", en referencia a un agente de la invención, significa que el agente está compuesto por un enlace (enlace químico cruzado, o covalente, o de otro tipo) de dos o más proteínas que tienen estructuras dispares y/o que tienen fuentes de origen dispares. Así, un antagonista de la integrina alfa-4 quimérico puede incluir una porción que es un antagonista de la integrina alfa-4 o un fragmento de otra porción que no es un antagonista de la integrina alfa-4.

Una especie de proteína "quimérica" es una "fusión" o "proteína de fusión" referida a un enlace covalente co-lineal de dos o más proteínas o fragmentos de las mismas por medio de sus esqueletos peptídicos individuales, más preferentemente a través de la expresión genética de una

molécula polinucleótida que codifica dichas proteínas. Por lo tanto, las proteínas de fusión preferidas son las proteínas quiméricas que incluyen un anticuerpo remielinizante o un fragmento del mismo, covalentemente unido a una segunda porción que no es original del cuerpo remielinizante (es decir, que deriva de otra inmunoglobulina o polipéptido). Las proteínas de fusión preferidas de la invención pueden incluir porciones de anticuerpos intactos que mantienen la especificidad para la ligación del antígeno, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fv, fragmentos scFv, monómeros o dímeros de cadena pesada, monómeros o dímeros de cadena liviana, o dímeros que contienen una cadena pesada y una liviana y similares.

Las proteínas de fusión más preferidas son las quiméricas y comprenden una roción remielinizante fusionada o de otra forma unida a parte o la totalidad de las regiones bisagra y constantes de una cadena liviana de inmunoglobulina, cadena pesada, o ambas. Así, esta invención se refiere a una molécula que incluye: (1) una porción remielinizante, (2) un segundo péptido, por ejemplo, uno que aumenta la solubilidad o la vida *in vivo* de la porción remielinizante, por ejemplo, un miembro de la superfamilia de la inmunoglobulina o un fragmento o porción del mismo, por ejemplo, una porción o fragmento de una IgG, por ejemplo, la región constante de la cadena pesada de la IgGl humana, por ejemplo, CH2, CH3, y las regiones bisagra. Específicamente, una "fusión porción remielinizante/Ig" es una proteína que comprende una porción remielinizante biológicamente activa de la invención. Una especie de agentes remielinizantes es una "fusión integrina/Fc" que es una proteína que contiene una inmunoglobulina remielinizante de la invención unida a al menos una parte del dominio

constante de una inmunoglobulina. Una fusión Fc preferida contiene una inmunoglobulina remielinizante de la invención unida a un fragmento de un anticuerpo que contiene el dominio terminal C de las cadenas pesadas de inmunoglobulina,

El término "proteína de fusión" también se refiere a una porción remielinizante que se une químicamente mediante una molécula mono- o hétero-funcional a una segunda porción que no es una porción remielinizante (obteniéndose una molécula "quimérica") y se prepara "*de novo*" a partir de proteína purificada como se describe a continuación. Así, un ejemplo de una molécula quimérica unida químicamente, en oposición a otra unida de forma recombinante, que es una proteína de fusión puede comprender: (1) porción que apunta a una subunidad de la integrina alfa-4, por ejemplo, una porción VCAM-1 capaz de unirse a VLA-4 en la superficie de las células que contienen VLA-4; (2) una segunda molécula que aumenta la solubilidad o el tiempo de vida *in vivo* de la región meta, por ejemplo un polímero de polialquilenglicol tal como el polietilenglicol (PEG). La porción que apunta la alfa-4 puede ser cualquier ligando de alfa-4 natural o un fragmento del mismo, por ejemplo, un péptido VCAM-1 o una secuencia aminoacídica similar sustituida conservadoramente.

Los anticuerpos quiméricos, primatizados® y humanizados se pueden producir a partir de anticuerpos no humanos, y tienen la misma o similar afinidad de ligación que el anticuerpo a partir del cual se producen. Se pueden usar las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos quiméricos (Morrison *et al.*, 1984 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 6851; Neuberger *et al.*, 1984 *Nature* 312: 604; Takeda *et al.*, 1985 *Nature* 314: 452) en las cuales se empalman ("splicing") los genes de una molécula de

anticuerpo de ratón que tiene una especificidad para un antígeno apropiado junto con una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica adecuada; tales anticuerpos están dentro del campo de esta invención. Por ejemplo, se puede unir una región variable (V) codificadora de ácido nucleico de de un anticuerpo monoclonal de ratón a una región constante (C) humana codificadora de ácido nucleico, por ejemplo, IgG1 o IgG4. Así, el anticuerpo resultante es una especie híbrida, generalmente con el dominio de ligación de antígeno del anticuerpo no humano y el dominio C o efector de un anticuerpo humano.

Los anticuerpos humanizados son anticuerpos con regiones variables que son principalmente de un anticuerpo humano (el anticuerpo del aceptor), pero que tienen regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo no humano (el anticuerpo del donante). Ver, por ejemplo, Queen *et al.*, 1989 *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 10029-33; WO 90/07861; y Patentes Estadounidenses Nos. 6.054.297; 5.693.761; 5.585.089; 5.530.101 y 5.224.539. La región o las regiones constantes de estos anticuerpos generalmente son también de un anticuerpo humano. Típicamente los dominios variables humanos se eligen entre los anticuerpos humanos cuyas secuencias presentan una elevada homología con los dominios de ligación de la región variable no humana deseada. Los residuos variables de las cadenas pesadas y livianas se pueden derivar a partir del mismo anticuerpo o de otro anticuerpo humano diferente. Además, las secuencias se pueden elegir como un consenso de varios anticuerpos humanos, como se describe en WO 92/22653.

Se seleccionan aminoácidos específicos dentro de la región variable humana para la sustitución en base a la conformación y propiedades de

ligación de antígeno pronosticadas. Éstas se pueden determinar aplicando técnicas tales como el modelado por ordenador, predicción del comportamiento y las propiedades de ligación de los aminoácidos en ciertas ubicaciones dentro de la región variable, y observación de los efectos de la sustitución. Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre una región variable no humana y una región variable humana, la región variable humana se puede alterar para reflejar la composición aminoacídica de la región variable no humana. En la presente se describen varios ejemplos de anticuerpos anti-alpha-4 humanizantes.

El término "anticuerpo homólogo humanizado" se refiere a un anticuerpo homólogo, producido por tecnología de DNA recombinante, en el cual algunos o todos los aminoácidos de una cadena liviana o pesada de inmunoglobulina humana han sido sustituidos por los aminoácidos correspondientes de una cadena liviana o pesada de inmunoglobulina de un mamífero no humano. Un "anticuerpo homólogo humano" es un anticuerpo homólogo en el cual todos los aminoácidos de una cadena liviana o pesada de inmunoglobulina (independientemente de si se requieren o no para ligación de antígenos) se derivan de una fuente humana.

En una realización específica, los anticuerpos usados en el régimen de dosificación crónica de la presente invención son anticuerpos humanizados según lo descripto en la Patente Estadounidense No. 5.840.299, la cual se incorpora a la presente por referencia.

En otra realización, ratones transgénicos que contienen genes de anticuerpo humano se pueden inmunizar con una estructura antigénica de la alfa-4, y se puede utilizar tecnología del hibridoma para generar anticuerpos humanos que se liguen selectivamente a la alfa-4,

792

Se pueden producir anticuerpos quiméricos, humanos y/o humanizados, mediante expresión recombinante, por ejemplo, expresión en hibridomas humanos (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985)), en células de mieloma o en células de ovario de hámster chino (CHO). Alternativamente, se pueden incorporar secuencias codificadoras de anticuerpo en vectores adecuados para introducirlas en el genoma de un animal, produciendo así un animal transgénico. Un ejemplo sería producir tales anticuerpos en la leche de un animal transgénico tal como un bocino. Ver, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 5.849.992 y 5.304.489. Los transgenes adecuados incluyen los transgenes que tienen un promotor y/o mejorador de un gen específico de la glándula mamaria, por ejemplo caseína o β-lactoglobulina.

5.1.1. Anticuerpos Humanizados y Primatizados®

En una realización de la invención, se proveen inmunoglobulinas (u otros anticuerpos humanizados (y primatizados®) específicos para la subunidad alfa-4 de la VLA-4, que cuando se administran en una cantidad efectiva inhiben la desmielinización y/o promueven la remielinización y/o reducen la parálisis. Los anticuerpos humanizados y primatizados® son anticuerpos de origen animal (típicamente de mamíferos) que han sido modificados usando técnicas de ingeniería genética. Las técnicas se usan para reemplazar secuencias de la región marco constante y/o de la región variable por secuencias humanas, a la vez manteniendo la especificidad para el antígeno original del anticuerpo. Los anticuerpos humanizados y primatizados® habitualmente se derivan de anticuerpos de roedores (por ejemplo ratón y hámster) con especificidad para los antígenos humanos (por ejemplo VCAM-1 humana o VLA-4 humana). Al modificar el

anticuerpo del donante (el anticuerpo del animal al cual se le administró el antígeno) para que tenga secuencias del animal al cual se le administrará el anticuerpo con fines terapéuticos, la respuesta del huésped al administrarle el anticuerpo será reducida en. Sólo las regiones Fc o todas excepto las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se pueden reemplazar por dominios del aceptor, siendo el aceptor el animal al cual se le ha de administrar el anticuerpo modificado. (por ejemplo, mamíferos tales como humanos, animales domésticos, animales de granja y similares).

Se prefieren los anticuerpos que se ligan a la subunidad alfa-4 de la VLA-4 y que al ser administrados a un paciente en una cantidad efectiva inhiben la desmielinización. Se prefieren aún más aquellos anticuerpos que al ser administrados en una cantidad efectiva inducen remielinización y/o reducen la parálisis en un sujeto que padece una enfermedad o trastorno desmielinizante.

Típicamente, las CDR de un anticuerpo de la murina se transplantan a las correspondientes regiones en un anticuerpo humano, ya que son las CDR (es decir, tres en las cadenas pesadas del anticuerpo, tres en las cadenas livianas) las regiones del anticuerpo de ratón (o del anticuerpo de cualquier otro animal) las que se ligan a un antígeno específico. El transplante de las CDR se logra mediante ingeniería genética, donde las secuencias de DNA CDR se determinan clonando segmentos genéticos de región variable (V) de cadena pesada o liviana de murina, y luego se transfieren a las correspondientes regiones V humanas mediante mutagénesis dirigida. En la etapa final del proceso, se añaden los segmentos genéticos de región constante humanos del isotipo deseado (generalmente gama I para CH y kapa para CL), y los genes de cadena pesada y liviana humanizados se co-

expresan en células de mamífero para producir anticuerpo humanizado soluble.

La transferencia de estas CDR a un anticuerpo humano confiere a este anticuerpo las propiedades de ligación de antígeno del anticuerpo de la murina original. Las seis CDR en el anticuerpo de la murina se montan estructuralmente sobre una región "marco" de una región V. El motivo del éxito del transplante de las CDR es que las regiones marco de los anticuerpos de ratón y humanos pueden tener estructuras tridimensionales muy similares con puntos de fijación para CDR similares, de manera que las CDR se pueden intercambiar. Estos homólogos de anticuerpos humanizados se pueden preparar como se ejemplifica, por ejemplo, en Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321: 522-5; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332: 323-7; Queen *et al.*, 1989, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 10029; y Orlandi *et al.*, 1989, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 3833.

Sin embargo, se cree que ciertos aminoácidos dentro de las regiones marco interactúan con las CDR y afectan la afinidad de ligación a antígeno global. La transferencia directa de las CDR de un anticuerpo de la murina para producir un anticuerpo humanizado recombinante sin ninguna modificación de las regiones marco V humanas a menudo resulta en una pérdida total o parcial de la afinidad de ligación. En varios casos, parece ser crítico el alterar los residuos en las regiones marco del anticuerpo del aceptor (es decir, el anticuerpo humano) a fin de lograr actividad de ligación.

Queen *et al.*, 1989 (*supra*) y WO 90/07861 (Protein Design Labs) han descripto la preparación de un anticuerpo humanizado que contiene residuos modificados en las regiones marco del anticuerpo del aceptor

combinando las CDR de una MAb de la murina (anti-Tac) con regiones constantes y regiones marco de la inmunoglobulina humana. Una respuesta al problema de la pérdida de la afinidad de ligación sin modificar los residuos de las regiones marco V humanas involucra dos pasos que son clave. En primer lugar, las regiones marco V humanas son seleccionadas por un analista de sistemas para lograr una homología de secuencias óptima de la proteína respecto de la región marco del anticuerpo de la murina original. En el segundo paso, la estructura terciaria de la región V de la murina se modela por ordenador a fin de visualizar residuos aminoacídicos marco que probablemente interactuarán con las CDR de la murina. Estos residuos aminoacídicos de la murina luego se superponen sobre el marco humano homólogo. Para obtener detalles adicionales, ver las Patentes Estadounidenses Nos. 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; y 5.530.101 (Protein Design Labs).

Ciertos antagonistas de la integrina alfa-4 útiles para utilizar en la presente invención incluyen los homólogos de anticuerpos recombinantes quiméricos y humanizados (es decir, las inmunoglobulinas intactas y las porciones de las mismas) con especificidad por el epitopo B que han sido preparados y se describen en la Patente Estadounidense No. 5.932.214 (MAb HP1/2). El material de partida para preparar los homólogos de anticuerpos anti-integrina quiméricos (Variable de ratón - Constante humano) y los homólogos de anticuerpos anti-integrina humanizados pueden ser un anticuerpo anti-integrina monoclonal de la murina como se describió anteriormente, un anticuerpo anti-integrina monoclonal disponible comercialmente (por ejemplo, HP2/1, Amae International, Inc., Westbrook, Me). Otros homólogos de anticuerpos anti-VLA-4

humanizados preferidos son los descriptos por Athena Neurosciences, Inc. en PCT/US95/01219 (27 de Julio de 1995), Patentes Estadounidenses Nos. 5.840.299 y 6.033.665. El contenido de las patentes Nos. 5.932.214, 5.840.299 y 6.033.665 se incorpora en su totalidad a la presente por referencia.

Estos anticuerpos anti-VLA-4 humanizados comprenden una cadena liviana humanizada y una cadena pesada humanizada. La cadena liviana humanizada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDRI, CDR2 y CDR3) que tienen secuencias aminoacídicas de las correspondientes regiones determinantes de la complementariedad de una cadena liviana de inmunoglobulina 21.6 de ratón, y un marco de región variable de una secuencia de marco de región variable de la cadena liviana kapa humana, excepto que al menos en una posición la posición del aminoácido es ocupada por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente del marco de la región variable de la cadena liviana de la inmunoglobulina 21.6 de ratón. La cadena pesada humanizada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) que tienen secuencias aminoacídicas de las correspondientes regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada de la inmunoglobulina 21.6 de ratón, y un marco de región variable de una secuencia de un marco de una región variable de la cadena pesada humana, excepto que en al menos una posición la posición del aminoácido es ocupada por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente de la del marco de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 21.6 de ratón. Ver Patentes Estadounidenses Nos. 5.840.299 y 6.033.665.

También se pueden producir fragmentos de un antagonista de la integrina alfa-4 aislado (es decir, fragmentos de los homólogos de anticuerpo aquí descriptos) de manera eficiente utilizando métodos recombinantes, por digestión proteolítica, o por síntesis química, usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. En los métodos recombinantes, se pueden generar fragmentos internos o terminales de un polipéptido retirando uno o más nucléotidos de un extremo (para un fragmento terminal) o de ambos extremos (para un extremo interno) de una secuencia de DNA que codifica para el péptido aislado de puercoespín (hedgehog). La expresión del DNA mutagenizado produce fragmentos polipeptídicos. La digestión con ciertas endonucleasas también puede generar diferentes DNA, los cuales pueden codificar una variedad de fragmentos. Los DNA que codifican fragmentos de una proteína también se pueden generar por corte al azar, digestión con restricciones, o una combinación de estas técnicas. Se pueden generar fragmentos de proteína directamente a partir de proteínas intactas. Los polipéptidos se pueden dividir específicamente usando enzimas proteolíticas, incluyendo, pero sin limitarse a, plasmina, trombina, tripsina, quimotripsina o pepsina. Cada una de estas enzimas es específica para el tipo de enlace peptídico que ataca. La tripsina cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos en los cuales el grupo carbonilo es de un aminoácido básico, generalmente arginina o lisina. La pepsina y la quimotripsina catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de los aminoácidos aromáticos, tales como un triptofano, tirosina y fenilalanina. Se pueden generar conjuntos alternativos de fragmentos de proteínas impidiendo la división en un sitio que es susceptible a una enzima proteolítica. Por ejemplo, la reacción del grupo ε-

aminoácido de lisina con etiltrifluorotioacetato en solución levemente básica permite obtener residuos de aminoácido bloqueados cuyo enlace peptídico adyacente ya no es susceptible a la hidrólisis por tripsina. Las proteínas se pueden modificar para crear enlaces peptídicos que son susceptibles a las encimas proteolíticas. Por ejemplo, por alquilación de residuos de cisterna con β-haloetilaminas se obtienen enlaces peptídicos que son hidrolizados por tripsina (Lindley, 1956, *Nature* 178: 647). Además se pueden utilizar reactivos químicos que dividen las cadenas peptídicas en residuos específicos, Por ejemplo, el bromuro de cianogeno divide los péptidos en sus residuos de metionina (Gross *et al.*, 1961, *J. Am. Chem. Soc.* 83: 1510). Así, tratando las proteínas con diferentes combinaciones de modificadores, enzimas proteolíticas y/o reactivos químicos, las proteínas se pueden dividir en fragmentos de una longitud deseada sin superposición de los fragmentos, o bien se pueden dividir en fragmentos superpuestos de una longitud deseada.

5.1.1.1. Natalizumab y Anticuerpos Humanizados Relacionados

La invención se refiere a un método para utilizar inmunoglobulinas humanizadas que específicamente se ligan a un ligando VLA-4 ya sea solas o en combinación para promover la remielinización. Un anticuerpo preferido para utilizar en estos métodos de tratamiento y en medicamentos incluye el descripto en la Patente Estadounidense No. 5.840.299 otorgada a Elan Pharmaceuticals, la cual se incorpora en la presente en su totalidad. Otro aspecto contempla el uso de fragmentos de estos anticuerpos con actividad remielinizante según una evaluación *in vivo*.

Los anticuerpos humanizados comprenden una cadena liviana humanizada y una cadena pesada humanizada. En un aspecto, la cadena

liviana humanizada puede comprender tres regiones determinantes de la complementariedad (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) que tienen secuencias aminoacídicas de las correspondientes regiones determinantes de la complementariedad de una cadena liviana de inmunoglobulina 21-6 de ratón, y un marco de región variable de una secuencia de marco de región variable de cadena liviana kapa humana excepto en al menos una posición seleccionada de un primer grupo formado por las posiciones L45, L49, L58 y L69, donde la posición del aminoácido es ocupada por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente del marco de región variable de la cadena liviana de la inmunoglobulina 21.6 de ratón.

La cadena pesada humanizada comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) que tienen secuencias aminoacídicas de las correspondientes regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada de la inmunoglobulina 21.6 de ratón, y un marco de región variable de una secuencia de un marco de una región variable de la cadena pesada humana, excepto en al menos una posición seleccionada del grupo compuesto por H27, H28, H29, H30, H44, H71, donde la posición del aminoácido es ocupada por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente del marco de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 21-6 de ratón. Las inmunoglobulinas específicamente se ligan a la VLA-4 con una afinidad que tiene un límite inferior de alrededor de 10^7 M^{-1} y un límite superior de alrededor de cinco veces la afinidad de la inmunoglobulina 21-6 de ratón.

Generalmente, los marcos de región variable de las cadenas liviana y pesada son de las secuencias de las regiones variables RE1 y 21/28'CL respectivamente. Cuando el marco de región variable de la cadena liviana

es de RE1, se reemplazan al menos dos aminoácidos del marco. Un aminoácido es del primer grupo de posiciones arriba descripto. Los otros aminoácidos son de un tercer grupo compuesto por las posiciones L104, L105 y L107. Esta posición es ocupado por el mismo aminoácido presente en la posición equivalente de una cadena liviana kapa de una inmunoglobulina humana que no sea RE1.

Algunas inmunoglobulinas humanizadas tienen una secuencia de región variable de cadena liviana madura llamada La o Lb, o una secuencia de región variable de cadena pesada madura llamada Ha, Hb o Hc (Figura 13). Las inmunoglobulinas humanizadas preferidas incluyen aquellas que tienen una cadena liviana La y una cadena pesada Ha, Hb o Hc (Figura 14).

Las inmunoglobulinas humanizadas tienen regiones marco variables sustancialmente de una inmunoglobulina humana (llamada inmunoglobulina del aceptor) y regiones determinantes de la complementariedad sustancialmente de una inmunoglobulina de ratón llamada mu MAb 21.6 (también llamada inmunoglobulina del donante). La región o las regiones constantes, si las hay, son también sustancialmente de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanizados exhiben una afinidad de ligación específica por la VLA-4 de al menos 10^7, 10^8, 10^9, o 10^{10} M^{-1}. Generalmente el límite superior de la afinidad de ligación de los anticuerpos humanizados para la VLA-4 está dentro de un factor de tres o cinco veces el de la mu MAb 21.6 (alrededor de 10^9 M^{-1}). A menudo el límite inferior de la afinidad de ligación también está dentro de un factor de tres a cinco veces el de la mu MAb 21.6.

Se pueden producir anticuerpos humanizados como los que se ejemplifican, por ejemplo, con el anticuerpo monoclonal MAb 21.6 de

ratón. El material de partida para la producción de anticuerpos humanizados es mu MAb 21.6. La aislación y las propiedades de este anticuerpo se describen en la Patente Estadounidense No. 6.033.655 (otorgada a Elan Pharmaceuticals, Inc.), la cual se incorpora en su totalidad a la presente por referencia. En pocas palabras, mu MAb 21.6 es específica para la subunidad alfa-4 de la VLA-4 y ha demostrado inhibir la unión de linfocitos humanos a cultivos de tejidos de células cerebrales de rata estimuladas con factor de necrosis tumoral. Entre la terminal-N y la terminal-C, tanto cadenas livianas como pesadas componen los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con la convención de numeración de Kabat.

El siguiente paso es la selección de anticuerpos humanos para proveer residuos marco. Lo más probable es que la sustitución de las CDR de ratón en un marco humano de dominio variable provoque la retención de su correcta orientación espacial si el marco humano de dominio variable adopta la misma o similar conformación que el marco variable de ratón a partir del cual se originaron las CDR. Esto se logra obteniendo los dominios variables humanos de anticuerpos humanos cuyas secuencias marco exhiben un elevado grado de identidad de secuencia con los dominios variables de la murina a partir de la cual se derivaron las CDR. Las regiones de marco variable de cadena pesada y liviana se pueden derivar a partir de la misma o de diferentes secuencias de anticuerpos humanos. Las secuencias de anticuerpos humanos pueden ser las secuencias de anticuerpos humanos que ocurren naturalmente o pueden ser una secuencia consenso de diferentes anticuerpos humanos. Ver

Kettleborough *et al.*, *Protein Engineering* 4: 773 (1991); Kolbinger *et al.*, *Protein Engineering* 6: 971 (1993).

Las secuencias de anticuerpos humanos adecuadas se identifican comparando las secuencias aminoacídicas de las regiones variables de ratón con las secuencias de los anticuerpos humanos conocidos utilizando herramientas informáticas. La comparación se realiza independientemente para las cadenas pesadas y livianas, pero los principios son similares para ambos casos. Esta comparación revela que la cadena liviana mu 21.6 presenta la mayor identidad de secuencia respecto de las cadenas livianas humanas del subtipo kappa 1; la cadena pesada mu 21.6 presenta la mayor identidad de secuencia respecto de las cadenas livianas humanas del subtipo uno, según lo definido por Kabat, *supra*. Por lo tanto, las regiones marco humanas livianas y pesadas normalmente se derivan de anticuerpos humanos de estos subtipos, o de una secuencia consenso de estos subtipos. Las regiones variables humanas de cadena liviana y pesada preferidas que presentan la mayor identidad de secuencia respecto de las correspondientes regiones de mu MAb 21.6 son las de los anticuerpos RE1 y 21/28'CL respectivamente.

Luego se puede utilizar un modelado computacional para mejorar aún más la habilidad del anticuerpo humanizado de ligarse con su antígeno cognato. La yuxtaposición artificial de las regiones CDR de la murina con la región marco variable humana puede resultar en vínculos conformacionales no naturales, los cuales, a menos que se corrijan mediante la sustitución de ciertos residuos aminoacídicos, pueden provocar la pérdida de la afinidad de ligación. La selección de residuos aminoacídicos para la sustitución se determina, en parte, mediante

modelado computacional. Hay gran cantidad de hardware y software para producir imágenes tridimensionales de moléculas de inmunoglobulina disponibles comercialmente. En general, los modelos moleculares de desarrollan partiendo a partir de estructures resueltas para cadenas de inmunoglobulina o sus dominios. Las cadenas a modelar se comparan para detectar similitud de secuencias aminoacídicas respecto de cadenas o dominios de estructuras tridimensionales resueltas, y las cadenas o dominios que presentan la mayor similitud de secuencia se seleccionan como punto de partida para la construcción de un modelo molecular. Por ejemplo, para la cadena liviana de mu MAb 21.6, el punto de partida para modelar las regiones marco, regiones CDR1 y CDR2, fue la cadena liviana humana RE1. Para la región CDR3, el punto de partida fue la región CDR3 de la cadena liviana de un anticuerpo humano diferente HyHEL-5. Las estructuras resueltas de partida se modifican para tomar en cuenta las diferencias entre los aminoácidos verdaderamente presentes en las cadenas o dominios de la inmunoglobulina modelados, y aquellos presentes en la estructura de partida. Luego las estructuras modificadas se combinan en una inmunoglobulina compuesta. Finalmente, el modelo se refina mediante minimización de la energía y verificando que todos los átomos estén a distancias adecuadas uno de otro y que las longitudes y ángulos de enlace estén dentro de límites químicamente aceptables.

Como se observó anteriormente, los anticuerpos humanizados de la presente invención comprenden regiones marco variables sustancialmente de una inmunoglobulina humana y regiones determinantes de la complementariedad sustancialmente de una inmunoglobulina de ratón llamada mu MAb 21.6. Habiendo identificado las regiones determinantes

de la complementariedad (CDR) de mu MAb 21.6 e inmunoglobulina del aceptor humano apropiadas, el siguiente paso consiste en determinar cuál, si es que algún, residuo de estos componentes se deberían sustituir para optimizar las propiedades del anticuerpo humanizado resultante. En general, se debería minimizar la sustitución de residuos aminoacídicos por murina, ya que la introducción de residuos de murina aumentan el riesgo de que el anticuerpo provoque una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) en los humanos. Los aminoácidos se seleccionan para la sustitución en base a su posible influencia sobre la conformación de las CDR y/o ligación a antígenos. Estas posibles influencias se investigan por modelado, examinando las características de los aminoácidos en ciertas ubicaciones particulares, o por observación empírica de los efectos de la sustitución o mutagénesis de ciertos aminoácidos particulares.

Cuando un aminoácido difiere entre una región marco variable mu MAb 21.6 y una región marco variable humana equivalente, el aminoácido del marco humano generalmente se debe sustituir por el aminoácido de ratón equivalente si es razonable anticipar que el aminoácido:

(1) liga antígeno directamente de forma no covalente (por ejemplo, aminoácidos en las posiciones L49, L69 de mu MAb 21.6),

(2) está adyacente a una región CDR, es parte de una región CDR de acuerdo con la definición alternativa propuesta por Chothia *et al.*, *supra*, o de alguna otra manera interactúa con una región CDR (por ejemplo, está a 3 Å o menos de una región CDR) (por ejemplo, aminoácidos en las posiciones L45, L58, H27, H28, H29, H30 y H71 de mu MAb 21.6), o

(3) participa en la interfase V_L-V_H (por ejempo, aminoácidos en la posición H44 de mu MAb 21.6).

Otros candidatos para la sustitución son los aminoácidos aceptores de los marcos humanos que son inusuales para una inmunoglobulina humana en dicha posición (por ejemplo, aminoácidos en las posiciones L104, L105 y L107 de mu MAb 21.6). Estos aminoácidos se pueden sustituir por aminoácidos de la posición equivalente de inmunoglobulinas humanas más típicas. Alternativamente, los aminoácidos de posiciones equivalentes en la MAb 21.6 de ratón se pueden introducir en las regiones marco humanas si estos aminoácidos son típicos de la inmunoglobulina humana en las posiciones equivalentes.

En general, es deseable sustituir todos o casi todos los aminoácidos que satisfacen los criterios especificados anteriormente. Sin embargo, en ocasiones existe cierta ambigüedad respecto de si un determinado aminoácido satisface los anteriores criterios, y se producen inmunoglobulinas variantes alternativas, una de las cuales tiene dicha sustitución particular mientras que la otra no la tiene. Los anticuerpos humanizados generalmente contendrán una sustitución de un residuo de marco de cadena liviana humana por un correspondiente residuo de mu MAb 21.6 en al menos 1, 2 ó 3, y más habitualmente 4, de las posiciones siguientes: L45, L49, L58 y L69. Los anticuerpos humanizados generalmente también contienen una sustitución de un residuo de marco de cadena pesada humana en al menos 1, 2, 3, 4 ó 5, y algunas veces 6, de las posiciones siguientes: H27, H28, H29, H30, H44 y H71. Opcionalmente, también se puede sustituir H36. En realizaciones preferidas, cuando la inmunoglobulina de la cadena liviana del aceptor humano es RE1, la cadena liviana también contiene sustituciones en al menos 1 ó 2, y más habitualmente 3, de las posiciones siguientes: L104, L105 y L107. Estas

posiciones se sustituyen con el aminoácido de posición equivalente de una inmunoglobulina humana que tiene residuos aminoacídicos más típicos. En las Figuras 13 y 14 se ilustran aminoácidos apropiados para sustitución.

Habitualmente las regiones CDR en los anticuerpos humanizados son sustancialmente idénticas, y más habitualmente, idénticas a las correspondientes regiones CDR en el anticuerpo mu MAb 21.6. Sin embargo, en ocasiones es deseable cambiar uno de los residuos en una región CDR. Por ejemplo, el Ejemplo 4 identifica una similitud aminoacídica entre la CDR3 de mu MAb 21.6 y el ligando VCAM-1. Esta observación sugiere que la afinidad de ligación de los anticuerpos humanizados se podría mejorar rediseñando la región CDR de la cadena pesada para que se asemeje aún más a la VCAM-1. En consecuencia, uno o más aminoácidos del dominio de la CDR3 se puede sustituir por aminoácidos del dominio de ligación de la VCAM-1. Aunque en general no es deseable, algunas veces es posible hacer una o más sustituciones de residuos CDR sin afectar apreciablemente la afinidad de ligación de la inmunoglobulina humanizada resultante.

A excepción de las sustituciones de aminoácidos específicamente discutidas anteriormente, habitualmente las regiones marco de las inmunoglobulinas humanizadas son sustancialmente idénticas, y más habitualmente, idénticas a las regiones marco de los anticuerpos humanos a partir de los cuales fueron derivadas. Obviamente, muchos de los aminoácidos en la región marco contribuyen poco o nada a la especificidad o a la afinidad de un anticuerpo. En consecuencia, se pueden tolerar numerosas sustituciones conservadoras individuales de residuos marco sin modificar apreciablemente la especificidad o la afinidad de la

inmunoglobulina humanizada resultante. Sin embargo, en general estas sustituciones son indeseables.

Producción de Regiones Variables. Una vez que se han seleccionado conceptualmente los componentes CDR y marco para las inmunoglobulinas humanizadas, existe una variedad de métodos disponibles para producir tales inmunoglobulinas. Debido a la degeneración del código, una variedad de secuencias de ácido nucleico codificarán cada secuencia de las inmunoglobulinas aminoacídica. Las secuencias de ácido nucleico deseadas se pueden obtener por la síntesis de DNA de fase sólida o por mutagénesis PCR de un variante del polinucleótido deseado preparado anteriormente. La mutagénesis mediada por oligonucleótidos es un método preferido para preparar los variantes de sustitución, deleción e inserción del polipéptido DNA meta. Ver *See* Adelman *et al., DNA* 2: 183 (1983). En pocas palabras, el polipéptido DNA meta se altera hibridizando un oligonucleótido que codifica la mutación deseada a una plantilla de DNA de un solo filamento. Luego de a hibridización, se utiliza un DNA polimerasa para sintetizar un segundo filamento complementario completo de la plantilla que incorpora el cebador oligonucleótido, y codifica la alteración en el polipéptido DNA meta.

Selección de la Región Constante. Los segmentos variables de los anticuerpos humanizados producidos como se describió anteriormente están típicamente unidos a al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Se pueden aislar secuencias de DNA de la región constante humana de acuerdo con procedimientos conocidos a partir de una variedad de células humanas, pero preferentemente a partir de cálulas B inmortalizadas (ver

808

Kabat *et al., supra*, y WO 87/02671) (cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad por referencia). En general, el anticuerpo contendrá tanto regiones constantes de cadena liviana como de cadena pesada. La región constante de cadena pesada generalmente incluye las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4.

Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos que tienen todo tipo de regiones constantes, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Cuando se desea que el anticuerpo humanizado tenga actividad citotóxica, el dominio constante generalmente es un dominio constante fijador del complemento y la clase es típicamente IgG_1. Cuando no se desea esta actividad citotóxica, el dominio constante puede ser de la clase IgG_2. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo.

5.1.1.2. Otros Anticuerpos Anti-VLA-4

Otros anticuerpos anti-VLA-4 incluyen, pero no se limitan a, HP1/2, HP-2/1, HP2/4, L25, y P4C2. Estos anticuerpos también se pueden administrar en una cantidad efectiva para inhibir la desmielinización y/o promover la remielinización y/o reducir la parálisis en un paciente tal como se discute en la presente y tal como lo podrán apreciar los expertos en la técnica.

Con frecuencia los anticuerpos monoclonales creados en ratones posteriormente se humanizan para evitar la respuesta inmunológica del anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) en un sujeto humano al que se le inyecta un anticuerpo de ratón. Esto ocurre por transplante o modificación de las CDR. Es decir, típicamente los anticuerpos son primero anticuerpos monoclonales de ratón, los cuales a través de transplante o modificación de

las CDR se humanizan, como se discutió anteriormente para en anticuerpo 21.6.

Específicamente, los anticuerpos humanizados tienen especificidad por la VLA-4 y tienen la capacidad de promover la remielinización, impedir la desmielinización y/o reducir la parálisis. Estos anticuerpos se derivan de fuentes (por ejemplo ratones) que en al menos una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los dominios variables se derivan de un anticuerpo anti-VLA-4 no humano donante, y en que puede o no haber una alteración mínima de la región marco variable liviana y/o pesada del anticuerpo del aceptor a fin de retener la especificidad de ligación del anticuerpo del donante. Preferentemente las regiones de ligación de antígeno del dominio variable de la cadena pesada transplantadas a las CDR comprenden las CDR correspondientes a las posiciones 31-35 (CDR1), 50-65 (CDR2) y 95-102 (CDR3). En una realización preferida, la cadena pesada también incluye residuos no humanos en las posiciones marco 27-30 (numeración de Kabat). La cadena pesada puede además incluir residuos no humanos en la posición marco 75 (numeración de Kabat). La cadena pesada puede además incluir residuos no humanos en las posiciones marco 77-79 o 66-67 y 69-71 o 84-85 o 38 y 40 o 24 (numeración de Kabat). Preferentemente, las regiones de ligación de antígeno del dominio variable de la cadena liviana transplantadas a las CDR comprenden las CDR correspondientes a las posiciones 24-34 (CDR1), 50-56 (CDR2) y 89-97 (CDR3). En una realización preferida, la cadena liviana contiene además residuos no humanos en las posiciones marco 60 y 67 (numeración de Kabat). Estos residuos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (Kabat *et al.*, 5° ed. 4 vol.

SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, U.S. Department of Health Human Services, NIH, USA (1991)).

Síntesis y Humanización del Anticuerpo HP1/2 de ratón. El HP1/2 es otro anticuerpo dirigido contra la VLA-4. El método para preparar una versión humanizada de este cuerpo para su uso en humanos se describe en la presente, y también en la Patente Estadounidense No. 6.602.503 otorgada a Biogen, Inc., e incorporada a la presente en su totalidad por referencia. Las secuencias de los anticuerpos humanizados son como se indica a continuación. La secuencia HP1/2 V_H DNA y su secuencia aminoacídica traducida son:

```
5'-gtc aaa ctg cag cag tct ggg gca gag ctt gtg aag cca ggg gcc tca
48
   N-Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
     1               5                  10                  15

    gtc aag ttg ttc tgc aca gct tct ggc ttc aac att aaa gac acc tat
96
    Val Lys Leu Phe Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
                20                  25                  30

    atg cac tgg gtg aag cag agg cct caa cag ggc ctg gag tgg att gga
144
    Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gln Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
            35                  40                  45

    agg att gat cct gcg agt ggc gat act aaa tat gac ccg aag ttc cag
192
    Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
         50                  55                  60

    gtc aag gcc act att aca gcg gac acg tcc tcc aac aca gcc tgg ctg
240
    Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Trp Leu
     65                  70                  75                  80

    cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc tac tac tgt gca
288
    Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                    85                  90                  95

    gac gga atg tgg gta tca acg gga tat gct ctg gac ttc tgg ggc caa
336
    Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln
                100                 105                 110

    ggg     acc     acg     gtc     acc     gtc     tcc     tca-3'
360
    Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser-C
298
```

115 120

Una comparación entre las dos secuencias HP1/2 V_H y una secuencia de consenso de la familia IIC reveló que los únicos residuos inusuales están en las posiciones de aminoácido 80, 98 y 121 (es decir, 79, 94 y 121 en la numeración de Kabat). Aunque Tyr-80 es invariante en el subgrupo IIC, otras regiones V_H de la murina secuenciadas tienen otros aminoácidos aromáticos en esta posición, aunque ninguna tiene Trp. La mayoría de las V_Hs humanas y de murina tienen un residuo arginina en la posición 94 de Kabat. La presencia de Asp-94 en HP1/2 V_H es extremadamente rara; sólo se ha informado un ejemplo de un residuo de carga negativo en esta posición. La prolina en la posición 113 de Kabat también es inusual, pero es poco probable que sea importante en la conformación de las CDR debido a su distancia de las mismas. Los aminoácidos que componen la CDR1 se han encontrado en otras tres regiones V_H de murina secuenciadas. Sin embargo las CDR2 y CDR3 son exclusivas del HP1/2 y no se encuentran en ninguna otra V_H de murina informada.

La secuencia HP1/2 V_K DNA y su secuencia aminoacídica traducida son las siguientes:

```
 5'-agt att gtg atg acc cag act ccc aaa ttc ctg ctt gtt tca gca gga
48
  N-Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
     1               5                  10                  15

    gac agg gtt acc ata acc tgc aag gcc agt cag agt gtg act aat gat
96
    Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp
                20                  25                  30

    gta gct tgg tac caa cag aag cca ggg cag tct cct aaa ctg ctg ata
144
    Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
            35                  40                  45

    tat tat gca tcc aat cgc tac act gga gtc cct gat cgc ttc act ggc
192
    Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
         50                  55                  60
```

```
    agt gga tat ggg acg gat ttc act ttc acc atc agc act gtg cag gct
240
    Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
     65                  70                  75                  80

    gaa gac ctg gca gtt tat ttc tgt cag cag gat tat agc tct ccg tac
288
    Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr
                    85                  90                  95

    acg    ttc    gga    ggg    ggg    acc    aag    ctg    gag    atc-3'
318
    Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile-C
              100                 105
```

HP1/2 V_K es un miembro de la familia Kabat V (Kabat *et al.*, 5° ed., 4 vol., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, U.S. Department of Health Human Services (1991)) y no presenta ningún residuo inusual. Los aminoácidos de CDR1 y CDR3 son únicos. Los aminoácidos que componen la CDR2 se han informados en otra V_K de murina.

Diseño de un anticuerpo Anti-VLA-4 transplantado a las CDR. Para diseñar un anticuerpo Anti-VLA-4 transplantado a las CDR fue necesario determinar cuáles residuos de la HP1/2 de murina comprenden las CDR de las cadenas liviana y pesada. Hay tres regiones de hipervariabilidad entre las secuencias marco menos variables tanto en la cadena liviana como en la cadena pesada (Wu y Kabat, *J. Exp. Med.* 132: 211-250 (1970); Kabat *et al.*, (1991)). En la mayoría de los casos estas regiones hipervariables corresponden a, pero se pueden prolongar más allá de, la CDR. Las CDR de HP1/2 de murina se elucidaron de acuerdo con Kabat *et al.*, (1991) por alineación con otras secuencias V_H y V_K. Las CDR de HP1/2 de murina fueron identificadas y corresponden a los residuos identificados en las secuencias de V_H humanizado de la siguiente manera:

CDR1	AA_{31}-AA_{35}
CDR2	AA_{50}-AA_{66}
CDR3	AA_{99}-AA_{110}

Estos corresponden a AA_{31}-AA_{35}, AA_{50}-AA_{65}, y AA_{95}-AA_{102}, respectivamente, en la numeración de Kabat. Las CDR de HP1/2 V_K de murina fueron identificadas y corresponden a los residuos identificados en las secuencias de V_K humanizado de la siguiente manera:

CDR1	AA_{24}-AA_{34}
CDR2	AA_{50}-AA_{56}
CDR3	AA_{89}-AA_{97}

Estos corresponden a los mismos aminoácidos numerados en la numeración de Kabat. Así, sólo los límites de las CDR de V_K, pero no de V_H, correspondieron a los residuos CDR de Kabat. Los marcos humanos elegidos para aceptar los CDR del HP1/2 (donante) fueron NEWM y RE1 para las cadenas pesada y liviana, respectivamente. Las secuencias del NEWM y del RE1 han sido publicadas en Kabat *et al.*, (1991).

La secuencia DNA y la correspondiente secuencia aminoacídica de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo HP1/2 humanizado es:

```
 5'-atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc tgc ttg ctg gct gta gca cca ggt
48
  N-Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
     1               5                  10                  15

    gcc cac tcc cag gtc caa ctg cag gag tcc ggt gct gaa gtt gtt aaa
96
    Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Val Lys
                20                  25                  30

    ccg ggt tcc tcc gtt aaa ctg tcc tgc aaa gct tcc ggt ttc aac atc
144
    Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
            35                  40                  45

    aaa gac acc tac atg cac tgg gtt aaa cag cgt ccg ggt cag ggt ctg
192
```

```
    Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
         50                  55                  60

    gaa tgg atc ggt cgt atc gac ccg gct tcc ggt gac acc aaa tac gac
240
    Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
     65                  70                  75                  80

    ccg aaa ttc cag gtt aaa gct acc atc acc gct gac gaa tcc acc tcc
288
    Pro Lys Phe Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
                    85                  90                  95

    acc gct tac ctg gaa ctg tcc tcc ctg cgt tcc gaa gac acc gct gtt
336
    Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
                100                 105                 110

    tac tac tgc gct gac ggt atg tgg gtt tcc acc ggt tac gct ctg gac
384
    Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
            115                 120                 125

    ttc tgg ggt cag ggt acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gag tcc-3'
429
    Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser-C
        130                 135                 140
```

La secuencia DNA y la correspondiente secuencia aminoacídica de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo HP1/2 humanizado es:

```
 5'-atg ggt tgg tcc tgc atc atc ctg ttc ctg gtt gct acc gct acc ggt
48
  N-Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
     1               5                  10                  15

    gtt cac tcc atc gtt atg acc cag tcc ccg gac tcc ctg gct gtt tcc
96
    Val His Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser
                20                  25                  30

    ctg ggt gaa cgt gtt acc atc aac tgc aaa gct tcc cag tcc gtt acc
144
    Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr
            35                  40                  45

    aac gac gtt gct tgg tac cag cag aaa ccg ggt cag tcc ccg aaa ctg
192
    Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu
         50                  55                  60

    ctg atc tac tac gct tcc aac cgt tac acc ggt gtt ccg gac cgt ttc
240
    Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe
     65                  70                  75                  80

    tcc ggt tcc ggt tac ggt acc gac ttc acc ttc acc atc tcc tcc gtt
288
    Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val

302
```

```
                    85                  90                  95

    cag gct gaa gac gtt gct gtt tac tac tgc cag cag gac tac tcc tcc
336
    Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser
                100                 105                 110
    ccg tac acc ttc ggt ggt ggt acc aaa ctg gag atc taa ggatcctc-3'
383
    Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile-C
            115                 120
```

Además de las anteriores cadenas livianas y pesadas del anticuerpo HP1/2 humanizado, se pueden utilizar otras regiones de cadena pesada o liviana de aceptor para insertar en las regiones HP1/2 del donante. Todos los constructor contienen Ser-75 (Numeración de Kabat). El constructo STAW también contiene Gln a Thr en la posición 77, Phe a Ala en la posición 78, y Ser a Trp en la posición 79 (Numeración de Kabat). A continuación se presenta la secuencia V_H DNA y su secuencia aminoacídica traducida:

```
 5'-atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc tgc ttg ctg gct gta gca cca ggt
48
  N-Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
    1               5                   10                  15

    gcc cac tcc cag gtc caa ctg cag gag agc ggt cca ggt ctt gtg aga
96
    Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg
                20                  25                  30

    cct agc cag acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg tct ggc ttc aac att
144
    Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile
            35                  40                  45

    aaa gac acc tat atg cac tgg gtg aga cag cca cct gga cga ggt ctt
192
    Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
        50                  55                  60

    gag tgg att gga agg att gat cct gcg agt ggc gat act aaa tat gac
240
    Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
    65                  70                  75                  80

    ccg aag ttc cag gtc aga gtg aca atg ctg gta gac acc agc agc aac
288
    Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn
                    85                  90                  95
```

```
    aca gcc tgg ctg aga ctc agc agc gtg aca gcc gcc gac acc gcg gtc
336
    Thr Ala Trp Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
                100                 105                 110

    tat tat tgt gca gac gga atg tgg gta tca acg gga tat gct ctg gac
384
    Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
            115                 120                 125

    ttc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gag tcc-3'
429
    Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser-C
        130                 135                 140
```

El constructo KAITAS contiene los cambios adicionales de Arg a Lys (posición 66), Val a Ala (posición 67), Met a Ile (posición 69), Leu a Thr (posición 70) y Val a Ala (posición 71) (Numeración de Kabat). A continuación se presenta la secuencia KAITAS V_H DNA y su secuencia aminoacídica traducida:

```
 5'-atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc tgc ttg ctg gct gta gca cca ggt
48
  N-Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
    1               5                  10                  15

    gcc cac tcc cag gtc caa ctg cag gag agc ggt cca ggt ctt gtg aga
96
    Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg
                20                  25                  30

    cct agc cag acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg tct ggc ttc aac att
144
    Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile
            35                  40                  45

    aaa gac acc tat atg cac tgg gtg aga cag cca cct gga cga ggt ctt
192
    Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
        50                  55                  60

    gag tgg att gga agg att gat cct gcg agt ggc gat act aaa tat gac
240
    Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
    65                  70                  75                  80

    ccg aag ttc cag gtc aaa gcg aca att acg gca gac acc agc agc aac
288
    Pro Lys Phe Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
                    85                  90                  95

    cag ttc agc ctg aga ctc agc agc gtg aca gcc gcc gac acc gcg gtc
336

304
```

```
    Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
                100                 105                 110

    tat tat tgt gca gac gga atg tgg gta tca acg gga tat gct ctg gac
384
    Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
            115                 120                 125

    ttc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gag tcc-3'
429
    Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser-C
        130                 135                 140
```

El constructo SSE comprende las modificaciones adicionales de Ala a Ser (posición 84) y Ala a Glu (posición 85) (Numeración de Kabat). A continuación se indica la secuencia SSE V_H DNA y su secuencia aminoacídica traducida:

```
 5'-cag gtc caa ctg cag gag agc ggt cca ggt ctt gtg aga cct agc cag
48
  N-Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
     1               5                  10                  15

    acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg tct ggc ttc aac att aaa gac acc
96
    Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
                20                  25                  30

    tat atg cac tgg gtg aga cag cca cct gga cga ggt ctt gag tgg att
144
    Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
            35                  40                  45

    gga agg att gat cct gcg agt ggc gat act aaa tat gac ccg aag ttc
192
    Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
        50                  55                  60

    cag gtc aga gtg aca atg ctg gta gac acc agc agc aac cag ttc agc
240
    Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn Gln Phe Ser
    65                  70                  75                  80

    ctg aga ctc agc agc gtg aca tct gag gac acc gcg gtc tat tat tgt
288
    Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                    85                  90                  95

    gca gac gga atg tgg gta tca acg gga tat gct ctg gac ttc tgg ggc
336
    Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly
                100                 105                 110

    caa  ggg  acc  acg  gtc  acc  gtc  tcc  tca  ggt  gag  tcc-3'
372
    Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser-C
```

115 120

El constructo KRS comprende las modificaciones adicionales de Arg a Lys (posición 38) y Pro a Arg (posición 40) (Numeración de Kabat). A continuación se indica la secuencia KRS V_H DNA y su secuencia aminoacídica traducida:

```
 5'-atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc tgc ttg ctg gct gta gca cca ggt
48
  N-Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
     1               5                  10                  15

    gcc cac tcc cag gtc caa ctg cag gag agc ggt cca ggt ctt gtg aga
96
    Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg
                20                  25                  30

    cct agc cag acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg tct ggc ttc aac att
144
    Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile
            35                  40                  45

    aaa gac acc tat atg cac tgg gtg aaa cag cga cct gga cga ggt ctt
192
    Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu
        50                  55                  60

    gag tgg att gga agg att gat cct gcg agt ggc gat act aaa tat gac
240
    Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
    65                  70                  75                  80

    ccg aag ttc cag gtc aga gtg aca atg ctg gta gac acc agc agc aac
288
    Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn
                    85                  90                  95

    cag ttc agc ctg aga ctc agc agc gtg aca gcc gcc gac acc gcg gtc
336
    Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
                100                 105                 110

    tat tat tgt gca gac gga atg tgg gta tca acg gga tat gct ctg gac
384
    Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
            115                 120                 125

    ttc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gag tcc-3'
429
    Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser-C
        130                 135                 140
```

El constructo AS comprende la modificación Val a Ala en la posición 24 (Numeración de Kabat). La secuencia AS V_H DNA y su secuencia aminoacídica traducida son:

```
 5'-atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc tgc ttg ctg gct gta gca cca ggt
48
  N-Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
     1               5                  10                  15

    gcc cac tcc cag gtc caa ctg cag gag agc ggt cca ggt ctt gtg aga
96
    Ala His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg
                20                  25                  30

    cct agc cag acc ctg agc ctg acc tgc acc gcg tct ggc ttc aac att
144
    Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
            35                  40                  45

    aaa gac acc tat atg cac tgg gtg aga cag cca cct gga cga ggt ctt
192
    Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
        50                  55                  60

    gag tgg att gga agg att gat cct gcg agt ggc gat act aaa tat gac
240
    Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
    65                  70                  75                  80

    ccg aag ttc cag gtc aga gtg aca atg ctg gta gac acc agc agc aac
288
    Pro Lys Phe Gln Val Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Ser Asn
                    85                  90                  95

    cag ttc agc ctg aga ctc agc agc gtg aca gcc gcc gac acc gcg gtc
336
    Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
                100                 105                 110

    tat tat tgt gca gac gga atg tgg gta tca acg gga tat gct ctg gac
384
    Tyr Tyr Cys Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp
            115                 120                 125

    ttc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gag tcc-3'
429
    Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Ser-C
        130                 135                 140
```

La cadena liviana humanizada generalmente requiere pocas, si es que alguna, modificaciones. Sin embargo, en la preparación de anticuerpos anti-VLA-4 humanizados, varias modificaciones empíricas mejoraron la

actividad inmunológica del anticuerpo respecto de su ligando. Por ejemplo, la cadena pesada humanizada con la mutación Ser con la cadena liviana de murina tuvo una potencia alrededor de 2,5 veces menor que la HP1/2 de murina. La misma cadena pesada humanizada con una cadena liviana humanizada tuvo una potencia aproximadamente 4 veces menor.

Un constructo V_K humanizado (VK1) comprende una sustitución Ser por Asp en la posición 60, y Ser por Tyr en la posición 67. La secuencia DNA y su secuencia aminoacídica traducida son:

```
 5'-atg ggt tgg tcc tgc atc atc ctg ttc ctg gtt gct acc gct acc ggt
48
  N-Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
     1               5                  10                  15

    gtt cac tcc gac atc cag ctg acc cag agc cca agc agc ctg agc gcc
96
    Val His Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
                20                  25                  30

    agc gtg ggt gac aga gtg acc atc acc tgt aag gcc agt cag agt gtg
144
    Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
            35                  40                  45

    act aat gat gta gct tgg tac cag cag aag cca ggt aag gct cca aag
192
    Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
        50                  55                  60

    ctg ctg atc tac tat gca tcc aat cgc tac act ggt gtg cca agc aga
240
    Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg
    65                  70                  75                  80

    ttc agc ggt agc ggt agc ggt acc gac ttc acc ttc acc atc agc agc
288
    Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
                    85                  90                  95

    ctc cag cca gag gac atc gcc acc tac tac tgc cag cag gat tat agc
336
    Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser
                100                 105                 110

    tct ccg tac acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt aag tg-
3' 386
    Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Lys-C
            115                 120                 125
```

Otro constructo V_K (es decir, VK2) tiene las secuencias DQMDY del marco RE1 original restauradas. La secuencia DNA y su secuencia aminoacídica traducida son:

```
 5'-atg ggt tgg tcc tgc atc atc ctg ttc ctg gtt gct acc gct acc ggt
48
  N-Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
     1               5                  10                  15

    gtc cac tcc agc atc gtg atg acc cag agc cca agc agc ctg agc gcc
96
    Val His Ser Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
                20                  25                  30

    agc gtg ggt gac aga gtg acc atc acc tgt aag gcc agt cag agt gtg
144
    Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
            35                  40                  45

    act aat gat gta gct tgg tac cag cag aag cca ggt aag gct cca aag
192
    Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
        50                  55                  60

    ctg ctg atc tac tat gca tcc aat cgc tac act ggt gtg cca gat aga
240
    Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg
    65                  70                  75                  80

    ttc agc ggt agc ggt tat ggt acc gac ttc acc ttc acc atc agc agc
288
    Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
                    85                  90                  95

    ctc cag cca gag gac atc gcc acc tac tac tgc cag cag gat tat agc
336
    Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser
                100                 105                 110

    tct ccg tac acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt aag tg-
3' 386
    Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Lys-C
            115                 120                 125
```

Un tercer constructo V_K es VK3, que tiene SVM versus DQM en el término amino y dos modificaciones más en sus residuos. La secuencia DNA y su secuencia aminoacídica traducida son:

```
 5'-atg ggt tgg tcc tgc atc atc ctg ttc ctg gtt gct acc gct acc ggt
48
  N-Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
     1               5                  10                  15
```

```
    gtc cac tcc gac atc cag atg acc cag agc cca agc agc ctg agc gcc
96
    Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
                20                  25                  30

    agc gtg ggt gac aga gtg acc atc acc tgt aag gcc agt cag agt gtg
144
    Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val
            35                  40                  45

    act aat gat gta gct tgg tac cag cag aag cca ggt aag gct cca aag
192
    Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
        50                  55                  60

    ctg ctg atc tac tat gca tcc aat cgc tac act ggt gtg cca gat aga
240
    Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg
    65                  70                  75                  80

    ttc agc ggt agc ggt tat ggt acc gac ttc acc ttc acc atc agc agc
288
    Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
                85                  90                  95

    ctc cag cca gag gac atc gcc acc tac tac tgc cag cag gat tat agc
336
    Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser
            100                 105                 110

    tct ccg tac acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt aag tg-
3' 386
    Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Lys-C
            115                 120                 125
```

La Patente Estadounidense No. 6.602.503, la cual se incorpora en su totalidad a la presente por referencia, contiene detalles sobre la preparación de cada una de estas secuencias de cadena liviana y pesada. Se pueden preparar diferentes combinaciones de las mencionadas cadenas livianas y pesadas en base a modelos computacionales conocidos en la técnica.

En la técnica se conocen otros anticuerpos que reconocen y se ligan a integrina alfa-4. Estos incluyen, pero no se limitan a, GG5/3 (Keszthelyi *et al.*, *Neurology* 47(4): 1053-1059 (1996)), FW3-218-1 (ATCC No.: HB-261; un anticuerpo de la IgG2b contra la integrina alfa-4 de oveja), y R1-2 (ATCC No.: HB-227; anticuerpo de la IgG2b desarrollado en *Rattus norvegicus*). Ya sea que los anticuerpos se desarrollen en ratones u otros

animales, cada una de las secuencias se puede modificar mediante ingeniería genética de manera que sean humanizadas, en base al estado de conocimiento de la técnica y con la ayuda de modelos computacionales. Luego los anticuerpos de la integrina anti-alfa-4 humanizados se pueden ensayar para determinar su capacidad para promover la remielinización y/o inhibir la remielinización y/o reducir la parálisis en base a los ensayos *in vitro* e *in vivo* descritos en la presente.

5.2. Fragmentos de anticuerpo

Para su uso en el tratamiento de trastornos y enfermedades que involucran desmielinización, también se contemplan los fragmentos de anticuerpo de aquellos anticuerpos que se ligan a la anti-alfa-4 o VCAM-1 de manera tal de inhibir la interacción de la VLA-4 y la VCAM-1. Los fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, $F(ab')_2$, scFv y Fv que se pueden utilizar en las preparaciones aquí descriptas.

De acuerdo con el uso que se le da en la presente, el término "fragmento Fab" se refiere a una molécula de anticuerpo parcial que contiene una sola región de fijación de antígeno, que consiste en una porción tanto de las cadenas livianas como de las cadenas pesada de la molécula.

De acuerdo con el uso que se le da en la presente, el término "fragmento $F(ab')_2$" se refiere a una molécula de anticuerpo parcial que contiene ambas regiones de fijación de antígeno, y que consiste en cadenas livianas y una porción de las cadenas pesadas de la molécula.

De acuerdo con el uso que se le da en la presente, el término "fragmento Fv" se refiere a la porción de la molécula de anticuerpo involucrada en el reconocimiento y la fijación de antígeno.

8·24

De acuerdo con el uso que se le da en la presente, el término " scFv" se refiere a fragmentos Fv (scFv) de cadena simple. Estos fragmentos scFv son derivados de anticuerpo recombinantes que consisten sólo en los dominios variables de las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo conectadas por medio de un linker flexible. Los fragmentos de anticuerpo scFv comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, estando estos dominios presentes en una cadena polipeptídica simple. En general, el polipéptido Fv comprende además un grupo de fijación entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para fijación de antígeno. Para una descripción detallada del scFv ver Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, 269-315 (Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York 1994).

Entre los fragmentos de anticuerpo también se incluyen los "diacuerpos". El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de fijación de antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena liviana (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H -V_L). Usando un grupo de fijación ("linker") que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de fijación de antígeno. Los diacuerpos se describen en mayor profundidad, por ejemplo, en EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-8.

Los fragmentos de anticuerpo también incluyen los anticuerpos lineales. De acuerdo con el uso que se le da en la presente, la expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descriptos, por ejemplo, en Zapata *et*

al., 1995 *Protein Eng.* 8(10): 1057-62. En pocas palabras, estos anticuerpos comprenden un par de fragmentos Fd en tandem (V_H -C_H1-V_H -C_H1), los cuales forman un par de regiones de fijación de antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

La digestión de los anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de fijación de antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno de ellos con un único sitio de fijación de antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. Mediante tratamiento con pepsina se obtiene un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y que aún es capaz de formar un enlace cruzado con el antígeno.

Anteriormente se han descripto varios anticuerpos monoclonales anti-VLA-4 de ratón. Ver, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 6.602.503, 6.033.665 y 5.840.299, las cuales se incorporan a la presente en su totalidad por referencia; Sanchez-Madrid *et al.*, 1986, *Eur. J. Immunol.* 16: 1343-9; Hemler *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 11478-85; Pulido *et al.*, 1991, *J. Biol. Chem.*, 266: 10241-45; Issekutz *et al.*, 1991, *J. Immunol.*, 147: 109 (TA-2 MAb)). Estos anticuerpos monoclonales anti-VLA-4 y otros anticuerpos anti-VLA-4 (por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5.888.507- Biogen, Inc. y las referencias allí citadas) capaces de reconocer la cadena alfa y/o beta de la VLA-4 serán útiles en los métodos de tratamiento de acuerdo con la presente invención. Se prefieren los anticuerpos anti-VLA-4 que reconocerán los epitopos de las cadenas alfa-4 de la VLA-4 involucrados en la unión a VCAM-1 y ligandos fibronectina (es decir, anticuerpos que se pueden unir a VLA-4 en un sitio que participa en el reconocimiento de ligandos y bloquea la fijación de VCAM-1 y

fibronectina. Estos anticuerpos han sido definidos como anticuerpos específicos de epitopo B (B1 o B2) (Pulido *et al.*, 1991, *supra*) y también son anticuerpos anti-VLA-4 de acuerdo con la presente invención.

Los homólogos de anticuerpos monoclonales contra la VLA-4 totalmente humanos son otro agente de fijación preferidos que puede bloquear o recubrir los ligandos de la VLA-4 en el método de la invención. En su forma intacta, éstos se pueden preparar utilizando esplenocitos humanos cebados *in vitro*, como se describe en Boerner *et al.*, 1991, *J. Immunol.*, 147: 86-95. Alternativamente, se pueden preparar por clonación de repertorio, según se describe en Persson *et al.*, 1991, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 88: 2432-36 o en Huang *et al.*, 1991, *J. Immunol. Meth.*, 141: 227-236. La Patente Estadounidense No. 5.798.230 (25 de Agosto de 1998, "Procedimiento para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos y sus usos") describe la preparación de anticuerpos monoclonales humanos a partir de células B humanas. De acuerdo con este procedimiento, las células B humanas que producen anticuerpos se inmortalizan mediante infección con un virus de Epstein-Barr, o uno de sus derivados, que expresa el antígeno nuclear 2 del virus de Epstein-Barr (EBNA2). Luego la función del EBNA2, requerida para la inmortalización, se desactiva y esto da por resultado un aumento de la producción de anticuerpo. Hay otros métodos adicionales conocidos en la técnica.

Otro método para producir anticuerpos totalmente humanos se describe, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 5.789.650, la cual describe animales transgénicos no humanos capaces de producir anticuerpos heterólogos y animales transgénicos no humanos que tienen genes de inmunoglobulina endógena inactivados. Los genes de inmunoglobulina

endógena son suprimidos por polinucleótidos anti-sentido y/o por antisuero dirigido contra las inmunoglobulinas endógenas. Los anticuerpos heterólogos son codificados por genes de la inmunoglobulina que normalmente no se encuentran en el genoma de dicha especie de animal no humano. Se introducen uno o más transgenes que contienen secuencias de cadenas pesadas de inmunoglobulina humana heteróloga no reordenadas en un animal no humano, creando así un animal transgénico capaz de reordenar funcionalmente las secuencias de la inmunoglobulina transgénica y producir un repertorio de anticuerpos de diferentes isotipos codificados por los genes de la inmunoglobulina humana. Tales anticuerpos humanos heterólogos se producen en células B, las cuales luego se inmortalizan, por ejemplo, por fusión con una línea celular inmortalizante tal como un mieloma o manipulando tales células B mediante otras técnicas para perpetuar una línea celular capaz de producir un homólogo de anticuerpo monoclonal, heterólogo, totalmente humano. También se pueden usar librerías de anticuerpos humanos no inmunizados en sistemas de despliegue en fagos para aislar anticuerpos de alta afinidad los cuales se pueden desarrollar como terapéuticas humanas empleando la tecnología de despliegue en fagos estándar. Luego de los primeros métodos para la preparación de verdaderos "anticuerpos quiméricos" (es decir, aquellos en los cuales las regiones constantes completas y las regiones variables completas se derivan de diferentes fuentes), un nuevo método fue descripto en EP 0239400 (Winter *et al.*) en el cual los anticuerpos eran alterados por sustitución (dentro de una región variable dada) de sus regiones determinantes de la complementariedad (CDR) para una especie por aquellas de otra. Este procedimiento se puede usar, por ejemplo, para

sustituir las CDR de los dominios de región variable de la Ig de cadena pesada y liviana humana por otras CDR alternativas de los dominios de región variable de la murina. Estas regiones variables de la Ig alteradas luego se pueden combinar con regiones constantes de la Ig humana para crear anticuerpos, los cuales son totalmente humanos en sus composición excepto por las CDR de murina sustituidas. Se predice que será menos probable que tales provoquen una respuesta inmunológica en los humanos que los verdaderos anticuerpos quiméricos, ya que los anticuerpos CDR-sustituidos contienen considerablemente menos componentes no humanos. El procedimiento para humanizar anticuerpos monoclonales mediante "transplante" de CDR se ha dado en llamar "humanización" (Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332: 323-7; y Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* 239: 1534-6).

5.3. Purificación de Anticuerpos

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplasmático, o directamente secretado en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primer paso, se retiran los restos particulados, ya sean células huésped o fragmentos lisados, por ejemplo por centrifugado o ultrafiltración. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-7 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos, que son secretados en el espacio periplasmático de *E. coli*. En pocas palabras, se descongela pasta celular en presencia de acetato de sodio (pH 3.5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante alrededor de 30 min. Los restos celulares se pueden eliminar por centrifugado. Cuando el anticuerpo es secretado al medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión generalmente primero se

concentran usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon u Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como el PMSF en cualquiera de los pasos anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes accidentales.

La preparación de anticuerpos preparada a partir de las células preferentemente se somete a al menos una etapa de purificación antes de la LPHIC. Los ejemplos de etapas de purificación adecuadas incluyen la cromatografía en columna de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La adecuabilidad de una proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar los anticuerpos que se basan en cadenas pesadas humanas γ1, γ2, o γ4 (Lindmark *et al.*, 1983 *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para γ3 humana (Guss *et al.*, 1986 *EMBO J.* 5: 1567-75). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad es más frecuentemente la agarosa, pero también hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables tales como el vidrio poroso controlado o el poli(estirenodivinil)benceno permite mayores tasas de flujo y menores tiempos de procesamiento que los que se pueden lograr con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para su purificación. También hay otras técnicas disponibles para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de

intercambio iónico, precipitación en etanol, cromatografía en fase inversa HPLC, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEFAROSA™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de afinidad, SDS-PAGE y precipitación en sulfato de amonio, dependiendo del anticuerpo a recoger.

Luego de la etapa o las etapas de purificación preliminares, la mezcla que contiene el anticuerpo de interés y contaminante(s) se somete a LPHIC. A menudo, la composición del anticuerpo a purificar estará presente en un tampón de la etapa de purificación previa. Sin embargo, puede ser necesario añadir un tampón a la composición del anticuerpo antes de la etapa de LPHIC. Hay numerosos tampones disponibles y éstos se pueden seleccionar mediante experimentos rutinarios. El pH de de la mezcla que contiene el anticuerpo a purificar y al menos un contaminante en un tampón cargado se ajusta a un pH de alrededor de 2.5 a 4.5 usando un ácido o una base, dependiendo del pH inicial. Preferentemente, el tampón cargado tiene una baja concentración de sal (es decir, menos que alrededor de 0,25 M de sal).

La mezcla se carga en la columna de HIC. Las columnas de HIC normalmente comprenden una matriz base (por ejemplo, agarosa con enlaces cruzados o material copolimérico sintético), a la cual se acoplan ligandos hidrófobos (por ejemplo, grupos alquilo o arilo). Una columna de HIC preferida comprende una resina de agarosa sustituida por grupos fenilos (por ejemplo, una columna de Fenil SEFAROSA™). Hay numerosas columnas de HIC disponibles comercialmente. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, columna de Fenil SEFAROSA™ 6 FAST

831

FLOW™ de baja o alta sustitución (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); columna de Fenil SEFAROSA™ de Alto Rendimiento (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); columna de Octil SEFAROSE™ de Alto Rendimiento (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); columnas de FRACTOGEL™ EMD Propilo o FRACTOGEL™ EMD Fenilo (E. Merck, Alemania); Soportes de MACRO-PREP™ Metilo o MACRO-PREP™ t-Butilo (Bio-Rad, California); columna de WP HI-Propilo (C_3)™ (J. T. Baker, New Jersey); y columnas de TOYOPEARL™ éter, fenilo o butilo (TosoHaas, PA).

El anticuerpo es eluido de la columna usando un tampón de elución, el cual normalmente es igual al tampón de carga. El tampón de elución se puede seleccionar mediante experimentos rutinarios. El pH del tampón de elución está comprendido entre 2,5 y 4,5 y tiene una baja concentración de sal. Se ha descubierto que no es necesario utilizar un gradiente de sal para eluir el anticuerpo de interés; el producto deseado se recoge en la fracción que fluye a través de la columna, la cual no se une significativamente a la misma.

La etapa de LPHIC provee un medio para separar un anticuerpo correctamente plegado y ligado a disulfuro de los contaminantes no deseados (por ejemplo, fragmentos livianos y pesados asociados de forma incorrecta). En particular, el método provee una manera de separar sustancialmente una impureza caracterizada en la presente como un fragmento de anticuerpo correctamente plegado cuyas cadenas livianas y pesadas no se asocian por enlaces disulfuro.

Las formulaciones de uso diagnóstico o terapéutico de la proteína purificada se pueden elaborar proveyendo la composición del anticuerpo en

forma de un vehículo fisiológicamente aceptable, ejemplos de los cuales se presentan a continuación.

Para retirar los contaminantes (por ejemplo anticuerpo no plegado y fragmentos livianos y pesados incorrectamente asociados) de la columna de HIC de manera que pueda ser reutilizado, se puede hacer pasar a través de la columna una preparación que incluya urea (por ejemplo, 6.0 M de urea, 1% de tampón MES pH 6.0, 4 mM sulfato de amonio). También hay otros métodos conocidos en la técnica.

5.4. Formulaciones de Inmmunoglobulina

Los anticuerpos e inmunoglobulinas que tienen el efecto terapéutico deseado se pueden administrar a un sujeto en un vehículo fisiológicamente aceptable. Los anticuerpos se pueden administrar en una variedad de maneras diferentes incluyendo, pero no limitadas a, administración parenteral, incluyendo la administración subcutánea, subdural, intravenosa, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial, o por vías de administración intralesional, localizada (por ejemplo, aplicación quirúrgica o supositorio quirúrgico), y pulmonar (por ejemplo, aerosoles, inhalación o polvo) como se describe en párrafos posteriores.

Dependiendo del modo de introducción, las inmunoglobulinas se pueden formular de diferentes maneras. La concentración de inmunoglobulina terapéuticamente activa en la formulación (es decir, una formulación suficiente para inhibir la desmielinización y/o promover la remielinización puede variar entre alrededor de 1 mg/ml y 1 g/ml. Preferentemente, la composición de inmunoglobulina, al ser administrada a un sujeto que la necesita, hace que en el sujeto el nivel en sangre de inmunoglobulina llegue a alrededor de 10 ng/ml o más.

Preferentemente, la inmunoglobulina se formula para su administración parenteral en un vehículo inerte adecuado, tal como una solución salina fisiológica estéril. Por ejemplo, la concentración de inmunoglobulina en la solución vehículo típicamente está comprendida entre alrededor de 1 y 100 mg/ml. La dosis administrada será determinada por la vía de administración. Las vías de administración preferidas incluyen la administración parenteral o intravenosa.

Para su administración parenteral, los anticuerpos de la invención se pueden administrar en forma de dosis inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un disolvente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua y aceites y con o sin adición de un tensoactivo, y otras preparaciones farmacéuticas son aquellas de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético. En general, los glicoles tales como el propilenglicol o el polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para las soluciones inyectables. Los anticuerpos de esta invención se pueden administrar en forma de una inyección depot o una preparación para implante, que se pueden formular de manera que permitan la liberación sostenida del principio activo. Una preparación preferida comprende un anticuerpo monoclonal a una concentración de 5 mg/mL, formulada en un tampón acuoso compuesto por 50 mM L-histidina, 150 mM NaCl, ajustado a pH 6.0 con HCl.

Una dosis terapéuticamente efectiva es una dosis efectiva para producir una disminución significativa de la desmielinización y un aumento notable de la remielinización. Preferentemente, la cantidad es suficiente para

producir en un sujeto una cantidad de remielinización estadísticamente significativa.

De acuerdo con una importante característica de la invención, una inmunoglobulina que reconoce y se liga a VLA-4 se puede administrar sola, o en combinación con un agente anti-inflamatorio, que típicamente se utiliza para tratar trastornos y enfermedades asociadas con la desmielinización. La administración de los agentes anti-inflamatorios se puede hacer antes, durante o después de la administración de la inmunoglobulina.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o inmunoglobulina remielinizante, por ejemplo, natalizumab, se puede estimar por comparación con las dosis efectivas establecidas para los anticuerpos conocidos, considerándolas junto con los datos obtenidos para natalizumab tanto en modelos *in vivo* como en modelos *in vitro*. Preferentemente los datos se obtienen de estudios de la inhibición de la desmielinización. Como es sabido en la técnica, puede ser necesario realizar ajustes a la dosis debido a la degeneración o metabolización de la inmunoglobulina, administración sistémica y no localizada, así como también dependiendo de la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo, dieta, tiempo de administración, interacciones con otros fármacos y la gravedad de la condición del sujeto al cual se administra la inmunoglobulina. Los expertos en la técnica podrán realizar estos ajustes y determinar dosis adecuadas por medio de experimentaciones rutinarias.

Las formulaciones terapéuticas de la inmunoglobulina se preparan para su almacenamiento mezclando la inmunoglobulina que tiene el grado de pureza deseado con vehículos fisiológicamente aceptables, excipientes o

935

estabilizadores opcionales(*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16° ed., A. Osol, Ed., 1980 y ediciones más recientes), en forma de tortas liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables para la inmunoglobulina son no tóxicos, no terapéuticos y/o no inmunogénicos para los recipientes en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como suero albúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como la polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como la glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo la glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como el EDTA; alcoholes de azúcares tales como el manitol o sorbitol; contra-iones formadores de sales tales como el sodio; y/or tensoactivos no iónicos tales como Tween, Pluronics o polietilenglico (PEG). Los ejemplos específicos de las moléculas del vehículo incluyen, pero no se limitan a, glicosaminoglicanos (por ehemplo, sulfato de heparina), ácido hialurónico, keratan-sulfato, condroitin 4-sulfato, condroitin 6-sulfato, heparan sulfato y dermatin sulfate, perlecan y pentopolisulfato.

Las preparaciones farmacéuticas que comprenden inmunoglobulinas también pueden incluir, si se desea, vehículos o disolventes farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, los cuales son vehículos habitualmente utilizados para formular preparaciones farmacéuticas para administración a animales o humanos. El disolvente se selecciona de manera que no afecte la actividad biológica de la combinación. Los

ejemplos incluyen, pero no se limitan a, agua destilada solución fisiológica tamponada con fosfato, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank.

Los agentes de la invención se pueden formular en preparaciones para inyección disolviendo, suspendiendo o emulsionándola en un diluyente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales o similares, glicéridos de ácido alifático sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos de alto peso molecular o propilenglicol. Las formulaciones también pueden contener aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservantes.

Las inmunoglobulinas también se pueden usar en formulaciones en aerosol para su administración por inhalación o pulmonar. Los agentes de la presente invención se pueden formular en propelentes presurizados aceptables tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

La inmunoglobulina también se puede encerrar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de co-acervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-metilmetacilato), en sistemas de administración coloidal de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Estas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra.*

La inmunoglobulina a utilizar para administración *in vivo* debe ser estéril. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estéril, antes o después de la liofilización y reconstrucción. La

inmunoglobulina generalmente se almacenará en forma liofilizada o en solución.

Las preparaciones terapéuticas de inmunoglobulina generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa para solución intravenosa o un frasco que tenga un tapón que se pueda perforar con la aguja de una jeringa hipodérmica u otro elemento similar

Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen las matrices semi-permeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la proteína, matrices que tienen la forma de por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen los poliésteres, los hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) según se describe en Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277 (1981) y en Langer, *Chem. Tech.* 12: 98-105 (1982) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente Estadounidense No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gama etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, *Biopolymers* 22: 547-556, 1983), vinil acetato de etileno no degradable (Langer *et al.*, *supra*), copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (es decir microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico y ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988).

Aunque los polímeros tales como el vinil acetato de etileno y el ácido láctico-ácido glicólico permiten liberar moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo, éstos se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la

exposición a humedad a 37°C., provocando una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios de la inmunogenicidad. Se pueden desarrollar estrategias racionales para estabilizar una inmunoglobulina dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de un enlace S-S intermolecular por medio de intercambios tiol-disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones acídicas, controlando el contenido de humedad, empleando aditivos adecuados, desarrollando preparaciones de matriz de polímero específicas, y similares.

Las preparaciones de inmunoglobulina de liberación sostenida también incluyen la inmunoglobulina atrapada liposomalmente. Los liposomas que contienen la inmunoglobulina se preparan mediante métodos conocidos. Ver, por ejemplo, Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3688-92 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4030-4 (1980); Patentes Estadounidenses Nos. 4.485.045; 4.544.545; 6.139.869; y 6.027.726. Generalmente los liposomas son de tipo unilamelar pequeño (alrededor de 200 a 800 Angstroms), en los cuales el contenido lipídico es mayor que alrededor de 30 por ciento en moles (mol. %) de colesterol; la porción seleccionada se ajusta para la terapia de inmunoglobulina óptima.

Las inmunoglobulinas de esta invención se pueden administrar en una forma de liberación sostenida, por ejemplo, una inyección depot, implantes o bomba osmótica, que se pueden formular de manera tal de permitir una liberación sostenida del principio activo. Los implantes para las formulaciones de liberación sostenida son conocidas en la técnica. Los implantes se formulan como esferas, escamas, etc., con polímeros

biodegradables o no biodegradables. Por ejemplo, los polímeros de ácido láctico y/o ácido glicólico forman un polímero erosionable que es bien tolerado por el huésped. El implante se coloca próximo al sitio de depósitos de proteína (por ejemplo, el sitio de formación de depósitos amiloideos asociados con los trastornos neurodegenerativos), de manera que la concentración de ingrediente activo es mayor en dicho sitio en relación con el resto del cuerpo.

Además, se pueden proveer inmunoglobulinas que previenen la desmielinización y/o inducen la remielinización administrando a un sujeto un polinucleótido que codifique un anticuerpo completo o parcial (por ejemplo un Fv de cadena simple). El polinucleótido se administra en un vehículo adecuado para permitir la expresión de la inmunoglobulina en el sujeto en una cantidad terapéuticamente efectiva.

Una dosis diaria típica para las inmunoglobulinas puede estar comprendida entre alrededor de 1 μg/kg y alrededor de 10 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados en la presente. Típicamente, el médico administrará inmunoglobulina hasta llegar a una dosis con la cual se logra el efecto deseado. El progreso de esta terapia se puede monitorear fácilmente mediante pruebas convencionales.

Un formulación de anticuerpo o fragmento de anticuerpo "estable" es una en la cual la proteína esencialmente mantiene su estabilidad física y/o su estabilidad química y/o su actividad biológica cuando es almacenada. Existen diferentes técnicas analíticas para medir la estabilidad de las proteínas disponibles en la técnica, las cuales se describen en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, (Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. 1991) y A. Jones, *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-

840

90 (1993), por ejemplo. La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. Preferentemente, la formulación es estable a temperatura ambiente (altededor de 30°C) o a alrededor de 40°C durante al menos un mes y/o es estable a alrededor de 2 a 8°C durante un período de entre menos un año y alrededor de dos años. Además, la formulación preferentemente es estable luego de congelamiento (a por ejemplo, -70°C) y deshielo de la formulación.

Una proteína "mantiene su estabilidad física" en una preparación farmacéutica si no muestra señales de agregación, precipitación y/o desnaturalización al ser examinados visualmente su color y/o translucidez, o según se mide mediante dispersión de luz ultravioleta o mediante cromatografía por exclusión de tamaño.

Una proteína "mantiene su estabilidad química" en una preparación farmacéutica si la estabilidad química en un momento dado es tal que se considera que la proteína aún retiene su actividad biológica según se define a continuación. La estabilidad química se puede evaluar detectando y cuantificando las formas químicamente alteradas de la proteína. La alteración química puede involucrar modificaciones del tamaño (por ejemplo, recortado) que se pueden evaluar por cromatografía por exclusión de tamaño, SDS-PAGE y/o espectrometría de masas con ionización por desorción de láser asistida por matriz en tiempo de vuelo (MALDI/TOF MS), por ejemplo. Otros tipos de alteraciones químicas incluyen las alteraciones de la carga (por ejemplo, las que ocurren como resultado de la deamidación), las cuales se pueden evaluar, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico.

Una inmunoglobulina "mantiene su actividad biológica" en una preparación farmacéutica si la actividad biológica de la inmunoglobulina en un momento dado no difiere en más del 10% (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica exhibida en el momento en que se preparó la preparación farmacéutica, según se determina mediante una prueba de fijación de antígeno, por ejemplo.

5.5. Vías de Administración de las Preparaciones de Inmunoglobulina

Como se discutió brevemente en párrafos anteriores, las preparaciones farmacéuticas antes discutidas se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos de la esclerosis múltiple u otros trastornos relacionados con la desmielinización. En las aplicaciones terapéuticas, las preparaciones se administran a un paciente del cual se sospecha, o que ya padece, una enfermedad tal como la esclerosis múltiple, en una cantidad suficiente para promover la remielinización. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una dosis terapéutica o farmacéuticamente efectiva.

Las preparaciones farmacéuticas se administrarán por vía parenteral, tópica, intravenosa, oral, o subcutánea, administración intramuscular localizada, tal como mediante un aerosol o por vía transdermal, y para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. Aunque las sustancias proteináceas de la presente invención pueden sobrevivir el paso a través del intestino luego de la administración oral (p.o.), se prefieren las vías subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.), administración intraperitoneal por inyección depot; o implantes.

Las preparaciones farmacéuticas se pueden administrar en una variedad de formas de dosificación unitarias dependiendo del método de

administración. Por ejemplo, las formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración incluyen los polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas y grageas.

Las dosis efectivas de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de los trastornos antes descriptos, dependerán de numerosos factores, incluyendo el modo de administración, el sitio meta, el estado fisiológico del paciente y otros medicamentos administrados. Por lo tanto, las dosis de tratamiento se deberán titular para optimizar su seguridad y eficacia. Estas preparaciones se pueden administrar para uso veterinario en mamíferos, y para uso clínico en humanos de manera similar a otros agentes terapéuticos, por ejemplo, en un vehículo fisiológicamente aceptable. En general, la dosis de administración estará comprendida entre alrededor de 0.0001 y 100 mg/kg, y más habitualmente de 0.01 a 0.5 mg/kg de peso corporal del huésped.

En un régimen de tratamiento preferido, el anticuerpo se administra mediante infusión intravenosa o inyección subcutánea de 1 a 5 mg de anticuerpo por kilogramo de peso corporal del paciente. La dosis se repite a intervalos de entre 2 y 8 semanas. Dentro de este rango, el régimen de tratamiento preferido es de 3 mg de anticuerpo por kilogramo de peso corporal repetido a intervalos de cuatro semanas.

6. Combinaciones de Fármacos

Como se dijo anteriormente, no se ha identificado que ninguno de los fármacos o combinaciones de fármacos previamente descriptos detengan la pérdida progresiva de la función neurológica para las enfermedades desmielinizantes. Existían algunos fármacos que suprimían la inflamación inmune-mediada y que también pueden disminuir la tasa de recaída de la

esclerosis múltiple. Estos y otros fármacos usados para tratar los síntomas asociados con la esclerosis múltiple y los trastornos y enfermedades asociados con la desmielinización también se contemplan para su uso con los compuestos y preparaciones descriptos en la presente. La selección de uno o más agentes a utilizar en un cóctel y/o combinaciones con los compuestos y preparaciones descriptos en la presente dependerá del manejo de la enfermedad. Por ejemplo, en la esclerosis múltiple, el manejo de la enfermedad se puede categorizar en dos grupos: (1) tratamiento diseñado para detener la evolución de la enfermedad, y (2) manejo de los síntomas. En la categoría (D) se pueden utilizar diferentes combinaciones de fármacos. Por ejemplo, los compuestos y preparaciones descriptos en la presente se pueden administrar con agentes inmunosupresores para inhibir aún más el influjo de células inmunes y en consecuencia la actividad desmielinizante. Por ejemplo, se pueden utilizar inmunosupresores tales como los corticoesteroides.

Los agentes remielinizantes (por ejemplo, anticuerpos anti-integrina alfa-4, pequeños compuestos antagonistas de la integrina alfa-4 y similares) se pueden combinar con otros compuestos o composiciones usados para tratar, aliviar o paliar los síntomas asociados con los trastornos o enfermedades desmielinizantes.

Otros agentes utilizados para tratar, aliviar o paliar los síntomas asociados con los trastornos o enfermedades desmielinizantes, incluyendo la esclerosis múltiple, incluyen pero no se limitan a: relajantes musculares (*por ejemplo*, diazepam, ciclobenzaprina, clonazepam, clonidina, primidona y similares), anticolinérgicos (*por ejemplo*, propantelina, diciclomina y similares), estimulantes del sistema nervioso central (*por ejemplo*,

pemolina), agentes anti-inflamatorios no esteroides (NSAIDs tales como ibuprofeno, naproxeno y cetoprofeno), interferones, globulina inmune, glatiramer (Copaxona®), mitoxantrona (Novantrona®), misoprostol, inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (*por ejemplo*, pirfenidona, infliximab y similares) y corticoesteroides (*por ejemplo*, glucocorticoides y mineralocorticoides).

Los agentes comunes para el tratamiento de la esclerosis múltiple incluyen interferón beta-1b (Betaserón®), interferón beta-1a (Avonex®), interferón beta-1a de dosis elevada (Rebif®), glatiramer (Copaxona®), inmunoglobulina, mitoxantrona (Novantrona®), corticoesteroides (*por ejemplo*, prednisona, metilprednisolona, dexametasona y similares). También se pueden utilizar otros corticoesteroides los cuales incluyen pero no se limitan a cortisol, cortisona, fludrocortisona, prednisolona, 6α-metilprednisolona, triamcinolona y betametasona.

Las formas de dosificación de los agentes a utilizar en combinación con los compuestos y preparaciones aquí descriptos variarán dependiendo del sujeto y de la combinación de fármacos utilizada. Por ejemplo, los interferones típicamente se administran de la siguiente manera: del Interferón beta-1a (Avonex®) se administran 30 μg una vez por semana; del interferón beta-1a se administran entre alrededor de 22 μg y 44 μg tres veces por semana; y del interferón beta-1b (Betaseron®) se administran 250 μg día de pór medio (Durelli *et al.*, *Lancet* 359: 1453-60, 2002). Típicamente los interferones se administran para la esclerosis múltiple tipo recaída-remisión. Así, en combinación con los agentes remielinizantes descriptos en la presente, los rangos de interferones preferidos pueden incluir alrededor de 0,1 μg a alrededor de 250 μg y más preferentemente de

alrededor de 0,5 μg a alrededor de 50 μg, dependiendo del modo de administración del agente en combinación con los otros compuestos y preparaciones remielinizantes descriptos en la presente.

Los anti-inflamatorios no eteroides (NSAIDs) contemplados para utilizar con esta invención incluyen pero no se limitan a los inhibidores COX no selectivos y los inhibidores COX-2 selectivos. Los inhibidores COX no selectivos incluyen, pero no se limitan a, los derivados del ácido salicílico (por ejemplo aspirina, salicilatos de sodio, trisalicilato de colina y magnesio, salsalato, diflunisal, sulfasalazina y olsalazina), derivados del para-aminofenol (por ejemplo, acetaminofeno), indole y ácidos acéticos de indeno (por ejemplo, tolmetina, diclofenac y cetorolac), ácidos heteroaril acéticos (por ejemplo, abuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, cetoprofeno, fenprofeno y oxaprozina), ácidos o fanamatos antranílicos (por ejemplo, ácido mefenámico y ácido meclofenámico), ácidos enólicos (por ejemplo, oxicamas tales como piroxicam y meloxicam) y alcanonas (por ejemplo, nabumetona). Los inhibidores COX-2 selectivos incluyen las furanonas diaril-sustituidas (por ejemplo, rofecoxib), pirazolas diaril-sustituidas (por ejemplo, celecoxib), ácidos acéticos de indole (por ejemplo, etodolac), y sulfonanilidas (por ejemplo, nimesulida).

Algunas veces se administran NS /no esteroides/ en combinación con el interferón para disminuir los síntomas similares a los de la gripe que experimentan los pacientes que reciben, por ejemplo, Avonex®. Los NS habituales incluyen el naproxeno, ibuprofeno y cetoprofeno. También el paracetamol se administra frecuentemente a los pacientes. Ver, Reess *et al.*, 2002 *Mult. Scler.* 8: 15-8.

El acetato de glatiramer (GA, Copaxona®) es una molécula sintética que inhibe la activación de las células T reactivas a la proteína básica de la mielina e induce un repertorio de células T caracterizado por efectos anti-inflamatorios.

Además, el glatiramer puede acceder al sistema nervioso central (CNS), mientras que los interferones beta no pueden hacerlo (Dhib-Jalbut, 2002 *Neurology* 58: S3-9; Weinstock-Guttman *et al.*, 2000 *Drugs* 59: 401-10).

La mitoxantrona es un agente sintético de antracenediona, que ha probado ser efectivo para el tratamiento de la esclerosis múltiple secundaria progresiva (SP-MS). Sin embargo, el uso de este fármaco también está limitado por su cardiotoxicidad acumulativa (Weinstock-Guttman *et al.*, 2000).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) puede ser una citocina clave en la desmielinización (Walker *et al.*, 2001 *Mult. Scler.* 7: 305-12). Así, el uso de agentes que antagonizan la function de la TNF-α o inhiben su síntesis pueden ser útiles en combinación con los agentes y compuestos aquí descriptos. Estos pueden incluir los anticuerpos anti-TNF-α (*por ejemplo*, infliximab) y también agentes tales como la pirfenidona. La pirfenidona es un fármaco no peptídico, el cual se ha probado que reduce la síntesis de TNF-α y bloquea receptores para la TNF-α. *Id.*

La práctica habitual en la mayoría de los trastornos y enfermedades desmielinizantes ha consistido en utilizar ACTH, glucocorticoides y corticoesteroides. Estos agentes se emplean por sus efectos anti-edema y anti-inflamatorios. La ACTH habitualmente se administra a un sujeto a 80 U en forma introvenosa en 500 mL de dextrose al 5% y agua durante 6 a 8 horas durante tres días. También se puede administrar a 40 U/ml

intramuscularmente en una dosis de 40 U cada 12 horas durante 7 días, posteriormente reduciendo la dosis cada tres días. Ver S. Hauser, "Esclerosis múltiple and other demyelinating diseases," en *Harrison's Principles of Internal Medicine* 2287-95 (13° ed., Isselbacher *et al.*, ed. 1994). La metilprednisolona típicamente se administra lentamente en 500 ml D5W durante el transcurso de 6 horas, preferentemente por la mañana. Las dosis habituales incluyen 1000 mg diarios durante 3 dísa, 500 mg diarios durante 3 días y 250 mg diarios durante 3 días. *Id.* También es habitual la administración de una combinación metilprednisolona-prednisona. Típicamente, se administran 1000 mg metilprednisolona de forma intravenosa durante el transcurso de tres días, seguido de prednisona oral en una dosis de 1 mg/kg por día durante 14 días. En consecuencia, para su uso en combinación con los compuestos y formulaciones descriptos en la presente, los esteroides se pueden administrar en cantidades comprendidas entre alrededor de 1 y alrededor de 1000 mg/kg durante un período de entre alrededor de 1 y 14 días, según sea necesario.

Un efecto secundario en los trastornos desmielinizantes tal como la MS es la fatiga y la función cognitiva disminuida. Frecuentemente se han usado agentes tales como el hidrocloruro de amantadina y pemolina para tratar la fatiga asociada con la MS (Geisler *et al.*, 1996 *Arch. Neurol.* 53: 185-8).

El beneficio de tales terapias de combinación es que pueden disminuir los efectos secundarios específicos de la clase y específicos del agente que actualmente se presentan con algunos de los fármacos. Los efectos secundarios específicos del interferón-beta incluyen fiebre, temblores fríos, mialgias, antralgias y otros síntomas similares a los de la gripe que comienzan de 2 a 6 horas post-inyección. Ocasionalmente el interferón-beta

también provoca un empeoramiento transitorio de los síntomas preexistentes de la MS. Los efectos secundarios específicos del agente incluyen reacciones en el sitio donde se inyecta el interferón beta-1b. Estos efectos se pueden manejar personalizando la dosis y el tiempo de administración, prescribiendo combinaciones adecuadas de acetaminofeno, fármacos anti-inflamatorios no esteroides (NSAIDs) y esteroides. Ver, Munschauer *et al.*, 1997 *Clin. Ther.* 19: 883-93.

Por lo tanto, las combinaciones de fármacos que pueden disminuir la cantidad de un fármaco particular administrado también pueden reducir los efectos secundarios adversos experimentados por un paciente.

Cuando se administran en combinación, los agentes remielinizantes de compuesto pequeño se pueden administrar en la misma formulación que estos otros compuestos o preparaciones, o bien en una formulación separada. Cuando se administran en combinación, las inmunoglobulinas remielinizantes generalmente se administran en una formulación separada de los demás compuestos y preparaciones. Cuando se administran en combinación, los agentes remielinizantes se pueden administrar antes, después o durante la administración de otros compuestos y preparaciones usados para tratar, aliviar o paliar los síntomas.

7. **Regímenes de Administración Crónicos**

El régimen de tratamiento crónico de la presente invención contempla un agente integrina alfa-4 (por ejemplo, molécula pequeña o inmunoglobulina) en un nivel que mantenga una saturación de los receptores suficiente para suprimir la inflamación patológica en un paciente que la necesita. Los métodos de la invención implican la administración una vez cada dos semanas o una vez cada dos meses, repitiendo las dosis durante un período

de al menos seis meses, más preferentemente durante un año o más. Los métodos de la invención implican obtener y mantener en un paciente humano un nivel de saturación de los receptores con un dímero que contiene integrina alfa-4 (por ejemplo, VLA-4) en un rango de entre alrededor de 65% y 100%, más preferentemente de entre 75%, y 100%, y aún más preferentemente de entre 80 y 100%. Estos niveles de saturación de receptores se mantienen de forma crónica (por ejemplo, durante un período de aproximadamente seis meses) para permitir la supresión continua de la inflamación patológica.

En una realización específica, el agente remielinizantes es un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo humanizado o humano, y la dosis se administra en forma mensual. En otra realización específica, el agente remielinizante es un compuesto de las Fórmulas I, IA, IB, IC, II, IIA o IIB definidas anteriormente. Los niveles de saturación de los receptores se pueden monitorear para determinar la eficacia del régimen de dosificación, y se pueden medir marcadores fisiológicos para confirmar el éxito del régimen de dosificación. A modo de confirmación, se pueden monitorear los niveles en suero del anticuerpo para identificar que esté libre del anticuerpo y para determinar el potencial efecto de la vida media sobre la eficacia del tratamiento.

Para un tratamiento con un agente de la presente invención, la dosis está comprendida entre alrededor de 0.0001 y 100 mg/kg, y más habitualmente entre 0.01 y 5 mg/kg del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal. La dosis y la frecuencia de administración varían dependiendo de la vida media del agente en el paciente. La dosis y la frecuencia de administración

pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Para la administración de inmunoglobulina, cada dosis de inyección generalmente es de entre 2.0 y 8.0 mg/kg. Para la administración de un compuesto, cada dosis de inyección generalmente es de entre1.0 to 50.0 mg/kg. De acuerdo con lo descripto en la presente, las dosis efectivas se pueden monitorear obteniendo una muestra de fluido de un paciente. Para ello, generalmente se toma una muestra de suero sanguíneo o fluido cerebroespinal y se determina la saturación de los receptores con integrina usando métodos conocidos en la técnica. Idealmente, se toma una muestra antes de la dosis inicial, y luego se toman muestras y se las analiza antes y/o después de cada tratamiento.

Como una alternativa a la administración crónica consistente en dosis individuales repetidas, un agente remielinizante se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, siempre que la dosis sea tal que los niveles de saturación de los receptores permanezcan suficientes para suprimir la inflamación. Por ejemplo, se pueden usar sistemas de liberación controlada para administrar un agente remielinizante de la presente invención de forma crónica. *EXTENDED-RELEASE DOSAGE FORMS*, 1987 (CRC Press, Inc.) contiene discusiones de formas de dosificación de liberación controlada adecuadas.

Las diferentes tecnologías de liberación controlada abarcan un amplio espectro de formas de dosificación de fármacos. Las tecnologías de liberación controlada incluyen, pero no se limitan a, sistemas físicos y sistemas químicos. Los sistemas físicos incluyen, pero no se limitan a, los sistemas de reservorio con membranas para controlar la tasa de liberación, tales como microencapsulados, macroencapsulados y sistemas de

851

membrana; sistemas de reservorio sin membranas para controlar la tasa de liberación, tales como las fibras huecas, el triacetato de celulosa ultra-microporoso, y los sustratos poliméricos y espumas porosas; sistemas monocíticos, incluyendo aquellos sistemas físicamente disueltos en matrices no porosas, poliméricas o elastoméricas (por ejemplo, no erosionables, erosionables, con ingreso de agentes ambientales y degradables), y materiales físicamente dispersos en matrices no porosas, poliméricas o elastoméricas (por ejemplo, no erosionables, erosionables, con ingreso de agentes ambientales y degradables); estructuras laminadas, incluyendo capas reservorio químicamente similares o diferentes de las capas exteriores de control; y otros medios físicos tales como bombas osmóticas, o resinas de intercambio iónico.

Los sistemas químicos incluyen, pero no se limitan a, la erosión química de matrices poliméricas (por ejemplo, erosión heterogénea u homogénea). Agis F. Kydonieus, *CONTROLLED RELEASE TECHNOLOGIES: METHODS, THEORY AND APPLICATIONS*, 1980 (CRC Press, Inc.) contiene una discusión adicional de las categorías de sistemas para liberación controlada.

Los compuestos de la presente invención se pueden usar para tratar un paciente que padece un trastorno que involucra o que es provocado por una inflamación patológica, o para tratar profilácticamente un paciente que presenta riesgo de un trastorno en particular. Los regímenes de dosificación necesarios para un tratamiento profiláctico, en contraposición con un tratamiento terapéutico, pueden variar, y será necesario diseñarlos para el uso específico y el trastorno tratado.

En algunos métodos, dos o más agentes (por ejemplo, anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de fijación, un anticuerpo

852

monoclonal y un compuesto según lo aquí descripto) se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosis de cada agente administrado está comprendido dentro de los rangos indicados. También se pueden dar terapias de combinación en las cuales los agentes se administran consecutivamente al paciente con intervalos de tiempo deseados entre períodos de administración. Los intervalos también pueden ser irregulares, según lo indique la medición de los niveles de saturación o de acuerdo con otros indicios de la evolución de la enfermedad.

Los expertos en la técnica podrán apreciar que los niveles de dosificación pueden variar en función del agente específico, la severidad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos secundarios. Algunos de los agentes específicos son más potentes que otros. Las dosis preferidas para un agente determinado pueden ser fácilmente determinadas por los expertos en la técnica mediante una variedad de maneras. Una manera preferida consiste en medir la potencia fisiológica de un agente dado.

En las aplicaciones profilácticas, las preparaciones farmacéuticas se administran de forma crónica a un paciente susceptible a, o que presenta riesgo de, una enfermedad particular en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo o demorar la manifestación de la enfermedad. Esta cantidad se define como una dosis profilácticamente efectiva. En los pacientes con esclerosis multiple en remisión, el riesgo se puede evaluar por imágenes NMR o, en algunos casos, a través de indicaciones pre-sintomáticas observadas por el paciente.

Los regímenes de dosificación efectivos de las preparaciones de la presente invención, para el tratamiento de los trastornos antes descriptos,

variará dependiendo de numerosos factores, incluyendo el modo de administración, el sitio meta, el estado fisiológico del paciente y otros medicamentos administrados. Por ende, las dosis para los tratamientos se deberán titular para optimizar su seguridad y eficacia. En general, cada administración del régimen de dosificación estará comprendida entre alrededor de 0.0001 y alrededor de 100 mg/kg, usualmente entre alrededor de 0.01 y alrededor de 50, y más usualmente entre alrededor de 0.1 y alrededor de 30 mg/kg del peso corporal del huésped.

Los agentes remielinizantes de la invención se pueden utilizar junto con cantidades efectivas de otros agentes terapéuticos contra la inflamación aguda y crónica. Tales agentes incluyen otros antagonistas de las moléculas de adhesión (por ejemplo, otras integrinas, selectinas y miembros de la superfamilia de la inmunoglobulina (Ig) (*ver* Springer, *Nature* (1990) 346:425-433; Osborn (1990) *Cell* 62:3; y Hynes (1992) *Cell* 9:11)). Las integrinas son glicoproteínas heterodiméricas transmembranales compuestas por una cadena α (120-180 kDa) y una cadena β (90-110 kDa), generalmente con dominios citoplasmáticos cortos. Por ejemplo, tres integrinas importantes, LFA-1, Mac-1 y P150,95, tienen diferentes subunidades alfa, denominadas CD11a, CD11b y CD11c, y una subunidad beta común llamada CD18. La LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) se expresa en los linfocitos, granulocitos y monocitos, y se une predominantemente a un contra-receptor de la familia IG llamado ICAM-1 y a sus ligandos relacionados. La ICAM-1 se expresa en muchas células, incluyendo los leucocitos y las células endoteliales, y es favorecida en el endotelio vascular por citocinas tales como la TNF y la IL-1. La Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) está distribuida en los neutrófilos y monocitos, y también se liga a la ICAM-1. La tercera integrina β_2,

P150,95 ($\alpha_X\beta_2$), también se encuentra e los neutrófilos y monocitos. Las selectinas consisten en la L-selectina, la E-selectina y la P-selectina.

Otros agentes anti-inflamatorios que se pueden utilizar en combinación con los agentes remielinizantes incluyen los anticuerpos y otros antagonistas de las citocinas, tales como las interleuquinas IL-1 a IL-13, los factores de necrosis tumoral α y β (TNF-α y TNF-β), las interferonas α, β y γ, el factor de crecimiento tumoral Beta (TGF-β), el factor de estimulación de colonias (CSF) y fel actor de estimulación de colonias de granulocitos/monocitos (GM-CSF). Otros agentes anti-inflamatorios incluyen anticuerpos y otros antagonistas de las quemoquinas tales como MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, exotaxina y IL-8. Otros agentes anti-inflamatorios incluyen los no esteroides, esteroides y otros inhibidores de la inflamación de molécula pequeña. El cronograma y la secuencia de administración, las formulaciones, las vías de administración y las concentraciones efectivas de los agentes para las terapias combinadas son como se describió anteriormente para los anticuerpos humanizados contra la integrina alfa-4, los compuestos pequeños contra la integrina alfa-4 y las combinaciones de fármacos.

8. <u>Ensayo de los Reactivos</u>

Los reactivos se pueden ensayar *in vitro* e *in vivo*. Existen muchos modelos *in vitro* que permiten ensayar si el reactivo se une a la subunidad alfa-4, tal como se conoce en la técnica. Se pueden realizar ensayos para determinar si el reactivo tiene una actividad *in vivo* para promover la remielinización e inhibir la desmielinización usando el modelo animal de la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE). La EAE es un trastorno inflamatorio del sistema nervioso central que presenta similitudes con la

esclerosis múltiple (Paterson, en TEXTBOOK OF IMMUNOPATHOLOGY, eds. Miescher and Mueller-Eberhard, 179-213, Grune and Stratton, N.Y. 1976). Se puede inducer EAE en ratas mediante una única inyección intraperitoneal de un clon de célula T CD4-positivo específico para la proteína básica de la mielina. La inflamación comienza dentro de las 4 a 12 horas siguientes, los monocitos y linfocitos endógenos infiltran los vasos inflamados en el tronco cerebral y la médula espinal, provocando la parálisis de la cola y las extremidades traseras al llegar al día 4 ó 5.

Se pueden ensayar cortes de cerebro con EAE para determinar su capacidad de soportar la fijación de leucocitos usando, por ejemplo, un ensayo de fijación *in vitro* descripto en Stamper y Woodruff, *J. Exp. Med.* 144: 828-833 (1976). Los reactivos contra los receptores de adhesión de leucocitos se pueden estudiar para determinar la actividad inhibitoria en el ensayo *in vitro* descripto en el Ejemplo 4. Como se indica en las Tablas 12 y 13, la fijación de células U937 (una línea celular monocítica humana) fue casi totalmente bloqueada por los anticuerpos contra la integrina VLA-4 humana. Los anticuerpos remielinizantes produjeron un efecto bloqueador significativamente mayor comparado con los anticuerpos contra otras moléculas de adhesión.

Sorprendentemente, los anticuerpos que selectivamente inhiben la actividad de fijación de fibronectina de una integrina α_4 (P4G9 y HP1/7) mejoraron la fijación de U937 a los vasos con EAE. Estos resultados sugieren que la actividad de fijación de fibronectina de la integrina α_4 no participa directamente en la adhesión de U937 a los vasos con EAE *in vitro*. Las Tablas 1 y 13 también muestran que los anticuerpos contra otros

numerosos receptores de adhesión de leucocitos no efecto en la fijación de U937 o linfocitos a los vasos con EAE.

En vista de los resultados *in vitro* obtenidos usando los reactivos $\alpha_4\beta_1$ arriba descriptos, el efecto de estos anticuerpos sobre la evolución de la EAE también se pueden ensayar *in vivo* midiendo la demora en la aparición de la parálisis o la reducción de la severidad de la parálisis. En el Ejemplo 4 se ilustra el efecto protector de uno de los anticuerpos útiles en la presente invención, HP2/1.

Mediante ensayos de fijación se pueden identificar otros reactivos efectivos para inhibir la fijación de leucocitos a las células endoteliales del cerebro y que por lo tanto inhiben la desmielinización o promueven la desmielinización. Usando HP2/1 o éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina como control, por ejemplo, se pueden investigar otros anticuerpos o reactivos para determinar su capacidad de inhibir la fijación de linfocitos a un ligando conocido para la integrina $\alpha_4\beta_1$. Se pueden identificar varios reactivos adicionales que inhiben la adhesión que apunta a la subunidad α_4 del receptor de la superficie celular del leucocito VLA-4.

Los anticuerpos monoclonales útiles en los métodos y preparaciones de la presente invención incluyen por ejemplo, HP2/1, TY21.6, TY21.12, y L25 como se discute en la Patente Estadounidense No. 6.033.665, la cual se incorpora en su totalidad a la presente por referencias. Estos anticuerpos reaccionan con la cadena α de la VLA-4 y bloquean la fijación a VCAM-1, fibronectina y células endoteliales cerebrales inflamadas , pero no afectan la actividad de los demás miembros de la familia de la integrina β_1.

También se pueden usar otros reactivos que reaccionan selectivamente contra la VLA-4/VCAM-1. Por ejemplo, un anticuerpo que interactúa con el dominio de fijación de la VCAM-1 VLA-4 (α_4) en combinación con la cadena β_1 que bloquea sólo la migración de linfocitos a sitios de inflamación, tales como el cerebro durante la esclerosis múltiple, se puede usar para promover la remielinización. Además, este reactivo no afectaría las interacciones matriciales (mediadas por todos los miembros de las integrinas β_1) ni afectarían la inmunidad intestinal normal (mediada por $\alpha_4\beta_7$). La producción de este o otros reactivos está al alcance de los expertos en la técnica.

9. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se incluyen para proveerles a los expertos en la técnica una descripción completa de cómo preparar y utilizar la presente invención; no es su intención limitar el campo de lo que los inventores consideran como su invención, ni es su intención representar que los siguientes experimentos son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho grandes esfuerzos para asegurar la exactitud respecto de las cifras utilizadas (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero se deberían considerar algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura se expresa en grados Centígrados, y la presión corresponde a la presión atmosférica o está próxima a la misma.

9.1. Síntesis de Compuestos

Si una de las abreviaturas usadas en los siguientes ejemplos no ha sido definida anteriormente, tiene el significado generalmente aceptado.

Además, todas las temperaturas son en grados Celsius (a menos que se especifique lo contrario). Para preparar los compuestos presentados a continuación se utilizaron los siguientes Métodos, tal como se indica.

Método 1

Procedimiento de *N*-Tosilación

La *N*-tosilación del aminoácido apropiado se realizó por el método de Cupps, Boutin y Rapoport *J. Org. Chem.* **1985,** *50,* 3972.

Método 2

Procedimiento de Preparación de Ésteres Metílicos

Los ésteres metílicos de aminoácidos se prepararon usando el método de Brenner y Huber *Helv. Chim. Acta* 1953, *36,* 1109.

Método 3

Procedimiento de Acoplamiento vía BOP

El éster dipeptídico deseado se preparó por reacción de un aminoácido N-protegido (1 equivalente) con el éster de aminoácido o hidrocloruro de éster de aminoácido adecuado (1 equivalente), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)fosfonio[BOP] (2.0 equivalentes), trietilamina (1.1 equivalente) y DMF. La mezcla de reacción se revolvió a temperatura ambiente durante una noche. El producto crudo se purifica por cromatografía flash para obtener el éster dipeptídico.

Método 4

Procedimiento de Hidrogenación I

La hidrogenación se efectuó usando 10% de paladio en carbono (10% en peso) en metanol a 30 psi durante una noche. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celita y el filtrado se concentró para obtener el compuesto amino deseado.

Método 5

Procedimiento de Hidrólisis I

A una solución enfriada (0EC) en THF/H_2O(2:1, 5 - 10 mL) del éster apropiado se añadió LiOH (o NaOH) (0.95 equivalentes). La temperatura se mantuvo a 0EC y la reacción se completó en 1 a 3 horas. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo, y la fase acuosa se liofilizó para obtener la sal de carboxilato deseada.

Método 6

Procedimiento de Hidrólisis de Ésteres II

A una solución enfriada (0EC) en THF/H_2O (2:1, 5 - 10 mL) del éster apropiado se añadió LiOH (1.1 equivalentes). La temperatura se mantuvo a 0EC y la reacción se completó en 1 a 3 horas. La mezcla de reacción se concentró, y el residuo se recogió en H_2O y el pH se ajustó a un valor entre 2 y 3 con HCl acuoso. El producto se extrajo con acetato de etilo, y la fase orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró para obtener el ácido deseado.

Método 7

Procedimiento de Hidrólisis de Ésteres III

El éster apropiado se disolvió en dioxano/H_2O (1:1) y se añadieron 0.9 equivalentes de 0.5 N NaOH. La reacción se revolvió durante 3 a 16 horas y luego se concentró. El residuo resultante se disolvió en H_2O y se extrajo con acetato de etilo. La fase acuosa se liofilizó para obtener la sal de carboxilato de sodio deseada.

Método 8

Procedimiento de Sulfonilación I

Al análogo de aminofenilalanina protegido apropiadamente (11.2 mmol), disuelto en cloruro de metileno (25ml) y enfriado a -78EC se añadió el cloruro de sulfonilo deseado (12 mmol) seguido de la adición de piridina en forma de gotas (2 mL). Se permitió que la solución se calentara a temperatura ambiente y se revolvió durante 48 horas. La solución de reacción se transfirió a un embudo separador de 250 mL con cloruro de metileno (100 mL) y se extrajo con 1N HCl (50 mL x 3), salmuera (50 mL) y agua (100 mL). Se secó ($MgSO_4$) la fase orgánica, y se concentró el solvente para obtener el producto deseado.

Método 9

Procedimiento de Aminación Reductiva

La afinación reductiva de Tos-Pro-p-NH2-Phe con el aldehído apropiado se llevó a cabo usando ácido acético, triacetoxiborohidruro de sodio, cloruro de metileno, y la mezcla combinada se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El producto crudo se purificó por cromatografía flash.

Método 10

Procedimiento de de Remoción de BOC

Se hicieron pasar burbujas de hidrocloruro (HCl) anhidro gaseoso a través de una solución metabólica del éster de aminoácido Boc apropiado a 0EC durante 15 minutos y la mezcla de reacción se agitó durante tres horas. La solución se concentró obteniéndose un jarabe, se disolvió en Et_2O y se concentró nuevamente. Este procedimiento se repitió y el sólido resultante se sometió a alto vacío durante una noche.

Método 11

Procedimiento de Hidrólisis de Éster *ter*-butilílico I

El éster *tert*-butílico se disolvió en CH_2Cl_2 y se trató con TFA. La reacción se completó en 1 a 3 horas, momento en el cual la mezcla de reacción se concentró y el residuo se disolvió en H_2O y se liofilizó para obtener el ácido deseado.

Método 12

Procedimiento de Acoplamiento de EDC I

A una solución en CH_2Cl_2 (5-20 mL) de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolina (1 equivalente), se mezclaron el hidrocloruro de éster de aminoácido apropiado (1 equivalente), N-metilmorfolina (1.1 a 2.2 equivalentes) y 1-hidroxibenzotriazola (2 equivalentes), se colocó en un baño de hielo, y se añadió 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil carbodiimida (1.1 equivalentes). Se permitió que la temperatura de la reacción aumentara hasta la temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se vertió en H_2O y la fase orgánica se lavó con $NaHCO_3$ saturado, salmuera, se secó ($MgSO_4$ o Na_2SO_4), se filtró y se concentró. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna.

Método 13

Procedimiento de Acoplamiento de EDC II

A una solución en DMF (5-20 mL) del aminoácido N-protegido adecuado (1 equivalente), se mezclaron el hidrocloruro del éster de aminoácido apropiado (1 equivalente), Et_3N (1.1 equivalentes) y 1-hidroxibenzotriazola (2 equivalentes), se colocaron en un baño de hielo y se añadió 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil carbodiimida (1.1 equivalentes). Se permitió que la temperatura de la reacción aumentara hasta la temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se particionó entre EtOAc y H_2O y la fase orgánica se lavó con ácido cítrico

0.2 N, H_2O,. $NaHCO_3$ saturado, salmuera, se secó ($MgSO_4$ o Na_2SO_4), se filtró y se concentró. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna o TLC preparativa.

Método 14

Procedimiento de Sulfonilación II

El cloruro de sulfonilo apropiado se disolvió en CH_2Cl_2 y se colocó en un baño de hielo. Se añadieron L-Pro-L-Phe-OMe X HCl (1 equivalente) y Et_3N (1.1 equivalente), y se permitió que la temperatura de la reacción aumentara hasta la temperatura ambiente y se agitó durante la noche bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se concentró, el residuo se particionó entre EtOAc y H_2O, y la fase orgánica se lavó con $NaHCO_3$ saturado, salmuera, se secó ($MgSO_4$ o Na_2SO_4), se filtró y se concentró. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna o TLC preparativa.

Método 15

Procedimiento de Sulfonilación III

A una solución de L-Pro-L-4-(3-dimetilaminopropiloxi)-Phe-OMe [preparada usando el procedimiento descripto en el Método 10] (1 equivalente) en CH_2Cl_2 se añadió Et_3N (5 equivalentes) seguido del cloruro de sulfonilo apropiado (1.1 equivalente). Se permitió que la temperatura de la reacción aumentara hasta la temperatura ambiente y se agitó durante la noche bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se concentró, se disolvió en EtOAc, se lavó con $NaHCO_3$ saturado y ácido cítrico 0.2 N. La fase acuosa se hizo básica con $NaHCO_3$ sólido, y el producto se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó ($MgSO_4$ o Na_2SO_4), se filtró y se concentró. El éster metílico crudo se purificó por TLC preparativa. El

ácido correspondiente se preparó usando el procedimiento descripto en el Método 7.

Método 16

Procedimiento de Hidrogenación II

A una solución en metanol (10 -15 mL) de la azlactona se añadieron NaOAc (1 equivalente) y 10% Pd/C. Esta mezcla se colocó en el hidrogenador a 40 psi H_2. Luego de 8 a 16 horas, la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celita y el filtrado se concentró para obtener el éster metilo dehidrodipeptídico. El éster se disolvió en dioxano/H_2O (5-10 mL), al cual se añadió 0.5 N NaOH (1.05 equivalentes). Luego de agitar durante 1 a 3 horas, la mezcla de reacción se concentró y el residuo se disolvió nuevamente en H_2O y se lavó con EtOAc. La fase acuosa se acidificó con 0.2 N HCl y el producto se extrajo con EtOAc. La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (1 x 5 mL), se secó ($MgSO_4$ o Na_2SO_4), se filtró y se concentró para obtener el ácido en forma de una mezcla diastomérica aproximadamente 1:1.

Método 17

Procedimiento de Hidrólisis de Éster *ter*-butilílico II

El éster *ter*-butílico se disolvió en CH_2Cl_2 (5 mL) y se trató con (5 mL). La reacción se completó en 1 a 3 horas, momento en el cual la mezcla de reacción se concentró y el residuo se disolvió en H_2O y se concentró. El residuo se disolvió nuevamente en H_2O y se liofilizó para obtener el producto deseado.

Ejemplo 1

Síntesis de Éster etílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi) fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 y sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR $(CD_3)_2SO$): δ = 8.33 (d, 1H), 7.70 (d, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.24 (d, 2H), 7.00 (d, 2H), 4.52-4.44 (m, 1H), 4.09-4.00 (m, 3H), 3.53 (bs, 2H), 3.38-3.31 (m, 3H), 3.11-3.01 (m, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.32 (bs, 4H), 2.19 (s, 3H), 1.61-1.50 (m, 3H), 1.43-1.38 (m, 1H), 1.13 (t, 3H).

^{13}C NMR $(CD_3)_2SO$): δ = 171.1, 171.1, 153.9, 149.8, 143.6, 134.1, 133.9, 130.0, 129.8, 127.4, 121.5, 61.2, 60.7, 54.2, 54.1, 53.3, 49.0, 45.7, 44.0, 43.4, 35.8, 30.5, 23.8, 21.0, 14.0.

Ejemplo 2

Síntesis de Éster etílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

En un frasco para reacciones se combinaron 7.00 g (15.2 mmol, 1.0 eq) de Ts-Pro-Tyr(H)-Oet y 1.86 g (15.2 mmol, 1.0 eq) DMAP. Se agregaron luego cloruro de metileno (50 ml), trietilamina (2.12 ml, 1.54g, 15.2 mml, 1.0 eq) y cloruro de dimetilcarbamilo (1.68 mL – 1.96g, 18.2 mml, 1.2 eq). El frasco se cerró herméticamente y la solución de reacción se agitó para obtener una solución homogénea. La solución de reacción se calentó a 40EC. Luego de 48 horas, la TLC de la solución incolora resultante indicó su conversión total. El procedimiento de la reacción fue como sigue: agregar 50 mL EtOAc y 50 mL de hexano a la mezcla de la reacción, y lavar con 3 x 50 mL 0.5 mL de hexanos a la mezcla de la reacción, y lavar con 3x50 mL 0.5 M de ácido cítrico, 2 x 50 mL de agua, 2 x 50 mL 10% K_2CO_3, y 1 x 50 mL saturados de NaCl. Secar con $MgSO_4$. Filtrar. Evaporar

para obtener 8.00 g (99%) del compuesto del título en forma de un aceite claro, que se solidifica al ser dejado en reposo. Recristalizar a partir de 5:3:2 heptano/EtOAc/CH_2Cl_2

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CD_3)_2SO$): δ = 8.32 (d, 1H), 7.70 (d, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.23 (d, 2H), 7.00 (d, 2H), 4.52-4.44 (m, 1H), 4.09-4.02 (m, 3H), 3.37-3.31 (m, 1H), 3.11-2.96 (m, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.87 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 1.61-1.50 (m, 3H), 1.43-1.38 (m, 1H), 1.13 (t, 3H).

^{13}C NMR ($CD_3)_2SO$): δ = 171.1, 171.1, 154.0, 150.0, 143.6, 133.9, 133.9, 130.0, 129.8, 127.4, 121.5, 61.2, 60.6, 53.3, 49.0, 36.3, 36.1, 35.8, 30.5, 23.8, 21.0, 14.0.

Ejemplo 3

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida apropiados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.72 (d, 2H), 7.36 (d, 1H), 7.33 (d, 2H), 7.16 (d, 2H), 7.03 (d, 2H), 5.07 (Sept., 1H), 4.78 (dt, 1H), 4.08-4.05 (m, 1H), 3.67 (bs, 2H), 3.57 (bs, 2H), 3.41-3.35 (m, 1H), 3.24 (dd, 1H), 3.15-3.07 (m, 1H), 3.04 (dd, 1H), 3.46-2.43 (m, 7H), 2.34 (s, 3H), 2.05-2.02 (m, 1H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.9, 170.4, 153.6, 150.5, 144.3, 133.2, 133.1, 130.2, 130.0, 127.9, 121.7, 69.5, 62.2, 54.7, 53.4, 49.6, 46.1, 44.3, 43.7, 37.2, 29.7, 24.1, 21.6, 21.6, 21.4.

Ejemplo 4

866

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

Combinar 41.2 g (84.34 mml, 1.0 eq) de Ts-Pro-Tyr(H)-OtBu y 17.0 g (84.34 mml, 1.0 eq) de 4-nitrofenil cloroformato. Agregar 700 mL CH_2Cl_2. Tapar con un tabique. Adosar a una línea de N_2. Sumergir el matraz en una mezcla 4:1 de agua/EtOH y hielo seco, y revolver hasta enfriar a –15EC. Agregar 29.38 mL (21.33 g, 210.81 mmol, 2.5 eq) Et_3N a lo largo de cinco minutos revolviendo. Revolver entre –10 y –15 EC por una hora. Agregar 9.35 mL (8.45 g, 84.34 mml, 1.0 eq) de n-metil-piperazina a lo largo de 3 minutos revolviendo. Revolver durante la noche mientras se calienta a la temperatura ambiente. Diluir con 700 mL de hexanos. Lavar repetidamente con K_2CO_3 al 10%, hasta que no pueda verse el color amarillento (4-nitrofenol) en la capa acuosa. Lavar con NaCl saturado. Secar sobre $MgSO_4$ anhídrico. Filtrar. Evaporar. Disolver en 500 mL de EtOH, y evaporar, para remover el Et_3N. Repetir una vez. Disolver en 400 mL de EtOH, y agregar 600 mL de agua revolviendo, para precipitar un sólido o un aceite. Si es un aceite, revolver vigorosamente hasta solidificar. Aislar el sólido por filtración. Repetir la disolución, precipitación y filtración una vez. Enjuagar con agua para remover trazas de color amarillo. Manteniendo en alto vacío hasta llegar a masa constante produce el compuesto del título en la forma de un sólido de color blanco.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.72 (d, 2H), 7.33 (d, 3H), 7.17 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 4.71 (q, 1H), 4.09-4.06 (m, 1H), 3.67 (bs, 2H), 3.57 (bs, 2H), 3.41-3.34 (m, 1H), 3.22 (dd, 1H), 3.16-3.09 (m, 1H), 3.03 (dd, 1H), 2.46-2.43 (m, 7H), 2.34 (s, 3H), 2.05-2.02 (m, 1H), 1.57-1.43 (m, 3H), 1.47 (s, 9H).

867

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 171.8, 169.9, 153.6, 150.4, 144.3, 133.4, 133.1, 130.3, 130.0, 127.9, 121.6, 82.6, 62.3, 54.5, 53.8, 49.6, 46.1, 44.3, 43.7, 37.3, 29.7, 27.8, 24.1, 21.4.

Ejemplo 5

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 1 usando el procedimiento descripto en el Método 7.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ = 7.74 (d, 2H), 7.42 (d, 2H), 7.26 (d, 2H), 7.04 (d, 2H), 4.58-4.54 (m, 1H), 4.16-4.12 (m, 1H), 3.70 (bs, 2H) 3.53 (bs, 2H), 3.43-3.31 (m, 1H), 3.26-3.13 (m, 7H), 2.82 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 1.98-1.94 (m, 1H), 1.76-1.51 (m, 3H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ = 175.7, 173.6, 154.8, 151.6, 146.1, 136.3, 134.8, 131.9, 131.3, 129.1, 122.7, 63.6, 55.9, 53.9, 50.7, 43.5, 37.6, 31.3, 25.5, 21.5.

Ejemplo 6

Síntesis de Éster *n*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida apropiados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR $(CD_3)_2SO$: δ = 8.31 (d, 1H), 7.70 (d, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.23 (d, 2H), 6.99 (d, 2H), 4.53-4.46 (m, 1H), 4.10-4.01 (m, 1H), 3.63-3.30 (m,

868

1H), 3.10-2.96 (m, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.88 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 1.59-1.30 (m, 6H), 1.33-1.20 (m, 2H), 0.85 (t, 3H).

^{13}C NMR $(CD_3)_2SO$: δ = 171.4, 171.3, 154.2, 150.2, 143.7, 134.0, 130.1, 130.0, 127.6, 121.7, 64.3, 61.2, 59.2, 53.4, 49.0, 36.2, 36.0, 35.8, 30.0, 23.8, 21.0, 18.5, 13.5.

Ejemplo 7

Síntesis de Éster ciclopentílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida apropiados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR $(CD_3)_2SO$: δ = 8.27 (d, 1H), 7.70 (d, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.22 (d, 2H), 6.99 (d, 2H), 5.04 (bs, 1H), 4.48-4.40 (m, 1H), 4.08-4.05 (m, 1H), 3.34-3.30 (m, 1H), 3.09-2.95 (m, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.88 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 1.76-1.74 (m, 2H), 1.57-1.40 (m, 10H).

^{13}C NMR $(CD_3)_2SO$: δ = 171.3, 171.0, 154.2, 150.2, 432.7, 134.1, 130.1, 130.0, 127.6, 121.6, 77.4, 61.2, 53.4, 49.0, 36.2, 36.1, 35.7, 32.0, 30.5, 23.8, 23.2, 21.0.

Ejemplo 8

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida apropiados.

Los datos NMR son los siguientes

869

^{1}H NMR $(CD_3)_2SO$: δ = 8.18 (d, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.23 (d, 2H), 6.99 (d, 2H), 4.42-4.38 (m, 1H), 4.10-4.07 (m, 1H), 3.37-3.30 (m, 1H), 3.09-2.95 (m, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.88 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 1.58-1.50 (m, 3H), 1.40-1.30 (m, 1H), 1.36 (s, 9H).

^{13}C NMR $(CD_3)_2SO$: δ = 171.1, 170.3, 154.2, 150.2, 143.8, 134.2, 134.1, 130.2, 130.0, 127.6, 121.6, 81.0, 61.3, 53.8, 49.0, 36.3, 36.0, 35.9, 30.5, 27.5, 23.8, 21.0.

Ejemplo 9

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 2 utilizando el procedimiento descripto en el método 7.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR $(CD_3)_2SO$: δ = 8.13 (d, 1H), 7.70 (d, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.23 (d, 2H), 6.99 (d, 2H), 4.51-4.44 (m, 1H), 4.11-4.09 (m, 1H), 3.40-3.34 (m, 2H), 3.11-2.94 (m, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.87 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 1.59-1.36 (m, 4H).

^{13}C NMR $(CD_3)_2SO$: δ = 172.7, 171.2, 153.6, 150.2, 143.8, 134.3, 134.0, 130.2, 130.0, 127.6, 121.6, 61.3, 53.2, 49.0, 36.3, 36.1, 35.9, 30.4, 23.8, 21.0.

Ejemplo 10

Síntesis de Éster etílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-3-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida apropiados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.74 (m, 2H), 7.70-7.36 (m, 4H), 7.24-7.14 (m, 3H), 6.93-4.90 (m, 1H), 4.78-4.27 (m, 3H), 4.05-3.55 (m, .5H), 3.48-3.43 (m, .5H), 3.37-3.30 (m, 3H), 3.02-3.08 (bs, 3H), 2.99 (bs, 3H), 2.45 (s, 1.5H), 2.43 (s, 1.5H), 2.12 (m, 1H), 198, 1.80 (m, .5M),1.62-1.44 (m, 2.5H), 1.29 (t, 1.5H), 1.24 (t, 1.5H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 171.1, 171.0, 170.9, 154.9, 154.8, 151.8, 151.6, 144.4, 144.3, 137.6, 137.1, 133.1, 132.9, 130.0, 129.9, 129.5, 129.2, 127.9, 127.9, 126.5, 126.1, 122.9, 122.7, 120.7, 120.5.

Ejemplo 11

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.76 (d, 2H), 7.35 (d, 2H), 7.22 (d, 2H), 7.01 (m, 3H), 5.05 (m, 1H), 4.85 (m, 1H), 4.57 (d, 1H), 4.38 (d, 1H), 3.86 (s,1H), 3.19-3.00 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.01 (s, 3H), 2.45 (s, 3H), 1.24 (t, 6H), 1.16 (s, 3H), 1.09 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.3, 168.4, 154.9, 150.6, 144.8, 132.9, 132.8, 130.3, 130.0, 128.2, 121.7, 73.4, 69.5, 54.5, 53.2, 50.4, 37.7, 36.5, 36.3, 29.0, 23.8, 21.5, 21.4.

Ejemplo 12

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.75 (d, 2H), 7.34 (d, 2H), 7.23 (d, 2H), 7.05-6.98 (m, 3H), 4.76 (m, 1H), 4.56 (d, 1H), 4.40 (d, 1H), 3.85 (s, 1H), 3.09-3.00 (m, 8H), 2.44 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.09 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 169.8, 168.3, 154.9, 150.6, 144.8, 133.2, 132.9, 130.4, 130.0, 128.2, 121.6, 82.6, 73.4, 54.6, 53.8, 50.4, 37.8, 36.5, 36.3, 29.0, 27.7, 23.8, 21.5.

Ejemplo 13

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 11 utilizando el procedimiento descripto en el Método 7.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.76 (d, 2H), 7.35 (d, 2H), 7.25 (d, 2H), 7.14 (d, 1H), 7.02 (d, 2H), 5.17 (br s, 1H), 4.89 (m, 1H), 4.56 (d, 1H), 4.40 (d, 1H), 3.90 (s, 1H), 3.30-3.00 (m, 8H), 2.43 (s, 3H), 1.09 (s, 6H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 172.7, 169.3, 155.2, 150.6, 144.9, 133.1, 132.7, 130.5, 130.1, 128.1, 121.9, 73.3, 54.5, 53.3, 50.5, 36.9, 36.6, 36.4, 29.0, 23.7, 21.5.

Ejemplo 14

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-[(1,1-dioxo)tiamorfolin-3-carbonil]-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se preparó ácido L-tiamorfolin-5-carboxílico mediante el método de Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* **1994**, 48, 517-525). Se preparó ácido *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-tiamorfolin-5-carboxílico siguiendo el procedimiento descripto en el Método 1 y fue luego acoplado a t-butil tirosina en DMF en presencia de BOP y NMM para obtener luego de un proceso acuoso y cromatografía flash éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-[tiamorfolin-3-carbonil]-L-4-fenilalanina.

La formación del grupo 4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi) fue de acuerdo con el Ejemplo 2 anterior y la oxidación del grupo tiamorfolino al grupo 1,1-dioxo-tiamorfolino fue de acuerdo con Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* **1994**, 48, 522).

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.68 (d, 2H), 7.37 (d, 2H), 7.08 (m, 4H), 6.73 (d, 1H), 5.11 (m, 1H), 4.62 (m, 1H), 4.23 (m, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.82 (m, 1H), 3.14 (s, 3H), 3.03 (s, 3H), 2.80 (m, 5H), 2.44 (s, 3H), 1.48 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 171.3, 169.9, 164.4, 145.6, 135.4, 132.6, 130.8, 130.4, 127.3, 121.9, 83.0, 56.1, 53.8, 49.4, 48.7, 44.5, 42.0, 36.9, 36.6, 36.4, 27.8, 21.5.

Ejemplo 15

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-[(1,1-dioxo)tiamorfolin-3-carbonil]-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 14 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

873

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR (CD_3OD): δ = 7.77 (d, 2H), 7.40 (d, 2H), 7.22 (d, 2H), 7.00 (d, 2H), 5.19 (m, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.30 (m, 1H), 3.95 (m, 1H), 3.61 (m, 1H), 3.20 (m, 5H), 3.09 (s, 3H), 2.97 (s, 3H), 2.43 (s, 3H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ = 174.1, 168.0, 157.0,152.0, 146.4, 137.7, 135.3, 131.7, 131.6, 128.8, 123.0, 57.1, 54.8, 51.1, 50.9, 48.0, 47.7, 43.2, 37.4, 36.8, 36.7, 21.5.

Ejemplo 16

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.74 (d, 2H), 7.33 (d, 2H), 7.25 (d, 2H), 7.20-7.00 (m, 3H), 4.74 (m, 1H), 4.55 (d, 1H), 4.38 (d, 1H), 3.83 (s, 1H), 3.66 (br m, 2H), 3.57 (br m, 2H), 3.08-3.05 (m, 2H), 2.45-2.42 (m, 7H), 2.33 (s, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.15 (s, 3H), 1.08 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 169.7, 168.2, 153.6, 150.3, 144.7, 133.3, 132.7, 130.4, 129.9, 128.1, 121.5, 82.6, 73.4, 54.5, 53.7, 50.4, 46.0, 44.2, 43.6, 37.7, 28.9, 27.7, 23.8, 21.4.

Ejemplo 17

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 16 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

874

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 8.31 (d, 1H), 7.72 (d, 2H), 7.42-7.35 (m, 4H), 7.08 (d, 2H), 4.90-4.68 (m, 1H), 4.64-4.61 (m, 1H), 4.47-4.44 (m, 1H), 4.01 (s, 1H), 3.36-3.32 (br m, 4H), 3.27-3.25 (m, 1H), 3.22-3.10 (m, 1H), 2.94 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.07 (s, 3H).

Ejemplo 18

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)sarcosil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.66 (d, 2H), 7.34 (d, 2H), 7.18 (d, 2H), 7.07 (d, 2H), 6.98 (d, 1H), 5.03 (m, 1H), 4.81 (m, 1H), 3.69 (d, 1H), 3.49 (d, 1H), 3.08 (m, 2H), 3.04 (s, 3H), 2.99 (s, 3H), 2.63 (s, 3H), 2.43 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 167.4, 154.9, 150.8, 144.4, 132.6, 130.2, 130.1, 127.7, 122.0, 110.9, 69.5, 57.3, 53.9, 53.0, 37.1, 36.6, 21.6, 21.4.

Ejemplo 19

Síntesis de Éster *ter*-butílico *N*-(tolueno-4-sulfonil)sarcosil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.67 (d, 2H), 7.34 (d, 2H), 7.19 (d, 2H), 7.03 (d, 2H), 6.98 (d, 1H), 4.76 (m, 1H), 3.67 (q, 1H), 3.06 (m, 2H), 3.16 (s, 3H), 2.99 (s, 3H), 2.64 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 1.42 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.0, 137.2, 154.9, 150.7, 144.3, 133.2, 132.9, 130.3, 130.0, 127.7, 121.9, 82.6, 83.9, 53.3, 37.2, 36.6, 36.4, 27.9, 21.4.

Ejemplo 20

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)sarcosil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 18 utilizando el procedimiento descripto en el Método 7.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.41 (d, 2H), 7.10 (d, 2H), 6.98 (d, 2H), 6.75 (d, 2H), 4.42 (m, 1H), 3.43 (m, 2H), 3.04 (m, 2H), 2.80 (s, 3H), 2.69 (s, 3H), 2.33 (s, 3H), 2.14 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 174.2, 170.2, 156.9, 151.9, 145.6, 135.5, 135.2, 131.4, 131.1, 128.9, 123.0, 54.6, 54.0, 37.4, 36.8, 36.7, 21.4.

Ejemplo 21

Síntesis de Éster *ter*-butílico *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilaminosulfoniloxi)fenilalanina

Sustituyendo cloruro de dimetilsulfamoilo por cloruro de dimetilcarbamilo, y siguiendo el método para la preparación del Ejemplo 2, se obtuvo el compuesto del título.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.72 (d, 2H), 7.34 (d, 2H), 7.21 (s, 4H), 4.69 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.4 (m, 1H), 3.24 (m, 3H), 2.96 (s, 6H), 2.42 (s, 3H), 2.02 (m, 1H), 1.45 (m, 13H).

876

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 166.3, 165.3, 144.8, 140.0, 130.9, 126.4, 125.6, 123.5, 117.3, 95.5, 78.3, 57.8, 49.2, 45.2, 34.2, 32.9, 25.0, 23.4, 19.7, 17.1.

Ejemplo 22

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilaminosulfoniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 21 utilizando el procedimiento descripto en el método 11.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR (CD_3OD): δ = 7.73 (d, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.38 (d, 2H), 7.22 (d, 2H), 4.69 (m, 1H), 4.11 (m, 1H), 3.41 (m, 2H), 3.19 (m, 2H), 2.94 (s, 6H), 2.41 (s, 3A), 1.78 (m, 1H), 1.61 (m, 3H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ = 174.3, 174.0, 150.8, 145.9, 137.3, 135.1, 132.1, 131.2, 129.1, 123.1, 63.3, 54.6, 50.6, 39.1, 37.5, 31.6, 25.3, 21.5.

Ejemplo 23

Síntesis de Éster t-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-sarcosil-L-(4-morfolincarbamiloxi) fenilalanina

Sustituyendo sacrosina por L prolina en la preparación de éster t-butílico de Ts-Pro-Tyr(H) O y sustituyendo cloruro de 4-morfolincarbonilo por cloruro de dimetilcarbamilo, y siguiendo el método para la preparación del Ejemplo 2, dio el compuesto del título como un sólido de color blanco. Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.61 (d, 2H), 7.28 (d, 2H), 7.16 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 4.69 (m, 1H), 3.67 (m, 8H), 3.58 (m, 1H), 3.48 (m, 1H), 3.06 (m, 2H), 2.59 (s, 3H), 2.36 (s, 3H), 1.26 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 169.7, 167.1, 153.5, 150.1, 144.1, 133.1, 133.0, 133.0, 130.1, 129.8, 127.4, 121.6, 82.6, 66.3, 53.6, 53.1, 44.5, 43.7, 36.9, 36.4, 27.6, 21.2.

Ejemplo 24

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)sarcosil-L-4-(isonipecotoiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 23 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR (CD_3OD): δ = 7.30 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 6.88 (d, 2H), 6.67 (d, 2H), 4.33 (m, 1H), 3.32 (m, 3H), 3.25 (m, 2H), 3.12 (m, 3H), 2.89 (m, 1H), 2.70 (m, 3H), 2.22 (s, 3H), 2.03 (s, 3H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ = 174.2, 170.3, 155.6, 151.7, 145.6, 135.8, 135.2, 131.5, 131.1, 128.9, 123.0, 67.5, 54.6, 54.0, 37.4, 36.8, 21.5.

Ejemplo 25

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-[(1,1-dioxo)tiamorfolin-3-carbonil]-L-4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

Sustituyendo cloruro de 4-morfolincarbonilo por cloruro de dimetilcarbamilo, y siguiendo los métodos para la preparación de los Ejemplos 2 y 14, se obtuvo el compuesto del título como un sólido de color blanco.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.76 (d, 1H), 7.68 (d, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.14 (m, 2H), 7.05 (m, 1H), 6.97 (d, 1H), 6.80 (d, 0.5H), 6.57 (d, 0.5H), 5.09 (m, 0.5H), 4.91 (m, 0.5H), 4.75 (m, 0.5H), 4.62 (m, 0.5H), 4.25 (m, 0.5H), 4.09

(m, 2H), 3.79 (m, 4H), 3.65 (m, 4H), 2.91 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 1.69 (s, 4H), 1.44 (s, 5H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.0, 169.8, 164.8, 164.4, 153.7, 150.4, 145.6, 145.4, 135.4, 135.3, 132.9, 130.8, 130.7, 130.5, 130.4, 127.5, 127.2, 122.1, 121.8, 83.01, 82.8, 66.4, 56.1, 56.1, 53.7, 53.6, 49.5, 49.3, 48.6, 44.7, 43.9, 42.0, 41.6, 36.9, 36.3, 27.8, 21.5.

Ejemplo 26

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-[(1,1-dioxo)tiamorfolin-3-carbonil]-L-4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 25 siguiendo el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR (CD_3OD): δ = 7.67 (m, 2H), 7.32 (m, 2H), 7.08 (m, 2H), 6.93 (m, 2H), 5.09 (m, 1H), 4.54 (m, 1H), 4.19 (m, 0.5H), 4.02 (m, 0.5H), 3.81 (m, 0.5H), 3.66 (m, 8H), 2.99 (m, 7H), 2.32 (s, 3H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ = 174.0, 168.0, 155.7, 151.9, 151.8, 146.6, 146.4, 137.5, 135.5, 135.3, 131.7, 131.6, 131.6, 128.8, 123.3, 122.9, 67.6, 57.3, 57.1, 54.8, 51.1, 50.9, 50.6, 46.0, 45.3, 45.2, 43.0, 37.4, 37.0, 21.5.

Ejemplo 27

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 7.87-7.83 (m, 2H), 7.26-7.13 (m, 5H), 4.74-4.69 (m, 1H), 4.05 (m, 1H), 3.36 (m, 1H), 3.24-3.17 (m, 1H), 3.11-3.01 (m, 4H), 2.97 (s, 3H), 2.05-2.02 (m, 1H), 1.60-1.47 (m, 3H), 1.46 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.6, 170.0, 165.7, 154.9, 150.6, 133.2, 132.4, 130.7, 130.2, 121.7, 116.7, 82.7, 62.3, 53.7, 49.6, 37.2, 36.6, 36.4, 29.9, 27.9, 24.2.

Ejemplo 28

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)sarcosil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 8.17 (d, 1H), 7.59 (d, 2H), 7.26 (d, 2H), 7.13 (d, 2H), 7.00 (d, 2H), 4.66 (m, 1H), 3.60 (m, 6H), 3.04 (m, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.40 (m, 7H), 2.34 (s, 3H), 1.41 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 169.7, 167.0, 153.4, 150.2, 144.0, 133.0, 132.9, 130.1, 129.8, 127.4, 121.6, 82.2, 54.3, 53.5, 53.1, 45.8, 44.2, 43.5, 36.9, 27.6, 21.2.

Ejemplo 29

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxo-5,5-dimetil)-

tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El producto del Ejemplo 12 se oxidó según el método de Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* 1994, 48, 517-525), dando el compuesto del título como un sólido de color blanco.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.73 (d, 2H), 7.36 (d, 2H), 7.21 (d, 2H), 7.06-6.95 (m, 3H), 4.79 (m, 1H), 4.38 (dd, 2H), 4.10 (s, 1H), 3.18-2.95 (m, 8H), 2.43 (s, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.33 (s, 3H), 1.08 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 169.8, 166.2, 154.9, 120.7, 145.8, 133.0, 131.9, 130.2, 128.5, 121.9, 82.9, 68.0, 60.9, 59.3, 53.9, 37.5, 36.6, 36.3, 27.7, 21.6, 19.3, 18.5.

Ejemplo 30

Síntesis de *N*-(1-metilimidazolil-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 106 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 8.07 (d, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.25 (d, 2H), 7.01 (d, 2H), 4.71-4.66 (m, 1H), 4.28-4.24 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.42-3.05 (m, 3H), 3.09 (s, 3H), 2.96 (s, 3H), 1.84-1.69 (m, 2H), 1.61-1.54 (m, 2H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 174.4, 174.1, 156.9, 151.9, 141.8, 137.7, 135.6, 131.6, 127.6, 122.9, 63.7, 54.7, 50.8, 37.4, 36.8, 36.7, 34.3, 31.6, 25.4.

Ejemplo de Preparación A

Síntesis de Éster *ter*-butílico de 2-(sacarin-2-ilo)propionoil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se preparó éster t-butílico de *N*-(benzisotiasolona)-L-alanil-L-tirosina primero combinando hidruro de sodio (lavado libre de aceite mineral) en THF enfriado a 0EC, y una solución de éster t-butílico de *N*-(2-metoxicarbonil)sulfonil-L-alanin-L-tirosina en THF que se agregó por

goteo. La reacción fue revuelta a 0EC durante una hora y luego a temperatura ambiente por dos horas. La mezcla de reacción fue extraída con EtoAc y 0.2 N HCl, las capas combinadas de EtOAc fueron lavadas sucesivamente con 0.2 N HCl saturado, $NaHCO_3$, y NaCl saturado. La capa orgánica fue secada sobre $MgSO_4$, filtrada y concentrada. El residuo fue filtrado por cromatografía de gel de sílice para producir éster t-butílico de *N*-(benzisotiazolona)-L-alanil-L-tirosina.

Se preparó entonces el compuesto del título siguiendo el procedimiento descripto en el Ejemplo 2.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6,400 MHz) (1:1 mezcla de diastereómeros) δ = 8.15 (m, 2H); 8.5 (m, 3H); 7.20 (m, 2H); 6.95 (m, 2H); 4.75 (m, 1H); 4.30 (m, 1H); 3.05 (s, 3H); 2.95 (m, 2H); 2.90 (s, 3H); 1.75 y 1.65 (dos d, 3H); 1.30 y 1.35 (dos s, 9H).

Ejemplo 31

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxo-5,5-dimetil)-tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 29 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.75 (m, 3H), 7.29 (m, 4H), 7.08 (d, 2H), 4.95 (m, 1H), 4.46-4.20 (m, 3H), 3.17 (s, 3H), 3.30-3.10 (m, 2H), 3.02 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 0.88 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 127.2, 167.5, 155.8, 150.3, 145.4, 133.6, 132.6, 130.8, 130.2, 128.3, 121.9, 67.9, 65.8, 60.8, 53.9, 36.8, 36.6, 35.8, 21.6, 18.8, 15.0.

Ejemplo 32

Síntesis de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 27 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 7.88-7.84 (m, 2H), 7.54 (d, 1H), 7.26-7.18 (m, 4H), 7.01 (d, 2H), 6.92 (s, 3H), 4.88-4.83 (m, 1H), 4.14-4.11 (m, 1H), 3.39-3.29 (m, 2H), 3.13 (m, 2H), 3.00 (s, 3H), 2.99 (s, 3H), 1.92-1.89 (m, 1H), 1.59-1.43 (m, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 173.1, 172.4, 165.6, 155.5, 150.4, 133.2, 131.9, 130.6, 130.3, 121.8, 116.6, 61.9, 53.1, 49.6, 36.6, 36.3, 30.2, 23.9.

Ejemplo 33

Síntesis de Éster *t*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-D-prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilo)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida apropiados.

Los datos NMR son los siguientes

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 7.72 (d, 2H), 7.33 (d, 3H), 7.17 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 4.71 (q, 1H), 4.09-4.06 (m, 1H), 3.67 (bs, 2H), 3.57 (bs, 2H), 3.41-3.34 (m, 1H), 3.22 (dd, 1H), 3.16-3.09 (m, 1H), 3.03 (dd, 1H), 2.46-2.43 (m, 7H), 2.05-2.02 (m, 1H), 1.57-1.43 (m, 3H), 1.47 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.8, 169.9, 153.6, 150.4, 144.3, 133.4, 133.1, 130.3, 130.0, 127.9, 121.6, 82.6, 62.3, 54.5, 53.8, 49.6, 46.1, 44.3, 43.7, 37.3, 29.7, 27.8, 24.1, 21.4.

Ejemplo 34

Síntesis de Éster *t*-butílico de *N*-(Ttolueno-4-sulfonil)-*N*-metil-L-alanil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida apropiados.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.68 (d, 2H), 7.31 (d, 2H), 7.17 (d, 2H), 7.04 (d, 2H), 6.86 (d, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.47 (q, 1H), 3.71-3.53 (m, 4H), 3.24-2.92 (m, 2H), 2.50-2.40 (m, 10H), 2.35 (s, 3H), 1.45 (s, 9H), 0.92 (d, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.1, 169.9, 153.6, 150.4, 143.9, 135.6, 133.3, 130.2, 129.9, 127.2, 121.8, 82.4, 55.4, 54.6, 53.6, 46.0, 44.2, 43.7, 37.2, 29.6, 27.8, 21.4, 11.5.

Ejemplo 35

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-nitrobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida apropiados.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 8.38-8.34 (m, 2H), 8.05-8.00 (m, 2H), 7.16-2.12 (m, 2H), 7.03-6.94 (m, 3H), 4.74-4.68 (m, 1H), 4.15-4.14 (m, 1H), 3.41-3.32 (m, 1H), 3,23-3.14 (m, 2H), 3.08 (s, 3H), 3.03 (m, 1H), 2.98 (s, 3H), 2.05 (m, 1H), 1.66-1.48 (m, 3H), 1.47 (s, 9H).

884

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.0, 169.9, 154.8, 150.6, 150.4, 142.4, 132.9, 130.2, 129.0, 124.5, 121.6, 82.7, 62.2, 53.4, 49.4, 37.0, 36.5, 36.2, 30.1, 27.7, 24.1.

Ejemplo 36

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-[(1,1-dioxo)-tiamorfolin-3-carbonil]-L-4-(*N,N*-dimetilaminosulfoniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 21 sustituyendo los materiales de partida apropiados.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.73 (d, 1H), 7.67 (d, 1H), 7.35 (m, 2H), 7.27 (m, 2H), 6.88 (d, 1H), 6.66 (d, 1H), 5.08 (m, 0.5H), 4.97 (m, 0.5H), 4.71 (m, 0.5H), 4.61 (m, 0.5H), 4.25 (m, 0.5H), 4.03 (m, 1H), 3.21-3.04 (m, 4H), 2.89 (s, 3H), 2.83 (s, 3H), 2.78 (m, 3H), 2.42 (s, 3H), 1.44 (s, 4.5H), 1.38 (s, 4.5H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 169.8, 169.6, 164.9, 164.5, 149.3, 149.1, 145.6, 145.4, 135.4, 135.0, 134.6, 130.9, 130.6, 130.5, 127.4, 127.2, 122.0, 121.8, 83.0, 83.0, 56.0, 53.7, 49.2, 49.1, 48.5, 41.9, 41.4, 38.6, 36.8, 36.2, 27.7, 21.5.

Ejemplo 37

Síntesis de Éster *ter*-butílico *N*-(tolueno-4-sulfonil)sarcosil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

Sustituyendo tiomorfolina por N-metil-piperazina, y siguiendo el método para la preparación del Ejemplo 4, se obtuvo el compuesto del título.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.65 (d, 2H), 7.33 (d, 2H), 7.20 (d, 2H), 7.04 (d, 2H), 4.76 (m, 1H), 3.89 (m, 4H), 3.68 (d, 1H), 3.48 (d, 1H), 3.10 (m, 2H), 2.66 (m, 7H), 2.41 (s, 3H), 1.43 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 169.9, 167.2, 153.5, 150.3, 144.3, 133.1, 130.3, 130.0, 127.6, 121.8, 82.5, 53.8, 53.3, 47.0, 36.4, 37.2, 36.6, 27.8, 27.3, 27.0, 21.4.

Ejemplo 38

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-*N*-metilalanil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 34 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.65 (d, 2H), 7.34 (d, 2H), 7.27 (d, 2H), 7.09 (d, 2H), 4.64-4.50 (m, 2H), 4.48-4.23 (m, 2H), 3.60-2.96 (m, 8H), 2.92 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 0.93 (d, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 174.3, 173.1, 154.9, 151.6, 145.5, 137.0, 136.1, 131.6, 131.2, 128.5, 123.1, 56.4, 54.8, 54.0, 43.8, 37.3, 30.2, 21.5, 13.2.

Ejemplo 39

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(1,1-dioxotiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 81 siguiendo el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes

886

^{1}H NMR (CD_3OD): δ = 8.03 (m, 1H), 7.73 (d, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.28 (d, 2H), 7.08 (d, 2H), 4.70-4.65 (m, 1H), 4.12-4.00 (m, 5H), 3.38-3.36 (m, 1H), 3.31-3.06 (m, 7H), 2.43 (s, 3H), 1.77-1.48 (m, 5H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ = 168.4, 159.1, 130.0, 129.1, 125.6, 125.1, 123.0, 116.9, 57.2, 48.8, 46.3, 44.5, 31.5, 25.6, 19.3, 15.4.

Ejemplo 40

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 82 siguiendo el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR (CD_3OD): δ = 7.73 (d, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.27 (d, 2H), 7.04 (d, 2H), 4.68-4.65 (m, 1H), 4.10-4.07 (m, 1H), 3.90 (t, 2H), 3.77 (t, 2H), 3.38-3.11 (m, 4H), 2.66 (m, 4H), 2.43 (s, 3H), 1.80-1.48 (m, 5H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ = 168.4, 168.2, 149.4, 145.7, 139.8, 129.7, 129.0, 125.6, 125.1, 123.1, 116.9, 57.2, 48.8, 44.6, 42.1, 36.0, 31.4, 25.7, 22.1, 21.8, 19.3, 15.4.

Ejemplo 41

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(isonipecotoiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 80 siguiendo el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes: ^{1}H NMR (CD_3OD): δ = 8.08 (m, 1H), 7.73 (d, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.27 (d, 2H), 7.03 (d, 2H), 4.71 (m, 1H), 4.11-4.08 (m, 1H), 3.61 (t, 2H), 3.47-3.38 (m, 3H), 3.31-3.11 (m, 4H), 2.43 (s, 3H), 1.77-1.47 (m, 10H).

887 826

^{13}C NMR (CD_3OD): δ = 168.3, 168.1, 158.8, 149.6, 145.9, 139.8, 129.5, 129.0, 125.6, 125.1, 123.1, 116.9, 57.2, 48.6, 44.6, 40.6, 40.1, 36.0, 31.4, 25.7, 20.9, 20.6, 19.3.

Ejemplo 42

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(pirrolidin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 83 siguiendo el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes

^{1}H NMR (CD_3OD): δ = 8.08 (m, 1H), 7.73 (d, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.04 (d, 2H), 7.27 (d, 2H), 4.72-4.68 (m, 1H), 4.11-4.08 (m, 1H), 3.57-3.53 (t, 2H), 3.43-3.28 (m, 3H), 3.25-3.06 (m, 4H), 2.43 (s, 3H), 1.99-1.80 (m, 4H), 1.78-1.49 (m, 5H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ = 168.2, 158.3, 149.2, 145.8, 139.8, 129.4, 129.1, 125.6, 125.1, 123.1, 116.9, 57.2, 48.7, 44.5, 41.5, 31.4, 25.7, 20.6, 19.8, 19.3, 15.4.

Ejemplo 43

Síntesis de *N*-(Tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 108 siguiendo el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ = 7.73 (d, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.27 (d, 2H), 7.04 (d, 2H), 4.95-4.93 (m, 1H), 4.10-4.07 (m, 1H), 3.71-3.65 (m, 6H), 3.50 (t, 2H), 3.40-3.10 (m, 4H), 2.43 (s, 3H), 1.78-1.48 (m, 4H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ = 168.4, 168.2, 149.6, 145.7, 139.8, 129.1, 125.6, 125.1, 123.1, 116.8, 61.5, 57.2, 44.5, 36.0, 31.4, 25.6, 19.3, 15.4.

Ejemplo 44

Síntesis de Éster neopentílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

Se agregó isopropóxido de titanio (0.3 equivalentes) a éster etílico de Tos-Pro-Tyr (1 equivalente) y un exceso de alcohol neopentílico. La mezcla se calentó hasta el reflujo bajo una atmósfera de argón durante la noche. El exceso de alcohol neopentílico se retiró bajo presión reducida y el residuo se purificó en una columna de cromatografía flash (sílice, hexano: EtOAc 2:1) para dar el éster neopentílico como un sólido de color blanco (0.9g 85%). El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto en el Ejemplo 4.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ = 8.29 (d, 1H, J=7.91Hz); 7.68 (d, 2H, J=8.45Hz); 7.40 (d, 2H, J=8.34Hz); 7.24 (d, 2H, J=8.57Hz); 7.00 (d, 2H, J=8.57Hz); 4.56 (m, 1H); 4.07 (m, 1H); 3.73 (s, 2H); 3.55 (br s, 2H); 3.40 (m, 3H); 3.10 (m, 3H); 2.40 (s, 3H); 2.35 (br s, 4H); 2.20 (s, 3H); 1.55 (m, 3H); 1.37 (m, 1H); 0.85 (s, 9H).

Ejemplo 45

Síntesis de Éster neopentílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se agregó isopropóxido de titanio (0.3 equivalentes) a éster etílico de Tos-Pro-Tyr (1 equivalente) y un exceso de alcohol neopentílico. La mezcla se calentó hasta el reflujo bajo una atmósfera de argón durante la noche. El exceso de alcohol neopentílico se retiró bajo presión reducida y

el residuo se purificó en una columna de cromatografía flash (sílice, hexano: EtOAc 2:1) para dar el éster neopentílico como un sólido de color blanco (0.9g 85%). El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto en el Ejemplo 2.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ = 8.28 (d, 1H, J=8.13Hz); 7.68 (d, 2H, J=8.4Hz); 7.40 (d, 2H, J=7.9Hz); 7.23 (d, 2H, J=8.56Hz), 6.99 (d, 2H, J=8.35Hz); 4.57 (m, 3H); 2.40 (s, 3H); 1.55 (m, 3H); 1.38 (m, 1H); 0.85 (s, 9H).

Ejemplo 46

Síntesis de Éster *ter*-butílico de 2-(sacarin-2-ilo)propionoil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descritpo en el Ejemplo Preparativo A y en el Ejemplo 4.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) (1:1 mezcla de diastereómeros) δ = 8.31 (m, 1H); 8.26 (m, 1H); 8.03 (m, 3H); 7.20 (m, 2H); 7.00 (m, 2H); 4.73 (m, 1H); 4.30 (m, 1H); 3.58 (br s, 2H); 3.40 (br s, 2H); 3.02 (m, 1H); 2.95 (m, 1H); 2.35 (br s, 4H); 2.20 (s, 3H); 2.75 y 2.65 (dos d, 3H); 1.35 y 1.32 (dos s, 9H).

Ejemplo 47

Síntesis de 2-(sacarin-2-ilo)propionoil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo Preparativo A utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

890

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) (1:1 mezcla de diastereómeros) δ = 12.75 (br s, 1H); 8.28 (m, 2H); 8.05 (m, 3H); 7.20 (m, 2H); 7.00 y 9.95 (dos d, 2H); 4.75 (m, 1H); 4.40 (m, 1H); 3.10 (m, 1H); 3.05 (s, 3H); 2.95 (m, 1H); 2.90 (s, 3H); 2.75 y 2.60 (dos d, 3H).

Ejemplo 48

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-*N*-metilalanil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la síntesis del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida apropiados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.68 (d, 2H), 7.31 (d, 2H), 7.17 (d, 2H), 7.04 (d, 2H), 6.87 (d, 2H), 4.67 (m, 1H), 4.48 (q, 1H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 3.14-2.92 (m, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 1.45 (s, 9H), 0.92 (d, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.2, 169.9, 154.9, 150.6, 143.9, 135.6, 133.2, 130.2, 130.0, 127.3, 121.9, 82.5, 55.5, 53.7, 37.2, 36.6, 36.4, 29.7, 27.8, 21.4, 11.5.

Ejemplo 49

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(tiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se preparó ácido L-tiamorfolin-3-carboxílico según el método de Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* **1994**, 48, 517-525). Se preparó ácido N-(tolueno-4-sulfonil)-l-tiamorfolin-3-carboxílico según el procedimiento descripto en el Método 1. El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento para la síntesis del Ejemplo 2 con la sustitución de los materiales de partida apropiados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.69 (d, 2H), 7.31 (d, 2H), 7.16 (d, 2H), 6.98 (d, 2H), 6.86 (d, 1H), 4.71 (m, 1H), 4.62 (m, 1H), 3.94 (m, 1H), 3.31 (m, 1H), 3.09 (m, 4H), 2.98 (s, 3H), 2.67 (m, 1H), 2.50 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.31 (m, 1H), 2.10 (m, 1H), 1.49 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 169.9, 167.4, 154.8, 150.6, 144.2, 136.8, 132.8, 130.4, 130.2, 127.3, 121.8, 82.6, 55.2, 54.0, 43.3, 36.5, 36.3, 27.8, 25.2, 24.6, 21.4.

Ejemplo 50

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)sarcosil-L-4-(1,1-dioxotiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 121 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ = 7.67 (d, 2H), 7.40 (d, 2H), 7.27 (d, 2H), 7.09 (d, 2H), 4.61 (m, 1H), 4.12 (m, 2H), 3.99 (m, 2H), 3.60 (m, 2H), 3.23 (m, 8H), 2.58 (s, 3H), 2.42 (s, 3H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ = 174.2, 170.3, 155.0, 151.6, 145.6, 136.1, 135.2, 131.5, 131.1, 128.9, 123.0, 54.6, 54.0, 52.4, 52.2, 44.4, 44.0, 37.4, 36.8, 21.4.

Ejemplo 51

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 49 siguiendo el procedimiento descripto por Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* **1994**, 48, 522).

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.76 (d, 2H), 7.37 (d, 2H), 7.08 (d, 2H), 6.98 (d, 2H), 6.56 (d, 1H), 4.95 (m, 1H), 4.62 (m, 1H), 3.99 (m, 2H), 3.25 (m, 1H), 3.07 (s, 3H), 2.97 (m, 8H), 2.44 (s, 3H), 1.48 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.0, 164.8, 154.9, 150.7, 145.4, 135.3, 132.6, 130.7, 130.3, 127.5, 122.3, 82.8, 56.1, 53.6, 49.5, 48.6, 41.6, 36.6, 36.4, 27.9, 21.6.

Ejemplo 52

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 71.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.75 (d, 2H), 7.36 (d, 2H), 7.12 (d, 2H), 6.98 (d, 2H), 6.58 (d, 1H), 4.93 (m, 1H), 4.63 (m, 1H), 4.09 (m, 2H), 3.72 (m, 4H), 3.63 (m, 2H), 3.51 (m, 2H), 3.24 (m, 1H), 2.96 (m, 4H), 2.43 (s, 3H), 1.46 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.0, 164.8, 153.7, 150.4, 145.4, 135.2, 132.9, 130.7, 130.4, 127.5, 122.1, 82.9, 66.4, 56.1, 53.6, 49.4, 48.5, 44.7, 43.9, 41.6, 36.3, 27.8, 21.6.

Ejemplo 53

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-*N*-metilalanil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 48 siguiendo el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.68 (d, 2H), 7.31 (d, 2H), 7.20 (d, 2H), 7.11-7.04 (m, 3H), 6.35 (br s, 1H), 4.81 (m, 1H), 4.52 (q, 1H), 3.35-2.98 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.45 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 0.91 (d, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 173.7, 170.8, 155.2, 150.6, 144.0, 135.4, 133.2, 130.2, 130.0, 127.3, 122.1, 55.5, 53.2, 36.6, 36.5, 36.4, 29.8, 21.4, 11.6.

Ejemplo 54

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(tiamorfolin-3-carbonil)- L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se preparó ácido L-tiamorfolin-3-carboxílico mediante el método de Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* **1994**, 48, 517-525). Se preparó ácido N-(tolueno-4-sulfonil)-L-tiamorfolin-3-carboxílico mediante el procedimiento descripto en el Método 1.

Se preparó entonces el compuesto del título siguiendo el procedimiento para la Síntesis del Ejemplo 2.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.87-7.82 (m, 2H), 7.20 (t, 2H), 7.16 (d, 2H), 7.00 (d, 2H), 6.76 (d, 1H), 4.74 (t, 1H), 4.65 (q, 1H), 3.92 (d, 1H), 3.32 (dd, 1H), 3.17-3.00 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 2.99 (s, 3H), 2.76-2.66 (m, 1H), 2.62 (dd, 1H), 2.46 (dt, 1H), 2.22 (d, 1H), 1.49 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.0, 167.2, 165.5, 154.8, 150.7, 135.8, 132.7, 130.5, 130.1, 121.9, 116.9, 82.8, 55.3, 53.9, 43.4, 36.6, 36.4, 36.3, 27.9, 25.8, 25.0.

Ejemplo 55

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 54 siguiendo el procedimiento descripto por Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* **1994**, 48, 522).

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.92-7.88 (m, 2H), 7.24 (t, 2H), 7.09 (d, 2H), 6.97 (d, 2H), 6.41 (d, 1H), 4.96 (d, 1H), 4.62 (d, 1H), 4.03 (d, 1H), 3.26 (dd, 1H), 3.13-2.92 (m, 6H), 3.09 (s, 3H), 2.97 (s, 3H), 1.49 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.1, 165.9, 164.5, 154.9, 150.7, 134.0, 132.4, 130.5, 130.4, 122.2, 117.3, 83.0, 56.1, 53.4, 50.0, 49.1, 41.7, 36.6, 36.3, 36.1, 27.9.

Ejemplo 56

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(piridina-3-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se acopló N-bencil-L-prolina a éster t-butílico de L-tirosina utilizando el procedimiento descripto en el Método 12. Se preparó éster t-butílico de N-bencil-L-prolil-L-(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenil-alanina siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2. Se preparó éster t-butílico de L-prolil-L-(4-*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina a partir del producto de la reacción previa utilizando el procedimiento descripto en el Método 4. El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento

descripto para la preparación de cloruro de 3-piridina sulfonilo (ver Crowell *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1989, *32*, 2436-2442) y el producto de la última reacción.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 9.95 (d, 1H), 8.83 (dd, 1H), 8.14-8.10 (m, 1H), 7.51-7.47 (m, 1H), 7.16-7.13 (m, 3H), 7.02-6.99 (m, 2H), 4.72-4.69 (m, 1H), 4.09-4.06 (m, 1H), 3.41-3.39 (m,1H), 3.23-3.17 (m, 1H), 3.13-2.98 (m, 1H), 3.07 (s, 3H), 2.97 (s, 3H), 2.04 (m, 1H), 1.59-1.47 (m, 3H), 1.45 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.1, 169.9,154.8, 153.9, 150.5, 148.4, 135.5, 133.0, 130.1, 123.9, 121.6, 82.6, 52.2, 53.6, 49.5, 37.1, 36.5, 36.3, 29.9, 27.8, 24.0.

Ejemplo Preparativo B

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(pirimidine-2-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó sustituyendo cloruro de 2-pirimidin sulfonilo (ver Skulnick *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1997, *40*, 1149-1164) y siguiendo el método para la preparación del Ejemplo 56.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 8.28 (d, 2H), 7.39 (d, 1H), 7.02 (d, 2H), 6.88 (d, 2H), 6.54 (m, 1H), 4.76-4.69 (m, 1H), 4.57-4.55 (m, 1H), 3.64 (m, 1H), 3.55-3.52 (m, 1H), 3.09-3.03 (m, 1H), 3.08 (s, 3H), 2.99-2.95 (m, 1H), 2.98 (s, 3H), 2.32 (m, 1H), 2.01-1.97 (m, 3H), 1.37 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 172.1, 170.4, 160.6, 157.7, 154.8, 150.3, 133.0, 130.1, 121.3, 110.5, 82.0, 60.7, 53.3, 47.5, 37.1, 36.5, 36.3, 28.9, 27.7, 24.1.

Ejemplo 57

Síntesis de *N*-(4-nitrobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 35 siguiendo el procedimiento descripto en el método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 8.36 (d, 2H), 8.02 (d, 2H), 7.42 (d, 1H), 7.20 (d, 2H), 7.01 (d, 2H), 4.86 (m, 1H), 4.18-4.15 (m, 1H), 3.46-3.43 (m, 1H), 3.32-3.26 (m, 1H), 3.19-3.11 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.01 (s, 3H), 1.91 (m, 1H), 1.65-1.54 (m, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 172.9, 171.7, 155.5, 150.4, 150.4, 142.1, 133.2, 130.5, 129.1, 124.6, 121.8, 61.9, 52.9, 49.6, 36.6, 36.3, 36.3, 30.6, 24.1.

Ejemplo 58

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-cyanobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.94 (d, 2H), 7.82 (d, 2H), 7.13 (d, 2H), 7.05-6.99 (m, 3H), 4.71-4.66 (m, 1H), 4.12-4.09 (m, 1H), 3.36-3.35 (m, 1H), 3.22-3.11 (m, 2H), 3.07 (s, 3H), 3.06-3.01 (m, 1H), 2.97 (s, 3H), 2.05 (m, 1H), 1.63-1.37 (m, 3H), 1.46 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.1, 169.9, 154.8, 150.6, 140.8, 133.1, 132.9, 130.2, 128.4, 121.7, 117.1, 116.9, 82.7, 62.2, 53.4, 49.4, 37.0, 36.5, 36.3, 30.1, 27.8, 24.1.

Ejemplo 59

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilaminosulfoniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 36 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ = 7.79 (m, 2H), 7.44 (m, 2H), 7.27 (m, 2H), 7.17 (m, 2H), 5.21 (m, 1H), 4.64 (m, 1H), 4.14 (m, 1H), 3.61 (m, 2H), 3.24 (m, 2H), 3.08 (m, 2H), 2.89 (s, 6H), 2.80 (m, 2H), 2.43 (s, 3H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ = 173.9, 168.1, 168.0, 150.8, 150.8, 146.7, 146.5, 137.6, 137.5, 137.1, 136.9, 132.2, 132.1, 131.7, 131.6, 128.8, 123.3, 123.1, 57.3, 54.8, 51.0, 50.8, 50.5, 47.9, 47.8, 43.2, 43.0, 39.0, 39.0, 37.4, 37.0, 21.5.

Ejemplo 60

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 51 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.79 (d, 2H), 7.43 (d, 2H), 7.20 (d, 2H), 7.00 (d, 2H), 5.21 (m, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.12 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.29 (m, 3H), 3.08 (s, 3H), 3.00 (m, 1H), 3.00 (m, 1H), 2.97 (s, 3H), 2.80 (m, 3H), 2.44 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 165.1, 159.0, 147.9, 143.1, 137.6, 128.6, 126.1, 122.7, 122.6, 119.8, 114.3, 48.3, 45.8, 41.6, 34.0, 28.0, 27.8, 27.7, 12.5.

Ejemplo 61

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxo)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir de éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina, preparado como se describe en los ejemplos mostrados en la presente, siguiendo el procedimiento descripto por Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* **1994**, 48, 522).

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.77 (d, 2H), 7.38 (d, 2H), 7.18 (m, 3H), 7.09 (d, 2H), 4.83-4.57 (m, 3.H), 3.77-3.60 (m, 2H), 3.36-3.23 (m, 1H), 3.15-3.00 (m, 7H), 2.85-2.73 (m, 1H), 2.46 (s, 3H), 1.50 (s, 9H).

Ejemplo 62

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para a preparación del Ejemplo sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDC1_3$): δ = 7.96 (d, 2H), 7.80 (d, 2H), 7.26-7.13 (m, 3H), 7.01 (d, 2H), 4.72-4.70 (m, 1H), 4.11-4.08 (m, 1H), 3.40-3.37 (m, 1H), 3.25-3.10 (m, 2H), 3.07 (s, 3H), 3.04-3.02 (m, 1H), 2.98 (s, 3H), 2.06 (m, 1H), 2.06-2.04 (m, 1H), 1.61-1.52 (m, 3H), 1.46 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDC1_3$): δ = 170.3, 169.9, 154.9, 150.6, 139.9, 134.9, 133.1, 130.2, 128.4, 126.5, 121.7, 82.7, 62.3, 5.35, 49.6, 37.2, 36.6, 36.3, 30.0, 27.8 24.1.

899

Ejemplo 63

Síntesis de *N*-(1-metilpirazolil-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 117 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 8.84 (br s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.68-7.65 (m, 1H), 7.18 (d, 2H), 6.99 (d, 2H), 4.88-4.81 (m, 1H), 4.08-4.06 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.45-3.40 (m, 1H), 3.34-3.27 (m, 1H), 3.11-3.01 (m, 5H), 2.97 (s, 3H), 1.82 (m, 1H), 1.66-1.57 (m, 2H), 1.45 (m, 1H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 173.1, 172.9, 159.1, 158.6, 150.4, 138.8, 133.4, 133.2, 130.3, 121.9, 117.3, 62.0, 53.1, 49.7, 39.4, 36.6, 36.5, 36.4, 30.4, 23.9.

Ejemplo 64

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxo)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 61 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 8.34 (d, 1H), 7.70 (d, 2H), 7.33 (d, 2H), 7.14 (d, 2H), 7.01 (d, 2H), 5.07 (m, 1H), 4.93 (m, 1H), 4.43 (d, 1H), 4.01 (d, 1H), 3.68 (m, 1H), 3.37 (m, 1H), 3.17 (s, 3H), 3.14 (m, 1H), 3.09 (s, 3H), 2.54 (m, 1H), 2.43 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 171.5, 166.4, 156.4, 150.5, 145.5, 134.2, 134.1, 131.4, 130.3, 128.1, 121.8, 64.3, 59.2, 53.7, 50.5, 36.9, 36.5, 35.8, 21.6.

Ejemplo 65

Síntesis de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 84 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.83 (m, 2H), 7.73 (d, 1H), 7.16 (m, 4H), 6.99 (d, 2H), 5.57 (br s, 1H), 4.87 (m, 1H), 4.76 (m, 1H), 4.53 (d, 1H), 4.10 (d, 1H), 3.34 (m, 1H), 3.22 (d, 2H), 3.12 (s, 3H), 3.04 (s, 3H), 2.43 (m, 1H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 172.1, 168.7, 155.7, 150.5, 133.6, 133.1, 130.8, 130.7, 121.7, 116.9, 116.6, 65.3, 53.3, 51.3, 36.8, 36.4, 36.1, 33.4.

Ejemplo 66

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)-tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.91 (m, 2H), 7.26 (m, 4H), 7.02 (d, 2H), 6.96 (d, 1H), 4.75 (m, 1H), 4.55 (d, 1H), 4.42 (d, 1H), 3.86 (s, 1H), 3.08 (s, 3H), 3.05 (m, 2H), 3.00 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.17 (s, 3H), 1.16 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 169.9, 168.1, 167.6, 164.2, 154.9, 150.6, 133.1, 132.2, 131.0, 130.9, 130.4, 121.7, 116.9, 116.6, 82.7, 73.5, 54.7, 53.7, 50.5, 37.8, 36.6, 36.4, 29.1, 27.8, 23.8.

Ejemplo 67

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(1,1-dioxotiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 68.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.91-7.87 (m, 2H), 7.27-7.25 (m, 2H), 7.15 (d, 2H), 6.51 (d, 1H), 4.93-4.90 (m, 1H), 4.64 -4.58 (m, 1H), 4.14-3.99 (m, 7H), 3.28-2.90 (m, 10H), 1.47 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.1, 167.6, 164.5, 153.1, 149.8, 133.9, 133.4, 130.7, 130.5, 121.7, 117.4, 117.1, 83.1, 56.1, 53.4, 51.6, 49.9, 48.9, 43.1, 41.6, 36.2, 27.8.

Ejemplo 68

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(1,1-dioxotiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

Sustituyendo tiomorfolina por N-metil piperazina, y siguiendo el método para la preparación del Ejemplo 4 y oxidación del grupo sulfuro en el anillo tiomorfolino según Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* **1994**, 48, 522) se obtuvo el compuesto del título como un sólido de color blanco.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.75 (d, 2H), 7.35 (d, 2H), 7.17 (d, 2H), 6.99 (d, 2H), 6.65 (d, 1H), 4.92-4.90 (m, 1H), 4.63-4.60 (m, 1H), 4.15-3.95 (m, 7H), 3.30-3.23 (m, 1H), 3.14 (t, 4H), 3.07-2.80 (m, 6H), 2.45 (s, 3H), 1.48 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 169.9, 164.8, 153.1, 149.8, 145.5, 135.1, 133.6, 130.7, 127.5, 121.8, 82.9, 60.3, 56.1, 53.7, 51.8, 49.3, 48.4, 43.1, 42.7, 41.5, 36.3, 27.8, 21.5.

Ejemplo 69

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto en el Ejemplo 37 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.88-7.83 (m, 2H), 7.26-7.15 (m, 5H), 7.01 (d, 2H), 4.74-4.67 (m, 1H), 4.08-4.05 (m, 1H), 3.91-3.80 (m, 4H), 3.41-3.35 (m, 1H), 3.24-3.00 (m, 3H), 2.70-2.65 (t, 4H), 2.06-2.04 (m, 1H). 1.60-1.46 (m, 12H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.5, 169.8, 153.4, 150.2, 133.5, 130.7, 130.5, 130.3, 121.6, 116.8, 116.5, 82.6, 62.2, 53.6, 49.6, 47.0, 46.4, 37.2, 29.8, 27.8, 27.3, 27.0, 24.1.

Ejemplo 70

Síntesis de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)-tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 66 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.90 (m, 2H), 7.30-7.14 (m, 5H), 7.02 (d, 2H), 5.83 (br s, 1H), 4.90 (m, 1H), 4.57 (d, 1H), 4.40 (d, 1H), 3.96 (s, 1H), 3.09 (s, 3H), 3.28-3.02 (m, 2H), 3.00 (s, 3H), 1.13 (s, 6H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 173.2, 169.2, 164.2, 163.9, 155.3, 150.6, 133.1, 132.0, 131.0, 130.9, 130.6, 122.0, 117.0, 116.7, 73.3, 54.6, 53.3, 50.5, 37.0, 36.7, 36.4, 29.0, 23.7.

Ejemplo 71

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

Sustituyendo cloruro de 4-morfolincarbamilo por cloruro dimetilcarbamilo, y siguiendo los métodos para la preparación del Ejemplo, se obtuvo el compuesto del título como un sólido de color blanco.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.91-7.87 (m, 2H), 7.26-7.20 (m, 2H), 7.11 (d, 2H), 6.98 (d, 2H), 6.43 (d, 1H), 4.95-4.92 (m, 1H), 4.62-4.60 (m, 1H), 4.05-4.00 (m, 2H), 3.74 (t, 4H), 3.66-3.52 (m, 4H), 3.30-2.92 (m, 6H), 1.48 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.1, 164.5, 150.4, 134.6, 132.7, 130.5, 122.0, 117.4, 117.1, 83.1, 66.5, 56.1, 53.4, 49.9, 49.0, 44.7, 44.0, 41.6, 36.2, 27.8.

Ejemplo 72

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-trifluorometoxibencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.89 (d, 2H), 7.35 (d, 2H), 7.25-7.13 (m, 3H), 7.01 (d, 2H), 4.70 (m, 1H), 4.09-4.06 (m, 1H), 3.39-3.36 (m, 1H), 3.24-3.01 (m, 5H), 2.98 (s, 3H), 2.05 (m, 1H), 1.62-1.47 (m, 3H), 1.46 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.4, 169.9, 154.9, 152.7, 150.6, 134.6, 113.2, 130.2, 130.1, 121.7, 120.2, 82.7, 62.2, 53.6, 49.6, 37.2, 36.6, 36.3, 29.9, 27.8, 24.1.

Ejemplo 73

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Siguiendo el método para la preparación del Ejemplo 2 y la oxidación del grupo sulfuro en el anillo tiomorfolino según Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* **1994**, 48, 522) se obtuvo el compuesto del título.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.70 (d, 2H), 7.31 (d, 2H), 7.04 (d, 2H), 6.93 (d, 2H), 6.59 (d, 1H), 5.01 (m, 2H), 4.65 (m, 1H), 4.01 (d, 1H), 3.90 (d, 1H), 3.25 (m, 1H), 3.00 (s, 3H), 2.82 (m, 8H), 2.37 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.20 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.3, 165.0, 154.6, 150.5, 145.1, 135.2, 132.3, 130.4, 130.0, 127.2, 122.1, 69.5, 55.9, 53.1, 49.1, 48.5, 41.4, 36.3, 36.1, 35.9, 21.4.

Ejemplo 74

Síntesis de Éster *ter*-Butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxo-5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 66 siguiendo el procedimiento descripto por Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* **1994**, 48, 522).

905

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.88 (m, 2H), 7.24 (m, 4H), 7.05 (d, 2H), 6.95 (d, 1H), 4.80 (m, 1H), 4.40 (m, 2H), 4.10 (s, 1H), 3.17-3.03 (m, 2H), 3.10 (s, 3H), 3.01 (s, 3H), 1.47 (s, 9H), 1.36 (s, 3H), 1.11 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 169.8, 168.6, 166.0, 154.5, 150.8, 139.7, 133.0, 131.5, 131.4, 130.3, 122.0, 117.1, 116.8, 83.0, 68.0, 60.9, 59.3, 53.8, 37.4, 36.6, 36.4, 27.8, 18.9, 18.8.

Ejemplo 75

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxo-5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 11 siguiendo el procedimiento descripto por Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* **1994**, 48, 522).

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.75 (d, 2H), 7.38 (d, 2H), 7.21 (d, 2H), 7.03 (m, 3H), 5.08 (m, 1H), 4.89 (m, 1H), 4.38 (m, 2H), 4.10 (s, 1H), 3.22-3.04 (m, 2H), 3.10 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 1.26 (m, 9H), 1.09 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.3, 166.3, 150.8, 145.9, 132.8, 131.9, 130.3, 128.6, 122.0, 69.8, 68.0, 60.9, 59.4, 53.4, 37.4, 36.6, 36.4, 21.6, 21.5, 19.2, 18.6.

Ejemplo 76

Síntesis de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 74 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 171.7, 167.9, 137.3, 164.5, 155.9, 150.4, 133.6, 131.8, 131.3, 131.2, 130.8, 121.9, 117.1, 116.8, 67.8, 60.9, 59.9, 53.8, 36.8, 36.6, 36.0, 19.1, 19.0.

Ejemplo 77

Síntesis de *N*-(pirimidine-2-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo Preparativo B utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 8.45 (br m, 2H), 8.22 (br s, 1H), 7.55 (d, 1H), 7.11 (d, 2H), 6.95 (d, 2H), 6.81 (m, 1H), 4.80-4.74 (m, 2H), 3.70 (m, 1H), 3.55 (m, 1H), 3.20-3.08 (m, 4H), 2.98 (s, 3H), 2.89-2.76 (m, 1H), 2.13-1.96 (m, 3H), 1.60 (m, 1H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 190.0, 173.6, 171.0, 155.2, 153.9, 150.6, 133.2, 130.1, 121.9, 110.3, 62.0, 55.1, 48.2, 36.6, 36.6, 36.3, 30.2, 23.4.

Ejemplo 78

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

Siguiendo el método para la preparación del Ejemplo 4 y oxidando el grupo sulfuro en anillo tiamorfolino según Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* **1994**, 48, 522) se obtuvo el compuesto del título.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.76 (d, 2H), 7.37 (d, 2H), 7.12 (d, 2H), 6.96 (d, 2H), 6.57 (d, 1H), 4.95 (m, 1H), 4.62 (m, 1H), 4.03 (m, 2H), 3.67 (m, 4H), 3.25 (m, 1H), 2,89 (m, 4H), 2.45 (m, 6H), 2.35 (s, 3H), 1.48 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.0, 164.8, 153.7, 150.5, 145.4, 135.3, 132.8, 130.7, 130.4, 127.5, 122.2, 82.9, 56.2, 54.6, 54.5, 53.6, 49.5, 48.6, 46.0, 44.2, 43.7, 41.6, 36.3, 27.9, 21.6.

Ejemplo 79

Síntesis de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxo)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 85 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 4.98, (m, 1H), 4.90 (m, 1H), 4.44 (d, 1H), 4.03 (d, 1H), 3.67 (m, 1H), 3.37(m, 1H), 3.25-3.02 (m, 1H), 3.20 (s, 3H), 3.11 (s, 3H), 2.68 (m, 1H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 171.7, 167.9, 166.3, 164.4, 157.0, 156.4, 150.5, 139.6, 134.0, 133.1, 131.3, 131.1, 130.9, 121.9, 117.2, 116.9, 64.1, 58.8, 53.7, 50.6, 36.9, 36.5, 35.6.

Ejemplo 80

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(isonipecotoiloxi)fenilalanina

Sustituyendo piperazina por N-metil piperazina, y siguiendo los métodos para la preparación del Ejemplo 4, se obtuvo el compuesto del título como un sólido blanco.

Los datos NMR son los siguientes:

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 7.70 (d, 2H), 7.32-7.26 (m, 2H), 7.14 (d, 2H), 7.01 (d, 2H), 4.72-4.68 (m, 1H), 4.07-4.05 (m, 1H), 3.60-3.49 (m, 4H), 3.37-3.31 (m, 1H), 3.22-2.98 (m, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.02 (m, 2H), 1.61-1.55 (m, 6H), 1.50-1.45 (m, 13H).

908

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 177.3, 170.7, 169.8, 150.6, 144.3, 133.1, 130.1, 129.9, 127.9, 121.6, 110.8, 82.5, 62.2, 57.2, 53.7, 49.5, 44.9, 37.2, 29.7, 27.8, 25.7, 24.1, 21.4.

Ejemplo 81

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(1,1-dioxotiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El producto del Ejemplo 82 se oxidó según el método de Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* 1994, 48, 517-525), dando el compuesto del título como un sólido de color blanco.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.69 (d, 2H), 7.33-7.29 (m, 3H), 7.20 (d, 2H), 7.00 (d, 2H), 4.71-4.66 (m, 1H), 4.13-4.04 (m, 5H), 3.37-3.32 (m, 1H), 3.21-3.00 (m, 7H), 2.41 (s, 3H), 2.05-2.01 (m, 1H), 1.52-1.44 (m, 12H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.7, 169.7, 149.8, 144.3, 134.4, 133.3, 130,6, 130.0, 127.9, 121.4, 82.7, 62.4, 54.0, 52.1, 49.7, 43.2, 37.6, 29.7, 28.1, 24.4, 21.7.

Ejemplo 82

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

Sustituyendo tiomorfolina por N-metil piperazina, y siguiendo los métodos para la preparación del Ejemplo 4, dio el compuesto del título como un sólido de color blanco.

Los datos NMR son los siguientes:

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 7.70 (d, 2H), 7.31-7.26 (m, 2H), 7.16 (d, 2H), 7.00 (d, 2H), 4.72-4.66 (m, 1H), 4.07-4.04 (m, 1H), 3.89-3.79 (m, 4H),

3.37-3.32 (m, 1H), 3.22-2.99 (m, 3H), 2.67 (t, 4H), 2.42 (s, 3H), 2.02 (m, 2H), 1.50-1.45 (m, 12H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 177.2, 170.7, 169.8, 153.5, 150.2, 144.3, 133.6, 132.9, 130.3, 129.9, 127.9, 121.5, 82.5, 62.4, 53.7, 49.5, 47.0, 46.4, 37.2, 29.6, 27.8, 27.3, 24.1, 21.4.

Ejemplo 83

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(pirrolidin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

Sustituyendo cloruro de pirrolidincarbonilo por cloruro de dimetilcarbamilo, y siguiendo los métodos para la preparación del Ejemplo 2, se obtuvo el compuesto del título como un sólido de color blanco.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.71 (d, 2H), 7.32 (d, 2H), 7.15 (d, 2H), 7.04 (d, 2H), 4.73-4.67 (m, 1H), 4.07-4.04 (m, 1H), 3.53 (t, 2H), 3.45 (t, 2H), 3.36-3.32 (m, 1H), 3.24-2.98 (m, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.03-1.88 (m, 5H), 1.75 (s, 1H), 1.52 (1.24 (m, 12H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.7, 169.8, 153.1, 150.4, 144.3, 133.1, 130.1, 129.9, 127.9, 121.6, 110.8, 99.8, 82.5, 62.2, 53.7, 49.5, 46.3, 37.2, 29.7, 27.8, 25.6, 24.8, 24.0, 21.4.

Ejemplo 84

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo los procedimientos descriptos para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida apropiados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.87 (m, 2H), 7.28-7.13 (m, 5H), 7.02 (d, 2H), 4.70-4.60 (m, 2H), 4.58 (d, 1H), 4.06 (d, 1H), 3.38-3.01 (m, 3H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.58 (m, 1H), 1.47 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 169.7, 167.8, 154.9, 150.7, 132.7, 130.9, 130.7, 130.4, 121.8, 117.1, 116.8, 82.9, 65.1, 53.9, 51.4, 36.8, 36.6, 36.4, 33.1, 27.9.

Ejemplo 85

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxo)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 84 siguiendo el procedimiento de oxidación de Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* 1994, 48, 517-525).

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.90 (m, 2H), 7.30-7.04 (m, 7H), 4.83-4.58 (m, 3H), 3.66 (m, 2H), 3.32-3.24 (m, 1H), 3.09-2.85 (m,2H), 3.10 (s, 3H), 3.01 (s, 3H), 1.50 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 173.1, 169.8, 168.0, 165.6,154.9, 150.9, 132.6, 131.1, 131.0, 130.3, 122.3, 117.3, 117.0, 83.2, 62.8, 57.8, 53.9, 49.0, 36.8, 36.6, 36.4, 27.9.

Ejemplo 86

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(2,5-diclorotiofeno-3-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.14 (d, 2H), 7.09 (s, 1H), 7.07 (d, 1H), 7.01 (d, 2H), 4.73-4.66 (m, 1H), 4.32-4.28 (m, 1H), 3.42-3.17 (m, 3H), 3.08 (s, 3H), 3.06-3.01 (m, 1H), 2.98 (s, 3H), 2.17-2.04 (m, 1H), 1.84-1.60 (m, 2H), 1.60-1.46 (m, 1H), 1.45 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.2, 169.9, 154.9, 150.6, 133.4, 133.1, 131.2, 130.2, 127.9, 127.0, 121.7, 82.7, 62.2, 53.6, 49.3, 37.2, 36.6, 36.4, 30.1, 27.8, 24.2.

Ejemplo 87

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-acetamidobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo los procedimientos descriptos para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 8.58 (s, 1H), 7.70-7.67 (m, 4H), 7.32 (d, 1H), 7.14 (d, 2H), 7.01 (d, 2H), 4.68 (m, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.37-3.34 (m, 1H), 3.23-3.16 (m, 1H), 3.11-3.01 (m, 1H), 3.08 (s, 3H), 2.98 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.97-1.94 (m, 1H), 1.55-1.47 (m, 3H), 1.44 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 171.1, 169.9, 169.4, 155.0, 150.6, 143.3, 133.3, 130.2, 130.0, 128.9, 121.7, 119.4, 82.7, 62.2, 53.8, 49.6, 37.2, 36.6, 36.4, 29.9, 27.8, 24.4, 24.1.

Ejemplo 88

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-*ter*-butílicobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento para la preparación del Ejemplo 73 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.81 (d, 2H), 7.59 (d, 2H), 7.07 (d, 2H), 6.97 (d, 2H), 6.46 (d, 1H), 4.95 (m, 1H), 4.62 (m, 1H), 4.06 (m, 2H), 3.23 (m, 1H), 3.07 (m, 4H), 2.97 (m, 4H), 2.81 (m, 4H), 1.55 (s, 9H), 1.37 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.0, 164.9, 158.2, 154.8, 150.6, 135.0, 132.6, 130.2, 127.4, 126.9, 122.2, 82.7, 56.1, 53.5, 49.7, 48.8, 41.5, 36.5, 36.3, 36.1, 35.2, 30.8, 27.8.

Ejemplo 89

Síntesis de *N*-(piridina-3-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 56 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ = 8.95 (s, 1H), 8.83 (d, 1H), 8.28-8.24 (m, 1H), 7.73-7.69 (m, 1H), 7.30 (d, 2H), 7.05 (d, 2H), 4.68-4.63 (m, 1H), 4.29-4.25 (m, 1H), 3.47-3.41 (m, 1H), 3.38-3.22 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.06-3.02 (m, 1H), 2.96 (s, 3H), 1.92-1.66 (m, 4H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ = 174.2, 173.9, 160.6, 160.0, 156.9, 152.9, 152.0, 147.9, 139.1, 136.9, 135.7, 131.6, 126.5, 123.1, 63.1, 54.8, 50.4, 37.5, 36.8, 36.7, 32.2, 25.5.

Ejemplo 90

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(2-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

913

Se preparó ácido L-tiamorfolin-3-carboxílico según el método de Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* **1994**, 48, 517-525). Se preparó ácido *N*-(2-fluorobenceno-4-sulfonil)-L-tiamorfolin-3-carboxílico utilizando el proecedimiento descripto en el Método 1. El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos arriba descriptos utilizando materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.92 (m, 1H), 7.69 (m, 1H), 7.34 (m, 2H), 7.16 (m, 2H), 6.99 (m, 2H), 6.60 (d, 1H), 5.01 (m, 1H), 4.64 (m, 1H), 4.03 (m, 2H), 3.29 (m, 1H), 3.06 (m, 6H), 2.90 (m, 7H), 1.49 (d, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 169.9, 164.8, 160.3, 156.9, 154.9, 150.7, 136.6, 136.4, 132.7, 131.0, 130.3, 128.8, 126.4, 126.2, 125.1, 122.2, 118.1, 117.8, 82.7, 56.3, 56.7, 50.2, 49.5, 41.8, 36.5, 36.3, 27.8.

Ejemplo 91

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(3-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se preparó ácido L-tiamorfolin-5-carboxílico según el método de Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* **1994**, 48, 517-525). Se preparó ácido *N*-(3-fluorobenceno-4-sulfonil)-L-tiamorfolin-5-carboxílico utilizando el procedmiento descripto en el Método 1. El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos arriba descriptos utilizando materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.66 (m, 1H), 7.58 (m, 2H), 7.34 (m, 1H), 7.07 (d, 1H), 6.92 (d, 1H), 6.42 (d, 1H), 5.00 (m, 1H), 4.58 (m, 1H), 4.02 (m, 2H), 3.22 (m, 1H), 3.05 (s, 3H), 2.98 (m, 6H), 1.45 (s, 9H).

914

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.0, 164.5, 164.4, 161.0, 154.9, 150.6, 140.3, 140.2, 132.5, 131.9, 131.8, 130.2, 123.2, 123.1, 122.2, 121.4, 121.2, 115.0, 114.7, 82.9, 56.1, 53.4, 49.9, 49.1, 41.7, 36.5, 36.3, 36.0, 27.8.

Ejemplo 92

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(2,4-difluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se preparó ácido L-tiamorfolin-5-carboxílico según el método de Larsson y Carlson (*Acta Chemica Scan.* **1994**, 48, 517-525). Se preparó ácido *N*-(2,4-difluorobenceno-4-sulfonil)-L-tiamorfoline-5-carboxílico utilizando el procedmiento descripto en el Método 1. El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos arriba descriptos utilizando materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.93 (m, 1H), 7.15 (m, 2H), 7.04 (m, 4H), 6.53 (d, 1H), 4.97 (m, 1H), 4.64 (m, 1H), 4.05 (m, 2H), 3.21 (m, 3H), 3.17 (s, 3H), 2.97 (m, 5H), 1.43 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.0, 164.6, 154.9, 150.7, 132.6, 132.6, 130.3, 122.6, 122.1, 112.6, 112.3, 107.0, 106.7, 106.3, 82.8, 56.3, 53.5, 50.5, 49.8, 42.0, 36.5, 36.3, 27.8.

Ejemplo 93

Síntesis de *N*-(4-acetamidobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 87 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ = 8.05 (d, 1H), 7.78 (m, 4H), 7.26 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 4.94 (m, 1H), 4.72-4.67 (m, 1H), 4.13-4.09 (m, 1H), 3.40-3.36 (m, 1H), 3.30-3.05 (m, 3H), 3.08 (s, 3H), 2.97 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.81-1.51 (m, 4H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ = 174.3, 174.2, 172.3, 156.9, 152.0, 144.9, 135.5, 132.4, 131.6, 130.2, 122.9, 120.7, 63.2, 54.7, 50.6, 37.5, 36.8, 36.7, 31.7, 25.4, 24.0.

Ejemplo 94

Síntesis de *N*-(4-trifluorometoxibencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 72 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ = 7.93 (d, 2H), 7.48 (d, 2H), 7.28 (d, 2H), 7.03 (d, 2H), 4.72-4.68 (m, 1H), 4.17-4.13 (m, 1H), 3.45-3.42 (m, 1H), 3.28-3.11 (m, 2H), 3.14-3.07 (m, 1H), 3.09 (s, 3H), 2.97 (s, 3H), 1.85-1.69 (m, 3H), 1.59 (m, 1H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ = 174.2, 174.1, 157.0, 153.9, 152.0, 137.3, 135.6, 131.7, 131.5, 123.0, 122.5, 121.8, 63.1, 54.7, 50.6, 37.4, 36.8, 36.6, 31.9, 25.4.

Ejemplo 95

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descripto en el Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.90 (m, 2H), 7.22 (m, 4H), 7.00 (m, 3H), 5.08 (m, 1H), 4.84 (m, 1H), 4.56 (d, 1H), 4.42 (d, 1H), 3.88 (s, 1H), 3.15-2.99 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 1.26-1.16 (m, 12H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.4, 168.2, 167.5, 164.1, 154.9,150.7, 132.8, 132.2, 132.1, 131.0, 130.8, 130.3, 121.8, 116.9, 116.6, 73.5, 69.6, 54.6, 53.2, 50.5, 37.6, 36.6, 36.3, 29.1, 23.8, 21.6, 21.5.

Ejemplo 96

Síntesis de *N*-(4-cianobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 58 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ = 8.14 (d, 1H), 7.94-7.89 (m, 4H), 7.29 (d, 2H), 7.03 (d, 2H), 4.70-4.66 (m, 1H), 4.21-4.17 (m, 1H), 3.47-3.40 (m, 1H), 3.31-3.21 (m, 2H), 3.11-3.04 (m, 1H), 3.09 (s, 3H), 2.97 (s, 3H), 1.87-1.72 (m, 3H), 1.70-1.61 (m, 1H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ = 174.2, 173.9, 157.0, 152.0, 142.9, 135.7, 134.5, 131.7, 129.7, 123.0, 118.6, 111.8, 63.0, 54.7, 50.5, 37.4, 36.8, 36.7, 32.0, 25.4.

Ejemplo 97

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(3,3-dimetil)prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 98.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.76 (d, 1H), 7.75 (d, 1H), 7.35 (d, 1H), 7.34 (d, 1H), 7.33 (d, 1H), 7.20 (d, 1H), 7.10 (d, 1H), 7.03 (d, 1H), 6.91 (d, 0.5H), 6.08 (d, 0.5H), 4.86 (ddd, 0.5H), 4.77 (q, 0.5H), 3.61 -3.47 (m, 2H), 3.27-3.02 (m, 3H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.45 (s, 1.5H), 2.43 (s, 1.5H), 1.75-1.68 (m, 0.5H), 1.61-1.51 (m, 0.5H), 1.45 (s, 4.5H), 1.40 (s, 4.5H), 1.48-1.25 (m, 3H); 0.95 (s, 1.5H), 0.80 (s, 1.5H); 0.61 (s, 1.5H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.4, 170.1, 170.0, 169.6, 155.0, 154.9, 150.7, 150.6, 144.3, 144.2, 133.4, 133.1, 132.8, 132.6, 130.7, 130.2, 129.9, 129.8, 128.0, 121.8, 121.7, 82.6, 82.2, 71.5, 71.2, 53.6, 52.7, 47.3, 47.2, 42.7, 42.5, 38.2, 38.1, 37.7, 37.5, 36.6, 36.3, 27.8, 27.8, 27.2, 23.4, 23.2, 21.5.

Ejemplo 98

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(3,3-dimetil)prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se N-tosiló 3,3-dimetil prolina (ver Sharma y Lubell, *J. Org. Chem.* 1996, *61*, 202-209) utilizando el procedimiento descripto en el Método 1. Se preparó entonces el compuesto del título siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.76 (d, 1H), 7.74 (d, 1H), 7.36 (d, 1H), 7.33 (d, 2H), 7.19 (d, 1H), 7.10 (d, 1H), 7.03 (d, 1H), 6.91 (d, 0.5H), 6.89 (d, 0.5H), 5.06 (sept., 0.5H), 4.96 (sept., 0.5H), 4.98-4.83 (m, 1H), 3.59-3.48 (m, 2H), 3.31-3.03 (m, 3H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.45 (s, 1.5H), 2.43 (s, 1.5H), 1.75-1.66 (m, 0.5), 1.62-1.52 (m, 0.5H), 1.34-1.22 (m, 3H), 1.27 (s, 1.5H), 1.25 (s, 1.5H), 1.22 (s, 1.5H), 1.20 (s, 1.5H), 0.95 (s, 1.5H), 0.78 (s, 1.5H), 0.60 (s, 1.5H), 0.57 (s, 1.5H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.8, 170.6, 170.0, 169.7, 154.9, 150.8, 150.6, 144.4, 144.2, 133.2, 132.5, 132.5, 130.7, 130.2, 129.9, 129.8, 128.0, 122.0, 121.8, 71.5, 17.2, 69.5, 69.3, 53.0, 52.2, 47.3, 47.2, 42.8, 42.5, 38.2, 38.1, 37.6, 37.2, 36.6, 36.3, 27.1, 23.4, 23.2, 21.6, 21.6, 21.5, 21.5.

Otros compuestos preparados según los métodos arriba indicados incluyen aquellos descriptos en los Ejemplos 99-137 de la Tabla II a continuación. Además, los Ejemplos 101, 109, 111, 117, 132 y 137 de la Tabla II se ejemplifican como sigue:

Ejemplo 101

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)-L-fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR $(CD_3)_2SO$: δ = 8.28 (d, 1H), 7.70 (d, 2H), 7.41 (d, 2H), 7.23 (d, 2H), 6.99 (d, 2H), 4.86 (sept, 1H), 4.47 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 4.07 (m, 1H), 3.38 (m, 1H), 3.30 (m, 1H), 3.09 (m, 3H), 2.95 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.88 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 1.63 (m, 3H), 1.51 (m, 3H), 1.44 (m, 1H), 1.39 (m, 1H), 1.16 (d, 3H), 1.11 (d, 3H).

^{13}C NMR $(CD_3)_2SO$: δ = 171.3, 170.8, 154.2, 150.2, 143.7, 134.1, 130.2, 130, 127.6, 121.6, 68.2, 61.2, 53.5, 49, 36.3, 36.1, 35.7, 30.5, 23.8, 21.4, 21.4, 21.

Ejemplo 109

Síntesis de N-(bencilsulfonil)-L-(5,5-dimetil) tiaprolil-L-(4-N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 111 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos físicos son los siguientes:

MS (FAB) $(M+H)^+$ 550.

Calc. para: $C_{25}H_{31}N_3O_7S_2$; C, 54.62; H, 5.68; N 7.64.

Hallados: C 54.51; H 5.60; N 7.63.

Ejemplo 111

Síntesis de Éster *ter*-Butílico de N-(bencilsulfonil)-L-(5,5-dimetil) tiaprolil-L-(4-N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos físicos son los siguientes:

MS $[M+H]^+$ 550.

Calc. para: $C_{29}H_{39}N_3O_7S_2$; C, 57.52; H, 6.45; N, 6.94.

Hallados: C, 57.32; H, 6.52; N, 6.81.

Ejemplo 117

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(metil-pirazol-4-sulfonil)-L-prolil-L-(4-*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Sustituyendo cloruro de N-metil-pirazol sulfonilo (ver Dickson, Patente Estadounidense 3.665.009 (23 de mayo de 1972)) siguiendo el método para la preparación del Ejemplo 56 se obtuvo el compuesto del título.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.83 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.26 (m, 1H), 7.15 (m, 2H), 7.00 (m, 2H), 4.69 (m, 1H), 3.95 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.38 (m,

1H), 3.23-3.11 (m, 1H), 3.10-2.99 (m, 4H), 2.99 (s, 3H), 2.05 (m, 1H), 1.66-1.46 (m, 3H), 1.44 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.7, 169.9, 154.9, 150.6, 138.9, 133.2, 132.5, 130.2, 121.7, 117.9, 82.6, 62.4, 53.7, 49.7, 39.6, 37.7, 36.6, 36.4, 29.9, 27.9, 24.2.

Ejemplo 132

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(1,1-dioxotiomorfolin-4-ilcarboniloxi)-fenilalanina

Sustituyendo tiamormolina por N-metil piperazina y siguiendo el método para la preparación de los Ejemplos 4 y 14 se obtuvo el compuesto del título.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.87-7.82 (m, 2H), 7.28-7.17 (m, 5H), 7.01 (d, 2H), 4.71-4.69 (m, 1H), 4.14-4.05 (m, 5H), 3.39-3.36 (m, 1H), 3.23-3.01 (m, 7H), 2.05-2.03 (m, 1H), 1.58-1.44 (m, 12H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ = 170.4, 169.8, 153.0, 149.7, 134.2, 130.6, 130.5, 121.3, 116.8, 116.5, 82.6, 62.1, 53.6, 51.8, 49.5, 43.1, 42.7, 37.2, 29.7, 27.8, 24.2.

Ejemplo 137

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(metil-pirazol-4-sulfonil)-L-prolil-L-(4-*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)-fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 117.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.83 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.27 (d, 1H), 7.13 (d, 2H), 7.01 (d, 2H), 5.06-5.02 (m, 1H), 4.80-4.73 (m, 1H), 3.97-3.94 (m, 1H),

3.93 (s, 3H), 3.44-3.37 (m, 1H), 3.25-3.19 (m, 1H), 3.09-3.00 (m, 5H), 2.97 (s, 3H), 2.06-2.02 (m, 1H), 1.66-1.48 (m, 3H), 1.23 (d, 6H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.8, 170.5, 154.9, 150.6, 138.9, 132.9, 32.5, 130.2, 121.7, 117.8, 69.5, 62.3, 53.2, 49.7, 39.6, 37.1, 36.6, 36.3, 29.9, 24.1, 21.6, 21.5.

Ejemplo 138

Síntesis de Éster *ter*-butílico de N-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se preparó cloruro de N-metilpirazol agregando N-metilpirazol a ácido clorosulfónico enfriado (0EC). Se le permitió a la mezcla de reacción retornar a temperatura ambiente y luego se la calentó a 100EC durante la noche bajo una corriente de N_2. La mezcla de reacción se retornó a temperatura ambiente y luego se enfrió a 0EC. A esta solución se le agregó cloruro de tionilo (2.5 eq) y la reacción se mezcló a temperatura ambiente por 30 minutos, luego se calentó a 70EC durante dos horas. La reacción se retornó a temperatura ambiente y luego se enfrió en un baño de hielo. Agua y hielo se agregaron lentamente a la mezcla de reacción para precipitar un sólido blanco que luego se recogió por filtración. El cloruro de sulfonilo deseado se lavó con agua fría y hexano.

El compuesto del título se preparó entonces siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados, punto de fusión: 169-170EC.

Ejemplo 139

Síntesis de N-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 138 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 8 = 7.94 (s, 1H); 7.79 (s, 1H); 7.25 (d, 2H, J=8.8Hz); 7.0 (d, 2H, J=8.8Hz); 5.15 (br s, 1H); 4.80 (m, 1H); 4.54 (d, 1H,J=9.HHz); 4.39 (d, 1H, J=9.3Hz); 3.93 (s, 3H); 3.88 (s, 1H); 3.23-3.02 (m, 2H0; 3.07 (s, 3H); 2.98 (s, 3H); 1.27 (s, 3H); 1.14 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 173.86, 169.05, 155.23, 150.47, 139.21, 133.59, 133.15, 130.53, 121.84, 117.57, 73,58, 54,71, 53.75, 50.42, 39.60, 37.18, 36.60, 36.36, 35.11, 28.97, 23.95.

Ejemplo 140

Síntesis de Éster etílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(N-(1,4-dioxa-8-aza-spiro[4.5]decan-8-ilo)carboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para el Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS (+ESI): 630 $[M+H]^{+\cdot}$

Anal. Calc. para $C_{31}H_{39}N_3O_9S \equiv 0.2\ CH_2Cl_2$: C, 57.94; H, 6.14; N, 6.50.

Hallados: C, 57.73; H, 5.90; N, 6.47.

Ejemplo 141

Síntesis de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(N-(1,4-dioxa-8-aza-spiro[4.5]decan-8-ilo)carboniloxl)fenilalanina

El producto del Ejemplo 140 se hidrolizó utilizando el procedimiento descripto en el Método 5 pero empleando metanol como solvente y manteniendo la reacción a 25EC durante 24 horas. Se evaporó entonces el

solvente, el residuo tomado en H_2O, lavado con cloruro de metileno y liofilizado para producir el compuesto del título.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS (+ESI): 619 $[M+H]^+$.

Anal. Calc. para $C_{29}H_{35}N_3O_9SLi \cong 1.5\ H_20$: C, 53.37; H, 6.02; N, 6.44.

Hallados: C, 53.40; H, 5.58; N, 6.48.

Ejemplo 142

Síntesis de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-acetilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El producto del Ejemplo 127 se hidrolizó utilizando el procedimiento descripto en el Método 5 pero empleando metanol como solvente y manteniendo la reacción a 25EC durante 24 horas. Se evaporó entonces el solvente, el residuo fue tomado en H_2O, lavado con cloruro de metileno y liofilizado para producir el compuesto del título.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS (+ESI): 587 $[M+H]^+$.

Anal. Calc. para $C_{28}H_{33}N_4O_8SLi \cong 3H_20$: C, 52.01; H, 6.08; N, 8.66.

Hallados: C, 52.03; H, 5.36; N, 8.04.

Ejemplo 143

Síntesis de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-metanosulfonilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El producto del Ejemplo 128 se hidrolizó utilizando el procedimiento descripto en el Ejemplo 142.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS (+ESI): 623 $[M+H]^+$.

Anal. Calc. para $C_{27}H_{33}N_4O_9S_2Li \cong 2\ H_20$: C, 48.79; H, 5.61; N, 8.43.

Hallados: C, 48.66; H, 5.14; N, 8.04.

Ejemplo 144

Síntesis de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-fenilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El éster etílico del compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto en el Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados. Entonces se hidrolizó el éster etílico utilizando el procedimiento descripto en el Ejemplo 142.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS (-ESI): 619 $[M-H]^-$.

Anal. Calc. para $C_{32}H_{36}N_4O_7SLi \cong 2H_2O$: C, 58.00; H, 5.93; N, 8.45.

Hallados: C, 57.65; H, 5.49; N, 8.13.

Ejemplo 145

Síntesis de Éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El producto del Ejemplo 125 (0.7g, 1 mmol) se disolvió en cloruro de metileno (9 mL). La solución se enfrió a 0EC y se agregó ácido trifluoroacético (1.0 mL) y la solución clara resultante se revolvió durante 4 horas. La solución de reacción se disolvió entonces con cloruro de metileno adicional (50 mL), se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio (3 x 50 mL), se secó (K_2CO_3) y el disolvente se quitó para obtener un sólido de color blanco (0.465 g). Por cromatografía flash (9:1 CH_2Cl_2:EtOH) se obtuvo un aceite claro que se lavó varias veces con hexano para obtener un sólido de color blanco (0.289g, 48%).

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS (+ESI): 601.7 $[M+1]^+$.

925

Anal. Calc. para $C_{30}H_{40}N_4O_7S \cong 0.25\ CH_2Cl_2$: C, 58.42; H, 6.56; N, 9.01.

Hallados: C, 58.79; H, 6.51; N, 8.74.

Ejemplo 146

Síntesis de 2-(sacarin-2-ilo)propionil-L-4-(4N-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 46 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11, punto de fusión = 117-122EC (con espuma).

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{25}H_{28}N_4O_8S \cong 1.5\ H_2O$: C, 52.53; H, 5.47; N, 9.80.

Hallados: C, 52.26; H, 5.36; N, 9.23.

Ejemplo 147

Síntesis de Éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-metanosulfonil piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descripto para el Ejemplo 128 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS (+ESI): 696 $[M+NH_4]^+$.

Anal. Calc. para $C_{31}H_{42}N_4O_9S_2 \cong 0.5\ CH_2Cl_2$: C, 51.62; H, 6.00; N, 7.76.

Hallados: C, 51.55; H, 6.21; N, 7.60.

Ejemplo 148

Síntesis de Éster N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-

(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina (N^N-*ter*-butoxicarbonil-2-amino-2-metilpropil)

Se agregó $(BOC)_2O$ (96 mg, 0.44 mmol) a una solución del producto del Ejemplo 9 (200 mg, 0.4 mmol.), N-boc-2-amino-2-metil-1-propanol (965 mg, 0.5 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP en THF (92 mL) conteniendo Piridina (50 µl). La mezcla se revovió a temperatura ambiente bajo argón por 48 horas. La mezcla se virtió en 1N HCl y extraída con etil acetato. La fase orgánica se lavó (1N HCl), secó ($MgS0_4$) y el solvente se retiró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía flash (EtOAc:hexanos 2:1) para dar el compuesto deseado como una espuma amorfa de color blanco (150 mg., 55%).

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: $[M+H]^+$ at 675.

MS (+ESI) : $[M+ NH_4]^+$ at 692 (100%).

Ejemplo 149

Síntesis de Éster etílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina 2-(morfolin-4-ilo)

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto en el Ejemplo 148 sustituyendo 2-morfolinoetanol por N-boc-2-amino-2-metil-1-propanol.

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{30}H_{40}N_4O_8S \cong 0.5\ H_2O$: C, 57.58; H, 6.60; N, 8.95.

Hallados: C, 57.26; H, 6.29; N, 8.82.

Ejemplo 150

Síntesis de Éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-acetilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

927

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto en el Ejemplo 127 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS (+ESI) : 660.4 $[M+NH_4]^+$.

Anal. Calc. para $C_{32}N_{42}N_4O_8S \cong 0.15\ CH_2Cl_2$: C, 58.91; H, 6.50; N, 8.55.

Hallados: C, 58.64; H, 6.36; N, 8.40.

Ejemplo 151

Síntesis de Éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4^N-hidroxipiperidin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto en el Ejemplo 4 sustituyendo 4-piperidinol por *N*-metil piperazina.

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{31}H_{41}N_3O_8S \cong 0.6\ H_2O \cong 0.22$ EtOAc: C, 59.28; H, 6.86; N, 6.51

Hallados: C, 58.92; H, 6.37; N, 6.47.

Ejemplo 152

Síntesis de Éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(N-(2^N-(morfolin-4N-ilo)etil)carbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto en el Ejemplo 4 sustituyendo 4-(2-aminoetil)morfolina por N-metil piperazina.

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{32}H_{44}N_4O_8S \cong 0.25\ H_2O$: C,59.20; H, 6.91; N, 8.63

Hallados: C, 59.01; H, 6.54; N, 8.38.

Ejemplo 153

Síntesis de Éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(N-(1,4-dioxa-8-aza-spiro[4.5]decan-8-ilo)carboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto en el Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS (-ESI): 656 $[M-H]^{-}$.

Anal. Calc. para $C_{33}H_{43}N_3O_9S \cong 0.1\ CH_2Cl_2$: C, 59.67; H, 6.54; N, 6.31.

Hallados: C, 59.83; H, 6.63; N, 6.66.

Ejemplo 154

Síntesis de Éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(N-(2^N-hidroxietil)-N-metilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto en el Ejemplo 4 sustituyendo 2-(metilamino)etanol por N-metil piperazina.

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{29}H_{39}N_3O_8S \cong 0.5\ H_2O$: C, 58.18; H, 6.73; N, 7.02.

Hallados: C, 57.95; H, 6.5; N, 6.9.

Ejemplo 155

Síntesis de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4^N-formiloxipiperidin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó tratando y revolviendo el producto del Ejemplo 151 con ácido fórmico durante la noche. El compuesto del título se obtuvo como una espuma de color blanco (130 mg, 94%) luego de la remoción del exceso de ácido fórmico.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHZ) δ 12.8 (s, 1H); 8.23 (s, 1H); 8.09 (d, 1H); 7.69 (d, 2H), 7.4 (d, 2H); 7.23 (d, 2H), 7.02 (d, 2H); 5.00 (m, 1H); 4.45 (m, 1H); 4.10 (m,1H); 3.6-3.8 (br, 2H); 3.4 (br s, 1H); 3.25 (m, 2H); 3.10 (m, 2H); 2.95 (m, 1H); 2.35 (s, 3H); 1.95 (m, 2H); 1.56-1.75 (m, 5H); 1.4 (m, 1H).

IR (KBr,cm-^{1}) 3400, 2950, 1720, 1680, 1510, 1430, 1325, 1250, 1150, 1010, 650, 75, 540.

MS ((+)ESI, m/z (%)) 605 (100 [M+NH,1$^+$).

Anal. Calc. para $C_{28}H_{33}N_3O_9S.0.66H_2O$: C, 56.09; H, 5.77; N, 7.01.

Hallados: C, 56.14; H, 5.83; N, 6.78.

Ejemplo 156

Síntesis de Éster isopropílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-hidroxipiperidin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para el Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados, punto de fusión 64-67EC (con espuma).

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{30}H_{39}N_3O_8S \cong 0.75\ H_2O \cong 0.1$ EtOAc : C, 58.51; H, 6.67; N, 6.73.

Hallados: C, 58.55; H, 6.09; N, 6.78.

Ejemplo 157

Síntesis de Éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-(2-hidroxietil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El carbonato se preparó por tratamiento de éster Tos-Pro-Tyr-t-butílico con 4-nitrofenil cloroformato, seguido del agregado de N-(2-hidroxil etil)piperazina (trietilamina, cloruro de metileno, enfriado a 0EC, luego

revuelto a temperatura ambiente durante la noche). El producto crudo se purificó por cromatografía flash (sílice, 95:5 EtOAc:EtOH) para obtener un sólido de color blanco, punto de fusión 158-160EC. (0.387 g, 58%).

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHZ) δ 8.15 (d, 1H, J=7.90 Hz); 7.70(d, 2H, J=6.59 Hz); 7.40 (d, 2H, J=7.90 Hz); 7.23(d, 2H, J=8.56 Hz); 7.00 (d, 2H, J=8.56 Hz); 4.42 (m, 1H); 4.38 (m, 1H); 4.08 (m, 1H); 3.51 (m, 4H); 3.34 (m, 3H); 3.09 (m, 1H); 2.99 (m, 2H); 2.43 (m, 6H); 2.39 (s, 3H); 1.59 (m, 3H); 1.39 (m, 1H); 1.35 (s, 9H).

IR (KBr,cm-^{1}) 3505, 3400, 2990, 2930, 2890, 1730, 1700, 1670, 1510, 1430, 1350, 1220, 1200, 1160, 670, 590, 545.

MS ((-)ESI, m/z (%)) 643 (98 [M-NH_4]).

Anal. Calc. para $C_{32}H_{44}N_4O_8S$: C, 59.61; H, 6.88; N, 8.69.

Hallados: C, 59.06; H, 6.95; N, 8.43.

Ejemplo 158

Síntesis de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(N-(2^N-formiloxietil)-N-metilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó tratando y revolviendo el producto del Ejemplo 154 con ácido fórmico durante la noche. El compuesto del título se obtuvo como una espuma de color blanco (110 mg., 77%) luego de la remoción del exceso de ácido fórmico.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 12.8 (s, 1H); 8.25 (d, 1H); 8.08 (d, 1H); 7.69 (d, 2H), 7.40 (d, 2H); 7.22 (d, 2H), 6.98 (dd, 2H); 4.47 (m, 1H); 4.35 (m, 1H); 4.27 (m, 1H); 4.10 (m, 1H); 3.65 (m, 1H); 3.55 (m, 1H); 2.85-3.15 (overlapping m, 7H); 2.40 (s, 3H); 1.55 (m, 3H); 1.40 (m, 1H).

IR (KBr,cm-[1]) 3420, 2910, 1725, 1510, 1400, 1340, 1270, 1150, 675, 590, 550.

MS ((+)ESI, m/z (%)) 579 (100 [M+NH,1$^+$).

Anal. Calc. para $C_{26}H_{31}N_3O_9S.0.66H_2O$: C, 54.45; H, 5.68; N, 7.33

Hallados: C, 54.41; H, 5.60; N, 7.24.

Ejemplo 159

Síntesis de Éster isopropílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(N-(2N-hidroxietil)-N-metilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto en el Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados, punto de fusión 49-52EC.

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal Calc. para $C_{28}H_{37}N_3O_8S \cong 0.5\ H_2O$: C, 57.52; H, 6.55; N, 7.19.

Hallados: C, 57.56; H, 6.38; N, 7.14.

Ejemplo 160

Síntesis de Éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-4-(N-(metoxicarbonilmetil)carbamiloxi)fenilalanina

El carbonato se preparó tratando éster Tos-Pro-Tyr-t-butílico con 4-nitrofenil cloroformato, seguido de adición de éster metílico de glicina (trietilamina, cloruro de metileno enfriado a 0E, luego revuelto a temperatura ambiente durante la noche). El producto crudo se purificó por cromatografía flash (sílice, 3:2 EtOAc:hexano) para obtener una espuma de color blanco (0.640 g, 35%).

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 8.15 (d, 1H, J=8.12 Hz); 8.12 (d, 2H, J=6.15 Hz); 7.73 (d, 2H, J=8.34 Hz); 7.40 (d, 2H, J=7.90 Hz); 7.24 (d, 2H,

J=8.56 Hz); 6.98 (d, 2H, J=8.34 Hz); 4.25 (m, 1H); 4.07 (m, 1H); 3.83 (d, 2H, J=6.15 Hz); 3.64 (s, 3H); 3.32 (m, 1H); 3.02 (m, 3H); 2.39 (s, 3H); 1.56 (m, 3H); 1.41 (m, 1H); 1.35 (s, 9H).

IR (KBr,CM-^{1}) 3400, 2990, 1745, 1680, 1500, 1370, 1350, 1200, 1160, 670, 600.

MS ((+)ESI, m/z (%)) 621 (100$[M+NH_4]^+$).

Anal. Calc. para $C_{29}H_{37}N_3O_9S$: c, 57.70; H, 6.18; N, 6.96.

Hallados: C, 57.63; H, 6.11; N, 6.74.

Ejemplo 161

Síntesis de Éster isopropílico de N-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil) tiaprolil-L-4-(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto en el Ejemplo 138 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.91 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.21 (d, 2H, J=8.2 Hz), 7.03 (m, 3H); 5.03 (m, 1H), 4.84 (m, 1H), 4.55 (d, 1H), 4.42 (d, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.83 (s, 1H), 3.18-3.01 (m, 2H), 3.10 (s, 3H), 3.01 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.24 (m, 6H), 1.17 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.43, 166.31, 154.92, 150.68, 132.91, 132.88, 130.34,121.78, 117.69, 73.76, 69.61, 54,79, 53.2, 50.52, 39.61, 37.62, 36.58, 36.35, 28.96, 24.02, 21.57, 21.49.

Ejemplo 162

Síntesis de Éster isopropílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-methoxipiperidin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto por el Ejemplo 156 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DSMO-d_6, 400 MHz) δ 8.10 (d, 1H); 7.72 (d, 2H); 7.41(d, 2H); 7.24 (d, 2H); 7.02 (d, 2H); 4.92 (m, 1H); 4.45 (m, 1H); 4.10 (m, 1H); 3.8 (br s, 1H); 3.65 (br s, 1H); 3.40 (M, 2H); 3.25 (s, 3H); 2.95-3.15 (overlapping m, 5H); 2.40 (s, 3H); 1.85 (br, 2H); 1.4-1.6 (m, 6H); 1.18 (d, 3H); 1.12 (d, 3H).

IR (KBr,cm^{-1}) 3400, 2950, 1720, 1520, 1425, 1340, 1210, 1160, 1100, 625, 590, 540.

MS ((+) ESI, m/z (%)) 633 [M+NH]$^+$).

Ejemplo 163

Síntesis de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-methoxipiperidin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 162 utilizando el procedimiento descripto en el Método 5.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 12.8 (s, 1H); 8.10 (d, 1H); 7.72 (d, 2H); 7.41 (d, 2H); 7.24 (d, 2H); 7.02 (d, 2H); 4.45 (m, 1H); 4.10 (m, 1H); 3.8 (br s, 1H); 3.65 (br s, 1H); 3.40 (m, 2H); 3.25 (s, 3H); 2.95-3.15 (superpuesto m, 5H); 2.40 (s, 3H); 1.85 (br, 2H); 1.4-1.6 (m, 6H).

IR (KBr, cm^{-1}) 3400, 2950, 1720, 1520, 1425, 1340, 1210, 1160, 1100, 625, 590, 540.

MS ((-)ESI, m/z (%)) 572 (100 [M-H]$^-$).

Anal. Calc. para $C_{28}H_{35}N_3O_8SA0.33EtOAc.1H_2O$: C, 56.73; H, 6.44; N, 6.77.

Hallados: C, 56.96; H, 6.01; N, 6.76.

Ejemplo 164

Síntesis de Éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-4-oxoprolil-L-4-(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se enfrió diclorometano (7 mL) a -60EC (baño de cloroformo/hielo seco). Se agregó cloruro de oxalilo (0.15 mL). El producto del Ejemplo 165 (870 mg) y DMSO seco (0.26 mL) se disolvieron en diclorometano (8 mL) y se agregaron lentamente a la solución anterior. La reacción se revolvió a -60EC durante 30 minutos bajo condiciones secas. Se agregó trietilamina (1.05 mL). Luego de 5 minutos, se retiró el baño de hielo seco. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El solvente se evaporó bajo vacío. Se agregó acetato de etilo (30 mL) al residuo. La mezcla se lavó con solución de ácido cítrico (5%, 2 x 30 mL), solución saturada de $NaHCO_3$ (2 x 30 mL) y finalmente con salmuera. La solución se secó sobre $MgSO_4$. El solvente se evaporó bajo vacío y el residuo se limpió con una columna de gel de sílice para obtener 440 mg del producto deseado, punto de fusión: 78-80EC.

Ejemplo 165

Síntesis de Éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-*trans*-4-hidroxiprolil-L-4-(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se disolvieron éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-*trans*-4-hidroxiprolil-L-4-(hidroxi)fenilalanina (1,60 g) y cloruro de dimetilcarbamilo (0.30 mL) en DMF a 0EC en un baño de hielo. Se agregó a la solución carbonato de potasio en polvo (2.03 g). Se retiró el baño de hielo luego de 5 minutos. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. El sólido se filtró. Se agregó acetato de etilo (40 mL) a la solución. La solución se lavó con solución de ácido cítrico (5%, 40 mL) 2 veces, y una vez con solución saturada de $NaHCO_3$ (40 mL). La solución se

lavó entonces con salmuera y se secó con $MgSO_4$. El solvente se evaporó bajo vacío para dar 1.07 g del compuesto del título, punto de fusión: 170-172EC.

Ejemplo 166

Síntesis de Éster *ter*-butílico de N-(3-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4- (N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se disolvieron éster *ter*-butílico de N-(3-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(hidroxi)fenilalanina (700 mg) y dimetilcarbamilo (0.2 mL) en DMF (15 mL) a 0EC en un baño de hielo. Se agregó polvo de carbonato de potasio (1.375 g) a la solución. El baño de hielo fue retirado luego de 5 minutos. La reacción se revolvió a temperatura ambiente durante 6 horas. El sólido se filtró. Se agregó acetato de etilo (20 mL) a la solución. La solución se lavó con solución de ácido cítrico (5%, 30 mL, 2x) y solución saturada de $NaHCO_3$. La solución se lavó entonces con salmuera y secada con $MgSO_4$. El solvente se evaporó bajo vacío para dar 890 mg del compuesto del título, punto de fusión 107-109EC.

Ejemplo 167

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(morfolino-sulfonil)-L-prolil-L-(4-*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se preparó *N*-(Morfolino-sulfonil)-L-prolina utilizando el procedimiento descripto por Cheeseright *et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, *12*, 1595 - 1600. El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.13 (d, 2H), 7.03 (d, 2H), 6.92 (d, 1H), 4.71 (q, 1H), 4.25 (t, 1H), 3.67 (t, 4H), 3.39 (dt, 1H), 3.28 - 3.19 (m, 1H), 3.23 (t,

4H), 3.18 (dd, 1H), 3.08 (dd, 1H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 2.16 - 2.08 (m, 2H), 1.98 - 1.86 (m, 1H), 1.78 - 1.66 (m, 1H), 1.45 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 171.2, 170.4, 154.8, 150.7, 132.9, 130.3, 121.7, 82.7, 66.3, 62.6, 53.3, 49.6, 46.2, 37.0, 36.6, 36.3, 30.5, 27.8, 24.7.

Ejemplo 168

Síntesis de *N*-(morfolino-sulfonil)-L-prolil-L-(4-*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 167 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.04 (d, 1H), 7.25 (d, 2H), 7.01 (d, 2H), 4.71 - 4.64 (m, 1H), 4.22 (dd, 1H), 3.62 -3.50 (m, 4H), 3.43 - 3.31 (m, 2H), 3.24 (dd, 1H), 3.11 (t, 4H), 3.09 (s, 3H), 3.03 (dd, 1H), 2.97 (s, 3H), 2.22 - 2.11 (m, 1H), 1.98 - 1.80 (m, 3H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 174.65, 174.58, 174.00, 156.60, 151.70, 135.30, 131.20, 122.70, 67.10, 63.10, 54.59, 54.50, 50.6, 47.10, 37.10, 36.50, 36.40, 32.0, 25.60.

Ejemplo 169

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(1-Metilpirazol-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo los procedimientos descriptos para la preparación de los Ejemplos 14 y 117.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.93 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.12 (d, 2H), 6.98 (d, 2H), 6.44 (d, 1H0HH), 4.95 (m, 1H), 4.66 (m, 1H), 4.04 (m, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.19 (m, 2H), 3.06 (m, 6H), 2.98 (m, 4H), 1.42 (m, 9H).

937

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.58, 164.75, 154.91, 150.75, 139.33, 132.73, 132.43, 130.43, 122.18, 119.66, 83.07, 56.02, 53.23, 50.03, 49.03, 41.49, 39.63, 36.56, 36.31, 36.16, 27.87.

Ejemplo 170

Síntesis de *N*-(2-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 90 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.90 (m, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.56 (d, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.20 (d, 2H), 7.07 (d, 2H), 5.18 (m, 1H), 4.59 (m, 1H), 4.26 (m, 1H), 3.76 (m, 2H), 3.36 (m, 1H), 3.21 (m, 2H), 3.08 (m, 6H), 2.96 (s, 3H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 173.85, 168.04, 162.06, 158.69, 156.92, 152.06, 137.69, 135.05, 131.83, 131.59, 129.77, 128.44, 128.26, 126.21, 123.17, 119.04, 118.75, 57.04, 54.99, 52.08, 51.66, 43.36, 37.24, 36.83, 36.66.

Ejemplo 171

Síntesis de *N*-(2,4-difluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 92 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.88 (m, 1/2H), 8.14 (m, 1/2H), 7.90 (m, 1H), 7.64 (m, 1H), 7.20 (m, 2H), 7.10 (m, 1H), 7.03 (m, 2H), 5.16 (m, 1H), 4.63 (m, 1H), 4.28 (m, 1H), 3.75 (m, 2H), 3.41 (m, 1H), 3.15 (m, 5H), 3.02 (m, 4H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 173.91, 168.04, 156.93, 152.05, 135.15, 133.81, 133.67, 131.60, 123.13, 113.48, 113.18, 107.38 ,107.02, 57.02, 55.02, 52.29, 51.84, 43.45, 37.34, 36.83, 36.66.

Ejemplo 172

Síntesis de *N*-(Tolueno-4-sulfonil)-L-(tiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 49 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.67 (d, 2H), 7.32 (d, 2H), 7.21 (d, 2H), 7.10 (d, 1H), 7.00 (d, 2H), 5.40 (bs, >1H), 4.85 (m, 2H), 3.95 (m, 1H), 3.41 (m, 1H), 3.07 (m, 6H), 2.98 (m, 4H), 2.62 (m, 1H), 2.41 (m, 5H), 2.13 (m, 1H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 173.40, 168.49, 155.26, 144.44, 136.88, 132.95, 130.51, 130.30, 127.28, 122.08, 55.34, 53.45, 43.43, 36.62, 36.38, 35.85, 25.25, 24.54, 21.43.

Ejemplo 173

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(piridina-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil-tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 56 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9.13 (m, 1H), 8.90 (m, 1H), 8.19 (m, 1H), 7.56 (m, 1H), 7.23 (d, 2H), 7.04 (d, 2H), 6.93 (d, 1H), 5.07 (m, 1H), 4.85 (m, 1H), 4.62 (d, 1H), 4.48 (d, 1H), 3.92 (s, 1H), 3.20 - 3.05 (m, 2H), 3.12 (s, 3H), 3.03 (s, 3H), 1.32 - 1.16 (m, 12H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.30, 167.75, 154.19, 150.67, 148.59, 135.72, 132.94, 132.72, 130.27, 123.91, 121.78, 73.62, 69.64, 54.69, 53.12, 50.48, 37.50, 36.53, 36.29, 29.05, 23.73, 21.54, 21.46.

Ejemplo 174

Síntesis de *N*-(3-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 91 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.68 (m, 3H), 7.44 (m, 1H), 7.20 (m, 2H), 7.01 (m, 2H), 5.21 (m, 1H), 4.60 (m, 1H), 4.20 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.43 (m, 1H), 3.21 (m, 3H), 3.02 (m, 4H), 2.96 (m, 4H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 173.98, 167.98, 165.89, 162.56, 156.94, 152.06, 142.70 ,142.61, 135.11, 133.30, 133.19, 131.57, 124.71, 123.25, 122.21, 121.93, 116.05, 115.71, 57.27, 54.87, 54.79, 51.29, 51.06, 43.24, 37.11, 36.83.

Ejemplo 175

Síntesis de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 169 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.11 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.36 (d, 1H), 7.24 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 5.16 (m, 1H), 4.69 (m, 1H), 4.19 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.81 (m, 2H), 3.33 (m, 3H), 3.10 (s, 3H), 3.02 (m, 4H).

960

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 174.07, 168.11, 156.93, 152.08, 140.12, 135.05, 134.90, 131.67, 123.28, 121.82, 57.33, 54.77, 50.83, 50.64, 42.94, 39.80, 37.02, 36.84, 36.76.

Ejemplo 176

Síntesis de *N*-(4-*ter*-butílicobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 88 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.70 (d, 2H), 7.53 (d, 2H), 7.04 (d, 2H), 6.87 (d, 2H), 5.09 (m, 1H), 4.48 (m, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.60 (m, 1H), 2.90 (m, 5H), 2.80 (m, 5H), 1.15 (s, 9H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 173.95, 168.09, 159.33, 156.88, 152.09, 137.52, 135.03, 131.54, 128.68, 128.15, 123.32, 57.27, 54.81, 50.75, 43.04, 36.97, 36.82, 36.65, 36.16, 31.35.

Ejemplo 177

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-(3,3-dimetil)prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 97 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.77 (d, 1H), 7.75 (d, 1H), 7.42 - 7.33 (m, 3.5H), 7.27 (d, 1H), 7.19 (d, 0.5H), 7.10 (d, 1H), 7.03 (d, 1H), 5.07 - 5.00 (m, 0.5H), 4.94 - 4.87 (m, 0.5), 3.67 (d, 1H), 3.58 - 3.52 (m, 1H), 3.35 - 3.25 (m, 1H), 3.19 - 3.08 (m, 2H), 3.11 (s, 3H), 3.02 (s, 3H), 2.45 (s, 1.5 H), 2.43

(s, 1.5H), 1.70 - 1.57 (m, 1H), 1.34 - 1.27 (m, 1H), 0.94 (s, 1.5H), 0.75 (s, 1.5H), 0.54 (s, 6H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 174.6, 174.4, 171.8, 171.4, 155.7, 150.5, 150.4, 144.5, 144.4, 133.5, 132.6, 130.9, 130.6, 130.0, 129.9, 128.0, 127.9, 122.2, 122.0, 71.2, 70.9, 53.3, 52.2, 47.3, 47.1, 43.0, 42.7, 38.1, 37.9, 36.6, 36.4, 27.0, 26.8, 23.3, 23.0.

Ejemplo 178

Síntesis de *N*-(2,5-diclorotiofeno-3-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 86 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.10 (d, 1H), 7.25 (d, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.0 (d, 2H), 4.65 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 3.55 - 3.35 (m, 2H), 3.30 - 3.20 (m, 2H), 3.15 - 3.00 (m, 4H), 2.95 (s, 3H), 2.05 - 1.80 (m, 2H), 1.80- 1.65 (m, 2H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 174.2, 173.9, 156.9, 151.9, 135.9, 135.5, 132.3, 131.6, 128.9, 128.6, 122.9, 63.1, 54.8, 54.7, 50.3, 37.4, 36.8, 36.7, 32.1, 25.5.

Ejemplo 179

Síntesis de *N*-(4-metoxibencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 180 utilizando el procedimiento descripto en el Método 7.

Los datos NMR son los siguientes:

942

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.78 (d, 2H), 7.27 (d, 2H), 7.09 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 4.71 - 4.67 (m, 1H), 4.10 - 4.06 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.41 - 3.31 (m, 1H), 3.28 - 3.07 (m, 6H), 2.97 (s, 3H), 1.81 - 1.50 (m, 4H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 168.3, 168.2, 159.2, 150.9, 145.9, 129.5, 125.6, 125.3, 123.5, 116.9, 109.6, 57.2, 50.2, 48.7, 44.6, 31.4, 30.8, 30.6, 25.7, 19.3.

Ejemplo 180

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(4-metoxibencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto en el Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.76 (d, 2H), 7.34 (d, 1H), 7.14 (d, 2H), 7.03 - 6.97 (m, 4H), 5.08 - 5.04 (m, 1H), 4.77 (m, 1H), 4.05 - 4.03 (m, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.37 - 3.34 (m, 1H), 3.26 - 3.19 (m, 1H), 3.10 - 3.01 (m, 4H), 2.98 (s, 3H), 2.02 (m, 1H), 1.56 - 1.46 (m, 3H), 1.25 (d, 6H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.8, 170.3, 163.4, 154.8, 150.5, 132.9, 130.1, 129.9, 127.6, 121.6, 114.3, 69.4, 62.1, 55.4, 53.2, 49.5, 37.1, 36.5, 36.2, 29.7, 24.0, 21.5, 21.4.

Ejemplo 181

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1-oxo-tiomorfolin-3-carbonil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 182 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.90 (m, 1H), 7.78 (m, 2H), 7.40 (m, 2H), 7.26 (m, 2H), 7.03 (m, 2H), 5.14 (m, 1H), 4.64 (m, 2H), 3.81 (m, 1H), 3.71 (m, 2H), 3.19 (m, 1H), 3.14 (m, 3H), 3.02 (m, 4H), 2.84 (m, 1H), 2.60 (m, 1H), 2.42 (m, 4H), 2.21 (m, 1H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 174.22, 173.93, 169.59, 156.88, 152.08, 152.05, 146.44, 146.26, 137.75, 137.63, 135.61, 134.96, 131.79, 131.64, 131.55, 131.39, 128.75, 128.66, 123.35, 123.06, 57.03, 54.88, 54.66, 51.64, 42.69, 42.51, 40.34, 37.12, 36.83, 36.66, 32.76, 21.51.

Ejemplo 182

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1-oxo-tiomorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 49. La oxidación del grupo tiomorfolino al grupo 1-oxo-tiomorfolino se realizó según Larsson y Carlson (Acta Chemica Scan. 1994, 48, 517-525).

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.72 (m, 2H), 7.69 (m, 2H), 7.31 (m, 2H), 7.11 (m, 2H), 7.07 (m, 2H), 6.96 (m, 2H), 4.79 (m, 1H), 4.54 (m, 1H), 3.80 (m, 4H), 3.04 (4H), 2.92 (m, 3H), 2.64 (m, 1H), 2.43 (m, 4H), 1.44 (s, 3H), 1.36 (s, 6H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 169.8, 166.5, 166.,3 154.6, 150.5, 150.4, 144.9, 144.4, 135.7, 135.3, 132.8, 130.5, 130.1, 29.9, 127.4, 126.9, 122.1, 121.4, 82.6, 82.2, 55.6, 53.9, 53.1, 50.6, 48.1, 47.8, 41.7, 40.5, 38.3, 36.4, 36.1, 31.1, 27.5, 21.2.

Ejemplo 183

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(3,4-difluorobencenosulfonil)-L-prolil-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.72 - 7.60 (m, 2H), 7.87 - 7.37 (m, 1H), 7.13 - 7.11 (m, 3H), 7.01 (d, 2H), 5.08 - 5.04 (m, 1H), 4.81 - 4.74 (m, 1H), 4.09 - 4.06 (m, 1H), 3.39 - 3.35 (m, 1H), 3.26 - 3.19 (m, 1H), 3.12 - 2.97 (m, 8H), 2.06 - 2.03 (m, 1H), 1.66 - 1.57 (m, 3H), 1.26 (d, 6H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.50, 170.40, 154.90, 153.60, 150.70, 150.30, 133.30, 132.90, 130.10, 125.00, 121.80, 121.80, 118.50, 112.80, 69.60, 62.20, 53.20, 49.60, 37.10, 36.60, 36.30, 30.10, 24.20, 21.59, 21.56.

Ejemplo 184

Síntesis de *N*-(3,4-DiFluorobencenosulfonil)-L-prolil-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 183 utilizando el procedimiento descripto en el Método 7.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.10 (d, 1H), 7.84 - 7.77 (m, 1H), 7.69 - 7.65 (m, 1H), 7.53 - 7.45 (m, 1H), 7.28 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 4.72 - 4.68 (m, 1H), 4.19 - 4.16 (m, 1H), 3.43 - 3.39 (m, 1H), 3.31 - 3.21 (m, 2H), 3.13 - 3.05 (m, 4H), 2.97 (s, 3H), 1.86 - 1.61 (m, 4H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 174.2, 174.1, 164.7, 156.9, 154.9, 152.0, 151.6, 135.8, 135.6, 131.6, 129.7, 122.9, 119.7, 118.8, 63.1, 54.7, 50.5, 37.4, 36.8, 36.6, 31.9, 25.5.

Ejemplo 185

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(3,4-difluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descripto en el Ejemplo 92 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.71 (m, 2H), 7.33 (m, 1H), 7.07 (d, 2H), 6.91 (d, 2H), 6.36 (d, 1H), 4.95 (m, 1H), 4.61 (m, 1H), 4.03 (m, 2H), 3.16 (m, 2H), 3.13 (m, 4H), 3.07 (m, 1H), 2.93 (s, 9H), 1.43 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.07, 169.45, 164.42, 155.06, 155.44, 154.81, 152.21, 152.17, 150.58, 148.81, 148.64, 134.90, 134.85, 132.41, 130.29, 124.82, 124.71, 124.66, 121.97, 119.07, 118.76, 117.52, 117.23, 82.92, 55.98, 53.20, 50.10, 49.40, 41.76, 36.41, 36.16, 35.99, 27.64.

Ejemplo 186

Síntesis de *N*-(3,4-difluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 185 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 6.22 (m, 1H), 6.03 (m, 1H), 5.84 (m, 1H), 5.58 (m, 2H), 5.38 (m, 2H), 3.33 (m, 1H), 3.01 (m, 1H), 2.57 (m, 1H), 2.14 (m, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.66 (m, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.35 (m, 3H), 1.32 (s, 3H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 173.97, 167.89, 156.94, 153.53, 152.07, 150.00, 137.48, 135.17, 131.63, 126.54, 126.43, 123.20, 120.21, 119.96, 118.84, 118.57, 57.25, 54.82, 51.29, 49.86, 43.29, 37.21, 36.85, 36.67.

Ejemplo 187

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descripto en el Ejemplo 82 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.64 (d, 2H), 7.33 (d, 2H), 7.25 (d, 2H), 7.08 - 6.97 (m, 3H), 4.76 (m, 1H), 4.57 (d, 1H), 4.38 (d, 1H), 3.83 (s, 1H), 3.95 - 3.78 (m, 4H), 3.09 (m, 2H), 2.69 (m, 4H), 2.43 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.16 (s, 3H), 1.08 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 169.78, 168.36, 153.53, 150.28, 144.84, 133.53, 132.76, 130.51, 130.03, 128.19, 121.58, 82.69, 73.42, 54.56,53.78, 50.46, 47.05, 46.40, 37.80, 29.06, 27.76, 27.37, 27.04, 23.86, 21.52.

Ejemplo 188

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 187 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.77 (d, 2H), 7.37 (d, 2H), 7.28 (d, 2H), 7.22 (d, 1H), 7.03 (d, 2H), 5.35 (brs, 1H), 4.91 (m, 1H), 4.60 (d, 1H), 4.39 (d, 1H), 3.91 (s, 1H), 3.96 - 3.28 (m, 4H), 3.30 - 3.07 (m, 2H), 2.67 (m, 4H), 2.45 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.08 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 173.09, 169.45, 153.81, 150.28, 145.02, 133.42, 132.61, 130.60, 130.12, 128.13, 121.86, 73.28, 54.51, 53.31, 50.48, 47.08, 46.47, 36.97, 28.97, 27.35, 27.03, 23.70, 21.52.

Ejemplo 189

Síntesis de Éster etílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 117 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.89 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.19 (d, 2H), 7.00 (m, 3H), 4.87 (m, 1H), 4.54 (d, 1H), 4.42 (d, 1H), 4.18 (q, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.81 (s, 1H), 3.11 (m, 2H), 3.08 (s, 3H), 2.99 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 1.25 (t, 3H), 1.16 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.98, 168.34, 154.91, 150.71, 139.62, 132.88, 130.28, 121.85, 117.71, 73.77, 61.66, 54.80, 53.16, 50.53, 39.64, 37.63, 36.60, 36.36, 28.98, 24.00, 13.92.

Ejemplo 190

Síntesis de *N*-(piridina-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 191 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9.09 (s, 1H), 8.82 (m, 1H), 8.20 (m, 1H), 7.56 (m, 1H), 7.23 (d, 2H), 7.07 (d, 1H), 5.58 (brs, 1H), 4.83 (m, 1h), 4.56 (m, 2H),

4.07 (s, 1H), 3.14 (m, 2H), 3.07 (s, 3H), 2.99 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.18 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 173.04, 168.29, 155.16, 153.39, 150.60, 147.96, 136.43, 133.91, 133.06, 130.66, 130.50, 124.65, 122.14, 121.91, 73.43, 54.58, 53.21, 50.38, 37.18, 36.64, 36.38, 29.25, 23.64.

Ejemplo 191

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(piridina-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 56 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: $[M+H]^+$ 593

Anal. Calc. para $C_{27}H_{36}N_4O_7S_2$ A 0.5 H_20: C, 53.88; H, 6.07; N, 9.27.

Hallados: C, 53.98; H, 6.07; N, 9.27.

Ejemplo 192

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(piridina-2-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Sustituyendo cloruro de 2-piridinsulfonilo (ver Corey *et al.*, *J. Org. Chem.* 1989, 54, 389-393) y siguiendo el método para la preparación del Ejemplo 56 se obtuvo el compuesto del título.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8.59 (d, 1H), 8.00 - 7.89 (m, 2H), 7.78 (d, 1H), 7.53 - 7.49 (m, 1H), 7.16 (d, 2H), 7.01 (d, 2H), 5.05 - 4.99 (m, 1H), 4.85 - 4.78 (m, 1H), 4.60 - 4.57 (m, 1H), 3.44 -3.35 (m, 2H), 3.25 - 3.19 (m, 1H),

3.07 (s, 3H), 3.06 - 3.01 (m, 1H), 2.97 (s, 3H), 2.19 - 2.13 (m, 1H), 1.88 - 1.71 (m, 2H), 1.55 (m, 1H), 1.22 - 1.19 (m, 6H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.90, 170.30, 156.20, 154.80, 150.50, 150.00, 138.00, 133.10, 130.10, 127.00, 123.40, 121.60, 69.20, 62.80, 53.30, 49.60, 37.20, 36.40, 36.20, 29.80, 24.30, 21.42, 21.40.

Ejemplo 193

Síntesis de *N*-(piridina-2-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 192 utilizando el procedimiento descripto en el Método 7.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.67 (d, 1H), 8.27 (d, 1H), 8.07 - 8.02 (m, 1H), 7.96 - 7.91 (m, 1H), 7.65 - 7.61 (m, 1H), 7.27 (d, 2H), 7.01 (d, 2H), 4.72 - 4.69 (m, 1H), 4.58 - 4.54 (m, 1H), 3.44 - 3.37 (m, 2H), 3.28 - 3.24 (m, 1H), 3.13 - 3.05 (m, 4H), 2.96 (s, 3H), 1.94 - 1.89 (m, 2H), 1.70 - 1.63 (m, 2H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 174.5, 174.4, 174.2, 157.7, 156.9, 151.9, 139.9, 135.6, 131.6, 128.8, 124.7, 122.9, 64.1, 54.8, 54.7, 50.9, 37.5, 36.8, 36.7, 31.9, 25.6.

Ejemplo 194

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(piridina-2-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 192 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

950

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8.64 - 8.62 (m, 1H), 7.98 - 7.92 (m, 2H), 7.56 - 7.51 (m, 1H), 7.28 - 7.21 (m, 3H), 7.01 (d, 2H), 5.01 - 4.97 (m, 1H), 4.88 - 4.85 (m, 2H), 4.80 (d, 1H), 4.63 (d, 1H), 4.19 (s, 1H), 3.11 - 3.07 (m, 5H), 2.98 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.26 - 1.18 (m, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.3, 168.4, 155.5, 154.9, 150.7, 150.4, 138.2, 133.0, 130.4, 127.5, 123.5, 121.8, 73.5, 69.5, 54.7, 53.3, 51.0, 37.6, 36.6, 36.4, 29.3, 23.9, 21.52, 21.50.

Ejemplo 195

Síntesis de *N*-(piridina-2-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 194 utilizando el procedimiento descripto en el Método 7.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.70 - 8.69 (m, 1H), 8.07 - 8.01 (m, 1H), 7.92 - 7.89 (m, 1H), 7.67 - 7.63 (m, 1H), 4.77 - 4.67 (m, 3H), 4.30 (s, 1H), 3.23 - 3.06 (m, 5H), 2.97 (s, 3H), 1.27 - 1.18 (m, 6H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 174.1, 171.2, 157.0, 151.9, 151.6, 139.9, 135.7, 131.8, 131.7, 129.0, 124.6, 122.9, 74.3, 61.6, 55.7, 54.9, 51.9, 37.6, 36.8, 36.7, 30.1, 24.9.

Ejemplo 196

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(tiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 49 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.67 (d, 2H), 7.30 (d, 2H), 7.12 (d, 2H), 6.97 (d, 2H), 6.86 (d, 1H), 5.05 (m, 1H), 4.70 (m, 2H), 3.90 (m, 1H), 3.31 (m, 1H), 3.06 (m, 4H), 2.97 (s, 3H), 2.68 (m, 1H), 2.50 (m, 1H), 2.44 (s, 3H), 2.29 (m, 1H), 2.13 (m, 1H), 1.24 (s, 3H), 1.22 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.35, 167.55, 155.00, 150.61, 144.20, 136.80, 132.51, 130.24, 130.14, 127.20, 121.82, 69.48, 55.14, 53.55, 43.26, 36.43, 36.16, 25.21, 24.56, 21.48, 21.31.

Ejemplo 197

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(3-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.68 (d, 1H), 7.61 - 7.52 (m, 2H), 7.36 (dt, 1H), 7.21 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 6.94 (d, 1H), 5.05 (sept, 1H), 4.85 (q, 1H), 4.59 (d, 1H), 4.41 (d, 1H), 3.88 (s, 1H), 3.17 - 3.03 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 1.25 (d, 3H), 1.23 (d, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.12 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.3, 168.1, 162.6, 154.9,150.7, 137.9, 132.8, 131.3, 130.4, 123.9, 121.8, 121.0, 115.4, 73.5, 69.6, 54.5, 53.2, 50.5, 37.6, 36.6, 36.3, 29.0, 23.7, 21.6, 21.5.

Ejemplo 198

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(2-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.92 - 7.87 (m, 1H), 7.67 - 7.59 (m, 1H), 7.33 - 7.24 (m, 2H), 7.21 (d, 2H), 7.03 (d, 2H), 6.93 (d, 1H), 5.03 (Sept, 1H), 4.83 (q, 1H), 4.67 (d, 1H), 4.63 (d, 1H), 4.03 (s, 1H), 3.16 - 3.03 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.24 (d, 3H), 1.22 (d, 3H), 1.19 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.3, 168.1, 159.2, 154.9, 150.7, 136.0, 132.9, 132.0, 130.3, 124.6, 121.8, 117.6, 73.3, 69.6, 54.8, 53.2, 50.3, 37.6, 36.6, 36.3, 29.1, 23.9, 21.6, 21.5.

Ejemplo 199

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(3,4-difluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.77 - 7.71 (m, 1H), 7.70 - 7.65 (m, 1H), 7.40 - 7.31 (m, 1H), 7.20 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 6.87 (d, 1H), 5.05 (Sept, 1H), 4.88 - 4.82 (m, 1H), 4.55 (d, 1H), 4.44 (d, 1H), 3.91 (s, 1H), 3.17 - 3.03 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 1.25 (d, 3H), 1.23 (d, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.18 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.4, 167.9, 154.9, 150.7, 133.1, 132.7, 130.4, 124.4, 121.8, 118.5, 118.0, 73.6, 69.7, 54.6, 53.1, 50.5, 37.6, 36.6, 36.3, 29.2, 23.7, 21.6, 21.5.

Ejemplo 200

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(3,5-difluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.77 - 7.71 (m, 1H), 7.70 - 7.65 (m, 1H), 7.40 - 7.31 (m, 1H), 7.20 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 6.87 (d, 1H), 5.05 (Sept, 1H), 4.88 - 4.82 (m, 1H), 4.55 (d, 1H), 4.44 (d, 1H), 3.91 (s, 1H), 3.17 - 3.03 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 1.25 (d, 3H), 1.23 (d, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.18 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.4, 167.9, 154.9, 150.7, 133.1, 132.7, 130.4, 124.4, 121.8, 118.5, 118.0, 73.6, 69.7, 54.6, 53.1, 50.5, 37.6, 36.6, 36.3, 29.2, 23.7, 21.6, 21.5.

Ejemplo 201

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(2,4-difluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.94 - 7.86 (m, 1H), 7.20 (d, 2H), 7.03 (d, 2H), 7.02 - 6.95 (m, 2H), 6.88 (d, 1H), 5.03 (Sept, 1H), 4.82 (q, 1H), 4.67 (d, 1H), 4.61 (d, 1H), 4.01 (s, 1H), 3.16 - 3.03 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.23 (d, 3H), 1.21 (d, 3H), 1.20 (s, 3H).

954

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.3, 167.9, 154.9, 150.7, 133.7, 132.8, 130.3, 121.8, 112.1, 106.1, 73.4, 69.6, 54.9, 53.2, 50.4, 37.6, 36.6, 36.3, 29.1, 23.9, 21.6, 21.5.

Ejemplo 202

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(4-clorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.82 (d, 2H), 7.53 (d, 2H), 7.21 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 6.93 (d, 1H), 5.05 (Sept, 1H), 4.89 - 4.82 (m, 1H), 4.55 (d, 1H), 4.41 (d, 1H), 3.87 (s, 1H), 3.17 - 3.03 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 1.25 (d, 3H), 1.23 (d, 3H), 1.16 (s, 6H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.3, 168.1, 154.9, 150.7, 140.4, 134.5, 132.8, 130.4, 129.7, 129.5, 121.8, 73.5, 69.6, 54.6, 53.1, 50.5, 37.6, 36.6, 36.3, 29.1, 23.8, 21.6, 21.0.

Ejemplo 203

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(3-clorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.88 (t, 1H), 7.78 - 7.75 (m, 1H), 7.64 - 7.61 (m, 1H), 7.51 (t, 1H), 7.21 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 6.92 (d, 1H), 5.05 (sept, 1H),

4.89 - 4.82 (m, 1H), 4.58 (d, 1H), 4.40 (d, 1H), 3.88 (s, 1H), 3.18 - 3.03 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 1.25 (d, 3H), 1.23 (d, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.14 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.3, 168.0, 154.9, 150.7, 137.7, 135.7, 133.9, 132.8, 130.7, 130.3, 127.9, 126.2, 121.8, 73.6, 69.96, 54.5, 53.2, 50.5, 37.6, 36.6, 36.3, 29.1, 23.7, 21.6, 21.5.

Ejemplo 204

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(2-clorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8.08 (dd, 1H), 7.54 - 7.52 (m, 2H), 7.45 - 7.39 (m, 1H), 7.19 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 6.79 (d, 1H), 5.00 (sept, 1H), 4.78 (d, 1H), 4.75 - 4.68 (m, 1H), 4.69 (d, 1H), 4.19 (s, 1H), 3.09 (s, 3H), 3.06 (d, 2H), 3.00 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.23 (d, 3H), 1.19 (d, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.3, 168.1, 154.9, 150.7, 135.6, 134.4, 132.8, 132.7, 132.4, 130.3,127.3, 121.8, 73.3, 69.5, 54.7, 53.3, 50.4, 37.6, 36.6, 36.3, 29.6, 23.7, 21.6, 21.5.

Ejemplo 205

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(3,4-diclorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.97 (d, 1H), 7.70 (dd, 1H), 7.63 (d, 1H), 7.20 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 6.86 (d, 1H), 5.05 (sept, 1H), 4.89 - 4.82 (m, 1H), 4.55 (d, 1H), 4.43 (d, 1H), 3.92 (s, 1H), 3.17 - 3.03 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 1.26 (d, 3H), 1.22 (d, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.18 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.3, 167.9, 154.9, 150.7, 138.7, 136.1, 134.2, 132.7, 131.4, 130.3, 129.8, 127.1, 121.8, 73.6, 69.7, 54.6, 53.1, 50.5, 37.5, 36.6, 36.3, 29.2, 23.7, 21.6, 21.5.

Ejemplo 206

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(3,5-diclorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.76 (d, 2H), 7.62 (t, 1H), 7.20 (d, 2H), 7.03 (d, 2H), 6.85 (d, 1H), 5.05 (sept, 1H), 4.89 - 4.82 (m, 1H), 4.57 (d, 1H), 4.42 (d, 1H), 3.92 (s, 1H), 3.18 - 3.04 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 1.25 (d, 3H), 1.23 (d, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.18 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.3, 167.8, 154.9, 150.7, 139.1, 136.5, 133.7, 132.7, 130.3, 126.2, 121.8, 73.7, 69.7, 54.6, 53.1, 50.5, 37.5, 36.6, 36.3, 29.2, 23.7, 21.6, 21.5.

Ejemplo 207

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(3-clorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 92 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.85 (m, 1H), 7.76 (m, 1H), 7.63 (m, 1H), 7.53 (m, 1H), 7.06 (d, 2H), 6.96 (d, 2H), 6.37 (m, 1H), 5.01 (m, 1H), 4.62 (m, 1H), 4.01 (m, 2H), 3.26 (m, 1H), 3.06 (s, 3H), 2.96 (m, 7H), 1.49 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.0, 164.5, 154.9, 150.6, 140.0, 136.1, 134.2, 132.5, 131.3, 130.2, 127.4, 125.5, 122.2, 82.8, 56.0, 53.3, 49.9, 49.2, 41.7, 36.5, 36.3, 36.0, 27.8.

Ejemplo 208

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(3,4-diclorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 92 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.91 (m, 1H), 7.66 (m, 2H), 7.06 (d, 2H), 6.94 (d, 2H), 6.33 (m, 1H), 4.98 (m, 1H), 4.60 (m, 1H), 3.49 (m, 3H), 3.12 (m, 2H), 3.04 (s, 3H), 3.00 (m, 2H), 2.94 (s, 3H), 1.44 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.0, 164.3, 154.8, 150.6, 138.8, 137.9, 134.3, 132.4 132.0, 130.3, 129.2, 126.4, 122.1, 83.0, 55.5, 53.1, 50.2, 49.5, 41.8, 36.5, 36.2, 36.0, 27.7.

Ejemplo 209

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(4-metoxibencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.81 (d, 2H), 7.22 (d, 2H), 7.06 - 6.99 (m, 5H), 5.04 (sept, 1H), 4.89 - 4.82 (m, 1H), 4.56 (d, 1H), 4.39 (d), 3.88 (s, 3H), 3.83 (s, 1H), 3.17 - 3.03 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 1.25 (d, 3H), 1.22 (d, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.12 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.3, 168.5, 163.8, 154.9, 150.7, 132.9, 130.4, 130.3, 127.4, 121.7, 114.5, 73.5, 69.5, 55.6, 54.6, 53.2, 50.5, 37.7, 36.6, 36.3, 29.1, 23.9, 21.6, 21.5.

Ejemplo 210

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(3-metoxibencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.47 - 7.45 (m, 2H), 7.37 - 7.36 (m, 1H), 7.21 (d, 2H), 7.19 - 7.15 (m, 1H), 7.04 - 6.98 (m, 3H), 5.04 (sept, 1H), 4.88 - 4.82 (m, 1H), 4.58 (d, 1H), 4.40 (d, 1H), 3.89 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.17 - 3.03 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 1.25 (d, 3H), 1.23 (d, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.08 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.3, 168.3, 160.2, 154.9, 150.7, 136.9, 132.9, 130.5, 130.4, 121.7, 120.2, 120.0, 112.6, 73.4, 69.6, 55.7, 54.5, 53.2, 50.4, 37.7, 36.6, 36.3, 29.1, 23.7, 21.6, 21.5.

Ejemplo 211

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(2-metoxibencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.92 (dd, 1H), 7.54 (dd, 1H), 7.21 (d, 2H), 7.07 - 7.00 (m, 4H), 6.96 (d, 1H), 5.01 (sept, 1H), 4.83 - 4.76 (m, 1H), 4.73 (d, 1H), 4.61 (d, 1H), 4.17 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.14 - 3.03 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.22 (d, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.19 (d, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.3, 168.7, 157.7, 154.9, 150.6, 135.4, 133.0, 132.5, 130.3, 125.2, 121.7, 120.5, 112.6, 73.3, 69.5, 56.0, 54.8,53.3, 50.4, 37.7, 36.6, 36.3, 29.2, 24.1, 21.6, 21.5.

Ejemplo 212

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(3,4-dimetoxibencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.50 (dd, 1H), 7.31 (d, 1H), 7.21 (d, 2H), 7.05 - 7.01 (m, 3H), 6.97 (d, 1H), 5.04 (sept, 1H), 4.89 - 4.82 (m, 1H), 4.56 (d, 1H), 4.40 (d, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.89 (s, 1H), 3.17 - 3.03 (m, 2H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 1.25 (d, 3H), 1.22 (d, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.14 (s, 3H).

960

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.3, 168.5, 154.9, 153.5, 150.7, 149.4, 132.9, 130.4, 127.6, 122.3, 121.7, 110.6, 110.3, 73.5, 69.6, 56.3, 56.1, 54.6, 53.2, 50.5, 37.7, 36.6, 36.3, 29.2, 23.8, 21.6, 21.5.

Ejemplo 213

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(2,4-difluorobencenosulfonil)-L-(tiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 49 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.89 (m, 1H), 7.16 (m, 2H), 6.97 (m, 4H), 6.77 (d, 1H), 4.72 (m, 1H), 4.60 (m, 1H), 3.92 (m, 1H), 3.29 (m, 1H), 3.09 (m, 5H), 2.93 (s, 3H), 2.70 (m, 2H), 2.55 (m, 1H), 2.10 (m, 1H), 1.42 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.0, 168.0, 167.7, 137.1, 164.4, 164.3, 161.1, 160.9, 157.7, 157.5, 154.8, 150.5, 132.7, 132.6, 132.4, 130.4, 124.0, 123.8, 121.7, 112.2, 111.9, 106.5, 106.1, 105.8, 82.6, 55.4, 53.9, 43.5, 36.4, 36.2,27.7, 26.8, 25.5.

Ejemplo 214

Síntesis de *N*-(3,4-diclorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 208 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.04 (m, 1H), 7.68 (m, 2H), 7.52 (m, 1H), 7.21 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 5.22 (m, 1H), 4.63 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 3.71 (m, 1H), 3.57 (m, 1H), 3.30 (m, 3H), 3.08 (s, 3H), 3.02 (m, 3H), 2.97 (s, 3H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 174.0, 168.0, 156.9, 152.1, 140.7, 139.3, 135.2, 133.2, 131.6, 130.7, 128.3, 123.2, 57.2, 54.9, 54.6, 51.7, 51.4, 43.3, 37.3, 36.9, 36.7.

Ejemplo 215

Síntesis de *N*-(3-Clorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 207 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.94 (m, 1H), 7.77 (m, 2H), 7.58 (m, 1H), 7.46 (d, 1H), 7.19 (d, 2H), 7.07 (d, 2H), 5.23 (m, 1H), 4.63 (m, 1H), 4.20 (m, 1H), 3.71 (m, 1H), 3.43 (m, 1H), 3.26 (m, 4H), 3.17 (s, 3H), 2.95 (m, 5H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 168.0, 152.1, 142.5, 136.8, 135.0, 132.7, 131.6, 128.6, 127.1, 123.3, 57.2, 54.9, 51.4, 51.2, 43.2, 37.2, 36.8, 36.7.

Ejemplo 216

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(3-cloro-4-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 92 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.93 (d), 7.90 (m), 7.29 (s), 7.27 (d), 7.04 (d), 4.60 (m), 4.46 (d), 3.90 - 3.40 (m), 3.10 (s), 2.98 (s), 1.43 (s).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 171.5, 166.5, 156.9, 151.9, 135.2, 131.3, 129.9, 127.9, 127.8,123.1, 117.8, 117.5, 101.4, 83.7, 57.9, 56.0, 42.9, 37.3, 36.9, 36.7, 28.1.

Ejemplo 217

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(tiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo los procedimientos descriptos para la preparación de los Ejemplos 49 y 117.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.77 (s), 7.63 (s), 7.08 (d), 6.93 (d), 6.76 (d), 6.71 (d), 5.50 (d), 5.22 (s), 4.82 (t), 4.61 (q), 3.83 (s), 3.25 (dt), 3.04 (m), 2.90 (s), 2.05 (dd), 1.34 (s).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 169.3, 166.8, 154.7, 150.4, 138.4, 132.4, 132.2, 130.2, 121.4, 118.3, 105.4, 82.5, 55.2, 53.6, 53.3, 39.5, 38.3, 36.6, 36.3, 36.1, 27.6, 23.5.

Ejemplo 218

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(3,4-difluorobencenosulfonil)-L-(tiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 49 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.88 (m, 1H), 7.70 (m, 1H), 7.57 (m, 1H), 7.23 (d, 2H), 7.03 (d, 2H), 6.83 (d, 1H), 5.63 (dd, 1H), 5.07 (t, 1H), 4.58 (m, 1H), 3.22 - 3.00 (m, 3H), 3.09 (s, 3H), 2.98 (s, 3H), 2.07 (dd, 1H), 1.44 (s, 9H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 171.3, 169.3, 156.9, 152.0, 135.0, 131.6, 126.5, 122.9, 120.2, 119.9, 119.4, 118.7, 118.4, 106.4, 83.6, 56.5, 55.6, 37.1, 36.8, 36.6, 28.1, 25.2.

Ejemplo 219

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)thioprolil-L-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 82 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9.09 (s, 1H), 8.88 (m, 1H), 8.16 (m, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.22 (d, 2H), 7.01 (d, 2H), 6.91 (d, 1H), 5.05 (m, 1H), 4.85 (m, 1H), 4.60 (d, 1H), 4.46 (d, 1H), 3.89 (s, 1H), 3.93 - 3.83 (m, 4H), 3.11 (m, 2H), 2.69 (m, 4H), 1.29 - 1.16 (m, 12H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.3, 167.8, 154.3, 153.5, 150.4, 148.7, 135.8, 133.1, 132.9, 130.4, 124.0, 121.8, 73.7, 69.7, 54.7, 53.2, 50.5, 47.1, 46.4, 37.6, 29.1, 27.4, 27.0, 23.8, 21.6, 21.5.

Ejemplo 220

Síntesis de *N*-(3,4-difluorobencenosulfonil)-L-(tiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 218 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.89 (s, 1H), 7.57 - 7.46 (m, 2H), 7.35 (d, 1H), 7.32 - 7.22 (m, 1H), 7.09 (d, 2H), 6.91 (d, 2H), 6.64 (d, 1H), 5.50 (d, 1H),

4.89 (s, 1H), 4.88 - 4.79 (m, 1H), 3.17 - 3.02 (m, 3H), 3.02 (s, 3H), 2.93 (s, 3H), 1.75 (dd, 1H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 173.6, 167.7, 155.5, 152.0, 151.8, 150.1, 148.4, 132.8, 130.4, 124.6, 121.5, 118.7, 118.5, 117.5, 117.3, 117.1, 106.9, 54.9, 53.0, 36.4, 36.2, 36.0, 23.4.

Ejemplo 221

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(2,5-diclorotiofeno-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.18 (d, 2H), 7.11 (s, 1H), 7.00 (d, 2H), 6.87 (d, 1H), 5.03 - 4.99 (m, 1H), 4.84 - 4.81 (m, 1H), 4.65 - 4.56 (m, 2H), 4.07 (s, 1H), 3.10 - 3.01 (m, 5H), 2.98 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.18 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.3, 167.7, 154.9, 150.7, 132.9, 132.8, 131.9, 130.3, 128.0, 127.0, 121.8, 73.4, 69.6, 54.8, 53.2, 50.5, 37.5, 36.6, 36.3, 29.1, 23.8, 21.6, 21.5.

Ejemplo 222

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 82 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.89 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.21 (d, 2H), 7.01 (m, 3H), 5.03 (m, 1H), 4.83 (m, 1H), 4.54 (d, 1H), 4.40 (d, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.86 (m, 4H), 3.80 (s, 1H), 3.09 (m, 2H), 2.68 (m, 4H), 1.28 (s, 3H), 1.22 (m, 6H), 1.16 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.4, 168.3, 153.5, 150.4, 139.3, 133.3, 132.9, 130.4, 121.7, 117.6, 73.8, 69.7, 54.8, 53.2, 50.5, 47.1, 46.4 39.6, 37.6, 29.0, 27.4, 27.1, 24.0, 21.6, 21.5.

Ejemplo 223

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(8-quinolinasulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9.01 - 8.99 (m, 1H), 8.56 - 8.53 (m, 1H), 8.27 - 8.23 (m, 1H), 8.07 - 8.04 (m, 1H), 7.66 - 7.61 (m, 2H), 7.55 - 7.51 (m, 1H), 7.17 (d, 2H), 7.01 (d, 2H), 5.27 - 5.23 (m, 1H), 5.07 - 4.98 (m, 1H), 4.84 - 4.76 (m, 1H), 3.34 - 3.20 (m, 3H), 3.06 - 2.98 (m, 4H), 2.97 (s, 3H), 2.15 - 2.09 (m, 1H), 1.64 - 1.51 (m, 3H), 1.23 (d, 6H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 172.0, 170.5, 154.9, 151.5, 150.6, 143.9, 136.8, 135.6, 134.9, 134.1, 133.3, 130.2, 129.2, 125.6, 122.3, 121.7, 69.3, 62.8, 53.5, 48.7, 37.3, 36.5, 36.3, 29.7, 24.3, 21.6, 21.6.

Ejemplo 224

Síntesis de *N*-(8-quinolinasulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 223 utilizando el procedimiento descripto en el Método 7.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 9.03 - 9.01 (m, 1H), 8.49 - 8.42 (m, 2H), 8.23 - 8.20 (m, 1H), 8.09 - 8.07 (m, 1H), 7.73 - 7.61 (m, 2H), 7.25 (d, 2H), 7.00 (d, 2H), 5.30 - 5.27 (m, 1H), 4.73 - 4.69 (m, 1H), 3.38 - 3.21 (m, 3H), 3.09 - 3.02 (m, 4H), 2.95 (s, 3H), 1.86 (m, 1H), 1.78 - 1.73 (m, 1H), 1.58 - 1.50 (m, 2H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 175.3, 174.2, 164.7, 156.9, 152.9, 145.2, 138.5, 136.9, 135.8, 135.6, 131.6, 130.9, 126.9, 123.8, 122.9, 63.9, 54.7, 50.0, 37.5, 36.8, 36.7, 31.6, 25.5.

Ejemplo 225

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(8-quinolinasulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 117 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 9.05 - 9.03 (m, 1H), 8.53 - 8.49 (m, 1H), 8.26 - 8.22 (m, 1H), 8.08 - 8.05 (m, 1H), 7.65 - 7.60 (m, 1H), 7.56 - 7.52 (m, 1H), 7.19 (d, 2H), 7.06 (d, 1H), 7.00 (d, 2H), 5.17 (d, 1H), 4.94 (m, 1H), 7.74 - 4.78 (m, 2H), 4.66 (s, 1H), 3.08 - 2.99 (m, 8H), 1.20 - 1.16 (m, 12H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.2, 168.9, 154.9, 151.5, 150.6, 144.2, 136.7, 134.4, 134.4, 133.1, 130.3, 129.2, 125.5, 122.3, 121.7, 73.2, 69.3, 54.8, 53.3, 50.6, 37.6, 36.6, 36.3, 29.2, 24.1, 21.5, 21.4.

Ejemplo 226

Síntesis de *N*-(8-Quinolinasulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 225 utilizando el procedimiento descripto en el Método 7.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 9.06 - 9.04 (m, 1H), 8.45 - 8.39 (m, 2H), 8.23 - 8.14 (m, 1H), 7.72 - 7.61 (m, 2H), 7.32 (d, 2H), 7.03 (d, 2H), 5.12 (d, 1H), 4.87 (d, 1H), 4.69 - 4.64 (m, 2H), 3.28 - 3.02 (m, 5H), 2.98 (s, 2H), 1.18 (s, 3H), 1.08 (s, 3H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 174.1, 171.8, 157.1, 152.9, 152.0, 145.5, 138.4, 137.3, 135.8, 135.6, 135.1, 131.8, 130.9, 126.8, 123.8, 122.9, 73.7, 55.9, 54.8, 51.7, 37.6, 36.8, 36.7, 30.2, 25.0.

Ejemplo 227

Síntesis de Éster isopropílico *N*-(3-sulfonamida-4-cloro-bencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina de

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8.45 (d, 1H), 7.91 (d, 1H), 7.67 (d, 1H), 7.13 (d, 2H), 7.06 (d, 1H), 7.01 (d, 2H), 5.90 (brs, 2H), 5.06 - 5.02 (m, 1H), 4.79 - 4.72 (m, 1H), 4.14 - 4.10 (m, 1H), 3.42 - 3.39 (m, 1H), 3.25 - 3.14 (m, 2H), 3.07 (s, 3H), 3.04 - 2.97 (m, 1H), 2.96 (s, 3H), 1.98 - 1.96 (m, 1H), 1.72 - 1.62 (m, 3H), 1.28 - 1.25 (m, 6H).

968

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.8, 170.7, 155.1, 150.6, 141.4, 136.9, 136.1, 132.9, 132.8, 131.9, 130.3, 128.7, 121.9, 69.8, 62.1, 53.3, 49.6, 36.9, 36.6, 36.4, 30.4, 24.3, 21.6, 21.6.

Ejemplo 228

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1-oxotiomorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 182 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.77 (d, 2H), 7.72 (d, 2H), 7.33 (m, 2H), 7.20 (m, 2H), 7.12 (d, 2H), 7.01 (m, 2H), 5.10 (m, 1H), 5.01 (m, 1H), 4.84 (m, 1H), 4.75 (m, 1H), 3.80 (m, 3H), 3.05 (m, 4H), 2.96 (m, 3H), 2.74 (m, 1H), 2.42 (m, 4H), 1.30 - 1.20 (m, 6H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.6, 170.4, 166.8, 166.7, 154.9, 150.7, 150.6, 145.1, 144.8, 135.8, 135.5, 132.7, 130.6, 130.4, 130.3, 130.0, 127.7, 127.1, 122.4, 121.8, 69.8, 69.4, 55.8, 53.7, 52.9, 50.8, 48.2, 47.9, 42.0, 41.2, 38.4, 36.6, 36.5, 36.3, 31.2, 21.5, 21.5.

Ejemplo 229

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(2,4-difluorobencenosulfonil)-L-(1-oxotiomorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 182 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.91 (m, 1H), 7.30 (m, 2H), 6.97 (m, 4H), 4.71 (m, 1H), 4.55 (m, 1H), 3.90 (m, 2H), 3.77 (m, 1H), 3.11 (m, 4H), 2.85 (m, 3H), 2.80 (m, 1H), 2.60 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.39 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.0, 168.0, 167.9, 166.4, 166.2, 164.6, 164.4, 162.7, 161.4, 161.2, 157.9, 157.8, 154.8, 150.6, 150.4, 132.8, 132.5, 132.4, 130.9, 130.4, 130.1, 123.3, 123.1, 122.2, 121.6, 121.1, 122.6, 122.2, 111.9, 106.6, 106.3, 105.9, 82.8, 82.3, 55.8, 54.1, 53.2, 51.6, 49.2, 48.7, 43.1, 42.3, 38.7, 36.5, 36.2, 31.8, 27.7.

Ejemplo 230

Síntesis de Éster 2,2- dimetilpropilíco de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El producto el Ejemplo 161 (1 g., 9.72 mmol) se disolvió en alcohol neopentílico (5 mL). Se agregó isopropóxido de titanio (IV) (260 mg., 0.9 mmol) y la mezcla se calentó a 100EC bajo una atmósfera inerte por 48 horas. El exceso de alcohol neopentílico se retiró bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía flash de columna (sílice, 1% MeOH in $CHCl_3$) para obtener el compuesto del título como un sólido de color blanco (1.02 g, 97%).

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS (+) ESI $[M+H]^+$ 610; $[M+NH4]^+$ 627 (100%).

Anal. Calc. para $C_{29}H_{39}N_5O_7S$: C, 53.18; H, 6.45; N, 11.49.

Hallados: C, 53.46; H, 6.38; N, 11.06.

Ejemplo 231

Síntesis de Éster 2,2-dimetilpropilíco de *N*-(piridina-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El producto del Ejemplo 173 se sometió al proceso de transesterificación descripto para la preparación del Ejemplo 230. El compuesto se purificó por cromatografía flash en columna (sílice, 1% MeOH en $CHCl_3$) seguida de recristalización a partir de acetato de etilo para obtener el compuesto del título en forma de un sólido blanco (720 mg, 47%).

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{28}H_{38}N_4O_7S_2$: C, 55.43; H, 6.31; N, 9.23.

Hallados: C, 55.37; H, 6.32; N, 9.22.

Ejemplo 232

Síntesis de Éster ciclopropilmetílico de *N*-(1-Metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se sometió el producto del ejemplo 161 al procedimiento de transesterificación descripto para la preparación del Ejemplo 230. El compuesto del título se obtuvo como un sólido de color blanco luego de ser sometido a cromatografía flash (sílice, 1% MeOH in $CHCl_3$) (860 mg, 70%).

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{26}H_{35}N_5O_7S_2$: C, 52.6; H, 5.94; N, 11.8.

Hallados: C, 52.49; H, 5.93; N, 11.62.

Ejemplo 233

Síntesis de Éster metílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 161 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS (+) ESI $[M+H]^+$ 554; $[M+NH_4]^+$ 571 (100%).

Anal. Calc. para $C_{23}H_{31}N_5O_7S_2$ A 0.2 EtOAc: C, 50.04; H, 5.75; N, 12.26.

Hallados: C, 50.12; H, 5.69; N, 12.19.

Ejemplo 234

Síntesis de Éster etílico de *N*-(piridina-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se sometió el producto del ejemplo 173 al procedimiento de transesterificación descripto para la preparación del Ejemplo 230. El compuesto del título se purificó con cromatografía flash de columna (sílice, 2% MeOH in $CHCl_3$) seguido de recristalización a partir acetato de etilo para dar el compuesto del título como un sólido de color blanco (1.2 g, 61%).

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{25}H_{32}N_4O_7S_2$: C, 53.18; H, 5.71; N, 9.92.

Hallados: C, 53.14; H, 5.72; N, 9.57.

Ejemplo 235

Síntesis de Éster ciclopropilmetílico de *N*-(piridina-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se sometió el producto del ejemplo 173 al procedimiento de transesterificación descripto para la preparación del Ejemplo 230. El compuesto se aisló como un sólido de color blanco luego de cromatografía flash de columna (sílice, 2% MeOH in $CHCl_3$) seguido de recristalización a partir de EtOAc/hexanos (1 g, 65%).

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{27}H_{34}N_4O_4S_2$: C, 54.9; H, 5.8; N, 9.48.

Hallados: C, 54.77; H, 5.65; N, 9.46.

Ejemplo 236

Síntesis de 2-Metoxifenil éster de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

A una solución del compuesto del Ejemplo 139 (1.79 g, 3.31 mmol), 2-metoxi-fenol (0.45 g, 3.64 mmol) y BOP (1.61 g, 3.64 mmol) en cloruro de metileno (25 mL) a 0°C se agregó trietilamina (0.7 mL, 4.97 mmol). La mezcla de reacción se calentó lentamente a 25°C donde fue agitada bajo nitrógeno durante 24 horas. La reacción fue ahogada mediante el agregado de 100 mL de salmuera saturada y extraída con EtOAc. El extracto orgánico se lavó secuencialmente con 2N HCl (3 veces), bicarbonato de sodio saturado (3x) y salmuera saturada (2x), se secó sobre $MgSO_4$, y se evaporó hasta obtener 2.1 g de producto crudo. La cromatografía flash (eluyente: 96-4 cloruro de metileno: EtOAc) dio 1.85 g de un sólido de color blanco que luego de trituración con hexano dio 1.68 g (79%) de cristales de color blanco, punto de fusión 72-75 °C.

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{29}H_{35}N_5O_8S_2$: C, 59.94; H, 5.46; N, 10.85.

Hallados: C, 53.45; H, 5.62; N, 10.31.

Ejemplo 237

Síntesis de Éster *n*-butílico de *N*-(1-Metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se saturó una solución del compuesto del Ejemplo 139 (2g) en n-butanol (50 mL) con refrigeración de hielo con HCl gaseoso. La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 36 horas, se evaporó bajo vacío hasta

estar casi completamente seca, luego se particionó entre 5% $NaHCO_3$ y cloroformo. La capa orgánica se secó y evaporó bajo vacío para obtener 900 mg del compuesto del título.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: [(+)ESI], $[M+H]^+$ 596.

Ejemplo 238

Síntesis de Éster *n*-propílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se saturó una solución de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina (2 g) en *n*-propanol (50 mL) al enfriarse con hielo con HCl gaseoso. La mezcla se revolvió a temperatura ambiente durante 36 horas, se evaporó bajo vacío hasta estar casi completamente seca, luego se particionó entre 5% $NaHCO_3$ y cloroformo. La capa orgánica se secó y evaporó bajo vacío para producir 1500 mg del compuesto del título.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: [(+)ESI], $[M+H]^+$ 582.

Ejemplo 239

Síntesis de 2,2-dimetilpropioniloximetil éster de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se agregó ioduro de potasio (324 mg) inmediatamente a una mezcla del compuesto del Ejemplo 139 (1.08 g), clorometilpivalato (294 mg) y K_2CO_3 en polvo (222 mg) en DMF (5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se particionó entre agua (12 mL) y acetato de etilo (60 mL). La capa orgánica separada se lavó con tiosulfato

de sodio 0.1 N enfriado a hielo, agua y salmuera, luego se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y evaporó bajo vacío para producir 750 mg del compuesto del título.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: [(+)ESI], $[M+H]^+$ 654.

Ejemplo 240

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-fenilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para el Ejemplo 117 sustituyendo los materiales de partida adecuados. Se obtuvo un sólido de color blanco, punto de fusión 60-65°C.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS (+ESI) 694.3 $[M+NH_4]^+$.

Anal. Calcd for $C_{36}H_{44}N_4O_7S$ A $0.5C_4H_8O_2$: C, 63,31; H, 6.71; N, 7.77.

Hallados: C, 63.12; H, 6.58; N, 7.69.

Ejemplo 241

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-(etoxicarbonil)piperidin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

Se preparó el carbamato mediante el tratamiento de éster Tos-Pro-Tyr-t-butílico con 4-nitrofenilcloroformato, seguido de la adición de etinilsonipecatato (trietilamina, cloruro de metileno, enfriado a 0EC, luego agitado a temperatura ambiente durante la noche). El producto crudo se purificó por cromatografía flash (sílice, 95:5 EtoAc:Et_3N) para dar un sólido de color blanco (.78 g, 39%).

Los datos NMR son los siguientes:

975

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): δ 8.15 (d, 1H, J = 7.68Hz); 7.70 (d, 2H, J = 8.34Hz); 7.40 (d, 2H, J = 7.90Hz); 7.22 (d, 2H, J = 8.56Hz); 7.00 (d, 2H, J = 8.56Hz); 4.37 (m, 1H), 4.07 (q, 2H, J = 7.14, 14.08Hz); 4.03 (m, 2H); 3.90 (m, 1H); 3.34 (m, 1H); 3.09 (m, 2H); 3.00 (m, 3H); 2.59 (m, 1H); 2.39 (s, 3H); 1.87 (m, 2H); 1.58 (m, 5H); 1.41 (m, 1H); 1.35 (s, 9H); 1.18 (t, 3H, 7.14Hz).

IR (KBr, cm^{-1}): 3410, 2990, 2950, 1725, 1680, 1510, 1430, 1355, 1220, 1200, 1170, 1000, 675, 595.

MS ((+)ESI, m/z (%)) 689 (100$[M+NH_4]^+$); 691 (37$[M+NH_4]^+$).

Anal. Calc=d for $C_{34}H_{45}N_3O_9S$: C, 60.79; H, 6.75; N, 6.25.

Hallados: C, 60.59; H, 6.67; N, 6.22.

Ejemplo 242

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*-(4=-(2=-aminoetil)morfolino)carbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 152 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): δ 12.75 (s, 1H); 8.08 (d, 1H); 7.68 (d, 2H); 7.60 (t, 1H); 7.39 (d, 2H); 7.21 (d, 2H); 6.97 (d, 2H); 4.46 (m, 1H); 4.08 (m, 1H); 3.56 (m, 4H); 3.26 (m, 3H); 3.09 (m, 2H); 2.94 (m, 1H); 2.49 (s, 6H); 2.48 (s, 3H); 1.5 (m, 3H); 1.38 (m, 1H).

IR (KBr, cm^{-1}) 3400, 2975, 1725, 1650, 1500, 1350, 1150, 650, 575, 550.

MS ((-)ESI, m/z (%)) 587 (100$[M-H]^+$).

Anal. Calc=d for $C_{28}H_{36}N_4O_8S.HCOOH.0.5H_2O$: C, 54.11; H, 6.11; N, 8.70.

Hallados: C, 53.96; H, 6.02; N, 8.68.

Ejemplo 243

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-[4-(carboxi)piperidin-1-ilcarboniloxi]fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 241 utilizando los procedimientos descriptos en los Método 6 y 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): δ 12.50 (bs, 2H); 8.08 (d, 1H, J = 7.90Hz); 7.69 (d, 2H, J = 8.34Hz); 7.39 (d, 2H, J = 7.90Hz); 7.22 (D, 2H, J = 8.56 Hz); 6.99 (d, 2H, J = 8.56 Hz); 4.46 (m, 1H); 4.09 (m, 1H); 4.00 (m, 1H); 3.90 (m, 1H); 3.30 (m, 1H); 3.09 (m, 3H); 2.95 (m, 2H); 2.49 (m, 1H); 2.38 (s, 3H); 1.86 (m, 2H); 1.36-1.61 (m, 6H).

IR (KBr, cm^{-1}) 3400, 2960, 1720, 1535, 1430, 1350, 1200, 1160, 670, 590, 550.

MS ((+)ESI, m/z (%)) 605 (100$[M+NH_4]^+$).

Anal. Calc=d for $C_{28}H_{33}N_3O_9S$ H_2O: C, 55.53; H, 5.65; N, 6.94.

Hallados: C, 55.23; H, 5.82; N, 6.59.

Ejemplo 244

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-bis-(2-hidroxietil)carbamiloxi)fenilalanina

Se preparó el carbamato por tratamiento de éster Tos-Pro-Tyr-iPr con 4-nitrofenil cloroformato, seguido de la adición de dietanol amina (trietilamina, cloruro de metileno, enfriado a 0°C, agitado a temperatura ambiente durante la noche). El producto crudo se purificó por cromatografía flash (sílice, 98:2 EtOAc:EtOH) para dar una espuma de color blanco (0.180g, 28%).

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): δ 8.26 (d, 1H, J = 7.90Hz); 7.69 (d, 2H, J = 8.12Hz); 7.40 (d, 2H, J = 8.12Hz); 7.23 (D, 2H, J = 8.56 Hz); 6.99 (d, 2H, J = 8.56Hz); 4.87 (m, 1H); 4.83 (t, 1H, J = 5.49Hz); 4.76 (t, 1H, J = 5.49Hz); 4.42 (m, 1H); 4.08 (m, 1H); 3.58 (m, 2H); 3.51 (m, 2H); 3.44 (m, 2H); 3.34 (m, 3H); 2.99 - 3.09 (m, 3H); 2.39 (s, 3H); 1.59 (m, 3H); 1.41 (m, 1H); 1.16 (d, 3H, J = 6.15Hz); 1.12 (d, 3H, J = 6.15Hz).

IR (KBr, cm^{-1}) 3420, 2940, 1725, 1535, 1670, 1520, 1460, 1410, 1350, 1220, 1160, 1110, 670, 600, 550.

MS ((+)ESI, m/z (%)) 606 (15$[M+H]^+$); 623 (100$[M+NH_2]^+$).

Anal. Calc=d for $C_{29}H_{39}N_3O_9S$ H_2O: C, 56.66; H, 6.56; N, 6.84.

Hallados: C, 56.66; H, 6.41; N, 6.72.

Ejemplo 245

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(Tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-[3-(hidroximetil)piperidin-1-ilcarboniloxi]fenilalanina

Se preparó el carbamato por tratamiento de éster Tos-Pro-Tyr-iPr con 4-nitrofenil cloroformato, seguido de la adición de 3-piperidin metanol (trietilamina, cloruro de metileno, enfriado a 0°C, agitado a temperatura ambiente durante la noche). El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash (sílice, 3:2 EtOAc:Hex) para dar una espuma de color blanco (0.519g, 67%).

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): δ 8.26 (d, 1H, J = 7.90Hz); 7.69 (d, 2H, J = 8.12Hz); 7.40 (d, 2H, J = 8.12Hz); 7.22 (d, 2H, J = 8.56Hz); 6.98 (d, 2H, J = 8.34Hz); 4.85 (M, 1H); 4.57 (bs, 1H); 4.42 (m, 1H); 3.99 - 4.09 (m, 3H); 3.85 (m, 1H); 3.31 (m, 1H); 3.22 (m, 1H); 2.91 - 3.10 (m, 4H);

2.80 (m, 1H); 2.55 (m, 1H); 2.39 (s, 3H); 1.51 - 1.72 (m, 6H); 1.42 (m, 2H); 1.16 (d, 3H, J = 6.15Hz); 1.11 (d, 3H), J = 6.15Hz).

IR (KBr, cm^{-1}) 3400, 2990, 2940, 2880, 1725, 1520, 1430, 1350, 1220, 1165, 1100, 660, 600, 550.

MS ((-)ESI, m/z (%)) 614 (30[M-H]).

Anal. Calc=d for $C_{31}H_{41}N_3O_8S$: C, 60.47; H, 6.71; N, 6.82.

Hallados: C, 59.83; H, 6.61; N, 6.59.

Ejemplo 246

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-trifluorometanosulfonilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 128 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS (+ESI):733 $[M+H]^+$.

Anal. Calc=d for $C_{31}H_{39}F_3N_4O_9S_2$ A 0.10 $C_4H_8O_2$: C,50.20; H, 5.40; N, 7.55.

Hallados: C, 50.25; H, 5.46; N, 7.07.

Ejemplo 247

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-(N-fenilurea)bencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se calentó hasta el reflujo bajo atmósfera de argón una mezcla del Ejemplo 107 (250 mg, 0.51 mmol), isocianato de fenilo (62 mg, 0.56 mmol) y trietilamina (76 µL, 0.56 mmol). El reflujo se continuó durante la noche. Se retiró el solvente bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía flash (sílice, hexanos: EtOAc 1:1 then EtOAc) para dar

el compuesto del título en forma de una espuma grisácea (160 mg, 46%), punto de fusión 112-115°C.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS (+ESI) $[M+NH_4]^+$ 697 (100%).

Ejemplo 248

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(2-trifluoroacetil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.70 - 7.66 (m, 2H), 7.35 - 7.30 (m, 1H), 7.27 - 7.21 (m, 1H), 7.14 - 7.10 (m, 2H), 7.01 (d, 2H), 5.09 - 4.95 (m, 1H), 4.89 - 4.75 (m, 2H), 4.14 - 4.07 (m, 1H), 3.93 - 3.85 (m, 2H), 3.35 - 3.20 (m, 2H), 3.13 - 2.97 (m, 9H), 2.05 - 2.01 (m, 1H), 1.63 (1.50 (m, 3H), 1.20 (d, 6H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.7, 170.6, 170.5, 156.3, 155.8, 154.9, 150.6, 140.1, 139.2, 135.1, 135.1, 13.2, 133.0, 133.0, 132.9, 130.2, 130.1, 129.9, 126.9, 126.4, 126.3, 125.8, 121.7, 118.3, 114.5, 69.6, 62.1, 62.0, 53.2, 49.6, 46.6, 46.5, 45.1, 42.7, 40.9, 37.1, 36.6, 36.3, 30.1, 30.0, 29.2, 27.8, 24.2, 24.2, 21.6, 21.6.

Ejemplo 249

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(1-metilpirazol-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Sustituyendo cloruro de *N*-metilpirazol-3-sulfonilo (ver Solicitud de Patente Europea 095925) y siguiendo el método descripto para la preparación del Ejemplo 56, se obtuvo el compuesto del título.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.45 (d, 1H), 7.21 (d, 2H), 7.09 (d, 1H), 7.01 (d, 2H), 6.71 (d, 1H), 5.03 - 4.98 (m, 1H), 4.87 - 4.84 (m, 1H), 4.60 - 4.59 (m, 2H), 4.05 (s, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.12 - 3.01 (m, 5H), 2.98 (s, 3H), 1.22 - 1.15 (m, 12H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.3 , 168.3, 154.9, 150.7, 146.7, 133.0, 131.9,130.3, 121.7, 108.9, 73.5, 69.5, 54.7, 53.3, 50.7, 39.9, 37.7, 36.6, 36.3, 28.8, 24.1, 21.5, 21.5.

Ejemplo 250

Síntesis de *N*-(1-metilpirazol-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 249 utilizando el procedimiento descripto en el Método 7.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.25 (d, 1H), 7.76 (d, 1H), 7.32 (d, 2H), 7.01 (d, 2H), 6.70 (d, 1H), 4.74 - 4.71 (m, 1H), 4.68 (d, 1H), 4.56 (d, 1H), 4.12 (s, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.24 - 3.07 (m, 5H), 2.97 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.13 (s, 3H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 174.1, 171.4, 157.0, 151.9, 148.2, 135.7, 134.2, 131.8, 122.9, 109.6, 74.4, 55.6, 55.0, 51.5, 40.0, 37.6, 36.8, 36.7, 29.6, 24.8.

Ejemplo 251

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(piridina-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 56, donde se usó N-óxido de cloruro de 4-piridinsulfonilo en lugar de cloruro de 3-piridinsulfonilo (ver Marsais y coworkers, *J. Org. Chem.* 1987, **52,** 1133-1136). La desoxigenación del N-óxido se logró utilizando el procedimiento de Aoyagi y sus colegas, *Synthesis* 1997, 891.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8.89 - 8.87 (m, 2H), 7.72 - 7.70 (m, 2H), 7.19 (d, 2H), 7.01 (d, 2H), 6.79 (d, 1H), 5.05 - 5.01 (m, 1H), 4.85 - 4.82 (m, 1H), 4.58 (d, 1H), 4.45 (d, 1H), 3.91 (s, 1H), 3.11 - 3.02 (m, 5H), 2.99 (s, 3H), 1.28 - 1.16 (m, 12H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.3, 167.7, 154.9, 151.5, 150.7, 144.2, 132.7, 130.3, 121.8, 120.9, 73.6, 69.7, 54.6, 53.1, 50.4, 37.5, 36.6, 36.3, 29.1, 23.6, 21.6, 21.5.

Ejemplo 252

Síntesis de *N*-(piridina-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 251 utilizando el procedimiento descripto en el Método 7.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.78 (d, 2H), 7.42 (d, 1H), 7.69 (d, 2H), 7.35 (d, 2H), 7.06 (d, 2H), 4.69 - 4.61 (m, 3H), 4.16 (s, 1H), 3.25 - 3.19 (m, 1H), 3.13 - 3.05 (m, 4H), 2.97 (s, 3H), 1.25 (s, 6H).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 174.1, 170.5, 157.0, 152.2, 152.0, 147.2, 135.8, 131.8, 123.1, 122.7, 73.9, 55.6, 54.9, 54.4, 37.5, 36.8, 36.7, 30.1, 24.8.

Ejemplo 253

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*-metil-*N*-(2-dimetilaminoetil)carbamiloxi)fenilalanina

Se agitó una solución del ácido de partida (500 mg), éster *ter*-butílico del ácido (2S)-2-amino-3-{4-[(2-dimetilaminoetil)-metilcarbamoiloxi]fenil} propiónico, HOBt (235 mg) y 4-metilmorfolina (0.87 mL) en DMF (10 mL) en baño de hielo a 0°C. Se agregó a la solución hidrocloruro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (360 mg). El baño de hielo se retiró luego de 10 minutos. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se agregó acetato de etilo (20 mg). La solución se lavó con solución saturada de $NaHCO_3$ (30 mL) dos veces, y luego se lavó con salmuera. La solución se secó sobre $MgSO_4$. El solvente se evaporó bajo vacío y el residuo se sometió a cromatografía en gel de sílice para obtener 385 mg del compuesto del título.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: [(+)ESI], $[M+H]^+$ 663.

Ejemplo 254

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*-metil-N-(2-dimetilaminoetil)carbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 253 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: [(+)ESI], $[M+H]^+$ 617.

Ejemplo 255

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiapropil-L-4-(*N*-metil-*N*-(2-dimetilaminoetil)carbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 253 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: [(+)ESI], $[M+H]^+$ 607.

Ejemplo 256

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*-metil-*N*-(2-dimetilaminoetil)carbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 254 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: [(+)ESI], $[M+H]^+$ 561.

Ejemplo 257

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados, punto de fusión 64-67°C.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: $[M+H]^+$ 699.

Anal. Calc. para $C_{31}H_{40}ClFN_4O_7S_2$ A H_20: C, 51.90; H, 5.9; N, 7.8.

Hallados: C, 51.53; H, 5.50; N, 7.62.

Ejemplo 259

Síntesis de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(*N,N*-dimethycarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 258 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: [M+1] 603.

Anal. Calc. para $C_{24}H_{27}FN_3O_7S_2$: C, 49.02; H, 4.63; N, 7.15.

Hallados: C, 49.25; H, 4.89; N, 6.73.

Ejemplo 260

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 82 sustituyendo los materiales de partida adecuados, punto de fusión 111-114°C.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: +ESI [M+NH4]+ 719.

Anal. Calc. para $C_{30}H_{37}ClFN_3O_7S$: C, 50.02; H, 5.46; N, 5.8.

Hallados: C, 50.23; H, 5.10; N, 5.50.

Ejemplo 261

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 82 sustituyendo los materiales de partida adecuados, punto de fusión77-81°C.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: $[M+NH_4]+$ 705.

Anal. Calc. para $C_{29}H_{35}ClFN_3O_7S_3$: C, 50.61; H, 5.13; N, 6.1.

Hallados: C, 50.33; H, 5.07; N, 5.94.

Ejemplo 262

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)]fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados, punto de fusión 65-69°C.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: $[M+NH_4]^+$ 647.

Anal. Calc. para $C_{27}H_{33}ClFN_3O_7S_2$: C, 51.46; H, 5.28; N, 6.4.

Hallados: C, 51.29; H, 5.19; N, 6.50.

Ejemplo 263

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados, punto de fusión 68-72°C.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: $[M+H]^+$ 626.

Anal. Calc. para $C_{28}H_{36}ClN_3O_7S_2$: C, 53.77; H, 5.80; N, 6.71.

Hallados: C, 53.26; H, 5.8; N, 6.63.

Ejemplo 264

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: $[M+H]^+$ 685.

Anal. Calc. para $C_{30}H_{38}ClN_4O_7$: C, 52.59; H, 5.59; N, 8.18.

Hallados: C, 52.09; H, 5.48; N, 7.77.

Ejemplo 265

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-3-cloro-4-(N,N-dimetilcarbamiloxi)]fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: $[M+H]^+$ 580.

Anal. Calc. para $C_{27}H_{34}ClN_3O_7S$ A 0.5 H_20: C, 55.04; H, 6.00; N, 7.13.

Hallados: C, 55.06; H, 5.71; N, 6.93.

Ejemplo 266

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(4-Fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(4-(2=-piridil)-piperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: $[M+H]^+$ 748.

Anal. Calc. para $C_{34}H_{39}ClFN_5O_7S_2$: C, 54.57; H, 5.25; N, 9.3.

Hallados: C, 54.26; H, 5.10; N, 9.07.

Ejemplo 267

Síntesis de Éster *ter*-butílico *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(4-(2=-piridil)-piperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados, punto de fusión 80-86°C.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: $[M+H]^+$ 762.

Anal. Calc. para $C_{35}H_{41}ClFN_5O_7S_2$: C, 55.14; H, 5.42; N, 9.19.

Hallados: C, 54.67; H, 5.40; N, 8.69.

Ejemplo 268

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(4-nitrobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{26}H_{32}N_4O_9S$: C, 54.16; H, 5.59; N, 9.72.

Hallados: C, 53.69; H, 5.24; N, 9.52.

Ejemplo 269

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(4-Aminobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 268 utilizando el procedimiento descripto en el Método 4.

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{26}H_{34}N_4O_7S$: C, 57.13; H, 6.27; N, 10.25.

Hallados: C, 56.30; H, 6.12; N, 10.05.

Ejemplo 270

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 82 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{29}H_{37}N_3O_7S_2$: C, 57.69; H, 6.18; N, 6.96.

Hallados: C, 57.36; H, 5.99; N, 6.76.

Ejemplo 271

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-fenilcarbamilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

989 990

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): δ 8.62 (s, 1H); 8.11 (d, 1H); 7.73 (d, 2H); 7.45 (m, 4H); 7.26 (m, 3H); 7.04 (m, 2H); 6.95 (m, 1H); 6.25 (d, 1H); 4.90 (m, 1H); 4.50 (m, 1H); 4.11 (m, 1H); 3.6 (br, 4H); 3.4 (br, 4H); 3.10 (m, 2H); 3.00 (m, 1H); 2.40 (s, 3H); 1.60 (m, 3H); 1.40 (m, 1H); 1.18 (d, 3H); 1.12 (d, 3H).

IR (KBr, cm^{-1}) 3400-3500(br), 2950, 2900, 1725, 1650, 1540, 1450, 1240, 1210, 1000, 760, 675, 580, 540.

MS ((+)ESI, m/z (%)) 706 (100 $[M+H]^+$).

Anal. Calc. para $C_{36}H_{43}N_5O_8S$.0.35 EtOAc: C, 60.98; H, 6.27; N, 9.51.

Hallados: C, 50.31; H, 6.16; N, 9.33.

Ejemplo 272

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-fenilcarbamilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 271 utilizando el procedimiento descripto en el Método 7.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): δ 12.8 (s, 1H); 8.62 (s, 1H); 8.11 (d, 1H); 7.73 (d, 2H), 7.45 (m, 4H); 7.26 (m, 3H); 7.04 (m, 2H); 6.95 (m, 1H); 6.25 (d, 1H); 4.50 (m, 1H); 4.11 (m, 1H); 3.6 (br, 4H); 3.4 (br, 4H); 3.10 (m, 2H); 3.00 (m, 1H); 2.40 (s, 3H); 1.60 (m, 3H); 1.40 (m, 1H).

IR (KBr, cm^{-1}) 3400, 1725, 1650, 1540, 1450, 1240, 1210, 1000, 760, 675, 580, 540.

MS ((-)ESI, m/z (%)) 662 (100 $[M-H]^+$).

Ejemplo 273

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(1-*n*-butilicopirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 137 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.89 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.21 (d, 2H), 7.06 (d, 1H), 7.02 (d, 2H), 5.04 (sept, 1H), 4.89 - 4.82 (m, 1H), 4.57 (d, 1H), 4.41 (d, 1H), 4.16 (t, 2H), 3.78 (s, 1H), 3.14 (dd, 1H), 3.06 (dd, 1H), 3.09 (s, 3H), 3.00 (s, 3H), 1.85 (pent, 2H), 1.36 - 1.23 (m, 2H), 1.27 (s, 3H), 1.24 (d, 3H), 1.21 (d, 3H), 1.16 (s, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 170.4, 168.3, 154.9, 150.7, 139.2, 131.8, 130.3, 121.8, 117.0, 73.8, 69.6, 54.8, 53.2, 52.7, 50.6, 37.7, 36.6, 36.3, 31.8, 28.9, 24.0, 21.6, 21.5, 19.4, 13.3.

Ejemplo 274

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(pyridin-4-ilocarbonil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): δ 8.69 (dd, 2H), 8.28 (d, 1H); 7.71 (d, 2H); 7.43 (m, 4H); 7.26 (d, 2H); 7.04 (d, 2H); 4.86 (m, 1H); 4.42 (m, 1H); 4.05 (m, 1H); 3.4-3.8 (brm, 9H); 3.05 (m, 3H); 2.40 (s, 3H); 1.60 (m, 3H); 1.40 (m, 1H); 1.18 (d, 3H); 1.15 (d, 3H).

IR (KBr, cm^{-1}) 3400, 1725, 1650, 1510, 1200, 1160, 1100, 1010, 650, 600, 550.

MS ((+)ESI, m/z (%)) 692 (100 $[M+H]^+$).

Anal. Calc. para $C_{35}H_{41}N_5O_9S$. $0.75H_20$: C, 59.60; H, 6.07; N, 9.93

Hallados: C, 59.45; H, 5.86; N, 9.88.

Ejemplo 275

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-4-oxoprolil-L-4-(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 164 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS [(-)ESI] [M-H]) 516.

Ejemplo 276

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-*trans*-4-hidroxiprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 165 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS [(-)ESI] [M-H]) 518.

Ejemplo 277

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(4-cianobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados, punto de fusión 166-167°C.

Ejemplo 278

Síntesis de *N*-(4-Aminobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 107 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{23}H_{28}N_4O_7S$: C, 47.34; H, 4.84;N, 9.60.

Hallados: C, 47.57; H, 5.20; N, 8.75.

Ejemplo 279

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-4-oxoprolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

Se enfrió acetonitrilo (3 mL) a -40EC (CH_3CN/hielo seco). Se agregó cloruro de oxalilo (0.10 mL). Se disolvieron éster *ter*-butílico *N*-(Tolueno-4-sulfonil)-L-4-hidroxiprolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi) fenilalanina (300 mg) y DMSO (0.008 mL) en acetonitrilo (4 mL) y se agregaron a la solución anterior. La reacción se revolvió a -40EC durante media hora bajo condiciones secas. Se agregó trietilamina (0.33 mL). El baño de hielo seco se retiró luego de 5 minutos. La reacción se revolvió a temperatura ambiente durante 1 hora. El solvente se evaporó bajo vacío y se agregó acetato de etilo (15 mL). La mezcla se lavó con agua (3x) y luego con salmuera. La solución se secó sobre $MgSO_4$. El solvente se evaporó bajo vacío y el residuo se lavó en una columna de gel de sílice para dar 150 mg del compuesto del título, punto de fusión 84-85°C.

Ejemplo 280

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-[3-(hidroximetil)piperidin-1-ilcarboniloxi]fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados, punto de fusión 84-85°C.

Ejemplo 281

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(4,4-difluoro)prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: [(+)ESI], $[M+NH_4]^+$ 599.

Ejemplo 282

Síntesis de *N*-(Tolueno-4-sulfonil)-L-(4,4-difluoro)prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 281 utilizando el procedimiento descripto en el Método 7.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: [(+)ESI], $[M+NH_4]$ 557.

Ejemplo 283

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-(4-benzoilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): δ 8.27 (d, 1H); 7.69 (d, 2H); 7.45 (m, 7H); 7.24 9d, 2H); 7.02 (d, 2H); 4.86 (m, 1H); 4.42 (m, 1H); 4.07 (m, 1H); 3.65 (br s, 4H); 3.45 (br s, 4H); 3.35 (m, 1H); 3.05 (m, 3H); 2.38 (s, 3H); 1.60 (m, 3H); 1.40 (m, 1H); 1.18 (d, 3H); 1.11 (d, 3H).

IR (KBr, cm^{-1}) 3400, 1725, 1675, 1625, 1510, 1425, 1350, 1250, 1175, 1110, 1010, 700, 660, 590, 550.

MS ((+)ESI, m/z (%)) 708 (100 $[M+NH_2]^+$).

Anal. Calc. para $C_{36}H_{42}N_4O_8S.0.5H_2O$: C, 61.79; H, 6.19; N, 8.01.

Hallados: C, 61.64; H, 6.10; N, 7.72.

Ejemplo 284

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(1-metil-1H-imidazola-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se preparó el carbamato por tratamiento de éster de 1-metilmidazol-4-sulfonil-Pro-Tri-iPr con 4-nitrofenil cloroformato, seguido de adición de dimetilamina (trietilamina, cloruro de metileno, 0°C, revuelto a temperatura ambiente durante la noche). El producto crudo se purificó por cromatografía flash (sílice, 95:3:2 EtOAc:EtOH;Et_3N), seguido de recristalización a partir de EtOAc. Se obtuvo un sólido de color blanco, punto de fusión 162-164°C (8.7g, 66%).

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{24}H_{33}N_5O_7S$: C, 53.82; H, 6.21; N, 13.08.

Hallados: C, 53.47; H, 6.13; N, 12.96.

Ejemplo 286

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 285 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11 punto de fusión 116-118°C.

Ejemplo 287

995

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(4-cianobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados, punto de fusión 70-71°C.

Ejemplo 288

Síntesis de Éster metílico de *N*-(4-amidinobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se enfrió metanol (seco) a 0°C. Se burbujeó HCl en la solución durante 15 minutos para preparar una solución saturada. Se agregó Ejemplo 277 y la mezcla de reacción se revolvió a 0°C por 30 minutos y luego a temperatura ambiente durante 24 horas. Se evaporó el solvente. Se agregó NH_3 en metanol (2M, 5mL). La reacción se revolvió a temperatura ambiente por 24 horas. Se evaporó el solvente. El residuo se purificó por HPLC de fase reversa en CH_3CN:H_2O (20:80). En un tiempo de retención de 12.45 minutos, el producto se aisló por secado por congelamiento para dar el compuesto del título.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (en DMSO) multiplete a 1.47 - 1.55 ppm (1H), 1.63 - 1.72 ppm (3H=s), singlete a 2.87 ppm (3H=s), singlete a 3.02 ppm (3H=s), multiplete a 3.05 - 3.10 ppm (2H=s), multiplete a 3.17 - 3.22 ppm (1H), multiplete a 3.37 - 3.42 ppm (1H), singlete a 3.62 ppm (3H=s), multiplete a 4.21 - 4.23 ppm (1H), cuarteto a 4.48 - 4.56 ppm (1H), doblete a 7.00 - 7.03 ppm (2H=s), doblete a 7.23 - 7.26 ppm (2H=s), un pico amplio a 7.20 - 7.50 ppm, doblete a 8.02 - 8.03 ppm (4H=s), doblete a 8.48 - 8.52 ppm (1H).

Ejemplo 289

Síntesis de Éster *ter*-butílico *N* -(tolueno-4-sulfonil)-L-4-hidroxiprolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados, punto de fusión80-82°C.

Ejemplo 290

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-4-hidroxiprolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

Se disolvió éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-4-hidroxiprolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi) fenilalanina (160 mg) en ácido fórmico (7 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Se evaporó el solvente y el residuo se purificó utilizando HPLC de fase reversa en 20:80 CH_3CN/agua. En un tiempo de retención de 5.85 minutos, se obtuvieron 50 mg del compuesto del título, punto de fusión 170-172°C.

Ejemplo 291

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-(4-benzoilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 283 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): δ 12.8 (s, 1H); 8.27 (d, 1H); 7.69 (d, 2H); 7.45 (m, 7H); 7.24 (d, 2H); 7.02 (d, 2H); 4.42 (m, 1H); 4.07 (m, 1H); 3.65 (br s, 4H); 3.45 (br s, 4H); 3.35 (m, 1H); 3.05 (m, 3H); 2.38 (s, 3H); 1.60 (m, 3H); 1.40 (m, 1H).

997 97

IR (KBr, cm^{-1}) 3400, 1725, 1675, 1625, 1510, 1425, 1350, 1260, 1175, 1110, 1010, 700, 660, 590, 550.

MS ((+)ESI, m/z (%)) 666 (100 $[M+NH_4]^+$).

Anal. Calc. para $C_{33}H_{36}N_4O_8S.0.66H_2O$: C, 60.00; H, 5.69; N, 8.48

Hallados: C, 60.36; H, 5.70; N, 7.81.

Ejemplo 292

Síntesis de Éster metílico de *N*-(4-amidinobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo los procedimientos descriptos para la preparación de los Ejemplos 287 y 288.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: [(+)ESI] [M+H] 604.

Ejemplo 293

Síntesis de *N*-(3-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbaniloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 166 utilizando el procedimiento descripto en el Método 11, punto de fusión 82-83°C.

Ejemplo 294

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-[*N*-metil-*N*-(2-(*N*=-metil-*N*=-toluenosulfonil-amino)etil)carbamiloxi]fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): δ 8.27 (d, 1H); 7.71 (d, 2H); 7.69 (d, 2H); 7.40 (m, 4H); 7.24 (d, 2H); 6.99 (d, 2H); 4.86 (m, 1H); 4.43 (m, 1H); 4.06 (m, 1H); 3.51 (m, 1H); 3.2 - 3.35 (m, 3H); 2.9 - 3.2 (overlapping m, 7H); 2.67 (d, 3H); 2.38 (s, 6H); 1.60 (m, 3H); 1.40 (m, 1H); 1.20 (d, 3H); 1.15 (d, 3H).

IR (KBr, cm^{-1}) 3400, 2975, 2950, 1725, 1680, 1510, 1450, 1400, 1280, 1225, 1150, 1110, 800, 730, 675, 575, 550.

MS ((+)ESI, m/z (%)) 760 (100 $[M+NH_4]^+$).

Anal. Calc. para $C_{36}H_{46}N_4O_9S_2$: C, 58.20; H, 6.24; N, 7.54.

Hallados: C, 57.90; H, 6.30; N, 7.34.

Ejemplo 295

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-[*N*-(2-(*N*=-fenilaminocarboniloxi)etil)carbamiloxi)]fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 4 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz): δ 9.67 (s, 1H); 8.27 (d, 1H); 7.72 (d, 2H); 7.47 (d, 2H); 7.42 (d, 2H); 7.24 (m, 4H); 6.98 (m, 3H); 4.87 (m, 1h); 4.45 (m, 1H); 4.18 (m, 2H); 4.05 (m, 1H); 3.4 (m, 3H); 3.05 (m, 3H) 2.40 (s, 3H); 1.6 (m, 3H); 1.40 (m, 1H); 1.2 (d, 3H); 1.15 (d, 3H).

IR (KBr, cm^{-1}) 3350, 2950, 1725, 1675, 1600, 1550, 1500, 1325, 1200, 1150, 1100, 650, 575, 525.

MS ((+)ESI, m/z (%)) 698 (100 $[M+NH_4]^+$).

Anal. Calc. para $C_{34}H_{40}N_4O_9S.0.21$ EtOAc. $0.5H_2O$: C, 59.08; H, 6.07; N, 7.91.

Hallados: C, 59.08; H, 6.02; N, 7.80.

Ejemplo 296

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-4-(*trans*-hidroxi)prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: [(+)ESI], [M+NH_4] 583.

Ejemplo 297

Síntesis de Éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-4-(*trans*-hidroxi)prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi) fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto para la preparación del Ejemplo 2 sustituyendo los materiales de partida adecuados.

Los datos físicos fueron los siguientes:

MS: [(+)ESI], [M+NH_4] 597.

Ejemplo 298

Síntesis de *N*-(4-amidinobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del producto del Ejemplo 288 utilizando el procedimiento descripto en el Método 5. punto de fusión:130-132°C.

Ejemplo 299

1000

Síntesis de Éster del ácido bis-{4-[(2S)-2-*ter*-butoxicarbonil-2-((4R)-5,5-dimetil-3-(tolueno-4-sulfonil)tiazolidin-4-carboxamido)etil]fenil} piperazin-1,4-dicarboxílico.

El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento descripto en el Ejemplo 4, excepto que se utilizaron 0.5 equivalentes de piperazina.

Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{58}H_{74}N_6O_{14}S_4$: C, 57.69; H, 6.18; N, 6.96.

Hallados: C, 58.01; H, 6.07; N, 6.68.

Ejemplo 300

Síntesis de Éster del ácido bis-{4-[(2S)-2-carboxi-2-((4R)-5,5-dimetil-3-(tolueno-4-sulfonil)tiazolidin-4-carboxamido)etil]fenil}piperazin-1,4-dicarboxílico

El compuesto del título se preparó por hidrólisis del éster di-t-butílico del Ejemplo 299 con ácido fórmico para dar una espuma de color blanco (300 mg cuantitativos).

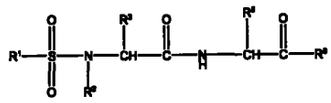
Los datos físicos fueron los siguientes:

Anal. Calc. para $C_{50}H_{58}N_6O_{14}S_4$: C, 54.83; H, 5.34; N, 7.67

Hallados: C, 55.10; H, 5.57; N, 7.37.

Otros compuestos de las Fórmulas I y Ia preparados según los métodos arriba descriptos incluyen aquellos presentados en los Ejemplos 301-370 de la Tabla 5 a seguir.

Tabla 5



Ej. No.	R^1	R^2	R^3	R^5	R^6
301	*p*-CH_3-φ-	R^2/R^3 = -CH_2CH_2-NH-CH_2- cíclico (L-piperazinilo)		*p*-[$(CH_3)_2NC(O)O$-]bencilo-	-$OC(CH_3)_3$
302	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-$C(CH_3)_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[(2-(hidroximetil)pirrolidin-1-ilo-C(O)O-]-bencilo-	-$OC(CH_3)_3$
303	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-$C(CH_3)_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[(2-(hidroximetil)pirrolidin-1-ilo-C(O)O-]-bencilo-	-OH
304	*p*-CH_3-φ-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(2-($CH_3OC(O)$-)pirrolidin-1-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-$OC(CH_3)_3$
305	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-$C(CH_3)_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		3-cloro-4-[(tiomorfolin-4-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-OH
306	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-$C(CH_3)_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-OH
307	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-$C(CH_3)_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-$OC(CH_3)_3$
308	*p*-CH_3-φ-	R^2/R^3 = cíclico -$CH_2CH(OH)CH_2$- (L-4-hidroxipirrolidinilo)		*p*-[(tiomorfolin-4-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-$OC(CH_3)_3$

Ej. No.	R^1	R^2	R^3	R^5	R^6
309	*p*-CH_3-φ-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[$(CH_3)_2NC(O)O$-]bencilo-	-$O(CH_2CH_2O)_2CH_3$
310	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-$C(CH_3)_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[(4-(pirimidin-2-ilo)piperazin-1-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-$OC(CH_3)_3$
311	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-$C(CH_3)_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		3-fluoro-4-[$(CH_3)_2NC(O)O$-]-bencilo-	-$OCH(CH_3)_2$
312	*p*-CH_3-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-CH_2N-(-SO_2CH_3)-CH_2- cíclico (L-4-metanosulfonil-piperazinilo)		*p*-[$(CH_3)_2NC(O)O$-]bencilo-	-$OC(CH_3)_3$
313	R^1/R^2 = 1,1-dioxo-2,3-dihidro-3,3-dimetil-1,2-benzisotiazol-2-ilo-		H	*p*-[$(CH_3)_2NC(O)O$-]bencilo-	-OH
314	R^1/R^2 = *N*-2,10-canforsultamil-		H	*p*-[$(CH_3)_2NC(O)O$-]bencilo-	-$OC(CH_3)_3$
315	R^1/R^2 = *N*-2,10-canforsultamil-		H	*p*-[$(CH_3)_2NC(O)O$-]bencilo-	-OH
316	R^1/R^2 = *N*-2,10-canforsultamil-		H	3-cloro-4-[$(CH_3)_2NC(O)O$-]-bencilo-	-$OCH(CH_3)_2$
317	*p*-Br-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-$C(CH_3)_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[$(CH_3)_2NC(O)O$-]bencilo-	-$OC(CH_3)_3$

Ej. No.	R^1	R^2	R^3	R^5	R^6
318	*p*-Br-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-C(CH_3)$_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[(CH_3)$_2$NC(O)O-]bencilo-	-OH
319	*p*-CH_3-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-CH(OH)-CH_2- cíclico (L-4-hidroxipirrolidinilo)		*p*-[(4-metilpiperazin-1-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-OH
320	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-C(CH_3)$_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[(4-pirimidin-2-ilo)piperazin-1-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-OH
321	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-C(CH_3)$_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	-OCH(CH_3)$_2$
322	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-CH_2-S- cíclico (tiazolidin-2-ilo)		*p*-[(CH_3)$_2$NC(O)O-]bencilo-	-OH
323	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-CH_2-S- cíclico (tiazolidin-2-ilo)		*p*-[(CH_3)$_2$NC(O)O-]bencilo-	-OC(CH_3)$_3$
324	*p*-CH_3-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-C(O)-CH_2- cíclico (L-4-oxopirrolidinil)		*p*-[(tiomorfolin-4-ilo)C(O)O-]bencilo-	-OH
325	*p*-CH_3-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-C(O)-CH_2- cíclico (L-4-oxopirrolidinil)		*p*-[(4-metilpiperazin-1-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-OH
326	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-CH_2-S- cíclico (tiazolidin-2-ilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-OH
327	*p*-NO_2-φ-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-OC(CH_3)$_3$
328	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-CH_2-S- cíclico (tiazolidin-2-ilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-OC(CH_3)$_3$

Ej. No.	R^1	R^2	R^3	R^5	R^6
329	*p*-Br-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-C(CH_3)$_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-OH
330	*p*-CH_3-φ-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(4-(φNHC(S)-)piperazin-1-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-OCH(CH_3)$_2$
331	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-CH_2-S- cíclico (tiazolidin-2-ilo)		*p*-[(4-CH_3-homopiperazin-1-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-OC(CH_3)$_3$
332	*p*-CH_3-φ-	R^2/R^3 = -CH_2CH(-OSO_2CH_3)-CH_2- cíclico (L-4-metanosulfoxi-pirrolidinil)		*p*-[(CH_3)$_2$NC(O)O-]bencilo-	-OC(CH_3)$_3$
333	*p*-$H_2NC(O)$-φ-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(CH_3)$_2$NC(O)O-]bencilo-	-OH
334	*p*-$H_2NC(O)$-φ-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(tiomorfolin-4-ilo)C(O)O-]bencilo-	-OH
335	*p*-$H_2NC(=N)$-φ-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(tiomorfolin-4-ilo)C(O)O-]bencilo-	-OH
336	*p*-NO_2-φ-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-OH
337	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-C(CH_3)$_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		3-cloro-4-[(4-piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]-bencilo-	-OCH_2CH_3
338	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-C(CH_3)$_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		3-cloro-4-[(4-piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]-bencilo-	-OH

Ej. No.	R^1	R^2	R^3	R^5	R^6
339	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-CH_2-S- cíclico (tiazolidin-2-ilo)		*p*-[(4-CH_3-homopiperazin-1-ilo-C(O)O-]bencilo-	-OH
340	1-metilpirazol-4-ilo-	R^2/R^3 = -CH_2-S-$C(CH_3)_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		3-cloro-4-[$(CH_3)_2$NC(O)O-]bencilo-	-$OCH(CH_3)_2$
341	1-metilimidazol-4-ilo-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	-$OCH(CH_3)_2$
342	1-metilimidazol-4-ilo-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	-$OC(CH_3)_3$
343	*p*-CH_3-φ-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	-OH
344	*p*-CH_3-φ-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	-$OC(CH_3)_3$
345	*p*-CH_3-φ-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-$OCH(CH_3)_2$
346	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	-$OCH(CH_3)_2$
347	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	-$OC(CH_3)_3$
348	*p*-CH_3-φ-	R^2/R^3 = -$CH_2CH_2N(-SO_2-CH_3)CH_2$- cíclico (4-metanosulfonil-piperazin-2-ilo)		*p*-[$(CH_3)_2$NC(O)O-]bencilo-	-OH

Ej. No.	R^1	R^2	R^3	R^5	R^6
349	*p*-CH_3-φ-	R^2/R^3 = -CH_2CH(-OSO_2-CH_3)CH_2- cíclico (L-4-metanosulfoxi-pirrolidinil)		*p*-[$(CH_3)_2$NC(O)O-]bencilo-	-OH
350	CH_3-	-CH_3φ	H	*p*-[$(CH_3)_2$NC(O)O-]bencilo-	-OC$(CH_3)_3$
351	*p*-Br-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-C$(CH_3)_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[(4-piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	-OC$(CH_3)_3$
352	*p*-CF_3O-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-C$(CH_3)_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[$(CH_3)_2$NC(O)O-]bencilo-	-OH
353	*p*-CF_3O-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-C$(CH_3)_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[$(CH_3)_2$NC(O)O-]bencilo-	-OC$(CH_3)_3$
354	*p*-CF_3O-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-C$(CH_3)_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[(4-piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	-OC$(CH_3)_3$
355	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(4-piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	-OH
356	*p*-F-φ-	R^2/R^3 = -CH_2CH(OH)CH_2- cíclico (L-4-hidroxipirrolidinilo)		*p*-[(4-piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	-OH
357	*p*-CF_3O-φ-	R^2/R^3 = -CH_2-S-C$(CH_3)_2$- cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[(4-piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	-OH
358	1-metilimidazol-4-ilo-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		3-cloro-4-[$(CH_3)_2$NC(O)O-]-bencilo-	-OH
359	1-metilimidazol-4-ilo-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		3-cloro-4-[$(CH_3)_2$NC(O)O-]-bencilo-	-OCH$(CH_3)_2$

Ej. No.	R^1,	R^2	R^3	R^5	R^6
360	1-metilimidazol-4-ilo-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)-C(O)O-]bencilo-	-OH
361	1-metilimidazol-4-ilo-	R^2/R^3 = $-CH_2-S-C(CH_3)_2-$ cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	-OH
362	1-metilpirazol-4-ilo-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	-OH
363	1-metilpirazol-4-ilo-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	$-OCH(CH_3)_2$
364	1-metilpirazol-4-ilo-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	$-OC(CH_3)_3$
365	1-metilpirazol-4-ilo-	R^2/R^3 = $-CH_2-S-C(CH_3)_2-$ cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	$-OC(CH_3)_3$
366	1-metilpirazol-4-ilo-	R^2/R^3 = 3 átomos de carbono cíclicos (L-pirrolidinilo)		3-cloro-4-[(4-(piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]bencilo-	$-OCH(CH_3)_2$
367	1-metilpirazol-4-ilo-	R^2/R^3 = $-CH_2-S-C(CH_3)_2-$ cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[$(CH_3)_2NC(O)O$-]bencilo-	$-OCH_2CH_2O\varphi$
368	1-metilpirazol-4-ilo-	R^2/R^3 = $-CH_2-S-C(CH_3)_2-$ cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		3-cloro-4-[(4-piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]-bencilo-	-OH
369	1-metilpirazol-4-ilo-	R^2/R^3 = $-CH_2-S-C(CH_3)_2-$ cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		3-cloro-4-[(4-piridin-2-ilo)piperazin-1-ilo)C(O)O-]-bencilo-	$-OCH_2CH_3$
370	1,5-dimetil-3-cloropirazol-4-ilo-	R^2/R^3 = $-CH_2-S-C(CH_3)_2-$ cíclico (L-5,5-dimetiltiazolidin-4-ilo)		*p*-[4-[5-CF_3-piridin-2-ilo)piperazin-1 il)-C(O)O-]bencilo-	-OH

946

Además, los Ejemplos 319, 324, 325, 332, 333, 334, 335 y 349 de la Tabla 5 se ejemplifican de la siguiente manera:

Ejemplo 319

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(4-hidroxi)prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

Se disolvió el éster *ter*-butilílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(4-hidroxi)prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina (300 mg) de partida en ácido fórmico (15 mL). La reacción se agitó durante 72 horas. Se evaporó el solvente y el residuo se purificó mediante HPLC de fase reversa, 20-80% CH_3CN/agua. En un tiempo de retención de 10.75 minutos, se obtuvieron 82 mg del compuesto del título, punto de fusión 128-130EC.

Ejemplo 324

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(4-oxo)prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

Se disolvió el éster *ter*-butilílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(4-oxo)prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina (130 mg) de partida en ácido fórmico (7 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Se evaporó el solvente bajo vacío para obtener 150 mg del producto deseado, punto de fusión: 111-112EC.

Ejemplo 325

Síntesis de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(4-oxo)prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina

Se disolvió el éster *ter*-butilílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(4-oxo)prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina (150 mg) de partida en ácido fórmico (7 mL). La reacción se agitó a temperatura

ambiente durante 6 horas. El solvente se evaporó bajo vacío y el residuo se purificó utilizando HPLC de fase reversa, 20-80% CH_3CH/agua. El tiempo de retención fue de 10.34 minutos. El producto se secó por congelamiento para obtener 82 mg del compuesto del título, punto de fusión 99-101EC.

Ejemplo 332

Se disolvieron el éster *ter*-butilílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(4-hidroxi)prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina (300 mg) de partida y cloruro de metilsulfonilo en THF (7 mL) a 0EC en baño de hielo. Se agregó trietilamina (0.21 mL). El baño de hielo se retiró luego de 10 minutos. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Se agregó acetato de etilo (20 mL). La mezcla se lavó con ácido cítrico (5%, 20 mL, 2x), y se lavó con $NaHCO_3$ saturado, luego con salmuera. La solución se secó sobre $MgSO_4$. Se evaporó el solvente y el residuo se lavó en columna de gel de sílice. El solvente se evaporó bajo vacío para obtener 300 mg del producto deseado, punto de fusión 73-74EC.

Ejemplo 333

Síntesis de *N*-(4-Aminobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se agregaron el éster metílico de *N*-(4-aminobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina (300 mg) de partida y solución de LiOH (2M, 0.6 mL) en metanol (6 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas. Se evaporó el solvente bajo vacío, y el residuo se purificó mediante HPLC de fase reversa, 20-80% CH_3CN/agua. En un tiempo de retención de 12.11 minutos, se obtuvieron 27 mg del producto deseado, punto de fusión: 130-132EC.

Ejemplo 334

Síntesis de *N*-(4-Aminocarbonilbencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

Se agregaron el éster metílico de *N*-(4-aminocarbonilbenzenesulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina (300 mg) de partida y solución de LiOH (2M, 0.5 mL) en metanol (6 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas. Se evaporó el solvente bajo vacío, y el residuo se purificó mediante HPLC de fase reversa, 20-80% CH_3CN/agua. En un tiempo de retención de 12.69 minutos, se obtuvieron 20 mg del producto deseado, punto de fusión: 123-125EC.

Ejemplo 335

Síntesis de *N*-(4-Amidinobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina

Se agregaron el éster metílico de *N*-(4-Amidinobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina (300 mg) de partida y solución de LiOH (2M, 0.5 mL) en metanol (6 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas. Se evaporó el solvente bajo vacío, y el residuo se purificó mediante HPLC de fase reversa, 20-80% CH_3CN/agua. En un tiempo de retención de 11.78 minutos, se obtuvieron 25 mg del producto deseado, punto de fusión: 123-125EC.

Ejemplo 349

Síntesis de *N*-(Tolueno-4-sulfonil)-L-(4-metanosulfoniloxi)prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina

Se disolvió el éster *ter*-butilílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(4-metanosulfoniloxi)prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina (200 mg) de partida en ácido fórmico (5 mL). La mezcla de reacción se agitó a

temperatura ambiente durante 6 horas. Se evaporó bajo vacío para obtener el producto deseado (195 mg), punto de fusión 83-84EC.

Ejemplo 371

Síntesis de *N*-(Tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-4-(α-metilbenciloxi)-L-fenilalanina

Se disolvió éster metílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-tirosina (785 mg, 1.89 mmol) en DMF (20 mL) a temperatura ambiente. A esto se le agregó K_2CO_3 (1.1 eq, 281 mg) y 1-bromoetil benceno (1.1 eq, 284 µL). La reacción se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. Se agregó acetato de etilo (100 mL) y la capa orgánica se lavó varias veces con salmuera (5 x 50 mL). La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$. Luego de filtrar y evaporar los solventes bajo presión reducida se aisló un aceite. Se aisló el material crudo en una concentración del 32% (330 mg, 0.6 mmol). Se convirtió entonces el éster metílico (330 mg. 0.6 mmol) al ácido correspondiente luego de ser tratado con NaOH (1.1 eq, 27 mg), en MeOH:H_2O (1:1) (15 mL) durante 4 horas a temperatura ambiente. Se agregó EtOAc y agua. La capa acuosa se recogió y se acidificó con HCl 1N hasta pH 2.5 y luego se extrajo nuevamente con EtOAc. La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$. Luego de filtrar y evaporar los solventes bajo presión reducida, se aisló una espuma en concentraciones cuantitativas.

Los datos NMR fueron los siguientes:

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.71 (bd, 2H), 7.34 (m, 7H), 7.20 (m, 1H), 7.01 (m, 2H), 6.80 (d, 2H, J = 8.37 Hz), 5.27 (m, 1H), 4.75 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.23-2.93 (m, 4H), 2.42 (s, 3H), 1.85 (m, 1H), 1.60 (d, 3H, J = 6.09 Hz), 1.36-1.26 (m, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 174.74, 172.22, 157.53, 145.00, 143.77, 133.42, 130.76, 130.58, 129.14, 128.60, 128.48, 127.94, 126.15, 116.57, 76.39, 62.73, 53.90, 50.09, 37.09, 25.07, 24.52, 22.17.

Espectroscopía de masas: (FAB) 537 (M+H).

Ejemplo 372

Síntesis de *N*-(Tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-4-(2-carboxfienoxi)-L-fenilalanina

Se agregó éster metílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-tirosina (2.14 g, 5.16 mmol) a una suspensión de hidruro de sodio, 60% en aceite (1.1 eq., 228 mg) en xilenos (50 mL) a 0EC. La mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos y se agregó un complejo de bromuro cuproso-sulfuro de dimetilo (1.4 eq., 1.48 g). Se agitó la mezcla de reacción a 23EC durante 0.5 horas. A esto se le agregó 2-iodobenzoato de sodio (1.5 eq., 8.06 mmol), y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 12 horas. Se agregó EtOAc (100 mL) y la capa orgánica se lavó con NH_4Cl, 10% HCl, y salmuera, y luego se secó sobre $MgSO_4$. El material crudo se eluyó por cromatografía en columna (gel de sílice) con $CHCl_3$:MeOH (9:1) y se aisló en forma de un aceite. El ácido se preparó por tratamiento con NaOH (1.1 eq), en MeOH:H_2O (1:1) durante 4 horas a temperatura ambiente. El diácido se aisló en forma de una espuma.

Los datos NMR son los siguientes:

^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.71 (m, 2H), 7.29 (m, 4H), 7.19 (m, 4H), 6.72 (m, 1H), 4.84 (m, 1H), 4.13 (m, 1H), 3.39 (m, 1H), 3.11 (m, 3H), 2.43 (s, 3H), 1.89 (m, 1H), 1.48 (m, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 172.67, 157.84, 155.89, 155.04, 145.17, 133.61, 133.19, 133.08, 131.69, 131.02, 130.64, 128.42, 127.87, 124.24, 120.04, 119.61, 116.12, 62.81, 50.31, 37.28, 30.69, 24.81, 22.15.

Espectroscopía de Masas: (FAB) 553 (M+H).

Ejemplo 373

Síntesis de *N*-(Tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-O-(bencil)-L-tirosina

Se trató *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-Pro-OH con $(COCl)_2$ y DMF en CH_2Cl_2 para obtener, luego de evaporación, *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-Pro-Cl. Este producto se trató con L-Tyr(Bn)-OH y NaOH en THF y H_2O, para obtener, luego de acidificación, extracción, secado con $MgSO_4$ y evaporación, el compuesto del título en forma de un aceite claro.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz): δ = 8.04 (d, J = 8.2, 1H), 7.70 (d, J = 8.1, 2H), 7.42-7.21 (m, 6H), 7.15 (d, J = 8.5, 2H), 6.90 (d, J = 8.5, 2H), 5.04 (s, 2H), 4.49-4.42 (m, 1H), 4.13-4.09 (m, 1H), 3.33-3.27 (m, 2H), 3.10-2.89 (m, 3H), 2.38 (s, 3H), 1.60-1.35 (m, 4H).

^{13}C NMR (DMSO-d_6, 75 MHz): δ = 172.63, 170.8, 157.0, 143.6, 137.2, 133.8, 130.3, 129.8, 129.4, 128.9, 128.4, 127.6, 125.3, 114.4, 69.1, 61.3, 53.4, 49.0, 35.8, 30.4, 23.8, 21.0.

Espectroscopía de Masas: (+FAB, alcohol 3-nitrobencilico) 523 (M+H).

Ejemplo 374

Síntesis de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-4-(1-H, 2-oxo-3-metiltetrahidropirimidin-1-il)-L-fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del éster t-butílico correspondiente utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.73 (d, 2H), 7.58 (d, 1H), 7.34 (d, 2H), 7.21 (d, 2H), 7.17 (d, 2H), 4.79 (q, 1H), 4.15 - 4.11 (m, 1H), 3.68 - 3.63 (m, 2H), 3.48 - 3.39 (m, 3H), 3.27 (dd, 1H), 3.17 (dd, 1H), 3.15 - 3.07 (m, 1H), 2.99 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.16 -2.08 (m, 2H), 2.00 - 1.98 (m, 1H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$):δ = 173.4, 172.2, 164.2, 156.4, 144.4, 142.5, 134.1, 133.0, 130.2, 130.0, 127.9, 126.2, 62.1, 53.4, 49.5, 48.9, 47.9, 36.5, 35.9, 30.2, 24.2, 22.0, 21.4.

Ejemplo 375

Síntesis de N-(Tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-4-(2-metoxifenil)-L-fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del éster t-butílico correspondiente utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

^{1}H NMR (CD_3OD):δ = 7.70 (m, 2H), 7.36 (m, 4H), 7.22 (m, 4H), 6.98 (m, 2H), 4.75 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.29 (m, 2H), 3.11 (m, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.75 (m, 1H), 1.53 (m, 3H).

^{13}C NMR (CD_3OD):δ = 174.4, 174.2, 158.1, 145.9, 138.9, 136.7, 135.1, 131.2, 130.9, 130.8, 130.2, 129.9, 129.1, 122.0, 112.6, 63.3, 55.9, 54.6, 50.5, 37.9, 31.5, 25.2, 21.4.

Ejemplo 376

Síntesis de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-4-(2-metoxifenil)-L-fenilalanina

El compuesto del título se preparó a partir del éster t-butílico correspondiente utilizando el procedimiento descripto en el Método 11.

Los datos NMR son los siguientes:

1015

^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8.41 (d, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.03 (d, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.74 (d, 2H), 7.39 (d, 1H), 7.33 (d, 2H), 4.72-4.68 (m, 1H), 4.17-4.13 (m, 1H), 3.54-3.34 (m, 3H), 3.20-3.12 (m, 1H), 2.82 (s, 6H)m 2.43 (s, 3H), 2.09-2.04 (m, 1H), 1.79-1.59 (m, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$):δ = 173.7, 171.8, 154.5, 147.2, 144.4, 137.8, 135.5, 133.2, 130.1, 127.9, 126.4, 62.2, 53.0, 49.5, 38.5, 36.0, 30.3, 24.4, 21.4.

Ejemplo 377

Síntesis de Éster bencilílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-4-(2,4,5-trioxo-3-(3-clorofenil)-tetrahidroimidazol-1-il)-L-fenilalanina

El compuesto se preparó por tratamiento de éster isopropílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-4-[(3-clorofenil ureido)-tetrahidroimidazol-1-il]-L-fenilalanina con cloruro de oxalilo en cloruro de metileno. El producto crudo se purificó por cromatografía flash (sílice 3:2 Hex: EtOAc) para obtener un sólido de color blanco (0.410g, 50%).

MS ((+)ESI, m/z (%) 746 (100[M+H]+) (746/748 1Cl)

Ejemplo 378

Síntesis de N-(fenil-sulfonil)-D-prolil-L-4-(2,6-dimetoxifenil)fenilalanina

El compuesto del título se preparó acoplando ácido 2,6-dimetoxifenilborónico y derivados de 4'-iodofenilalanina para obtener dimetoxibifenilalaninas como el compuesto del título siguiendo los procedimientos descriptos en Hagmann *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2001; 11(20): 2709-2713; Kamenecka *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2002; 12(16): 2205-2208; y Doherty *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2003; 13(11): 1891-1895.

Ejemplo 379

Síntesis de N-(3,5-diclorofenil-sulfonil)-D-prolil-L-4-[4-(metilcarbonil aminobutil)-2,5-Dioxo-imidazolidin-1-il]fenilalanina

El compuesto del título se preparó siguiendo los procedimientos descriptos en WO 01/54690.

Ejemplo 380

Síntesis de N-(2,6-diclorofenil-carbonil)-L-4-(2,6-dimetoxifenil)fenilalanina

El compuesto del título se preparó acoplando ácido 2,6-dimetoxifenilborónico y derivados de 4'-iodofenilalanina para obtener dimetoxibifenilalaninas como la del título siguiendo los procedimientos descriptos en WO 99/36393 y en Sircar *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002; 10(6): 2051-2066.

Ejemplo 381

Síntesis de Éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinsulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina

Cloruro de 3-piridinsulfonilo

La base libre del compuesto del título puede ser preparada a partir de ácido 3-piridinsulfónico (Aldrich) por un procedimiento que ha sido publicado: Corey *et al.*, *J. Org. Chem.* 1989, 54(2): 389. Alternativamente, el hidrocloruro del compuesto del título puede ser preparado a partir de ácido 3-piridinsulfónico (Aldrich) por procedimientos que han sido publicados: Crowell *et al.*, *J. Med. Chem.* 1989, 32(11): 2436; Karaman *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114(12): 4889.

L-3,3-dimetil-4-tiaprolina

El compuesto del título puede ser preparado a partir de L-penicilinamina (Aldrich) mediante procedimientos que han sido publicados: Samanen *et al., J. Med. Chem.* 1989, 32(2): 466; Nagasawa *et al., J. Med. Chem.* 1984, 27(5): 591.

N-(3-piridinsulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolina

Se preparó un tampón de pH = 7.4 disolviendo fosfato disódico de hidrógeno (43.2 g, 0.304 mol) y dihidrógeno fosfato potásico (11.8 g, 0.0870 mol) en H_2O para obtener un volumen de 1.0 L. A una solución tampón de L-3,3-dimetil-4-tiaprolina (25.4 g, 0.157 mol) en 700 mL, a 0°C, pH = 7.4, se agregó una solución de cloruro de 3-piridinsulfonilo (28.0 g, 0.157 mol) en 300 mL CH_2Cl_2. La mezcla se agitó durante 24 horas mientras se dejó llegar a temperatura ambiente, y se acidificó a pH = 2 mediante la adición de 3 M de H_2SO_4, precipitándose un sólido de color amarillo. El sólido amarillo se aisló por filtración de ambas fases y la capa de CH_2Cl_2 se separó y evaporó para obtener sólido amarillo adicional. Los sólidos amarillos combinados se agitaron en 700 mL de H_2O durante 1 hora para disolver las sales inorgánicas asociadas y luego se aisló nuevamente por filtración. Las dos capas acuosas se combinaron y extrajeron con EtoAc (3 x 500 mL). Las capas de EtOAc se lavaron con salmuera, se trataron con sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron para obtener sólido amarillo adicional. Todas las alícuotas de sólido amarillo se combinaron para obtener 36.1 g (76%) de *N*-(3-piridinsulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolina.

Éster isopropílico *N*-[*N*-(3-piridinsulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-L-tirosina

1018

Se agregó hidrocloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (4.83 g, 0.0253 mol) a una solución a 0°C de *N*-(3-piridinsulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolina (6.37 g, 0.0211 mol), hidrocloruro de éster isopropílico de L-tirosina (5.48 g, 0.0211 mol), 1-hidroxibenzotriazola (5.69 g, 0.0421 mol), y 4-metilmorfolina (2.32 mL, 2.13 g, 0.0211 mol) en 125 mL de DMF. La mezcla se agitó durante 16 horas mientras se calentaba a temperatura ambiente, y se agregaron 200 mL de EtOAc y 200 mL de H_2O. Se agitó vigorosamente la mezcla, se separó la capa acuosa y se lavó la capa orgánica con 0.2 M de ácido cítrico (2 x 100 mL), H_2O (2 x 100 mL), $NaHCO_3$ (2 x 100 mL) saturado, H_2O (2 x 100 mL), y salmuera (2 x 100 mL). La capa orgánica se trató con sulfato de sodio, se filtró y se evaporó para obtener 9.40 g de éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinsulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-L-tirosina en forma de una espuma amarilla. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 9.08 (bs, 1H), 8.86 (bs, 1H), 8.16 (dt, J_d = 8.1 Hz, J_t = 2.0 Hz, 1H), 7.51 (dd, J = 8.0 Hz, J = 4.6), 7.07 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 6.87 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.74 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 5.96 (bs, 1H), 5.06 (sept, J = 6.3, 1H), 4.83 (dt, J_d = 6.0 Hz, J_t = 7.8 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 3.91 (s, 1H), 3.09 (dd, J = 14.1 Hz, J = 5.4 Hz, 1H), 2.98 (dd, J = 14.1 Hz, J = 7.5 Hz, 1H), 1.25 (t, J = 6.6 Hz, 6H), 1.18 (s, 3H), 1.13 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 170.5, 168.0, 155.2, 154.2, 148.6, 135.9, 130.7, 127.6, 124.1, 115.5, 105.5, 73.7, 69.7, 54.7, 53.4, 50.5, 37.5, 29.2, 23.7, 21.62, 21.55.

<u>Éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinsulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina</u>

Se disolvieron éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinsulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-L-tirosina (1.51 g, 2.89 mmol) y cloroformato 4-

nitrofenílico (0.58 g, 2.89 mmol) en 40 mL de CH_2Cl_2, y la solución se agitó durante 15 minutos mientras se la enfriaba en una mezcla de 4:1 H_2O/EtOH y hielo seco a -15°C. A la solución se le agregó Et_3N (1.00 mL, 0.73 g, 7.23 mol) agitando durante 2 minutos, y la solución se agitó durante 1 hora a -15°C. A la suspensión resultante se añadió 1-metilpiperazina (0.32 mL, 0.289 g, 2.89 mmol) con agitación durante 1 min, y la mezcla se agitó durante 16 horas calentando hasta temperatura ambiente. La mezcla se diluyó en 40 mL de hexanos y se lavó con K_2CO_3 al 10% (peso/volumen) (4 x 50 mL) hasta que no se observó ningún color amarillo (4-nitrofenol) en la capa acuosa. La capa orgánica se lavó con salmuera (75 mL), se trató con sulfato de sodio, se filtró y se evaporó para obtener un residuo amarillo pálido. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando 70:25:5 CH_2Cl_2/EtOAc/EtOH para obtener 1.53 g (84 %) de éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinsulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina en forma de una espuma incolora. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 9.09 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 8.87 (dd, J = 4.9 Hz, J = 1.6 Hz, 1H), 8.16 (dt, J_d = 8.4 Hz, J_t = 2.0 Hz, 1H), 7.51 (dd, J = 8.2 Hz, J = 4.9 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.02 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.89 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 5.05 (sept, J = 6.4 Hz, 1H), 4.84 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 6.59 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 4.47 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 3.90 (s, 1H), 3.67 (bs, 2H), 3.58 (bs, 2H), 3.18-3.03 (m, 2H), 2.45 (t, J = 10.2 Hz, 4H), 2.34 (s, 3H), 1.26 (d, J = 6.0 Hz, 3H), 1.23 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.17 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl3, 75 MHz) δ 170.4, 167.8, 154.3, 153.7, 150.6, 148.7, 135.8, 133.1, 133.0, 130.4, 133.0, 121.8, 73.7, 69.7, 54.8, 54.6, 54.5, 50.5, 46.1, 44.3, 43.8, 37.6, 29.1, 23.8, 21.6, 21.5.

9.2. Ensayo de los Agentes *In Vivo* e *In Vitro*

Ejemplo A

Ensayo *In vitro* para determinar la Fijación de los Compuestos Candidatos a la VLA-4

Para evaluar la fijación de los compuestos candidatos a la integrina $\alpha_4\beta_1$ se usó un ensayo *in vitro*. Los compuestos que se fijan en este ensayo se pueden usar para evaluar los niveles de VCAM-1 en muestras biológicas mediante ensayos convencionales (por ejemplo, ensayos competitivos). Este ensayo es sensible a valores de IC_{50} tan bajos como alrededor de 1 nM.

La actividad de la integrina $\alpha_4\beta_1$ se midió por la interacción de VCAM-1 soluble con células Jurkat (por ejemplo, American Type Culture Collection Nos. TIB 152, TIB 153y y CRL 8163), una línea cellular humana que espresa altos niveles de integrina $\alpha_4\beta_1$. La VCAM-1 interactúa con la superficie cellular de un modo que delende de la integrina $\alpha_4\beta_1$ (Yednock *et al.*, *J. Bio. Chem.*, 1995, 270:28740).

La VCAM-1 soluble recombinante se expresó como una proteína de fusión quimérica conteniendo los siete dominios extracelulares de la VCAM-1 en el terminal N y la región constante de la cadena pesada de la IgG_1 humana en el terminal C. La proteína de fusión VCAM-1 se preparó y purificó del modo descripto por Yednock, *supra*.

Las células Jurkat se cultivaron en 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina, estreptomicina y glutamina como se describe en Yednock, *supra*.

Las células Jurkat se incubaron con 1.5 mM de $MnCl_2$ y 5 μg/mL de anticuerpo 15/7 durante 30 minutos sobre hielo. La Mn^{+2} activa al receptor para mejorar la fijación de ligandos, y el 15/7 es un anticuerpo monoclonal

que reconoce una conformación activada ocupada por ligando de la integrina $\alpha_4\beta_1$ y bloquea la molécula en esta conformación, estabilizando así la interacción VCAM-1/integrina $\alpha_4\beta_1$. Yednock *et al.*, *supra*. Otros investigadores han preparado anticuerpos similares al 15/7 (Luque *et al.*, 1996, *J. Bio. Chem.*, 271:11067), los cuales se pueden usar en este ensayo.

Luego las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con los compuestos candidato, en diferentes combinaciones comprendidas entre 66 µg/mL y 0.01 µg/mL usando una dilución serial estándar de cinco puntos. Se añadieron 15 µL de proteína de fusión VCAM-1 recombinante soluble a las células Jurkat, y éstas se incubaron durante 30 minutos sobre hielo. (Yednock *et al.*, *supra.*).

Luego las células se lavaron dos veces y se suspendieron nuevamente en Ig Fc anti-ratón $F(ab')_2$ de cabra PE-conjugada (Immunotech, Westbrook, ME) a una concentración de 1:200 y se incubaron sobre hielo, en la oscuridad, durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces y se analizaron con un separador de células activadas por fluorescencia ("FACS") como se describe en Yednock *et al.*, *supra*.

Los compuestos con una IC_{50} de menos de alrededor de 15 µM presentan afinidad de fijación con $\alpha_4\beta_1$.

Al ser ensayados mediante este ensayo, cada uno de los compuestos de los Ejemplos 1-381 (o los correspondientes ácidos carboxílicos de los compuestos de éster, es decir, los profármacos) tiene una IC_{50} de 15 µM o menos.

Ejemplo B

Ensayo de Saturación *In vitro* para determiner la Fijación de los Compuestos Candidato a la $\alpha_4\beta_1$

A continuación se describe un ensayo *in vitro* para determinar los niveles en plasma necesarios para que un compuesto sea activo en el modelo de la Encefalomielitis Autoinmune Experimental ("EAE"), descripto en el ejemplo siguiente, o en otros modelos *in vivo*.

Se lavan células Jurkat de crecimiento logarítmico y se resuspenden en plasma animal normal conteniendo 20 μg/ml del anticuerpo 15/7 (descripto en el ejemplo anterior).

Las células Jurkat se diluyen por dos veces ya sea en muestras de plasma normal conteniendo cantidades conocidas del compuesto candidato en diferentes concentraciones comprendidas entre μg/mL y 0.01 μg/mL, usando una dilución serial estándar de 12 puntos para una curva estándar, o en muestras de plasmas obtenidas de la sangre periférica de los animales tratados con el compuesto candidato.

Luego las células se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavan dos veces con solución salina con tampón de fosfato ("PBS") conteniendo 2% de suero fetal bovino y 1mM tanto de cloruro de calcio como de cloruro de magnesio (medio de ensayo) para retirar el anticuerpo 15/7 no fijado.

Luego las células se exponen a IgG Fc anti-ratón $F(ab')_2$ de cabra ficoeritrina-conjugada (Immunotech, Westbrook, ME), que ha sido adsorbida para cualquier reactividad cruzada no específica por incubación con suero al 5% de la especie animal estudiada, en una concentración de 1:200, y se incuban en la oscuridad a 4EC durante 30 minutos.

Las células se lavan dos veces con el medio de ensayo y se suspenden nuevamente en el mismo. Luego se las analiza mediante separador de

células activadas por fluorescencia como se describe en Yednock *et al.*, *J. Bio.* Chem., 1995, 270: 28740.

A continuación los datos se grafican como fluorescencia versus dosis, por ejemplo, en forma dosis normal-respuesta. Los niveles de dosis que caen en la parte superior de la curva representan los niveles necesarios para obtener eficacia en un modelo *in vivo*.

Este ensayo también se puede usar para determinar los niveles en plasma necesarios para saturar los sitios de fijación de otras integrinas, tales como la integrina $\alpha_9\beta_1$, que es la integrina más cercana a la $\alpha_4\beta_1$ (Palmer *et al.*, 1993, *J. Cell Bio.*, 123: 1289).

En consecuencia, el ensayo arriba descripto se puede realizar con la línea celular del carcinoma de colon humano, SW 480 (ATTC #CCL228) transfectada con cDNA codificador de interina α_9 (Yokosaki *et al.*, 1994, *J. Bio. Chem.*, 269:26691), en vez de las células de Jurkat, para medir la fijación de la integrina $\alpha_9\beta_1$. A modo de control se pueden utilizar células SW 480 que expresan otras subunidades α y β_1.

Usando este ensayo se han establecido los niveles en plasma necesarios para obtener eficacia en los modelos in vivo para $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_9\beta_1$ para los compuestos de la presente invención sometidos a este ensayo.

En consecuencia, otro aspecto de esta invención se refiere a un método para tratar una enfermedad en un paciente mamífero, donde la enfermedad es mediada por $\alpha_9\beta_1$, y donde el método consiste en administrar a ese paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la presente invención. Tales compuestos preferentemente se administran en una preparación farmacéutica como las descriptas anteriormente en la presente. Las dosis efectivas diarias dependerán de la edad, peso, estado del

paciente, factores que el médico puedo conocer fácilmente. Sin embargo, en una realización preferida, los compuestos se administran de entre 20 a 500 μg/kg por día.

Ejemplo 1

Reversión Clínica de la Encefalomielitis Alérgica Experimental usando éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina

La encefalomielitis alérgica experimental es un trastorno inflamatorio autoinmune del sistema nervioso central (CNS), mediado por células, inducido experimentalmente, que sirve como un modelo animal de la esclerosis múltiple. Los infiltrados típicamente consisten en linfocitos y macrófagos, aunque ocasionalmente se han observado células polimorfonucleares (Traugott *et al.*, 1985 *Cell. Immunol.* 91: 240-54; Traugott *et al.*, 1986 *Cell. Immunol.* 99: 395-410). La EAE se induce activamente en animales susceptibles mediante inyección con antígenos CNS homogeneizados tales como el adyuvante completo de Freund (CFA). La EAE también se puede transferir de forma pasiva mediante células T mielina-específicas de un animal inmunizado activamente (Paterson, 1960, *J. Exp. Med.* 111: 119-36). La susceptibilidad a la enfermedad depende no sólo del antígeno inductor y de la especie animal usada, sino que también depende de la edad, el sexo y el origen comercial de los animales (Tsunoda *et al.*, 1996, *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 55: 673-86).

Al igual que en la MS, la EAE clínica se puede manifestar de diferentes formas. En algunos modelos los animales desarrollan una enfermedad monofásica aguda seguida por una recuperación espontánea. Sin embargo, en otros modelos los animales desarrollarán una enfermedad crónica con

recaídas, caracterizada por ataques clínicos recurrentes con períodos de recuperación intermitentes. (Tsunoda *et al.*, 1996). Se puede inducir una forma progresiva crónica de EAE en cobayos Hartley adultos por inmunización con CNS completo en adyuvante (Wisniewski *et al.*, 1983, *J. Neuropath. & Exp. Neurol.* 42: 243-55; Karlik *et al.*, 1986, *Neurology* 36: 1112-4; Karlik *et al.*, 1993, *Magn. Reson. Med.* 30: 326-31), donde los animales exhiben un progresivo empeoramiento de los síntomas clínicos sin períodos de recuperación o remisión. Histológicamente, grandes placas confluentes de desmielinización acompañan la infiltración continua de CNS mononuclear.

Materiales y Métodos: Animales e Inducción de la EAE: Se mantuvieron cobayos Hartley hembra (Charles River Canada, St. Constant, Québec) en un ambiente con iluminación controlada y se les permitió alimento y agua a voluntad. Se indujo EAE en 50 animales (200-250 g) por vía nucal, inyección intradermal de 0.6 mL de una mezcla 1:1de tejido CNS isólogo homogeneizado y adyuvante completo de Freund, con 10 mg/mL adicionales de *Mycobacterium tuberculosis* (Difco). Los animales fueron evaluados diariamente por un observador ciego usando una escala clínica de cuatro puntos de la siguiente manera: 0 = sin anomalía; 0.5 = más de un día consecutivo de pérdida de peso; 1 = ataxia y pobre reflejo de enderezamiento; 2 = paresis de los miembros posteriores, incontinencia urinaria, impacción fecal; 3 = parálisis; 4 = parálisis terminal.

Regímenes de Tratamiento. El éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina es una molécula pequeña que se une con una alta afinidad a la integrina 4 humana y de cobayo (IC_{50} para la inhibición de la

adhesión celular a VCAM = 1 nm). La enfermedad de los animales se consideró crónica a partir del día 40 post-inmunización, y por lo tanto el período de tratamiento comenzó a partir de dicho momento, y se prologó durante 10, 20, 30 o 40 días. Los animales recibieron ya sea 0.5 mL de solución salina (vehículo para el éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-O-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina; n=20) o bien 30 mg/kg de éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina (n=25) dos veces al día. Con el régimen de dosificación, los niveles de saturación de los receptores de éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina (>10 nm) se mantuvieron en todo momento. Un subgrupo de animales recibió éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina durante 30 días, y luego se retiró el tratamiento y los animales se mantuvieron durante 10 días más (n=5). Todos los tratamientos se administraron de forma subcutánea.

Sacrificio de los Animales y Análisis Histológico. Los animales no tratados, con EAE crónica (n=5) fueron sacrificados en el día 40, así como los animales de control sin EAE (n=5). Luego de cada intervalo de tratamiento de 10 días de duración, se sacrificaron 5 animales de cada grupo (0.25 mL sodio pentobarbital), se tomaron muestras de sangre para análisis FACS (ver a continuación), y el cerebro y la médula espinal fueron diseccionadas y se prepararon . Se utilizaron tres cortes de médula espinal, correspondientes a las regiones lumbar, torácica y cervical de la médula. El cerebro se cortó en cinco secciones transversales. Las primeras tres

secciones proximales se combinaron en un bloque, y las dos secciones distales en otro. Los tejidos se fijaron en formalina al 10% y se embebieron en parafina. Se tiñeron cortes de 5 nm con hematoxilin-eosina (H-E) o solocromo R-cianlina (SCR) y estos fueron evaluados por un observador ciego en cada una de las cuatro categorías siguientes: (1) inflamación de las meninges, (2) infiltración perivascular, (3) encefalitis o (4) mielitis y desmielinización (Tabla 6). El índice patológico combinado representa el índice total (de un total de 20) correspondiente a las 5 secciones CNS de cada animal.

TABLA 6: Escala del Índice Patológico

M: Reacción inflamatoria en las meninges

- 0: sin cambios
- 1: Infiltración perivascular y/or meníngea por células mononucleares, 1-3 vasos implicados
- 2: 4-6 vasos implicados
- 3: 6+ vasos implicados
- 4: infiltración densa de las meninges con todos o casi todos los vasos involucrados

P: Infiltración parenquimal perivascular

- 0: sin cambios
- 1: 1-3 vasos parenquimales infiltrados en los espacios de Virchow-Robin
- 2: 4-6 vasos implicados
- 3: 6+ vasos implicados
- 4: todos o virtualmente todos los vasos implicados

E: Encefalitis o Mielitis

0: Ninguna invasión del parénquima neural; células microgliales o inflamatorias invadiendo el parénquima neural

1: unas pocas células dispersas

2: invasión por parte de células de varios puños perivasculares

3: grandes áreas de parénquima neural implicadas

4: virtualmente toda la sección está infiltrada

D: Desmielinización, remielinización y restos de mielina

0: sin desmielinización

1: foco único de desmielinización subpial o restos de mielina

2: varios focos de desmielinización

3: una gran área confluente de desmielinización

4: varias áreas grandes confluentes de desmielinización

Para cuantificar las anomalías observadas en la médula espinal, las secciones teñidas con H-E se dividieron en 12 áreas representativas en forma de torta. En cada área, se contó el número de células dentro de un campo visual de 0.12 mm^2 usando el software para análisis de imágenes Sigma Scan Pro (SPSS Inc.), y se calculó el número promedio combinado de células en las 12 áreas para la totalidad de la médula espinal (36 campos visuales por animal). Observar que como se contaron todos los núcleos celulares, el número de células puede incluir neuronas y células gliales además de los infiltrados. Así, el recuento de células en los animales sin EAE sirvió como línea de base.

PCR de Transcripción Reversa Cuantitativa: IL-2, IL-10, MCP-1. Se aisló RNA de 30 mg de médula espinal de cobayo congelada usando el

Equipo para Aislación Total de RNA S.N.A.P.™ (preparación de ácido nucléico simple) (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, modificadas para incluir un segundo paso de tratamiento de DNAse seguido de una purificación adicional en la columna del S.N.A.P. Al añadir el segundo tratamiento de DNAse, hallamos que la contaminación del DNA es consistentemente no detectable para estas muestras y ensayos según lo medido usando un ensayo RT-PCR sobre un control negativo.

En la Tabla 7 se indican secuencias cebador/sonda y concentraciones para IL-2, IL-10 y MCP-1, así como el RNA estándar usado para cada gen. Se realizó RT-PCR por triplicado usando el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM® 7700. Las reacciones de 50 µl contenían entre 10 y 800 ng de RNA total y cebadores y sondas en las concentraciones arriba indicadas en un tampón de reacción compuesto por 6.67% de glicerol (Amresco); 5.5 mM de MgCl; 300 µM de dATP, dCTP, dGTP, y dUTP; 100 nM de sondas; 1.25 unidades de AmpliTaq Gold® DNA Polimerase (Applied Biosystems); 1X de Tampón TaqMan® A (TaqMan® equipos de reacción PCR Core, Applied Biosystems), 20 unidades de inhibidor RNase (Roche); 1.25 unidades transcriptasa inversa del virus de leucemia de murina (MuLV) (Applied Biosystems). La transcripción inverse del RNA se llevó a cabo a 48°C durante 30 minutos, seguido de una etapa de desnaturación de 10 minutos a 95°C. La PCR se llevó a cabo mediante 40 termo-ciclos consistentes en 95°C durante 15 segundos seguido de 60°C durante 1 minuto. Cada placa incluía una curva estándar usando el RNA listado en la Tabla 7 y dos muestras de control adicionales: 1) una muestra

de RNA de control positivo usada en todas las placas, 2) un control NTC (non-template control)

TABLA 7: Recuentos de Células Promedio en la Médula Espinal

Grupo de tratamiento	No. promedio de células/0,12 mm^2
Sin EAE	61 ± 3.2
control d40	107 ± 6.1
solución salina d50	138 ± 8.3
solución salina D60	137 ± 8.3
solución salina D70	143 ± 6.7
solución salina D80	113 ± 4.8
éster isopropílico de D50 *N*-[*N*-(3-piridinesulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina D50	97 ± 3.9
éster isopropílico de D60 *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina D60	86 ± 4.2
éster isopropílico de D70 *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina D70	89 ± 8
éster isopropílico de D80 *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina D80	70 ± 4

Los coeficientes de correlación de las curvas estándares fueron mayores que 0,990 para todos los datos indicados. Los coeficientes de variación para las muestras triplicadas fueron menores que 0,2. Como el RNA usado para la curva estándar es una mezcla heterogénea de RNA que contiene una

cantidad constante pero desconocida del mensaje meta, los números calculados son relativos.

Análisis por FACS: El día 80 post-inmunización, se tomaron muestras de sangre heparinizada de los animales sin EAE, los animales tratados con solución salina, animales tratados con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina, y animales 10 días después de retirarles el éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina. Todas las muestras se mantuvieron a 4°C para todos los procedimientos. Se expusieron muestras de 150 µl al anticuerpo primario durante 30 minutos, se lavaron dos veces, y luego se incubaron con Ig Fc anti-ratón de cabra PE-conjugada en presencia de suero de cobayo al 5% (Beckman Coulter #PN EM055 1). Los glóbulos rojos se lisaron con solución de lisación de Becton-Dickinson y las muestras se examinaron en un citrómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) separando diferentes poblaciones celulares por dispersión de luz.

Análisis Estadístico. El análisis estadístico se efectuó utilizando el software SigmaStat v2 software (SPSS Inc.). Los índices clínicos se evaluaron usando la prueba de suma de rangos de Mann Whitney, mientras que los índices patológicos se evaluaron usando análisis de la varianza de dos vías (ANOVA). Las anomalías cuantitativas se compararon usando ANOVA de Kruskal-Wallis en rangos. En cada caso, $p < 0.05$ se consideró significativo. Se realizó una regresión lineal sobre los recuentos promedios de células en la médula espinal.

RESULTADOS: Inversión Clínica. Los animales comenzaron a evidenciar síntomas clínicos de enfermedad en el día 9 post-inmunización, los cuales continuaron hasta el día 40. En este punto la enfermedad se consideró crónica. El período de tratamiento comenzó en el día 40 y tuvo una duración mínima de 10 días y una duración máxima de 40 días. Aunque los animales que recibieron solución salina evidenciaron una progresión clínica continua hasta el final del experimento, los animales tratados con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina comenzaron a manifestar una reversión clínica comenzando 2 ó 3 días después del tratamiento inicial (Figura 1A). En varios animales que tenían un índice clínico establecido de 2 antes de comenzar el tratamiento, el éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina revirtió la paresis, y los animales fueron capaces de utilizar sus miembros traseros durante la totalidad del período de tratamiento (es decir, reversión a un índice clínico de 1). Dependiendo de la duración del tratamiento, algunos animales que anteriormente habían exhibido síntomas de la enfermedad aparentemente estuvieron completamente libres de la enfermedad mientras recibían el éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina. Con el transcurso del período de tratamiento, los índices clínicos promedio de los animales tratados con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina fueron significativamente menores que aquellos de los animales tratados con solución salina. ($p<0.001$, prueba de suma de rangos de Mann Whitney).

En el grupo tratado con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina hubo un pequeño aumento transitorio, centrado en el día 54 post-inmunización (Figura 1A). Dos animales mostraron una fluctuación moderada en el grado de síntomas clínicos; éstos variaron entre una ausencia total de síntomas clínicos (índice igual a 0) hasta una ataxia muy leve (índice igual a 1). Sin embargo, ninguno de los animales escaparon del tratamiento, tal como observamos anteriormente en el caso de los anticuerpos anti-integrina alfa-4, donde el animal deja de responder a la terapia totalmente debido a que el cobayo rechaza el anticuerpo de murina o humanizado. No hubo ningún problema secundario (tal como inflamación del sitio de inyección), con el tratamiento de animales durante períodos de tiempo prolongados con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina.

En un subgrupo de animales, el éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina se administró durante 30 días, luego de lo cual se retiró y los animales se mantuvieron con inyecciones de solución salina durante los últimos 10 días del experimento. Una vez que se retiró el éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina, la progresión clínica retornó, similar a la evolución clínica de los animales que recibieron solución salina durante todo el período de tratamiento (Figura 1B). Entre los días 70 y 80 post-inmunización, el índice clínico medio de los animales post-tratamiento con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina fue

significativamente mayor que el de los animales que recibieron éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina durante la totalidad del período de tratamiento ($p < 0.05$, prueba de la suma de rangos de Mann Whitney). En resumen, el éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina se administró exitosamente durante hasta 40 días sin efectos secundarios adversos, y mantuvo una inversión de los déficits clínicos asociados con la EAE progresiva crónica.

RESULTADOS: Inversión de las Anomalías Patológicas. Las anomalías patológicas se evaluaron en secciones de cerebro y médula espinal teñidas con H-E y SCR.

En la Figura 2, los paneles de la izquierda corresponden a secciones teñidas con SCR, que tiñe de azul de mielina (x40). Los paneles de la derecha corresponden a secciones teñidas con H-E, altamente amplificadas (x250) tomadas de la región medial dorsal de la correspondiente foto SCR (Figura 2). Las secciones mostradas en los paneles A y B de la Figura 2 fueron tomadas de un cobayo normal, y no evidencian inflamación ni desmielinización. Al llegar al día 40 post-inmunización, los animales crónicos presentaban una extensa inflamación meníngea y perivascular, así como una o más grandes placas subpiales de desmielinización (Figura 2C). La densidad de las células infiltrantes había aumentado significativamente (Figura 2D). Las anomalías patológicas observadas se volvieron más extremas a medida que la enfermedad progresaba. Al llegar al día 60 post-inmunización, los animales de control que recibieron 20 días de tratamiento con solución salina presentaban una infiltración meníngea severa, grandes

áreas de mielitis y desmielinización focalizada (Figuras 2E, F). Al llegar al día 80 post-inmunización, virtualmente la totalidad de las secciones de médula espinal estaban infiltradas y desmielinizadas, incluyendo la invasión de algunas áreas de materia gris (Figuras 2I, J). Por el contrario, los animales que recibieron 20 días de tratamiento con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina presentaban áreas de desmielinización mucho menores en el día 60 post-inmunización, y había una escasa invasión de las células meníngeas y perivasculares (Figuras 2G, H). Luego de 40 días de tratamiento con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina, la recuperación patológica era aún mayor; los animales no mostraban prácticamente infiltración meníngea y perivascular, y la mielina permanecía intacta (Figuras 2K, L).

Un observador ciego asignó un índice a un total de cinco bloques de cada animal, y el índice patológico combinado representa el índice total de las cinco secciones en las cuatro categorías (inflamación de las meninges, infiltración perivascular, mielitis y desmielinización; Figura 3). Durante el transcurso del período de tratamiento, los animales que recibieron éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina mostraron una disminución significativa del índice patológico promedio en las cuatro categorías en comparación con los animales tratados con solución salina ($p < 0.001$, ANOVA de dos vías). Cuando se retiró el éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina, y los animales se mantuvieron durante 10 días más

sin tratamiento, el índice patológico combinado promedio en las cuatro categorías fue significativamente mayor que en los animales que continuaron recibiendo la molécula pequeña durante la totalidad del período de tratamiento (Figura 3; $p < 0.05$, ANOVA de Kruskal Wallis en rangos con prueba de SNK).

RESULTADOS: Cuantificación de las Anomalías Patológicas. La inversión patológica evaluada cuantitativamente en el párrafo precedente se confirmó cuantitativamente en la médula espinal. El número medio de células se calculó a partir de 12 áreas representativas de 0.12 mm^2 en secciones teñidas con H-E de médula lumbar, torácica y cervical, y se combinaron a fin de examinar la totalidad de la médula espinal (Figura 4). Todos los animales con EAE no tratados tuvieron recuentos celulares significativamente mayores que los animales sin EAE, lo cual indica que la infiltración celular aumentó durante la enfermedad, tal como se esperaba ($p < 0.001$, ANOVA de dos vías). Se observó una reducción significativa del número de células luego de tan sólo 10 días de tratamiento con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina, y se mantuvo durante 20, 30 y 40 días de tratamiento con respecto a los animales tratados con solución salina ($p < 0.001$, ANOVA de dos vías). Además, los recuentos de células promedio de los animales tratados durante 20, 30 o 40 días con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina fueron significativamente que los de los animales crónicos de control ($p < 0.05$, ANOVA de Kruskal Wallis en rangos con prueba de SNK), y luego de 40 días de tratamiento con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-

metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina, el recuento de células promedio en la médula espinal no difería del de los animales sin EAE. Una regresión lineal de estos promedios demuestra una pérdida progresiva de células inflamatorias en la médula espinal ($r^2 = 0.90$). De la pendiente de esta recta se puede calcular una tasa de pérdida de células igual a 8 células/mm^2/día. Luego de retirar el éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina, en los animales que se mantuvieron con solución salina durante 10 días adicionales se observó nuevamente un aumento significativo del número promedio de células ($p < 0.05$, ANOVA en rangos con prueba SNK).

RESULTADOS: PCR Cuantitativa. Se realizó PCR cuantitativa en secciones lumbares de médula espinal para evaluar los niveles de IL-2, IL-10 y MCP-1, y los resultados complementan la inversión patológica ya descripta. En los animales tratados con solución salina, la cantidad de IL-2 aumentó durante la fase crónica de la enfermedad. Por el contrario, los animales que recibían éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina prácticamente no tenían RNA IL-2 detectable. Luego de retirar el éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina, la cantidad de IL-2 en la médula espinal regresó a niveles comparables a los de los animales tratados con solución salina. También se vieron resultados similares en relación con la IL-10 y MCP-1. Durante el tratamiento se evidenció una reducción significativa de los niveles de citocina en el RNA, seguido por una vuelta a niveles más elevados al retirar el inhibidor (Figura 5).

RESULTADOS: Análisis por FACS: Según se determina mediante análisis por FACS, el tratamiento de los animales con EAE con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina provocó un gran aumento del porcentaje de linfocitos brillantes de integrina α_4 en la circulación, respecto de los animales tratados con solución salina. Estos resultados sugieren que los linfocitos activados por inmunización periférica no fueron capaces de ingresar al CNS en presencia de éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina, y se acumularon en la circulación (Figuras 6 y 7A). Consistentemente con esto, el porcentaje de linfocitos brillantes de integrina α_4 en la circulación regresaron a los niveles correspondientes a tratamiento con solución salina cuando se retiró el éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina, y volvió la inflamación del CNS (Figura 7A). No hubo subpoblaciones discernibles de monocitos bajos y altos de integrina α_4; sin embargo, la expresión general de integrina α_4 en los monocitos circulantes aumentó en los animales con EAE (Figura 7B). Este aumento no se vio afectado por el éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina, lo cual también sugiere que la reacción inmunológica periférica no fue inhibida por el tratamiento.

Ejemplo 2

Remielinización Espontánea luego de la Inhibición Prolongada de la Integrina α_4 en EAE Crónica

Se estudió el modelo de influjo de células inmunes al sistema nervioso central siendo bloqueado por bloques inhibidores de integrina alpha-4 beta-1 ($\alpha_4\beta_1$) (VLA-4) para determinar si la presencia de células inflamatorias suprime la reparación espontánea de la mielina en la encefalomielitis autoinmune experimental. Se trataron cobayos paralizados en una etapa de la EAE avanzada y desmielinizada con el inhibidor específico de la $\alpha_4\beta_1$, éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina (Piraino *et al.*, *J. Neuroimmunol.* 2002, 131:147-159), y hallamos que: (1) 87% de las placas mostraron evidencia de remielinización luego de 40 días de tratamiento; (2) en 50% del área total lesionada hubo reparación de mielina; y (3) 50% de los animales recuperaron función motriz. No hubo reparación significativa ni recuperación de la función motriz en los animales tratados con vehículo. Estos resultados indican que la inhibición prolongada de la inflamación del CNS, en ausencia de una reparación de mielina dirigida, puede facilitar los mecanismos de remielinización espontánea.

Métodos.

Animales e Inducción de la Enfermedad. Se mantuvieron cobayos Hartley hembra (200-250 g, Charles River Canada, St. Constant, Québec) en un ambiente con iluminación controlada y se les permitió alimento y agua a voluntad. Se indujo EAE por vía nucal, inyección intradermal de 0.6 mL de una mezcla 1:1 de tejido de CNS isólogo homogeneizado y adyuvante completo de Freund (Difco, Detroit, MI), con 10 mg/mL adicionales de

Mycobacterium tuberculosis (Difco). Los animales comenzaron a presentar síntomas clínicos de la enfermedad en el día 9, y se consideraron crónicos a partir del día 40 post-inmunización. Los animales se pesaron diariamente y fueron evaluados por un observador ciego usando una escala clínica de cuatro puntos de la siguiente manera: 0 - sin anomalía; 0.5 - más de un día consecutivo de pérdida de peso; 1 - ataxia y pobre reflejo de enderezamiento; 2 - paresis de los miembros posteriores, incontinencia urinaria, impacción fecal; 3 - parálisis; y 4 - parálisis terminal.

Criterio del Tratamiento. Los animales se seleccionaron para el tratamiento en base a la severidad de la enfermedad, de acuerdo con dos criterios: (1) los animales debían estar en las etapas crónicas de la enfermedad (es decir, al menos día 40 post-inmunización); y (2) los animales debían haber llegado a un índice clínico de 2 antes de comenzar el período de tratamiento (es decir, parálisis de los miembros traseros). En nuestras experiencias pasadas con este modelo de EAE progresivo crónico, 95% de los animales crónicos con índices clínicos de 2 mostraron desmielinización moderada a severa en la médula espinal, desde varios pequeños focos de desmielinización hasta una o más grandes placas confluentes. La adherencia a estos criterios optimizó el potencial de pérdida de mielina antes del inicio del período de tratamiento.

Regímenes de Tratamiento. Se trataron animales que satisfacían los dos criterios expuestos durante intervalos de 10, 20, 30 o 40 días. El éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-O-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina es una molécula pequeña (peso molecular ~500 Da) que se une con alta afinidad a la integrina 4 humana y de cobayo (IC_{50} para la inhibición de la adhesión celular a VCAM-1 de alta

densidad en presencia de suero al 100% = 1 a 1 nm). Los animales recibieron ya sea solución salina (n = 16) o bien éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-O-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina (30 mg/kg, n = 12) dos veces al día durante el período de tratamiento. Con este régimen de dosificación, los niveles de saturación de los receptores de éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-O-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina (> 10 nm) se mantuvieron en todo momento. Además, un grupo de animales se sacrificó a los pocos días de recibir el índice clínico de 2 para servir como una línea de base de control "d0".

Recolección y Procesamiento de Tejidos. Luego del sacrificio (0.25 mL sodio pentobarbital), los animales se exsanguinaron, y el CNS se disectó y seccionó. Se utilizaron tres secciones de médula espinal, correspondientes a las regiones lumbar, torácica y servical. Los tejidos se fijaron en formalina al 10% y se embebieron en parafina. Se tiñeron cortes de 5 µm con solocromo R-cianina, una tinción de mielina cuantitativa, y se examinaron por microscopía óptica para detectar evidencia de desmielinización (ausencia de tinción azul) y remielinización (áreas de tinción azul pálido con lesiones).

De cada una de las secciones lumbares, torácicas y servicales, un trozo de 5 mm de médula espinal del extremo distal se fijó en 2.5% glutaraldehído al 2.5% a 4°C. Luego un corte de 0,5 mm del centro de cada sección transversal se dividió en mitades dorsales y ventrales. Estos cortes se post-fijaron en tetróxido de osmio y se embebieron en resina epoxi. Se examinaron secciones de un micrón teñidas con azul de toluidino mediante microscopía óptica para detectar evidencia de desmielinización y

remielinización. Las áreas que contenía lesiones se prepararon nuevamente para microscopía electrónica, y se tiñeron secciones delgadas con permanganato de potasio y acetato de uranilo etanólico y se examinaron en un microscopio Philips EM 300.

Análisis Histológico. La patología de la médula espinal se cuantificó utilizando un método modificado de McGavern *et al.*, *J. Neurosci. Res.* 1999, 58: 492-504. Se tomaron imágenes de un promedio de 12 secciones por animal con un aumento de 40x usando una cámara digital Nikon Coolpix 995. Se usó el software para análisis de imágenes Sigma Scan Pro(SPSS Inc.) para calcular tanto el área total lesionada y el área de lesión remielinizada dentro de cada sección (en unidades arbitrarias). Estas áreas se sumaron para obtener una estimación global correspondiente a la totalidad de la médula espinal, y el área de remielinización se expresó como un porcentaje del área total lesionada.

Resultados y Discusión. El objetivo primario de este estudio fue determinar si la inhibición prolongada de la migración de células inmunes al CNS permitiría la remielinización espontánea de las lesiones existentes en la médula espinal. El modelo de EAE en cobayo presenta una enfermedad progresiva y no remitente luego de la inmunización con el homogenato de CNS completo (Wisniewski *et al.*, *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1983, 42: 243-255; Karlik *et al.*, 1986, *Neurology* 36: 1112-4; Karlik *et al.*, 1993, *Magn. Res. Med.* 30: 326-331). La parálisis aguda comienza aproximadamente luego de 10 días, con notable desmielinización al llegar al día 20 (Karlik *et al.*, 1986, *Neurology* 36: 1112-4; Karlik *et al.*, 1993, *Magn. Res. Med.* 30: 326-331). Luego de 40 días, el 95% de los animales que presentan parálisis bilateral total de los miembros traseros tienen

desmielinización moderada a severa en todo el tronco cerebral y la médula espinal. Es importante observar que los animales en esta etapa de la enfermedad no recaen ni remite, y tampoco se recuperan espontáneamente. En el presente estudio, el tratamiento recién se inició cuando un animal llegó a esta etapa – al menos 40 días post-inmunización – y presentaba parálisis bilateral total de los miembros traseros (índice clínico 2). Luego los animales recibieron ya sea el inhibidor de la integrina of $\alpha_4\beta_1$ de molécula pequeña éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina o bien vehículo (solución salina) durante intervalos de 10, 20, 30 o 40 días. La Figura 8 ilustra micrografías ópticas representativas de secciones de médula espinal teñida con solocromo R-cianina (Figuras 8A-F). En los controles (día de tratamiento "0") en todos los animales era evidente una extensa desmielinización; las lesiones típicamente estaban libres de mielina intacta, exhibiendo una densa infiltración de células inmunes con macrófagos espumosos conteniendo restos de mielina fagocitados en su borde de ataque (Figuras 8A, 8B). En el intervalo de tratamiento más breve (10 días), animales tratados con solución salina y con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina continuaron mostrando grandes áreas de desmielinización en la médula espinal, con mínima evidencia de mielina intacta. Por el contrario, luego de 20 días de terapia con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina, muchas lesiones mostraron tinción difusa azul pálido, análoga a las placas oscuras descriptas clásicamente y que son indicadoras de la remielinización en pacientes con MS (Figura

8D). Las placas dentro de los animales de control tratados con solución salina permanecieron libres de mielina (Figura 8C). Al llegar al día 40 del tratamiento, se observó una diferencia sorprendente en el aspecto global de la mielina entre los dos grupos de tratamiento. La mayoría de las lesiones en los animales tratados con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina presentaron placas oscuras (Figura 8F), mientras que las lesiones en los animales de control presentaron poca, si es que alguna, tinción azul (Figura 8E).

Para definir mejor el cambio del aspecto histológico, se analizaron muestras de tejido con mayor resolución, tanto en microscopio óptico como en microscopio electrónico (EM) (Figura 9). En los animales tratados durante 30 días con solución salina, secciones semidelgadas teñidas con azul de toluidino mostraron áreas de mielina normal (Figura 9A), como así también áreas de desmielinización severa y pérdida axonal (Figura 9B). Las pequeñas zonas de transición entre estas dos áreas contenían axones finamente recubiertos de calibre relativamente pequeño (Figura 9B, los cuales pueden representar axones recientemente desmielinizados que están intentando la reparación. También hubo evidencia frecuente de axones sufriendo degeneración Walleriana, tanto en las lesiones como en las áreas normalmente mielinizadas. En los animales que recibieron éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina (Figura 9C), las áreas de axones finamente mielinizados se expandieron significativamente, y los axones tendían a ser de mayor calibre, lo cual indica una respuesta reparadora más general, con frecuencia en la totalidad del área lesionada. Estas

observaciones se confirmaron por microscopía electrónica. En la Figura 9D se muestran envolturas de mielina de gran espesor alrededor de axones de gran calibre, representativas de una mielina compacta "normal." En los animales que recibieron 40 días de tratamiento con solución salina, las áreas lesionadas mostraron una pobre mielinización, donde los axones de gran tamaño estaban totalmente desmielinizados (Figura 9E). Por el contrario, el tratamiento con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina resultó en una apariencia normal de las múltiples capas delgadas de mielina alrededor de los axones de gran calibre, lo que representa un estado de remielinización (Figura 9F). Por lo tanto, parece que la administración prolongada de éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina permitió la remielinización espontánea en la médula espinal de los animales con EAE progresiva crónica.

A fin de cuantificar el efecto del éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina, se determinó el porcentaje de placas que exhibían evidencia de remielinización. El número de lesiones con aspecto de mielina se dividió por el número total de secciones de médula espinal tomadas en toda su longitud de cada animal (Figura 10) (para el método, ver Warrington *et al.*, 2000, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 97: 6820-5). Luego de 20, 30 y 40 días de tratamiento con solución salina, el porcentaje promedio de placas que exhibían remielinización era de entre 10 y 20%; no hubo un cambio significativo con el tiempo en la incidencia del aspecto de mielina en estos animales (Figura 10A). Por el contrario, luego de 20 días de

administración de éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina, la frecuencia de las placas oscuras en la médula espinal aumentó respecto de la de los animales tratados con solución salina, llegando al 68%; luego de 30 y 40 días, la incidencia fue del 77% y 87%, respectivamente ($p < 0.001$, ANOVA de dos vías con prueba de Tukey). Estos valores son significativamente mayores que los correspondientes al inicio del tratamiento (día 0 y día 10) ($p < 0.05$, ANOVA de dos vías con prueba de Tukey), lo cual indica que el compuesto aumentó la incidencia de la remielinización de una forma dependiente del tiempo. Debido a que el porcentaje de placas con evidencia de remielinización no aumentó significativamente luego del día 20, parece que la remielinización se inició en gran medida de forma síncrona entre los días 10 y 20 del tratamiento (Figura 10A).

También se midió el grado global de remielinización de placas en la médula espinal. La Figura 10B muestra una sección de médula espinal representativa con una gran lesión desmielinizada en el asta ventral. Se determinó el área lesionada total para cada animal contorneando todas las lesiones dentro de las secciones de médula espinal y sumando sus áreas. De manera similar, el área total de desmielinización se midió contorneando las regiones con apariencia de mielina. Las Figuras 10C a F grafican el área lesionada total versus el porcentaje de remielinización. En los animales tratados con solución salina las lesiones rara vez muestran evidencia de reparación, con promedios comprendidos entre 2 y 11%, y no hay diferencias significativas durante el período de tratamiento de 40 días (Figuras 10C a F). Por el contrario, luego de 20, 30 o 40 días de éster

isopropílico de tratamiento con *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina, la mayoría de las lesiones identificadas muestran un grado variable de remielinización comprendido entre 2 y 100% (área media de remielinización, aproximadamente 50%) (Figuras 10D-5). ($p < 0.001$, ANOVA de dos vías con prueba de Tukey). Por lo tanto, aunque en todos los animales se evidenciaron lesiones durante la totalidad del período de tratamiento de 40 días, el éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina aumentó la incidencia y el porcentaje de remielinización. Lo que es más, la evidencia de remielinización en los animales tratados con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina es consistente con una recuperación observada de la función motriz. El punto de partida para el tratamiento fue un índice clínico de 2, el cual denota una parálisis bilateral total en los miembros traseros. En el 50% de los animales tratados con éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina la parálisis se revirtió a un índice clínico de 1, lo cual indica que los animales recuperaron significativamente el uso de sus extremidades traseras ($p < 0.05$, prueba de suma de rangos de Mann Whitney). En los animales de control no se observó en ningún momento una recuperación funcional.

Por definición, la remielinización espontánea es la reparación de la mielina en ausencia de una intervención terapéutica específicamente diseñada para estimular la remielinización (Miller *et al.*, 1995, *Microsc. Res. Tech.* 32: 230-245). La reparación espontánea está bien documentada

en modelos de desmielinización en animales que involucran daño tóxico agudo, tal como con bromuro de cuprizona, lisolecitina o etidio (Dubois-Dalcq *et al.*, 1990, *Bioessays* 12: 569-576), y en modelos de encefalitis viral (Miller *et al.*, 1995, *Microsc. Res. Tech.* 32: 230-245) o en modelos con inmunosupresión generalizada o depleción de las células inmunes (Rodriguez *et al.*, 1992, *Neurol.* 42: 348-57; y Murray *et al.*, 2001, *Brain* 124: 1403-16). En estos casos la remielinización se puede completar en algunas semanas. El éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina es una molécula pequeña que interfiere con la actividad de la integrina $\alpha_4\beta_1$ en las células inmunes, y que fue diseñado como un agente limitador de enfermedades para impedir la infiltración de células inflamatorias del cerebro, antes que como un agente para directamente promover la reparación de la mielina (Piraino *et al.*, 2002, *J. Neuroimmunol.* 131:147-159). Debido a que el modelo de CP-EAE en cobayo es una enfermedad no episódica que normalmente no exhibe reparación, el haber hallado que un agente limitador de las enfermedades puede, por sí solo, promover la remielinización espontánea es significativo. Estos resultados indican que el propio ambiente inflamatorio suprime o sobrepasa los mecanismos de reparación normales, y eventualmente puede llevar a su agotamiento. Aunque hubo evidencia microscópica de remielinización en los animales tratados con solución salina, ésta no alcanzó niveles significativos, y en ningún caso fue acompañada por remisión clínica. Por lo tanto, parece que al suprimir la infiltración de células inmunes, el éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-

ilcarbonil]-L-tirosina impidió el ataque de la mielina recién formada y permitió su reparación.

De hecho, se ha logrado remielinización inducida del CNS de diferentes maneras, incluyendo la administración de glicolípidos de mielina (Raine *et al.*, 1978, *Acta. Neuropathol. (Berl)*. 43: 43-53; Traugott *et al.*, 1982, *J. Neurol. Sci.* 56: 65-73), antisuero CNS-específico, inmunoglobulinas purificadas (Warrington *et al.*, 2001, *J. Allergy Clin. Immunol.* 108:121-5), o factores de crecimiento (Yao *et al.*, 1995, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 92: 6190-4). Recientemente también se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales humanos derivados del suero (IgM) pueden promover la remielinización aparentemente a través de la estimulación directa de los oligodendrocitos (Warrington *et al.*, 2000, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 97: 6820-6825; Bieber *et al.*, 2002, *Glia* 37: 241-9; Mitsunaga *et al.*, 2002, *FASEB J.* 16: 1325-1327). También los transplantes de células madre tanto embrionarias como de adulto ha llevado a la generación de oligodendrocitos y nueva síntesi de mielina en modelos deficientes (Halfpenny *et al.*, 2002, *Lancet Neurol.* 1: 31-40). Aunque estos estudios han mostrado que el CNS tiene capacidad de reparación, es importante observar que la remielinización inducida terapéuticamente no detiene la enfermedad en curso. El factor Notch, por ejemplo, recientemente han sido señalado como un inhibidor de la mielinización en la MS, reflejando la interacción entre los oligodendrocitos, las células gliales y la inflamación en curso (John *et al.*, 2002, *Nat. Med.* 8: 1115-21). En un trastorno inflamatorio tal como la MS, el CNS aún sería vulnerable a los ataques.

Los agentes remielinizantes, tales como el natalizumab, revierten la patología de la enfermedad en la EAE inhibiendo el influjo de otro modo

continuo de nuevas células inflamatorias. Las células que ya han ingresado al CNS son despejadas por mecanismos apoptóticos normales (Hyduk *et al.*, 1998, *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 57: 602-614). Consistente con estas observaciones, el éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina ha probado reducir progresivamente la infiltración de las células inmunes y sus mediadores inflamatorios asociados con el aumento en la duración del tratamiento (Piraino *et al.*, 2002, *J. Neuroimmunol.* 131:147-159). En una prueba controlada para MS tipo recaída-remisión, el natalizumab demostró que un tratamiento durante un período de seis meses llevaba a menor cantidad de lesiones cerebrales inflamatorias y menor cantidad de recaídas con respecto a los sujetos tratados con el placebo. Durante la prueba la terapia fue bien tolerada, y hubo una percepción de bienestar mejorado entre los pacientes tratados con natalizumab (Miller *et al.*, 2003, *New Engl. J. Med.* 348: 15-23). Así, las terapias con agentes tales como el anticuerpo anti-integrina alfa-4 y los compuestos tales como el éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina no sólo servirán como un factor limitante de la enfermedad para la MS, sino también como un agente que permitirá la reparación del CNS.

Aunque la presente invención se ha descripto con referencia a sus realizaciones específicas, los expertos en la técnica comprenderán que es posible introducir diversos cambios y reemplazar diversos equivalentes sin apartarse del verdadero espíritu y campo de la invención. Además, se pueden realizar numerosas modificaciones para adaptar una determinada situación, material, composición de materia, proceso, etapa o etapas de

proceso, al objetivo, espíritu y campo de la presente invención. Todas estas modificaciones están comprendidas en el campo de la invención.

Ejemplo 3

Construcción de Anticuerpo Humanizado 21.6

Se construyeron cadenas quiméricas livianas y pesadas uniendo las regiones V_L y V_H 21.6 de cDNA de ratón clonado en PCR a regiones constantes humanas. Los extremos 5' y 3' de las secuencias de cDNA de ratón se modificaron usando cebadores de la PCR. Los cebadores de los extremos 5' (Tabla 8), los cuales hibridizan a las secuencias de DNA que codifican para los comienzos de las secuencias líder, se diseñaron para crear las secuencias de DNA esenciales para una traslación eficiente (Kozak, *J. Mol. Biol.* 196: 947-950 (1987)), y para crear sitios de restricción *Hind*III para clonar en un vector de expresión. Los cebadores de los extremos 3' (Tabla 8), los cuales hibridizan a las secuencias de DNA que codifican para los extremos de las regiones J, fueron diseñados para crear las secuencias de ADN esenciales para empalmar ("splicing") las regiones constantes, y para crear un sitio *Bam*HI para clonar en un vector de expresión. Los productos de amplificación de la PCR se digirieron con *Hind*III y *Bam*HI, se clonaron en un vector pUC19, y se secuenciaron para confirmar que no hubieran ocurrido errores durante la amplificación por PCR. Las regiones variables 21.6 de ratón adaptadas luego se subclonaron en vectores de expresión de células de mamífero conteniendo las regiones constantes humanas kapa o gama-1.

TABLA 8

Cebadores de la PCR para la construcción del Anticuerpo 21.6
A. <u>Región variable de la cadena liviana</u>

Cebadores de la PCR para la construcción del Anticuerpo 21.6
1. Cebador para la reconstrucción del extremo 5' (37-mer) 5' C AGA AAG CTT GCC GCC ACC ATG AGA CCG TCT ATT CAG 3' *Hind*III Kozak M R P S I Q Consenso Secuencia 2. Cebador para la reconstrucción del extremo 3' (35-mer) 5' CC GAG GAT CCA CTC ACG TTT GAT TTC CAG CTT GGT 3' *Bam*HI Sitio de Empalme del donante
B. Región variable de la cadena pesada 1. Cebador para la reconstrucción del extremo 5' (37-mer) 5' C AGA AAG CTT GCC GCC ACC ATG AAA TGC AGC TGG GTC 3' *Hind*III Kozak M K C S W V Consenso Secuencia 2. Cebador para la reconstrucción del extremo 3' (33-mer) 5' CC GAG GAT CCA CTC ACC TGA GGA GAC GGT GAC T 3' *Bam*HI Sitio de Empalme del donante

Modelado de la Estructura de las Regiones Variables del 21.6 de Ratón. Se construyó un modelo molecular de las regiones V_L y V_H del anticuerpo 21.6 de ratón. El modelo se construyó en una estación de trabajo Silicon Graphics IRIS 4D corriendo bajo sistema operativo UNIX y usando el paquete para modelado molecular QUANTA (Polygen Corp., USA). La estructura de las FR de la región V_L del 21.6 de ratón se basó en la estructura resuelta de la inmunoglobulina humana RE1 de Bence-Jones (Epp *et al., Biochemistry* 14: 4943-4952 (1975)). La estructura de las FR de la región V_H del 21.6 de ratón se basó en la estructura resuelta del anticuerpo de ratón Gloop2. Los residuos idénticos se retuvieron en las FR;

los residuos no idénticos se sustituyeron usando las herramientas de QUANTA. Las CDR1 y CDR2 de la región V_L del 21.6 de ratón se identificaron como pertenecientes a los grupos de estructuras canónicos 2 y 1, respectivamente (Chothia *et al., J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Como las CDR1 y CDR2 del RE1 pertenecen a los mismos grupos canónicos, las CDR1 y CDR2 de la región V_L del 21.6 de ratón se modelaron sobre las estructuras de las CDR1 y CDR2 del RE1. La CDR3 de la región V_L del 21.6 de ratón no pareció corresponder a ninguno de los grupos de estructuras canónicos para las CDR3 de las regiones V_L. Sin embargo, una investigación en base de datos reveló que la CDR3 de la región V_L del 21.6 de ratón era similar a la CDR3 en la región V_L del HyHEL-5 de ratón (Sheriff *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8075-8079 (1987)). Por ende, la región V_L del 21.6 de ratón se modeló sobre la estructura de la CDR3 en la región V_L del HyHEL-5 de ratón. Las CDR1 y CDR2 de la región V_L del 21.6 de ratón se identificaron como pertenecientes a los grupos de estructuras canónicos 1 y 2, respectivamente. La CDR1 de la región V_H del 21.6 de ratón se modeló sobre la CDR1 de la región V_H del Gloop2, la cual se asemeja mucho a los miembros del grupo canónico 1 para las CDR1 de las regiones V_H. Las CDR2 de la región V_H del 21.6 de ratón se modeló sobre la CDR2 del HyHEL-5 de ratón (Sheriff *et al., supra*), que también es miembro del grupo canónico 2 para las CDR2 de las regiones V_H. Para las CDR3 de regiones V_H no hay estructuras canónicas. Sin embargo, la CDR3 en la región V_H del 21.6 de ratón era similar a la región V_H del R19.9 de ratón (Lascombe *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 607-611 (1989)) y se modeló sobre esta CDR3 retirando un residuo de serina adicional presente en el ápex del lazo de la

CDR3 de la región V_H del R19.9 de ratón y templado y refinando el espacio libre. Finalmente el modelo se sometió a minimización de energía por el método de los cambios máximos ("steepest descents") y gradientes conjugados usando el potencial CHARMM (Brooks *et al., J. Comp. Chem.* 4: 187-217 (1983)), como se implementa en el QUANTA a fin de liberar contactos atómicos desfavorables y optimizar las interacciones de van der Waals y electrostáticas.

Diseño de las Regiones Variables del 21.6 Humanizado - Selección de Anticuerpos Humanos Homólogos para la Secuencia Marco. Se identificaron regiones variables humanas cuyas RF mostraron un elevado porcentaje de identidad respecto del 21.6 de ratón por comparación de sus secuencias aminoacídicas. Las Tablas 10 y 11 comparan las regiones variables del 21.6 de ratón con todas las regiones variables de ratón conocidas y luego con todas las regiones variables humanas conocidas. La región V_L del 21.6 de ratón se identificó como perteneciente al subgrupo de regiones V_L kapa de ratón. Se identificaron regiones V_L kapa de ratón que tenían hasta 93.4% de identidad con la región V_L kapa del 21.6 de ratón (38C13V'CL y PC613'CL). La región V_L del 21.6 de ratón presentaba mayor similitud con las regiones V_L kapa del subgrupo 1, según lo definido por Kabat. Se identificaron regiones V_L kapa humanas individuales que tenían hasta 72.4% de identidad con la región V_L kapa del 21.6 de ratón. Las regiones marco (FR) de una de las regiones variables humanas más similares, RE1, se usaron para diseñar la región V_L del 21.6 humananizado. La región V_H del 21.6 de ratón se identificó como perteneciente al subgrupo de regiones V_H de ratón 2c según lo definido por Kabat. Se identificaron regiones variables de cadena pesada de ratón individuales con

hasta 93.3% de identidad con la región V_H del 21.6 de ratón (17.2.25'CL y 87.92.6'CL). La región V_H del 21.6 de ratón presenta la mayor similitud con las regiones V_H humanas del subgrupo 1 según lo definido por Kabat *et al.*, *supra*. Se identificaron regiones V_H humanas con hasta 64.7% de identidad respecto de la región V_H del 21.6 de ratón. Las FR de una de las regiones variables humanas más similares, se utilizó para diseñar la región V_H del 21.6 humanizado.

Sustitución de Aminoácidos en las Regiones Marco.

(A) Cadena Liviana. El siguiente paso en el proceso de diseño para obtener la región V_L del 21.6 humanizado fue unir las CDR de la región V_L del 21.6 de ratón con las FR del RE1 humano (Palm *et al.*, *Physiol. Chem.* 356: 167-191 (1975). En la primera versión de la región (La), se hicieron siete modificaciones en las FR humanas (Tabla 10, Figura 13). En las posiciones 104, 105 y 107 en la FR4, los aminoácidos del RE1 se sustituyeron con aminoácidos de región J humanos más típicos de otra cadena liviana kapa humana (Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988)).

En la posición 45 en la FR2, la lisina normalmente presente en RE1 se cambió por arginina tal como se encuentra en dicha posición en la región V_L del 21.6 de ratón. Se creyó que el residuo aminoacídico en esta posición era importante para soportar el lazo de la CDR2 en la región V_L del 21.6 de ratón.

En la posición 49 en la FR2, la tirosina normalmente presente en RE1 se cambió por histidina tal como se encuentra en dicha posición en la región V_L del 21.6 de ratón. En el modelo se observó que la histidina en esta posición en la región región V_L del 21.6 de ratón estaba ubicada en el

medio del sitio de fijación y posiblemente pudiera hacer contacto directo con el antígeno durante la fijación anticuerpo-antígeno.

En la posición 58 en la FR3, la valina normalmente presente en RE1 se cambió por una isoleucina tal como se encuentra en dicha posición en la región V_L del 21.6 de ratón. Se creyó que el residuo aminoacídico en esta posición era importante para soportar el lazo de la CDR2 en la región V_L del 21.6 de ratón.

En la posición 69 en la FR3, la treonina normalmente presente en RE1 se cambió por una arginina tal como se encuentra en dicha posición en la región V_L del 21.6 de ratón. En el modelo se observó que la arginina en esta posición en la región V_L del 21.6 de ratón estaba ubicada adyacente al loop de la CDR1 de la región V_L del 21.6 de ratón y posiblemente pudiera hacer contacto directo con el antígeno durante la fijación anticuerpo-antígeno.

Se diseñó una segunda versión de la región V_L del 21.6 humanizado (llamada Lb) conteniendo las mismas sustituciones descriptas, excepto que no se realizó ningún cambio en la posición 49 en la FR2 de RE1 (Figura 13).

(B) Cadena Pesada. El siguiente paso en el proceso de diseño para obtener la región V_H del 21.6 humanizado fue unir las dos CDR de la región V_H del 21.6 de ratón con las FR del 21/28'CL (Dersimonian *et al., J. Immunol.* 139: 2496-2501 (1987)). En la primera versión de la región V del 21.6 humanizado (Ha), se hicieron cinco modificaciones en las regiones marco humanas (Tabla 11, Figura 14). Los cinco cambios en las FR humanas fueron en las posiciones 27, 28, 29, 30 y 71.

En las posiciones 27, 28, 29 y 30 en la FR1, los aminoácidos presentes en el 21/28'CL humano se cambiaron por los aminoácidos que se

encuentran en tales posiciones en la región V_H del 21.6 de ratón. Aunque estas posiciones se designan como estando dentro de la FR1 (Kabat *et al., supra*), las posiciones 26 a 30 son parte del lazo estructural que forma el lazo de la CDR1 de la región V_H. Es probable, por lo tanto, que los aminoácidos en estas posiciones estén directamente involucrados en la fijación de antígeno. De hecho, las posiciones 27 a 30 son parte de la estructura canónica para la CDR1 de la región V_H según lo definido por *et al., supra.*

En la posición 71 en la FR2, la arginina persente en el 21/28'CL humano se cambió por una alanina tal como se encuentra en dicha posición en la región V_H del 21.6 de ratón. La posición 71 es parte de la estructura para la CDR2 de la región V_H según lo definido por Chothia *et al., supra.* Del modelo de las regiones variables del 21.6 surge que la alanina en la posición 71 sería importante para soportar el lazo de la CDR2 de la región V_H . Una sustitución de una arginina por una alanina en esta posición probablemente alteraría la colocación del lazo de la CDR2.

Una segunda versión (Hb) de la región V_H del 21.6 humanizado contiene los cinco casos antes descriptos para la versión Ha, más un cambio adicional en la FR2.

En la posición 44 en la FR2, la arginina presente en el 21/28'CL humano se cambió por una glicina tal como se encuentra en dicha posición en la región V_H del 21.6 de ratón. En base a la información publicada sobre el empaquetamiento de las regiones V_L-V_H y en el modelo de las regiones variables del 21.6 de ratón, se creyó que el residuo aminoacídico en la posición 44 podría ser importante para el empaquetamiento de las regiones V_L-V_H.

La versión Hc de la región V del 21.6 humanizado se diseñó para hacer que el lazo CDR3 fuera más similar a la VCAM-1 humana. Tanto el anticuerpo 21.6 de ratón como la VCAM-1 se unen a la integrina $\alpha_4\beta_1$. El lazo CDR3 de la región V_H de los anticuerpos es el más diverso de los seis lazos de CDR y generalmente el componente individual más importante del anticuerpo en las reacciones anticuerpo-antígeno (Chothia *et al., supra*; Hoogenboom & Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381-388 (1992); Barbas *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4457-4461 (1992)).

Se identificó algo de similitud de secuencias entre la CDR3 de la región V_H del 21.6 de ratón y los aminoácidos 86 a 94 de la VCAM-1 humana, particularmente entre la secuencia YGN (Tirosina-Glicina-Asparagina) en el lazo de CDR3 y la secuencia FGN (es decir, Fenilalanina-Glicina-Asparagina) en la VCAM-1. Se cree que estas secuencias están relacionadas con las secuencias RGD (es decir, Arginina-Glicina-Ácido aspártico) que son importantes en diferentes eventos de adhesión celular (Main *et al., Cell* 71: 671-678 (1992)). Por lo tanto, en la posición 98 en la CDR3, la tirosina presente en la región V_H del 21.6 de ratón se cambió por una fenilalanina como la que se encuentra en la secuencia de la VCAM-1 humana.

También se consideró una posible sustitución en la posición 36 en la FR2. La cadena V_H del 21.6 de ratón contiene un residuo de cisteína inusual en la posición 36 en la FR2. Esta posición en la FR2 generalmente es un tristofano en las secuencias de ratón y humanas relacionadas (Tabla 11). Aunque los residuos de cisteína a menudo son importantes para la conformación de un anticuerpo, el modelo de las regiones variables del 21.6 de ratón no indica que este residuo de cisteína estuvo involucrado

directa o indirectamente con la fijación de antígeno, de modo que el triptofano presente en la FR2 de la región V_H del 21/28'CL humano se dejó insustituido en las tres versiones del anticuerpo 21.6 humanizado.

Construcción de Anticuerpos 21.6 Humanizados. La primera versión de la región V_L del 21.6 humanizado (resh21.6VLa) se construyó a partir de fragmentos PCR superponibles según se describe en Daugherty *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19: 2471-2476 (1991). La región V_L del 21.6 de ratón, adaptada como se describió anteriormente e insertada en pUC19, se usó como plantilla. Se sintetizaron cuatro pares de cebadores, APCR1-vla1, vla2-vla3, vla4-vla5, y vla6-vla7 (Tabla 9). Pares adyacentes se superpusieron en al menos 21 bases. El cebador APCR1 es complementario del vector pUC19. Se combinaron pares de cebadores adecuados (0.2 μmoles) con 10 ng de plantilla de DNA y 1 unidad de AmpliTaq DNA polimerasa (Perkin Elmer Cetus) en 50 μl de tampón PCR conteniendo 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM de KCl, 200 μM de dNTPs, y 1.5 mM de $MgCl_2$. Cada reacción se llevó a cabo en 25 ciclos. Luego de una fusión inicial a 94°C durante 5 minutos, las reacciones se ciclaron a 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, y 72°C durante 2 minutos, y finalmente se incubaron a 72°C durante 10 minutos más. El tiempo de transición entre las etapas de templado y extensión del cebador fue de 2.5 minutos. Los productos de las cuatro reacciones (A, B, C y D) de la primera ronde de reacciones en PCR se extrajeron en fenol y se precipitaron en etanol.

TABLA 9

Cebadores PCR para la construcción de regiones variables del 21.6 humanizado

1060

Cebadores PCR para la construcción de regiones variables del 21.6 humanizado

A. Región variable de la cadena liviana

1. Cebadores para la síntesis de la versión "a"

21.6VLa1 (39-mer):
5' GAT GGT GAC TCT ATC TCC TAC AGA TGC AGA CAG TGA GGA 3'

21.6VLa2 (32-mer):
5' CTG TAG GAG ATA GAG TCA CCA TCA CTT GCA AG 3'

21.6VLa3 (39-mer):
5' AGG AGC TTT TCC AGG TGT CTG TTG GTA CCA AGC CAT ATA 3'

21.6VLa4 (41-mer):
5' ACC AAC AGA CAC CTG GAA AAG CTC CTA GGC TGC TCA TAC AT 3'

21.6VLa5 (40-mer):
5' GCA GGC TGC TGA TGG TGA AAG TAT AAT CTC TCC CAG ACC C 3'

21.6VLa6 (42-mer):
5' ACT TTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT ATT GCA ACT 3'

21.6VLa7 (59-mer):
5' CCG AGG ATC CAC TCA CGT TTG ATT TCC ACC TTG GTG CCT TGA CCG AAC GTC CAC AGA TT 3'

2. Cebadores para la síntesis de la versión "b"

21.6VLb1 (33-mer): cambia H-49 por Y-49
5' GGA AAA GCT CCT AGG CTG CTC ATA TAT TAC ACA 3'

21.6VLb2 (38-mer): cambia ACC-101 a ACA-101 para destruir el sitio *StyI*
5' CCG AGG ATC CAC TCA CGT TTG ATT TCC ACC TTT GTG CC 3'

Cebadores PCR para la construcción de regiones variables del 21.6 humanizado

B. Región variable de la cadena pesada

1. Cebadores para la síntesis de la versión "a"

21.6VHa1 (51-mer):
5' AAC CCA GTG TAT ATA GGT GTC TTT AAT GTT GAA ACC GCT AGC TTT ACA GCT 3'

21.6VHa2 (67-mer):
5' AAA GAC ACC TAT ATA CAC TGG GTT AGA CAG GCC CCT GGC CAA AGG CTG GAG TGG ATG GGA AGG ATT G 3'

21.6VHa3 (26-mer):
5' GAC CCG GCC CTG GAA CTT CGG GTC AT 3'

21.6VHa4 (66-mer):
5' GAC CCG AAG TTC CAG GGC CGG GTC ACC ATC ACC GCA GAC ACC TCT GCC AGC ACC GCC TAC ATG GAA 3'

21.6VHa5 (64-mer):
5' CCA TAG CAT AGA CCC CGT AGT TAC CAT AAT ATC CCT CTC TGG CGC AGT AGT AGA CTG CAG TGT C 3'

21.6VHa6 (63-mer):
5' GGT AAC TAC GGG GTC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC CTT GTC ACC GTC TCC TCA 3'

2. Cebadores para la síntesis de la versión "b"

21.6VHb (37-mer): cambia R-44 a G-44
5' CCA GGG CCG GGTCAC CAT CAC CAG AGA CAC CTC TGC C 3'

3. Cebadores para la síntesis de la versión "c"

21.6VHc (27-mer): cambia Y-98 a F-98
5' CAG GCC CCT GGC CAA GGG CTG GAG TGG 3'

C. Ambas regiones variables de las cadenas liviana y pesada

Cebadores que hibriden las regiones adyacentes pUC19 al vector DNA APCR1 (17-mer, cebador de sentido)
5' TAC GCA AAC CGC CTC TC 3'

APCR4 (18-mer, cebador anti-sentido)
5' GAG TGC ACC ATA TGC GGT 3'

Los productos PCR A y B, y C y D se unieron en una segunda ronda de reacciones PCR. Los A y B, y C y D (50 ng de cada uno) se añadieron a 50 μl de reacciones PCR (según se describió anteriormente) y se amplificó en 29 ciclos como ya se describió, excepto que la temperatura de templado se

elevó a 60°C. Los productos de estas reacciones se denominaron E y F. Los pares de cebadores PCR utilizados fueron APCR1-vla3 y vla4-vla7, respectivamente. Los productos PCR E y F se extrajeron en fenol y se precipitaron en etanol, y luego se acomodaron en una tercera ronda de reacciones PCR según sus propias complementariedades en una reacción PCD de dos etapas similar a la antes descripta usando APCR1 y vla7 como los cebadores del terminal. El fragmento totalmente armado que representa la totalidad de la región V_L del 21.6 humanizado incluyendo una secuencia líder se digirió con *Hind*III y *Bam*HI y se clonó en pUC19 para su secuenciado. Un clon con la secuencia correcta se denominó resh21.6VLa.

La segunda versión de una región V_L del 21.6 humanizado (Lb) se construyó usando cebadores PCR para introducir modificaciones menores en la primera versión de la región V_L del 21.6 humanizado (La) mediante el método de Kamman *et al., Nucl. Acids Res.* 17: 5404 (1989). Se sintetizaron dos conjuntos de cebadores (Tabla 9). Cada reacción PCR se llevó a cabo bajo esencialmente las mismas condiciones antes descriptas. En una primera reacción PCR, se usó cebador mutagénico 21.6VLb2 para destruir un sitio *Sty*I (Thr-ACC-97 a Thr-ACA-97) para obtener resh21.6VLa2. Luego, en una segunda reacción PCR, el cebador mutagénico 21.6VLb1 (His-49 a Tyr-49) se usó con pUC-resh21.6VLa2 como plantilla de DNA. El producto PCR se cortó con *Sty*I y *Bam*HI y se subclonó en pUC-resh21.6VLa2, escindiendo con las mismas enzimas de restricción. Un clon con la secuencia correcta se denominó pUC-resh21.6VLb.

La versión "a" de la región V_H del 21.6 humanizado se construyó usando los mismos métodos PCR descriptos para la construcción de la versión "a"

de la región V_L del 21.6 humanizado (Tabla 9). Los fragmentos de DNA *Hind*III-*Bam*HI que codifican para la versión "g" de la región V_H del 425 humanizado (Kettleborough *et al., supra*) y la versión "b" de la región V_H del AUK12-20 humanizado se subclonaron en vectores pUC19 obteniéndose pUC-resh425g y pUC-reshAUK12-20b, respectivamente. (La versión "b" de AUK12-20 se derivó por mutagénesis PCR de un fragmento V_H de a425 descripto por Kettleborough *et al., supra*, y codifica la secuencia aminoacídica:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT SYYIH WVRQAPGQGLEWVG YIDPFNGGTSYNQKFKG KVTMTVDTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR GGN-RFAY WGQGTLVTVSS (los espacios separan las regiones FR y CDR).

Los pUC-resh425g y pUC-reshAUK12-20b plásmidos, así como el vector pUC conteniendo la región V_H del 21.6 de ratón modificada para su uso en la construcción de la cadena pesada del 21.6 quimérico (pUC-chim21.6V_H), se usaron como plantillas de DNA en las reacciones PCR siguientes. Se designaron y sintetizaron cebadores PCR para la construcción de la versión "a" de la región V_H del 21.6 humanizado (Tabla 9). El producto PCR A se obtuvo usando pUC-reshAUK12-20b como plantilla de DNA y APCR1-vha1 como el par de cebadores. Los productos PCR B y D se obtuvieron usando pUC-chim21.6V_H como plantilla de DNA y vha2-vha3 y vha6-APCR4 como pares de cebadores, respectivamente. Finalmente, el producto PCR C se obtuvo usando pUC-resh425g como plantilla de DNA y vla4-vla5 como el par de cebadores. El producto PCR final se subclonó en pUC19 como un fragmento *Hind*III-*Bam*HI para secuenciar el DNA. Un clon con la secuencia DNA correcta se designó

pUC-resh21.6VHa. Las secuencias DNA y aminoacídicas de la primera versión de la región variable del 21.6 humanizado se ilustran en la Figura 15.

Las demás versiones de la región V_H del 21.6 humanizado se construyeron esencialmente como se describió anteriormente para la construcción de la versión "b" de la región V_L del 21.6 humanizado. Se sintetizaron dos conjuntos de cebadores (Tabla 9). Para la segunda versión (Hb) y la tercera versión (Hc), se usaron cebadores mutagénicos 21.6VHb (Arg-44 a Gly-44) y 21.6VHc (Tyr-98 a Phe-98), respectivamente, en reacciones PCR con pUC-resh21.6VHa como la plantilla de DNA. Los productos PCR VHb y VHc se cortaron con enzimas de restricción y se subclonaron en vector pUC pUC-resh21.6VHa como fragmentos MscI-BamHI y PstI-BamHI, respectivamente, para obtener pUC-resh21.6VHb y pUC-resh21.6VHc.

La primera versión de una región V_H del 21.6 humanizado (Ha) se construyó de manera similar a la usada para la construcción de la primera versión de la región V_L del 21.6 humanizado (La). Sin embargo, en este caso se usaron cebadores con tres plantillas de DNA, región V_H del 21.6 de ratón ya adaptada para la expresión de la versión "g" de la región V_H del 425 humanizado, 21.6 quimérico de cadena pesada (Kettleborough *et al., supra*),

y la versión "b" de la región V_H del AUK12-20 humanizado (Tabla 9). Las secuencias DNA y aminoacídicas de la primera versión de la región variable de cadena pesada del 21.6 humanizado se ilustran en la Figura 16. La segunda y tercera versión de la región V_H del 21.6 humanizado (Hb y

Hc) se construyeron usando cebadores para introducir modificaciones en la primera versión de la región V_H del 21.6 humanizado (Ha) (Tabla 9).

TABLA 10

Alineación de la secuencia aminoacídica que lleva al diseño de regiones variables de cadena liviana humanizadas del 21.6.

Kabat	#	FR o CDR	21.6 de ratón	kapa 5 de ratón (FIG. 17A)	kapa 1 de humano (FIG. 17B)	REI de humano	RH V_L de 21.6	Comentario
1	1	FR1	D	D	D	D	D	
2	2	|	I	I	I	I		
3	3	|	Q	Q	Q	Q	Q	
4	4	|	M	M	M	M	M	
5	5	|	T	T	T	T	T	
6	6	|	Q	Q	Q	Q	Q	
7	7	|	S	S	S	S	S	
8	8	|	P	P	P	P	P	
9	9	|	S	S	S	S	S	
10	10	|	S	S	S	S	S	
11	11	|	L	L	L	L	L	
12	12	|	S	S	S	S	S	
13	13	|	A	A	A	A	A	
14	14	|	S	S	S	S	S	
15	15	|	L	L	V	V	V	
16	16	|	G	G	G	G	G	
17	17	|	G	D	D	D	D	
18	18	|	K	R	R	R	R	
19	19	|	V	V	V	V	V	
20	20	|	T	T	T	T	T	
21	21	|	I	I	I	I	I	
22	22	|	T	T	T	T	T	
23	23	FR1	C	C	C	C	C	
24	24	CDR1	K	R	R	Q	K	
25	25	|	T	A	A	A	T*	
26	26	|	S	S	S	S	S	
27	27	|	Q	Q	Q	Q	Q*	
27A		|	–	D	S	–	–	
27B		|	–	–	L	–	–	
27C		|	–	–	V	–	–	
27D		|	–	–	X	–		
27E		|	–	–	X	–	–	
27F		|	–	–	–	–	–	
28	28	|	D	D	S	D	D*	
29	29	|	I	I	I	I	I*	
30	30	|	N	S	S	I	N*	
31	31	|	K	N	N	K	K*	
32	32	|	Y	Y	Y	Y	Y*	
33	33	|	M	L	L	L	M*	
34	34	CDR1	A	N	A	N	A	
35	35	FR2	W	W	W	W	W	
36	36	|	Y	Y	Y	Y	Y	
37	37	|	Q	Q	Q	Q	Q	

1066

Alineación de la secuencia aminoacídica que lleva al diseño de regiones variables de cadena liviana humanizadas del 21.6.

Kabat	#	FR o CDR	21.6 de ratón	kapa 5 de ratón (FIG. 17A)	kapa 1 de humano (FIG. 17B)	RE1 de humano	RH V_L de 21.6	Comentario
38	38	|	H	Q	Q	Q	Q	
39	39	|	K	K	K	T	T	K en CAMPATH-1H
40	40	|	P	P	P	P	P	
41	41	|	G	G	G	G	G	
42	42	|	K	G	K	K	K	
43	43	|	R	S	A	A	A	Considerar R en otras versiones
44	44	|	P	P	P	P	P	
45	45	|	R	K	K	K	R	Soporta el lazo L2 Considerar K en otras versiones
46	46	|	L	L	L	L	L	
47	47	|	L	L	L	L	L	
48	48	|	I	I	I	I	I*	
49	49	|	H	Y	Y	Y	H	En el medio del sitio de fijación, potencial para interactuar con antígeno, considerar Y en otras versiones
50	50	CDR2	Y	Y	A	E	Y*	
51	51	|	T	A	A	A	T*	
52	52	|	S	S	S	S	S*	
53	53	|	A	R	S	N	A	
54	54	|	L	L	L	L	L	
55	55	|	Q	H	E	Q	Q	
56	56	CDR2	P	S	S	A	P	
57	57	FR3	G	G	G	G	G	
58	58	|	I	V	V	V	I	Posiblemente soporte L2, considerar V en otras versiones
59	59	|	P	P	P	P	P	
60	60	|	S	S	S	S	S	
61	61	|	R	R	R	R	R	
62	62	|	F	F	F	F	F	
63	63	|	S	S	S	S	S	
64	64	|	G	G	G	G	G*	
65	65	|	S	S	S	S	S	
66	66	|	G	G	G	G	G	
67	67	|	S	S	S	S	S	
68	68	|	G	G	G	G	G	
69	69	|	R	T	T	T	R	Adyacente a L1, en la superficie cerca del sitio de fijación
70	70	|	D	D	D	D	D	
71	71	|	Y	Y	F	Y	Y*	F en CAMPATH-1H
72	72	|	S	S	T	T	T	
73	73	|	F	L	L	P	F	
74	74	|	N	T	T	T	T	
75	75	|	I	I	I	I	I	

Alineación de la secuencia aminoacídica que lleva al diseño de regiones variables de cadena liviana humanizadas del 21.6.

Kabat	#	FR o CDR	21.6 de ratón	kapa 5 de ratón (FIG. 17A)	kapa 1 de humano (FIG. 17B)	REI de humano	RH V_L de 21.6	Comentario
76	76	|	S	S	S	S	S	
77	77	|	N	N	S	S	S	
78	78	|	L	L	L	L	L	
79	79	|	E	E	Q	Q	Q	
80	80	|	P	Q	P	P	P	
81	81	|	E	E	E	E	E	
82	82	|	D	D	D	D	D	
83	83	|	I	I	F	I	I	
84	84	|	A	A	A	A	A	
85	85	|	T	T	T	T	T	
86	86	|	Y	Y	Y	Y	Y	
87	87	|	Y	F	Y	Y	Y	
88	88	FR3	C	C	C	C	C	
89	89	CDR3	L	Q	Q	Q	L	
90	90	|	Q	Q	Q	Q	Q*	
91	91	|	Y	G	Y	Y	Y*	
92	92	|	D	N	N	Q	D*	
93	93	|	N	T	S	S	N*	
94	94	|	L	L	L	L	L*	
95	95	|	–	P	P	P	–	
95A		|	–	P	E	–	–	
95B		|	–	–	–	–	–	
95C		|	–	–	–	–	–	
95D		|	–	–	–	–	–	
95E		|	–	–	–	–	–	
95F		|	–	–	–	–	–	
96	95	|	W	R	W	Y	W*	
97	96	CDR3	T	T	T	T	T	
98	97	FR4	F	F	F	F	F	
99	98	|	G	G	G	G	G	
100	99	|	G	G	Q	Q	Q	
101	100	|	G	G	G	G	G	
102	101	|	T	T	T	T	T	
103	102	|	K	K	K	K	K	
104	103	|	L	L	V	L	V	como indicado en CAMPATH-1H
105	104	|	E	E	E	Q	E	como indicado en CAMPATH-1H
106	105	|	I	I	I	I	I	
106A		|	–	–	–	–	–	
107	106	FR4	K	K	K	T	K	como indicado en CAMPATH-1H

Referencias: (Kabat) numeración de acuerdo con Kabat *et al., supra*; (#), numeración secuencial tal como se utliza en el modelado molecular; (21.6 de ratón) secuencia aminoacídica de la region V_L del 21.6 de ratón; (kapa 5

de ratón) secuencia consenso del las regiones V_L del subgupo 5 de ratón (Kabat *et al., supra*); (kapa 1 del humano) secuencia consenso de las regiones V_L del sugrupo 1 (Kabat *et al., supra*); (RE1 de Humano) secuencia aminoacídica RED de la region V_L humana (Palm *et al., Physiol. Chem.* 356: 167-191 (1975)); (RH V_L de 21.6) secuencia aminoacídica de la versión L1 de la región V_L humanizada del 21.6 ; (*) residuos que son parte de las estructuras canónicas de los lazos de CDR (Chothia *et al., supra*); (subrayado) residuos en las regiones marco (FRs) humanas donde los residuos aminoacídicos fueron cambiados.

TABLA 11

Alineación de la secuencia aminoacídica que lleva al diseño de regiones variables de cadena pesada humanizadas del 21.6.

Kabat	#	FR o CDR	21.6 de ratón	2c de ratón (FIG. 18A)	1 de humano (FIG. 18B)	21/28'CL de humano	RH V_H 21.6	Comentario
1	1	FR1	E	E	Q	Q	Q	
2	2	|	V	V	V	V	V	
3	3	|	Q	Q	Q	Q	Q	
4	4	|	L	L	L	L	L	
5	5	|	Q	Q	V	V	V	
6	6	|	Q	Q	Q	Q	Q	
7	7	|	S	S	S	S	S	
8	8	|	G	G	G	G	G	
9	9	|	A	A	A	A	A	
10	10	|	E	E	E	E	E	
11	11	|	L	L	V	V	V	
12	12	|	V	V	K	K	K	
13	13	|	K	K	K	K	K	
14	14	|	P	P	P	P	P	
15	15	|	G	G	G	G	G	
16	16	|	A	A	A	A	A	
17	17	|	S	S	S	S	S	
18	18	|	V	V	V	V	V	
19	19	|	K	K	K	K	K	
20	20	|	L	L	V	V	V	
21	21	|	S	S	S	S	S	
22	22	|	C	C	C	C	C	
23	23	|	T	T	K	K	K	
24	24	|	A	A	A	A	A	
25	25	|	S	S	S	S	S	
26	26	|	G	G	G	G	G*	

Alineación de la secuencia aminoacídica que lleva al diseño de regiones variables de cadena pesada humanizadas del 21.6.

Kabat	#	FR o CDR	21.6 de ratón	2c de ratón (FIG. 18A)	1 de humano (FIG. 18B)	21/28'CL de humano	RH V_H 21.6	Comentario
27	27	|	F	F	Y	Y	F*	Estructura canónica H1, considerar Y en otras versiones
28	28	|	N	N	T	T	N*	Estructura canónica H1, en la superficie
29	29	|	I	I	F	F	I*	Estructura canónica H1, considerar F en otras versiones
30	30	FR1	K	K	T	T	K*	Estructura canónica H1, en la superficie
31	31	CDR1	D	D	S	S	D*	
32	32	|	T	T	Y	Y	T*	
33	33	|	Y	Y	A	A	Y	
34	34	|	I	M	I	M	I*	
35	35	|	H	H	S	H	H	
35A		|	–	–	–	–	–	
35B		CDR1	–	–	–	–	–	
36	36	FR2	C	W	W	W	W	Residuo sepultado, C no tiene un rol especial evidente
37	37	|	V	V	V	V	V	
38	38	|	K	K	R	R	R	
39	39	|	Q	Q	Q	Q	Q	
40	40	|	R	R	A	A	A	
41	41	|	P	P	P	P	P	
42	42	|	E	E	G	G	G	
43	43	|	Q	Q	Q	Q	Q	
44	44	|	G	G	G	R	R	V_L - V_H empaquet., considerar G en otras versiones
45	45	|	L	L	L	L	L	
46	46	|	E	E	E	E	E	
47	47	|	W	W	W	W	W	
48	48	|	I	I	M	M	M	
49	49	FR2	G	G	G	G	G	

Alineación de la secuencia aminoacídica que lleva al diseño de regiones variables de cadena pesada humanizadas del 21.6.

Kabat	#	FR o CDR	21.6 de ratón	2c de ratón (FIG. 18A)	1 de humano (FIG. 18B)	21/28'CL de humano	RH V_H 21.6	Comentario
50	50	CDR2	R	R	W	W	R	
51	51	|	I	I	I	I	I	
52	52	|	D	D	N	N	D	
52A	53	|	P	P	P	A	P*	
52B		|	–	–	–	–	–	
52C		|	–	–	–	–	–	
53	54	|	A	A	G	G	A*	
54	55	|	N	N	N	N	N*	
55	56	|	G	G	G	G	G*	
56	57	|	Y	N	D	N	Y	
57	58	|	T	T	T	T	T	
58	59	|	K	K	N	K	K	
59	60	|	Y	Y	Y	Y	Y	
60	61	|	D	D	A	S	D	
61	62	|	P	P	Q	Q	P	
62	63	|	K	K	K	K	K	
63	64	|	F	F	F	F	F	
64	65	|	Q	Q	Q	Q	Q	
65	66	CDR2	G	G	G	G	G	
66	67	FR3	K	K	R	R	R	
67	68	|	A	A	V	V	V	
68	69	|	T	T	T	T	T	
69	70	|	I	I	I	I	I	
70	71	|	T	T	T	T	T	
71	72	|	A	A	A	R	A*	Estructura canónica H2, soportando H2
72	73	|	D	D	D	D	D	
73	74	|	T	T	T	T	T	
74	75	|	S	S	S	S	S	
75	76	|	S	S	T	A	A	
76	77	|	N	N	S	S	S	
77	78	|	T	T	T	T	T	
78	79	|	A	A	A	A	A	
79	80	|	Y	Y	Y	Y	Y	
80	81	|	L	L	M	M	M	
81	82	|	Q	Q	E	E	E	
82	83	|	L	L	L	L	L	
82A	84	|	S	S	S	S	S	
82B	85	|	S	S	S	S	S	
82C	86	|	L	L	L	L	L	
83	87	|	T	T	R	R	R	
84	88	|	S	S	S	S	S	
85	89	|	E	E	E	E	E	
86	90	|	D	D	D	D	D	
87	91	|	T	T	T	T	T	
88	92	|	A	A	A	A	A	

Alineación de la secuencia aminoacídica que lleva al diseño de regiones variables de cadena pesada humanizadas del 21.6.

Kabat	#	FR o CDR	21.6 de ratón	2c de ratón (FIG. 18A)	1 de humano (FIG. 18B)	21/28'CL de humano	RH V_H 21.6	Comentario
89	93	|	V	V	V	V	V	
90	94	|	Y	Y	Y	Y	Y	
91	95	|	F	Y	Y	Y	Y	
92	96	|	C	C	C	C	C	
93	97	|	A	A	A	A	A	
94	98	FR3	R	R	R	R		
95	99	CDR3	E	G	A	G	E	
96	100	|	G	Y	P	G	G	
97	101	|	Y	Y	G	Y	Y	
98	102	|	Y	Y	Y	Y	Y	
99	103	|	G	Y	G	G	G	
100	104	|	N	D	S	S	N	
100A	105	|	Y	S	G	G	Y	
100B	106	|	G	X	G	S	G	
100C	107	|	V	V	o	–	V	
100D	108	|	Y	G	C	–	Y	
100E	109	|	A	Y	Y	–	A	
100F	110	|	M	Y	R	M		
100G		|	–	A	0	–	–	
100H		|	–	M	D	–	–	
100I		|	–	–	Y	–	–	
100J		|	–	–	–	–		
100K		|	–	–	F	–	–	
101	111	|	D	D	D	N	D	
102	112	CDR3	Y	Y	Y	Y	Y	
103	113	FR4	W	W	W	W	W	
104	114	|	G	G	G	G	G	
105	115	|	Q	Q	Q	Q	Q	
106	116	|	G	G	G	G	G	
107	117	|	T	T	T	T	T	
108	118	|	S	X	L	L	L	
109	119	|	V	V	V	V	V	
110	120	|	T	T	T	T	T	
111	121	|	V	V	V	V	V	
112	122	|	S	S	S	S	S	
113	123	FR4	S	S	S	S	S	

Referencias: (Kabat) numeración de acuerdo con Kabat *et al., supra;* (#), numeración secuencial tal como se utliza en el modelado molecular; (21.6 de ratón) secuencia aminoacídica de la region V_L del 21.6 de ratón; (2c de ratón) secuencia de consenso de la region V_L del subgrupo 2c de ratón (Kabat *et al., supra*); (1 de humano) secuencia de consenso de las regiones

V_H del subgrupo 1 de humano (Kabat *et al., supra*); (21/28'CL de humano) secuencia aminoacídica de la region V_H de humano (Dersimonian *et al., J. Immunol.*, 139: 2496-2501 (1987)); (RH V_H 21.6) secuencia aminoacídica de la versión H1 de la región V_H humanizada del 21.6; (*) residuos que son parte de las estructuras canónicas de los lazos CDR (Chothia *et al., supra*); (subrayado) residuos en las regions marco humanas (FRs) donde los residuos aminoacídicos fueron cambiados.

Ejemplo 4

Modelo EAE de la Inflamación del Cerebro

A. Análisis *in vitro* de la fijación de linfocitos al endotelio inflamado en secciones de cerebro con EAE. Siguiendo el procedimiento descripto en Yednock *et al., Nature* 356: 63-66 (1992), se extrajeron los cerebros de ratos con EAE en el quinto día de la enfermedad (primer día de parálisis de cola/extremidades posteriores). Los cerebros se congelaron rápidamente, se seccionaron y se cubrieron con suspensiones de células linfoideas (métodos descriptos anteriormente para los cerebros inyectados con tumores). Las células humanas U937 se unieron selectivamente con los vasos inflamados en los cerebros de rata con EAE. El pretratamiento de las células U937 con el anticuerpo anti- VLA-4, HP2/1, inhibió completamente su fijación a los vasos inflamados en una sección adyacente de cerebro con EAE.

Como se ilustra en la Tabla 12, la fijación de las células U937 humanas a los vasos inflamados en los cerebros con EAE fue inhibido mediante reactivos contra la VLA-4 (anti-α_4, HP2/1; y anti-β2, AIIB2), pero no por anticuerpos contra numerosos otros receptores de adhesión. Dos anticuerpos que inhiben selectivamente la actividad de fijación de fibronectina (FN) de la VLA-4, no afectaron la fijación de las U937 a los

vasos con EAE (P4G9 y HP1/7). La Tabla 13 muestra que la fijación de linfocitos y monocitos humanos recién aislados, así como de linfocitos de ratón y de rata recién aislados, a los vasos inflamados con EAE también fue inhibida selectivamente por los anticuerpos contra la VLA-4. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo a como se describió anteriormente, y el grado de fijación se cuantificó usando una población de células de referencia.

TABLA 12

Tratamiento de células U397	Vasos de Clon	Fijación Relativa a EAE (% de control)
Anti-integrina β_1	AIIB2	8±3
Anti-integrina -α_3	A043	111±5
Anti-integrina-α_4	HP2/1 (inhibe la fijación de FN y VCAM-1)	3±1
Anti-integrina-α_4	P4G9 (inhibe selectivamente la fijación de FN)	151±7
Anti-integrina-α_4	HP1/7 (inhibe selectivamente la fijación de FN)	338±41
Anti-integrina-α_5	F1D6	104±6
Anti-integrina-α_6	GoH3	88±11
Anti-α_4 y -α_5	F4G9 y P106 (combinadas)	138±8
Anti-α_3, -α_4, y -α_6	A043, P1D5 y GoH3 (combinadas)	112±3
Anti-CD44	Homos-3	107±4
Selección anti-L	TQ-1	96±4
Anti-integrina-β_2	P4H9	77±1
Anti-integrina-β_2	TS1/18	98±5
Anti-integrina -β_2	P4H9 (probados a 25°C)	100±10
Anti-integrina-β_2	TS1/18 (probados a 25°C)	114±2
Anti-integrina-α_4	HP2/1 (probados a 25°C)	5±1

Tratamiento de células U397	Vasos de Clon	Fijación Relativa a EAE (% de control)
Anti-LFA-1	IOT1G	123±2
Anti-Mac-1	LM2/1	107±3

TABLA 13:

Especificidad del anticuerpo	Clon	Tipo de célula	Fijación Relativa a los vasos de E.A.E. (% de control)
Anti-integrina -β_1	AIIB2	linfocitos humanos	7±2
Anti-integrina -α_4	HP2/1	linfocitos humanos	0±0
Anti-integrina-α_4	HP2/1	linfocitos humanos	1±1
Anti-integrina -α_4	HP2/1	linfocitos de rata	18±7
Anti-integrina -α_4	R1-2	linfocitos de ratón	43±2
Anti-CD2	OX-34	linfocitos de rata	100±10
Selección Anti-L	MEL-14	linfocitos de ratón	92±4
Receptor de asentamiento del parche de Peyer	18.2.6	linfocitos de rata	117±12
Anti-LFA-1	OX-52	linfocitos de rata	87±1
Anti-CD45	OX-1	linfocitos de rata	90±3
Anti-Thy 1.1	OX-7	linfocitos de rata	87±3
Anti-CD4	OX-35	linfocitos de rata	107±8
Superficie de anti-monocito/célula T	OX-44	linfocitos de rata	102±8

B. Efecto de la Administración *In Vivo* del Anticuerpo Anti-VLA-4. Se administró anti- VLA-4 a ratas (administración intraperitoneal) a fin de determinar el efecto del anticuerpo sobre la progresión de la EAE. Para la

Tabla 14 siguiente, en cada experimento, el clon de célula T se administró en en día 0. En el día 2 los animales recibieron una inyección intraperitoneal de PBS, la cantidad indicada de integrina anti-α_4 purificada, o la cantidad indicada de anticuerpo de control purificado. Todos los anticuerpos eran IgG_1 de ratón. La enfermedad se definió por la parálisis total de la cola o de la cola y las extremidades posteriores. En los animales que desarrollaron la enfermedad, la parálisis comenzó en el día 4 ó 5, llegó a su pico en el día 5 ó 6, y de allí en más disminuyó de forma constante. Dos experimentos adicionales arrojaron resultados comparables. Los niveles circulantes y recuentos diferenciales de glóbulos blancos fueron indistinguibles entre los animales tratados con HP2/1 y los animales de control con PBS al ser medidos en los días 3, 4 y 7 (el día 3 corresponde a un día después de la administración del anticuerpo y un día antes de la primera aparición de parálisis). Se adquirieron cantidades de HP2/1 de AMAC; MOPC de Sigma; OX-1 y OX-7 de Bioproducts for Science.

Se extrajeron los cerebros de varias ratas enfermas con EAE y de ratas saludables tratadas con integrina anti-alfa-4 de los experimentos 2 y 3 en el transcurso del día 6. Había una extensa infiltración en los cerebros de los animales enfermos con EAE, mientras que no se pudieron detectar leucocitos en las ratas en las cuales se había inducido EAE y habían sido tratadas con integrina anti-alfa 4.

TABLA 14

Experimento 1 Número de animales con parálisis			
Tratamiento	Día 5	Día 6	Día 7
Sin anticuerpos	4/5	5/6	4/6
HP2/1 (1.2 mg)	0/6	0/6	0/6
MOPC (1.2 mg)	6/6	6/6	5/6

Experimento 2 Número de animales con parálisis			
Tratamiento	Día 4	Día 5	Día 6
Sin anticuerpos	4/5	5/6	5/5
HP2/1 (1.0 mg)	0/6	0/6	2/4
OX-1 (1.0 mg)	5/5	5/5	5/5
OX-7 (1.0 mg)	5/6	5/5	5/5

Experimento 3 Número de animales con parálisis			
Tratamiento	Día 4	Día 5	Día 6
Sin anticuerpos	6/6	6/6	6/6
HP2/1 (1.0 mg)	1/1	2/5	2/5
OX-1 (1.0 mg)	1/5	2/5	1/5
OX-7 (1.0 mg)	0/6	0/6	2/6

Ejemplo 5

Producción de Anticuerpos de VLA-4 Adicionales

Protocolo de Inmunización y Evaluación. Se cultivaron TY21.6 y J 21.12 contra la línea celular B humana, de Ramos (obtenida de la ATCC). 10^7 células Ramos, homogeneizadas en adyuvante completo de Freund, se inyectaron en un ratón Balb/c (administración intraperitoneal). Catorce días después, al animal se le inyectaron otras 10^7 células de Ramos (homogeneizadas en adyuvante completo de Freund, administración intraperitoneal). Luego de catorce días más, al animal se le inyectaron $2x10^6$ células de Ramos vivas (administración intraperitoneal). Tres días de la inyección final se retiró el bazo, los esplenocitos se aislaron, se fusionaron con el mieloma SP/2, y se colocaron en placas en aproximadamente 2000 pozos. Los sobrenadantes se analizaron para determinar su capacidad de inhibir la fijación de la línea celular humana B

de Ramos a las células L transfectadas con VCAM-1. Las células L de VCAM-1 transfectadas se produjeron usando técnicas convencionales: se aisló cDNA de VCAM-1 por PCR, se sintetizaron cebadores en base a la secuencia publicada y la plantilla de RNA se aisló de las células endoteliales de vena unbilical humana estimuladas con TNF (HUVEC). El cDNA aislado se transfectó a células L de ratón y se aislaron clones que expresaban elevados niveles de mensaje VCAM-1. Para los ensayos de adhesión, se colocaron células VCAM-1 L en placas de 96 pozos y se permitió que llegaran a la confluencia. Se rotularon fluorescentemente células U937 con PKH26 (Zynaxis Cell Science, Inc., Malvern, Pa.), se pre-trataron con sobrenadantes de hibridoma durante 30 minutos en hielo (200.000 células/muestra), y se añadieron a pozos individuales de VCAM-1. Se permitió que ocurriera adhesión durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego los pozos se lavaron para eliminar las células fijadas, y las células restantes se lisaron con 40 µl de Triton al 0.1%. 20 µl del extracto se analizaron en un lector de placas Pandex para determinar el grado de fluorescencia (es decir, el número de células fijadas). El grado de fijación se determinó por el porcentaje de fluorescencia con respecto a la fluorescencia asociada con el número total de células colocadas en cada pozo (es decir, 200.000 células U937) Se identificaron dos hibridomas individuales como potentes bloqueadores de la fijación de Ramos a la VCAM-1, y se estabilizaron como clones. Los anticuerpos se denominaron TY21.6 y TY21.12.

Se determinó que ambos anticuerpos reaccionan con la integrina alfa-4 ya que los anticuerpos precipitaron dos bandas de proteínas de un lisado de linfocitos humanos de célula superficial rotulados. Estas proteínas tenían

150 y 130 kD de peso molecular, lo cual corresponde a los pesos moleculares conocidos de las cadenas de integrina α_4 y β_1, respectivamente. Se precipitaron bandas idénticas en una muestra paralela usando un anticuerpo contra la integrina α_4 humana (anticuerpo HP2/1) disponible comercialmente y bien caracterizado. No se detectaron otras bandas de proteínas. Estos resultados sugieren que los 21.6 y 21.12 reaccionan con el complejo integrina $\alpha_4\beta_1$.

Los anticuerpos TY21.6 y 21.12 se caracterizaron también mediante análisis por FACS, usando métodos convencionales de tinción de células mediante inmunofluorescencia indirecta. Ambos anticuerpos reaccionan con la línea celular humana B, JY (que expresa integrina α_4, pero sólo niveles bajos de β_1). Ninguno de los dos anticuerpos reacciona con las células K562 humanas ni con los neutrófilos humanos (que expresan β_1 pero niveles muy bajos de integrina α_4). Por último, ambos anticuerpos interactúan con células L de ratón transfectadas con integrina $\alpha_4\beta_1$ humana (producidas como se describió anteriormente para las células L transfectadas con VCAM-1, usando la línea de células T humana Jurkat como plantilla de RNA), pero no con las células L transfectadas con el control. Con el HP2/1 se obtuvo un patrón de reactividad idéntico, mientras que un anticuerpo bien caracterizado contra la integrina β_1 (AIIB2) no reaccionó con las JY, pero sí reaccionó con las K562 y los neutrófilos. En consecuencia, TY21.6 y TY21.12 reaccionan selectivamente con la integrina α_4.

B. Caracterización Funcional de TY21.6, TY21.12 y L25. Los tres anticuerpos, TY21.6, TY21.12 y L-25 (Clayberger *et al., J. Immunol.* 138:

1510-1514 (1987)), inhiben efectivamente la fijación de los linfocitos humanos a CE de cerebro de rata TNF-estimuladas.

Se colocaron CE primarias de cerebro de rata, o clones de CE de cerebro de rata (arriba descriptos) en placas de cultivo de tejidos de 96 pozos. Las CE en algunos pozos se estimularon con TNF (como se describió anteriormente) durante 4 a 24 horas. Se rotularon células Jurkat, U937, o Ramos fluorescentemente (como se describió anteriormente), se pre-trataron con el anticuerpo indicado, y luego se añadieron a pozos individuales (200,000 células/pozo; pozos triplicados /tratamiento con anticuerpo). El grado de fijación se determinó como se describe anteriormente para el ensayo de fijación de VCAM-1 en 96 pozos. Los resultados se resumen en la Tabla 15.

TABLA 15

Experimento 1			Experimento 2			
1° CE de cerebro de rata	U937	% de células fijadas	Clon RBEC	Anticuerpo	% de fijación Jurkat	% de fijación de Ramos
0	sin Ab	7±1	0	sin Ab	3±1	2±1
TNFα	sin Ab	36±5	TNFα	sin Ab	66±3	40±1
TNFα	HP2/1	13±2	TNFα	HP2/1	6±1	2±1
TNFα	21.6	7±1	TNFα	TY21.6	8±2	1±1
TNFα	21.12	5±2	TNFα	TY21.12	8±1	1±0
			TNFα	L25	12±3	2±1

También se halló que los tres anticuerpos inhiben la fijación de linfocitos humanos a células L transfectadas con VCAM-1 (ensayo como se describió anteriormente, como se ilustra en la Tabla 16.

TABLA 16

Anticuerpo	% fijación de Ramos	% fijación de U937
ninguno	45±13	60±6
HP2/1	0±0	3±2
L25	9±2	11±2

TY21.6	1±1	0±1
TY21.12	0±0	1±0

Como se ilustra en la Tabla 17, los tres anticuerpos inhiben la fijación de células a los vasos inflamados en las secciones de cerebro con EAE (ensayo realizado como se describió anteriormente).

TABLA 17

Tratamiento U937	Fijación
Sin anticuerpo	100 ± 10
TY21.6	0 ± 1
TY21.12	0 ± 1

Algunos anticuerpos contra la integrina α_4 (tales como el HP2/4; Pulido *et al., J. Biol. Chem.* 266: 10241-10245 (1991)) inducen a los linfocitos a auto-agregarse. La base de esta agregación no se comprende completamente. En el mismo informe, se informa que el L25 indujo agregación de linfocitos. Sin embargo, no hemos podido reproducir estas observaciones. En nuestras manos, el L25, TY21.6 y 21.12 no inducen agregación celular al ser comparados directamente con el HP2/4. Se indujo agregación mezclando 100.000 células U937 con sobrenadante de anticuerpos (dilución final 1:5) en pozos de una placa de cultivo de tejidps de 96 pozos (100 µl volumen final/pozo). Se permitió que se produjera la agregación durante un período de entre 30 minutos y 4 horas, y se procedió a calificar con un sistema arbitrario +/-, por comparación con el control sin anticuerpo. Los resultados se presentan en la Tabla 18.

TABLA 18

Anticuerpo Inductor	Grado de Agregación U937
ninguno	-
HP2/1	-

L25	-
TY21.6	-
TY21.12	-
HP2/4	+++

Algunos anticuerpos contra la integrina α_4 inhiben la agregación inducida por el anticuerpo anti-integrina α_4 HP2/. Los HP2/1, TY21.6 y TY21.12 bloquean la agregación celular inducida por el HP2/4, mientras que el L25 no lo hace. Este ensayo se realizó como se describió anteriormente, excepto que las células U937 se pre-trataron con los anticuerpos bloqueantes (sobrenadante diluido 1:5 o anticuerpo purificado a 5 μg/mL) durante 30 minutos sobre hielo antes de añadir el anticuerpo inductor de la agregación, HP2/4 (la concentración final de hibridoma de HP2/4 sobrenadante fue de 1:20).

TABLA 19

Pretratamiento de U937	Grado de Agregación Inducido por HP2/4
Ninguno	+++
HP2/1	-
L25	+++
TY21.6	-
TY21.12	+/-

Además de la VCAM-1, la integrina $\alpha_4\beta_1$ media la fijación de células al dominio CS-1 del FN. Algunos anticuerpos contra la integrina α_4 inhiben la fijación de FN, como en el caso de los L25, TY21.6 y TY21.12; los tres anticuerpos fueron tan efectivos como el HP2/1. Este ensayo se realizó como se describe en *et al.*, (1991) *supra*. Los resultados se resumen en la Tabla 20.

1082

TABLA 20

Revestimiento de la Placa	BSA	FN	FN	FN	FN	FN
Tratamiento de Jurkat	Ninguno	Ninguno	HP2/1	21.6	21.12	L25
% fijado	2±1	77±6	42±7	43±6	34±2	21±1
(% inhibición)	-	-	(47)	(45)	(55)	(60)

Esta solicitud reivindica el beneficio de las Solicitudes Estadounidenses Provisorias Nos. 60/442.713 y 60/500.316, presentadas el 24 de Enero de 2003 y el 5 de Setiembre de 2003, respectivamente. La totalidad del contenido de las solicitudes antes mencionadas y todas las referencias, patentes otorgadas y solicitudes de patente publicadas aquí citadas se incorporan a la presente por referencia.

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. El uso de un agente remielinizante para la preparación de un medicamento en una cantidad para promover la remielinización de las células nerviosas en un mamífero para el tratamiento de una enfermedad desmielinizante.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el mamífero es un humano.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde el humano padece un trastorno que desmieliniza las células, y donde dicho trastorno es esclerosis múltiple, un trastorno metabólico congénito, una neuropatía con mielinización anómala, desmielinización inducida por fármacos, desmielinización inducida por radiación, un trastorno desmielinizante

hereditario, trastornos desmielinizantes inducidos por la proteína prión, desmielinización inducida por encefalitis o una lesión de la médula espinal.

4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde el humano padece esclerosis múltiple.

5. El uso de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el antagonista es un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo.

6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento inmunológicamente activo de un anticuerpo monoclonal.

7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo producto de la ingeniería genética, o un anticuerpo bi-específico.

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde el anticuerpo quimérico es humanizado o primatizado.

9. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el anticuerpo o un fragmento inmunológicameante activo del mismo se une a integrina alfa-4 beta-1.

10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un fragmento inmunológicameante activo del mismo.

11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde el anticuerpo humanizado es natalizumab o un fragmento inmunológicameante activo del mismo.

12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, donde el natalizumab se administra por vía intravenosa o subcutánea.

13. El uso de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 5 a 11, donde el fragmento inmunológicamente activo del anticuerpo es Fab, scFv o $F(ab')_2$.

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, donde el medicamento se administra de forma crónica al mamífero que lo necesita.

15. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde el natalizumab se administra de forma intravenosa a un mamífero, y donde la administración da por resultado un nivel en sangre efectivo de natalizumab en dicho mamífero de al menos alrededor de 1 ng/mL.

16. El uso de acuerdo con la reivindicación 15, donde el nivel en sangre efectivo de natalizumab es de alrededor de 1 ng/mL.

17. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el agente remielinizante se administra de forma crónica.

18. El uso de acuerdo con la reivindicación 18, donde la administración crónica del agente remielinizante se hace semanal o mensualmente durante un período de al menos un año.

19. El uso de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde un agente anti-inflamatorio se co-administra con el agente remielinizante al mamífero.

20. El uso de acuerdo con la reivindicación 18, donde el agente anti-inflamatorio es una hormona adrenocorticotrópica, un corticoesteroide, un interferón, un acetato de glatiramer, o un fármaco anti-inflamatorio no esteroide.

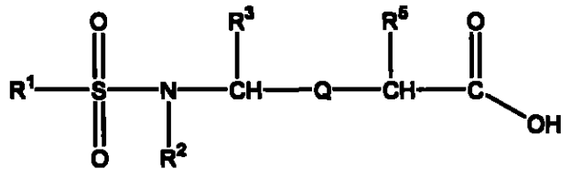
21. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, donde el interferón es interferón beta-1b o interferón beta-1a.

22. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, donde el corticoesteroide es prednisona, metilprednisolona, dexametasona cortisol, cortisona, fludrocortisona, prednisolona, 6α-metilprednisolona, triamcinolona, o betametasona.

23. El uso de acuerdo con la reivindicación 22, donde el corticoesteroide es prednisona.

24. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, donde el fármaco anti-inflamatorio no esteroide es aspirina, un salicilato de sodio, trisalicilato de colina y magnesio, salsalato, diflunisal, sulfasalazina, olsalazina, derivados del para-aminofenol, una indola, ácido acético indénico, un ácido heteroaril acético, un ácido antranílico, un ácido enólico, una alcanona, una furanona diaril-sustituida, una pirazola diaril-sustituida, un ácido acético indolénico o una sulfonanilida.

25. El uso de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el agente remielinizante es un compuesto de la Fórmula I



I

donde:

R^1 se selecciona del grupo formado por alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido;

R^2 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, y R^1 y R^2 junto con el átomo de nitrógeno unido a R^2 y el grupo SO_2 unido a R^1 pueden formar un grupo heterocíclico un heterocíclico sustituido;

R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido y, cuando R^2 no forma un grupo heterocíclico con R^1, R^2 y R^3 junto con el átomo de nitrógeno unido a R^2 y el átomo de carbono unido a R^3 pueden formar un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido;

R^5 es $-(CH_2)_x$-Ar-R^{5N} donde R^{5N} se selecciona del grupo formado por -O-Z-NR^8R^{8N} y -O-Z- R^{8NN} en donde R^8 y R^{8N} se seleccionan independientemente del grupo formando por hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, y donde R^8 y R^{8N} se unen para formar un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido, R^{8NN} se selecciona del grupo formado por heterociclo y heterociclo sustituido, y Z se selecciona del grupo formado por -C(O)- y $-SO_2$-;

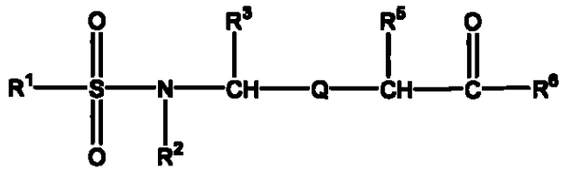
Ar es arilo, heteroarilo, arilo sustituido o heteroarilo sustituido;

x es un entero entre 1 y 4;

Q es -C(X)NR^7- donde R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo; y X se selecciona del grupo formado por oxígeno y azufre;

y sus sales farmacéuticamente aceptables.

26. El uso de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el agente remielinizante es un compuesto de la Fórmula IA



IA

donde:

R^1 se selecciona del grupo formado por alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido;

R^2 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, y R^1 y R^2 junto con el átomo de nitrógeno unido a R^2 y el grupo SO_2 unido a R^1 pueden formar un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido;

R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido y, cuando R^2 no forma un grupo heterocíclico con R^1, R^2 y R^3 junto con el átomo de nitrógeno unido a R^2 y el átomo de cargono unido a R^3 pueden formar un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido;

R^5 es - $(CH_2)_x$-Ar-R^{5N} donde R^{5N} se selecciona del grupo formado por -O-Z-NR^8R^{8N} y -O-Z- R^{8NN} donde R^8 y R^{8N} se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo

sustituido, y cuando R^8 y R^{8N} están unidos formando un heterociclo o un heterociclo sustituido, R^{8NN} se selecciona del grupo formado por heterociclo y heterociclo sustituido, y Z se selecciona del grupo formado por -C(O)- y $-SO_2-$;

Ar es arilo, heteroarilo, arilo sustituido o heteroarilo sustituido;

x es un entero entre 1 y 4;

R^6 se selecciona del grupo formado por 2,4-dioxo-tetrahidrofurano-3-il(3,4-enol), amino, alcoxilo, alcoxilo sustituido, cicloalcoxilo, cicloalcoxilo sustituido, -O-(N-succinimidilo), -NH-adamantilo, -O-colest-5-en-3-β-ilo, -NHOY donde Y es hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo y arilo sustituido, $-NH(CH_2)_pCOOY$ donde *p* es un entero entre 1 y 8, e Y es como se definió anteriormente, $-OCH_2NR^9R^{10}$ donde R^9 se selecciona del grupo formado por -C(O)-arilo y -C(O)- arilo sustituido y R^{10} se selecciona del grupo formado por hidrógeno y $-CH_2COOR^{11}$ donde R^{11} es alquilo, y $-NHSO_2Z=$ donde Z= es alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo y heterociclo sustituido;

Q es $-C(X)NR^7-$ donde R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo; y X se selecciona del grupo formado por oxígeno y azufre;

y sus sales farmacéuticamente aceptables

considerando las siguientes disposiciones:

(A) cuando R^1 y R^2 junto con el grupo SO_2 enlazado a R^1 y el nitrógeno enlazado a R^2 forman un grupo sacarin-2-ilo, R^3 es $-CH_3$, R^5 es *p*-$[(CH_3)_2NC(O)O-]$ bencilo y Q es -C(O)NH- entonces R^6 no es $-OC(CH_3)_3$;

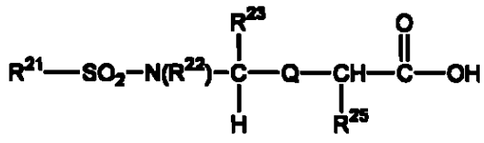
1089

(B) cuando R^1 es *p*-metilfenilo, R^2 y R^3 junto con el átomo de nitrógeno enlazado a R^2 y el átomo de carbono enlazado a R^3 forman un anillo de pirrodinilo derivado de la D-prolina; R^5 es *p*-[(4-metilpiperazin-1-il)NC(O)O-] bencilo derivado de la D-fenilalanina y Q es -C(O)NH- entonces R^6 no es $-OC(CH_3)_3$;

(C) cuando R^1 es pirimidin-2-ilo, R^2 y R^3 junto con el átomo de nitrógeno unido a R^2 y el átomo de carbono unido a R^3 forman un anillo de pirrolidinilo, R^5 es *p*-[$(CH_3)_2NC(O)O$-] bencilo y Q es -C(O)NH- entonces R^6 no es $-OC(CH_3)_3$; y

(D) cuando R^1 es *p*-metilfenilo, R^2 y R^3 junto con el átomo de nitrógeno enlazado a R^2 y el átomo de carbono enlazado a R^3 forman un anillo de (2S)-piperazin-2-carbonilo; R^5 es *p*-[$(CH_3)_2NC(O)O$-] bencilo y Q es -C(O)NH- entonces R^6 no es $-OC(CH_3)_3$.

27. El uso de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el agente remielinizante es un compuesto de la Fórmula II



II

donde:

R^{21} se selecciona del grupo formado por alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido;

R^{22} se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, y R^{21} y R^{22} junto con el átomo

de nitrógeno unido a R^{22} y el grupo SO_2 unido a R^{21} pueden formar un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido;

R^{23} se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido y cuando R^{22} y R^{23} junto con el átomo de nitrógeno unido a R^{22} y el átomo de carbono unido a R^{23} pueden formar un grupo heterocíclico saturado o un grupo heterocíclico saturado sustituido, con la condición que si está monosustituido, el sustituyente en dicho grupo heterocíclico sustituido saturado no es carboxilo;

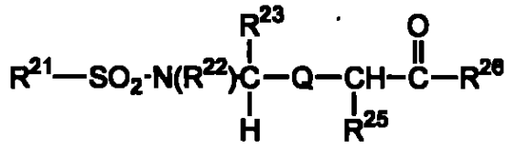
Q es $-C(X)NR^7-$ donde R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo;

X se selecciona del grupo formado por oxígeno y azufre; y

R^{25} es $-CH_2Ar^{22}-R^{25'}$ donde Ar^{22} es arilo o heteroarilo y $R^{25'}$ se selecciona del grupo formado por arilo, heteroarilo, arilo sustituido, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, ariloxilo, ariloxilo sustituido, aralcoxilo, aralcoxilo sustituido, heteroariloxilo, heteroariloxilo sustituido, heterociclo -O-, heterociclo -O- sustituido, heteroaralcoxilo y heteroaralcoxilo sustituido;

y sus sales farmacéuticamente aceptables.

28. El uso de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el agente remielinizante es un compuesto de la Fórmula IIA



IIA

donde:

R^{21} se selecciona del grupo formado por alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido;

R^{22} se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido, y R^{21} y R^{22} junto con el átomo de nitrógeno unido a R^{22} y el grupo SO_2 unido a R^{21} pueden formar un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido;

R^{23} se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido y cuando R^{22} y R^{23} junto con el átomo de nitrógeno unido a R^{22} y el átomo de carbono unido a R^{23} pueden formar un grupo heterocíclico saturado o un grupo heterocíclico saturado sustituido, con la condición que si está monosustituido, el sustituyente en dicho grupo heterocíclico sustituido saturado no es carboxilo;

R^{25} es $-CH_2Ar^{22}-R^{25'}$ donde Ar^{22} es arilo o heteroarilo y $R^{25'}$ se selecciona del grupo formado por arilo, heteroarilo, arilo sustituido, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, ariloxilo, ariloxilo sustituido, aralcoxilo, aralcoxilo sustituido, heteroariloxilo, heteroariloxilo sustituido, , heterociclo-O-, heterociclo-O- sustituido, heteroaralcoxilo y heteroaralcoxilo sustituido;

R^{26} se selecciona del grupo formado por 2,4-dioxo-tetrahidrofuran-3-il (3,4-enol), amino, alcoxilo, alcoxilo sustituido, cicloalcoxilo, cicloalcoxilo sustituido, -O-(N-succinimidilo), -NH-adamantilo, -O-colest-5-en-3-β-ilo,

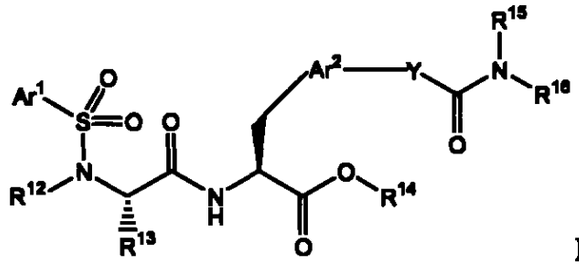
-NHOY donde Y es hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo y arilo sustituido, -NH$(CH_2)_p$COOY donde *p* es un entero entre 1 y 8, e Y es como se definió anteriormente, -$OCH_2NR^{29}R^{30}$ donde R^{29} se selecciona del grupo formado por -C(O)-arilo y -C(O)-arilo sustituido, y R^{30} se selecciona del grupo formado por hidrógeno y -CH_2COOR^{31} donde R^{31} es alquilo, y -$NHSO_2Z'$ donde Z' es alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo o heterociclo sustituido;

Q es -C(X)NR^7- donde R^7 se selecciona del grupo formado por hidrógeno y alquilo; y

X se selecciona del grupo formado por oxígeno y azufre;

y sus sales farmacéuticamente aceptables.

29. El uso de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el agente remielinizante es un compuesto de la Fórmula IB indicada a continuación:



IB

donde:

Ar^1 se selecciona del grupo formado por arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido;

Ar^2 se selecciona del grupo formado por arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido;

R^{12} se selecciona del grupo formado por alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo y cicloalquilo sustituido, o R^{12} y R^{13} junto con el átomo de nitrógeno unido a R^{12} y el átomo de carbono unido a R^{13} forman un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido;

R^{13} se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, y alquilo sustituido, o R^{12} y R^{13} junto con el átomo de nitrógeno unido a R^{12} y el átomo de carbono unido a R^{13} forman un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido;

R^{14} se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo y arilo sustituido;

R^{15} se selecciona del grupo formado por alquilo y alquilo sustituido, o R^{15} y R^{16} junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos forman un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido;

R^{16} se selecciona del grupo formado por alquilo y alquilo sustituido, o R^{15} y R^{16} junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos forman un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido; e

Y se selecciona del grupo formado por -O-, $-NR^{100}-$, y $-CH_2-$ donde R^{100} es hidrógeno o alquilo;

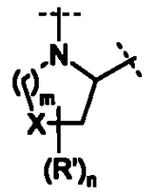
y sus sales farmacéuticamente aceptables.

30. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, donde R^{12} es alquilo, alquilo sustituido, o R^{12} y R^{13} junto con el átomo de nitrógeno unido a R^{12} y el átomo de carbono unido a R^{13} forman un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido y R^{14} es hidrógeno o alquilo.

31. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, donde Ar^1 se selecciona del grupo formado por fenilo, 4-metilfenilo, 4-*t*-butilfenilo, 2,4,6-trimetilfenilo, 2-fluorofenilo, 3-fluorofenilo, 4-fluorofenilo, 2,4-

difluorofenilo, 3,4-difluorofenilo, 3,5-difluorofenilo, 2-clorofenilo, 3-clorofenilo, 4-clorofenilo, 3,4-diclorofenilo, 3,5-diclorofenilo, 3-cloro-4-fluorofenilo, 4-bromofenilo, 2-metoxifenilo, 3-metoxifenilo, 4-metoxifenilo, 3,4-dimetoxifenilo, 4-*t*-butoxifenilo, 4-(3'-dimetilamino-*n*-propoxi)-fenilo, 2-carboxifenilo, 2-(metoxicarbonil)fenilo, 4-($H_2NC(O)$-)fenilo, 4-($H_2NC(S)$-)fenilo, 4-cianofenilo, 4-trifluorometilfenilo, 4-trifluorometoxifenilo, 3,5-di-(trifluorometil)fenilo, 4-nitrofenilo, 4-aminofenilo, 4-($CH_3C(O)NH$-)fenilo, 4-(PhNHC(O)NH-)fenilo, 4-amidinofenilo, 4-metilamidinofenilo, 4-[$CH_3SC(=NH)$-]fenilo, 4-cloro-3-[$H_2NS(O)_2$-]fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, piridin-2-ilo, piridin-3-ilo, piridin-4-ilo, pirimidin-2-ilo, quinolin-8-ilo, 2-(trifluoroacetil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-ilo, 2-tienilo, 5-cloro-2-tienilo, 2,5-dicloro-4-tienilo, 1-*N*-metilimidazol-4-ilo, 1-*N*-metilpirazol-3-ilo, 1-*N*-metilpirazol-4-ilo, 1-*N*-butilpirazol-4-ilo, 1-*N*-metil-3-metil-5-cloropirazol-4-ilo, 1-*N*-metil-5-metil-3-cloropirazol-4-ilo, 2-tiazolil y 5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-ilo.

32. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, donde R^{12} y R^{13} junto con el átomo de nitrógeno unido a R^{12} y el átomo de carbono unido a R^{13} forman un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido de la fórmula:



donde:

X se selecciona del grupo formado por -S-, -SO-, $-SO_2$ y $-CH_2$- opcionalmente sustituido;

m es un entero entre 0 y 12;

n es un entero entre 0 y 2; y

R' se selecciona del grupo formado por alquilo, alquilo sustituido y amino.

33. El uso de acuerdo con la reivindicación 32, donde m es 1, X es -S- o $-CH_2-$, R' es alquilo o alquilo sustituido.

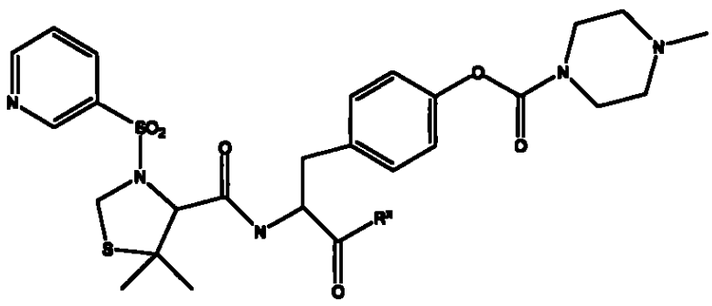
34. El uso de acuerdo con la reivindicación 32, donde R^{12} y R^{13} junto con el átomo de nitrógeno unido a R^{12} y el átomo de carbono unido a R^{13} forman un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido seleccionado del grupo formado por azetidinilo, tiazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, tiomorfolinilo, pirrolidinilo, 4-hidroxipirrolidinilo, 4-oxopirrolidinilo, 4-fluoropirrolidinilo, 4,4-difluoropirrolidinilo, 4-(tiomorfolin-4-ilC(O)O-)pirrolidinilo, 4-[$CH_3S(O)_2O$-]pirrolidinilo, 3-fenilpirrolidinilo, 3-tiofenilpirrolidinilo, 4-aminopirrolidinilo, 3-metoxipirrolidinilo, 4,4-dimetilpirrolidinilo, 4-*N*-Cbz-piperazinilo, 4-[$CH_3S(O)_2$-]piperazinilo, tiazolidin-3-ilo, 5,5-dimetil-tiazolidin-3-ilo, 5,5-dimetiltiazolindin-4-ilo, 1,1-dioxo-tiazolidinilo, 1,1-dioxo-5,5-dimetiltiazolidin-2-ilo y 1,1-dioxotiomorfolinilo.

35. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, donde Ar^2 se selecciona del grupo formado por fenilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo y 4-pirid-2-onilo.

36. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, donde Y es -O-, y cuando Y es -O-, la porción $-OC(O)NR^{15}R^{16}$ se selecciona del grupo formado por $(CH_3)_2NC(O)O$-, (piperidin-1-il)C(O)O-, (4-hidroxipiperidin-1-il)C(O)O-, (4-formiloxipiperidin-1-il)C(O)O-, (4-etoxicarbonilpiperidin-1-il)C(O)O-, (4-carboxilpiperidin-1-il)C(O)O-, (3-hidroximetilpiperidin-1-

il)C(O)O-, (4-hidroximetilpiperidin-1-il)C(O)O-, (4-piperidon-1-il etilen quetal)C(O)O-, (piperazin-1-il)-C(O)O-, (1-Boc-piperazin-4-il)-C(O)O-, (4-metilpiperazin-1-il)C(O)O-, (4-metilhomopiperazin-1-il)C(O)O-, (4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)C(O)O-, (4-fenilpiperazin-1-il)C(O)O-, (4-(piridin-2-il)piperazin-1]-il)C(O)O-, (4-(4-trifluorometilpiridin-2-il)piperazin-1-il)C(O)O-, (4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)C(O)O-, (4-acetilpiperazin-1-il)C(O)O-, (4-(fenilC(O)-)piperazin-1-il)C(O)O-, (4-(piridin-4'-ilC(O)-)piperazin-1-il)C(O)O, (4-(fenilNHC(O)-)piperazin-1-il)C(O)O-, (4-(fenilNHC(S)-)piperazin-1-il)C(O)O-, (4-metanosulfonilpiperazin-1-il-C(O)O-, (4-trifluorometanosulfonilpiperazin-1-il-C(O)O-, (morfolin-4-il)C(O)O-, (tiomorfolin-4-il)C(O)O-, (tiomorfolin-4'-il sulfona)-C(O)O-, (pirrolidin-1-il)C(O)O-, (2-metilpirrolidin-1-il)C(O)O-, (2-(metoxicarbonil)pirrolidin-1-il)C(O)O-, (2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il)C(O)O-, (2-(N,N-dimetilamino)etil)(CH_3)NC(O)O-, (2-(N-metil-N-tolueno-4-sulfonilamino)etil)(CH_3)N-C(O)O-, (2-(morfolin-4-il)etil)(CH_3)NC(O)O-, (2-(hidroxi)etil)(CH_3)NC(O)O-, bis(2-(hidroxi)etil)NC(O)O-, (2-(formiloxi)etil)(CH_3)NC(O)O-, ($CH_3OC(O)CH_2$)HNC(O)O-, y 2-[(fenilNHC(O)O-)etil-]HNC(O)O-.

37. El uso de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el agente remielinizante es un compuesto de la Fórmula IC

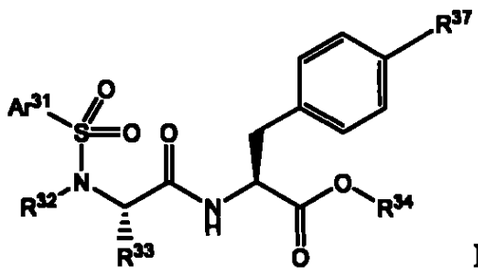


IC

donde R^x es hidroxilo o C_{1-5} alcoxilo y sus sales farmacéuticamente aceptables.

38. El uso de acuerdo con la reivindicación 37, donde el compuesto es éster isopropílico de *N*-[*N*-(3-piridinasulfonil)-L-3,3-dimetil-4-tiaprolil]-*O*-[1-metilpiperazin-4-ilcarbonil]-L-tirosina.

39. El uso de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el agente remielinizante es un compuesto de la Fórmula IIB indicada a continuación:



IIB

donde:

Ar^{31} se selecciona del grupo formado por arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido;

R^{32} se selecciona del grupo formado por alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo y cicloalquilo sustituido, o R^{32} y R^{33} junto con el átomo de nitrógeno unido a R^{32} y el átomo de carbono unido a R^{33} forman un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido;

R^{33} se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo y sustituido alquilo, o R^{32} y R^{33} junto con el átomo de nitrógeno unido a R^{32} y el átomo de carbono unido a R^{33} forman un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido;

R^{34} se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo y arilo sustituido; y

R^{37} es arilo, heteroarilo, arilo sustituido, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, ariloxilo, ariloxilo sustituido, aralcoxilo, aralcoxilo sustituido, heteroariloxilo, heteroariloxilo sustituido;

y sus sales farmacéuticamente aceptables.

40. El uso de acuerdo con la reivindicación 39, donde R^{32} es alquilo, alquilo sustituido, o R^{32} y R^{33} junto con el átomo de nitrógeno unido a R^{32} y el átomo de carbono unido a R^{33} forman un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido, y R^{34} es hidrógeno o alquilo.

41. El uso de acuerdo con la reivindicación 40, donde R^{37} es arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, o heterociclo sustituido.

42. El uso de acuerdo con la reivindicación 41, donde R^{37} es arilo sustituido, donde el arilo está sustituido por entre uno y tres sustituyentes seleccionados independientemente del grupo formado por alquilo y alcoxilo o es heteroarilo sustituido, donde el heteroarilo está sustituido por entre uno y tres sustituyentes seleccionados independientemente del grupo formado por alquilo, alcoxilo y oxo.

43. El uso de acuerdo con la reivindicación 41, donde R^{37} es arilo o heteroarilo sustituido, donde el arilo o el heteroarilo es 2,6-di-sustituido.

44. El uso de acuerdo con la reivindicación 43, donde R^{37} se selecciona del grupo formado por 2,6-dialcoxiarilo, 2,6-dialcoxiheteroarilo, 2-alquil-6-alcoxiarilo, 2-alquil-6-alcoxiheteroarilo, 2-oxo-6-alcoxihetero arilo, 2-oxo-6-alquilheteroarilo y imidazolidin-2,4-dion-3-ilo opcionalmente sustituido.

45. El uso de acuerdo con la reivindicación 39, donde Ar^{31} se selecciona del grupo formado por 4-metilfenilo, 4-clorofenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-metoxifenilo, fenilo, 2,4,6-trimetilfenilo, 2-(metoxicarbonil)fenilo, 2-carboxifenilo, 3,5-diclorofenilo, 4-trifluorometilfenilo, 3,4-diclorofenilo, 3,4-dimetoxifenilo, 4-($CH_3C(O)NH$-)fenilo, 4-trifluorometoxifenilo, 4-cianofenilo, 3,5-di-(trifluorometil)fenilo, 4-*t*-butilfenilo, 4-*t*-butoxifenilo, 4-nitrofenilo, 2-tienilo, 1-N-metil-3-metil-5-cloropirazol-4-ilo, 1-N-metilimidazol-4-ilo, 4-bromofenilo, 4-amidinofenilo, 4-metilamidinofenilo, 4-[$CH_3SC(=NH)$]fenilo, 5-cloro-2-tienilo, 2,5-dicloro-4-tienilo, 1-N-metil-4-pirazolilo, 2-tiazolilo, 5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-ilo, 4-[$H_2NC(S)$]fenilo, 4-aminofenilo, 4-fluorofenilo, 2-fluorofenilo, 3-fluorofenilo, 3,5-difluorofenilo, piridin-3-ilo, pirimidin-2-ilo, 4-(3N-dimetilamino-*n*-propoxi)-fenilo, y 1-metilpirazol-4-ilo.

46. El uso de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el agente remielinizante se selecciona del grupo formado por:

éster etílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster etílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *n*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster ciclopentílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *n*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster ciclopentílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster etílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(isonipecotoiloxi)fenilalanina;

éster etílico de *N*-(α-toluenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*-metilisonipecotoiloxi)fenilalanina;

N-(α-toluenosulfonil)-L-prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster etílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-3-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster etílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(1-*ter*-butilcarboniloxi-4-fenilpiperidin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-[(1,1-dioxo)tiamorfolin-3-carbonil]-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-[(1,1-dioxo)tiamorfolin-3-carbonil]-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)sarcosil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)sarcosil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)sarcosil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(1-metilimidazol-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-aminobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)sarcosil-L-4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(α-toluenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-(piperazin-2-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(α-toluenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(piperazin-2-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(4-benciloxicarbonilpiperazin-2-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)sarcosil-L-4-(isonipecotoiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-[(1,1-dioxo)tiamorfolin-3-carbonil]-L-4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-[(1,1-dioxo)tiamorfolin-3-carbonil]-L-4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)sarcosil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxo-5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(1-metilimidazol-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxo-5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(4-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(piridin-3-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-D-prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-*N*-metilalanil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-nitrobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)sarcosil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-*N*-metilalanil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(1,1-dioxotiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(isonipecotoiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(pirrolidin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster neopentílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster neopentílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster etílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-*ter*-butiloxicarbonilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster etílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)sarcosil-L-4-(1,1-dioxotiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)sarcosil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-*N*-metilalanil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(tiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)sarcosil-L-4-(1,1-dioxotiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-*N*-metilalanil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(tiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(piridin-3-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(pirimidin-2-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(4-nitrobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-cianobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxo)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxo)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(4-fluorobencenosulfonil)-L-tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(1-*ter*-butiloxicarbonilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

1106

éster etílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster etílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-acetilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster etílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-metanosulfonilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)-3-nitrofenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(1-*ter*-butiloxicarbonilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-*N*-metil-2-(*ter*-butil)glicinil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(1,1-dioxotiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(1,1-dioxotiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(1,1-dioxotiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-trifluorometoxibencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

3-[*N*-(tolueno-4-sulfonil)-*N*-metilamino]-1-[1-*ter*-butiloxicarbonil-2-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)feniletil]azetidin-2-ona

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxo-5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxo-5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(pirimidin-2-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

3-[*N*-(tolueno-4-sulfonil)-*N*-metilamino]-1-[1-carboxi-2-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)feniletil]azetidin-2-ona

éster *ter*-butílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxo)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(isonipecotoiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(1,1-dioxotiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(pirrolidin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxo)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*- éster *ter*-butílico de dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(2,5-diclorotiofeno-3-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-acetamidobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-*ter*-butilbencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(piridin-2-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(2-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(3-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(2,4-difluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(4-acetamidobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(4-trifluorometoxibencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(4-cianobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(3,3-dimetil)prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(3,3-dimetil)prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *iso*-propílico *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de N-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster etílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(N-(1,4-dioxa-8-aza-spiro[4.5]decan-8-il)carboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(N-(1,4-dioxa-8-aza-spiro[4.5]decan-8-il)carboniloxi)fenilalanina;

1110

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-acetilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-metanosulfonilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-fenilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-metanosulfonilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

(N^N-*ter*-butoxicarbonil-2-amino-2-metilpropil) éster de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-acetilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4^N-hidroxipiperidin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(N-(2^N-(morfolin-4N-il)etil)carbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(N-(1,4-dioxa-8-aza-spiro[4.5]decan-8-il)carboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(N-(2^N-hidroxietil)-N-metilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-4-(4N-(2-hidroxietil)piperazin-1-ilcarboniloxi)-L-fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(N-(2^{N}-formiloxietil)-N-metilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(N-(2N-hidroxietil)-N-metilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(N-(metoxicarbonilmetil)carbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de N-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-(4-N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-metoxipiperidin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-metoxipiperidin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-4-oxoprolil-L-4-(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de N-(tolueno-4-sulfonil)-L-*trans*-4-hidroxiprolil-L-4-(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de N-(3-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de N-(morfolino-sulfonil)-L-prolil-L-(4-*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(morfolino-sulfonil)-L-prolil-L-(4-*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(2-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(2,4-difluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-(tiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(piridin-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil-tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(3-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(4-*ter*-butilbencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-(3,3-dimetil)prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(2,5-diclorotiofeno-3-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(4-metoxibencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(4-metoxibencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1-oxo-tiomorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1-oxo-tiomorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(3,4-difluorobencenosulfonil)-L-prolil-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(3,4-difluorobencenosulfonil)-L-prolil-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(3,4-difluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(3,4-difluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster etílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(piridin-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(piridin-2-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(piridin-2-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(piridin-2-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(piridin-2-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(tiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(3-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(2-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(3,4-difluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(3,5-difluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(2,4-difluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(4-clorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(3-clorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(2-clorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(3,4-diclorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(3,5-diclorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico *N*-(de 3-clorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(3,4-diclorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(4-metoxibencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(3-metoxibencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N éster isopropílico de -(2-metoxibencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(3,4-dimetoxibencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N éster isopropílico de -(2,4-difluorobencenosulfonil)-L-(tiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(3,4-diclorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(3-clorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(3-cloro-4-fluorobencenosulfonil)-L-(1,1-dioxotiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(tiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N éster *ter*-butílico de -(3,4-difluorobencenosulfonil)-L-(tiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tioprolil-L-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(3,4-difluorobencenosulfonil)-L-(tiamorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(2,5-diclorotiofeno-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(8-quinolinasulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(8-quinolinasulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(8-quinolinasulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(8-quinolinasulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-fenilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4N-(etoxicarbonil)piperidin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(piridin-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(3-sulfonamido-4-cloro-bencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1-oxotiomorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(2,4-difluorobencenofulfonil)-L-(1-oxotiomorfolin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster 2,2-dimetilpropílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster 2,2-dimetilpropílico de *N*-(piridin-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster ciclopropilmetílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster metílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster etílico de *N*-(piridin-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster ciclopropilmetílico de *N*-(piridin-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster 2-metioxifenílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *n*-butílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *n*-propílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster 2,2-dimetilpropioniloximetílico de *N*-(1-metilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*-(4=-(2=-aminoetil)morfolino)carbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-[4-(carboxi)piperidin-1-ilcarboniloxi]fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-bis-(2-hidroxietil)carbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-[3-(hidroximetil)piperidin-1-ilcarboniloxi]fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-trifluorometanosulfonilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-(*N*-fenilurea)bencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(2-trifluoroacetil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-7-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(1-metilpirazol-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(1-metilpirazol-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(piridin-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(piridin-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*-metil-*N*-(2-dimetilaminoetil)carbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*-metil-N-(2-dimetilaminoetil)carbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiapropil-L-4-(*N*-metil-*N*-(2-dimetilaminoetil)carbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N*-metil-*N*-(2-dimetilaminoetil)carbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(*N,N*-dimeticarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)]fenilalanina;

N éster isopropílico de -(tolueno-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-3-cloro-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)]fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(4-(2=-piridil)-piperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(4-(2=-piridil)-piperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(4-nitrobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(4-aminobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-fenilcarbamilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-fenilcarbamilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(1-*n*-butilpirazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

1120

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(piridin-4-ilcarbonil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-4-oxoprolil-L-4-(N,N-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-*trans*-4-hidroxiprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(4-cianobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(4-aminobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-4-oxoprolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-[3-(hidroximetil)piperidin-1-ilcarboniloxi]fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(4,4-difluoro)prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-(4,4-difluoro)prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-(4-benzoilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(1-metil-1H-imidazol-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(4-cianobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster metílico de *N*-(4-amidinobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-4-oxoprolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-4-hidroxiprolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-(4-benzoilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster metílico de *N*-(4-amidinobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(3-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbaniloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-[*N*-metil-*N*-(2-(*N*=-metil-*N*=-toluenosulfonil-amino)etil)carbamiloxi]fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-[*N*-(2-(*N*=-fenilaminocarboniloxi)etil)carbamiloxi)]fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-4-(*trans*-hidroxi)prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-4-(*trans*-hidroxi)prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(4-amidinobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(pirazin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(2-hidroximetilpirrolidin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(2-hidroximetilpirrolidin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(2-metoxicarbonilpirrolidin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(4-hidroxi)prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster etílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina; 2-(2-metoxietoxi)

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(4-(2-pirimidil)piperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-fluoro-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1-metanosulfonilpirazin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-[2-(*N*-2,10-camforsultamil)acetil]-L-3-cloro-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-bromobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(4-bromobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-(4-hidroxi)prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(4-(2-pirimidil)piperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina;

N-(4-fluorobencenosulfonil)tiazolidinil-2-carbonil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)tiazolidinil-2-carbonil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-(4-oxo)prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-(4-oxo)prolil-L-4-(4-metilpiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(4-fluorobencenosulfonil)tiazolidinil-2-carbonil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-nitrobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)tiazolidinil-2-carbonil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina;

N-(4-bromobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-(*N*-feniltiocarbonil)piperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina;

N éster *ter*-butílico de -(4-fluorobencenosulfonil)tiazolidinil-2-carbonil-L-4-(4-metilhomopiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-4-(metanosulfoniloxi)prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(4-aminocarbonilbencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(4-aminocarbonilbencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(4-amidinobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(tiomorfolin-4-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(4-nitrobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina;

éster etílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)]fenilalanina;

N-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(4-fluorobencenosulfonil)tiazolidinil-2-carbonil-L-4-(4-metilhomopiperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(1-metilpirazol-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(1-metilimidazol-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(1-metilimidazol-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(tolueno-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-(1-metanosulfonilpirazin-3-carbonil)-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(tolueno-4-sulfonil)-L-4-(metanosulfoniloxi)prolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-bromobencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(4-trifluorometoxibencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N éster *ter*-butílico de -(4-trifluorometoxibencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N,N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(4-trifluorometoxibencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(4-fluorobencenosulfonil)-L-prolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(4-fluorobencenosulfonil)-L-(4-hidroxi)prolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(4-trifluorometoxibencenosulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(1-metilimidazol-4-sulfonil)-L-prolil-L-3-cloro-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(1-metilimidazol-4-sulfonil)-L-prolil-L-3-cloro-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(1-metilimidazol-4-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(1-metilimidazol-4-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(1-metilpirazol-3-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(1-metilpirazol-3-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(1-metilpirazol-3-sulfonil)-L-prolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster *ter*-butílico de *N*-(1-metilpirazol-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster isopropílico de *N*-(1-metilimidazol-4-sulfonil)-L-prolil-L-3-cloro-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster 2-fenoxietílico de *N*-(1-metilpirazol-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-4-(*N*,*N*-dimetilcarbamiloxi)fenilalanina;

N-(1-metilpirazol-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

éster etílico de *N*-(1-metilpirazol-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(4-(2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

N-(3-cloro-1,5-dimetilpirazol-3-sulfonil)-L-(5,5-dimetil)tiaprolil-L-3-cloro-4-(4-(5-trifluorometil-2-piridil)piperazin-1-ilcarboniloxi)fenilalanina;

47. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, donde el compuesto de la Fórmula IB se administra de forma parenteral.

48. El uso de acuerdo con la reivindicación 37, donde el compuesto de la Fórmula IC se administra de forma parenteral.

49. El uso de acuerdo con la reivindicación 39, donde el compuesto de la Fórmula IIB se administra de forma parenteral.

50. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, donde el compuesto de la Fórmula IB se administra de forma crónica al mamífero que lo necesita.

51. El uso de acuerdo con la reivindicación 37, donde el compuesto de la Fórmula IC se administra de forma crónica al mamífero que lo necesita.

52. El uso de acuerdo con la reivindicación 39, donde el compuesto de la Fórmula IIB se administra de forma crónica al mamífero que lo necesita.

53. El uso de acuerdo con la reivindicación 50, donde la administración crónica del compuesto de la Fórmula IB se hace en forma semanal o mensual durante un período de al menos un año.

54. El uso de acuerdo con la reivindicación 51, donde la administración crónica del compuesto de la Fórmula IC se hace en forma semanal o mensual durante un período de al menos un año.

55. El uso de acuerdo con la reivindicación 52, donde la administración crónica del compuesto de la Fórmula IIB se hace en forma semanal o mensual durante un período de al menos un año.

56. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, donde un agente anti-inflamatorio se co-administra con el compuesto de la Fórmula IB al mamífero.

1128 2006

57. El uso de acuerdo con la reivindicación 37, donde un agente anti-inflamatorio se co-administra con el compuesto de la Fórmula IC al mamífero.

58. El uso de acuerdo con la reivindicación 39, donde un agente anti-inflamatorio se co-administra con el compuesto de la Fórmula IIB al mamífero.

59. Una terapia combinada que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente remielinizante, que previene la desmielinización y promueve la remielinización cuando es administrada a un sujeto que lo necesita, y un agente anti-inflamatorio.

60. La terapia combinada de acuerdo con la reivindicación 59, donde el sujeto que necesita la remielinización padece esclerosis múltiple, un trastorno metabólico congénito, una neuropatía con mielinización anómala, desmielinización inducida por fármacos, desmielinización inducida por radiación, un trastorno desmielinizante hereditario, un trastorno desmielinizante inducido por la proteína prión, desmielinización inducida por encefalitis o una lesión de la médula espinal.

61. La terapia combinada de acuerdo con la reivindicación 59, donde el agente remielinizante es un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo, donde dicho anticuerpo se une a VLA-4.

62. La terapia combinada de acuerdo con la reivindicación 61, donde el agente es un anticuerpo que se une a integrina alfa-4 beta-1.

63. La terapia combinada de acuerdo con la reivindicación 61, donde el agente remielinizante es un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a VLA-4, y donde dicho agente remielinizante se administra de forma crónica a un paciente que lo necesita.

64. La terapia combinada de acuerdo con la reivindicación 59, donde la terapia combinada comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un segundo agente remielinizante, el cual previene la desmielinización y promueve la remielinización cuando es administrado a un sujeto que lo necesita, y donde el segundo agente remielinizante es un anticuerpo monoclonal o un fragmento inmunológicamente activo de un anticuerpo monoclonal.

65. La terapia combinada de acuerdo con la reivindicación 61, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

66. La terapia combinada de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 64 o 65, donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo producto de la ingeniería genética, o un anticuerpo bi-específico.

67. La terapia combinada de acuerdo con la reivindicación 66, donde el anticuerpo quimérico es humanizado o primatizado.

68. La terapia combinada de acuerdo con la reivindicación 67, donde el anticuerpo humanizado es natalizumab o un fragmento inmunológicameante activo del mismo.

69. La terapia combinada de acuerdo con la reivindicación 59, donde el agente anti-inflamatorio es una hormona adrenocorticotrópica, un corticoesteroide, un interferón, un acetato de glatiramer, o un fármaco anti-inflamatorio no esteroide.

70. La terapia combinada de acuerdo con la reivindicación 69, donde el interferón es interferón beta-1b o interferón beta-1a.

71. La terapia combinada de acuerdo con la reivindicación 69, donde el corticoesteroide es prednisona, metilprednisolona, dexametasona cortisol,

cortisona, fludrocortisona, prednisolona, 6α-metilprednisolona, triamcinolona o betametasona.

72. La terapia combinada de acuerdo con la reivindicación 69, donde el fármaco anti-inflamatorio no esteroide es aspirina, un salicilato de sodio, trisalicilato de colina y magnesio, salsalato, diflunisal, sulfasalazina, olsalazina, derivados del para-aminofenol, una indola, un ácido acético indénico, un ácido heteroaril acético, un ácido antranílico, un ácido enólico, una alcanona, una furanona diaril-sustituida, una pirazola diaril-sustituida, un ácido acético indolénico o una sulfonanilida.

73. La terapia combinada de acuerdo con la reivindicación 69, donde el fármaco anti-inflamatorio no esteroide es aspirina, un salicilato de sodio, trisalicilato de colina y magnesio, salsalato, diflunisal, sulfasalazina, olsalazina, derivados del para-aminofenol, una indola, un ácido acético indénico, un ácido heteroaril acético, un ácido antranílico, un ácido enólico, una alcanona, una furanona diaril-sustituida, una pirazola diaril-sustituida, un ácido acético indolénico o una sulfonanilida.

74. La terapia combinada de acuerdo con la reivindicación 59, donde el agente remielinizante tiene una forma para administración intravenosa o subcutánea.

75. La terapia combinada de acuerdo con la reivindicación 59, donde el agente remielinizante se administra semanalmente o mensualmente durante un período de al menos un año al paciente que lo necesita.

76. El uso de un agente remielinizante en una cantidad suficiente para inhibir la infiltración de linfocitos en las células inmunes en la médula espinal para promover la remielinización de las células nerviosas en la

médula espinal y así tratar la parálisis en dicho sujeto que lo necesita para la preparación de un medicamento para reducir la parálisis en dicho sujeto.

77. El uso de un agente remielinizanate de acuerdo con la reivindicación 76, donde el sujeto con parálisis padece esclerosis múltiple, un trastorno metabólico congénito, una neuropatía con mielinización anómala, desmielinización inducida por fármacos, desmielinización inducida por radiación, un trastorno desmielinizante hereditario, un trastorno desmielinizante inducido por la proteína prión, desmielinización inducida por encefalitis o una lesión de la médula espinal.

78. El uso de un agente remielinizanate de acuerdo con cualesquiera de las reivindicaciones 76 o 77, donde el sujeto es humano.

79. El uso de un agente remielinizanate de acuerdo con la reivindicación 76 que además comprende la co-administración de un inmunosupresor.

80. El uso de un agente remielinizanate de acuerdo con la reivindicación 76, donde el agente remielinizante es un anticuerpo anti-VLA-4.

81. El uso de un agente remielinizanate de acuerdo con la reivindicación 76, donde el anticuerpo anti-VLA-4 liga integrina alfa-4 beta-1.

82. El uso de un agente remielinizanate de acuerdo con la reivindicación 81, donde el anticuerpo anti-VLA-4 es un anticuerpo monoclonal.

83. El uso de un agente remielinizanate de acuerdo con la reivindicación 82, donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo

quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo producto de la ingeniería genética o un anticuerpo biespecífico.

84. El uso de un agente remielinizanate de acuerdo con la reivindicación 83, donde el anticuerpo quimérico es humanizado o primatizado.

85. El uso de un agente remielinizanate de acuerdo con la reivindicación 84, donde el anticuerpo humanizado es natalizumab.

86. El uso de un agente remielinizanate de acuerdo con la reivindicación 76, donde el agente remielinizante se administra de forma crónica al sujeto que lo necesita.

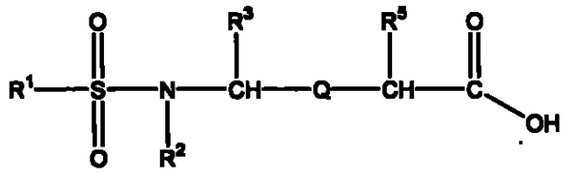
87. El uso de un agente remielinizanate de acuerdo con la reivindicación 86, donde la administración crónica del agente remielinizante se hace semanal o mensualmente durante un período de al menos doce meses.

88. El uso de un agente remielinizanate de acuerdo con la reivindicación 79, donde el inmunosupresor es una hormona adrenocorticotrópica, un corticoesteroide o un interferón.

89. El uso de un agente remielinizanate de acuerdo con la reivindicación 88, donde el interferón es interferón beta-1b o interferón beta-1a.

90. El uso de un agente remielinizanate de acuerdo con la reivindicación 88, donde el corticoesteroide es prednisona, metilprednisolona, dexametasona cortisol, cortisona, fludrocortisona, prednisolona, 6α-metilprednisolona, triamcinolona, o betametasona.

91. La terapia combinada de acuerdo con la reivindicación 59, donde el agente remielinizante es un compuesto de la Fórmula I



I

donde

R^1 se selecciona del grupo formado por alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido;

R^2 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, y R^1 y R^2 junto con el átomo de nitrógeno unido a R^2 y el grupo SO_2 unido a R^1 pueden formar un grupo heterocíclico un heterocíclico sustituido;

R^3 se selecciona del grupo formado por hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido y, cuando R^2 no forma un grupo heterocíclico con R^1, R^2 y R^3 junto con el átomo de nitrógeno unido a R^2 y el átomo de carbono unido a R^3 pueden formar un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido;

R^5 es $-(CH_2)_x$-Ar-R^{5N} donde R^{5N} se selecciona del grupo formado por -O-Z-NR^8R^{8N} y -O-Z- R^{8NN} en donde R^8 y R^{8N} se seleccionan independientemente del grupo formando por hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, y donde R^8 y R^{8N} se unen para formar un grupo heterocíclico o un grupo heterocíclico sustituido, R^{8NN} se selecciona del grupo formado por