QF

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21 **EXPEDIENTE No.** 06-53408

54 **TÍTULO** "MÉTODO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD ASOCIADA CON ADAMTS-5".

51 **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** A61K 31/19, 31/41

71 **SOLICITANTE** WYETH

DOMICILIO NUEVA JERSEY, ESTADOS UNIDOS

74 **APODERADO** ALVARO CORREA ORDOÑEZ
T P 20281

22 **BOGOTÁ, D. C.,** JUNIO 2, 2006

(FORMA P 10)

PETITORIO

000001

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Esp SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-053406- -00000-0000
Fec: 2006-06-02 16:43:51 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTES Y S
Eve: 379 FASE NACIONAL

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

(1) SOLICITUD DE :

[X] Patente de Invención — [ ] Patente de Modelo de Utilidad

[X] Capítulo I. — [ ] Capítulo II.

(2) SOLICITANTE (71)

Nombre: WYETH

Dirección: Five Giralda Farms, Madison, Nueva Jersey 07940 Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Nueva Jersey, Estados Unidos de América

Lugar de Constitución:

Teléfono: Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C. [ ] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Cual _____

Número _____

(3) REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6

Teléfono: 634 1500 Fax: 376 2211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C. [X] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Cual _____

Número 79.143.366 de Usaquén TP 20.281

(4) INVENTOR (ES) (72)

Nombre: MORRYS, Elisabeth A.; GLASSON, Sonya S.; XIANG, Jason Shaoyun

Dirección: 15 Apple Street, Sherborn, MA 01770 (US); 98 Shaw Road Belmont, MA 02478 (US); 3 River Street, Winchester, MA 01890 (US)

Nacionalidad o Domicilio: Americana; Australiana; Americana

(5) PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2004/037169 Fecha 08-NOV-04

Publicación Internacional No. WO 2005/060456 A2 Fecha 07-JUL-05

(6) Título (54) MÉTODO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD ASOCIADA CON ADAMTS-5

(7) Clasificación Internacional (51) A61K 31/19 ; 31/47

(8) Prioridad SI [X] NO [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	04-DIC-03	60/526.883

(9) Comprobante de pago No. 06-27545; 06-21330; 06-21331 y 06-5995 **Fecha** 10-abr-06; 16-mar-06; 16-mar-06 y 25-ene-06

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

(10) **ANEXOS**

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- [ ] Poderes, si fuere el caso
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [X] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- [ ] Arte final 12 x 12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [X] Otros: Extracto publicación, extracto propietario, extracto temático, modificación preliminar, reporte de búsqueda y opinión escrita

(11) **FIGURA CARATERISTICA**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

3 0 0 7

000003

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-053408- -00000-0000
Fec: 2006-06-02 15:43:51 Dep. 2020 RUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEYII
Exs: 378 EASEMACIONALU
Act: 411 PRESENTACION Folios: 342

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 27,545
FECHA : ABRIL 10 DE 2006

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	48495428	07/04/2006	46,795,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	5 TRAMITES DE SOL. DE MODELO DE UTI	272,000.00
		TOTAL : $	272,000.00

SON: DOSCIENTOS SETENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

006

000004

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 21,330
FECHA : MARZO 16 DE 2006

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	51176325	16/03/2006	57,556,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	REMTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	95,000.00
		TOTAL : $	95,000.00

SON: NOVENTA Y CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

000005

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 21,331
FECHA : MARZO 16 DE 2006

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	51176325	16/03/2006	57,556,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES		95,000.00
		TOTAL :	$	95,000.00

SON: NOVENTA Y CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 6 - 5,995
FECHA : ENERO 25 DE 2006

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	49211790	25/01/2006	24,705,000.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO		CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99	OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	1,000.00
				TOTAL : $	1,000.00

SON: MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL ASUNTO No.

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

997.37000PCT
LSP
NPL CH I 8/4/05 with 7/13/05

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU 000007

PCT

NOTIFICATION CONCERNING TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

To:

RECEIVED
2005 JUL 12 A 11:57
FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO

PERRY, Lawrence, S.
Fitzpatrick, Cella, Harper & Scinto
30 Rockefeller Plaza
New York, NY 10112-3801
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 07 July 2005 (07.07.2005)		
Applicant's or agent's file reference 1997.37000.PC	**IMPORTANT NOTICE**	
International application No. PCT/US2004/037169	International filing date *(day/month/year)* 08 November 2004 (08.11.2004)	Priority date *(day/month/year)* 04 December 2003 (04.12.2003)
Applicant WYETH et al		

The International Bureau transmits herewith the following documents:

☑ copy of the international application as published by the International Bureau on 07 July 2005 (07.07.2005) under No. WO 2005/060456

☐ copy of international application as republished by the International Bureau on under No. WO
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (*as the case may be*) on the front page of the attached document.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Nora Lindner
Facsimile No.+41 22 740 14 35	Facsimile No.+41 22 338 89 65

Form PCT/IB/311 (January 2004)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
7 July 2005 (07.07.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/060456 A2

(51) International Patent Classification: Not classified

(21) International Application Number:
PCT/US2004/037169

(22) International Filing Date:
8 November 2004 (08.11.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/526,883 4 December 2003 (04.12.2003) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: WYETH [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: MORRIS, Elisabeth, A. [US/US]; 15 Apple Street, Sherborn, MA 01770 (US). GLASSON, Sonya, S. [US/US]; 98 Shaw Road, Belmont, MA 02478 (US). XIANG, Jason, Shaoyun [US/US]; 3 River Street, Winchester, MA 01890 (US).

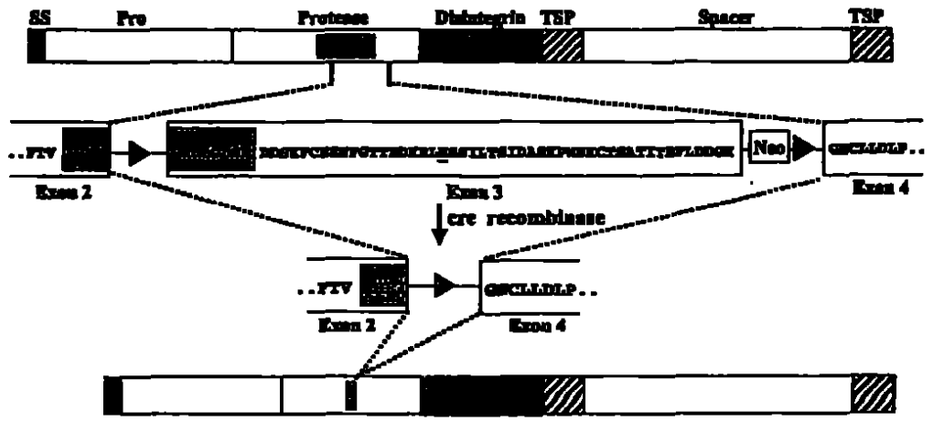
(74) Agents: PERRY, Lawrence, S. et al.; Fitzpatrick, Cella, Harper & Scinto, 30 Rockefeller Plaza, New York, NY 10112-3801 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD FOR TREATING ADAMTS-5-ASSOCIATED DISEASE



(57) Abstract: The present invention relates to methods of treating ADAMTS-5-associated diseases and particularly osteoarthritis comprising administering an agent capable of modulating ADMATS-5 activity to a subject afflicted with the disease. The agent is preferably a biaryl sulfonamide compound. The invention is based, in part, on the discovery that transgenic animals that do not express functional ADAMTS-5 show a reduction in the degree of osteoarthritis after the induction of osteoarthritis as compared to WT animals. Furthermore, the ADAMTS-5 transgenic animals have reduced aggrecanase activity in articular tissue as compared to WT animals. These animals are good models for ADAMTS-5-associated diseases, and for screening of drugs useful in the treatment and/or prevention of these diseases. There are no other animal models in which the deletion of the activity of a single gene is capable of abrogating the course of osteoarthritis. Accordingly, these animals also show that osteoarthritis can be prevented and/or treated by administering to a subject an ADAMTS-5 inhibitory agent and particularly an agent capable of inhibiting the aggrecanase activity of ADAMTS-5.

WO 2005/060456 A2

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

TITLE

METHOD FOR TREATING ADAMTS-5-ASSOCIATED DISEASE

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[0001] This application claims priority under 35 U.S.C. § 119(e) to United States Provisional Application No. 60/526,883, filed December 4, 2003.

FIELD OF THE INVENTION

[0002] The present invention relates to a method of treating an ADAMTS-5-associated disease, and particularly, osteoarthritis. As employed herein, the term "ADAMTS" means a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I motifs. As employed herein, the term "KO" refers to animals carrying a mutation resulting in substantial reduction or absence of expression of a gene product, such as the ADAMTS-5 gene product in the cells of the transgenic animal.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] Osteoarthritis is a pathologic condition in synovial joints characterized by cartilage extracellular matrix degradation. A major component of cartilage extracellular matrix is the proteoglycan aggrecan. Pathologic cleavage of aggrecan occurs at 2 primary sites within the interglobular domain of the protein backbone which results in release of the functional entity from the extracellular matrix. One site ($N^{341\text{-}342}F$) is cleaved by matrix metalloproteases (MMPs), while a second, non-MMP cleavage site within aggrecan is at $E^{373\text{-}374}A$. The $E^{373\text{-}}$

^{374}A cleavage site has been identified as an important site of degradation in osteoarthritic synovial fluid samples (Lohmander, Neame and Sandy, 1993, *Arthritis & Rheum* 36:1214) and cytokine stimulated cartilage cultures (Sandy et al., 1991, *J. Biol. Chem.* 266:8683). Several ADAMTS enzymes have been demonstrated to be capable of cleaving aggrecan at the $E^{373-374}A$, or "aggrecanase" site (Kuno et al., 2000, *FEBS Letters* 478 :241; Rodriquez-Manzaneque et al., 2002, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293:501; Somerville et al., 2003, *Biol. Chem.* 278:9503; U.S. Patent No. 6,451,575). ADAMTS-4 and ADAMTS-5, or Aggrecanase-1 and Aggrecanase-2, respectively, appear to be the two enzymes capable of being synthesized by articular cartilage with by far (>1000 fold) the most efficient "aggrecanase" activity (Tortorella et al., 1999, *Science* 284:1664; and Abbaszade et al., 1999, *J. Biol. Chem.* 274:23443). However, it is not clear whether these enzymes, either collectively or independently, are responsible for the aggrecan degradation in osteoarthritis.

[0004] Evidence of ADAMTS-4 in joint disease is found in several reports of increased expression of ADAMTS-4 after stimulation of articular tissues with inflammatory cytokines . Bau et al., 2002, *Arthritis & Rheum* 46:2648-2657; Curtis et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275:721-724; Tortorella et al., 2001, *Osteoarthritis Cartilage* 9:539-552; Little et al., 2002, *Arthritis & Rheum* 46:124-129; and Yamanashi et al., 2002, *J. Immunol.* 168:1405-1412. *In vitro* findings indicate that ADAMTS-4 is one of the few enzymes that can efficiently cleave aggrecan at the site that is cleaved in naturally occurring disease. Tortorella et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275:18566-18573; Tortorella et al., 2002, *Matrix Biol.* 21:499-511.

[0005] In addition, aggrecanases are known to play a role in other disorders in which extracellular protein degradation or destruction occurs, such as cancer, asthma, chronic obstructive pulmonary disease ("COPD"), atherosclerosis, age-related macular degeneration, myocardial infarction, corneal ulceration and other ocular surface diseases, hepatitis, aortic aneurysms, tendonitis, central nervous system diseases, abnormal wound healing, angiogenesis, restenosis, cirrhosis, multiple sclerosis, glomerulonephritis, graft versus host disease, diabetes, inflammatory bowel disease, shock, invertebral disc degeneration, stroke, osteopenia, and periodontal diseases.

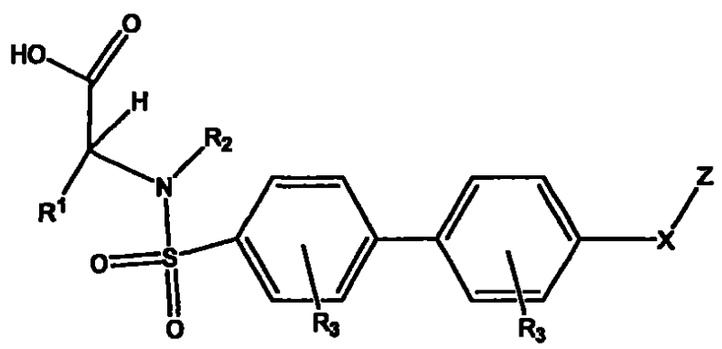
[0006] The generation of the ADAMTS-4 knockout (KO) has previously been reported (Glasson et al., 2004, *Arthritis and Rheum*, 50:2547-2558). While many reports showed at least some evidence that ADAMTS-4 is involved in the development of osteoarthritis,

surprisingly this mouse did not show any differences in the onset of osteoarthritis than wild-type (WT) and did not exhibit any difference in aggrecanase activity. Although, it is still possible that ADAMTS-4 is involved in osteoarthritis in other animals, including humans, to date, the aggrecanase activity associated with the pathological accumulation of aggrecan degradation products has not been identified.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0007] The present invention provides a method for treating an ADAMTS-5-associated disease, and particularly osteoarthritis, comprising administering to a subject an effective amount of an ADAMTS-5 inhibitory agent. In one embodiment, the ADAMTS-5 inhibitory agent inhibits the metalloproteinase activity of ADAMTS-5. In another embodiment, the agent inhibits the aggrecanase activity of ADAMTS-5. Particularly preferred agents that are useful for treating ADAMTS-5-associated diseases, and particularly osteoarthritis, include biaryl sulfonamide compounds and antibodies that bind to and inhibit ADAMTS-5.

[0008] Preferred biaryl sulfonamide compounds of the invention are those of the formula I:



I

wherein:

R^1 is H or C1-C6 alkyl;

R^2 is H, C1-C6 alkyl, $(CH_2)_nR^{2'}$, phenyl, or benzyl;

n is 0-6;

$R^{2'}$ is aryl, heteroaryl, cycloalkyl, or heterocycloalkyl;

R^3 is, independently with respect to each occurrence, H, halogen, $OC(halogen)_3$, $C(halogen)_3$, alkoxy, or C1-C6 alkyl;

X is selected from CH_2O, OCH_2, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)_2-C(R^3)_2$, $CH_2NHC(=O)$, $O(C=O)NH$, O, $C(=O)CH_2$, $SO_2CH_2C(=O)NH$, SO_2NH, $OC(=O)$, $CH_2S(O)$, and $CH_2S(O)_2$; and

Z is at least one aryl or heteroaryl moiety.

[0009] Particularly preferred biaryl sulfonamides of the invention are listed in Table 1 below in Example 4.

[0010] In addition, the present invention provides a method for identifying agents useful for the treatment of osteoarthritis using the transgenic animals of the invention, and cells isolated therefrom. In a particularly embodiment, the methods comprise administering to an ADAMTS-5 transgenic animal of the invention and an animal having ADAMTS-5 activity a potential therapeutic agent and determining whether the potential therapeutic agent is capable of abrogating the onset of induced osteoarthritis in the WT type animal but not in the ADAMTS-5 transgenic animal. In another embodiment, the methods comprise contacting a cell derived from an ADAMTS-5 transgenic animal and a cell derived from an animal having ADAMTS-5 activity, with a potential therapeutic agent, and determining whether the agent inhibits metalloproteinase activity in the cell having ADAMTS-5 activity but not in the ADAMTS-5 transgenic animal cell. Both methods may further comprise determining whether the agent inhibits ADAMTS-5 metalloproteinase activity and/or aggrecanase activity.

[0011] In a further embodiment, the methods of identifying potential agents useful for the treatment of ADAMTS-5-associated diseases, and particularly osteoarthritis, comprise identifying agents that inhibit ADAMTS-5 by contacting ADAMTS-5 and determining whether the agent inhibits ADAMTS-5. In a preferred embodiment, the agent inhibits the metalloproteinase activity of ADAMTS-5. In a particularly preferred embodiment, the agent inhibits the aggrecanase activity of ADAMTS-5.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0012] These and other aspects of the invention will be more clearly understood by reference to the following detailed description of exemplary embodiments in conjunction with the accompanying drawings, in which:

[0013] Figure 1 illustrates the targeted disruption of the murine ADAMTS-5 gene (A) shows a map of the amino acid sequence of ADAMTS-5, (B) shows the allelic characterization of the ADAMTS-5 KO animal and the location of primers used to generate PCR products, (C) shows PCR products generated using primers 1 and 2 shown in 1B, and PCR products generated using primers 3 and 4 shown in 1B, (D) shows a map of the site of primers used in reverse transcriptase (RT) PCR to identify mRNA in WT and KO animals, (E) shows RT-PCR products generated using primers 4 and 5, and (G) shows RT-PCR products generated using primers 4 and 6;

[0014] Figure 2 shows the immunohistochemical localization of the aggrecanase generated $TEGE^{373}$ neoepitope in growth plates of 14-18 week old WT animals (top), ADAMTS-4 KO animals (left bottom) and, ADAMTS-5 KO animals (right bottom);

[0015] Figure 3 illustrates the histologic scores of joints from WT, ADAMTS-5 homozygous KO and ADAMTS-5 heterozygous mice 4 and 8 weeks after induction of surgical joint in stability (A) shows the histologic scores expressed as the mean maximal score from each joint, and (B) shows the histologic scores expressed as the mean of the sum of the scores form each histologic section through the joints;

[0016] Figure 4 illustrates the mean maximal histologic scores of the medial tibial plateau of WT, homozygous ADAMTS-5 KO and heterozygous ADAMTS-5 KO animals 4 and 8 weeks after induction of joint instability; and

[0017] Figure 5 illustrates proteoglycan release from articular cartilage from WT and ADAMTS-5 KO animals (A) shows the percent total proteoglycan released from cultured articular cartilage, (B) shows a western analysis of $TEGE^{373}$ neoepitope released from articular cartilage, and (C) shows immunostaining of femoral head articular cartilage from WT (top), ADAMTS-4 KO (center) and ADAMTS-5 KO (bottom) articular cartilage.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0018] The present invention relates to the discovery that the expression of ADAMTS-5 is directly involved in osteoarthritis. Transgenic ADAMTS-5 KO mice are resistant to the onset of osteoarthritis when stimulated to develop osteoarthritis. These transgenic animals represent the first animal model in which the disruption in a single gene has resulted in resistance to osteoarthritis. Accordingly, this discovery has led to the determination that ADAMTS-5 is a drug target molecule for the treatment of osteoarthritis and that inhibitors, preferably aggrecanase inhibitors, of ADAMTS-5 can be used to treat osteoarthritis.

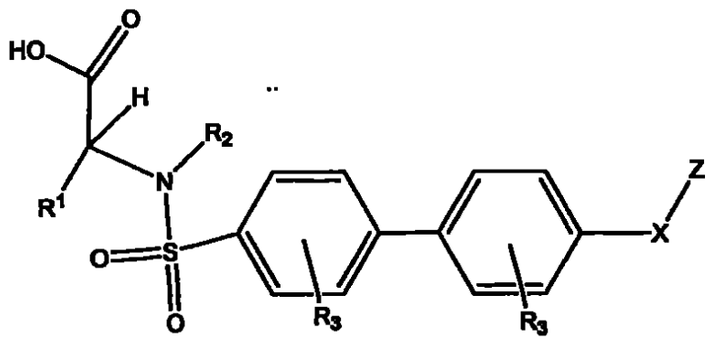
[0019] Therefore, the present invention relates to a method of preventing and/or treating osteoarthritis comprising administering to a subject an effective amount of an agent that inhibits ADAMTS-5. Such agents include, but are not limited to anti-sense RNA, drug compounds, particularly those that bind to and inhibit the metalloproteinase site of ADAMTS-5, peptides and proteins, and antibodies capable of binding to and inhibiting ADAMTS-5.

[0020] The term "effective amount," as used herein, refers to the amount of an agent, that when administered to a subject, is effective to at least partially ameliorate (and in preferred embodiments, prevent and/or cure) a condition from which the subject is suspected to suffer.

[0021] In one preferred embodiment, the agent is an anti-ADAMTS-5 antibody that is capable of inhibiting ADAMTS-5 metalloproteinase activity and/or aggrecanase activity. In a particularly preferred embodiment, the antibody inhibits ADAMTS-5. Such antibodies are further discussed below in Example 5.

[0022] In another preferred embodiment, the agent is a biaryl sulfonamide compound which has been found to act as a metalloproteinase inhibitor and/or an aggrecanase inhibitor. In a particularly preferred embodiment the agent is a biaryl sulfonamide compound that has been found to act as an ADAMTS-5 inhibitor and is capable of inhibiting the aggrecanase activity of ADAMTS-5.

[0023] In a preferred embodiment, the biaryl sulfonamide compound is of the formula I:



I

wherein:

R^1 is H or C1-C6 alkyl;

R^2 is H, C1-C6 alkyl, $(CH_2)_nR^{2'}$, phenyl, or benzyl;

n is 0-6;

$R^{2'}$ is aryl, heteroaryl, cycloalkyl, or heterocycloalkyl;

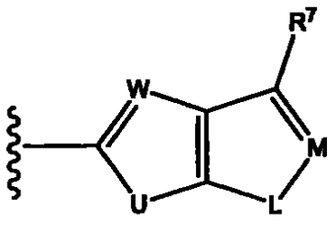
R^3 is, independently with respect to each occurrence, H, halogen, $OC(halogen)_3$, $C(halogen)_3$, alkoxy, or C1-C6 alkyl;

X is selected from CH_2O, OCH_2, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)_2$-$C(R^3)_2$, $CH_2NHC(=O)$, $O(C=O)NH$, O, $C(=O)CH_2$, $SO_2CH_2C(=O)NH$, SO_2NH, $OC(=O)$, $CH_2S(O)$, and $CH_2S(O)_2$; and

Z is at least one aryl or heteroaryl moiety.

[0024] It is understood that the foregoing definition includes pharmaceutically acceptable salts and pro-drugs of these compounds.

[0025] In one embodiment, Z is pyridine, pyrimidine, pyrazine, pyridazine, phenyl, naphthalene, furan, thiophene, pyrrole, pyrazole, imidazole, oxazole, isoxazole, thiazole, benzothiazole, quinoline, or isoquinoline, or



wherein:

U is selected from S, O, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)=N$, and $N(R^4)$;

W is selected from $C(R^3)$, and N;

M is selected from $C(R^3)$, and N;

L is selected from S, O, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)=N$, and $N(R^4)$;

R^4 and R^5 are, independently with respect to each occurrence, a bond to the other, H, C1-C6 alkyl, or phenyl;

R^7 is selected from a bond to R^3, H, halogen, $C(halogen)_3$, NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NHSO_2R^4$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, OR^4, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, phenyl, heteroaryl, C1-C6 alkyl, C2-C6 alkenyl, or C2-C6 alkynyl; and

R^8 is selected from H, phenyl, heteroaryl, and C1-C6 alkyl.

R^7, when substituted, is preferably substituted with NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NHSO_2R^4$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, OR^8, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, phenyl, or heteroaryl.

R^8, when substituted, is preferably substituted with NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NR^4SO_2R^5$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, phenyl, or heteroaryl.

[0026] Preferred among the above noted R^1 groups are H and branched alkyl, and more preferably isopropyl.

[0027] Preferred among the above noted R^3 groups are halogen, CF_3, OCH_3, and CH_3.

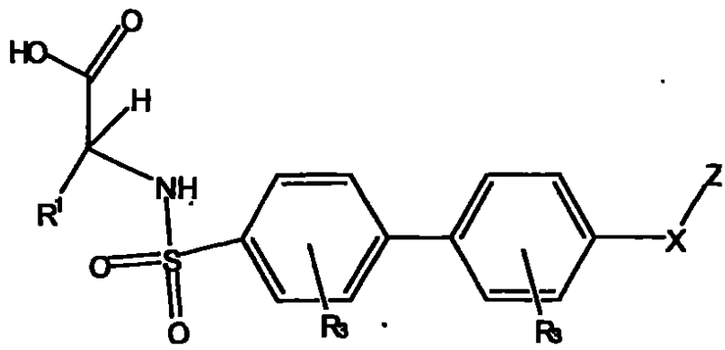
[0028] Preferred among the above noted X groups are CH_2O, OCH_2, $C(R^3)=C(R^3)$, and $CH_2NHC(=O)$.

[0029] Preferred among the above noted R^7 groups are CH_3, ethyl, isopropyl, CF_3, CN, and OCH_3.

[0030] Preferred among the above noted R^8 groups are CH3, phenyl, and benzyl.

[0031] In one embodiment, X is CH_2O, and Z is aryl or heteroaryl, preferably bicyclic.

[0032] A preferred biarylsulfanomide is shown in Formula 2 wich follows:



wherein

R1 is H or C_1-C_6 alkyl

Rc is H, Halogen, or C_1-C_6 alkyl

X is 0, CH_2O or OCH_3; and

Z is at least one aryl or heteroaryl moiety.

When Z is aryl, preferred moieties include substituted phenyl. Substituents for the phenyl group preferably include OH, halogen, C_1-C_6 alkoxy, benzoyl, C_1-C_6 alkyl or C_1-C_6 alkoyl.

When Z is a heteroaryl, preferred moieties include benzyfuranyl, pyridyl, indolyl.

[0033] In another embodiment, X is OCH_2, and Z is aryl or heteroaryl, preferably bicyclic.

[0034] In a further embodiment, X is $C(R^3)=C(R^3)$, and Z is aryl or heteroaryl, preferably bicyclic. More preferably, X is a *trans* carbon-carbon double bond.

[0035] In yet another embodiment, X is $C(R^3)_2$-$C(R^3)_2$, Z is aryl or heteroaryl, preferably bicyclic.

[0036] In one embodiment, X is CH_2NHCO, Z is aryl or heteroaryl, preferably bicyclic.

[0037] When X is carbamate O-CO-NH, Z is preferably aryl or heteroaryl, preferably bicyclic.

[0038] In one embodiment X is CO_2, Z is aryl or heteroaryl, preferably bicyclic.

[0039] In another embodiment, X is O, Z is aryl or heteroaryl, preferably bicyclic.

[0040] In a further embodiment, X is $C(=O)CH_2$, Z is aryl or heteroaryl, preferably bicyclic.

[0041] In one embodiment, X is SO_2CH_2, Z is aryl or heteroaryl, preferably bicyclic.

[0042] In one embodiment, X is OCH_2, Z is aryl or heteroaryl, preferably bicyclic. Preferably, if substituted, the substitution is on the second phenyl ring.

[0043] In one embodiment, X is OCH_2, Z is aryl or heteroaryl, preferably bicyclic. Preferably, if substituted, the substitution is on the first phenyl ring.

[0044] In one embodiment, X is CH_2OCH_2, Z is aryl or heteroaryl, preferably bicyclic. Preferably, if substituted, the substitution is on the first phenyl ring.

[0045] The term "alkyl", as used herein, whether used alone or as part of another group, refers to a substituted or unsubstituted aliphatic hydrocarbon chain and includes, but is not limited to, straight and branched chains containing from 1 to 12 carbon atoms, preferably 1 to 6 carbon atoms, unless explicitly specified otherwise. For example, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, i-butyl and t-butyl are encompassed by the term "alkyl." C1-C6 alkyl includes straight and branched chain aliphatic groups having from 1 to 6 carbons. Specifically included within the definition of "alkyl" are those aliphatic hydrocarbon chains that are optionally substituted.

[0046] The carbon number as used in the definitions herein refers to carbon backbone and carbon branching, but does not include carbon atoms of the substituents, such as alkoxy substitutions and the like.

[0047] The term "alkenyl", as used herein, whether used alone or as part of another group, refers to a substituted or unsubstituted aliphatic hydrocarbon chain and includes, but is not limited to, straight and branched chains having 2 to 8 carbon atoms and containing at least one double bond. Preferably, the alkenyl moiety has 1 or 2 double bonds. Such alkenyl moieties may exist in the E or Z conformations and the compounds of this invention include both conformations. C2-C6 alkenyl includes a 1 to 6 carbon straight or branched chain having at least one carbon-carbon double bond. Specifically included within the definition of "alkenyl" are those aliphatic hydrocarbon chains that are optionally substituted. Heteroatoms,

such as O, S or N-R1, attached to an alkenyl should not be attached to a carbon atom that is bonded to a double bond.

[0048] The term "alkynyl" refers to a hydrocarbon moiety containing at least one carbon-carbon triple bond. C2-C6 alkynyl includes a 1 to 6 carbon straight or branched chain having at least one carbon-carbon triple bond.

[0049] The term "cycloalkyl" refers to a monocyclic, bicyclic, tricyclic, fused, bridged, or spiro monovalent saturated hydrocarbon moiety, wherein the carbon atoms are located inside or outside of the ring system. Any suitable ring position of the cycloalkyl moiety may be covalently linked to the defined chemical structure. Examples of cycloalkyl moieties include, but are not limited to, chemical groups such as cyclopropyl, cyclopropylmethyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cyclohexylmethyl, cyclohexylethyl, cycloheptyl, norbornyl, adamantyl, spiro[4.5]decanyl, and homologs, isomers, and the like. C3-C6 cycloalkyl includes monocyclic, saturated rings of 3 to 6 carbons, optionally substituted with R^3, or spiro unsaturated hydrocarbon moiety. Examples are cyclopentane, cyclohexane, and cyclohexadiene.

[0050] The term "cycloalkenyl" refers to a monocyclic, bicyclic, tricyclic, fused, bridged, or spiro monovalent saturated hydrocarbon moiety, wherein the carbon atoms are located inside or outside of the ring system. Any suitable ring position of the cycloalkyl moiety may be covalently linked to the defined chemical structure. Examples of cycloalkyl moieties include, but are not limited to, chemical groups such as cyclopropyl, cyclopropylmethyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cyclohexylmethyl, cyclohexylethyl, cycloheptyl, norbornyl, adamantyl, spiro[4.5]decanyl, and homologs, isomers, and the like. C3-C6 cycloalkyl includes monocyclic, saturated rings of 3 to 6 carbons, optionally substituted with R^3.

[0051] "Aryl" refers to an unsaturated cyclic hycrocarbons with one or more rings, and may be fused with a carbocyclic or heterocyclic ring at any possible position. Aryl compounds generally have molecules with the ring structure characteristic of benzene, naphthalene, or the like.

[0052] "Heteroaryl" refers to a 5 to 6 membered aryl heterocyclic ring which contains from 1 to 3 heteroatoms selected from the group consisting of oxygen, nitrogen, and sulfur atoms in

the ring and may be fused with a carbocyclic or heterocyclic ring at any possible position. Including unsaturated hetrocyclics that are not aromatic, such as theinyl, firyl, pyrrolyl and the like.

[0053] "Heterocycloalkyl" refers to a 5 to 7-membered saturated ring containing carbon atoms and from 1 to 2 heteroatoms selected from N, O, and S.

[0054] The term "phenyl", as used herein, whether used alone or as part of another group, refers to a substituted or unsubstituted phenyl group.

[0055] An optionally substituted moiety may be substituted with one or more substituents. Suitable optionally substituents may be selected independently from H, halogen, C1-C6 alkyl, C2-C6 alkenyl, C2-C6 alkynyl, NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NHSO_2R^4$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, OR^4, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, and CN.

[0056] When such moieties are substituted, for example, they may typically be mono-, di-, tri- or persubstituted. Examples for a halogen substituent include 1-bromo vinyl, 1-fluoro vinyl, 1,2-difluoro vinyl, 2,2-difluorovinyl, 1,2,2-trifluorovinyl, 1,2-dibromo ethane, 1,2 difluoro ethane, 1-fluoro-2-bromo ethane, CF_2CF_3, $CF_2CF_2CF_3$, and the like.

[0057] The term halogen includes bromine, chlorine, fluorine, and iodine.

[0058] For the sake of simplicity, connection points ("-") are not depicted. When an atom or compound is described to define a variable, it is understood that it is intended to replace the variable in a manner to satisfy the valency of the atom or compound. For example, when L is $C(R^3)=C(R^3)$, both carbon atoms form a part of the ring in order to satisfy their respective valences.

[0059] The term "pharmaceutically acceptable salt", as used herein, refers to salts derived form organic and inorganic acids such as, for example, acetic, propionic, lactic, citric, tartaric, succinic, fumaric, maleic, malonic, mandelic, malic, phthalic, hydrochloric, hydrobromic, phosphoric, nitric, sulfuric, methanesulfonic, napthalenesulfonic, benzenesulfonic, toluenesulfonic, camphorsulfonic, and similarly known acceptable acids when a compound of this invention contains a basic moiety. Salts may also be formed from

organic and inorganic bases, preferably alkali metal salts, for example, sodium, lithium, or potassium, when a compound of this invention contains a carboxylate or phenolic moiety, or similar moiety capable of forming base addition salts.

[0060] The term "subject", as used herein, refers to a mammal, preferably a human.

[0061] The terms "administer", "administering", or "administration", as used herein, refer to either directly administering a compound or composition to a patient, or administering a prodrug derivative or analog of the compound to the patient, which will form an equivalent amount of the active compound or substance within the patient's body.

[0062] The term "carrier", as used herein, shall encompass carriers, excipients, and diluents.

[0063] The compounds of this invention may contain an asymmetric carbon atom and some of the compounds of this invention may contain one or more asymmetric centers and may thus give rise to optical isomers and diastereomers. While shown without respect to stereochemistry in formula I, the present invention includes such optical isomers and diastereomers; as well as the racemic and resolved, enantiomerically pure R and S stereoisomers; as well as other mixtures of the R and S stereoisomers and pharmaceutically acceptable salts thereof. Where a stereoisomer is preferred, it may in some embodiments be provided substantially free of the corresponding enantiomer. Thus, an enantiomer substantially free of the corresponding enantiomer refers to a compound that is isolated or separated via separation techniques or prepared free of the corresponding enantiomer. "Substantially free", as used herein, means that the compound is made up of a significantly greater proportion of one stereoisomer, preferably less than about 50%, more preferably less than about 25%, and even more preferably less than about 10% of the corresponding enantiomer.

[0064] The present invention thus provides pharmaceutical compositions comprising at least one biaryl sulfonamide compound and one or more pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or diluents.

[0065] Examples of such carriers are well known to those skilled in the art and are prepared in accordance with acceptable pharmaceutical procedures, such as, for example, those described in Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th edition, ed. Alfonoso R. Gennaro,

Mack Publishing Company, Easton, PA (1985), which is incorporated herein by reference in its entirety. Pharmaceutically acceptable carriers are those that are compatible with the other ingredients in the formulation and biologically acceptable.

[0066] The compounds of this invention may be administered orally or parenterally, alone or in combination with conventional pharmaceutical carriers. Applicable solid carriers can include one or more substances which may also act as flavoring agents, lubricants, solubilizers, suspending agents, fillers, glidants, compression aids, binders or tablet-disintegrating agents or encapsulating materials. They are formulated in conventional manner, for example, in a manner similar to that used for known antihypertensive agents, diuretics and β-blocking agents. Oral formulations containing the active compounds of this invention may comprise any conventionally used oral forms, including tablets, capsules, buccal forms, troches, lozenges and oral liquids, suspensions or solutions. In powders, the carrier is a finely divided solid, which is an admixture with the finely divided active ingredient. In tablets, the active ingredient is mixed with a carrier having the necessary compression properties in suitable proportions and compacted in the shape and size desired. The powders and tablets preferably contain up to 99% of the active ingredient.

[0067] Capsules may contain mixtures of the active compound(s) with inert fillers and/or diluents such as the pharmaceutically acceptable starches (e.g. corn, potato or tapioca starch), sugars, artificial sweetening agents, powdered celluloses, such as crystalline and microcrystalline celluloses, flours, gelatins, gums, and the like.

[0068] Useful tablet formulations may be made by conventional compression, wet granulation or dry granulation methods and utilize pharmaceutically acceptable diluents, binding agents, lubricants, disintegrants, surface modifying agents (including surfactants), suspending or stabilizing agents, including, but not limited to, magnesium stearate, stearic acid, sodium lauryl sulfate, talc, sugars, lactose, dextrin, starch, gelatin, cellulose, methyl cellulose, microcrystalline cellulose, sodium carboxymethyl cellulose, carboxymethylcellulose calcium, polyvinylpyrrolidine, alginic acid, acacia gum, xanthan gum, sodium citrate, complex silicates, calcium carbonate, glycine, sucrose, sorbitol, dicalcium phosphate, calcium sulfate, lactose, kaolin, mannitol, sodium chloride, low melting waxes and ion exchange resins. Preferred surface modifying agents include nonionic and anionic surface modifying agents. Representative examples of surface modifying agents

include, but are not limited to, POLOAXEMER 188, a block copolymer of ethylene glycol and propylene glycol, benzalkonium chloride, calcium stearate, cetostearl alcohol, cetomacrogol emulsifying wax, sorbitan esters, colliodol silicon dioxide, phosphates, sodium dodecylsulfate, magnesium aluminum silicate, and triethanolamine. Oral formulations herein may utilize standard delay or time release formulations to alter the absorption of the active compound(s). The oral formulation may also consist of administering the active ingredient in water or fruit juice, containing appropriate solubilizers or emulisifiers as needed.

[0069] Liquid carriers may be used in preparing solutions, suspensions, emulsions, syrups and elixirs. The active ingredient of this invention can be dissolved or suspended in a pharmaceutically acceptable liquid carrier such as water, an organic solvent, a mixture of both or pharmaceutically acceptable oils or fat. The liquid carrier can contain other suitable pharmaceutical additives such as solubilizers, emulsifiers, buffers, preservatives, sweeteners, flavoring agents, suspending agents, thickening agents, colors, viscosity regulators, stabilizers or osmo-regulators. Suitable examples of liquid carriers for oral and parenteral administration include water (particularly containing additives as above, e.g. cellulose derivatives, preferably sodium carboxymethyl cellulose solution), alcohols (including monohydric alcohols and polyhydric alcohols, e.g. glycols) and their derivatives, and oils (e.g. fractionated coconut oil and arachis oil). For parenteral administration the carrier can also be an oily ester such as ethyl oleate and isopropyl myristate. Sterile liquid carriers are used in sterile liquid form compositions for parenteral administration. The liquid carrier for pressurized compositions can be halogenated hydrocarbon or other pharmaceutically acceptable propellant.

[0070] Liquid pharmaceutical compositions, which are sterile solutions or suspensions, can be utilized by, for example, intramuscular, intraperitoneal or subcutaneous injection. Sterile solutions can also be administered intravenously. Compositions for oral administration may be in either liquid or solid form.

[0071] Preferably the pharmaceutical composition is in unit dosage form, e.g. as tablets, capsules, powders, solutions, suspensions, emulsions, granules, or suppositories. In such form, the composition is sub-divided in unit dose containing appropriate quantities of the active ingredient; the unit dosage forms can be packaged compositions, for example, packeted powders, vials, ampoules, prefilled syringes or sachets containing liquids. The unit

dosage form can be, for example, a capsule or tablet itself, or it can be the appropriate number of any such compositions in package form. Such unit dosage form may contain from about 1 mg/kg to about 250 mg/kg, and may given in a single dose or in two or more divided doses. Such doses may be administered in any manner useful in directing the active compounds herein to the recipient's bloodstream, including orally, via implants, parenterally (including intravenous, intraperitoneal and subcutaneous injections), rectally, vaginally, and transdermally. Such administrations may be carried out using the present compounds, or pharmaceutically acceptable salts thereof, in lotions, creams, foams, patches, suspensions, solutions, and suppositories (rectal and vaginal).

[0072] When administered for the treatment or inhibition of a particular disease state or disorder, it is understood that the effective dosage may vary depending upon the particular compound utilized, the mode of administration, the condition, and severity thereof, of the condition being treated, as well as the various physical factors related to the individual being treated. In therapeutic application, compounds of the present invention are provided to a patient already suffering from a disease in an amount sufficient to cure or at least partially ameliorate the symptoms of the disease and its complications. An amount adequate to accomplish this is defined as a "therapeutically effective amount". The dosage to be used in the treatment of a specific case must be subjectively determined by the attending physician. The variables involved include the specific condition and the size, age and response pattern of the patient.

[0073] In some cases it may be desirable to administer the compounds directly to the airways in the form of an aerosol. For administration by intranasal or intrabrachial inhalation, the compounds of this invention may be formulated into an aqueous or partially aqueous solution.

[0074] The compounds of this invention may be administered parenterally or intraperitoneally. Solutions or suspensions of these active compounds as a free base or pharmaceutically acceptable salt may be prepared in water suitably mixed with a surfactant such as hydroxyl-propylcellulose. Dispersions may also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols and mixtures thereof in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to inhibit the growth of microorganisms.

[0075] The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases, the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (e.g., glycerol, propylene glycol and liquid polyethylene glycol), suitable mixtures thereof, and vegetable oils.

[0076] The compounds of this invention can be administered transdermally through the use of a transdermal patch. For the purposes of this disclosure, transdermal administrations are understood to include all administrations across the surface of the body and the inner linings of bodily passages including epithelial and mucosal tissues. Such administrations may be carried out using the present compounds, or pharmaceutically acceptable salts thereof, in lotions, creams, foams, patches, suspensions, solutions, and suppositories (rectal and vaginal).

[0077] Transdermal administration may be accomplished through the use of a transdermal patch containing the active compound and a carrier that is inert to the active compound, is non-toxic to the skin, and allows delivery of the agent for systemic absorption into the blood stream via the skin. The carrier may take any number of forms such as creams and ointments, pastes, gels and occlusive devices. The creams and ointments may be viscous liquid or semisolid emulsions of either the oil-in-water or water-in-oil type. Pastes comprised of absorptive powders dispersed in petroleum or hydrophilic petroleum containing the active ingredient may also be suitable. A variety of occlusive devices may be used to release the active ingredient into the blood stream, such as a semi-permeable membrane covering a reservoir containing the active ingredient with or without a carrier, or a matrix containing the active ingredient. Other occlusive devices are known in the literature.

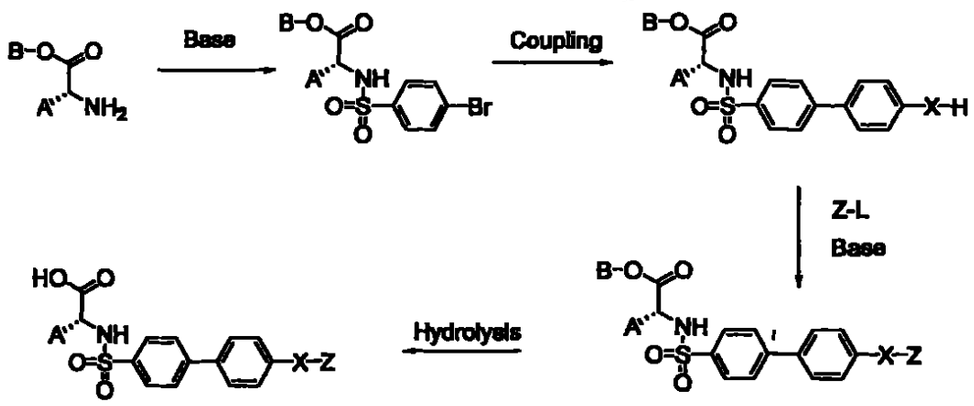
[0078] The compounds of this invention may be administered rectally or vaginally in the form of a conventional suppository. Suppository formulations may be made from traditional materials, including cocoa butter, with or without the addition of waxes to alter the suppository's melting point, and glycerin. Water soluble suppository bases, such as polyethylene glycols of various molecular weights, may also be used.

[0079] In certain embodiments, the present invention is directed to prodrugs of biaryl sulfonamide compounds. Various forms of prodrugs are known in the art, for example, as discussed in, for example, Bundgaard, (ed.), Design of Prodrugs, Elsevier (1985); Widder, et al. (ed.), Methods in Enzymology, vol. 4, Academic Press (1985); Krogsgaard-Larsen, et al. (ed.), "Design and Application of Prodrugs", Textbook of Drug Design and Development, Chapter 5, 113-191 (1991), Bundgaard, et al., Journal of Drug Deliver reviews, 8:1-38 (1992), Bundgaard, J. of Pharmaceutical Sciences, 77:285 et seq. (1988); and Higuchi and Stella (eds.) Prodrugs as Novel Drug Delivery Systems, American Chemical Society (1975), each of which is incorporated by reference in its entirety.

[0080] It is understood that the dosage, regimen and mode of administration of the compounds of the invention will vary according to the malady and the individual being treated and will be subject to the judgment of the medical practitioner involved. It is preferred that the administration of one or more of the compounds herein begin at a low dose and be increased until the desired effects are achieved.

[0081] The compounds of the current invention were prepared according to the following general synthetic scheme from commercially available starting materials, materials prepared as described in literature procedures, or new intermediates described in the schemes and experimental procedures. This general scheme covers most of the examples. For more detailed information, please refer to the schemes in the Examples section below.

General Synthetic Scheme

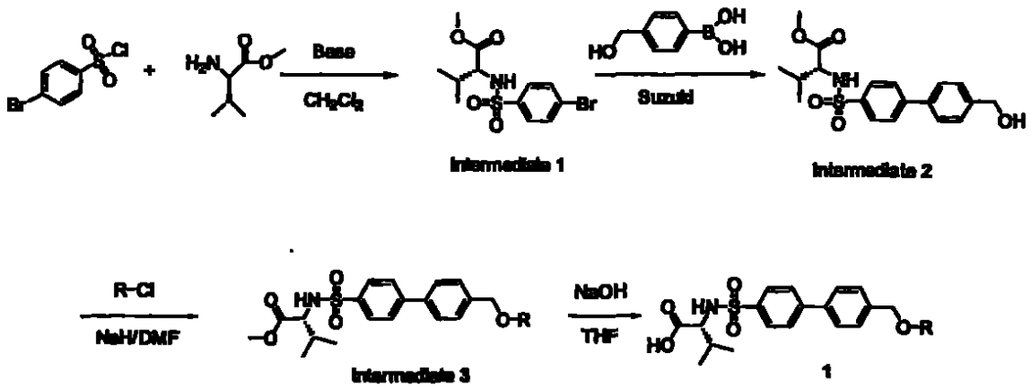


[0082] Bases used here are triethylamine, potassium carbonate, NaH, Hunig base, etc. Coupling was generally concluded by Suzuki coupling or Stille coupling. Hydrolysis was carried out using TFA, NaOH, LiOH, K_2CO3, etc.

[0083] More specific synthetic routes to many of the compounds of the invention are included in the following Schemes. It is understood by those skilled in the art that protection and deprotection steps not shown in the Schemes may be required for these syntheses, and that the order of steps may be changed to accommodate functionality in the target molecules.

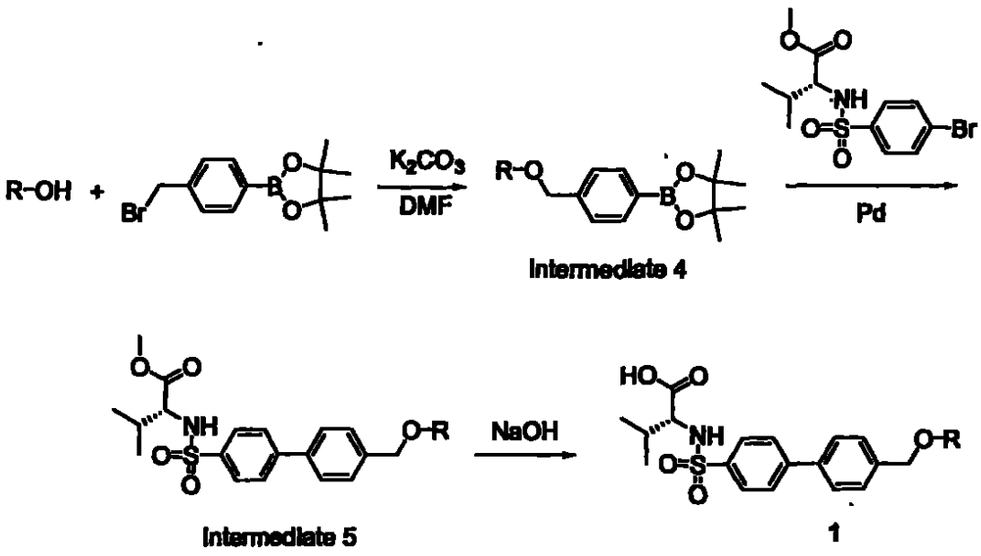
[0084] In Scheme 1 the compounds of the invention, 1, are prepared in 4 steps. Sulfonylation of valine methyl ester with 4-bromo-benzenesulfonyl chloride was carried out in the presence of Hunig base to give sulfonamide Intermediate 1. This 4-bromo-benzenesulfonamide was furthered coupled with boronate ester using Palladium catalyst under Suzuki coupling condition to provide biphenyl sulfonamide Intermediate 2. Biphenyl sulfonamide Intermediate 2 was then alkylated with various alkylating reagents to provide biphenyl sulfonamide ester (Intermediate 3). Hydrolysis of Intermediate 3 was carried out using bases such as NaOH, or LiOH to form the final product 1.

Scheme 1



[0085] An alternative route to compounds 1 is shown in Scheme 2. Phenol derivative was converted to pinacolborane (Intermediate 4) under basic condition in DMF. Pinacolborane was then coupled with 4-bromo-benzenesulfonamide under Suzuki condition to provide biphenyl sulfonamide Intermediate 5, which was hydrolyzed to final product under basic conditions.

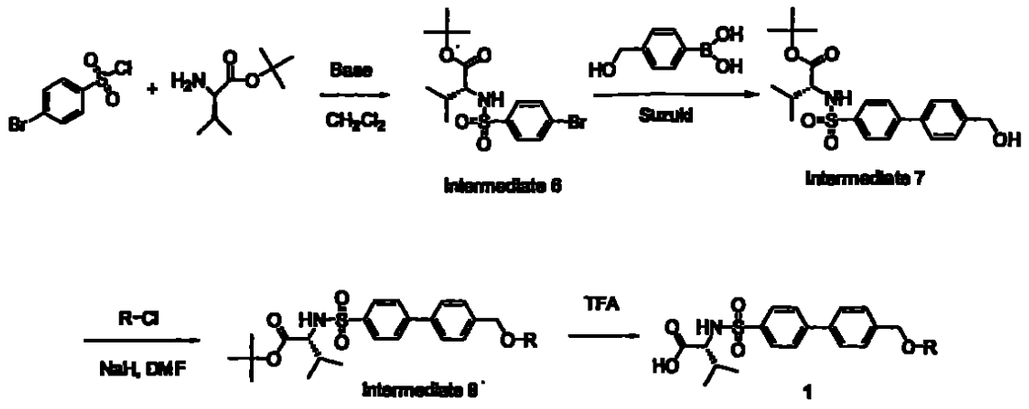
Scheme 2



[0086] A third option to make compounds of the invention, 1, are carried out based on Scheme 3. The synthetic sequence in Scheme 3 is similar to that in Scheme 1 but using a

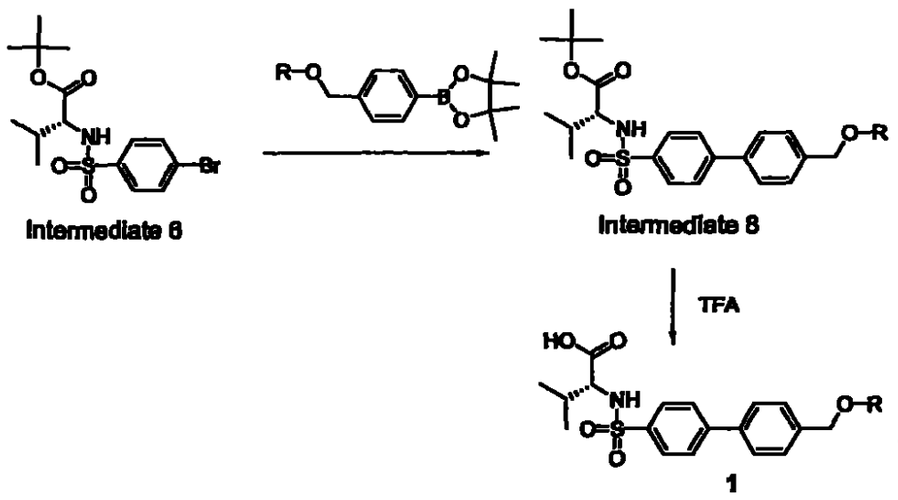
different starting material, valine tert-butyl ester. Therefore, thefinal step to form the product 1 was carried out by using TFA to deprotect the tert-butyl ester group of Intermediate 8.

Scheme 3



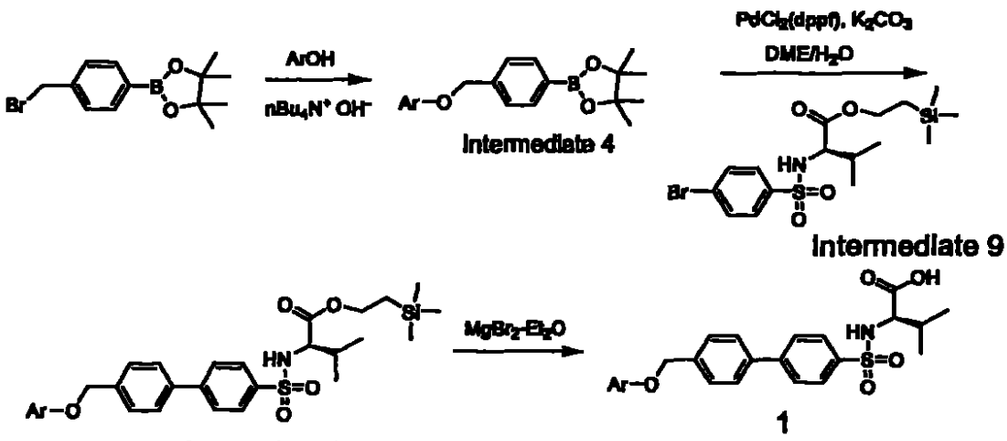
[0087] A slight modification of Scheme 3 can be made to produce the compounds of invention 1. This is illustrated in Scheme 4A. In this case, boronate esters with suitable ether moiety are purchased from a commercial source and used for Suzuki coupling to provide Intermediate 8. TFA deprotection of tert-butyl ester from Intermediate 8 resulted the desired final product 1.

Scheme 4A



[0088] Compounds of the invention 1, can also be made by hydrolysis of a suitable ester, such as Intermediate 10.

Scheme 4B



[0089] Scheme 4B features an alkylation, a Suzuki coupling and a deprotection step as follows.

[0090] *Alkylation*: The phenol derivative (4.14 mmol) is dissolved in methanol (6 mL) and treated with tetrabutylammonium hydroxide (4.14 mmol.) The mixture is stirred for 10

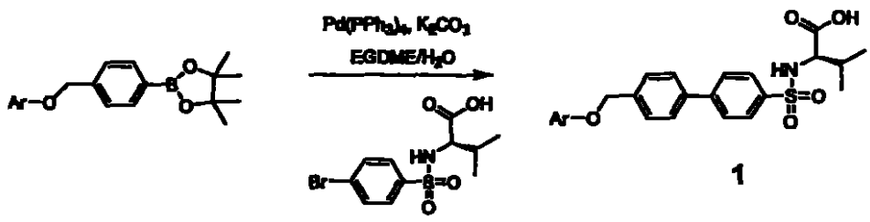
minutes, and the solvent is removed under reduced pressure. The residue is dissolved in THF (10 mL) and treated with a solution of the benzylic bromide (4.14 mmol) in THF (5 mL.) The reaction is stirred at room temperature overnight. The solvent is removed under reduced pressure and redissolved in dichloromethane (5 mL) and ether (50 mL.) The organic solution is washed with water (4 X 50 mL) and saturated sodium chloride solution (50 mL,) and dried over magnesium sulfate. The organic solution is filtered and concentrated under reduced pressure. The crude material is purified by flash silica gel chromatography to yield the purified product in 53% yield, which is Intermediate 4 a boronate ester.

[0091] *Suzuki Coupling*: The boronate ester (1.07 mmol) and aryl bromide (1.07 mmol) are dissolved in ethylene glycol dimethyl ether (10 mL) and the resulting solution is treated with tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.054 mmol.) A solution of potassium carbonate (2.14 mmol) in water (3.5 mL) is added, and the reaction is heated to reflux for 1 h. The reaction is cooled, filtered to remove solids, diluted with water (10 mL) and concentrated under reduced pressure. The residue is extracted with dichloromethane (3 X 25 mL) and the organic layers are washed with water (25 mL) and saturated sodium chloride solution (25 mL). The organic solution is dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by flash silica gel chromatography furnishes the product Intermediate 10, a (triemthylsilyl)ethyl ester of the desired product, in 57% yield. In some cases, PdCl2(dppf) was used as the catalyst instead of tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0).

[0092] *Deprotection with $MgBr_2$*: The 2-(trimethylsilyl)ethyl ester (0.0621 mmol) is dissolved in dichloromethane (58 mL) and treated with magnesium bromide etherate (0.186 mmol). The mixture is stirred vigorously overnight or until reaction is complete and then shaken with 10% HCl (3 X 25 mL) and saturated sodium chloride solution (25 mL). The organic solution is then dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to yield the product in 95% yield. The crude product could be purified by HPLC when required.

[0093] As shown in Scheme 4C Suzuki coupling can be carried out on free acid with boronate ester. Therefore, hydrolysis of the esters (as in Intermediate 10) is avoided. This results in direct preparation of compounds 1.

Scheme 4C

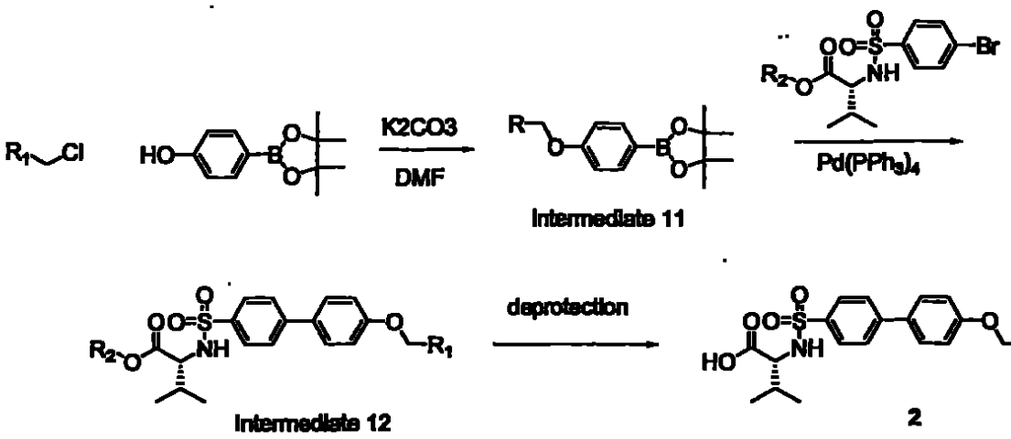


[0094] Suzuki coupling with free acid: The boronate ester (1.36 mmol) and bromoacid (1.36 mmol) are dissolved in ethylene glycol dimethyl ether (13.8 mL) and the resulting solution is treated with tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.068 mmol). After stirring at room temperature for 10 minutes, a solution of potassium carbonate (4.08 mmol) in water (4.8 mL) are added. The solution is heated to reflux for 2h, and then allowed to cool to room temperature overnight. The mixture is concentrated to an aqueous residue under reduced pressure and ethyl acetate (50 mL) is added. The organic mixture is washed with 10% HCl (2 X 25 mL) and saturated sodium chloride (25 mL). The organic solution is dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated to a crude residue, which is purified using flash silica gel chromatography to obtain the product in 64% yield.

[0095] In Scheme 5 the compounds of the invention, 2, are prepared in 3 steps. Boronate ester (Intermediate 11) is prepared by alkylation under basic condition. Intermediate 11 thus obtained can be easily coupled with 4-bromo-benzenesulfonamide derivative to provide biphenyl sulfonamide analog (Intermediate 12).

[0096] The ester functional group in Intermediate 12 can be hydrolyzed under various conditions to yield the desired biphenyl sulfonamide product 2.

Scheme 5



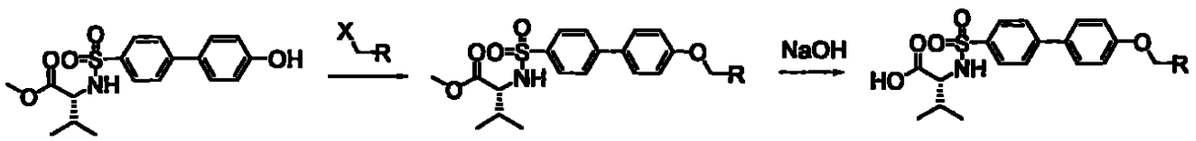
Intermediate 11

Intermediate 12

2

[0097] Alternate route to provide compounds, 2, is shown in Scheme 6. Starting material 4-hydroxybiphenyl sulfonamide derivative was readily available through Suzuki coupling. Alkylation of 4-hydroxybiphenyl sulfonamide under basic condition provides biphenyl sulfonamide ester Intermediate 13 with an ether linker. Hydrolysis of ester (Intermediate 13) using aqueous NaOH provides the desired product of the invention, 2.

Scheme 6



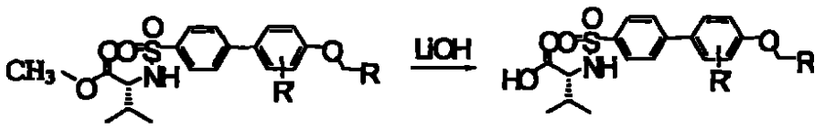
Intermediate 13

2

Deprotection of esters, such as methyl esters, shown in Scheme 6 can be conducted employing the routn shown in Scheme 6A.

Scheme 6A

Deprotection of Methyl esters:

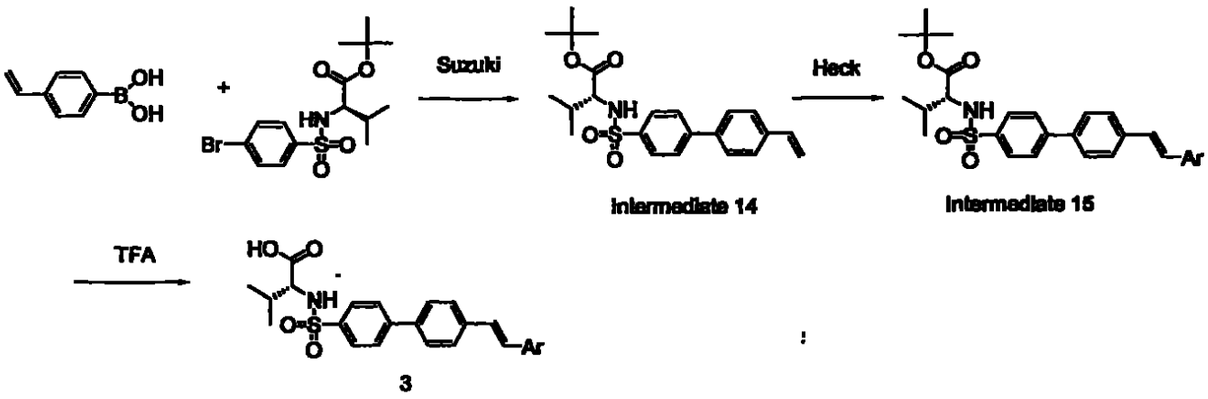


Intermediate 13A

[0098] Intermediate 13A methyl ester, (0.294mmol) was dissolved in THF:MeOH (2:1)(2mL) and 1M LiOH (0.881mmol) was added. The reaction mix was stirred for 3 days. The solvent was removed and the remaining white solid was dissolved in H_2O. The H_2O was extracted with ether. The ether layer was removed and the aqueous layer was acidified to pH 2 with HCl (conc.) forming a cloudy solution. This solution was extracted with CH_2Cl_2. The resulting aqueous layer was removed and the remaining organic layer was washed with brine. The solvent was removed and the remaining solid was dissolved in minimal CH_2Cl_2 and then hexane was added thus precipitating a white solid. The solid was filtered and dried at reduced pressure to provide the desired product.

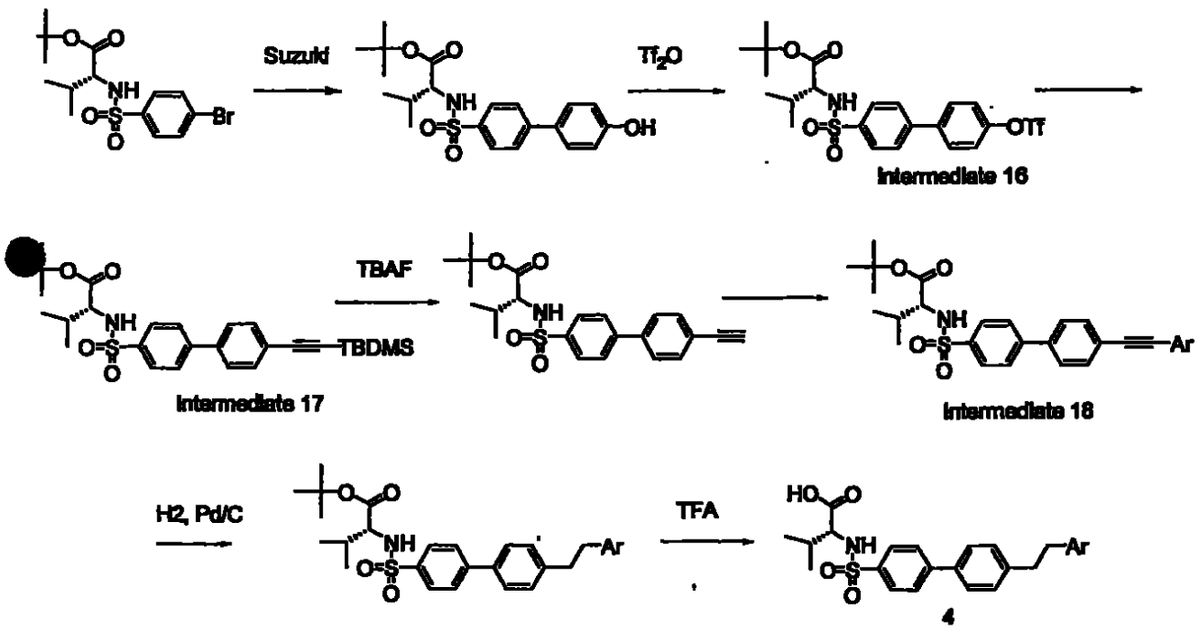
[0099] Compounds of the invention, 3, are prepared based on Synthesis Scheme 7. 4-Vinylphenylboronic acid and 4-bromobenzene sulfonamide derivative were reacted via Suzuki coupling catalyzed by palladium catalyst to provide Intermediate 14. Heck reaction of Intermediate 14 with aryl halide generated Intermediate 15. Intermediate 15 is a biphenyl sulfonamide derivative with a double bond as a linker connected to an aryl ring. Regular TFA deprotection of the tert-butyl ester of Intermediate 15 provides desired product 3 in high yield.

Scheme 7



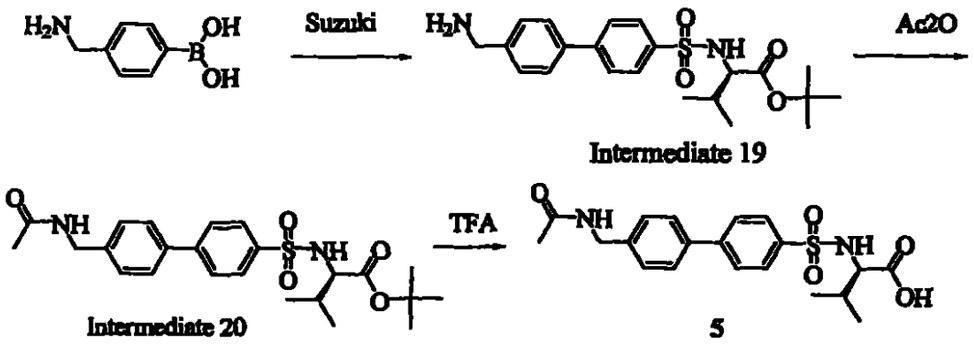
[00100] Scheme 8 shows the a multiple step synthesis leading to the compounds of invention, 4. A regular Suzuki coupling followed by the alkylation with triflic anhydride furnishes triflate Intermediate 16. Triflate Intermediate 16 was converted into alkynylation product 17 through a Sonagoshira reaction. TBDMS protecting group in 17 was removed by TBAF followed by another Sonagoshira reaction to provide Intermediate 18 with a triple bond linking the biphenyl group with aryl moiety. Intermediate 18 was then reduced by hydrogenation then TFA deprotection removed the ester group to give the desired product 4.

Scheme 8



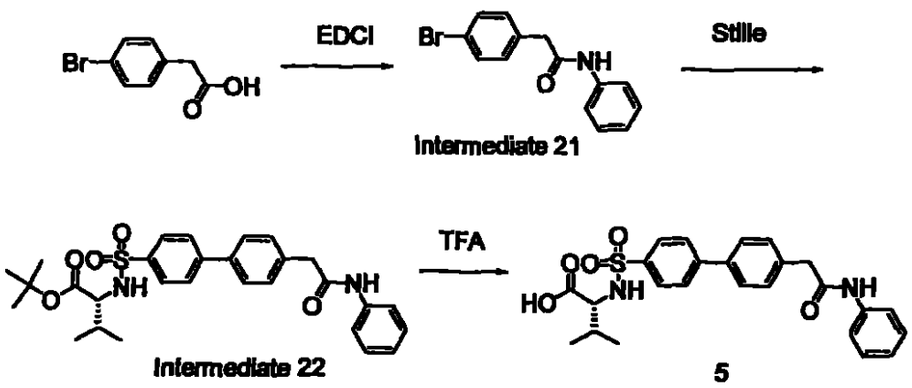
[00101] Routes to compounds of structure 5 are shown in Scheme 9. 4-aminomethyl phenyl boronic acid was used for Suzuki coupling to produce the Intermediate 19. Acylation of Intermediate 19 with acetic anhydride, followed by the TFA deprotection provided compounds with structure 5.

Scheme 9



[00102] An alternate route to make structures of 5 is presented in Scheme 10. Intermediate 21 was formed by EDCL coupling of 4-bromophenylacetic acid with phenylamine in DMF. Stille coupling of Intermediate 21 with corresponding tin reagent followed by TFA deprotection provided product 5.

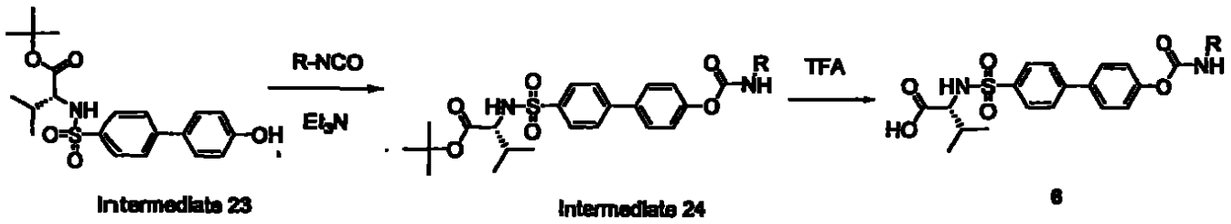
Scheme 10



[00103] In Scheme 11 the compounds of the invention, 6, are prepared by reacting 4-hydroxybiphenyl sulfonamide derivative with an isocyanate in the presence of triethylamine.

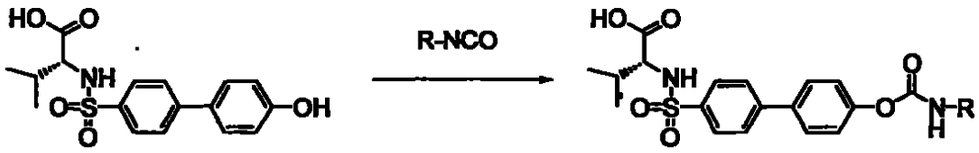
Carbamate (Intermediate 24) thus obtained was treated with TFA to remove the tert-butyl ester protectin group to provide compounds 6.

Scheme 11



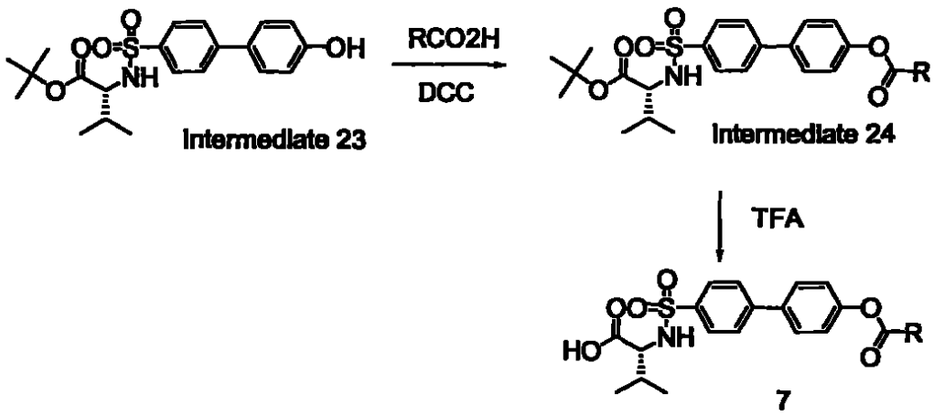
[00104] An alternate route to make compounds 6 is shown in Scheme 12 using 4-hydroxybiphenyl sulfonamide free acid to react with isocyanate in the presence of triethylamine. Compounds 6 are obtained thereby directly, without a deprotection step.

Scheme 12



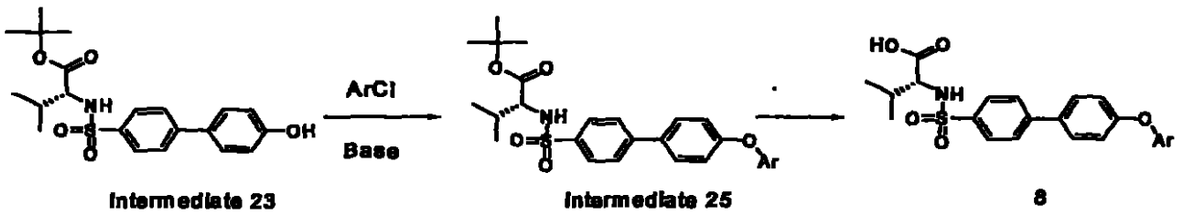
[00105] Routes to compounds of structure 7 are shown in Scheme 13. Intermediate 23 was coupled with carboxylic acid using DCC reagent to provide ester 24. Intermediate 24 was treated with TFA to selectively remove the tert-butyl group to provide compound 7.

Scheme 13



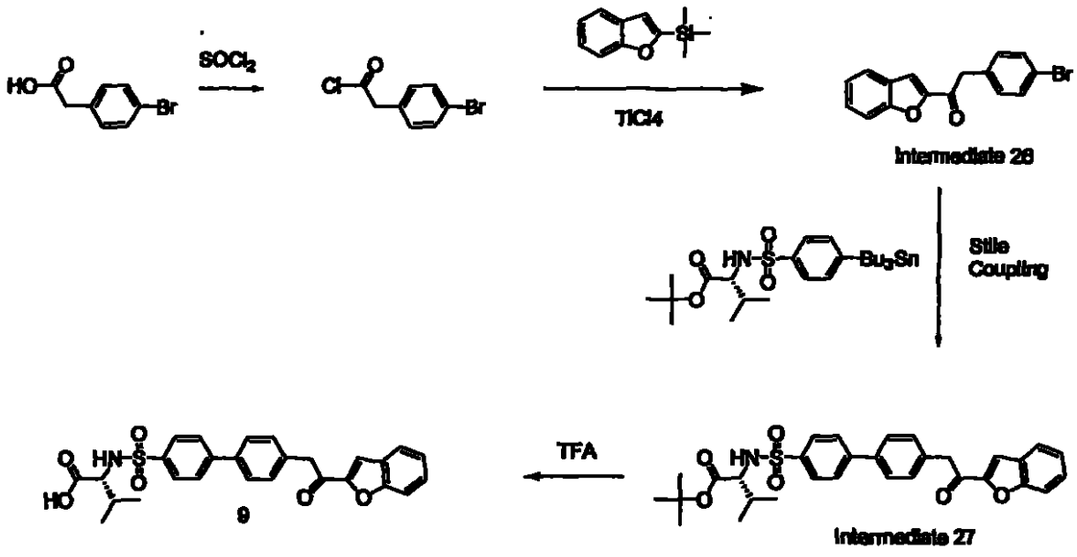
[00106] In Scheme 14, the compounds of the invention, 8, are prepared from Intermediate 23 by alkylation followed by the deprotection (removal of protectin tert-butyl group) with TFA.

Scheme 14



[00107] In Scheme 15 the compounds of the invention, 9, are prepared in a multiple step synthesis. Intermediate 26 was prepared based on known literature procedure. Stille coupling followed by TFA deprotection provided the desired product 9.

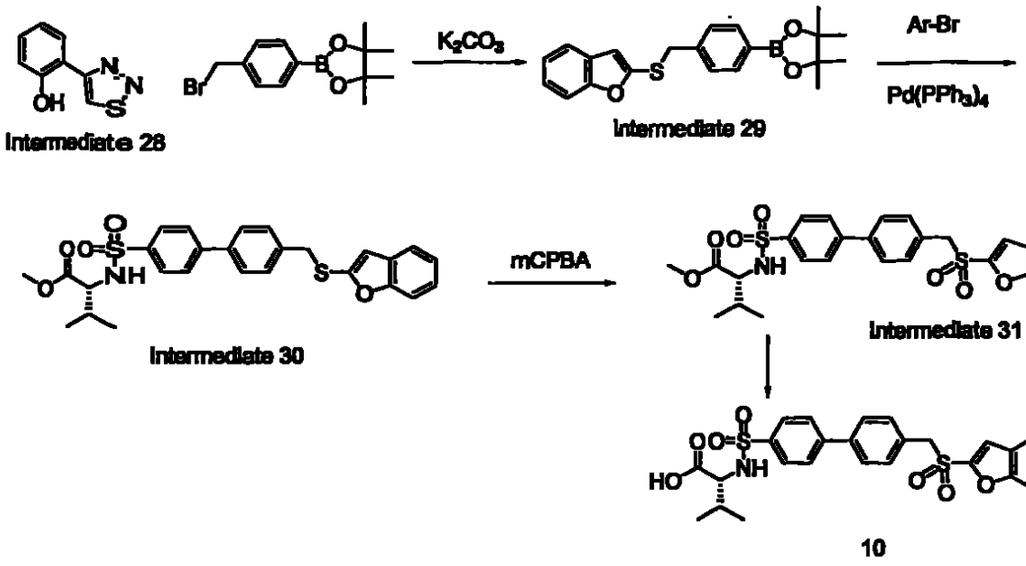
Scheme 15



[00108] Routes to compounds of structure 10 are shown in Scheme 16. Intermediate 28 (2-[1,2,3]thiazol-4-yl-phenol) was prepared according to literature procedure. Alkylation with benzyl bromide derivative followed by condensation resulted in thioether intermediate 29.

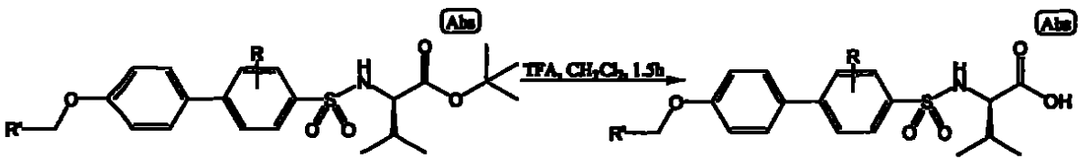
Suzuki coupling of 29 with 4-bromobenzene sulfonamide generated Intermediate 30. Oxidation with mCPBA followed by hydrolysis provided compound 10.

Scheme 16



Removal of t-butyl ester protecting group with TFA

Scheme 17



[00109] The t-butyl ester protected biphenylsulfonamide (0.505mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (2.5mL). TFA (2.5mL) was dissolved in CH_2Cl_2 (2.5mL), and this was slowly added to the dissolved ester and stirred for 1.5h. The solvent was removed at reduced pressure and the remaining oil dissolved in toluene, and the toluene removed. Finally, the oil was dissolved in a minimal amount of CH_2Cl_2 and hexane was added to precipitate a white solid. Solvent was removed at reduced pressure, and, after vacuum pump drying, a solid dried to give a 98% yield.

[00110] The present invention further relates to methods of identifying agents useful for the treatment of osteoarthritis. The methods of identifying agents useful for the treatment of osteoarthritis comprise determining whether a particular agent has ADAMTS-5-specific aggrecanase inhibitory activity. The methods may also comprise using ADAMTS-5 transgenic animals to determine whether a potential agent useful for the treatment of osteoarthritis is effective in an animal having ADAMTS-5 activity but is not effective in an animal not exhibiting ADAMTS-5 activity.

[00111] As further described in the Examples below, the ADAMTS-5 gene allele is functionally disrupted in a cell by homozygous recombination between the allele and a mutant ADAMTS-5 gene, or a portion thereof. The cell can be a differentiated cell type that normally expresses ADAMTS-5, such as a macrophage or monocyte, or a macrophage-like or monocyte-like cell line. Alternatively, the cell can be a pluripotent progenitor cell that can develop into an animal, such as an embryonic stem cell. In a preferred embodiment, an embryonic stem cell is used. The embryonic stem cell can be introduced into a blastocyst and the blastocyst introduced into a pseudopregnant animal to produce an animal having somatic and germ cells in which an ADAMTS-5 gene allele is functionally disrupted. Such an animal is a "homologous recombinant" animal. A preferred homologous recombinant animal of the invention is a mouse. Mice are a preferred animal because they are more easily utilized for laboratory studies and because they provide an art recognized model, as further described in the Examples below. However, any animal may be used, including, but not limited to, pigs, cows, sheep, goats, and other animals. In a particularly preferred embodiment, the animal is an inbred mouse.

[00112] To create a homologous recombinant cell or animal, a targeting vector can be prepared which contains DNA encoding an ADAMTS-5 protein, or a portion thereof, having a mutation introduced therein. The targeting vector may include a nonhomologous ADAMTS-5 replacement portion, which preferably includes Cre/Lox-P sites; a first homology region located upstream of the nonhomologous portion which has substantial identity to a first ADAMTS-5 gene sequence; and a second homology region located downstream of the nonhomologous portion which has substantial identity to a second ADAMTS-5 gene sequence. As used herein, "substantial identity" is intended to describe a nucleotide sequence having sufficient homology to an ADAMTS-5 gene to allow for

homologous recombination between the nucleotide sequence and an endogenous sequence to allow for homologous recombination between the nucleotide sequence and the endogenous ADAMTS sequence in a host cell. Typically, the nucleotide sequences of the flanking homology regions are from about 80% to about 100% identical to the endogenous sequences. In a particularly preferred embodiment, they are 100% identical. The homology regions are also of sufficient length to allow for homologous recombination with the endogenous gene in a host cell, i.e., at least 1 kilobase in length, and more preferably at least several kilobases in length.

[00113] The targeting vector may further include positive and negative selection cassettes. These cassettes include nucleotide sequences encoding positive and negative selection markers operatively linked to regulatory elements that control expression of the selection marker.

[00114] To functionally disrupt an endogenous ADAMTS-5 gene allele in a host cell, a targeting vector is introduced into the host cell, e.g., a differentiated cell or an embryonic stem cell. The targeting vector may be introduced into the cell by any technique known in the art, including, but not limited to, calcium phosphate precipitation, DEAE-dextran transfection, microinjection, lipofection, electroporation and the like. After introduction of the vector into the host cell, the cell is cultured for a period of time and under conditions sufficient to allow for homologous recombination between the introduced targeting vector and the endogenous ADAMTS-5 gene. Host cells are selected (e.g. by positive and/or negative selection) and screened for homologous recombination at the endogenous ADAMTS-5 gene locus by standard techniques known in the art (e.g. Southern hybridizations or PCR using probes/primers which distinguish the normal endogenous allele from the homologous recombinant allele.)

[00115] To create a homologous recombinant animal, an embryonic cell having at least one ADAMTS-5 gene allele functionally disrupted is introduced into a blastocyst, the blastocyst is implanted into a pseudopregnant foster mother, and the embryo is allowed to develop to term. The resultant animal is a chimera having cells descendent from the embryonic stem cell. Chimeric animals in which the embryonic stem cell has contributed to the germ cells of the animal can be mated with WT animals to produce animals heterozygous for the ADAMTS-5 gene disruption in all somatic and germ cells. The heterozygous animals can

then be mated to create animals homozygous for the ADAMTS-5 gene disruption (i.e. having both ADAMTS-5 gene alleles functionally disrupted). Any sort of mutation may be introduced into a transgenic animal, including null mutations and point mutations. A point mutation may result in normal expression of the ADAMTS-5 gene product but the product may have aberrant activity, e.g. it may not have aggrecanase activity.

[00116] In addition, cells from the animal homozygous for the ADAMTS-5 gene disruption can be isolated from the animals and cultured *in vitro* for various studies, including for screening assays.

[00117] ADAMTS-5 transgenic animals and cells derived therefrom are useful as positive controls by which to evaluate the efficacy of ADAMTS-5 inhibitors. The homozygous and heterozygous animals provide such standards. In a screening assay to identify and assess the efficacy of ADAMTS-5 inhibitors, a WT animal (or cells derived therefrom) not treated with inhibitor is used as the 0% inhibition standard, an animal homozygous for an ADAMTS-5 disruption is used as the 100% inhibition standard, while an animal heterozygous for an ADAMTS-5 gene disruption is used as standard for less than 100% inhibition but more than 0% inhibition. The amount of ADAMTS-5 activity in a subject treated with an ADAMTS-5 inhibitor is then assessed relative to these standards. The inhibition may be measured by the % inhibition of aggrecanase activity or the % reduction in osteoarthritic symptoms.

[00118] The transgenic animals and cells derived therefrom also can be used to screen ADAMTS-5 inhibitors for side effects or toxicity resulting from the inhibitor's action on a target(s) other than ADAMTS-5 (e.g. ADAMTS-5 isoforms or ADAMTS-4). For example, an ADAMTS-5 inhibitor may be administered to an ADAMTS-5 animal of the invention to evaluate side effects or toxicity of the inhibitor. Because the ADAMTS-5 transgenic animal lacks the normal target for the inhibitor, an effect observed upon administration of the inhibitor to the ADAMTS-5 null mutant can be attributed to a side effect of the ADAMTS-5 inhibitor on other target(s). Accordingly, ADAMTS-5 transgenic animals are useful for distinguishing these side effects from the direct effects of the inhibitor on ADAMTS-5 activity.

[00119] The transgenic animals may also be used for *in vivo* screening assays to identify diseases in which ADAMTS-5 plays a role in the pathogenesis of the disease condition. Such

screening assays are further useful for identifying other diseases that may be treated with ADAMTS-5 inhibitors. For example, the transgenic animals may be useful in evaluating the role of ADAMTS-5 in other disorders in which extracellular protein degradation or destruction occurs, such as cancer, asthma, chronic obstructive pulmonary disease ("CODP"), atherosclerosis, age-related macular degeneration, myocardial infarction, corneal ulceration and other ocular surface diseases, hepatitis, aortic aneurysms, tendonitis, central nervous system diseases, abnormal would healing, angiogenesis, restenosis, cirrhosis, multiple sclerosis, glomerulonephritis, graft versus host disease, diabetes, inflammatory bowel disease, shock, invertebral disc degeneration, stroke, osteopenia, rheumatoid arthritis and other forms of arthritis, and periodontal disease. A stimulus may be administered to the transgenic animals of the invention to induce the disease condition, as further described below in the Examples for osteoarthritis. Alternatively the transgenic animals of the invention may be bred with an animal genetically prone to a particular disease. Following induction of the disease in the ADAMTS-4 or ADAMTS-5 null mutant animal, the susceptibility or resistance of the animal to the disease condition is determined. Resistance of the animal to the disease condition, relative to WT, is indicative that the pathology of the disease condition involves the action of ADAMTS-4 or ADAMTS-5, and thus the disease condition is treatable with an inhibitor of ADAMTS-4 or ADAMTS-5, respectively. As an example of this utility, Example 1 below and Figure 3A and Figure 3B demonstrate that homozygous and heterozygous ADAMTS-5 transgenic animals are resistant to induced osteoarthritis.

[00120] ADAMTS-5 transgenic animals homozygous ADAMTS-5 null mutation, or a cell derived therefrom, can be reconstituted with a human equivalent of the gene to create a nonhuman cell or animal that expresses a human ADAMTS-5 gene product. These cells and animals can be used to screen compounds to identify agents that inhibit the activity of human ADAMTS-5, either in cultured cells or *in vivo*. Such animals and cells can be made by techniques well known to the skilled artisan. A nonhuman animal having cells expressing human ADAMTS-5 polypeptide, and/or cells derived therefrom, can be used to screen and identify agents that can inhibit human ADAMTS-5 *in vivo*.

[00121] ADAMTS-5 transgenic animals are also useful to determine whether a particular substance is a substrate for ADAMTS-5. ADAMTS-5 are metalloproteinases having aggrecanase activity. To assess whether a precursor form of a putative substrate is cleaved by

ADAMTS-5, the presence or absence of cleaved product in the ADAMTS-5 animals may be assessed. The cleaved product will be substantially reduced or absent in the transgenic animals.

[00122] The following examples are offered to illustrate, but not to limit the present invention.

EXAMPLES

Example 1: Materials and Methods

Generation of ADAMTS5 KO mice

[00123] ADAMTS-5 KO mice used in these studies were generated from inbred 129SvEv-Brd mice carrying a Cre/LoxP type conditional KO allele of the ADAMTS5 gene (Lexicon Genetics, The Woodlands, TX). The conditional allele contained LoxP sites flanking exon 3 so that Cre recombination resulted in deletion of exon 3, which encodes the majority of the enzyme active site, as shown in Figure 1A.

[00124] Mice carrying the ADAMTS-5 conditional KO allele were created by homologous recombination in ES cells followed by blastocyst injection to generate chimeric mice. The ADAMTS-5 KO mouse line was produced by crossing conditional KO mice with Protamine-Cre transgenic mice (provided by Lexicon Genetics) which resulted in Cre mediated deletion of exon 3 in the sperm of male offspring carrying both the mutant ADAMTS-5 and Prot-Cre alleles, as shown in Figure 1B.

Genotyping for ADAMTS5 WT, conditional KO and KO alleles

[00125] Genotyping for alleles of the ADAMTS-5 gene was performed by PCR using DNA template from crude proteinase K digest of tail biopsies. The wild type and heterozygous KO alleles were identified by PCR using a forward primer of the sequence (5'TGT TCA CCC AAA GCA ACT AC3') (primer 1) and a reverse primer of the sequence (5'TAG AGG AGA GGA GAG GAG G3') (primer 2). These primers flanked the insertion site of the (5') LoxP site producing a 230 bp amplicon in the WT and heterozygous animals and no amplicon in the KO animals (Figure 1B, C). The knockout allele was identified using the forward primer (5'GTG AAC CAC ATG GAC TTT GG3') (primer 3) and the reverse primer (5'TCG TAG

CAA ACA CCC ACC TG3') (primer 4) resulting in a 500 bp PCR product of the exon 3 deleted (KO) allele (figure 1B,C).

Preparation of RNA for RT-PCR:

[00126] Total RNA was prepared from WT and KO mice spleen using the RNAeasy kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. The quality of the RNA samples were confirmed in an RNA 6000 Nano assay using a Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). PCR primers were designed and synthesized (BioSource International, Camarillo, CA) as follows:
Primer 5, 5'CGACCCTCAAGAACTTTTGC3'; SEQ ID NO:4
Primer 6, 5'CTCAGGCCCAAATGTCAAGT3'; SEQ ID NO:5
Primer 7, 5'CGTCATGAGAAAGGCCAAGT3'; SEQ ID NO:6.
RT-PCR was performed by using Qiagen OneStep RT-PCR kit with a 600 nM concentration of each primer and 200 ng of total RNA in a DNA Engine Dyad thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA). The RT-PCR was run for 30 min at 50°C, 15 min at 95°C, and 35 cycles of 15 seconds at 95°C, 1 min at 59°C, and 30 seconds at 72°C. The RT-PCR primers are shown in Figure 1D and the RT-PCR products are shown in Figures 1E and 1F. Using primers 5 and 6, Figure 1E shows that the mRNA of the WT is 506 bp and the KO is 338 bp. Using primers 5, 4 and 7, Figure 1F shows that the mRNA of the WT is 258 bp and there is no product, as expected, in the KO because primer 7 is located in exon 3 which is deleted in the KO.

Histology and pathologic assessment of young and aged mice:
[00127] Complete necropsies were performed on 22 WT and 20 ADAMTS-5 KO males at 18 weeks of age. Necropsies included macroscopic observations, body and organ weights, hematology, complete serum chemistry and microscopic examination of brain, joints, heart, lungs, thymus, spleen, liver, kidneys, salivary glands, mandibular lymph nodes, testes, epididymides, eyes, harderian glands, lacrimal glands, sternum, and humerus. All tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin, decalcified if mineralized, routinely processed, paraffin-embedded and prepared as routine hematoxylin and eosin-stained sections. All slides were evaluated by a board-certified veterinary pathologist (BS) for presence or absence of pathologic lesions.

Surgical induction of osteoarthritis:

[00128] All studies were performed with approval of the Wyeth Institutional Animal Care and Use committee. Surgical induction of osteoarthritis in mice is an art recognized model for the study of osteoarthritis. Accordingly, ten week old mice were anesthetized with 250 mg/kg intraperitoneal tribromoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and knees were prepared for aseptic surgery. A medial para-patellar incision was made to expose and transect the meniscotibial ligament (anchoring the medial meniscus to the tibial plateau), resulting in destabilization of the medial meniscus (DMM). The joint capsule and subcutaneous layer were sutured closed with 8-0 and 9-0 Vicryl (Ethicon, Inc. Somerville, NJ) respectively, and the skin closed with Nexaband®S/C tissue adhesive (Abbott Laboratories, North Chicago, IL). Buprenorphine (Buprenex, Reckitt and Coleman Products, Hull, England) was provided at 0.03 mg/kg pre- and post-operatively. Four weeks after DMM surgery, 19 WT and 19 KO mice were sacrificed by carbon dioxide. Eight weeks after surgery, 33 WT, 20 heterozygous, and 28 homozygous KO mice were sacrificed. A small subset of animals underwent sham surgery to determine the effect of inflammation secondary to arthrotomy on disease progression. Histologic scores of animals 4 or 8 weeks following sham surgery were not statistically different than animals that did not undergo any surgery.

Assessment of progression and severity of osteoarthritis:

[00129] Intact knee joints were placed into 4% paraformaldehyde for 24 hours, then decalcified in 20% EDTA for 5 days. Joints were embedded in paraffin and 6 μm frontal sections taken through the entire joint. Slides were stained with Safranin-O/Fast green and graded at 70 μm intervals through the joint by three blinded, independent scorers. The semi-quantitative scoring system was modified from Chambers et al. (Chambers et al, 2001, *Arthritis & Rhuem* 44:1455) where 0 represents normal cartilage; 0.5 is loss of Safranin-O without structural changes; 1 represents roughened articular surface and small fibrillations; 2 represents fibrillation down to the layer immediately below the superficial layer and some loss of surface lamina ; 3 is mild (<20%), 5 is moderate (20-80%) and 6 is severe (>80%) loss of non-calcified cartilage. All quadrants of the joint (medial tibial plateau (MTP), medial femoral condyle, lateral tibial plateau, and lateral femoral condyle) were scored separately. Approximately 12 levels were scored for each knee joint, with scoring continuing until articular cartilage was no longer observed in any quadrant. Scores were expressed as the maximum histologic score found from all levels of the entire joint, as shown in Figure 3A.

Scores were added from all levels of all four quadrants to obtain the summed histologic score, as shown in Figure 3B, to reflect OA lesion severity as well the surface area affected.

[00130] In order to compare the results with those published results examining the progression of osteoarthritis in IL-1β, IL-1βr, INOS, and ICE KO mice (Clements et al., 2003, *Arthritis & Rhuem* 48:3452) the results as mean scores of the medial tibial plateau of each experimental group were also expressed. Figure 4 shows that these scores also were significantly reduced in the ADAMTS-5 homozygous and heterozygous KO animals.

Preparation and culture of cartilage explants:

[00131] Femoral heads were harvested from 4 week old WT and KO mice, and the cartilage was separated from the underlying subchondral bone. Cartilage samples were cultured as explants at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95% air in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 1% antimycotic-antibiotic (Sigma, Aldrich), 2 mM glutamine, 10 mM Hepes, 50 mg/ml of ascorbate and 10% FBS for 48 hours. Explants were then washed 3 times and cultured for an additional 72 hours in serum-free DMEM + 10 ng mouseIL-1α/ml (Sigma, Aldrich) and 10^{-5} M retinoic acid (Sigma, Aldrich). Conditioned media was collected and cartilage harvested at the end of the culture period.

Quantitation of proteoglycan

[00132] The proteoglycan content in the medium was measured as sulphated glucosaminoglycan (GAG) by a colorimetric assay using dimethylmethylene blue (DMMB) and chondroitin sulphate C from shark cartilage (Sigma, Aldrich) as a standard according to a previously reported procedure (Farndale et al., 1986, *Biochim Biophys Acta* 883:173). Harvested cartilage samples were digested with proteinase K (Sigma, Aldrich) for 16h, centrifuged and supernatant collected. Proteoglycan content in the digested cartilage was also measured to provide the total proteoglycan content in the cartilage and enable calculation of per cent release of proteoglycan during the experimental protocol.

Western analysis

[00133] Aggrecan fragments in conditioned medium were analyzed by western analysis using neoepitope antibodies designed to recognize aggrecanase-generated fragments. Conditioned medium was dialyzed against 50 mM Tris-acetate (pH 6.5) and digested with Chondroitinase ABC (Sigma; 1 mU/μg of GAG), Keratinase I (Seikagaku America,

Falmouth, MA; 1 mU/μg GAG) and Keratinase II (Seikagaku; 0.02 mU/μg GAG) for 2 h at 37°C. Samples were concentrated by YM-10 centrifugal filter device (Millipore Corp., Bedford, MA), lyophilized and reconstituted with water at a concentration of 1 mg/ml of GAG as measured by DMMB. Equal amount of GAG for each sample was separated under reducing conditions on 4-12% gradient Tris-glycine gels (Invitrogen, Carlsbad, CA) and transferred to nitrocellulose membranes. Immunoblotting was performed using monoclonal antibody (MAb) AGG-C1 (0.04 μg/ml) (Collins-Racie et al., 2004, *Matrix Biol.* 23:219-230) recognizing the aggrecanase-generated C-terminal interglobular neoepitope NITEGE^{373}. Incubation with primary and alkaline-phosphatase-conjugated secondary goat anti-mouse IgG (Promega Corp., Madison, WI; 1:7500) was performed overnight at 4°C and at room temperature for 1 h, respectively. The immunoblots were incubated with NBT/BCIP substrate (Promega) at room temperature for 2-15 minutes to achieve optimum color development.

Immunohistochemical identification of TEGE^{373} neoepitope in murine articular cartilage

[00134] The polyclonal antibody TEGE^{373} was synthesized by standard polyclonal antibody technology (Glasson et al., 2004, *Arthritis & Rheum.* 50:2547-2558.). The antibody reacted with G1-TEGE^{373} generated by ADAMTS-4 digestion of bovine aggrecan, but did not react with intact (undigested) aggrecan validating it as a "neoepitope" antibody. Positive serum was purified by affinity chromatography using the immunizing peptide.

[00135] For immunostaining of TEGE^{373} neoepitope in murine articular cartilage, femoral heads from ADAMTS-4 KO, ADAMTS-5 KO and WT animals were harvested after 3 days of tissue culture in the presence or absence of 10 ng IL-1α/ml [is this γ or α] (Sigma) and 10^{-5} M retinoic acid (Sigma). Tissues were frozen in OCT and 5 micron sections were cut. Endogenous peroxidase activity was blocked with hydrogen peroxidase (DakoCytomation, Carpinteria, CA) and the sections were deglycosylated with 0.1 U Chondroitinase ABC/ml (Sigma), 0.1 U keratanase I/ml (Seikagaku Corp., Tokyo, Japan) and 0.1 U Keratinase II/ml (Seikagaku Corp., Tokyo, Japan) for 1 hour at 37 °C. Primary antibody or normal rabbit serum was added to sections for 12 hours, and secondary antibody (donkey anti-rabbit, Rockland, Inc, Gilbertsville PA) was added for 30 minutes. Sections were incubated with ABC-peroxidase followed by DAB substrate (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The sections were counterstained with hematoxylin.

Example 2: Results and Discussion

[00136] The ADAMT-4 knock out (KO) was generated (Glasson et al., 2004, *Arthritis & Rheum.* 50:2547-2558.). As detailed above, the ADAMTS-5 KO was created by Cre-Lox mediated recombination resulting in deletion of 56 amino acids encoded by exon 3, including disruption of the zinc binding site and the deletion of the "met turn" (Figure 1A). PCR products from WT and heterozygous mice using primers 1 and 2 generated a 230 bp product. Primer 2 was located within the deleted portion encompassing exon 3 and therefore did not generate a PCR product in the homozygous KO animals. Primers 3 and 4 generated a 500 bp product in the heterozygous and homozygous KO animals doe to deletion of exon 3. The use of two forward primers (1 and 3) was required for optimal amplification with respect to the reverse primers (2 and 4). Because of differences in amplification efficiency between long and short amplicons, the use of short, allele-specific amplicons provided superior reliability of genotyping as compared to the use of one short (deletion) amplicon and one long (wt) amplicon generated from a single primer pair (i.e. 3 and 4). Figure 1E shows RT-PCR from spleen total RNA demonstrated mRNA generated by PCR products made from primers spanning exon 3 reduced in size in the KO. The presence of mRNA indicates that this in-frame deletion did not cause instability of the message. Presence of a translated protein lacking the catalytic domain could not be confirmed.

[00137] Male and female WT and homozygous KO mice were allowed to age for 14-18 weeks. Animals were examined for any gross abnormality, blood samples were drawn for complete blood count and serum chemistry, and 17 tissues were harvested and examined by a board certified veterinary pathologist (BS). Tissues examined included heart, lung, thymus, spleen, liver, kidney, brain, salivary glands, mandibular lymph node, testis, epididymis, eye, harderian gland, lacrimal gland, whole sternum, femur, and whole paw. There were no abnormalities in total body weight, any blood or serum analysis or histologic appearance of any tissue examined indicating activity of the ADAMTS-5 enzyme was not required for normal development and growth.

[00138] Aggrecan is a plentiful component of cartilage within the growth plate as well as the articular cartilage of the joints. Figure 2 shows an analysis of growth plates from WT, ADAMTS-4 and ADAMTS-5 KO animals by immunostaining of the proximal tibial growth

plates with a polyclonal antibody raised against the new C terminus of aggrecan after cleavage by aggrecanases, G1-TEGE^{373}.

[00139] As shown in Figure 2, WT mice demonstrated significant hybridization of the antibody within the cells of the proximal tibial growth plate, and this staining was no longer present in the ADAMTS-4 KO animals. In contrast, hybridization of the anti-TEGE^{373} antibody within the growth plate of the ADAMTS-5 KO mice resembled closely the staining of the WT growth plates. These results suggest that aggrecan turnover in the growth plate is a result of enzymatic activity of ADAMTS-4 and not ADAMTS-5. It is notable that the gross appearance of the animals, length of long bones and histologic appearance of the growth plates in both KO animals were identical to the WT. It is therefore likely that any aggrecan degrading activity attributed to ADAMTS-4 in the growth plate can be compensated for adequately by other enzymes in the absence of ADAMTS-4.

[00140] As described in detail in Example 1 above, unilateral joint instability was generated by surgical transection of the anterior menisco-tibial ligament resulting in destabilization of the medial meniscus (DMM), the data are represented in Figure 3A and Figure 3B. Mice were sacrificed 4 and 8 weeks after surgery, and sections through the joint were scored using a reported scoring system (Chambers et al., 2001, *Arthritis & Rheum* 44:1455). Scores were reported as mean maximal score from WT and ADAMTS-5 homozygous KO and heterozygous KO. In addition, the scores from each section through the joint were added to express the severity of OA as the mean of the summed scored for each treatment group at each time point. This second method of scoring takes into account severity of the lesion as well as the surface area of the joint affected. As shown in Figures 3A and 3B, both methods of analysis revealed significant reduction ($p<0.05$) in the scores of the ADAMTS-5 homozygous and heterozygous KO compared to WT mice (Figure 3). The summed scores of the ADAMTS-5 KO animals were reduced to less than 50% of the WT indicating reduced severity as well as surface area involvement. It is notable that we previously reported no difference in the scores in the identical surgical model performed on ADAMTS-4 KO mice. In addition, similar studies in the literature describing induction of OA in IL-1β, IL-1βr, INOS, and ICE KO mice reported increased severity of pathology in the genetically manipulated mice (Clements et al., 2003, *Arthritis & Rheum* 48:3452). In order to compare the results with those published results examining the progression of osteoarthritis in IL-1β,

IL-1βr, INOS, and ICE KO mice the results as mean scores of the medial tibial plateau of each experimental group were also expressed. Figure 4 shows that these scores also were significantly reduced in the ADAMTS-5 homozygous and heterozygous KO animals.

[00141] Femoral head articular cartilage was removed from ADAMTS-4 KO, ADAMTS-5 KO and WT mice and placed into tissue culture. Inflammatory cytokines (IL-1 and retinoic acid) were added to the culture system to induce degradative enzyme activity, and analysis of the aggrecan degradation products released from the cartilage were evaluated by quantitation of total proteoglycan release and by western blots using a monoclonal neoepitope antibody generated against the new C terminus of aggrecan after cleavage by an "aggrecanase" (G1-TEGE^{373}) (Collins-Racie et al., 2004,Matrix Biology 23:219-230). Results depicted in Figures 5A and 5B demonstrated equivalent total proteoglycan release, and equivalent generation of the TEGE^{373} neoepitope in articular cartilage from WT and ADAMTS-4 KO mice, while there was no evidence of aggrecanase-generated fragments in conditioned media from the articular cartilage of the ADAMTS-5 KO mice. Figure 5C shows immunohistochemical analysis of these femoral heads using a polyclonal antibody generated against the TEGE^{373} neoepitope demonstrated significant hybridization to the aggrecanase generated aggrecan neoepitope in articular cartilage from WT and ADAMTS-4 KO mice, and negligible hybridization in the ADAMTS-5 KO cartilage.

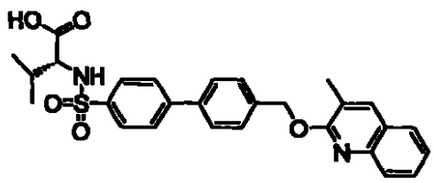
[00142] This work examined the affect of deletion of the activity of ADAMTS-5 (aggrecanase-2) on normal murine development, growth and physiology. Similar to reports previously examining the ADAMTS-4 KO mouse, deletion of ADAMTS-5 activity did not negatively affect any of these functions. Deletion of ADAMTS-5 activity did not affect aggrecanase-generated aggrecan turnover in the growth plates. However, surprisingly, deletion of ADAMTS-5 activity significantly abrogated the progression of osteoarthritis in these mice, while deletion of ADAMTS-4 activity had no such affect. This inability to cleave aggrecan at the "aggrecanase" site within the interglobular domain of the substrate in the ADAMTS-5 knockout was further substantiated by lack of appearance of these fragments after cytokine stimulation of articular cartilage *in vitro* in the ADAMTS-5 knockout mouse. Several enzymes have been reported to be capable of cleavage of aggrecan at the E$^{373\text{-}374}$A site within the interglobular domain of aggrecan including ADAMTS-1, ADAMTS-4, ADAMTS-5 and ADAMTS-9. The present invention shows that ADAMTS-5 is the enzyme

responsible for articular cartilage extracellular matrix degradation in osteoarthritis. This is the first report of a single gene deletion capable of abrogating the course of osteoarthritis in an animal model. It is clear from these results that ADAMTS-5 is the primary "aggrecanase" responsible for aggrecan degradation in murine osteoarthritis.

Example 3: Preparation of Biaryl Sulfanomides

[00143] Examples 3.1 and 3.2 were made based on Scheme 1

Example 3.1



3-Methyl-2-[4'-(3-methyl-quinolin-2-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

[00144] Step 1A [Intermediate 1] To a dry round-bottom flask was added 4-Bromo-benzenesulfonyl chloride (12.2 g, 47.7 mmol, 1 equiv.), anhydrous methylene chloride (170 mL), and H-D-Val-OMe (8.0 g, 47.7 mmol, 1 equiv.). The mixture was cooled to 0°C in an ice bath followed by the addition of Hunig base (19.11 mL, 109.7 mmol, 2.3 equiv.). The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and was stirred overnight. Reaction was complete as determined by TLC. The reaction mixture was then diluted with dichloromethane (100 mL) and washed with brine. The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, solvent evaporated to yield 2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester in 96%yield (16.0 g). 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.87 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.96 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 2.04 (m, 1 H) 3.49 (s, 3 H) 3.74 (d, *J*=14.40 Hz, 1 H) 5.10 (d, *J*=9.85 Hz, 1 H) 7.66 (m, 4 H).

[00145] Step 1B [Intermediate 2: 2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester (3.4 g, 9.71mmol), 4-hydroxymethyl phenyl boronic acid (1.48 g, 9.71 mmol, 1 equiv.), $Pd(PPh_3)_4$ (561mg, 0.48 mmol, 0.05equiv.) were dissolved in ethylene glycol

dimethyl ether (90 mL) under N_2 atmosphere and stirred at room temperature for 30 min. Then K_2CO_3 (2.68 g, 19.4 mmol, 2 equiv.) in H_2O (30 mL) was introduced to the reaction mixture and heat to reflux overnight. After TLC confirmation of reaction completion, solvent was removed by rotovap, residue partitioned between EtOAc and brine, organic layer dried over $MgSO_4$, solvent removed, crude residue was triturated with EtOAc to give 2-(4'-Hydroxymethyl-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester in 67% yield (2.46 g).

[00146] 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δppm 0.90 (d, *J*=7.07 Hz, 3 H) 0.97 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.57 (s, 1 H) 2.04 (m, 1 H) 3.43 (s, 3 H) 3.79 (dd, *J*=10.11, 5.05 Hz, 1 H) 4.78 (s, 2 H) 5.11 (d, *J*=10.36 Hz, 1 H) 7.49 (d, *J*=8.34 Hz, 2 H) 7.60 (d, *J*=8.34 Hz, 2 H) 7.70 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.88 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H).

[00147] Step 1C [Intermediate 3: 2-(4'-Hydroxymethyl-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester (1.2 g, 3.2 mmol, 1.0 equiv.), 2-chloro-3-methyl quinoline (2.26 g, 12.7 mmol, 4 equiv.) were dissolved in DMF (30 mL) followed by the addition of NaH (382 mg, 60% in oil, 9.54 mmol, 3 equiv.). The mixture was stirred at 100°C for 5 hrs, then at room temperature overnight. The reaction mixture was then poured into cold water, solid precipitated from the mixture was collected by filtration and washed with water. Regular column chromatography (Silica gel, 1% MeOH/CH_2Cl_2) to yield 203 mg of 3-Methyl-2-[4'-(3-methyl-quinolin-2-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid methyl ester in 12% yield.

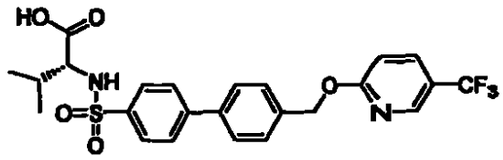
[00148] H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.89 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.97 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 2.04 (m, 1 H) 2.40 (s, 3 H) 3.43 (s, 3 H) 3.78 (dd, *J*=10.11, 5.31 Hz, 1 H) 5.09 (d, *J*=10.11 Hz, 1 H) 5.64 (s, 2 H) 7.37 (m, 1 H) 7.64 (m, 8 H) 7.86 (m, 4 H).

[00149] Step 1D: 3-Methyl-2-[4'-(3-methyl-quinolin-2-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid methyl ester (203 mg, 0.39 mmol, 1 equiv.) was dissolved in THF (8 mL) and MeOH (4 mL) and hydrolyzed with 1N NaOH (5.83 mL, 5.83 mmol, 13 equiv.). After stirring for 3 days, solvent was removed and the residue was dissolved in H_2O. The mixture was then acidified to pH 3 using 1N HCl. Solid precipitated from the mixture was collected by filtration and washed with water. After drying in vacuum oven, 101 mg of

3-Methyl-2-[4'-(3-methyl-quinolin-2-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid was obtained in 76.3 % yield.

[00150] 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.81 (d, *J*=6.57 Hz, 3 H) 0.84 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.95 (m, 1 H) 2.36 (s, 3 H) 3.56 (dd, *J*=9.09, 5.81 Hz, 1 H) 5.61 (s, 2 H) 7.42 (t, *J*=7.45 Hz, 1 H) 7.61 (t, *J*=7.71 Hz, 1 H) 7.67 (d, *J*=7.83 Hz, 2 H) 7.83 (m, 8 H) 8.08 (d, *J*=8.34 Hz, 2 H) 12.58 (s, 1 H).

Example 3.2



3-Methyl-2-[4'-(5-trifluoromethyl-pyridin-2-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

[00151] The title compound, 3-Methyl-2-[4'-(5-trifluoromethyl-pyridin-2-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid, was prepared according to the procedures similar to that described for Example 3.1.

[00152] Step 1C: 2-(4'-Hydroxymethyl-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester (350 mg, 0.93 mmol, 1 equiv), 2-chloro-5-trifluoromethylpyridine (841 mg, 4.64 mmol, 5 equiv.) were dissolved in DMF (7 mL) followed by the addition of NaH (111mg, 2.78 mmol, 3 equiv.) under N_2 atmosphere. The mixture was heat to 100°C for 2 hrs and cool to room temperature. Reaction mixture poured onto cold water and the resulting solid collected by filtration. Further purification by column chromatography (Silica gel, 20% EtOAc / Hexane) to afford 259 mg of G9058-182-2 in 54 % yield.

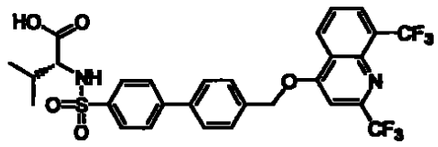
[00153] 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.82 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.90 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.98 (m, 1 H) 3.36 (s, 3 H) 3.72 (dd, *J*=10.11, 5.05 Hz, 1 H) 5.02 (d, *J*=10.11 Hz, 1 H) 5.43 (s, 2 H) 6.84 (d, *J*=8.84 Hz, 1 H) 7.52 (m, 4 H) 7.64 (d, *J*=6.82 Hz, 2 H) 7.74 (d, *J*=8.84 Hz, 1 H) 7.82 (m, 2 H) 8.40 (s, 1 H).

[00154] Step 1D: 3-Methyl-2-[4'-(5-trifluoromethyl-pyridin-2-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid (86.4% yield, 210mg) was prepared according to procedures in Step 1D for Example 1A, using 3-Methyl-2-[4'-(5-trifluoromethyl-pyridin-2-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid methyl ester (250 mg) as the starting material.

[00155] 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.81 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.84 (d, *J*=6.57 Hz, 3 H) 1.95 (m, 1 H) 3.56 (m, 1 H) 5.51 (d, 2 H) 7.12 (d, *J*=8.84 Hz, 1 H) 7.59 (d, *J*=8.34 Hz, 2 H) 7.77 (d, *J*=8.34 Hz, 2 H) 7.86 (m, 4 H) 8.11 (m, 2 H) 8.63 (m, 1 H) 12.57 (s, 1 H).

[00156] **Example 3.3 and 3.4 were made based on Scheme 2.**

Example 3.3



2-[4'-(2,8-Bis-trifluoromethyl-quinolin-4-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

[00157] Step 2A [Intermediate 4, G9591-157-1]: To a solution of 2,8-Bis-trifluoromethyl-quinolin-4-ol (3.85 g, 13.7 mmol, 1.1 equiv.) in DMF (40 mL) was added 2-(4-Bromomethyl-phenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolane (3.7 g, 12.5 mmol, 1.0 equiv.) and K_2CO_3 (3.45 g, 24.92 mmol, 2.2 equiv.) under N_2 atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction was complete as determined by TLC. The reaction mixture was poured into cold water, the white precipitate formed was collected by filtration, washed with water, dried under vacuum to yield 4-[4-(4,4,5,5-Tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzyloxy]-2,8-bis-trifluoromethyl-quinoline in 73% yield (4.95 g).

[00158] 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 1.36 (s, 12 H) 5.38 (s, 2 H) 7.21 (s, 1 H) 7.51 (d, *J*=8.34 Hz, 2 H) 7.65 (t, *J*=7.83 Hz, 1 H) 7.90 (d, *J*=8.08 Hz, 2 H) 8.14 (d, *J*=7.33 Hz, 1 H) 8.50 (d, *J*=8.59 Hz, 1 H).

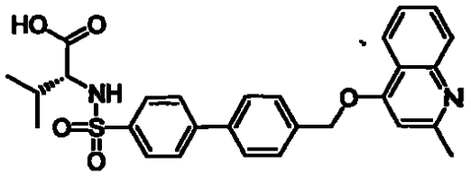
[00159] Step 2B [Intermediate 5, G9591-162]: To 4-[4-(4,4,5,5-Tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzyloxy]-2,8-bis-trifluoromethyl-quinoline (1.5 g, 3.0 mmol, 1 equiv.) in 45 mL of ethylene glycol dimethyl ether was added 2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester (1.06 g, 3.0 mmol, 1.0 equiv.) and $Pd(PPh_3)_4$ (174 mg, 0.15 mmol, 0.05equiv.) under N_2. The reaction mixture was stirred for 0.5 hr, then an aqueous solution of K_2CO_3 (834 mg, 6.0 mmol, 2 equiv.) was added. The mixture was heat to reflux overnight. After cooling to room temperature, solvent was removed under vacuum. The residue was diluted with EtOAc (100 mL) and washed with brine solution. The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, solvent evaporated under vacuum, and the crude product was purified on silica gel column (30% EtOAc/Hexane) to give 1.026 g of 2-[4'-(2,8-Bis-trifluoromethyl-quinolin-4-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester in 53% yield.

[00160] 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.90 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.98 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 2.07 (m, 1 H) 3.45 (s, 3 H) 3.81 (dd, *J*=10.11, 5.05 Hz, 1 H) 5.12 (d, *J*=10.11 Hz, 1 H) 5.44 (s, 2 H) 7.25 (s, 1 H) 7.70 (m, 7 H) 7.92 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 8.16 (d, *J*=7.33 Hz, 1 H) 8.52 (d, *J*=8.59 Hz, 1 H).

[00161] Step 2C: 2-[4'-(2,8-Bis-trifluoromethyl-quinolin-4-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester (1.026 g, 1.6 mmol, 1 equiv.) was dissolved in THF (15 mL) and MeOH (6 mL) and 1N NaOH (17.6 mL, 11equiv.) was added. The reaction was monitored by TLC. It was complete in 3 days. Solvent was removed by rotovap and the residue was dissolved in H_2O. The mixture was then acidified to pH 3 with 1N HCl. The resulting precipitate was collected by filtration and washed with cold water and dried overnight. 460 mg of white solid was obtained in 46% yield.

[00162] 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δppm 0.82 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.85 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.96 (m, 1 H) 3.57 (dd, *J*=9.35, 6.32 Hz, 1 H) 5.66 (s, 2 H) 7.83 (m, 10 H) 8.11 (d, *J*=9.35 Hz, 1 H) 8.35 (d, *J*=7.33 Hz, 1 H) 8.58 (d, *J*=7.83 Hz, 1 H) 12.57 (s, 1 H).

Example 3.4



D-3-Methyl-2-[4'-(2-methyl-quinolin-4-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

[00163] The title compound, D-3-Methyl-2-[4'-(2-methyl-quinolin-4-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid , was prepared according to the procedures similar to that described for Example 3.3.

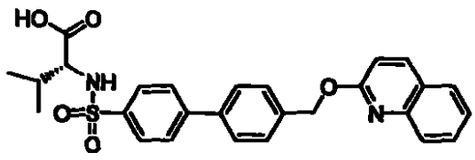
[00164] Step 2A: Alkylation of 2-Methyl-quinolin-4-ol with 2-(4-Bromomethyl-phenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolane was carried out according to procedures in Step 2A for Example 1C to give 2-Methyl-4-[4-(4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzyloxy]-quinoline in 28% yield. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 1.3 (s, 12 H) 2.6 (s, 3 H) 5.4 (s, 2 H) 7.0 (s, 1 H) 7.5 (m, 1 H) 7.6 (d, *J*=8.1 Hz, 2 H) 7.7 (m, 1 H) 7.7 (d, *J*=8.1 Hz, 2 H) 7.9 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 8.1 (dd, *J*=8.3, 0.8 Hz, 1 H).

[00165] Step 2B: Suzuki coupling of D-2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester with 2-Methyl-4-[4-(4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzyloxy]-quinoline was carried out according to procedures in Step 2B for Example 3.3 in 80% yield. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, *J*=15.0, 6.7 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 2.6 (s, 3 H) 3.3 (s, 3 H) 3.6 (dd, *J*=9.3, 7.1 Hz, 1 H) 5.5 (s, 2 H) 7.1 (s, 1 H) 7.5 (t, *J*=7.6 Hz, 1 H) 7.7 (m, 3 H) 7.8 (d, *J*=7.6 Hz, 4 H) 7.9 (m, 1 H) 7.9 (m, 2 H) 8.1 (d, *J*=8.3 Hz, 1 H) 8.3 (d, *J*=9.3 Hz, 1 H).

[00166] Step 2C: Hydrolysis of D-3-Methyl-2-[4'-(2-methyl-quinolin-4-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid methyl ester was carried out according to procedures in Step 2C for Example 3.3 in quantitative yield. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=40.2, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 2.6 (s, 3 H) 3.0 (s, 1 H) 5.4 (s, 2 H) 7.1 (s, 1 H) 7.5 (t, J=8.1 Hz, 1 H) 7.7 (t, J=7.7 Hz, 3 H) 7.8 (m, 7 H) 8.1 (d, J=9.3 Hz, 1 H).

[00167] Example 3.5 was made based on Scheme 3.

Example 3.5



[00168] Step 3A. To a round-bottom flask was added 4-Bromo-benzenesulfonyl chloride (24.37 g, 95.4 mmol, 1 equiv), anhydrous methylene chloride (350 mL), and H-D-Val-OtBu (20 g, 95.4 mmol, 1 equiv.). The mixture was cool to 0°C followed by the addition of Hunig's base (38.2 mL, 219 mmol, 2.3 equiv.). The cooling bath was then removed and the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred overnight. Starting material was consumed as determined by TLC. The reaction mixture was then diluted with methylene chloride (200 mL) and washed with H_2O (500 mL), brine (250 mL). The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, evaporated under vacuum to yield 2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester in quantitative yield (35.0 g).

[00169] 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.82 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.84 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.19 (s, 9 H) 1.93 (m, 1 H) 3.46 (dd, *J*=9.35, 6.06 Hz, 1 H) 7.69 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.79 (m, 2 H) 8.24 (d, *J*=9.60 Hz, 1 H).

[00170] Step 3B: 2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester (11.96 g, 30.47 mmol, 1 equiv.), 4-(Hydroxymethylbenzene) boronic acid (4.63 g, 30.5 mmol, 1 equiv) and $Pd(PPh_3)_4$ (1.76 g, 1.52 mmol, 0.05 equiv.) were charged to a reaction flask and added with ethylene glycol dimethyl ether (300 mL). The mixture was stirred at room temperature for 10 min., then a solution of K_2CO_3 (8.43 g, 60.9 mmol, 2 equiv.) dissolved in 100 mL H_2O was introduced. The reaction mixture was heat to reflux overnight. After cooling to room temperature, solvent was removed by rotavap and the residue partitioned between EtOAc and brine. Organic layer was separated and dried over $MgSO_4$. After removing solvent by rotavap, 8.3 g of white solid 2-(4'-Hydroxymethyl-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester was obtained in 65 % yield.

[00171] 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 1.05 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.12 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.33 (s, 9 H) 2.16 (m, 1 H) 3.73 (d, *J*=5.56 Hz, 1 H) 4.81 (s, 2 H) 7.62 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.78 (d, *J*=8.34 Hz, 2 H) 7.92 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 8.04 (m, 2 H).

[00172] Step 3C 2-(4'-Hydroxymethyl-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester (700 mg, 1.68 mmol, 1 equiv), 2-chloroquinoline (1.1g, 6.7 mmol, 4 equiv) were dissolved in DMF (20 mL) and added with and NaH (202 mg,60% in oil, 5.04 mmol, 3 equiv). The mixture was heat to 100°C for 2 hrs. After cooling to room temperature, the reaction mixture was quenched with sat. NH_4Cl (aq). After stirring for 0.5 h, solid precipitated from the mixture. Solid was collected by filtration and washed with water and dried overnight to produce 793 mg of 2-[4'-(Isoquinolin-3-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester in 87% yield.

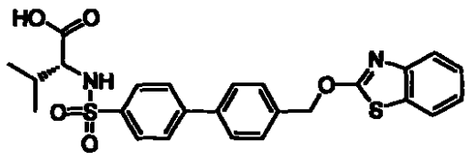
[00173] 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.87 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.03 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.19 (s, 9 H) 2.05 (m, 1 H) 3.66 (dd, *J*=9.85, 4.55 Hz, 1 H) 5.14 (d, *J*=9.85 Hz, 1 H) 5.62 (s, 2 H) 6.98 (d, *J*=8.84 Hz, 1 H) 7.40 (m, 1 H) 7.66 (m, 9 H) 7.89 (m, 2 H) 8.03 (d, *J*=8.59 Hz, 1 H).

[00174] Step 3D: 2-[4'-(Isoquinolin-3-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester (480 mg, 0.88 mmol) was dissolved in 15 mL of dichloromethane. The solution was cool to 0°C followed by the addition of 5 mL of TFA. The resulting mixture was stirred at room temperature for 4 hrs. Solvent was removed by rotavap and the residue was washed with MeOH. Solid thus obtained was dried overnight under vacuum to afford 60 mg of 2-[4'-(Isoquinolin-3-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid in 14% yield.

[00175] 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.81 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.84 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.95 (m, 1 H) 3.56 (dd, *J*=9.35, 6.06 Hz, 1 H) 5.58 (s, 2 H) 7.11 (d, *J*=8.84 Hz, 1 H) 7.46 (dd, *J*=7.58, 6.32 Hz, 1 H) 7.79 (m, 11 H) 8.08 (d, *J*=9.35 Hz, 1 H) 8.29 (d, *J*=8.59 Hz, 1 H) 12.57 (s, 1 H).

Example 3.6 was made based on Scheme 4.

Example 3.6



2-[4'-(Benzothiazol-2-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

[00176] To 2-[4-(4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzyloxy]-benzothiazole (300 mg, 0.604 mmol, 1 equiv.) in 9 mL of dimethoxy ethane was added 2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester (237 mg, 0.604 mmol, 1 equiv.) and Pd(PPh3)4 (35 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 20 min followed by the addition of K2CO3 (167 mg, 1.208 mmol, 2 equiv.) in H2O (3 mL). The mixture was heat to reflux overnight. After cooling to room temperature, solvent was removed by rotavap. Residue was dissolved in methylene chloride and washed with water, brine. Organic layer dried over $MgSO_4$, solvent removed under vacuum , crude mixture purified by column chromatography (30% EtOAc / Hexane) to give 285 mg of in 85% yield.

[00177] 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 1.07 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.23 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.39 (s, 9 H) 1.47 (t, *J*=7.20 Hz, 1 H) 3.86 (dd, *J*=9.85, 4.55 Hz, 1 H) 5.42 (s, 2 H) 6.99 (s, 1 H) 7.22 (d, *J*=7.07 Hz, 1 H) 7.39 (m, 2 H) 7.61 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.67 (d, *J*=6.32 Hz, 1 H) 7.72 (m, 2 H) 7.84 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 8.09 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H).

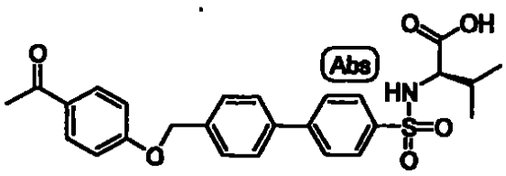
[00178] Step 4B 2-[4'-(Benzothiazol-2-yloxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester (140 mg, 0.25 mmol) was dissolved in 6 mL of methylene chloride followed by the addition of TFA (3mL) The reaction was complete in 6 hrs as determined by TLC. Solvent was removed and the residue was dissolved in EtOAc. n-Hexane was added into the solution and solid precipitated from the mixture. The precipitate was collected and dried to afford 86 mg of in 68% yield.

[00179] 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.80 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.83 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.93 (m, 1 H) 3.54 (dd, *J*=9.35, 6.06 Hz, 1 H) 5.26 (s, 2 H) 7.21 (m, 1 H) 7.33 (m, 2

H) 7.44 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.71 (t, *J*=8.46 Hz, 3 H) 7.82 (s, 4 H) 8.07 (d, *J*=9.35 Hz, 1 H) 12.55 (s, 1 H).

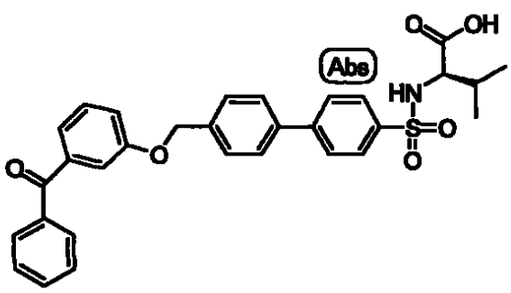
[00180] Examples 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18 were made based on Scheme 4B.

Example 3.7



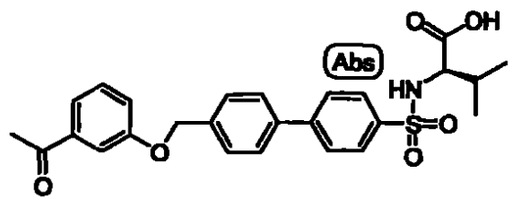
ES-480.1 (M-H)-HRMS: 482.16311 (M+Na)+; 482.16319 Calc'd

Example 3.8



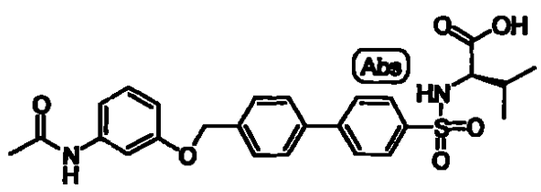
ES+ 544.2 (M+H)+HRMS: 544.17694 (M+H); 544.17884 Calc'd

Example 3.9



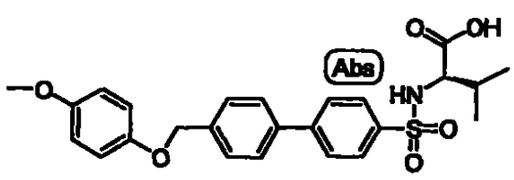
ES- 480.2 (M-H)-HRMS: 482.1635 (M+H)+; 482.16319 Calc'd

Example 3.10



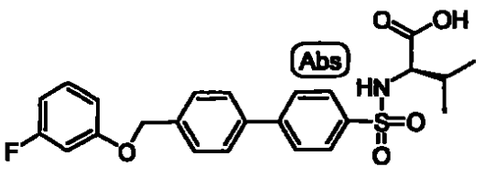
ES- 495.2 (M-H)-HRMS: 497.17284 (M+H)+; 497.17409 Calc'd

Example 3.11



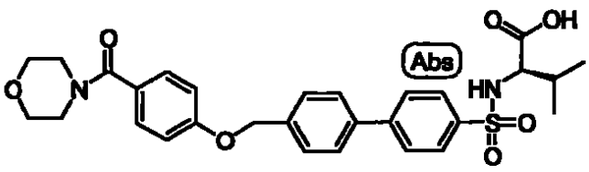
ES- 468.2 (M-H)-HRMS: 470.16231 (M+H)+; 470.16319 Calc'd

Example 3.12



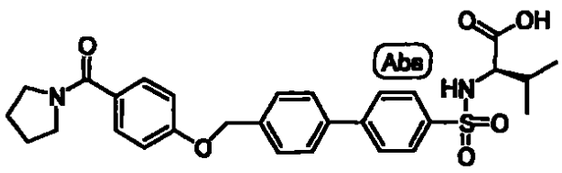
ES- 456.1 (M-H)-HRMS: 458.14323 (M+H)+; 458.1432 Calc'd

Example 3.13



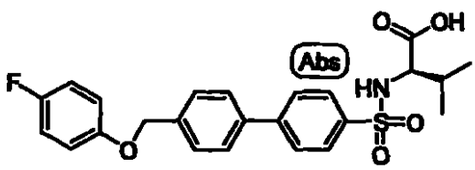
ES- 551.2 (M-H)-HRMS: 553.19849 (M+H)+; 553.2003 Calc'd

Example 3.14



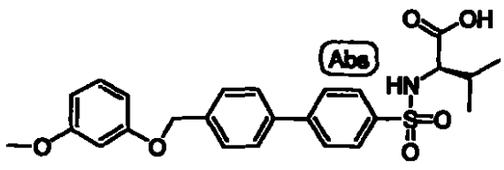
ES- 535.2 (M-H)-HRMS: 537.20469 (M+H)+; 537.20539 Calc'd

Example 3.15



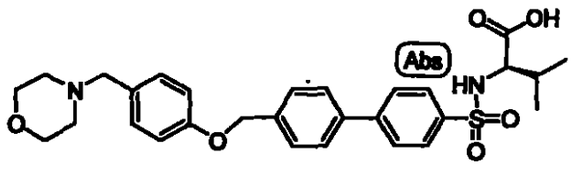
ES- 456.1 (M-H)-HRMS: 458.14389 (M+H)+; 458.1432 Calc'd

Example 3.16



ES- 468.2 (M-H)-HRMS: 470.16151 (M+H)+; 470.16319 Calc'd

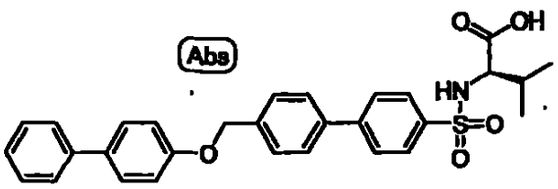
Example 3.17



ES+ 539.1 (M+H)+HRMS: 539.2202

1 (M+H)+; 539.22104 Calc'd

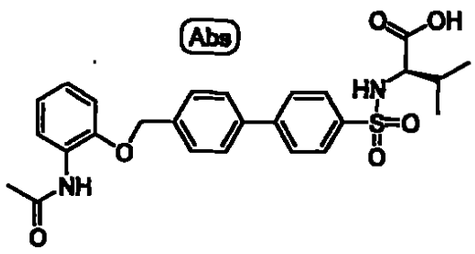
Example 3.18



ES-514.1 (M-H)-HRMS: 516.18313 (M+H)+; 516.18392 Calc'd

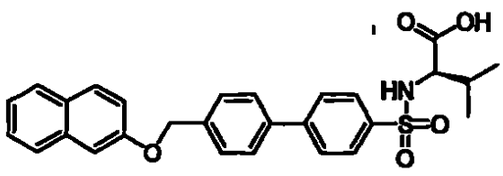
[00181] Examples 3.19, 3.20, 3.21, 3.22, 3.23, 3.24, 3.25, 3.26, 3.27, 3.28, 3.29, 3.30, 3.32 were made based on Scheme 4C.

Example 3.19



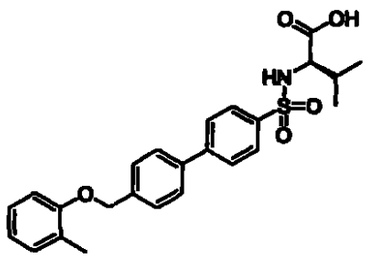
ES-495.1 (M-H)-HRMS: 497.17429 (M+H)+; 497.17409 Calc'd

Example 3.20



ES- 488.1 (M-H)-HRMS: 490.16864 (M+H)+; 490.16827 Calc'd

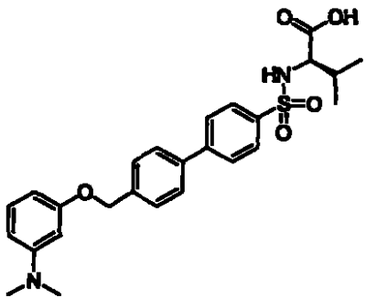
Example 3.21



ES$^+$ m/z 452.1 (M-H)-HRMS: 454.16745 (M+H)+; 454.16827 Calc'd

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.82 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), 0.94 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), 2.06 (m, 1H), 2.31 (s, 3H), 3.80 (dd, 1H, *J* = 4.4, 10Hz), 5.13 (m, 3H), 6.90 (m, 2H), 7.17 (m, 2H), 7.55 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.60 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.66 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.86 (d, 2H, *J* = 8Hz).

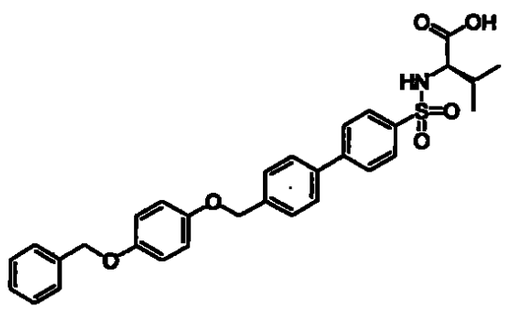
Example 3.22



ES$^+$ m/z 481.2 (M+H)+HRMS: 483.19410 (M+H)+; 483.19482 Calc'd

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 0.90 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), 0.99 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), 2.06 (m, 1H), 2.92 (s, 6H), 3.42 (s, 3H), 3.70 (d, 1H, *J* = 5.6, 10Hz), 5.14 (s, 2H), 6.41 (m, 3H), 7.11 (m, 1H), 7.57 (d, 2H, 8Hz), 7.71 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.80 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.92 (d, 2H, *J* = 8Hz).

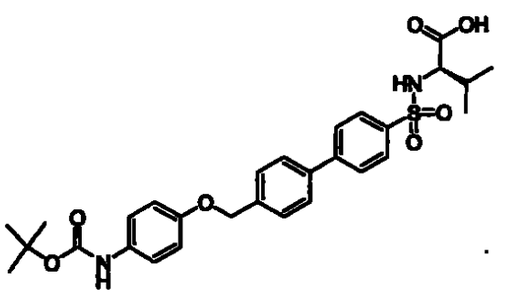
Example 3.23



ES$^+$ m/z 544.1 (M+H)+HRMS: 546.19448 (M+H)+; 546.19449 Calc'd

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 0.93 (d, 3H, J = 6.8Hz), 0.99 (d, 3H, J = 6.8Hz), 2.07 (m, 1H), 3.70 (d, 1H, J = 5.6), 5.03 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 6.94 (s, 4H), 7.31 (m, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.43 (m, 2H), 7.55 (d, 2H, 8Hz), 7.71 (d, 2H, J = 8Hz), 7.80 (d, 2H, J = 8Hz), 7.92 (d, 2H, J = 8Hz).

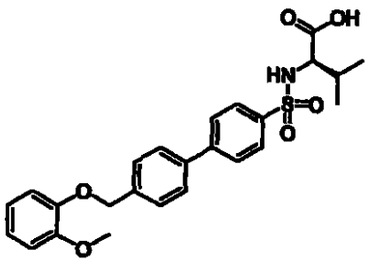
Example 3.24



ES$^+$ m/z 553.2 (M-H)-HRMS: 577.19777 (M+Na)+; 577.19789 Calc'd

[00182] ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 0.91 (d, 3H, J = 6.8Hz), 0.97 (d, 3H, J = 6.8Hz), 1.50 (s, 9H), 2.04 (m, 1H), 3.68 (d, 1H, J = 5.6Hz), 5.10 (s, 2H), 6.92 (s, 2H), 7.28 (d, 2H, J = 8Hz), 7.54 (d, 2H, J = 8Hz), 7.70 (d, 2H, J = 8Hz), 7.79 (d, 2H, J = 8Hz), 7.91 (d, 2H, J = 8Hz).

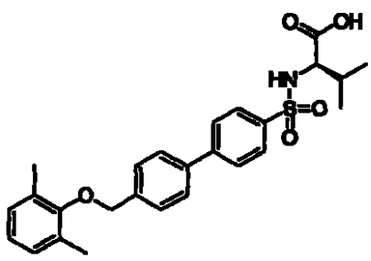
Example 3.25



ES$^+$ m/z 470.2 (M+H)+HRMS: 470.16364 (M+H)+; 470.16319 Calc'd

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.89 (d, 3H, J = 6.8Hz), 0.96 (d, 3H, J = 6.8Hz), 2.10 (m, 1H), 3.82 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 5.07 (d, 1H, J = 9.6Hz), 5.21 (s, 2H), 6.93 (m, 4H), 7.54 (d, 2H, J = 8Hz), 7.58 (d, 2H, J = 8Hz), 7.65 (d, 2H, J = 8Hz), 7.89 (d, 2H, J = 8Hz).

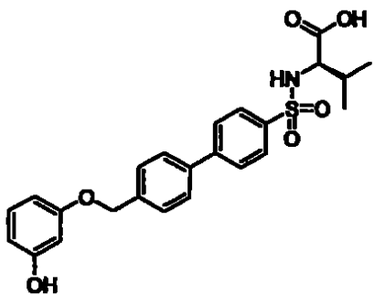
Example 3.26



ES$^+$ m/z 466.2 (M-H)-HRMS: 468.18540 (M+H)+; 468.18392 Calc'd

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.83 (d, 3H, J = 6.8Hz), 0.95 (d, 3H, J = 6.8Hz), 2.05 (m, 1H), 2.33 (s, 6H), 3.82 (dd, 1H, J = 5.2, 10Hz), 4.88 (s, 2H), 5.07 (d, 1H, J = 10 Hz), 6.97 (m, 1H), 7.05 (m, 2H), 7.64 (m, 4H), 7.67 (d, 2H, J = 8Hz), 7.87 (d, 2H, J = 8Hz).

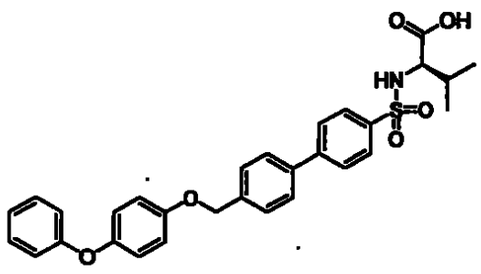
Example 3.27



ES$^+$ m/z 454.1 (M-H)-HRMS: 456.14707 (M+H)+; 456.14754 Calc'd

^{1}H NMR (400 MHz, acetone(d_6)): δ 0.92 (d, 3H, J = 6.8Hz), 0.98 (d, 3H, J = 6.8Hz), 2.10 (m, 1H), 3.16 (m, 1H), 5.16 (s, 2H), 6.45 (d, 1H, J = 8Hz), 6.53 (m, 2H), 7.10 (t, 1H, J = 8Hz), 7.61 (d, 2H, J = 8Hz), 7.76 (d, 2H, J = 8Hz), 7.86 (d, 2H, J = 8Hz), 7.94 (d, 2H, J = 8Hz).

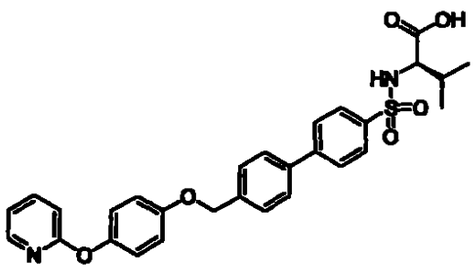
Example 3.28



ES$^+$ m/z 530.1 (M-H)-HRMS: 532.17709 (M+H)+; 532.17884 Calc'd

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 0.93 (d, 3H, J = 6.8Hz), 0.99 (d, 3H, J = 6.8Hz), 2.06 (m, 1H), 3.70 (d, 1H, J = 5.6, 10Hz), 5.16 (s, 2H), 6.93 (m, 3H), 7.04 (m, 3H), 7.31 (m, 2H), 7.58 (d, 2H, J = 8Hz), 7.72 (d, 2H, J = 8Hz), 7.81 (d, 2H, J = 8Hz), 7.93 (d, 2H, J = 8Hz).

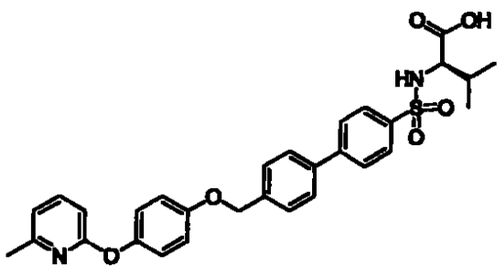
Example 3.29



ES$^+$ m/z 531.1 (M-H)-HRMS: 533.17293 (M+H)+; 533.17409 Calc'd

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.88 (d, 3H, J = 6.8Hz), 1.00 (d, 3H, J = 6.8Hz), 2.13 (m, 1H), 3.83 (m, 1H), 5.13 (m, 3H), 6.82 (m, 1H), 7.02 (m, 5H), 7.56 (m, 4H), 7.67 (m, 3H), 7.89 (m, 2H), 8.16 (m, 1H).

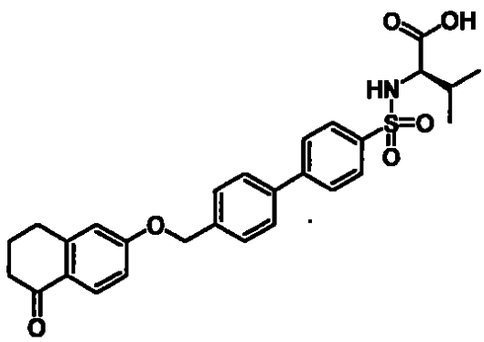
Example 3.30



ES$^+$ m/z 545.2 (M-H)-HRMS: 547.19006 (M+H)+; 547.18974 Calc'd

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.89 (d, 3H, J = 6.8Hz), 1.01 (d, 3H, J = 6.8Hz), 2.19 (m, 1H), 2.44 (s, 3H), 3.83 (m, 1H), 5.04 (s, 2H), 6.39 (d, 1H, J = 8 Hz), 6.83 (m, 1H), 6.90 (m, 2H, J = 8 Hz), 6.97 (d, 2H, J = 8 Hz), 7.52 (m, 5H), 7.60 (d, 2H, J = 8Hz), 7.90 (d, 2H, J = 8Hz).

Example 3.31

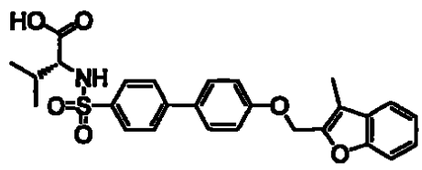


ES$^+$ m/z 506.2 (M-H)-HRMS: 508.17782 (M+H)+; 508.17884 Calc'd

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.81 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), 0.84 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), 1.98 (m, 3H), 2.64 (d, 2H), 2.91 (t, 2H, *J* = 6Hz), 3.56 (dd, 1H, *J* = 6, 9.2Hz), 5.27 (s, 2H), 6.99 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.59 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 7.78 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.85 (m, 4H), 8.08 (d, 1H, 8Hz).

[00183] Examples 3.32, 3.33, 3.34, 3.35, 3.36, 3.37, 3.38, 3.39, 3.40, 3.41 were made based on Scheme 5.

Example 3.32



D-3-Methyl-2-[4'-(3-methyl-benzofuran-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

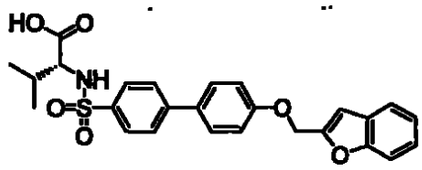
[00184] Step 5A: A mixture of 2-Chloromethyl-3-methyl-benzofuran (675.9 mg, 3.75 mmol), 4-(4,4,5,5-Tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-phenol (825 mg, 3.75 mmol, 1 eq), K_2CO_3 (2.1 g, 15.2 mmol, 4 eq) in 20 mL of CH_3CN was heat to reflux under nitrogen

atmosphere. Reaction was complete after 12 hrs. Regular work-up and column purification (5% EtOAc/hexane) to give 3-Methyl-2-[4-(4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-phenoxymethyl]-benzofuran in 44% yield (601 mg). 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 1.3 (s, 12 H) 2.3 (s, 3 H) 5.2 (s, 2 H) 7.0 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H) 7.3 (m, 2 H) 7.5 (dd, *J*=21.6, 7.7 Hz, 2 H) 7.8 (d, *J*=8.8 Hz, 2 H).

[00185] Step 5B: A mixture of D-2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester (568.07 mg, 1.62 mmol), 3-Methyl-2-[4-(4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-phenoxymethyl]-benzofuran (590.7 mg, 1.62 mmol, 1 eq), $Pd(PPh_3)_4$ (93.7 mg, 0.08 mmol, 0.05 eq), and K_2CO_3 (448.35 mg, 3.24 mmol, 2 eq) in 5 mL of DME and 5 mL of H_2O was heat to reflux for 12 hrs. After cool to room temperature, the mixture was loaded onto column for purification. 616 mg of product G8475-146 was obtained in 75% yield. 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.8 (d, *J*=6.8 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 2.2 (s, 3 H) 3.2 (s, 3 H) 3.5 (d, *J*=6.6 Hz, 1 H) 5.1 (s, 2 H) 7.0 (m, *J*=9.1 Hz, 2 H) 7.1 (m, 1 H) 7.2 (m, 1 H) 7.3 (m, 1 H) 7.4 (m, 1 H) 7.5 (d, *J*=9.1 Hz, 2 H) 7.6 (d, *J*=8.8 Hz, 2 H) 7.7 (m, 2 H).

[00186] Step 5C: To D-3-Methyl-2-[4'-(3-methyl-benzofuran-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid methyl ester (364 mg) was dissolved in THF (10 mL) and MeOH (3 mL). 1N LiOH (3 mL) was added and the mixture was stirred overnight. Regular work-up and column purification to give D-3-Methyl-2-[4'-(3-methyl-benzofuran-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid in quantitative. 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.8 (dd, J=30.3, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 2.2 (s, 3 H) 3.5 (d, J=5.3 Hz, 1 H) 5.1 (s, 2 H) 7.1 (d, J=9.1 Hz, 2 H) 7.1 (m, 1 H) 7.2 (m, 1 H) 7.3 (d, J=8.3 Hz, 1 H) 7.5 (d, J=8.3 Hz, 1 H) 7.5 (d, J=9.1 Hz, 3 H) 7.6 (d, J=8.6 Hz, 2 H) 7.8 (d, J=8.8 Hz, 2 H).

Example 3.33



D-2- [4'-(Benzofuran-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

[00187] The title compound, D-2- [4'-(Benzofuran-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.32.

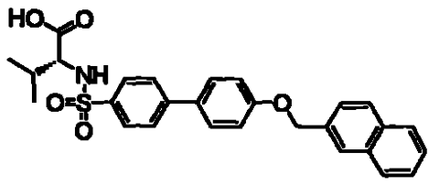
[00188] Step 5A: To 2-Bromomethyl-benzofuran (1.5 g, 7.1 mmol, 1 eq.), 4-(4,4,5,5-Tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-phenol (1.56g, 7.1 mmol, 1eq.), potassium carbonate (1.96 g, 14.2 mmol, 2 eq.) was dissolved in acetonitrile (50 mL) under argon and heated at 70 °C for 16 hours. After work-up and flash column chromatography, 2-[4-(4,4,5,5-Tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-phenoxymethyl]-benzofuran is obtained. Yield: 63%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 1.3 (s, 12 H) 5.3 (s, 2 H) 7.1 (m, 3 H) 7.3 (m, 1 H) 7.3 (m, 1 H) 7.6 (m, 4 H).

[00189] Step 5B: Coupling of 2-[4-(4,4,5,5-Tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-phenoxymethyl]-benzofuran with D-2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester to obtain D-2-[4'-(Benzofuran-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester was done according to procedures in Step 5B for Example 3.32 . Yield: 33%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, *J*=8.3, 7.1 Hz, 6 H) 1.2 (s, 9 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, *J*=9.7, 6.2 Hz, 1 H) 5.3 (s, 2 H) 7.1 (s, 1 H) 7.2 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H) 7.3 (m, 1 H) 7.3 (m, 1 H) 7.6 (dd, *J*=8.2, 0.6 Hz, 1 H) 7.7 (m, 3 H) 7.8 (d, *J*=3.3 Hz, 4 H) 8.1 (d, *J*=9.9 Hz, 1 H).

[00190] Step 5C: D-2-[4'-(Benzofuran-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester (126 mg, 0.23 mmol, 1 eq.), cerium chloride heptahydrate (175 mg, 0.47 mmol, 2 eq.), potassium iodide (51 mg, 0.30 mmol, 1.3 eq.) in acetonitrile (10 mL) were heated at 70C for 16 hours. After work-up and flash column chromatography, D-2-[4'-(Benzofuran-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid was obtained. Yield: 25%. NMR: 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=12.5, 6.7 Hz, 6 H)

2.0 (m, 1 H) 3.5 (dd, J=9.2, 5.9 Hz, 1 H) 5.3 (s, 2 H) 7.1 (s, 1 H) 7.2 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.3 (dd, J=8.1, 0.8 Hz, 1 H) 7.3 (m, 1 H) 7.6 (d, J=8.1 Hz, 1 H) 7.7 (m, 1 H) 7.7 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.8 (d, 4 H) 8.0 (d, J=9.3 Hz, 1 H).

Example 3.34



D-3-Methyl-2-[4'-(naphthalen-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

[00191] The title compound, D-3-Methyl-2-[4'-(naphthalen-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.32.

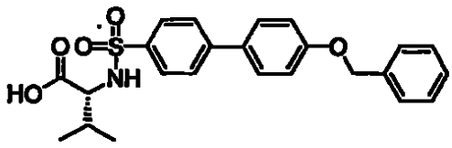
[00192] Step 5A: Alkylation of 2-Bromomethyl-naphthalene with 4-(4,4,5,5-Tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-phenol was carried out according to procedures in Step 5A in Example 3.32 to give 4,4,5,5-Tetramethyl-2-[4-(naphthalen-2-ylmethoxy)-phenyl]-[1,3,2]dioxaborolane in 85% yield. 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 1.3 (s, 12 H) 5.3 (s, 2 H) 7.0 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H) 7.5 (m, 2 H) 7.5 (dd, *J*=8.3, 1.8 Hz, 1 H) 7.8 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H) 7.9 (m, 4 H).

[00193] Step 5B: Suzuki coupling of 4,4,5,5-Tetramethyl-2-[4-(naphthalen-2-ylmethoxy)-phenyl]-[1,3,2]dioxaborolane with D-2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester was carried out according to procedures in Step 5B for Example 3.32 to give D-3-Methyl-2-[4'-(naphthalen-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid methyl ester in 44% yield. 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.9 (dd, *J*=32.1, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 3.4 (s, 3 H) 3.8 (dd, *J*=10.2, 5.2 Hz, 1 H) 5.1 (d, *J*=10.1 Hz, 1 H) 5.3 (s, 2 H) 7.1 (d, *J*=9.1 Hz, 2 H) 7.5 (m, 2 H) 7.6 (m, 3 H) 7.7 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H) 7.9 (m, 6 H).

[00194] Step 5C: Hydrolysis of D-3-Methyl-2-[4'-(naphthalen-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid methyl ester was carried out according to procedures in Step 5C for Example 3.32 in quantitative yield. 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.8 (dd, J=32.6,

6.8 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (d, J=5.3 Hz, 1 H) 5.2 (s, 2 H) 7.1 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.4 (m, 2 H) 7.5 (dd, J=8.6, 1.8 Hz, 1 H) 7.5 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.6 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.8 (m, 5 H) 7.8 (s, 1 H).

Example 3.35



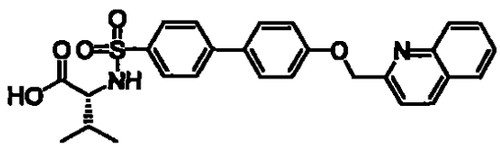
D-2-(4'-Benzyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid

[00195] The title compound, D-2-(4'-Benzyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.32.

[00196] Step 5B: Suzuki coupling of 4-benzyloxyphenylboronic acid with D-2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester was carried out according to procedures in Step 5B for Example 3.32 to give D-2-(4'-Benzyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester in 73% yield. 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.8 (dd, *J*=29.7, 6.7 Hz, 6 H) 1.1 (s, 9 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (d, *J*=5.8 Hz, 1 H) 5.0 (s, 2 H) 7.0 (d, *J*=8.8 Hz, 2 H) 7.2 (t, *J*=7.3 Hz, 1 H) 7.3 (m, 2 H) 7.4 (d, *J*=6.8 Hz, 2 H) 7.5 (d, *J*=9.1 Hz, 2 H) 7.6 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H) 7.8 (d, *J*=8.8 Hz, 2 H).

[00197] Step 5C: D-2-(4'-Benzyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid was prepared according to procedures in Step 5C for Example 3.32 in quantitative yield. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=12.3, 6.7 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, J=9.3, 6.1 Hz, 1 H) 5.2 (s, 2 H) 7.1 (d, J=9.1 Hz, 2 H) 7.4 (m, 3 H) 7.5 (m, 2 H) 7.7 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.8 (s, 4 H) 8.0 (d, J=9.3 Hz, 1 H).

Example 3.36



D-3-Methyl-2-[4'-(quinolin-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

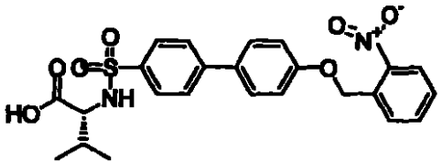
[00198] The title compound, D-3-Methyl-2-[4'-(quinolin-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.32.

[00199] Step 5A: Alkylation of 2-Chloromethyl-quinoline with 4-(4,4,5,5-Tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-phenol was carried out according to procedures in Step 5A for Example 3.32 to give 2-[4-(4,4,5,5-Tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-phenoxymethyl]-quinoline in 90% yield. 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 1.2 (s, 12 H) 5.3 (s, 2 H) 7.0 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H) 7.5 (m, 1 H) 7.6 (dd, *J*=11.4, 8.6 Hz, 3 H) 7.7 (m, 1 H) 7.8 (dd, *J*=8.1, 1.5 Hz, 1 H) 7.9 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 8.3 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H).

[00200] Step 5B: Suzuki coupling of 2-[4-(4,4,5,5-Tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-phenoxymethyl]-quinoline with D-2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester was carried out according to procedures in Step 5B for Example 3.32 to give D-3-Methyl-2-[4'-(quinolin-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid tert-butyl ester in 70% yield. 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.8 (dd, *J*=29.8, 6.8 Hz, 6 H) 1.1 (s, 9 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (d, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.3 (s, 2 H) 7.1 (d, *J*=8.8 Hz, 2 H) 7.5 (m, 3 H) 7.6 (t, *J*=8.6 Hz, 3 H) 7.7 (m, 1 H) 7.8 (d, *J*=8.8 Hz, 2 H) 7.9 (dd, *J*=8.2, 0.9 Hz, 1 H) 8.0 (m, 1 H) 8.3 (d, *J*=8.8 Hz, 1 H).

[00201] Step 5C: Removal of t-butyl ester was done according to procedures in Step 5C for Example 3.32 in quantitative yield. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, *J*=12.5, 6.7 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, *J*=9.3, 6.1 Hz, 1 H) 5.5 (s, 2 H) 7.2 (d, *J*=8.8 Hz, 2 H) 7.7 (m, 1 H) 7.7 (dd, *J*=8.7, 1.9 Hz, 3 H) 7.8 (s, 5 H) 8.0 (m, 3 H) 8.5 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H).

Example 3.37



D-3-Methyl-2-[4'-(2-nitro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

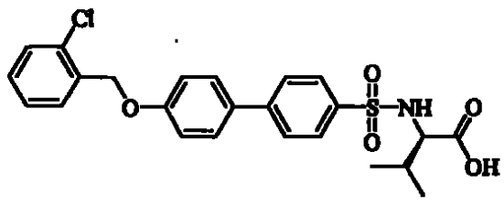
[00202] The title compound, D-3-Methyl-2-[4'-(2-nitro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.32.

[00203] Step 5A: Alkylation of 1-Bromomethyl-2-nitro-benzene with 4-(4,4,5,5-Tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-phenol was carried out according to procedures in Step 5A for Example 3.32 to give 4,4,5,5-Tetramethyl-2-[4-(2-nitro-benzyloxy)-phenyl]-[1,3,2]dioxaborolane in 62% yield. 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 1.3 (s, 12 H) 5.5 (s, 2 H) 7.0 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H) 7.5 (m, 1 H) 7.7 (m, 1 H) 7.8 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H) 7.9 (dd, *J*=7.8, 1.0 Hz, 1 H) 8.2 (dd, *J*=8.1, 1.3 Hz, 1 H).

[00204] Step 5B: Suzuki coupling of 4,4,5,5-Tetramethyl-2-[4-(2-nitro-benzyloxy)-phenyl]-[1,3,2]dioxaborolane with D-2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester was carried out according to procedures in Step 5B for Example 3.32 to give D- 3-Methyl-2-[4'-(2-nitro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid tert-butyl ester in 20% yield. 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.8 (dd, *J*=30.1, 6.8 Hz, 6 H) 1.1 (s, 9 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (d, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.4 (s, 2 H) 7.0 (d, *J*=8.8 Hz, 2 H) 7.5 (m, 1 H) 7.5 (d, *J*=8.8 Hz, 2 H) 7.6 (m, 3 H) 7.8 (d, *J*=8.6 Hz, 3 H) 8.1 (dd, *J*=8.1, 1.3 Hz, 1 H).

[00205] Step 5C: Removal of t-butyl ester was done according to procedures in Step 5C for Example 3.32 in quantitative yield. 1H NMR (400 MHz, MeOD) δppm 0.8 (dd, J=24.3, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 3.6 (d, J=5.8 Hz, 1 H) 5.4 (s, 2 H) 7.0 (d, J=8.6 Hz, 2 H) 7.5 (t, J=7.7 Hz, 1 H) 7.6 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.7 (m, 3 H) 7.8 (m, 3 H) 8.1 (d, J=9.6 Hz, 1 H).

Example 3.38



D-2-[4'-(2-Chloro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

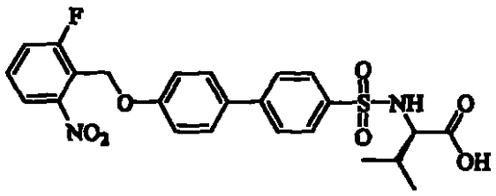
[00206] The title compound, D-2-[4'-(2-Chloro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.32.

[00207] Step 5A: Coupling of 2-chlorobenzyl bromide with 4-hydroxyphenyl boronic ester to obtain 2-[4-(2-Chloro-benzyloxy)-phenyl]-4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolane was done according to procedures in Step 5A for Example 2A. Yield: 85%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 1.3 (s, 12 H) 5.2 (s, 2 H) 7.0 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.4 (m, 2 H) 7.5 (m, 1 H) 7.6 (m, 1 H) 7.6 (d, J=8.8 Hz, 2 H).

[00208] Step 5B: Coupling 2-[4-(2-Chloro-benzyloxy)-phenyl]-4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolane with D-2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester to obtain D-2-[4'-(2-Chloro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester was done according to procedures in Step 5B for Example 3.32. Yield: 73%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=15.4, 6.6 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.3 (s, 3 H) 3.6 (dd, J=9.3, 7.1 Hz, 1 H) 5.2 (s, 2 H) 7.2 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.4 (m, 2 H) 7.5 (m, 1 H) 7.6 (m, 1 H) 7.7 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.8 (d, J=8.6 Hz, 2 H) 7.8 (m, 2 H) 8.3 (d, J=9.3 Hz, 1 H).

[00209] Step 5C: Hydrolysis of D-2-[4'-(2-Chloro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester to D-2-[4'-(2-Chloro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid was done according to procedures in Step 5C for Example 3.32. Yield: 55%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=12.6, 6.8 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, J=9.2, 5.9 Hz, 1 H) 5.2 (s, 2 H) 7.2 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.4 (m, 2 H) 7.5 (m, 1 H) 7.6 (m, 1 H) 7.7 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7:8 (s, 4 H) 8.0 (d, J=9.3 Hz, 1 H) 12.6 (s, 1 H).

Example 3.39



D-2-[4'-(2-Fluoro-6-nitro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

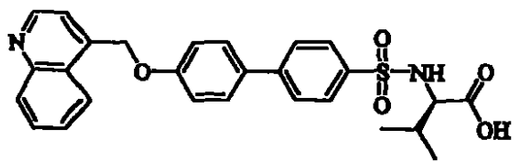
[00210] The title compound, D-2-[4'-(2-Fluoro-6-nitro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.32.

[00211] Step 5A: Coupling of 2-fluoro-6-nitrobenzyl bromide with 4-hydroxyphenyl boronic ester to obtain 2-[4-(2-Fluoro-6-nitro-benzyloxy)-phenyl]-4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolane was done according procedures in Step 5A for Example 3.32. Yield: 95%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 1.3 (s, 12 H) 5.3 (d, J=1.3 Hz, 2 H) 7.0 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.6 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.7 (m, 2 H) 7.9 (m, 1 H).

[00212] Step 5B: Coupling 2-[4-(2-Fluoro-6-nitro-benzyloxy)-phenyl]-4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolane with D-2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester to obtain D-2-[4'-(2-Fluoro-6-nitro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester was done according to procedures in Step 5B for Example 3.32. Yield: 49%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=15.2, 6.8 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.3 (s, 3 H) 3.6 (dd, J=9.5, 7.2 Hz, 1 H) 5.4 (d, J=1.3 Hz, 2 H) 7.1 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.8 (m, 6 H) 7.8 (m, 2 H) 7.9 (m, 1 H) 8.3 (m, J=9.3 Hz, 1 H).

[00213] Step 5C: Hydrolysis of D-2-[4'-(2-Fluoro-6-nitro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester to D-2-[4'-(2-Fluoro-6-nitro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid was done according to procedures in Step 5C for Example 3.32, except purification through prep-HPLC. Yield: 30%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=12.9, 6.8 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, J=9.2, 5.9 Hz, 1 H) 5.4 (d, J=1.3 Hz, 2 H) 7.1 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.7 (m, 4 H) 7.8 (d, J=0.8 Hz, 4 H) 7.9 (m, 2 H) 8.0 (d, J=9.1 Hz, 1 H).

Example 3.40



D-3-Methyl-2-[4'-(quinolin-4-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

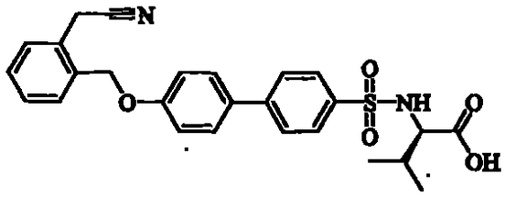
[00214] The title compound, D-3-Methyl-2-[4'-(quinolin-4-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid , was prepared according to procedures similar to that of Example 3.32.

[00215] Step 5A: Coupling of 4-Chloromethyl-quinoline with 4-hydroxyphenyl boronic ester to obtain 4-[4-(4,4,5,5-Tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-phenoxymethyl]-quinoline was done according to procedures in Step 5A for Example 3.32. Yield: 62%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 1.3 (s, 12 H) 5.7 (d, J=0.5 Hz, 2 H) 7.1 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.7 (m, 4 H) 7.8 (m, 1 H) 8.1 (dd, J=8.5, 0.9 Hz, 1 H) 8.2 (d, J=8.3 Hz, 1 H) 8.9 (d, J=4.5 Hz, 1 H).

[00216] Step 5B: Coupling of 4-[4-(4,4,5,5-Tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-phenoxymethyl]-quinoline with D-2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester to obtain D-3-Methyl-2-[4'-(quinolin-4-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid methyl ester was done according to procedures in Step 5B for example 3.32. Yield: 47%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=15.2, 6.8 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.3 (s, 3 H) 3.6 (dd, J=9.3, 7.1 Hz, 1 H) 5.8 (s, 2 H) 7.3 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.8 (m, 9 H) 8.1 (d, J=8.6 Hz, 1 H) 8.2 (d, J=8.6 Hz, 1 H) 8.3 (d, J=9.3 Hz, 1 H) 8.9 (d, J=4.3 Hz, 1 H).

[00217] Step 5C: Hydrolysis of D-3-Methyl-2-[4'-(quinolin-4-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid methyl ester to D-3-Methyl-2-[4'-(quinolin-4-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid was done according to procedures in Step 5C for Example 3.32. Yield: 54%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=43.6, 6.9 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 3.0 (d, J=3.0 Hz, 1 H) 5.8 (d, 2 H) 7.3 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.7 (m, 4 H) 7.8 (m, 5 H) 8.1 (m, 1 H) 8.2 (dd, J=8.3, 0.8 Hz, 1 H) 8.9 (d, J=4.5 Hz, 1 H).

Example 3.41



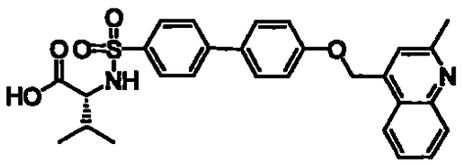
D-2-[4'-(2-Cyanomethyl-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

[00218] The title compound, D-3-Methyl-2-[4'-(quinolin-4-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid , was prepared according to procedures similar to that of Example 3.32.

[00219] Step 5C: Hydrolysis of D-2-[4'-(2-Cyanomethyl-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester (prepared according to step 3) to D-2-[4'-(2-Cyanomethyl-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid was done according to procedures in Step 5C for Example 3.32. Prep-HPLC was used for purification. Yield: 75%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=23.7, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 2.8 (d, J=6.6 Hz, 1 H) 4.1 (s, 2 H) 5.2 (s, 2 H) 7.2 (d, J=9.1 Hz, 2 H) 7.4 (m, 2 H) 7.5 (m, 1 H) 7.6 (m, 1 H) 7.7 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.8 (d, J=2.0 Hz, 4 H).

[00220] **Examples 3.42, 3.43, 3.44, 3.45, 3.46, 3.47, 3.48, 3.49 were made based on Scheme 6.**

Example 3.42

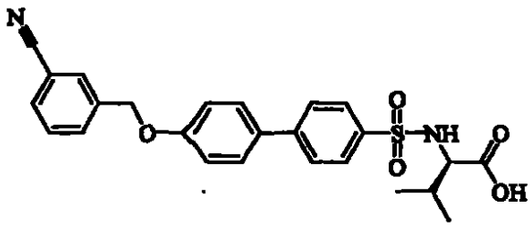


D-3-Methyl-2-[4'-(2-methyl-quinolin-4-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

[00221] Step: A mixture of 4-Chloromethyl-2-methyl-quinoline (165 mg, 0.86 mmol, 1 eq), D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester (314 mg, 0.86 mmol, 1 eq), and K_2CO_3 (270 mg, 1.13 mmol, 1.3 eq) in 8 mL of DMF under nitrogen was heat to 90 °C for 12 hrs. After work up and column chromatography (30-60% EtOAc in hexane), D-3-Methyl-2-[4'-(2-methyl-quinolin-4-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid methyl ester was obtained in 34% yield (150 mg). 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, *J*=15.0, 6.7 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 2.7 (s, 3 H) 3.3 (s, 3 H) 3.6 (dd, *J*=9.2, 7.2 Hz, 1 H) 5.7 (s, 2 H) 7.3 (d, *J*=8.8 Hz, 2 H) 7.6 (m, 2 H) 7.8 (m, 4 H) 7.8 (m, 2 H) 8.0 (d, *J*=9.3 Hz, 1 H) 8.1 (d, *J*=8.3 Hz, 1 H) 8.1 (none, 1 H) 8.3 (d, *J*=9.6 Hz, 1 H).

[00222] Step 6B: D-3-Methyl-2-[4'-(2-methyl-quinolin-4-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid methyl ester (150 mg) was dissolved in THF (8 mL) and MeOH (4mL) and added with 1N LiOH (3 mL,3 mmol). The resulting solution was stirred at room temperature overnight. Reaction was complete as determined by TLC. Solvents removed and regular work-up and column chromatography to afford 148 mg of in quantitative yield. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=31.8, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 2.7 (s, 3 H) 3.2 (s, 1 H) 5.7 (s, 2 H) 7.3 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.6 (m, 2 H) 7.8 (m, 7 H) 8.0 (d, J=7.6 Hz, 1 H) 8.1 (d, J=6.8 Hz, 1 H).

Example 3.43



D-2-[4'-(3-Cyano-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

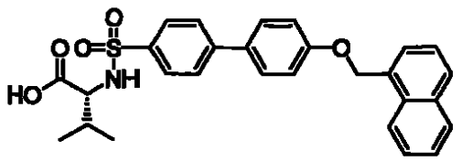
[00223] The title compound, D-2-[4'-(3-Cyano-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid , was prepared according to procedures similar to that of Example 3.42.

[00224] Step 6A: Coupling of α-Bromo-m-tolunitrile with D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester to obtain D-2-[4'-(3-Cyano-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester was done according to

procedures in Step 6A for Example 3.42. Yield: 25%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=14.9, 6.8 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.3 (s, 3 H) 3.6 (dd, J=9.5, 7.2 Hz, 1 H) 5.3 (s, 2 H) 7.2 (d, J=9.1 Hz, 2 H) 7.6 (t, J=8.0 Hz, 1 H) 7.7 (m, 4 H) 7.8 (m, 4 H) 8.0 (s, 1 H) 8.3 (d, J=9.3 Hz, 1 H).

[00225] Step 6B: Hydrolysis of D-2-[4'-(3-Cyano-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester to D-2-[4'-(3-Cyano-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid was done according to procedures in Step 6B for Example 3.42. Yield: 24%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=26.0, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 2.7 (s, 1 H) 5.2 (s, 2 H) 7.2 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.6 (d, J=7.6 Hz, 1 H) 7.7 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.8 (m, 6 H) 8.0 (s, 1 H).

[00226] **Example 3.44**



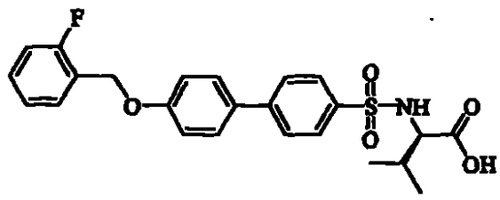
D-3-Methyl-2-[4'-(naphthalen-1-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

[00227] The title compound, D-3-Methyl-2-[4'-(naphthalen-1-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.42.

[00228] Step 6A: Alkylation of 1-Chloromethyl-naphthalene with D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester was carried out according to procedures in Step 6A for Example 3.42 to give D-3-Methyl-2-[4'-(naphthalen-1-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid methyl ester in 34% yield. 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.9 (dd, *J*=32.3, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 3.4 (s, 3 H) 3.8 (dd, *J*=10.1, 5.1 Hz, 1 H) 5.1 (d, *J*=10.1 Hz, 1 H) 5.6 (s, 2 H) 7.2 (d, *J*=8.8 Hz, 2 H) 7.5 (dd, *J*=8.2, 6.9 Hz, 1 H) 7.6 (m, 4 H) 7.6 (d, *J*=6.6 Hz, 1 H) 7.7 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H) 7.9 (m, 4 H) 8.1 (dd, *J*=8.5, 1.4 Hz, 1 H).

[00229] Step 6B: Hydrolysis of D-3-Methyl-2-[4'-(naphthalen-1-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid methyl ester was carried out according to procedures in Step 6B for Example 3.42 in quantitative yield. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=15.4, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 3.5 (s, 1 H) 5.6 (s, 2 H) 7.2 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.6 (m, 3 H) 7.7 (m, 3 H) 7.8 (d, J=2.8 Hz, 4 H) 8.0 (m, 3 H) 8.1 (m, 1 H).

Example 3.45



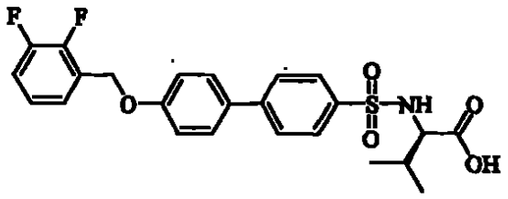
D-2-[4'-(2-Fluoro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

[00230] The title compound, D-2-[4'-(2-Fluoro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.42.

[00231] Step 6A: Coupling of 2-fluorobenzyl bromide with D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester to obtain D-2-[4'-(2-Fluoro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester was done according to procedures in Step 6A for Example 3.42. Yield: 47%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=15.2, 6.8 Hz, 6 H) 1.9 (dd, 1 H) 3.3 (s, 3 H) 3.6 (dd, J=9.3, 7.1 Hz, 1 H) 5.2 (s, 2 H) 7.2 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.3 (m, 2 H) 7.4 (m, 1 H) 7.6 (m, 1 H) 7.7 (m, 4 H) 7.8 (m, 2 H) 8.3 (d, J=9.3 Hz, 1 H).

[00232] Step 6B: Hydrolysis D-2-[4'-(2-Fluoro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester to D-2-[4'-(2-Fluoro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid was done according to procedures in Step 6B for Example 3.42. Yield: 67%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=43.7, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 2.9 (d, J=2.8 Hz, 1 H) 5.2 (s, 2 H) 6.8 (s, 1 H) 7.2 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.3 (m, 2 H) 7.4 (m, 1 H) 7.6 (m, 1 H) 7.7 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.8 (s, 4 H).

[00233] **Example 3.46**



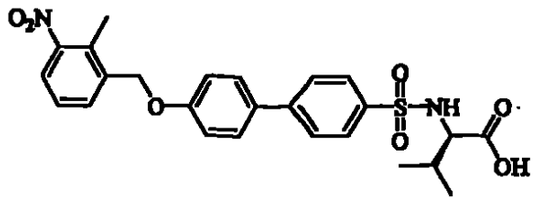
D-2-[4'-(2,3-Difluoro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

[00234] The title compound, D-2-[4'-(2,3-Difluoro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.42.

[00235] Step 6A: Coupling of 2,3-difluorobenzyl bromide with D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester to obtain D-2-[4'-(2,3-Difluoro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester was done according to procedures in Step 6A for Example 3.42 but at room temperature for 16 hours. Yield: 42%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm (s, 2 H) 7.2 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.3 (m, 1 H) 7.5 (m, 2 H) 7.7 (m, 4 H) 7.8 (m, 2 H) 8.3 (d, J=9.3 Hz, 1 H).

[00236] Step 6B: Hydrolysis D-2-[4'-(2,3-Difluoro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester to D-2-[4'-(2,3-Difluoro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid was done according to procedures in Step 6B for Example 3.42. Yield: 63%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=12.4, 6.8 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, J=9.3, 6.1 Hz, 1 H) 5.3 (s, 2 H) 7.2 (d, J=9.1 Hz, 2 H) 7.3 (m, 1 H) 7.5 (m, 2 H) 7.7 (d, J=9.1 Hz, 2 H) 7.8 (d, J=1.8 Hz, 4 H) 8.0 (d, J=9.3 Hz, 1 H) 12.6 (s, 1 H).

[00237] Example 2P



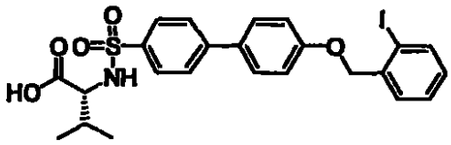
D-3-Methyl-2-[4'-(2-methyl-3-nitro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

[00238] The title compound, D-3-Methyl-2-[4'-(2-methyl-3-nitro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.42.

[00239] Step 6A: Coupling of 2-methyl-3-nitrobenzyl bromide with D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester to obtain D-3-Methyl-2-[4'-(2-methyl-3-nitro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid methyl ester was done according to procedures in Step 6A for Example 3.42 but at room temperature for 16 hours. Product further purified by recrystallization (EtOAc/hexane). Yield: 26%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=15.2, 6.8 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 2.4 (s, 3 H) 3.3 (s, 3 H) 3.6 (m, 1 H) 5.3 (s, 2 H) 7.2 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.5 (t, J=7.8 Hz, 1 H) 7.8 (m, 8 H) 8.3 (d, J=9.3 Hz, 1 H).

[00240] Step 6B: Hydrolysis D-3-Methyl-2-[4'-(2-methyl-3-nitro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid methyl ester to D-3-Methyl-2-[4'-(2-methyl-3-nitro-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid was done according to procedures in Step 6B for Example 3.42. Yield: 33%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=12.4, 6.8 Hz, 6 H) 1.9 (dd, 1 H) 3.5 (dd, J=9.3, 6.1 Hz, 1 H) 5.3 (s, 2 H) 7.2 (d, J=9.1 Hz, 2 H) 7.3 (m, 1 H) 7.5 (m, 2 H) 7.7 (d, J=9.1 Hz, 2 H) 7.8 (d, J=1.8 Hz, 4 H) 8.0 (d, J=9.3 Hz, 1 H) 12.6 (s, 1 H).

[00241] Example 3.48



D-2-[4'-(2-Iodo-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

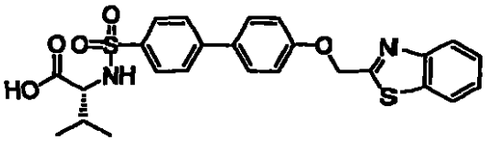
[00242] The title compound, D-2-[4'-(2-Iodo-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.42.

[00243] Step 6A: Alkylation of 1-Chloromethyl-2-iodo-benzene with D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester was carried out according to procedures in Step 6A for Example 3.42 to give D-2-[4'-(2-Iodo-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester in 55% yield. 1H NMR (400 MHz,

DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, *J*=15.3, 6.7 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.3 (s, 3 H) 3.6 (dd, *J*=9.5, 7.2 Hz, 1 H) 7.1 (m, 3 H) 7.5 (m, 1 H) 7.6 (m, 1 H) 7.7 (m, 4 H) 7.8 (m, 2 H) 7.9 (dd, *J*=8.0, 1.1 Hz, 1 H) 8.3 (d, *J*=9.3 Hz, 1 H).

[00244] Step 6B: Hydrolysis of D-2-[4'-(2-Iodo-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester was carried out according to procedures in Step 6A for Example 3.42 in quantitative yield. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=12.1, 6.8 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, J=9.3, 6.1 Hz, 1 H) 5.1 (s, 2 H) 7.1 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.5 (m, 1 H) 7.6 (d, J=7.6 Hz, 1 H) 7.7 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.8 (s, 4 H) 7.9 (dd, J=7.8, 1.3 Hz, 1 H) 8.0 (d, J=9.3 Hz, 1 H).

[00245] **Example 3.49**



D-2-[4'-(Benzothiazol-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

[00246] The title compound, D-2-[4'-(Benzothiazol-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.42.

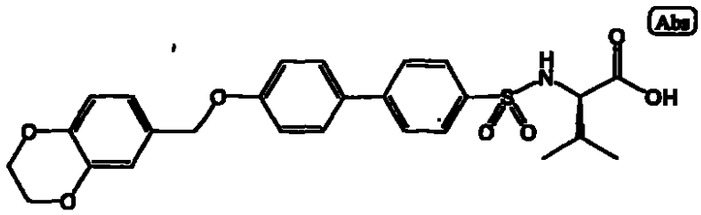
[00247] Step 6A: Alkylation of 2-Bromomethyl-benzothiazole with D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester was carried out according to procedures in Step 6A for Example 3.42 to give D-2-[4'-(Benzothiazol-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester in 20% yield. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, *J*=15.0, 6.7 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.6 (dd, *J*=9.5, 7.2 Hz, 1 H) 5.7 (s, 2 H) 7.2 (m, *J*=8.8 Hz, 2 H) 7.5 (m, 1 H) 7.6 (m, 1 H) 7.7 (m, 4 H) 7.8 (m, 2 H) 8.0 (d, *J*=7.3 Hz, 1 H) 8.1 (d, *J*=7.8 Hz, 1 H) 8.3 (d, *J*=9.6 Hz, 1 H).

[00248] Step 6B: Hydrolysis of D-2-[4'-(Benzothiazol-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester was carried out according to procedures in Step 6B for Example 3.42 in quantitative yield. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=12.4, 6.8 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, J=9.3, 5.8 Hz, 1 H) 5.7 (s, 2 H) 7.2 (d, J=8.8

Hz, 2 H) 7.5 (m, 1 H) 7.6 (m, 1 H) 7.7 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.8 (d, J=2.3 Hz, 4 H) 8.0 (dd, J=9.1, 4.5 Hz, 2 H) 8.1 (d, J=8.6 Hz, 1 H). 97%.

[00249] Examples 3.50, 3.51, 3.52, 3.53, 3.54, 3.55, 3.56 were made based on Scheme 6B.

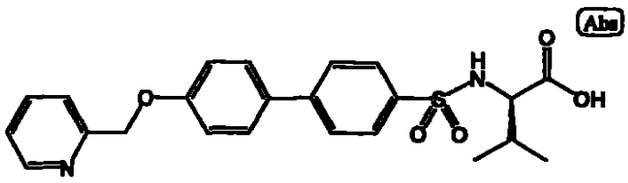
Example 3.50



2-[4'-(2,3-Dihydro-benzo[1,4]dioxin-6-ylmemethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.778(d, 3H), 0.845(d, 3H), 1.99(dd, 1H), 3.17(bs, 1H), 4.24(s, 4H), 5.04(s, 2H), 6.91(m, 3H), 7.10(d, 2H), 7.68(d, 2H); ES$^+$ m/z 496.0 (M-H); HRMS (C26H27NO7S): calcd; 520.14004 ; found; 520.13995 (M+Na).

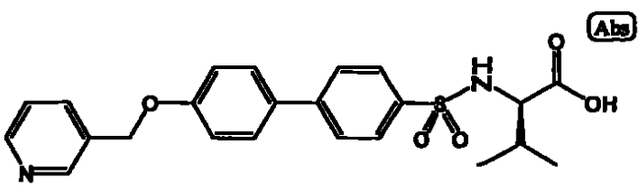
Example 3.51



3-Methyl-2-[4'-(pyridin-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.800(d, 3H), 0.803(d, 3H), 1.94(m, 1H), 3.51(bs, 1H), 5.25(s, 2H), 7.15(d, 2H), 7.36(m, 1H), 7.54(d, 2H), 7.71(d, 2H), 7.83(m, 3H), 8.59(d, 2H); ES$^+$ m/z 441.2 (M+H); HRMS (C23H24N2O5S): calcd; 440.14004 ; found; 440.14037 (M+H).

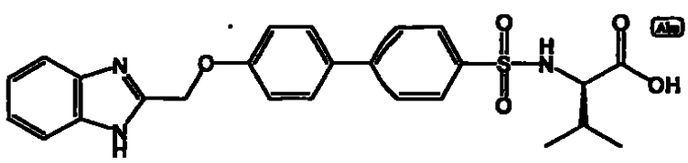
Example 3.52



3-Methyl-2-[4'-(pyridin-3-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.800(d, 3H), 0.803(d, 3H), 1.95(m, 1H), 3.49(bs, IH), 5.23(s, 2H), 7.16(d, 2H), 7.45(m, 1H), 7.71(d, 2H), 7.80(m, 3H), 7.90(d, 2H), 8.56(d, 1H), 8.70(bs, 1H); ES$^+$ m/z 441.1 (M+H); HRMS (C23H24N2O5S): calcd; 441.14787; found; 441.14617 (M+H).

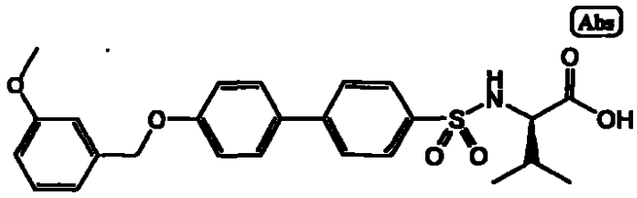
Example 3.53



2-[4'-(1H-Benzoimidazol-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid.

[00250] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.802(d, 3H), 0.833(d, 3H), 1.94(m, 1H), 3.54(m, 1H), 5.51(s, 2H), 6.88(d, 2H), 7.24(d, 1H), 7.34(m, 1H), 7.58(d, 2H), 7.66(m, 1H), 7.78(m, 4H), 8.03(d, 1H); ES$^+$ m/z 480.1 (M+H); HRMS (C25H25N3O5S): calcd; 480.15877; found; 480.15787 (M+H).

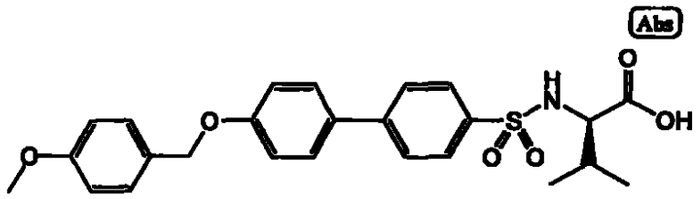
Example 3.54



2-[4'-(3-Methoxy-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.804(d, 3H), 0.835(d, 3H), 1.95(m, 1H), 3.54(m, 1H), 3.77(s, 3H), 5.15(s, 2H), 6.89(m, 2H), 7.04(m, 2H), 7.13(m, 2H), 7.32(m, 1H), 7.58(d, 1H), 7.69(d, 2H), 7.80(m, 1H), 8.01(d, 1H); ES$^+$ m/z 470.1 (M+H); HRMS (C25H27NO6S): calcd; 470.16319; found; 470.16183 (M+H).

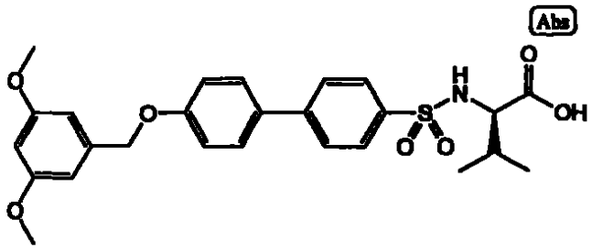
[00251] **Example 3.55**



2-[4'-(4-Methoxy-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid.

[00252] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.805(d, 3H), 0.836(d, 3H), 1.94(m, 1H), 3.54(m, 1H), 3.76(s, 3H), 5.09(s, 2H), 6.96(d, 2H), 7.12(d, 2H), 7.40(d, 2H), 7.69(d, 2H), 7.80(s, 3H), 8.01(d, 1H); ES$^+$ m/z 468.2 (M-H); HRMS (C25H27NO6S): calcd; 470.16319; found; 470.16248 (M+H)

Example 3.56

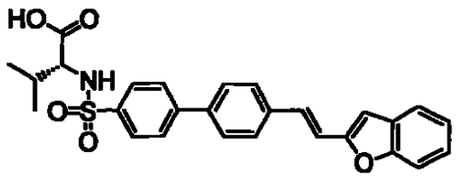


2-[4'-(3,5-Dimethoxy-benzyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.804(d, 3H), 0.835(d, 3H), 1.95(m, 1H), 3.55(m, 1H), 3.75(s, 6H), 5.11(s, 2H), 6.45(bs, 1H), 6.62(bs, 2H), 7.12(d, 2H), 7.70(d, 2H), 7.80(s, 3H), 8.01(d, 1H); ES$^+$ m/z 498.2 (M-H); HRMS (C26H29NO7S): calcd; 500.17375; found; 500.17223 (M+H).

[00253] Example 3.57 was made based on Scheme 7.

Example 3.57



3-Methyl-2-(4'-vinyl-biphenyl-4-sulfonylamino)-butyric acid tert-butyl ester

[00254] Step 7A: 4-Vinylphenylboronic acid (1.89 g, 12.7 mmol, 1 equiv.) and 2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester (5 g, 12.7 mmol, 1 equiv.) were dissolved in ethylene glycol dimethyl ether (180 mL) and added with $Pd(Ph_3)_4$ (736.0 mg, 0.64 mmol) and stirred at room temperature for 20 min. Then to the reaction mixture was introduced an aqueous solution of K_2CO_3 (3.52 g, 25.5 mmol, 2 equiv.) and heat to reflux overnight. After cool to room temperature, solvent was evaporated and the residue partitioned between EtOAC and H_2O. Organic layer washed with brine, dried over $MgSO_4$, and purified by column chromatography (Silica gel, 10% EtOAc / Hexane) to yield 808 mg of G9058-169 in 15.2% yield.

[00255] ^{1}H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.80 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.95 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.12 (s, 9 H) 1.99 (m, 1 H) 3.59 (dd; *J*=9.85, 4.55 Hz, 1 H) 5.06 (d, *J*=10.11 Hz, 1 H) 5.25 (d, *J*=10.86 Hz, 1 H) 5.75 (d, *J*=16.93 Hz, 1 H) 6.70 (m, 1 H) 7.45 (m, 4 H) 7.61 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.82 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H).

[00256] Step 7B: 3-Methyl-2-(4'-vinyl-biphenyl-4-sulfonylamino)-butyric acid tert-butyl ester (300 mg, 0.72 mmol, 1.2 equiv.), $Pd_2(dba)_3$ (11mg, 0.012 mmol, 0.02 equiv.), Tri-t-butylphosphonium tetrafluoroborate (14 mg, 0.048 mmol, 0.08 equiv.) and dioxane (1.5 mL) were placed in a microwave tube under N_2. 2-Bromo-1-Benzofuran (118 mg, 0.6mmol, 1 equiv) and dicyclohexyl methyl amine (0.15 mL, 0.72 mmol, 1.2 equiv.) were injected. The mixture was then irradiated in microwave reactor at 180°C for 30 min. The mixture was partitioned between EtOAc and H_2O, organic layer dried over $MgSO_4$. Crude residue purified by column chromatography (silica gel, 20% EtOAc/ Hexane) to afford 80 mg of 2-[4'-(2-Benzofuran-2-yl-vinyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester. (G9058-171) in 25% yield.

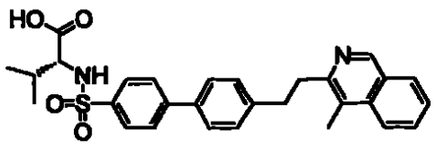
[00257] ^{1}H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.80 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.96 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.14 (s, 9 H) 2.01 (m, 1 H) 3.60 (dd, *J*=9.98, 4.42 Hz, 1 H) 5.07 (d, *J*=9.85 Hz, 1 H) 6.66 (s, 1 H) 7.01 (d, *J*=15.92 Hz, 1 H) 7.14 (m, 1 H) 7.25 (m, 2 H) 7.42 (d, *J*=8.08 Hz, 1 H) 7.52 (m, 5 H) 7.64 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.84 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H).

[00258] Step 7C; 2-[4'-(2-Benzofuran-2-yl-vinyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester (80 mg) in dichloroethane (4.5 mL) was added with to TFA (1.5 mL) and stirred at room temperature. The reaction was complete after 3 hrs as determined by TLC. After removing solvent, the crude residue was then purified by column chromatography (5-10% MeOH/CH_2Cl_2) to give 22 mg of 2-[4'-(2-Benzofuran-2-yl-vinyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid G9058-172 in 30.7% yield.

[00259] 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.79 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.86 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.23 (s, 2 H) 2.02 (m, 1 H) 3.18 (m, 1 H) 7.01 (s, 1 H) 7.25 (t, *J*=7.07 Hz, 1 H) 7.33 (m, 1 H) 7.38 (d, *J*=14.65 Hz, 1 H) 7.59 (d, *J*=8.08 Hz, 1 H) 7.64 (d, *J*=8.08 Hz, 1 H) 7.79 (d, *J*=6.57 Hz, 4 H) 7.83 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.90 (m, 2 H).

[00260] Example 3.58 was made based on Scheme 8.

Example 3.58



N-({4'-[2-4-methylisoquinolin-3-yl)ethyl]-1,1'-biphenyl-4-yl}sulfonyl)-D-valine

[00261] Step 8A2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester (10.65 g, 27.1 mmol, 1 equiv.), 4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenol (5.97 g, 27.1 mmol, 1 equiv), $Pd(PPh_3)_4$ (1.57 g, 1.4 mmol, 0.05 equiv.) were dissolved in ethylene glycol dimethyl ether (210 mL) under N_2 atmosphere and stirred at room temperature for 30 min. Then K_2CO_3 (7.5 g, 54.3 mmol, 2 equiv.) in H_2O (70 mL) was introduced to the reaction mixture and heat to reflux overnight. Reaction was complete as determined by TLC. Solvent was removed by rotovap and the residue partitioned between dichloromethane and brine. Organic layered dried over $MgSO_4$, solvent removed, crude purified by column chromatography (silica gel, 30% EtOAc / n-Hexane) to give 7.1 g of 2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester in 65 % yield.

[00262] 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δppm 0.79 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.95 (d, *J*=6.57 Hz, 3 H) 1.13 (s, 9 H) 1.51 (s, 1 H) 1.99 (m, 1 H) 3.59 (dd, *J*=10.11, 4.55 Hz, 1 H) 5.06 (d, *J*=9.85 Hz, 1 H) 6.86 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.38 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.55 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.79 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H).

[00263] Step 8B: 2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester (330 mg, 0.81 mmol) was dissolved in 20 mL of dry methylene chloride and cool to 0 °C. NaH (83 mg, 60% in oil, 2.0 mmol, 2.5 equiv.) was added under N2 and the mixture was stirred for 15 min. Triflic anhydride (251 mg, 0.89 mmol, 1.1 equiv.) was injected and the mixture was warm to room temperature for 1 h. TLC indicated the reaction was complete. The reaction mixture was diluted with methylene chloride and neutralized with 1N HCl. Mixture was washed with water, brine, and dried over MgSO4. Regular column chromatography (40% EtOAc/hexane) to afford 3 14 mg of desired product in 72% yield.

[00264] 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ·ppm 0.87 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.03 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.21 (s, 9 H) 2.01-2.20 (m, 1 H) 3.68 (dd, *J*=9.85, 4.55 Hz, 1 H) 5.18 (d,

J=10.11 Hz, 1 H) 7.39 (d, J=8.84 Hz, 2 H) 7.64 (dd, J=13.52, 8.72 Hz, 4 H) 7.93 (d, J=8.59 Hz, 2 H).

[00265] Step 8C: The reaction tube was filled with triflate (300 mg, 0.56 mmol) from Step 8B, lithium chloride (24 mg, 0.56 mmol, 1eq.), CuI (11 mg, 0.05 mmol, 10%), and $PdCl_2(PPh_3)_2$ (19.6 mg, 0.028 mmol, 5%) under nitrogen followed by the addition of DMF (5 mL). t-butyldimethylacetylene (235 mg, 1.68 mmol, 3 eq.) and diethylamine (409 mg, 5.6 mmol, 10 eq.) were injected. The tube was irradiated in microwave reactor at 125 °C for 10 min. Starting materials were consumed as determined by TLC. Mixture was partitioned between ethyl acetate and water. Organic phase collected and regular work-up and column chromatography to give 270 mg of desired acetylenic product tert-butyl N-[(4'-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]ethynyl}-1,1'-biphenyl-4-yl)sulfonyl]-D-valinate in 92% yield. 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.00 (s, 6 H) 0.66 (d, J=6.82 Hz, 3 H) 0.81 (s, 9 H) 0.82 (d, J=6.82 Hz, 3 H) 0.98 (s, 9 H) 1.75-1.98 (m, 1 H) 3.46 (dd, J=9.85, 4.55 Hz, 1 H) 4.93 (d, J=9.85 Hz, 1 H) 7.27-7.32 (m, 2 H) 7.33-7.39 (m, 2 H) 7.47 (d, J=8.84 Hz, 2 H) 7.70 (d, J=8.84 Hz, 2 H).

[00266] Step 8D: tert-butyl N-[(4'-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]ethynyl}-1,1'-biphenyl-4-yl)sulfonyl]-D-valinate (600 mg, 1.14 mmol) was dissolved in THF (8 mL) and added with TBAF (1.7 mL, 1M, 1.7 mmol, 1.5 eq). The solution was stirred at room temperature for half hour and the reaction was complete. Solvent removed and the residue was purified with column chromatography (silica gel, 20% EtOAc/hexane). 469 mg of product tert-butyl N-[(4'-ethyny-1,1'-biphenyl-4-yl)sulfonyl]-D-valinate was isolated in quantitative yield. 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.86 (d, J=6.82 Hz, 2 H) 1.02 (d, J=6.82 Hz, 2 H) 1.20 (s, 9 H) 1.88-2.29 (m, 1 H) 3.17 (s, 1 H) 3.67 (dd, J=9.85, 4.55 Hz, 1 H) 5.14 (d, J=10.11 Hz, 1 H) 7.52 (d, J=8.59 Hz, 2 H) 7.56-7.62 (m, 2 H) 7.67 (d, J=8.84 Hz, 2 H) 7.91 (d, J=8.59 Hz, 2 H).

[00267] Step 8E tert-butyl N-[(4'-ethyny-1,1'-biphenyl-4-yl)sulfonyl]-D-valinate (117 mg, 0.28 mmol), 2-chloro-3-methylisoquinoline (60 mg, 0.34 mmol, 1.2 eq), CuI (5.3 mg, 0.028 mmol, 10%), and PdCl2(PPh3)2 (9.8 mg, 0.014 mmol, 5%) were placed in a reaction tube under N_2 and added with DMF (4 mL) and 10 eq. of diethyl amine. The mixture was irradiated at 125 °C for 10 min. Reaction was complete as determined by LCMS. Dilute the

mixture with EtOAc and washed with water 3 times, brine once then dried over MgSO4. Column chromatography (silica gel, 30% EtOAc/hexane) to provide 120 mg of desired product tert-butyl N-({4'-[(4-methylisoquinolin-3-yl)ethynyl]-1,1'-biphenyl-4-yl}sulfonyl)-D-valinate in 76% yield. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.86 (dd, *J*=8.59, 6.82 Hz, 6 H) 1.17 (s, 9 H) 1.94 (m, 1 H) 2.67 (s, 3 H) 3.50 (dd, *J*=10.61, 7.33 Hz, 1 H) 7.62 (t, *J*=7.45 Hz, 1 H) 7.69-7.78 (m, 1 H) 7.80-7.85 (m, 4 H) 7.87 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.90-7.97 (m, 2 H) 8.00 (d, *J*=8.59 Hz, 1 H) 8.20 (d, *J*=9.60 Hz, 1 H) 8.30 (s, 1 H).

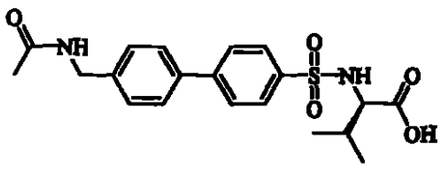
[00268] Step 8F: tert-butyl N-({4'-[(4-methylisoquinolin-3-yl)ethynyl]-1,1'-biphenyl-4-yl}sulfonyl)-D-valinate (46 mg, 0.08 mmol) was dissolved in 25 mL of methanol and added with catalytic amount of Pd/C (8.5 mg, 10% weight on Carbon, 0.008 mmol). The hydrogenation was carried out in a Parr shaker bottle under H_2 (50 PSI). Reaction was terminated after 5 hours and LCMS indicated the reaction was complete. The mixture was filtered through Celite and concentrated to the desired product G8594-178 in quantitative yield (46 mg). 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.77-0.93 (m, 6 H) 1.15 (s, 9 H) 1.85-2.06 (m, 1 H) 2.51 (s, 3 H) 3.13-3.28 (m, 2 H) 3.25-3.39 (m, 2 H) 3.47 (d, *J*=8.84 Hz, 1 H) 7.47 (d, *J*=8.08 Hz, 2 H) 7.52 (t, *J*=7.45 Hz, 1 H) 7.59-7.71 (m, 3 H) 7.76-7.90 (m, 4 H) 7.97 (d, *J*=8.34 Hz, 1 H) 8.06 (s, 1 H) 8.15 (s, 1 H).

[00269] Step 8G: tert-butyl N-({4'-[2-(4-methylisoquinolin-3-yl)ethyl]-1,1'-biphenyl-4-yl}sulfonyl-D-valinate (46 mg, 0.08 mmol) was dissolved in 5 mL of dry methylene chloride followed by the addition of 2.5 mL of TFA. The mixture was stirred at room temperature for 3 hrs and TLC indicated the reaction was complete. Solvent was removed by rotavap and the product dried in vacuum oven overnight. 44 mg of product N-({4'-[2-(4-methylisoquinolin-3-yl)ethyl]-1,1'-biphenyl-4-yl}sulfonyl-D-valine was obtained in 95% yield.

[00270] 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.83 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.88 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.80-2.13 (m, 1 H) 2.57 (s, 3 H) 3.15 (t, *J*=7.83 Hz, 2 H) 3.45-3.55 (m, 2 H) 3.60 (d, *J*=5.56 Hz, 1 H) 7.25 (d, *J*=8.08 Hz, 2 H) 7.53 (d, *J*=8.08 Hz, 2 H) 7.65 (d, *J*=8.34 Hz, 2 H) 7.81 (d, *J*=8.59 Hz, 3 H) 7.98 (t, *J*=7.58 Hz, 1 H) 8.02-8.09 (m, 1 H) 8.13 (d, *J*=8.08 Hz, 1 H) 8.83 (s, 1 H).

[00271] Example 3.59 was made based on Scheme 9.

Example 3.59



D- 2-[4'-(Acetylamino-methyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

[00272] Step 9A: Combined 4-aminomethyl phenyl boronic acid (143 mg, 0.77 mmol, 1 eq), D-2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester (300 mg, 0.77 mmol, 1 eq), palladium tetrakis (44 mg, 0.038 mmol, 0.05 eq) in dimethoxy ethane (10 mL) and stirred at room temperature for 10 min. Potassium carbonate (212 mg, 1.53 mmol, 2 eq) in 4 mL of water was added to the reaction mixture and heated at 88 °C for 4 hrs. The reaction is then cool to room temperature and diluted with ethyl acetate, washed with brine, dried over magnesium sulfate and stripped to dryness. Residue is purified via flash chromatography on silica gel eluting with 4-10% MeOH in methylene chloride with 2% Et_3N to obtain 200 mg of D-2-(4'-Aminomethyl-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester. Yield: 63%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.9 (dd, J=8.1, 7.1 Hz, 6 H) 1.1 (s, 9 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (d, J=6.3 Hz, 2 H) 3.8 (s, 2 H) 7.5 (d, J=8.3 Hz, 2 H) 7.6 (d, J=8.3 Hz, 2 H) 7.8 (d, J=2.0 Hz, 4 H).

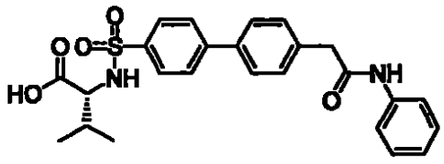
[00273] Step 9B: To acetic anhydride (71 uL, 0.75 mmol, 1.05 eq..) in CH_2Cl_2 (5 mL) was added with pyridine (70 uL, 0.86 mmol, 1.2 eq.) under argon and stirred for 5 min, then D-2-(4'-Aminomethyl-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester (300 mg, 0.72 mmol, 1 eq.) was added and stirred for 16 hours. After work-up and flash column chromatography, D-2-[4'-(Acetylamino-methyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester was obtained. Yield: 32%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=9.1, 6.8 Hz, 6 H) 0.9 (t, J=7.3 Hz, 3 H) 1.2 (s, 9 H) 1.3 (m, 2 H) 1.5 (m, 2 H) 1.9 (m, 1 H) 2.5 (m, 2 H) 3.4 (dd, J=9.6, 6.3 Hz, 1 H) 7.0 (dd, 4 H) 7.1 (m, 2 H) 7.5 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.7 (d, J=9.6 Hz, 1 H) 8.6 (s, 1 H).

[00274] Step 9C: To a solution of D-2-[4'-(Acetylamino-methyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester (300 mg, 0.65 mmol) in 6 mL of dichloroethane was

added 3 mL of trifluoroacetic acid. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 hrs and reaction was complete as determined by TLC. Solvent removed and residue dried over vacuum oven to obtain 250 mg of D-2-[4'-(Acetylamino-methyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid. Yield: 94%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, *J*=12.5, 6.7 Hz, 6 H) 1.9 (s, 3 H) 2.0 (m, 1 H) 3.6 (dd, *J*=9.3, 5.8 Hz, 1 H) 4.3 (d, *J*=5.8 Hz, 2 H) 7.4 (d, *J*=8.1 Hz, 2 H) 7.7 (d, *J*=8.3 Hz, 2 H) 7.8 (s, 4 H) 8.1 (d, *J*=9.3 Hz, 1 H) 8.4 (t, *J*=5.8 Hz, 1 H) 12.6 (s, 1 H).

[00275] Example 3.60 and 3.61 were made based on Scheme 10

Example 3.60



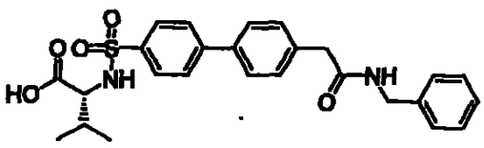
D-3-Methyl-2-(4'-phenylcarbamoylmethyl-biphenyl-4-sulfonylamino)-butyric acid

[00276] Step 10A: A mixture of 4-Bromophenylacetic acid (1.5 g, 7.0 mmol, 1 eq.), EDC (2.67 g, 14.0 mmol, 2 eq.), DMAP (846 mg, 7.0 mmol, 1 eq.), and phenylamine (0.765 mL, 8.4 mmol, 1.2 eq.) in 15 mL of DMF was stirred under nitrogen at room temperature for 3.5 hrs. After aqueous workup and recrystallization, 2-(4-Bromophenyl)-N-phenyl-acetamide was obtained in 69% yield (1.4 g). 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 3.6 (s, 2 H) 7.0 (m, 1 H) 7.3 (m, 4 H) 7.5 (m, 2 H) 7.6 (dd, *J*=8.7, 1.1 Hz, 2 H) 10.2 (s, 1 H).

[00277] Step 10B: A mixture of 2-(4-Bromophenyl)-N-phenyl-acetamide (107 mg, 0.37 mmol, 1.1 eq.), D-3-Methyl-2-(4-tributylstannanyl-benzenesulfonylamino)-butyric acid tert-butyl ester (202 mg, 0.34 mmol, 1 eq.), and $Pd(PPh_3)_4$ (38.5 mg, 0.033 mmol, 0.1 eq.) in 5 mL of toluene was heated to reflux under nitrogen. Reaction was complete after 5 hrs. Regular work-up and column purification, D-3-Methyl-2-(4'-phenylcarbamoylmethyl-biphenyl-4-sulfonylamino)-butyric acid tert-butyl ester was obtained in 34% yield (60 mg). 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.9 (dd, *J*=8.3, 6.8 Hz, 6 H) 1.1 (s, 9 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, *J*=9.6, 6.3 Hz, 1 H) 3.7 (s, 2 H) 7.0 (t, *J*=7.3 Hz, 1 H) 7.3 (m, 2 H) 7.5 (d, *J*=8.3 Hz, 2 H) 7.6 (dd, *J*=8.6, 1.0 Hz, 2 H) 7.7 (d, *J*=8.3 Hz, 2 H) 7.8 (d, *J*=2.5 Hz, 4 H) 8.1 (d, *J*=9.6 Hz, 1 H) 10.2 (s, 1 H).

[00278] Step 10C: Removal of t-butyl ester of D-3-Methyl-2-(4'-phenylcarbamoylmethyl-biphenyl-4-sulfonylamino)-butyric acid tert-butyl ester was done using TFA in dichloroethane (1:1). After evaporation of solvent, D-3-Methyl-2-(4'-phenylcarbamoylmethyl-biphenyl-4-sulfonylamino)-butyric acid was obtained in quantitative yield. 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.8 (dd, J=27.0, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 3.6 (d, J=5.6 Hz, 1 H) 3.6 (s, 2 H) 7.0 (m, 1 H) 7.2 (m, 2 H) 7.4 (d, J=8.3 Hz, 2 H) 7.5 (dd, J=8.7, 1.1 Hz, 2 H) 7.6 (d, J=8.3 Hz, 2 H) 7.7 (dd, J=48.0, 8.6 Hz, 4 H).

Example 3.61



D-2-[4'-(Benzylcarbamoyl-methyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

[00279] Step 10A: Amide coupling of 4-Bromophenylacetic acid with benzylamine was done according to procedures in Step 10A for Example 3.60 to give N-Benzyl-2-(4-bromo-phenyl)-acetamide in 82% yield. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 3.5 (s, 2 H) 4.3 (d, *J*=5.8 Hz, 2 H) 7.2 (dd, *J*=7.8, 5.6 Hz, 5 H) 7.3 (m, 2 H) 7.5 (d, *J*=8.3 Hz, 2 H) 8.6 (t, *J*=5.9 Hz, 1 H).

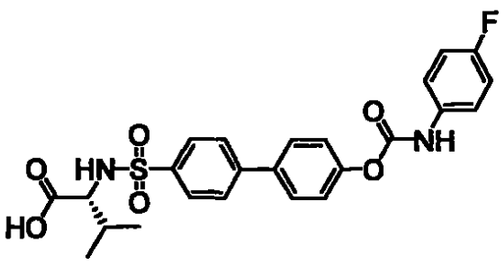
[00280] Step 10B: Stille coupling of N-Benzyl-2-(4-bromo-phenyl)-acetamide with D-3-Methyl-2-(4-tributylstannanyl-benzenesulfonylamino)-butyric acid tert-butyl ester was carried out according to procedures in Step 10B for Example 3.60 to give D-2-[4'-(Benzylcarbamoyl-methyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester in 31% yield. 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.9 (d, *J*=6.8 Hz, 3 H) 1.0 (d, *J*=6.6 Hz, 3 H) 1.2 (s, 9 H) 2.1 (m, 1 H) 3.7 (m, 3 H) 4.5 (d, *J*=5.8 Hz, 2 H) 5.1 (d, *J*=9.9 Hz, 1 H) 5.7 (s, 1 H) 7.3 (m, 5 H) 7.4 (d, *J*=8.1 Hz, 2 H) 7.5 (d, *J*=8.3 Hz, 2 H) 7.7 (d, *J*=8.3 Hz, 2 H) 7.9 (d, *J*=8.3 Hz, 2 H).

[00281] Step 10C: Removal of t-butyl ester was done according to procedures in Step 10C for Example 3.60 in quantitative yield. 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.8 (dd, J=26.3, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 3.5 (s, 2 H) 3.6 (d, J=5.6 Hz, 1 H) 4.3 (d, J=5.6 Hz, 2 H) 7.2 (m, 5

H) 7.3 (d, J=8.3 Hz, 2 H) 7.5 (d, J=8.3 Hz, 2 H) 7.7 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.8 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 8.5 (s, 1 H).

[00282] Examples 3.62, 3.63, 3.64, 3.65, 3.66, 3.67, 3.68, 3.69, 3.70, 3.71, 3.72, 3.73, 3.74, 3.75, 3.76, 3,77, 3,78, 3,79, 3.80 were made based on Scheme 11.

Example 3.62



2-[4'-(4-Fluoro-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

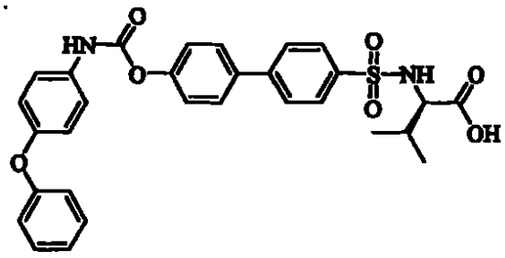
[00283] Step 11A: 2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester (300 mg, 0.74 mmol, 1 equiv.) was dissolved in diethyl ether (7.5 mL), followed by the addition of 4-fluorophenylisocyanate (101mg, 0.74 mmol, 1 equiv.) and Et_3N (1 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 50 min. Solid precipitated from the reaction mixture. Solid was collected by filtration and washed with ether to yield 2-[4'-(4-Fluoro-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester in 57% yield (228 mg).

[00284] 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.87 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.03 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.20 (s, 9 H) 2.05 (m, 1 H) 3.67 (dd, *J*=9.98, 4.42 Hz, 1 H) 5.13 (d, *J*=9.85 Hz, 1 H) 6.95 (s, 1 H) 7.05 (d, *J*=9.09 Hz, 2 H) 7.30 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.43 (m, 2 H) 7.57 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.67 (s, 2 H) 7.90 (d, *J*=8.34 Hz, 2 H).

[00285] Step 11B: 2-[4'-(4-Fluoro-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester (223 mg) was dissolved in dichloroethane (7.5 mL) and added with TFA (2.5mL). The mixture was stirred at room temperature for 5 hrs and TLC indicated the reaction was complete. Regular work-up and column chromatography to give 2-[4'-(4-Fluoro-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid in 89% yield (178 mg).

[00286] 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.81 (d, *J*=6.57 Hz, 3 H) 0.84 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.96 (m, 1 H) 3.56 (dd, *J*=9.35, 6.06 Hz, 1 H) 7.19 (t, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.37 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.54 (dd, *J*=9.09, 4.80 Hz, 2 H) 7.79 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.86 (d, *J*=4.29 Hz, 4 H) 8.08 (d, *J*=9.35 Hz, 1 H) 10.34 (s, 1 H).

Example 3.63



D-3-Methyl-2-[4'-(4-phenoxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

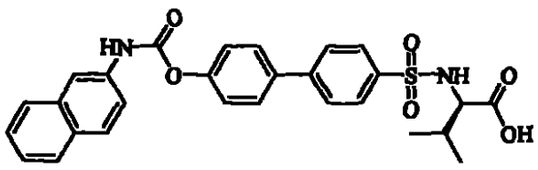
[00287] The title compound, D-3-Methyl-2-[4'-(4-phenoxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid , was prepared according to procedures similar to that of Example 3.62.

[00288] Step 11A: Reaction of 4-phenoxyphenyl isocyanate with D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid- *tert*-butyl ester to obtain D-3-Methyl-2-[4'-(4-phenoxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid *tert*-butyl ester was done according to procedures in Step 11A for Example 3.62. Yield: 36%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) □ ppm 0.9 (dd, J=8.2, 6.9 Hz, 6 H) 1.2 (s, 9 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, J=9.6, 6.3 Hz, 1 H) 7.0 (dd, J=8.6, 1.0 Hz, 2 H) 7.0 (d, J=9.1 Hz, 2 H) 7.1 (m, 1 H) 7.4 (m, 4 H) 7.5 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.7 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.9 (m, 4 H) 8.2 (d, J=9.6 Hz, 1 H) 10.3 (s, 1 H).

[00289] Step 11B: Conversion of D-3-Methyl-2-[4'-(4-phenoxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid *tert*-butyl ester to D-3-Methyl-2-[4'-(4-phenoxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid was done according to procedures in Step 11B for Example 3.62. Yield: 87%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=12.1, 6.8 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.6 (dd, J=9.3, 6.1 Hz, 1 H) 7.0 (m, 2 H) 7.0

(d, J=9.1 Hz, 2 H) 7.1 (t, J=7.3 Hz, 1 H) 7.4 (m, 4 H) 7.5 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.8 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.9 (d, J=4.8 Hz, 4 H) 8.1 (d, J=9.3 Hz, 1 H) 10.3 (s, 1 H).

Example 3.64



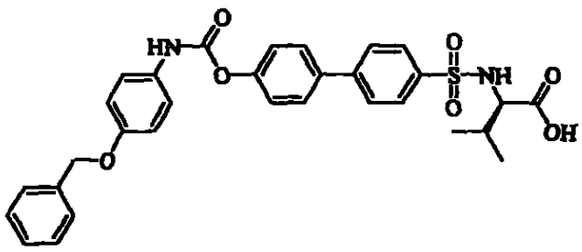
D-3-Methyl-2-[4'-(naphthalen-2-ylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

[00290] The title compound, D-3-Methyl-2-[4'-(naphthalen-2-ylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.62.

[00291] Step 11A: Reaction of 2-naphthyl isocyanate with D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid- *tert*-butyl ester to obtain D-3-Methyl-2-[4'-(naphthalen-2-ylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid *tert*-butyl ester was done according to procedures in Step 11A for Example 3.62. Yield: 16%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) □ ppm 0.9 (dd, J=8.2, 6.9 Hz, 6 H) 1.2 (s, 9 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, J=9.9, 6.3 Hz, 1 H) 7.4 (m, 3 H) 7.5 (m, 1 H) 7.6 (dd, J=8.8, 2.3 Hz, 1 H) 7.8 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.9 (m, 7 H) 8.1 (s, 1 H) 8.2 (d, J=9.9 Hz, 1 H) 10.5 (s, 1 H).

[00292] Step 11B: Conversion of D-3-Methyl-2-[4'-(naphthalen-2-ylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid *tert*-butyl ester to D-3-Methyl-2-[4'-(naphthalen-2-ylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid was done according to procedures in Step 11B for Example 3.62. Yield: 40%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=12.5, 6.7 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 3.6 (dd, J=9.1, 5.8 Hz, 1 H) 7.4 (m, 3 H) 7.5 (m, 1 H) 7.6 (dd, J=8.8, 2.3 Hz, 1 H) 7.9 (m, 9 H) 8.1 (m, 2 H) 10.5 (s, 1 H) 12.6 (s, 1 H).

Example 3.65



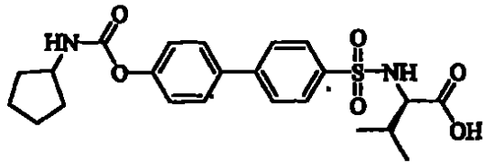
D-2-[4'-(4-Benzyloxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

[00293] The title compound, D-2-[4'-(4-Benzyloxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.62.

[00294] Step 11A: Reaction of 4-benzyloxyphenyl isocyanate with D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid- *tert*-butyl ester to obtain D-2-[4'-(4-Benzyloxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester was done according to procedures in Step 11A for Example 3.62. Yield: 37%. NMR: G8701-142. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.9 (dd, J=8.1, 6.8 Hz, 6 H) 1.2 (s, 9 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, J=9.9, 6.3 Hz, 1 H) 5.1 (s, 2 H) 7.0 (d, J=9.1 Hz, 2 H) 7.4 (m, 9 H) 7.7 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.9 (m, 4 H) 8.2 (d, J=9.6 Hz, 1 H) 10.1 (s, 1 H).

[00295] Step 11B: Conversion of D-2-[4'-(4-Benzyloxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester to D-2-[4'-(4-Benzyloxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid was done according to procedures in Step 11B for Example 3.62. Yield: 60%. NMR: G8701-151. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=12.1, 6.8 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.6 (dd, J=9.3, 6.1 Hz, 1 H) 5.1 (s, 2 H) 7.0 (d, J=9.1 Hz, 2 H) 7.4 (m, 9 H) 7.8 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.9 (m, 4 H) 8.1 (d, J=9.3 Hz, 1 H) 10.1 (s, 1 H).

Example 3.66



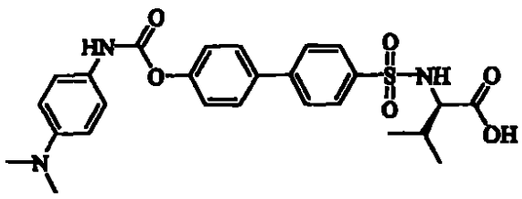
D-2-(4'-Cyclopentylcarbamoyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid

[00296] The title compound, D-2-(4'-Cyclopentylcarbamoyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.62.

[00297] Step 11A: Reaction of cyclopentyl isocyanate with D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid- *tert*-butyl ester to obtain D-2-(4'-Cyclopentylcarbamoyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester was done according to procedures in Step 11A for Example 3.62. Yield: 70%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.9 (dd, J=8.1, 7.1 Hz, 6 H) 1.2 (s, 9 H) 1.5 (m, 4 H) 1.7 (m, 2 H) 1.8 (m, 2 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, J=9.6, 6.3 Hz, 1 H) 3.9 (m, 1 H) 7.2 (d, J=8.6 Hz, 2 H) 7.7 (d, J=8.6 Hz, 2 H) 7.8 (m, 5 H) 8.2 (d, J=9.6 Hz, 1 H).

[00298] Step 11B: Conversion of D-2-(4'-Cyclopentylcarbamoyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester to D-2-(4'-Cyclopentylcarbamoyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid was done according to procedures in Step 11B for Example 3.62. Yield: 91%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (m, 6 H) 1.5 (m, 4 H) 1.7 (d, J=4.5 Hz, 2 H) 1.8 (m, 2 H) 1.9 (m, 1 H) 3.6 (dd, J=9.3, 6.1 Hz, 1 H) 3.9 (m, 1 H) 7.2 (d, J=8.6 Hz, 2 H) 7.7 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.8 (s, 5 H) 8.1 (d, J=9.3 Hz, 1 H) 12.6 (s, 1 H).

Example 3.67



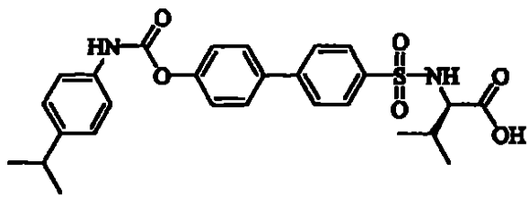
D-2-[4'-(4-Dimethylamino-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

[00299] The title compound, D-2-[4'-(4-Dimethylamino-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.62.

[00300] Step 11A: Coupling of 4-(dimethylamino)phenyl isocyanate with D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid- *tert*-butyl ester to obtain D- 2-[4'-(4-Dimethylamino-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester was done according to procedures in Step 11A for Example 3.62. Yield: 28%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.9 (dd, J=8.1, 6.8 Hz, 6 H) 1.2 (s, 9 H) 1.9 (m, 1 H) 2.8 (s, 6 H) 3.5 (dd, J=9.6, 6.3 Hz, 1 H) 6.7 (d, J=9.1 Hz, 2 H) 7.3 (d, J=8.6 Hz, 4 H) 7.7 (d, J=8.6 Hz, 2 H) 7.8 (m, 4 H) 8.2 (d, J=9.9 Hz, 1 H) 9.9 (s, 1 H).

[00301] Step 11B: Conversion of D- 2-[4'-(4-Dimethylamino-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester to D- 2-[4'-(4-Dimethylamino-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid was done according to procedures in Step 11B for Example 3.62. Yield: 99%. NMR: G8701-161. 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.8 (dd, J=23.7, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 3.1 (s, 6 H) 3.6 (d, J=5.6 Hz, 1 H) 7.2 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.4 (d, J=9.1 Hz, 3 H) 7.6 (m, 6 H) 7.8 (d, J=8.8 Hz, 2 H).

Example 3.68



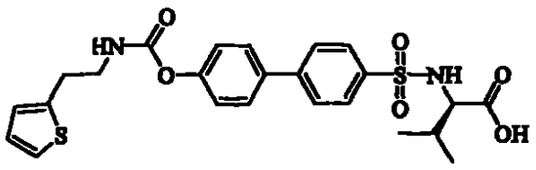
D-2-[4'-(4-Isopropyl-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

[00302] The title compound, D-2-[4'-(4-Isopropyl-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.62.

[00303] Step 11A: Reaction of 4-isopropylphenyl isocyanate with D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid- *tert*-butyl ester to obtain D-2-[4'-(4-Isopropyl-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester was done according to procedures in Step 11A for Example 3.62. Yield: 38%. NMR: G8701-158. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.9 (dd, J=8.3, 6.8 Hz, 6 H) 1.2 (m, 15 H) 1.9 (m, 1 H) 2.8 (m, 1 H) 3.5 (dd, J=9.9, 6.3 Hz, 1 H) 7.2 (d, J=8.6 Hz, 2 H) 7.4 (d, J=8.6 Hz, 2 H) 7.4 (d, J=8.6 Hz, 2 H) 7.7 (d, J=8.6 Hz, 2 H) 7.9 (m, 4 H) 8.2 (d, J=9.9 Hz, 1 H) 10.2 (s, 1 H).

[00304] Step 11B: Conversion of D-2-[4'-(4-Isopropyl-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester to D-2-[4'-(4-Isopropyl-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid was done according to procedures in Step 11B for Example 3.62. Yield: 34%. NMR: G8701-165. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=12.4, 6.8 Hz, 6 H) 1.2 (d, J=6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 2.8 (m, 1 H) 3.6 (dd, J=9.3, 6.1 Hz, 1 H) 7.2 (d, J=8.6 Hz, 2 H) 7.4 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.4 (d, J=8.6 Hz, 2 H) 7.8 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.9 (m, 4 H) 8.1 (d, J=9.3 Hz, 1 H) 10.2 (s, 1 H) 12.6 (s, 1 H).

Example 3.69



D-3-Methyl-2-[4'-(2-thiophen-2-yl-ethylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

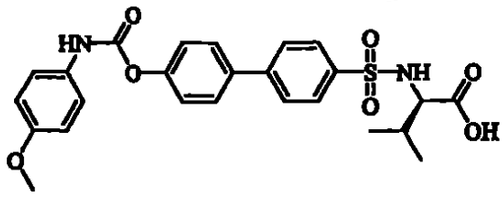
[00305] The title compound, D-3-Methyl-2-[4'-(2-thiophen-2-yl-ethylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid , was prepared according to procedures similar to that of Example 3.62.

[00306] Step 11A: Reaction of 2-(2-thienyl)ethyl isocyanate with D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid- *tert*-butyl ester to obtain D-3-Methyl-2-[4'-(2-thiophen-2-yl-ethylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid *tert*-butyl ester was done according to procedures in Step 11A for Example 3.62. Yield: 63%. NMR: G8701-169. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.9 (dd, J=8.3, 7.1 Hz, 6 H) 1.2 (s, 9 H) 1.9 (m, 1 H) 3.0 (t, J=7.1 Hz, 2 H) 3.3 (m, 2 H) 3.5 (dd, J=9.6, 6.3 Hz, 1 H) 7.0 (m, 2 H) 7.2 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.4 (dd, J=5.1, 1.3 Hz, 1 H) 7.7 (d, J=8.6 Hz, 2 H) 7.8 (d, J=2.3 Hz, 4 H) 8.0 (t, J=5.7 Hz, 1 H) 8.2 (d, J=9.9 Hz, 1 H).

[00307] Step 11B: Conversion of D-3-Methyl-2-[4'-(2-thiophen-2-yl-ethylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid *tert*-butyl ester to D-3-Methyl-2-[4'-(2-thiophen-2-yl-ethylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid was done according to procedures in Step 11B for Example 3.62. Yield: 43%. NMR: G8701-175. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, *J*=12.4, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 3.0 (t, *J*=7.1 Hz, 2 H) 3.3 (m, 2 H) 3.6 (dd, *J*=9.2, 5.9 Hz, 1 H) 6.9 (d, *J*=3.3 Hz, 1 H) 7.0 (dd, *J*=5.1, 3.3 Hz, 1 H) 7.2 (d, *J*=8.8 Hz, 2 H) 7.4 (dd, *J*=5.1, 1.3 Hz, 1 H) 7.7 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H) 7.8 (s, 4 H) 8.0 (t, *J*=5.8 Hz, 1 H) 8.1 (d, *J*=9.3 Hz, 1 H).

000108

Example 3.70



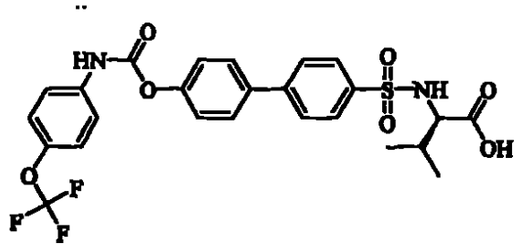
D-3-Methyl-2-[4'-(4-trifluoromethoxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

[00308] The title compound, D-3-Methyl-2-[4'-(4-trifluoromethoxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid , was prepared according to procedures similar to that of Example 3.62.

[00309] Step 11A: Reaction of 4-methoxyphenyl isocyanate with D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid- *tert*-butyl ester to obtain D-2-[4'-(4-Methoxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester was done according to procedures in Step 11A for Example 3.62. Yield: 49%. NMR: G8701-199. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.9 (dd, J=8.3, 6.8 Hz, 6 H) 1.2 (s, 9 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, J=9.9, 6.3 Hz, 1 H) 3.7 (s, 3 H) 6.9 (d, J=9.1 Hz, 2 H) 7.4 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.4 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.7 (d, J=8.6 Hz, 2 H) 7.9 (m, 4 H) 8.2 (d, J=9.9 Hz, 1 H) 10.1 (s, 1 H).

[00310] Step 11B: Reaction of D-2-[4'-(4-Methoxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester to D-3-Methyl-2-[4'-(4-trifluoromethoxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid was done according to procedures in Step 11B for Example 3.62. Yield: 91%. NMR: G9241-4. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=12.6, 6.8 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.6 (dd, J=9.3, 5.8 Hz, 1 H) 3.7 (s, 3 H) 6.9 (d, J=9.1 Hz, 2 H) 7.4 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.4 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.8 (d, J=8.6 Hz, 2 H) 7.9 (m, 4 H) 8.1 (d, J=9.3 Hz, 1 H) 10.1 (s, 1 H) 12.6 (s, 1 H).

Example 3.71



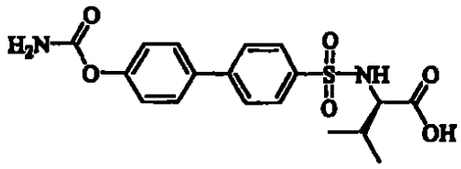
D-3-Methyl-2-[4'-(4-trifluoromethoxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

[00311] The title compound, D-3-Methyl-2-[4'-(4-trifluoromethoxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.62.

[00312] Step 11A: To a solution of D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid- *tert*-butyl ester (300 mg, 0.74 mmol, 1 eq.) in diethyl ether (10 mL) were added with 4-(trifluoromethoxy)phenyl isocyanate (123 uL, 0.81 mmol, 1.1 eq.) and triethylamine (124 uL, 0.89 mmol, 1.2 eq.) under argon and stirred at room temperature. After reaction complete, regular work-up and flash column chromatography to provide D-3-Methyl-2-[4'-(4-trifluoromethoxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid *tert*-butyl ester in 37% yield. NMR: G8701-200. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) □ ppm 0.9 (dd, J=8.1, 6.8 Hz, 6 H) 1.2 (s, 9 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, J=9.9, 6.3 Hz, 1 NMR: G8701-200. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.9 (dd, J=8.1, 6.8 Hz, 6 H) 1.2 (s, 9 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, J=9.9, 6.3 Hz, 1 H) 7.4 (m, 4 H) 7.6 (d, J=9.3 Hz, 2 H) 7.8 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.9 (m, 4 H) 8.2 (d, J=9.6 Hz, 1 H) 10.5 (s, 1 H).

[00313] Step 11B: Conversion of D-3-Methyl-2-[4'-(4-trifluoromethoxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid *tert*-butyl ester to D-3-Methyl-2-[4'-(4-trifluoromethoxy-phenylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid was done according to procedures in Step 11B for Example 3.62. Yield: 76%. NMR: G9241-5. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=12.4, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 3.6 (dd, J=9.3, 5.8 Hz, 1 H) 7.4 (m, 4 H) 7.6 (d, J=9.1 Hz, 2 H) 7.8 (d, J=8.6 Hz, 2 H) 7.9 (m, 4 H) 8.1 (d, J=9.3 Hz, 1 H) 10.5 (s, 1 H).

Example 3.72



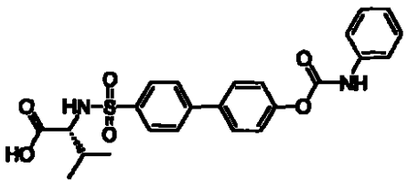
D- 2-(4'-Carbamoyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid

[00314] The title compound, D- 2-(4'-Carbamoyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.62.

[00315] Step 11A: To a solution of D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid- *tert*-butyl ester (500 mg, 1.23 mmol, 1 eq.) in CH2Cl2 (2 mL) were added with chlorosulfonyl isocyanate (107 uL, 1.23 mmol, 1 eq.) under argon and stirred at room temperature for 16 hours. Reaction was complete as determined by TLC. After work-up and flash column chromatography, D-2-(4'-Carbamoyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester was obtained. Yield: 45%. NMR: G9241-38. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.9 (dd, J=8.3, 6.8 Hz, 6 H) 1.1 (s, 9 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, J=9.9, 6.3 Hz, 1 H) 7.2 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.7 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.8 (d, J=1.0 Hz, 4 H) 8.2 (d, J=9.6 Hz, 1 H).

[00316] Step 11B: Conversion of D-2-(4'-Carbamoyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester to D-2-(4'-Carbamoyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid was done according to procedures in Step 11B for Example 3.62. Yield: 85%. NMR: G9241-46. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=12.4, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 3.6 (dd, J=9.3, 5.8 Hz, 1 H) 7.0 (s, 1 H) 7.2 (m, 3 H) 7.7 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.8 (s, 4 H) 8.1 (d, J=9.3 Hz, 1 H).

Example 3.73



3-Methyl-2-(4'-phenylcarbamoyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-butyric acid tert-butyl ester

[00317] The title compound, 3-Methyl-2-(4'-phenylcarbamoyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-butyric acid tert-butyl ester , was prepared according to procedures similar to that of Example 3.62.

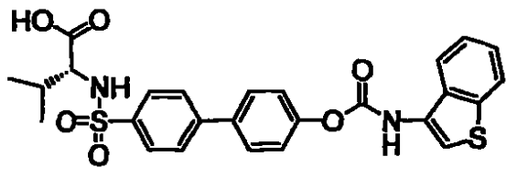
[00318] Step 11A: 2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester (300 mg, 0.74 mmol, 1 equiv) was dissolved in diethyl ether (7.5 mL), added with phenylisocyanate (0.08 mL, 0.74 mmol, 1 equiv) followed by Et_3N (1 mL). The reaction mixture was stirred for 4 hours. Solid precipitated from the reaction mixture was collected by filtration, washed with ether to afford with 76% yield (295 mg).

[00319] 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.87 (d, *J*=7.07 Hz, 3 H) 1.03 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.20 (s, 9 H) 2.07 (m, 1 H) 3.67 (dd, *J*=9.98, 4.42 Hz, 1 H) 5.13 (d, *J*=9.85 Hz, 1 H) 6.96 (s, 1 H) 7.14 (m, 1 H) 7.31 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.36 (m, 2 H) 7.47 (d, *J*=8.34 Hz, 2 H) 7.58 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.66 (d, *J*=8.34 Hz, 2 H) 7.91 (m, 2 H).

[00320] Step 11B: 3-Methyl-2-(4'-phenylcarbamoyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-butyric acid tert-butyl ester (200mg) was hydrolyzed according procedures in Step 11B for Example 3.62 to afford 3-Methyl-2-(4'-phenylcarbamoyloxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-butyric acid in 88% yield (158mg).

[00321] 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.82 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.85 (d, *J*=6.57 Hz, 3 H) 1.95 (m, 1 H) 3.56 (dd, *J*=9.22, 5.94 Hz, 1 H) 3.90 (s, 1 H) 7.07 (m, 1 H) 7.35 (m, 4 H) 7.53 (d, *J*=7.83 Hz, 2 H) 7.80 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.86 (d, *J*=22.23 Hz, 4 H) 8.08 (d, *J*=9.35 Hz, 1 H) 10.29 (s, 1 H).

Example 3.74



2-[4'-(Benzo[b]thiophen-3-ylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester

[00322] The title compound, 2-[4'-(Benzo[b]thiophen-3-ylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.62.

[00323] Step 11A: 2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester (300 mg, 0.74 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in diethyl ether (7.5 mL), added with 1-Benzothiophene-3-yl isocyanate (129.6 mg, 0.74 mmol, 1.0 equiv.) and 0.5 mL of Et_3N. Solid precipitated from the reaction mixture in 5 min. The mixture was continued to stir at room temperature for 2 hrs and the precipitate was collected by filtration, washed with ether to give in 43% yield (187mg).

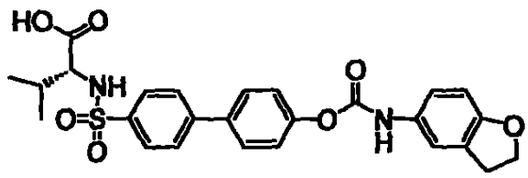
[00324] 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.87 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.03 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.20 (s, 9 H) 2.08 (m, 1 H) 3.68 (m, 1 H) 5.15 (d, *J*=10.11 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.34 Hz, 2 H) 7.43 (m, 2 H) 7.60 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.67 (d, *J*=8.34 Hz, 3 H) 7.74 (s, 1 H) 7.90 (t, *J*=9.09 Hz, 3 H).

[00325] Step 11B: 2-[4'-(Benzo[b]thiophen-3-ylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester (180 mg, 0.31 mmol) was dissolved in methylene chloride under N_2 atmosphere, added with TFA (2mL) at 0°C and stirred for 4 hrs. Solvent was evaporated and the product dried under high vacuum to give 2-[4'-(Benzo[b]thiophen-3-ylcarbamoyloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid in 66%yield (108mg).

[00326] 1H NMR (400 MHz, MeOD)δppm 0.82 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.89 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.20 (s, 1 H) 3.54 (d, *J*=5.05 Hz, 1 H) 7.30 (m, 2 H) 7.35 (m, 2 H) 7.58 (s, 1 H) 7.66 (d,

J=8.59 Hz, 2 H) 7.71 (d, J=8.59 Hz, 2 H) 7.78 (d, J=7.83 Hz, 1 H) 7.84 (d, J=8.59 Hz, 2 H) 7.92 (d, J=8.08 Hz, 1 H)

Example 3.75

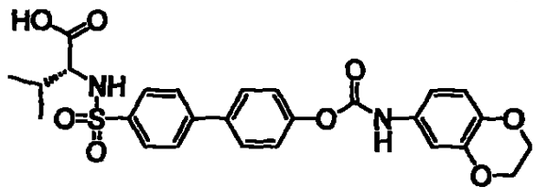


N-[(4'-{[2,3-dihydro-1-benzofuran-5-ylamino)carbonyl]oxy}-1,1'-biphenyl-4yl)sulfonyl]-D-valine

[00327] The title compound, N-[(4'-{[2,3-dihydro-1-benzofuran-5-ylamino)carbonyl]oxy}-1,1'-biphenyl-4-yl)sulfonyl]-D-valine, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.62.

[00328] Step 11A and 11B: Yield 40%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.80 (d, J=6.82 Hz, 3 H) 0.85 (d, J=6.82 Hz, 3 H) 1.98 (m, 1 H) 3.17 (t, J=8.97 Hz, 2 H) 3.39 (s, 1 H) 4.50 (t, J=8.59 Hz, 2 H) 6.72 (d, J=8.34 Hz, 1 H) 7.19 (d, J=8.84 Hz, 1 H) 7.34 (d, J=8.59 Hz, 2 H) 7.40 (s, 1 H) 7.78 (d, J=8.59 Hz, 2 H) 7.85 (d, J=1.77 Hz, 4 H) 10.05 (s, 1 H).

Example 3.76

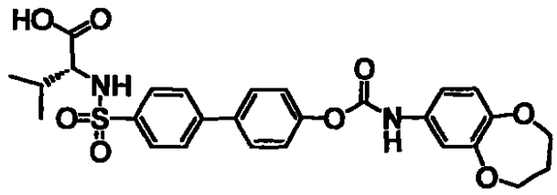


N-[(4'-{[(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-ylamino)carbonyl]oxy}-1,1'-biphenyl-4-yl)sulfonyl]-D-valine

[00329] The title compound, N-[(4'-{[(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-ylamino)carbonyl]oxy}-1,1'-biphenyl-4-yl)sulfonyl]-D-valine , was prepared according to procedures similar to that of Example 3.62.

[00330] Step 11A and: Yield 62%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.80 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.85 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.98 (m, 1 H) 3.42 (s, 1 H) 4.21 (m, 4 H) 6.81 (d, *J*=8.84 Hz, 1 H) 6.94 (d, *J*=10.86 Hz, 1 H) 7.09 (s, 1 H) 7.34 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.78 (d, *J*=8.84 Hz, 3 H) 7.85 (d, *J*=1.77 Hz, 4 H) 10.11 (s, 1H).

Example 3.77

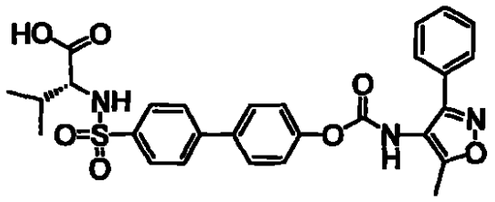


N-[(4'-{[(3,4-dihydro-2H-1,5-benzodioxepin-7-ylamino)carbonyl]oxy}-1,1'-biphenyl-4-yl)sulfonyl]-D-valine

[00331] The title compound, N-[(4'-{[(3,4-dihydro-2H-1,5-benzodioxepin-7-ylamino)carbonyl]oxy}-1,1'-biphenyl-4-yl)sulfonyl]-D-valine, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.62.

[00332] Step 11A and 11B: Yield 55%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.80 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.85 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.97 (m, 1 H) 2.08 (m, 2 H) 3.45 (s, 1 H) 4.08 (m, 4 H) 6.94 (d, *J*=8.59 Hz, 1 H) 7.06 (d, *J*=2.53 Hz, 1 H) 7.18 (d, *J*=2.27 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.79 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.85 (d, *J*=3.79 Hz, 4 H) 7.88 (s, 1 H) 10.21 (s, 1 H).

Example 3.78



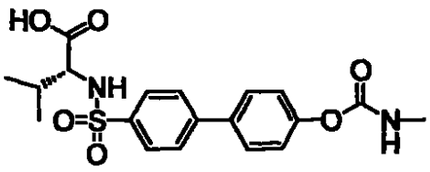
N-[(4'-{[(5-methyl-3-phenylisoxazol-4-yl)amino)carbonyl]oxy}-1,1'-biphenyl-4-yl)sulfonyl]-D-valine

[00333] The title compound, N-[(4'-{[(5-methyl-3-phenylisoxazol-4-yl)amino)carbonyl]oxy}-1,1'-biphenyl-4-yl)sulfonyl]-D-valine , was prepared according to procedures similar to that of Example 3.62.

[00334] Step 11B: Yield 75%.1H NMR (400 MHz, ACETONITRILE-D3) δ ppm 0.63 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.74 (d, *J*=6.57 Hz, 3 H) 1.83-1.88 (m, 1 H) 2.20 (s, 1H) 2.34 (m, 3 H) 3.81

(s, 1 H) 6.56 (s, 1 H) 6.66 (s, 1 H) 7.12 (d, *J*=7.83 Hz, 1 H) 7.45 (d, *J*=4.80 Hz, 4 H) 7.59 (m, 4 H) 7.68 (d, *J*=3.54 Hz, 2 H) 7.80 (d, *J*=8.08 Hz, 2 H).

Example 3.79

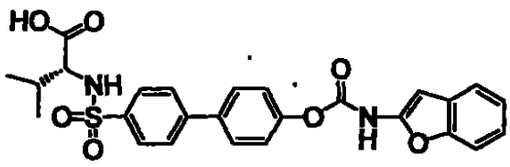


N-[(4'-{[(methylamino)carbonyl]oxy}-1,1'-biphenyl-4-yl)sulfonyl]-D-valine

[00335] The title compound, N-[(4'-{[(methylamino)carbonyl]oxy}-1,1'-biphenyl-4-yl)sulfonyl]-D-valine, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.62.

[00336] Step 11B: Yield 90%. 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.80 (d, *J*=8.34 Hz, 3 H) 0.87 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.91-2.02 (m, 1 H) 2.71 (s, 3 H) 3.52 (d, *J*=5.05 Hz, 1 H) 7.11 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.58 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.66 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.81 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H).

Example 3.80



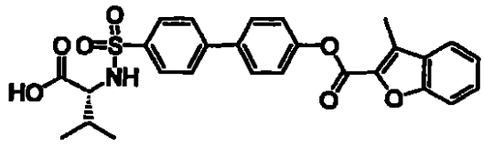
N-[(4'-{[(1-benzofuran-2-ylamino)carbonyl]oxy}-1,1'-biphenyl-4-yl)sulfonyl]-D-valine

[00337] Step 12A: 2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid (314 mg, 0.9 mmol) dissolved in methylene chloride (10 mL) and diethyl ether (20 mL) was added with benzofuran isocyanate (143 mg, 0.9 mmol, 1 equiv) and triethyl amine (363 mg, 3.6 mmol, 4 equiv). The mixture was stirred at room temperature overnight. Solid precipitated from reaction mixture was collected by filtration followed by column chromatography (silica gel, 5% MeOH/CH2Cl2). 76 mg of white solid was obtained in 16% yield.

[00338] 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.74-1.00 (m, 6 H) 1.90-2.07 (m, 1 H) 3.22-3.48 (m, 1 H) 6.86 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.10-7.28 (m, 2 H) 7.33-7.62 (m, 4 H) 7.69-7.83 (m, 4 H) 7.86 (s, 1 H).

[00339] Examples 81 and 82 were made based on Scheme 13.

Example 81

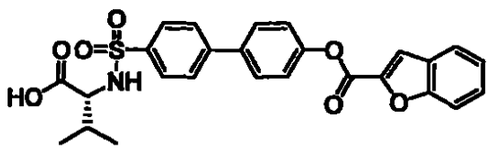


D-3-Methyl-benzofuran-2-carboxylic acid 4'-(1-carboxy-2-methyl-propylsulfamoyl)-biphenyl-4-yl ester

[00340] Step 13A: A mixture of D-2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester (305 mg, 0.75 mmol, 1 eq), 3-Methyl-benzofuran-2-carboxylic acid (131 mg, 0.74 mmol, 1 eq), 4-dimethylaminopyridine (DMAP, 95 mg, 0.77 mol, 1 eq), and 1,3-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 240 mg, 1.17 mmol, 1.6 eq) dissolved in 5 mL of dichloromethane under nitrogen atmosphere was allowed to react at room temperature for 3.5 hrs. Regular work-up and column chromatography (10% EtOAc in hexane) to give D-3-Methyl-benzofuran-2-carboxylic acid 4'-(1-tert-butoxycarbonyl-2-methyl-propylsulfamoyl)-biphenyl-4-yl ester (300 mg) in 71% yield. NMR: G8475-101. 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.9 (d, *J*=7.1 Hz, 3 H) 1.0 (d, *J*=6.8 Hz, 3 H) 1.2 (s, 9 H) 2.1 (m, 1 H) 2.7 (s, 3 H) 3.7 (dd, *J*=10.0, 4.4 Hz, 1 H) 5.1 (d, *J*=9.9 Hz, 1 H) 7.4 (m, 3 H) 7.5 (m, 1 H) 7.6 (t, *J*=8.0 Hz, 3 H) 7.7 (m, 3 H) 7.9 (d, *J*=8.3 Hz, 2 H).

[00341] Step 13B: Removal of t-butyl ester was done according to procedures in Step 11B for Example 3.62 in quantitative yield. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=12.1, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 2.7 (s, 3 H) 3.6 (dd, J=9.2, 5.9 Hz, 1 H) 7.4 (t, J=7.6 Hz, 1 H) 7.5 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.6 (t, J=8.2 Hz, 1 H) 7.8 (d, J=8.3 Hz, 1 H) 7.9 (m, 7 H) 8.1 (d, J=9.3 Hz, 1 H).

Example 3.82



Benzofuran-2-carboxylic acid 4'-(1-tert-butoxycarbonyl-2-methyl-propylsulfamoyl)-biphenyl-4-yl ester

[00342] The title compound, Benzofuran-2-carboxylic acid 4'-(1-tert-butoxycarbonyl-2-methyl-propylsulfamoyl)-biphenyl-4-yl ester, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.81.

[00343] Step 13A: 2-Benzofuran carbocarboxylic acid (400.5 mg, 2.47 mmol, 1 equiv.) dissolved in dry CH_2Cl_2 (50mL) was added with DCC (1.019 g, 4.94 mmol, 2 equiv) and stirred under N_2 for 15min. Then 2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester (1.0 g, 2.47 mmol, 1 equiv.) was introduced to the reaction mixture, followed by the addition of DMAP (50 mg, 0.41 mmol,). The mixture was allowed to stir at room temperature overnight. The reaction mixture was then diluted with CH_2Cl_2, washed with H_2O and brine. Organic layer dried over $MgSO_4$ and solvent removed to yield crude product. Residue was dissolved in EtOAc and purified by column chromatograph (silica gel, 20%EtOAc/ n-Hexane) to afford G9058-53-1 in 30.5% yield (325 mg).

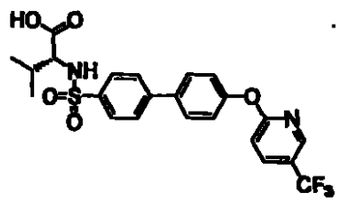
[00344] 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.87 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.03 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.21 (s, 9 H) 2.07 (m, 1 H) 3.68 (dd, *J*=9.85, 4.55 Hz, 1 H) 5.15 (d, *J*=9.85 Hz, 1 H) 7.37 (m, 3 H) 7.53 (t, *J*=7.83 Hz, 1 H) 7.66 (m, 5 H) 7.77 (m, 2 H) 7.92 (d, *J*=8.34 Hz, 2 H).

[00345] Step 13B: Benzofuran-2-carboxylic acid 4'-(1-tert-butoxycarbonyl-2-methyl-propylsulfamoyl)-biphenyl-4-yl ester (325 mg) was dissolved in dichloromethane (15 mL) and added with TFA. The solution was stirred at room temperature for 7 hrs. Solvent was removed by rotovap and crude product purified by column chromatography (5-20% MeOH/ EtOAc) to yield Benzofuran-2-carboxylic acid 4'-(1-carboxy-2-methyl-propylsulfamoyl)-biphenyl-4-yl ester in 76% yield (241mg).

[00346] 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.80 (d, *J*=6.57 Hz, 3 H) 0.87 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 2.04 (m, 1 H) 3.24 (m, 1 H) 7.43 (t, *J*=7.58 Hz, 1 H) 7.49 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.60 (t, *J*=7.96 Hz, 1 H) 7.70 (d, *J*=9.85 Hz, 1 H) 7.85 (m, 7 H) 8.08 (s, 1 H).

[00347] Examples 3.83, 3.84, 3.85, 3.86, 3.87, 3.88, 3.89 were made based on Scheme 14.

Example 3.83



3-Methyl-2-[4'-(5-trifluoromethyl-pyridin-2-yloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid tert-butyl ester

[00348] Step 14A: 2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester (100 mg, 0.25 mmol, 1.0 equiv.), 2-Chloro-5-trifluoro methyl pyridine (45.4 mg, 0.25 mmol, 1 equiv.), and K_2CO_3 (86.4 mg, 0.63 mmol, 2.5 equiv) were mixed in DMF (8 mL) and heat to 110°C for 4.5 hr. Reaction was complete as determined by TLC. Then the reaction mixture was cool to room temperature, diluted with EtOAc, washed with brine and dried over $MgSO_4$. After removing solvent, crude product was purified by column chromatography (silica gel, 20% EtOAc / n-Hexane) to afford G9058-109-1 in 74% yield (100 mg).

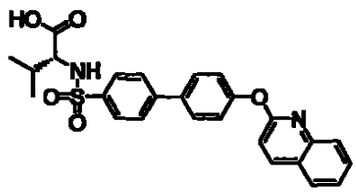
[00349] 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.80 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.96 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.14 (s, 9 H) 2.01 (m, 1 H) 3.61 (m, 1 H) 5.07 (d, *J*=9.85 Hz, 1 H) 7.03 (d, *J*=8.59 Hz, 1 H) 7.19 (s, 1 H) 7.21 (s, 1 H) 7.55 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.62 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.85 (d, *J*=2.02 Hz, 2 H) 7.88 (d, *J*=6.06 Hz, 1 H) 8.40 (s, 1 H).

[00350] Step 14B: 3-Methyl-2-[4'-(5-trifluoromethyl-pyridin-2-yloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid tert-butyl ester (97 mg) was dissolved in CH_2Cl_2 (6mL) and added with TFA (2 mL). Reaction was complete in 6 hrs as determined by TLC. After removing solvent, residue was purified by column chromatography (10%MeOH / CH_2Cl_2) to

afford 3-Methyl-2-[4'-(5-trifluoromethyl-pyridin-2-yloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid in 66% yield (54.5 mg).

[00351] 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.81 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.88 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.97 (m, 1 H) 3.55 (d, *J*=5.31 Hz, 1 H) 7.09 (d, *J*=8.59 Hz, 1 H) 7.19 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.68 (dd, *J*=14.65, 8.59 Hz, 4 H) 7.83 (d, *J*=8.34 Hz, 2 H) 8.02 (d, *J*=11.37 Hz, 1 H) 8.35 (d, *J*=2.53 Hz, 1 H).

Example 3.84



3-Methyl-2-[4'-(quinolin-2-yloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid tert-butyl ester

[00352] The title compound, 3-Methyl-2-[4'-(quinolin-2-yloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid tert-butyl ester, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.83.

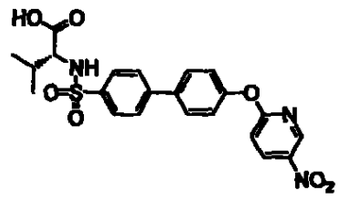
[00353] Step 14A [9058-120-1]: 2-(4'-Hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester (200 mg, 0.49 mmol, 1 equiv.), 2-Chloroquinoline (242 mg, 1.48 mmol, 3 equiv) and Cs_2CO_3 (402 mg, 1.235mmol, 2.5 equiv.) were mixed in DMF (8 mL) and stirred at 100°C for 7 hrs. Reaction mixture was cool to room temperature then placed in an ice bath and added with water. The solid precipitated from the mixture was collected by filtration and washed with water. After drying, 174 mg of yellow solid was obtained in 66% yield.

[00354] 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.88 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.03 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.22 (s, 9 H) 2.07 (m, 1 H) 3.68 (dd, *J*=9.85, 4.55 Hz, 1 H) 5.15 (d, *J*=9.85 Hz, 1 H) 7.15 (d, *J*=8.84 Hz, 1 H) 7.38 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.45 (m, 1 H) 7.63 (m, 3 H) 7.71 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.81 (t, *J*=8.72 Hz, 2 H) 7.91 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 8.17 (d, *J*=8.34 Hz, 1 H).

[00355] Step 14B [9058-121-2]: 3-Methyl-2-[4'-(quinolin-2-yloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid tert-butyl ester (164 mg) was dissolved in dichloroethane (12 mL) and hydrolyzed with TFA (4 mL) at room temperature over a period of 4 hrs. Solvent was removed and crude was purified by column chromatography (Eluent 10% MeOH / DCE) to afford 3-Methyl-2-[4'-(quinolin-2-yloxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid in 58% yield (84.8mg).

[00356] 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.82 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.88 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.97 (m, 1 H) 3.60 (d, *J*=5.56 Hz, 1 H) 7.10 (d, *J*=8.84 Hz, 1 H) 7.25 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.39 (t, *J*=6.82 Hz, 1 H) 7.56 (t, *J*=7.71 Hz, 1 H) 7.63 (d, *J*=0.51 Hz, 1 H) 7.65 (d, *J*=1.26 Hz, 1 H) 7.68 (m, 1 H) 7.69 (d, *J*=2.27 Hz, 1 H) 7.72 (m, 1 H) 7.74 (m, 1 H) 7.79 (dd, *J*=7.83, 1.26 Hz, 1 H) 7.82 (m, 1 H) 7.85 (m, 1 H) 8.23 (d, *J*=8.84 Hz, 1 H).

Example 3.85

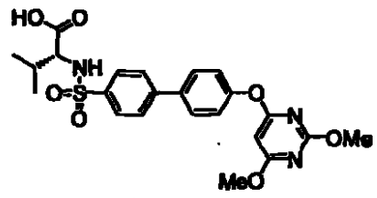


N-({4'-[(5-nitropyridin-2-yl)oxy]-1,1'-biphenyl-4-yl}sulfonyl)-D-valine

[00357] The title compound, N-({4'-[(5-nitropyridin-2-yl)oxy]-1,1'-biphenyl-4-yl}sulfonyl)-D-valine , was prepared according to procedures similar to that of Example 3.83.

[00358] Step 14A and 14B: Yield 60%. 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.82 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.88 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.96 (m, 1 H) 3.58 (d, *J*=5.31 Hz, 1 H) 7.11 (d, *J*=9.09 Hz, 1 H) 7.22 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.70 (dd, *J*=11.87, 8.84 Hz, 4 H) 7.83 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 8.52 (dd, *J*=9.09, 2.78 Hz, 1 H) 8.91 (d, *J*=3.28 Hz, 1 H).

Example 3.86

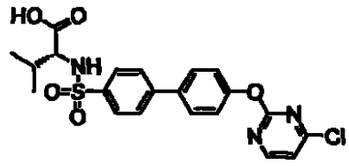


N-({4'-[(2,6-dimethoxypyrimidin-4-yl)oxy]-1,1'-biphenyl-4-yl}sulfonyl)-D-valine

[00359] The title compound, N-({4'-[(2,6-dimethoxypyrimidin-4-yl)oxy]-1,1'-biphenyl-4-yl}sulfonyl)-D-valine, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.83.

[00360] Step 14A and 14B: Yield 82%. 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.81 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.88 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.97 (m, 1 H) 3.56 (d, *J*=5.31 Hz, 1 H) 3.78 (s, 3 H) 3.85 (s, 3 H) 5.73 (s, 1 H) 7.18 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.66 (d, *J*=8.84 Hz, 3 H) 7.70 (d, *J*=8.84 Hz, 3 H) 7.81 (s, 1 H) 7.83 (s, 1 H).

Example 3.87

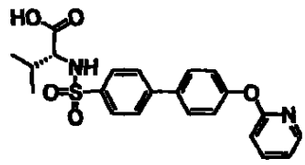


N-({4'-[(4-chloropyrimidin-2-yl)oxy]-1,1'-biphenyl-4-yl}sulfonyl)-D-valine

[00361] The title compound, N-({4'-[(4-chloropyrimidin-2-yl)oxy]-1,1'-biphenyl-4-yl}sulfonyl)-D-valine, was prepared according to procedures similar to that of Example 3.83.

[00362] Step 14A and 14B: Yield 59%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.80 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.85 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.97 (m, 1 H) 3.47 (s, 1 H) 7.24 (d, *J*=5.81 Hz, 1 H) 7.42 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.87 (d, 7 H) 8.66 (d, *J*=5.56 Hz, 1 H).

Example 3.88

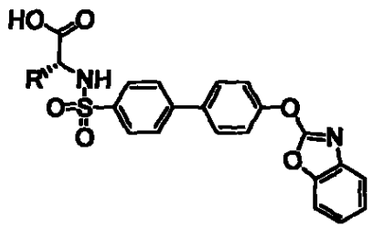


N-{[4'-(pyridin-2-yloxy)-1,1'-biphenyl-4-yl]sulfonyl}-D-valine

[00363] The title compound, N-{[4'-(pyridin-2-yloxy)-1,1'-biphenyl-4-yl]sulfonyl}-D-valine , was prepared according to procedures similar to that of Example 3.83.

[00364] Step 14A and 14B: Yield 83%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.82 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.85 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.85-2.02 (m, 1 H) 3.57 (dd, *J*=10.48, 4.67 Hz, 1 H) 7.10 (d, *J*=9.85 Hz, 1 H) 7.17 (dd, *J*=7.20, 4.93 Hz, 1 H) 7.26 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.79 (d, *J*=8.84 Hz, 2 H) 7.82-7.95 (m, 4 H) 8.09 (d, *J*=9.35 Hz, 1 H) 8.13-8.28 (m, 1 H).

Example 3.89



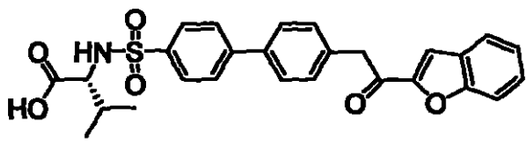
N-{[4'-(1,3-benzoxazol-2-yloxy)-1,1'-biphenyl-4-yl]sulfonyl}-D-valine

[00365] The title compound, N-{[4'-(1,3-benzoxazol-2-yloxy)-1,1'-biphenyl-4-yl]sulfonyl}-D-valine , was prepared according to procedures similar to that of Example 3.83.

[00366] Step 14A and 14B: Yield 85%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.82 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.85 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.86-2.05 (m, 1 H) 3.58 (dd, *J*=9.22, 5.94 Hz, 1 H) 7.32 (d, *J*=9.35 Hz, 1 H) 7.53 (d, *J*=7.33 Hz, 1 H) 7.61-7.73 (m, 3 H) 7.81-7.99 (m, 6 H) 8.10 (d, *J*=9.35 Hz, 1 H).

[00367] Example 3.90 was made based on Scheme 15.

Example 3.90



N-({4'-[2-(1-benzofuran-2-yl)-2-oxoethyl]-1,1'-biphenyl-4-yl}sulfonyl)-D-valine

[00368] Step 15A: (4-Bromophenyl)-acetic acid (5.0 g, 23.2 mmol, 1 eq.) dissolved in thionyl chloride (50 mL) was heat to reflux for 1hr. under nitrogen atmosphere. The solution was cool to room temperature and solvent was evaporated. Residue thus obtained was dissolved in anhydrous methylene chloride and used in Step 15B.

[00369] Step 15B: Benzofuran-2-yl-trimethyl-silane (3.4 g, 17.86mmol) was dissolved in methylene chloride (40 mL) and cool to -78°C. 4-Bromophenyl-acetyl chloride (19.65 mmol, 1.1equiv.) was added at this temperature. Under vigorous stirring, a solution of $TiCl_4$ (23 mL, 1M, 23.2 mmol, 1.3 equiv.) in CH_2Cl_2 was added dropwise and stirring continued for 20min. Then the reaction was quenched with H_2O (100 mL), cooling bath was removed and the mixture was allowed to warm up to room temperature. It was then diluted with H_2O (100mL) and extracted with CH_2Cl_2 (3X). Organic layers were combined, washed with brine, dried over $MgSO_4$, solvent evaporated. Crude product thus obtained was subject to column purification. (silica gel, 10%EtOAC/Hexane). 980 mg of 1-Benzofuran-2-yl-2-(4-bromo-phenyl)-ethanone was obtained in 17% yield.

[00370] 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 4.34 (s, 2 H) 7.34 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.44 (d, 1 H) 7.58 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H) 7.62 (d, *J*=5.81 Hz, 1 H) 7.67 (s, 1 H) 7.71 (m, 1 H) 7.84 (t, *J*=6.19 Hz, 1 H).

[00371] Step 15C: A solution of 3-Methyl-2-(4-tributylstannanyl-benzenesulfonylamino)-butyric acid *tert*-butyl ester (347.5mg, 0.58 mmol, 1.0 equiv.), 1-Benzofuran-2-yl-2-(4-bromo-phenyl)-ethanone (200 mg, 0.64 mmol, 1.1equiv.) and $Pd(PPh_3)_4$ (66 mg, 0.06 mmol, 10%) in anhydrous toluene (10 mL) was heat to reflux for 7 hrs. Reaction was complete as determined by TLC. Solvent was removed by rotovap and crude product purified by column

chromatography (silica gel, 20% EtOAc/ n-Hexane) to afford 2-[4'-(2-Benzofuran-2-yl-2-oxo-ethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid tert-butyl ester in 20% yield (62mg).

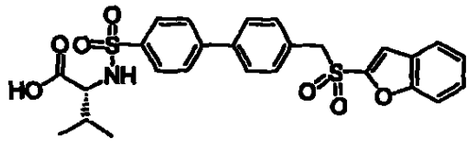
[00372] 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 0.79 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.95 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.11 (s, 9 H) 3.58 (dd, *J*=9.85, 4.55 Hz, 1 H) 4.26 (s, 2 H) 5.05 (d, *J*=9.85 Hz, 1 H) 7.26 (t, *J*=7.07 Hz, 1 H) 7.43 (m, 5 H) 7.56 (m, 4 H) 7.65 (d, *J*=7.83 Hz, 1 H) 7.81 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H).

[00373] Step 15D: 2-[4'-(2-Benzofuran-2-yl-2-oxo-ethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid *tert*-butyl ester (62 mg) was dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (6 mL) and added with TFA (2 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 hrs. Solvent was removed, crude product was purified by column chromatography (10% MeOH/CH_2Cl_2) to afford 2-[4'-(2-Benzofuran-2-yl-2-oxo-ethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid in 19% yield (10.7 mg).

[00374] 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.79 (d, *J*=6.82 Hz, 3 H) 0.84 (m, *J*=6.82 Hz, 3 H) 1.97 (m, 1 H) 3.33 (s, 1 H) 4.42 (s, 2 H) 7.39 (t, *J*=7.07 Hz, 1 H) 7.47 (d, *J*=8.34 Hz, 2 H) 7.57 (t, *J*=8.59 Hz, 1 H) 7.73 (m, 3 H) 7.83 (d, 4 H) 7.88 (d, *J*=8.84 Hz, 1 H) 8.13 (s, 1 H) 10.08 (s, 1 H).

[00375] Example 3.91 was made based on Scheme 16.

Example 3.91



D-2-[4'-(Benzofuran-2-sulfonylmethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid

[00376] Step 16A: Starting material 2-[1,2,3]Thiadiazol-4-yl-phenol was prepared according to literature procedure (M. A. Abramov, W. Dehaen, B. D'hooge, M. L. Petrov, S. Smeets, S. Toppet and M. Voets Tetrahedron, 2000, 56, *3933-3940*). 2-[1,2,3]Thiadiazol-4-yl-phenol

(241 mg, 1.35 mmol), 2-(4-Bromomethyl-phenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolane (406 mg, 1.37 mmol, 1 eq), and K_2CO3 (396 mg, 2.87 mmol, 1.9 eq) was mixed in 8 mL of CH3CN and heat to 90 °C under nitrogen atmosphere. After reaction was complete as monitored by TLC, the mixture was cooled to room temperature and solvent evaporated. The resulting crude material was subject to column chromatography (20% EtOAc in hexane) to give 2-[4-(4,4,5,5-Tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzylsulfanyl]-benzofuran (198 mg) in 40% yield. NMR: G8475-125. 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ ppm 1.3 (s, 12 H) 4.1 (s, 2 H) 6.6 (d, *J*=1.0 Hz, 1 H) 7.2 (m, 4 H) 7.4 (d, *J*=7.8 Hz, 2 H) 7.7 (d, *J*=8.1 Hz, 2 H).

[00377] Step 16B: Suzuki coupling of D-2-(4-Bromo-benzenesulfonylamino)-3-methyl-butyric acid methyl ester with 2-[4-(4,4,5,5-Tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzylsulfanyl]-benzofuran was carried out according to procedures in Step 5B for Example 2A to give D-2-[4'-(Benzofuran-2-ylsulfanylmethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester in 54% yield. NMR: G8475-165. 1H NMR (400 MHz, BENZENE-D6) δ ppm 0.7 (d, *J*=6.8 Hz, 3 H) 0.9 (d, *J*=6.8 Hz, 3 H) 1.9 (m, 1 H) 3.0 (s, 3 H) 4.0 (m, 3 H) 5.0 (d, *J*=10.1 Hz, 1 H) 6.6 (d, *J*=1.0 Hz, 1 H) 7.1 (m, 4 H) 7.3 (m, 6 H) 7.3 (s, 1 H) 7.4 (m, 1 H).

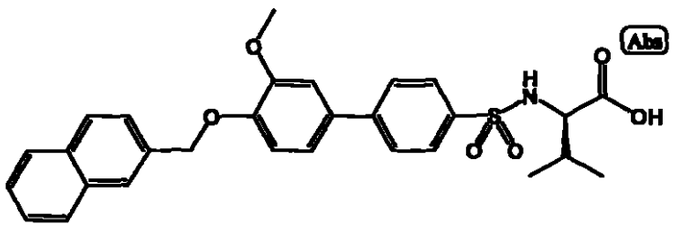
[00378] Step 16C: A solution of D-2-[4'-(Benzofuran-2-ylsulfanylmethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester (75 mg, 0.15 mmol, 1 eq) in 4 mL of THF was placed in ice bath. 125 mg of MCPBA (77%, 0.55 mmol, 3.7 eq) in 3 mL of THF was added dropwise. After addition complete, ice bath was removed and the reaction was allowed to warm to room temperature and stir for 12 hrs. TLC indicated reaction was complete. Regular work-up and column chromatography (20% EtOAc in hexane) to afford D-2-[4'-(Benzofuran-2-sulfonylmethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester (56 mg) in 70% yield. NMR: G8475-166. 1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) □ ppm 0.9 (dd, *J*=33.3, 6.8 Hz, 6 H) 2.0 (m, 1 H) 3.4 (s, 3 H) 3.8 (dd, *J*=10.1, 5.3 Hz, 1 H) 4.6 (s, 2 H) 5.1 (d, *J*=10.1 Hz, 1 H) 7.4 (m, 4 H) 7.5 (m, 3 H) 7.6 (m, 1 H) 7.7 (m, 3 H) 7.9 (d, *J*=8.8 Hz, 2 H).

[00379] Step 16D [: Hydrolysis of D-2-[4'-(Benzofuran-2-sulfonylmethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid methyl ester was carried out according to procedures in

Step 1D for Example 1A in quantitative yield. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0.8 (dd, J=12.1, 6.8 Hz, 6 H) 1.9 (m, 1 H) 3.5 (dd, J=9.3, 6.1 Hz, 1 H) 5.0 (s, 2 H) 7.4 (d, J=8.3 Hz, 2 H) 7.4 (m, 1 H) 7.6 (m, 1 H) 7.7 (d, J=1.0 Hz, 1 H) 7.7 (d, J=8.3 Hz, 2 H) 7.8 (m, 6 H) 8.1 (d, J=9.1 Hz, 1 H).

[00380] The following compounds (3.92 and 3.93) were prepared according to Scheme 6.63.

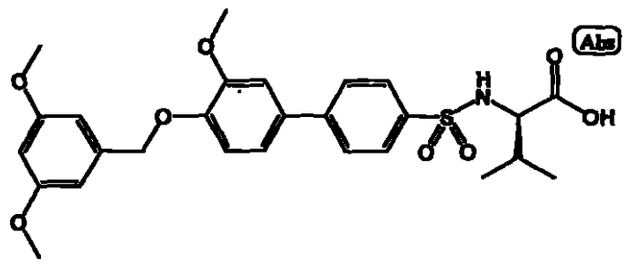
Example 3.92



3-Methyl-2-[4'-(naphthalen-2-ylmethoxy)-3'-methoxy-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.806(d, 3H), 0.837(d, 3H), 1.94(m, 1H), 3.53(t, 1H), 3.90(s, 3H), 5.33(s, 2H), 7.20(d, 1H), 7.27(m, 1H), 7.34(s, 1H), 7.54(d, 2H), 7.61(d, 1H), 7.89(m, 8H); ES$^+$ m/z 518.2 (M-H); HRMS (C29H29NO6S): calcd; 520.17884; found; 520.17839 (M+H).

Example 3.93

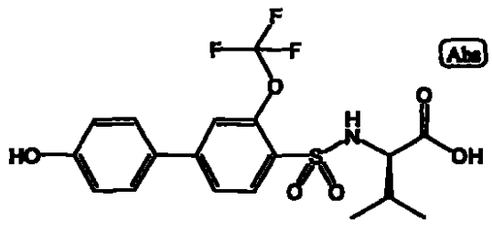


2-[4'-(3,5-Dimethoxy-benzyloxy)-3'-methoxy-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.808(d, 3H), 0.838(d, 3H), 1.94(m, 1H), 3.74(s, 6H), 3.89(s, 3H), 5.09(s, 2H), 6.45(t, 1H), 6.62(d, 2H), 7.11(d, 1H), 7.25(d, 1H), 7.32(d, 1H), 7.79(d, 2H), 7.85(d, 2H), 8.02(d, 1H); ES$^+$ m/z 528.2 (M-H); HRMS (C27H31NO8S): calcd; 530.18432; found; 530.18367 (M+H).

[00381] The following compounds (3.94-3.111) were made using procedures described in scheme 17.

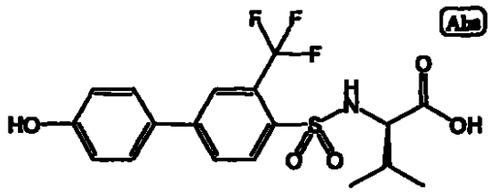
Example 3.94



2-(4'-Hydroxy-3-trifluoromethoxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid.

[00382] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.825(d, 3H), 0.875(d, 3H), 2.04(m, 1H), 3.70(m, 1H), 6.89(d, 2H), 7.59(m, 2H), 7.75(dd, 1H), 7.94(d, 1H), 8.16(d, 1H); ES$^+$ m/z 432.1 (M-H); HRMS (C18H18F3NO6S): calcd; 451.11451; found; 451.11461 (M+NH4).

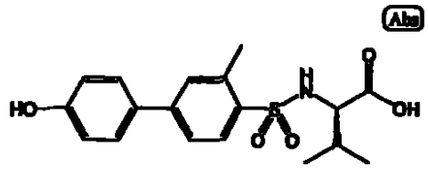
Example 3.95



[00383] 2-(4'-Hydroxy-3-trifluoromethyl-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.850(m, 6H), 2.02(m, 1H), 3.60(m, 1H), 6.90(d, 2H), 7.67(d, 2H), 8.10(m, 3H); ES$^+$ m/z 416.0 (M-H); HRMS (C18H18F3NO5S): calcd; 435.11960; found; 435.11966 (M+NH4).

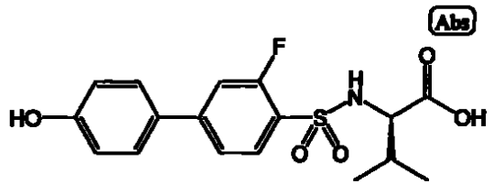
Example 3.96



2-(4'-Hydroxy-3-methyl-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.810(t, 6H), 1.93(m, 1H), 2.64(s, 3H), 3.39(m, 1H), 6.87(m, 2H), 7.56(m, 3H), 7.81(d, 1H), 8.00(d, 1H); ES$^+$ m/z 362.1 (M-H); HRMS (C18H21NO5S): calcd; 381.14786; found; 381.14808 (M+NH4).

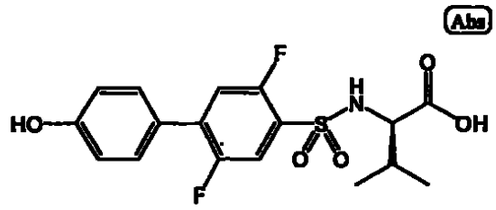
Example 3.97



2-(3-Fluoro-4'-hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.850(m, 6H), 2.02(m, 1H), 3.63(m, 1H), 6.87(d, 2H), 7.61(m, 3H), 7.76(t, 1H), 8.22(d, 1H); ES$^+$ m/z 366.0 (M-H); HRMS (C17H18FNO5S): calcd; 385.12279; found; 385.12276 (M+NH4).

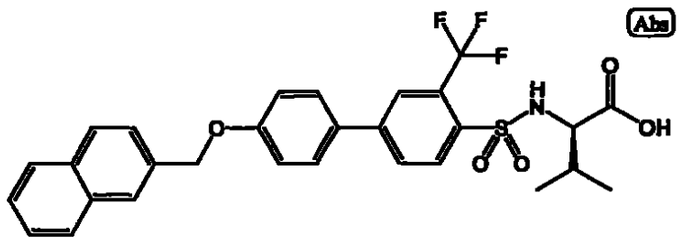
Example 3.98



2-(2,5-Difluoro-4'-hydroxy-biphenyl-4-sulfonylamino)-3-methyl-butyric acid.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.880(m, 6H), 2.04(m, 1H), 3.69(m, 1H), 6.89(d, 1H), 7.45(m, 2H), 7.58(m, 2H), 8.45(d, 1H); ES$^+$ m/z 384.1 (M-H); HRMS (C17H17F2NO5S): calcd; 403.1137; found; 403.11328 (M+NH4).

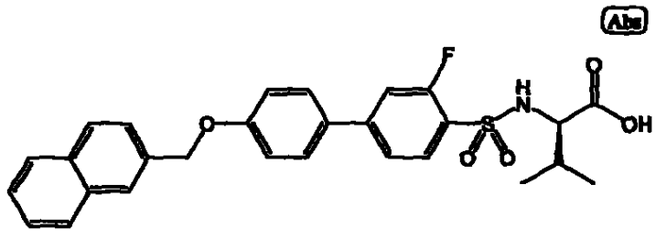
Example 3.99



3-Methyl-2-[4'-(naphthalen-2-ylmethoxy)-3-trifluoromethyl-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid.

[00384] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.900(d, 3H), 0.960(d, 3H), 2.06(m, 1H), 3.70(d, 1H), 4.19(s, 2H), 6.95(d, 1H), 7.43(m, 6H), 7.69(s, 1H), 7.75(m, 3H), 7.88(m, 1H), 7.97(s, 1H), 8.15(d, 1H); ES$^+$ m/z 556.1 (M-H); HRMS (C29H26F3NO5S): calcd; 558.15566; found; 558.15484 (M+H).

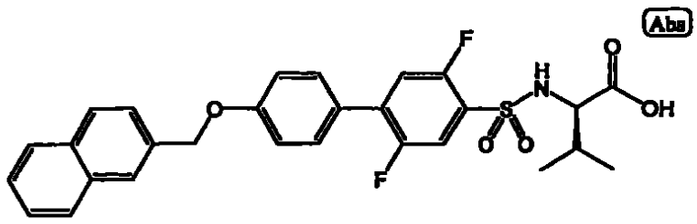
Example 3.100



2-[3-Fluoro-4'-(naphthalen-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid.

[0001] ^{1}H NMR (400 MHz, MeOH): δ 0.920(d, 3H), 0.980(d, 3H), 2.10(m, 1H), 3.76(d, 1H), 4.19(s, 2H), 6.94(d, 1H), 7.43(m, 7H), 7.70(s, 1H), 7.78(m, 4H); ES$^+$ m/z 506.1 (M-H); HRMS (C28H26FNO5S): calcd; 508.15885; found; 508.15818 (M+H).

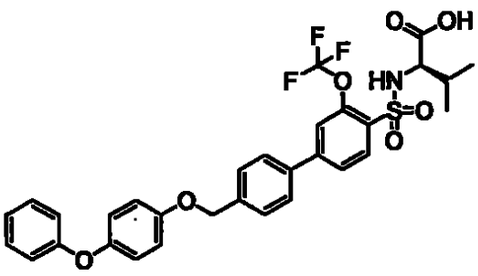
Example 3.101



[00385] 2-[2,5-Difluoro-4'-(naphthalen-2-ylmethoxy)-biphenyl-4-sulfonylamino]-3-methyl-butyric acid.

^{1}H NMR (400 MHz, MeOH): δ 0.910(d, 3H), 0.980(d, 3H), 2.09(m, 1H), 3.78(d, 1H), 4.16(s, 2H), 6.92(d, 1H), 7.37(m, 6H), 7.56(m, 1H), 7.67(s, 1H), 7.75(m, 4H); ES$^+$ m/z 524.1 (M-H); HRMS (C28H25F2NO5S): calcd; 526.14943; found; 526.14881 (M+H).

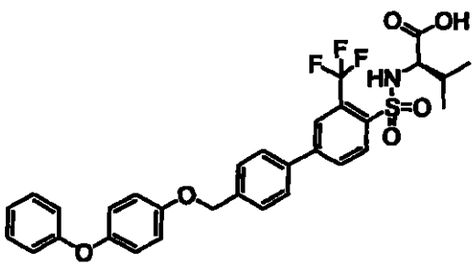
Example 3.102



ES$^+$ m/z 614.1 (M-H)-HRMS: 616.16053 (M+H)+; 616.16114 Calc'd

H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.83 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), .088 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), 2.06 (m, 1H), 3.74 (dd, 1H, *J* = 5.6, 10Hz), 5.18 (s, 2H), 5.35 (d, 1H, *J* = 10Hz), 6.92 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.00 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.07 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.34 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.61 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.69 (s, 1H), 7.79 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.88 (m, 1H), 8.02 (d, 1H, *J* = 8Hz), 8.24 (m, 1H), 12.70 (s, 1H).

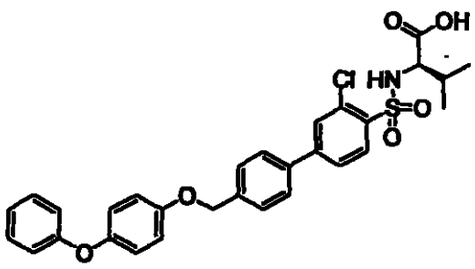
Example 3.103



ES$^+$ m/z 598.1 (M-H)-HRMS: 600.16554 (M+H)+; 600.16622 Calc'd

H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.85 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), .0.86 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), 2.05 (m,

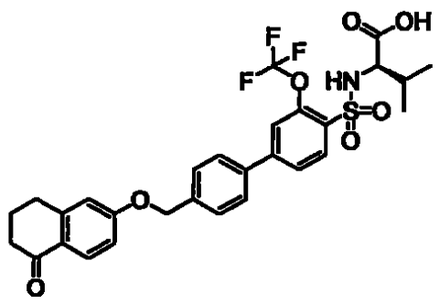
Example 3.104



ES$^+$ m/z 564.1 (M-H)-HRMS: 566.13860 (M+H)+; 566.13987 Calc'd

H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.84 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), .0.86 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), 2.02 (m, 1H), 3.57 (dd, 1H, *J* = 6, 9.2Hz), 5.17 (s, 2H), 6.92 (d, 2H, *J* = 8Hz), 6.99 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.07 (m, 3H), 7.33 (m, 2H), 7.59 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.83 (m, 5H), 7.95 (d, 1H, *J* = 1.6Hz), 8.03 (d, 1H, *J* = 8Hz), 8.21 (m, 1H), 12.65 (s, 1H).

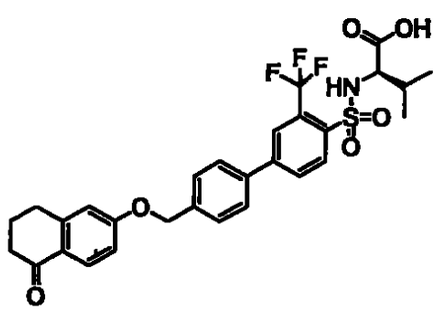
Example 3.105



ES$^+$ m/z 590.1 (M-H)-HRMS: 592.16098 (M+H)+; 592.16114 Calc'd

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.83 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), 0.88 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), 2.05 (m, 3H), 2.53 (t, 2H, *J* = 6Hz), 2.91 (t, 2H, *J* = 6Hz), 3.74 (dd, 1H, *J* = 5.6, 10Hz), 5.28 (s, 2H), 6.98 (m, 2H), 7.60 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.69 (s, 1H), 7.85 (m, 4H), 8.02 (d, 1H, *J* = 8Hz), 8.25 (d, 1H, *J* = 8Hz), 12.70 (s, 1H).

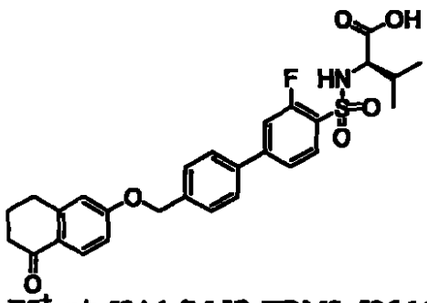
Example 3.106



ES$^+$ m/z 574.1 (M-H)-HRMS: 576.16522 (M+H)+; 576.16622 Calc'd

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.85 (d, 3H, J = 6.8Hz), 0.86 (d, 3H, J = 6.8Hz), 2.04 (m, 3H), 2.53 (t, 2H, J = 6Hz), 2.91 (t, 2H, J = 6Hz), 3.63 (dd, 1H, J = 6, 10Hz), 5.29 (s, 2H), 6.98 (m, 2H), 7.61 (d, 2H, J = 8Hz), 7.85 (m, 3H), 8.20 (m, 4H), 12.70 (s, 1H).

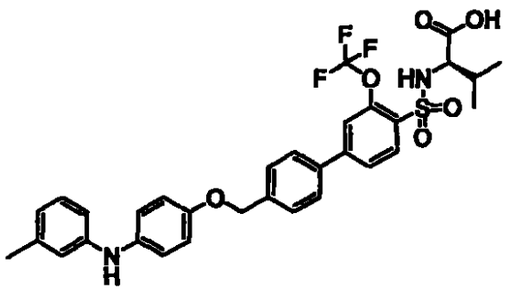
Example 3.107



ES$^+$ m/z 524.1 (M-H)-HRMS: 526.16859 (M+H)+; 526.16942 Calc'd

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.84 (d, 3H, J = 6.8Hz), 0.87 (d, 3H, J = 6.8Hz), 2.02 (m, 3H), 2.53 (t, 2H, J = 6Hz), 2.91 (t, 2H, J = 6Hz), 3.66 (dd, 1H, J = 6, 9.2Hz), 5.27 (s, 2H), 6.98 (m, 2H), 7.58 (d, 2H, J = 8Hz), 7.70 (m, 1H), 7.83 (m, 5H), 8.30 (d, 1H, J = 10Hz), 12.65 (s, 1H).

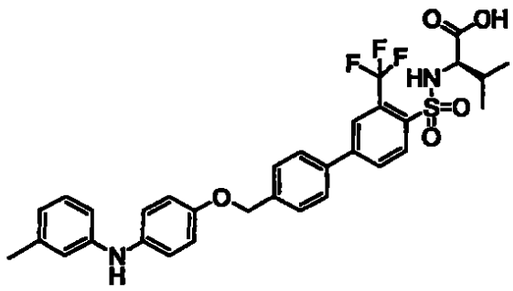
Example 3.108



ES$^+$ m/z 629.2 (M-H)-HRMS: 631.17159 (M+H)+; 631.17204 Calc'd

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.83 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), 0.88 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), 2.07 (m, 1H), 2.30 (s, 3H), 3.74 (dd, 1H, *J* = 5.6, 9.6Hz), 5.20 (s, 2H), 6.68 (d, 1H, *J* = 8Hz), 6.95 (d, 1H, *J* = 8Hz), 7.06 (m, 4H), 7.62 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.69 (m, 2H), 7.80 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.87 (dd, 1H, *J* = 1.6, 8Hz), 8.03 (d, 1H, *J* = 8Hz), 8.25 (d, 2H, *J* = 9.2Hz), 12.70 (s, 1H).

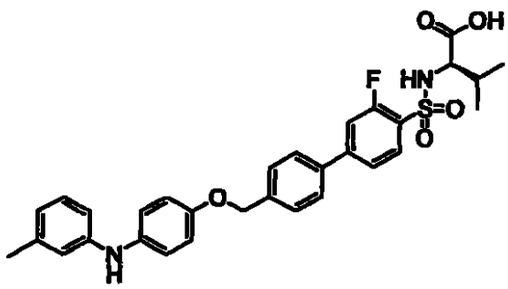
Example 3.109



ES$^+$ m/z 613.2 (M-H)-HRMS: 615.17639 (M+H)+; 615.17712 Calc'd

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.85 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), 0.87 (d, 3H, *J* = 6.8Hz), 2.05 (m, 1H), 2.30 (s, 3H), 3.63 (dd, 1H, *J* = 6, 9.6Hz), 5.20 (s, 2H), 6.68 (d, 1H, *J* = 8Hz), 6.95 (d, 1H, *J* = 8Hz), 7.06 (m, 4H), 7.63 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7.69 (t, 1H, *J* = 8Hz), 7.87 (d, 2H, *J* = 8Hz), 8.21 (m, 4H), 12.70 (s, 1H).

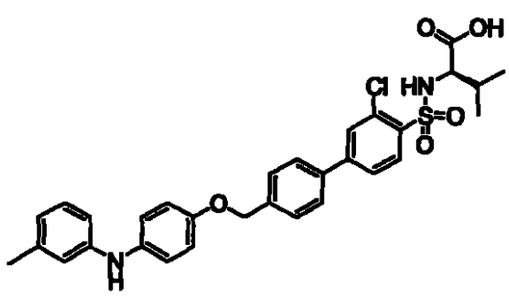
Example 3.110



ES$^+$ m/z 563.2 (M-H)-HRMS: 565.18038 (M+H)+; 565.18032 Calc'd

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.84 (d, 3H, J = 6.8Hz), 0.87 (d, 3H, J = 6.8Hz), 2.04 (m, 1H), 2.30 (s, 3H), 3.66 (dd, 1H, J = 6, 9.6Hz), 5.19 (s, 2H), 6.68 (d, 1H, J = 8Hz), 6.95 (d, 1H, J = 8Hz), 7.06 (s, 4H), 7.60 (d, 2H, J = 8Hz), 7.70 (m, 2H), 7.83 (m, 4H), 8.31 (d, 1H, J = 9.2Hz), 12.70 (s, 1H).

Example 3.111



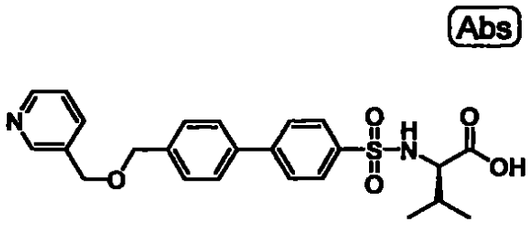
ES$^+$ m/z 579.1 (M-H)-HRMS: 581.15050 (M+H)+; 581.15077 Calc'd

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.84 (d, 3H, J = 6.8Hz), 0.86 (d, 3H, J = 6.8Hz), 2.02 (m, 1H), 2.30 (s, 3H), 3.58 (dd, 1H, J = 6.4, 9.6Hz), 5.20 (s, 2H), 6.68 (d, 1H, J = 8Hz), 6.95 (d, 1H, J = 8Hz), 7.06 (s, 4H), 7.60 (d, 2H, J = 8Hz), 7.62 (d, 2H, J = 8Hz), 7.83 (m, 3H), 7.95 (d, 1H, J = 1.6), 8.03 (d, 1H, J = 8Hz), 8.22 (d, 1H, J = 9.6Hz), 12.70 (s, 1H).

[00386] Examples 112, 113, 114 were made based on Scheme 5.

000136

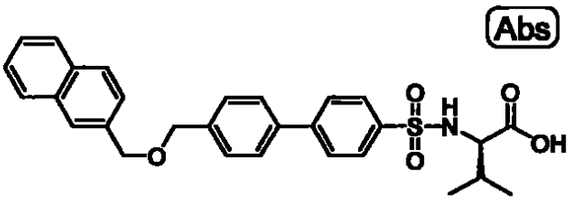
Example 3.112



3-Methyl-2-[4'-(pyridin-3-ylmethoxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

^{1}H NMR (400 MHz, MeOD): δ; ES$^+$ m/z (M+H) 455.1; HRMS (M+H) m/z calcd 455.16352; found 455.16317; ($C_{24}H_{26}N_2O_5S$):

Example 3.113

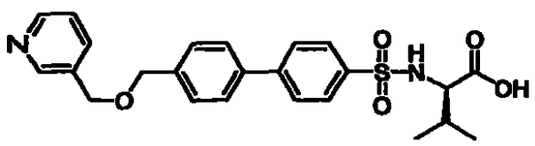


3-Methyl-2-[4'-(naphthalen-2-ylmethoxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ0.85 (d, 3H), 0.95 (d, 3H), 2.10 (m, 1H), 3.83 (m, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.74 (s, 2H), 5.25 (bs, 1H), 7.44-7.55 (m, 7H), 7.65 (d, 2H), 7.82-7.90 (m, 6H); ES$^+$ m/z (M-H) 502.1; HRMS (M+H) m/z calcd 504.18392; found 504.18503; ($C_{29}H_{29}NO_5S$):

Example 3.114

Abs



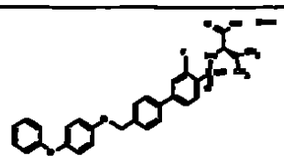
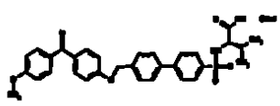
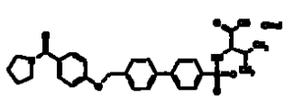
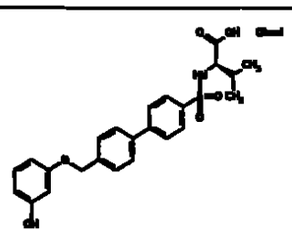
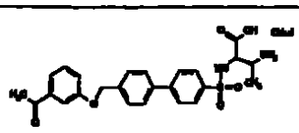
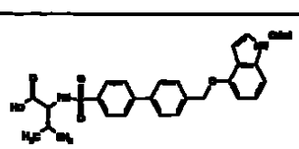
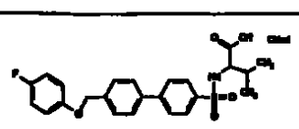
3-Methyl-2-[4'-(pyridin-3-ylmethoxymethyl)-biphenyl-4-sulfonylamino]-butyric acid

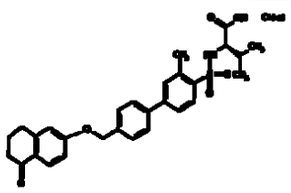
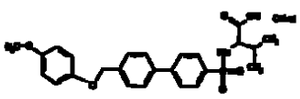
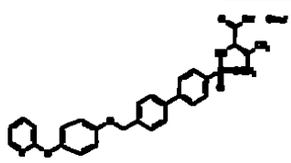
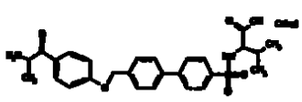
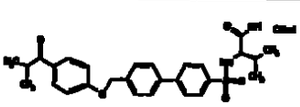
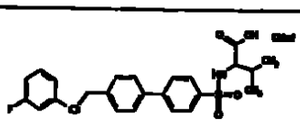
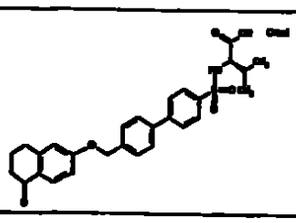
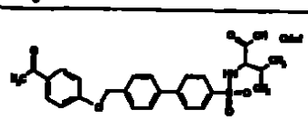
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 0.81 (d, 3H), 0.84 (d, 3H), 1.95 (m, 1H), 3.55 (dd, 1H), 4.56 (s, 2H), 4.63 (d, 2H), 7.44 (d, 2H), 7.50 (d, 1H), 7.70 (d, 2H), 7.74 (d, 1H), 7.84 (m, 4H), 8.08 (m, 2H); ES$^+$ m/z (M+H) 455.1; HRMS (M+H) m/z calcd 455.16352; found 455.16290; ($C_{24}H_{26}N_2O_5S$).

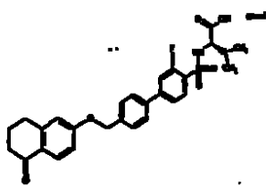
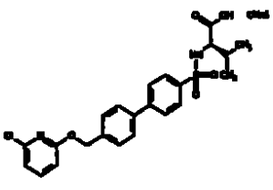
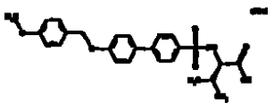
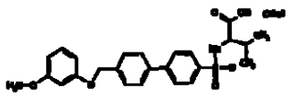
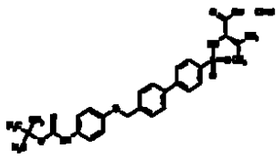
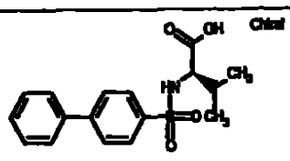
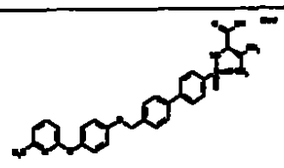
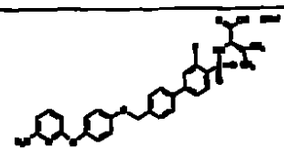
Example 4: Inhibition of ADAMTS-5 Aggrecanase Activity Using the Biaryl Sulfonamide Compounds of the Present Invention:

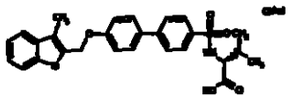
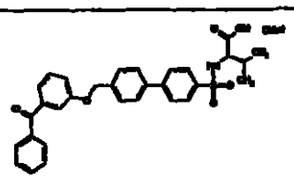
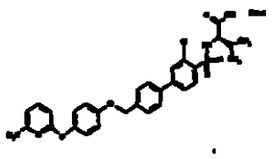
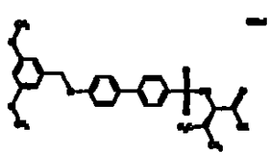
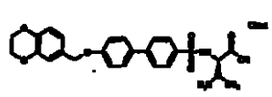
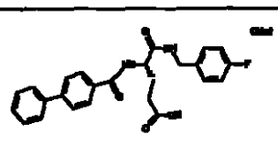
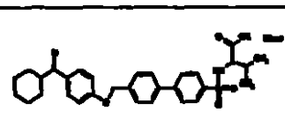
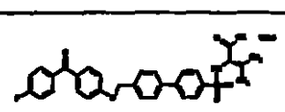
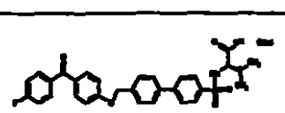
[00387] The biaryl sulfonamide compounds of the present invention were tested for their ability to inhibit the aggrecanase activity of ADAMTS-4 (Agg-1) and ADAMTS-5 (Agg-2). The results are shown in Table 1 below, which shows the concentration of the compounds in μM that inhibits 50% of the aggrecanase activity of the enzyme (IC50). The compounds are listed from lowest to highest potency for ADAMTS-5, with the last being the most potent.

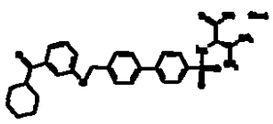
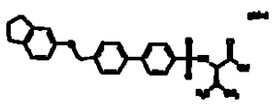
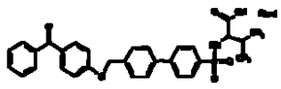
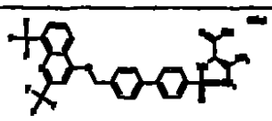
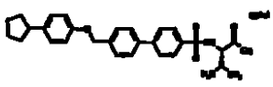
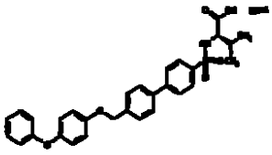
TABLE 1

Compound	IC50 Agg-1 (uM)	Agg-2 (uM)
	0.1	> 200
	0.3	> 100
	1.9	67.0
	1.1	13.0
	1.0	12.6
	1.9	12.0
	1.7	11.3

	0.9	11.2
	1.6	10.7
	0.9	10.6
	0.1	8.4
	0.1	8.4
	1.2	8.2
	0.2	7.5
	0.4	7.0

	0.2	6.6
	0.4	6.5
	1.9	6.3
	1.8	5.8
	0.6	5.4
	2.6	5.0
	0.7	4.0
	0.9	3.5

	1.1	3.4
	0.2	3.4
	0.9	3.2
	1.9	3.2
	1.4	3.0
	0.2	2.8
	0.1	2.6
	0.1	2.5
	0.1	2.4

	0.4	2.4
	0.4	2.4
	0.2	2.0
	0.2	1.8
	0.4	0.8
	0.4	0.4

[00388] A continuous assay was used in which the substrate upon which Agg-1 and Agg-1 acts is a synthetic peptide containing a fluorescent group that is quenched by energy transfer. Cleavage of the peptide by the aggrecanase enzyme results in a large increase in fluorescence. The initial rates of the reaction are compared to the initial rates of reactions containing the biaryl sulfonamide compounds in order to assess the inhibitor potency of the compounds.

[00389] The source of enzyme in the assay is purified recombinant human Aggrecanase-2. More specifically, the form used is denoted as Ag2t-Phe_{628}-Strep (MW = 41,737). This form is truncated relative to the full-length enzyme and contains an affinity tag. Aliquots of this

enzyme were stored at –80°C in 25mM Tris (pH 8.0), 100mM NaCl, 5mM $CaCl_2$, 10μM $ZnCl_2$, 10% glycerol.

[00390] The substrate in the assay is a synthetic peptide that is designed after a portion of brevican, one of the naturally occurring substrates of Aggrecanase-2. This peptide, denoted as WAKB-5, contains the fluorescent group 2-aminobenzoyl (Abz) that is quenched by energy transfer to a 2,4-dinitrophenyl group (Dnp). WAKB-5 (mass = 1740) was custom synthesized by AnaSpec, Inc. (San Jose, CA) and was >95% pure based on HPLC analysis. WAKB-5 has the sequence of Abz-TESESRGAIY-Dap(Dnp)-KK-NH_2. Stock solutions of the substrate were prepared with MilliQ water and aliquots were stored at –80°C. The concentration of this substrate stock was spectrophotometrically determined using the extinction coefficient at 354nm of 18,172 $M^{-1}cm^{-1}$. The V_{max} and K_m for this enzyme/substrate reaction were determined to be insensitive to DMSO up to at least 10% (*v/v*).

[00391] The assay buffer (pH 7.4) consisted of 50mM Hepes, 100mM NaCl, 5mM $CaCl_2$, 0.1% CHAPS, 5% glycerol. Each well of black polystyrene 96-well or 384-well plates contained a reaction consisting of assay buffer, purified Agg-2 (diluted with assay buffer), and varied concentrations of inhibitor (prepared by serial dilution in DMSO in 96-well polypropylene plates). The plates were then incubated at room temperature for 10 minutes. The enzymatic reactions were initiated by adding substrate to a final concentration of 25μM and were mixed by pipetting up and down. The initial rates of the cleavage reactions were determined at room temperature with a fluorescence plate reader immediately after substrate addition.

[00392] A detailed procedure for 100 μl reactions in a 96-well plate with a final DMSO concentration of 4% and a final enzyme concentration of 0.5 μg/ml (a concentration found to be suitable in most cases) is as follows: (1) the compounds were diluted in a 96-well polypropylene plate with 100% DMSO to 25X final concentration in the assay, (2) the Agg-2 was diluted to 2.083X final concentration (i.e., 1.04 μg/ml) in assay buffer, (3) 48.0 μl of 2.083X Agg-2 was then added to the wells, (4) 4.0 μl of 25X compound was transferred to the assay plate and the reagents were mixed, (5) the plates were incubated for 10 minutes at room temperature, (6) the substrate was diluted to 52.075 μM (2.083X final concentration)

with assay buffer, (7) after the 10 minute pre-incubation, 48.0 µl of 2.083X substrate was added and the reagents were mixed well, (8) the reactions were immediately monitored in a fluorescence plate reader at room temperature on the Tecan Safire with the excitation being 316nm, bandwidth 12 nm and emission being 432 nm and bandwidth 12 nm.

[00393] Analysis of the results was conducted by generating a plot of time *vs.* RFU for each sample. This was used as the "progress curve" of the reaction. The slope for the portion of the progress curve that is most linear was then determined. This slope (RFU/min) was used as the initial rate of the reaction. Plots of the inhibitor concentration *vs.* the initial cleavage rate were then fit to the following equation: $y = V_{max}*(1-(x^n / (K^n + x^n)))$, whereby x = inhibitor concentration, y = initial rate, V_{max} = initial rate in the absence of inhibitor, n = slope factor, and K = IC_{50} for the inhibition curve. Thus the IC50 calculations shown in Table 1 were determined.

Example 5: Inhibition of ADAMTS-5 Aggrecanase Activity Using the Anti-ADAMTS-5 Antibodies of the Present Invention:

[00394] The anti-ADAMTS-5 antibodies of the present invention were tested for their ability to inhibit the aggrecanase activity of ADAMTS-4 (Agg-1) and ADAMTS-5 (Agg-2). The results are shown in Table 2, which shows the characteristics of four monoclonal antibodies generated against recombinant human ADAMTS-5 demonstrated reactivity with ADAMTS-5, but not ADAMTS-4 or Bovine Serum Albumin (BSA) in an ELISA. All antibodies identified rhADAMTS-5 by western blot analysis.

TABLE 2

Clone	ELISA Full Length RhADAMTS-5	ELISA Truncated RhADAMTS-5	ELISA Full Length RhADAMTS-5	ELISA Truncated RhADAMTS-5	ELISA Full Length RhADAMTS-4	ELISA Full Length RhADAMTS-5	ELISA Full Length RhADAMTS-4	ELISA BSA	Western Blot	Western Blot
	6/01/03	6/01/03	6/11/03	6/11/03	6/11/03	6/12/03	6/12/03	BSA	6/25 Reduced	6/26 non-red.
17	2.522	2.645	3.194	3.348	0.067	3.758	0.115	0.094	+	+
18	2.432	2.666	3.107	3.406	0.043	3.839	0.291	0.122	+	+
34	2.589	2.654	3.258	3.328	0.068	3.786	0.207	0.064	+	+
41	2.622	2.627	3.422	3.538	0.276	4.000	0.374	0.104	+	+

While there have been described what are believed to be preferred embodiments of the invention, those skilled in the art will recognize that other and further modifications may be made thereto, e.g. to adapt the invention to various conditions, or other requirements, without departing from the spirit of the present invention as defined by the following claims.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for treating an ADAMTS-5-associated disease in a subject afflicted with the disease, comprising administering to the subject an agent which inhibits ADAMTS-5.

2. The method of claim 1, wherein the agent inhibits the metalloprotease activity of ADAMTS-5.

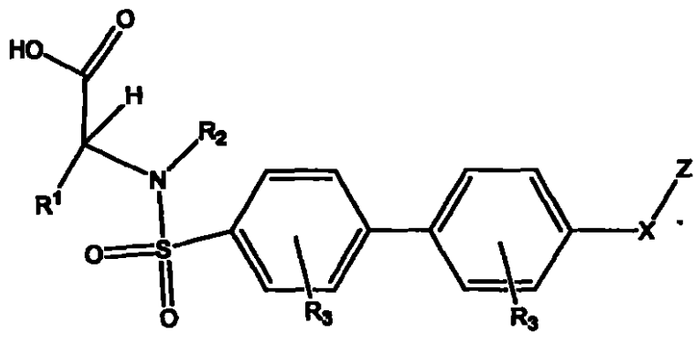
3. The method of claim 1, wherein the agent inhibits the aggrecanase activity of ADAMTS-5.

4. The method of claim 1, wherein the ADAMTS-5-associated disease is selected from the group consisting of osteoarthritis, cancer, asthma, chronic obstructive pulmonary disease ("COPD"), atherosclerosis, age-related macular degeneration, myocardial infarction, corneal ulceration and other ocular surface diseases, hepatitis, aortic aneurysms, tendonitis, central nervous system diseases, abnormal wound healing, angiogenesis, restenosis, cirrhosis, multiple sclerosis, glomerulonephritis, graft versus host disease, diabetes, inflammatory bowel disease, shock, invertebral disc degeneration, stroke, osteopenia, rheumatoid arthritis and other forms of arthritis, and periodontal disease.

5. The method of claim 3 or 4, wherein the disease is osteoarthritis.

6. The method of claim 5, wherein the agent is selected from the group consisting of an anti-ADAMTS-5 antibody and a biaryl sulfonamide compound.

7. The method of claim 6, wherein the biaryl sulfonamide compound is a compound of formula I:



I

wherein:

R^1 is H or C1-C6 alkyl;

R^2 is H, C1-C6 alkyl, $(CH_2)_nR^{2'}$, phenyl, or benzyl;

n is 0-6;

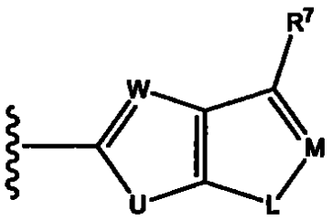
$R^{2'}$ is aryl, heteroaryl, cycloalkyl, or heterocycloalkyl;

R^3 is, independently with respect to each occurrence, H, halogen, $OC(halogen)_3$, $C(halogen)_3$, alkoxy, or C1-C6 alkyl;

X is selected from CH_2O, OCH_2, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)_2$-$C(R^3)_2$, $CH_2NHC(=O)$, $O(C=O)NH$, O, $C(=O)CH_2$, $SO_2CH_2C(=O)NH$, SO_2NH, $OC(=O)$, $CH_2S(O)$, and $CH_2S(O)_2$; and

Z is at least one aryl or heteroaryl moiety.

8. The method of claim 7, wherein Z is pyridine, pyrimidine, pyrazine, pyridazine, phenyl, naphthalene, furan, thiophene, pyrrole, pyrazole, imidazole, oxazole, isoxazole, thiazole, benzothiazole, quinoline, or isoquinoline, or



wherein:

U is selected from S, O, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)=N$, and $N(R^4)$;

W is selected from $C(R^3)$, and N;

M is selected from $C(R^3)$, and N;

L is selected from S, O, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)=N$, and $N(R^4)$;

R^4 and R^5 are, independently with respect to each occurrence, a bond to the other, H, C1-C6 alkyl, or phenyl;

R^7 is selected from a bond to R^3, H, halogen, $C(halogen)_3$, NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NHSO_2R^4$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, OR^4,

$C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, phenyl, heteroaryl, C1-C6 alkyl, C2-C6 alkenyl, or C2-C6 alkynyl; and

R^8 is selected from H, phenyl, heteroaryl, and C1-C6 alkyl.

9. The method of claim 8 wherein R^7 is substituted with NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NHSO_2R^4$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, OR^8, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, phenyl, or heteroaryl.

10. The method of claim 8 wherein R^8 is substituted with NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NR^4SO_2R^5$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, phenyl, or heteroaryl.

11. The method of claim 7 wherein R^1 is H or branched alkyl.

12. The method of claim 7 wherein R^1 is isopropyl.

13. The method of claim 7 wherein R^3 is halogen, CF_3, OCH_3, or CH_3.

14. The method of claim 7 wherein X is CH_2O, OCH_2, $C(R^3)=C(R^3)$, or $CH_2NHC(=O)$.

15. The method of claim 7 wherein R^7 is CH_3, ethyl, isopropyl, CF_3, CN, or OCH_3.

16. The method of claim 7 wherein R^8 is CH3, phenyl, and benzyl.

17. The method of claim 7 wherein Z is bicyclic.

18. A method for identifying a potential agent useful for the treatment of an ADAMTS-5-associated disease comprising contacting ADAMTS-5 with the potential agent and measuring the activity of ADAMTS-5 in the presence of the potential agent, wherein a reduction in activity is indicative that the potential agent is useful for the treatment of the disease.

19. The method of claim 18, wherein the activity is selected from the group consisting of metalloproteinase activity and aggrecanase activity.

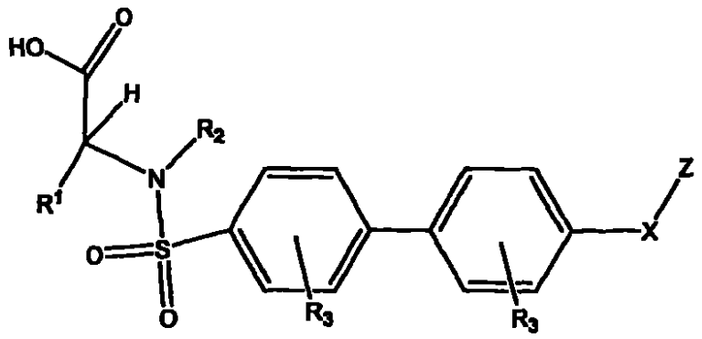
20. The method of claim 18 or 19, wherein the ADAMTS-5 is in a cell and the activity is measured in the cell.

21. The method of claim 20, further comprising contacting a cell lacking ADAMTS-5 with the potential agent, measuring the activity in the cell lacking ADAMTS-5 and comparing the activity to the activity of the cell having ADAMTS-5.

22. The method of claim 18, wherein the ADAMTS-5-associated disease is selected from the group consisting of osteoarthritis, cancer, asthma, chronic obstructive pulmonary disease ("COPD"), atherosclerosis, age-related macular degeneration, myocardial infarction, corneal ulceration and other ocular surface diseases, hepatitis, aortic aneurysms, tendonitis, central nervous system diseases, abnormal wound healing, angiogenesis, restenosis, cirrhosis, multiple sclerosis, glomerulonephritis, graft versus host disease, diabetes, inflammatory bowel disease, shock, invertebral disc degeneration, stroke, osteopenia, and periodontal disease.

23. The method of claim 18, wherein the ADAMTS-5-associated disease is osteoarthritis.

24. A method for modulating the activity of ADAMTS-5 comprising contacting ADAMTS-5 with a compound the formula I:



I

wherein:

R^1 is H or C1-C6 alkyl;

R^2 is H, C1-C6 alkyl, $(CH_2)_nR^{2'}$, phenyl, or benzyl;

n is 0-6;

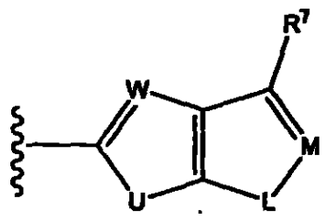
$R^{2'}$ is aryl, heteroaryl, cycloalkyl, or heterocycloalkyl;

R^3 is, independently with respect to each occurrence, H, halogen, $OC(halogen)_3$, $C(halogen)_3$, alkoxy, or C1-C6 alkyl;

X is selected from CH_2O, OCH_2, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)_2$-$C(R^3)_2$, $CH_2NHC(=O)$, $O(C=O)NH$, O, $C(=O)CH_2$, $SO_2CH_2C(=O)NH$, SO_2NH, $OC(=O)$, $CH_2S(O)$, and $CH_2S(O)_2$; and

Z is at least one aryl or heteroaryl moiety.

25. The method of claim 24, wherein Z is pyridine, pyrimidine, pyrazine, pyridazine, phenyl, naphthalene, furan, thiophene, pyrrole, pyrazole, imidazole, oxazole, isoxazole, thiazole, benzothiazole, quinoline, or isoquinoline, or



wherein:

U is selected from S, O, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)=N$, and $N(R^4)$;

W is selected from $C(R^3)$, and N;

M is selected from $C(R^3)$, and N;

L is selected from S, O, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)=N$, and $N(R^4)$;

R^4 and R^5 are, independently with respect to each occurrence, a bond to the other, H, C1-C6 alkyl, or phenyl;

R^7 is selected from a bond to R^3, H, halogen, $C(halogen)_3$, NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NHSO_2R^4$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, OR^4, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, phenyl, heteroaryl, C1-C6 alkyl, C2-C6 alkenyl, or C2-C6 alkynyl; and

R^8 is selected from H, phenyl, heteroaryl, and C1-C6 alkyl.

26. The method of claim 25 wherein R^7 is substituted with NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NHSO_2R^4$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, OR^8, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, phenyl, or heteroaryl.

27. The method of claim 25 wherein R^8 is substituted with NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NR^4SO_2R^5$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, phenyl, or heteroaryl.

28. The method of claim 24 wherein R^1 is H or branched alkyl.

29. The method of claim 24 wherein R^1 is isopropyl.

30. The method of claim 24 wherein R^3 is halogen, CF_3, OCH_3, or CH_3.

31. The method of claim 24 wherein X is CH_2O, OCH_2, $C(R^3)=C(R^3)$, or $CH_2NHC(=O)$.

32. The method of claim 24 wherein R^7 is CH_3, ethyl, isopropyl, CF_3, CN, or OCH_3.

33. The method of claim 24 wherein R^8 is CH3, phenyl, and benzyl.

34. The method of claim 24 wherein Z is bicyclic.

35. The method of claim 24, wherein the activity is metalloproteinase activity.

36. The method of claim 35, wherein the activity is aggrecanase activity.

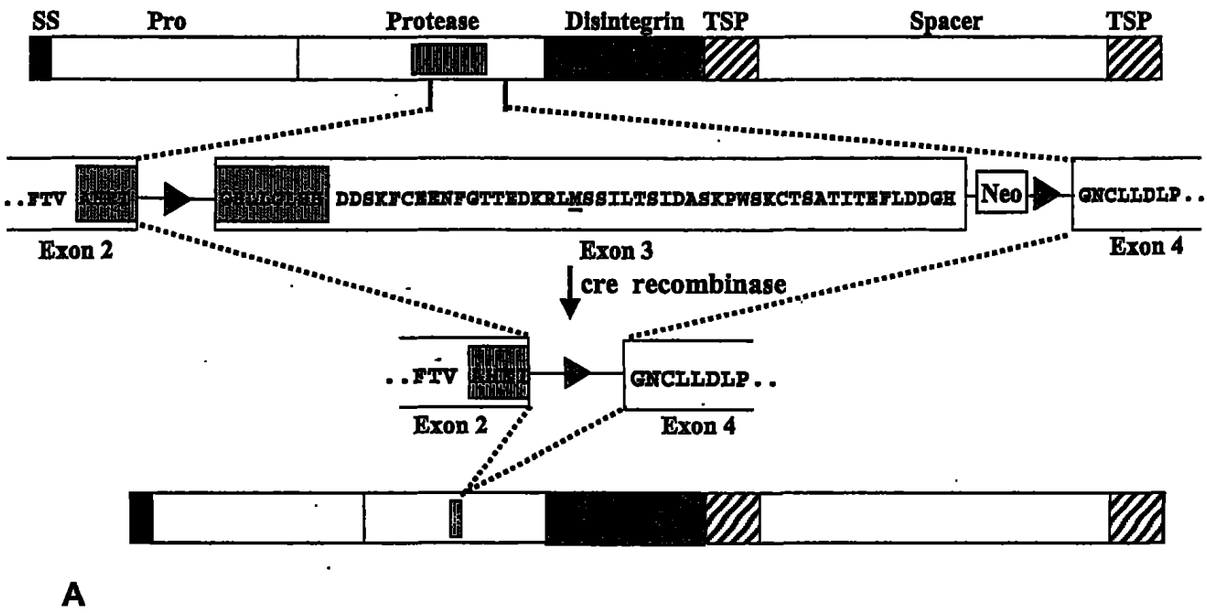
37. The method of claim 7 or 24, wherein the compound is selected from the group consisting of the compounds listed in Table 1.

38. The method of claim 1 or 18, wherein the agent is an anti-ADAMTS-5 antibody.

39. The method of claim 38, wherein the antibody has metalloprotese inhibitory activity.

40. The method of claim 39, wherein the antibody as aggrecanase inhibitory activity.

WO 2005/060456



A

Figure 1

PCT/US2004/037169

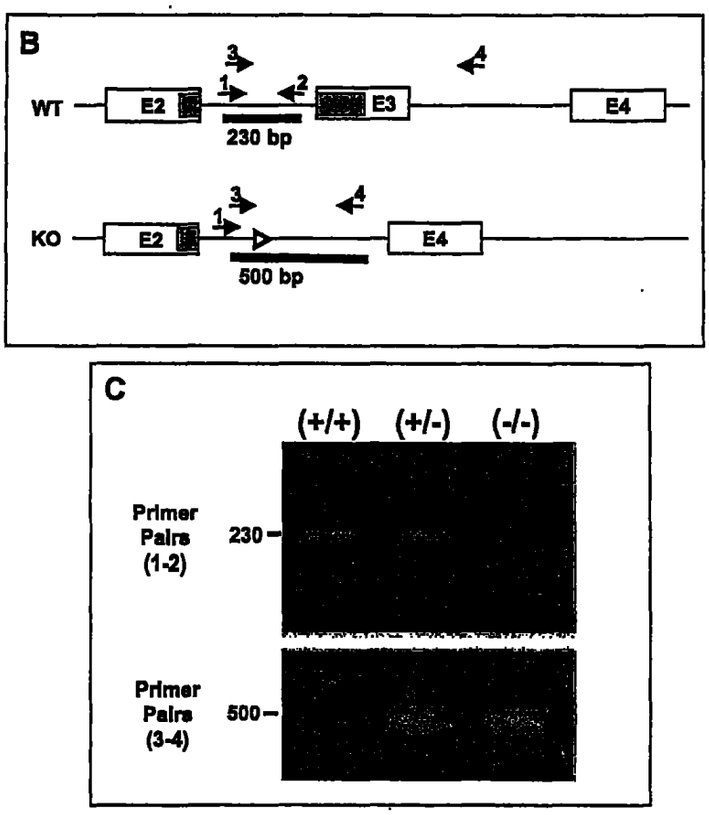
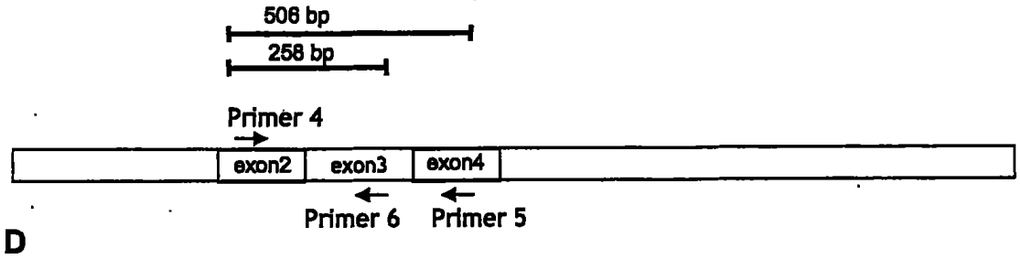
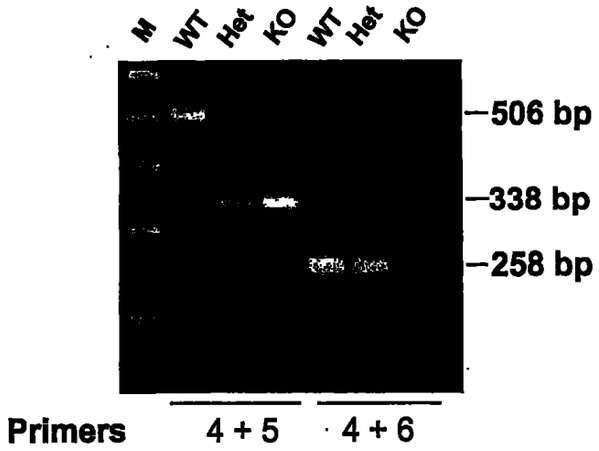

B
WT
E2
E3
E4
1
2
3
4
230 bp
KO
E2
E4
1
3
4
500 bp
C
(+/+)
(+/-)
(-/-)
Primer Pairs (1-2)
230
Primer Pairs (3-4)
500

Figure 1

WO 2005/060456



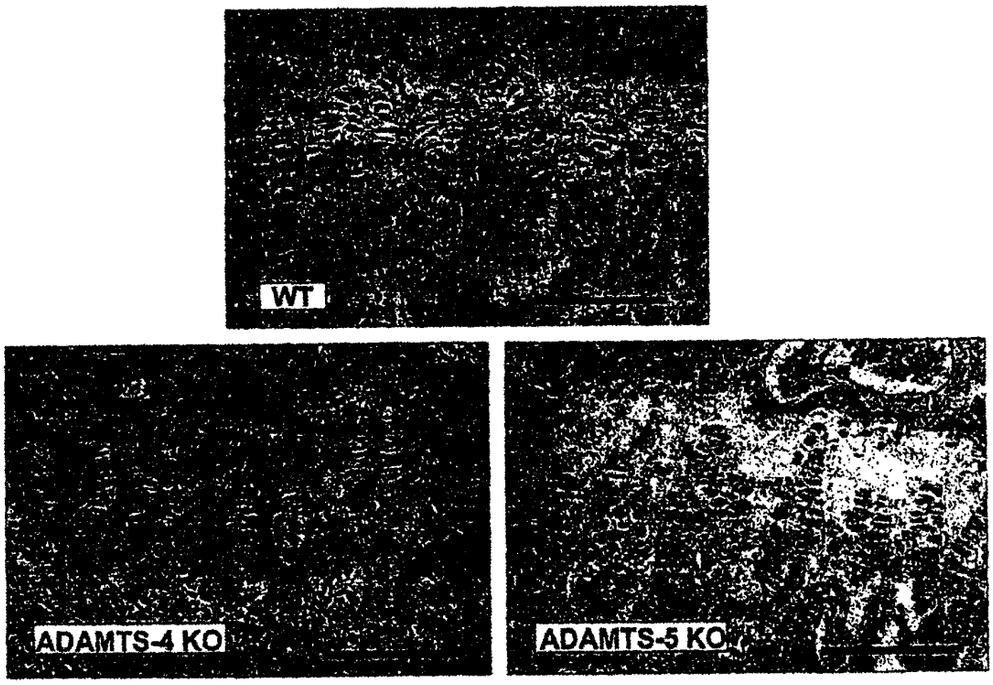
D



E

Figure 1

PCT/US2004/037169



Figur 2

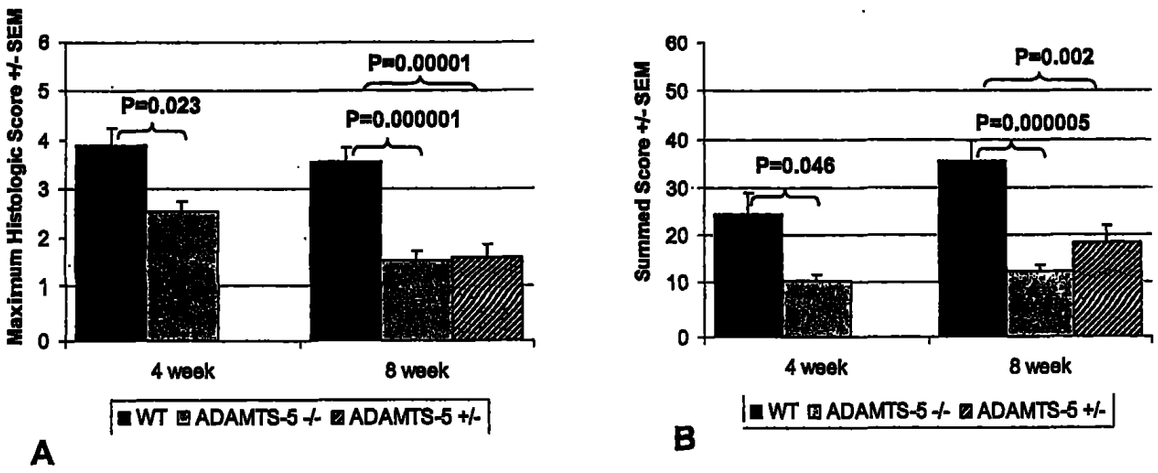

Maximum Histologic Score +/- SEM
P=0.023
P=0.00001
P=0.000001
4 week
8 week
WT ADAMTS-5 -/- ADAMTS-5 +/-
A
Summed Score +/- SEM
P=0.046
P=0.002
P=0.000005
4 week
8 week
WT ADAMTS-5 -/- ADAMTS-5 +/-
B

Figure 3

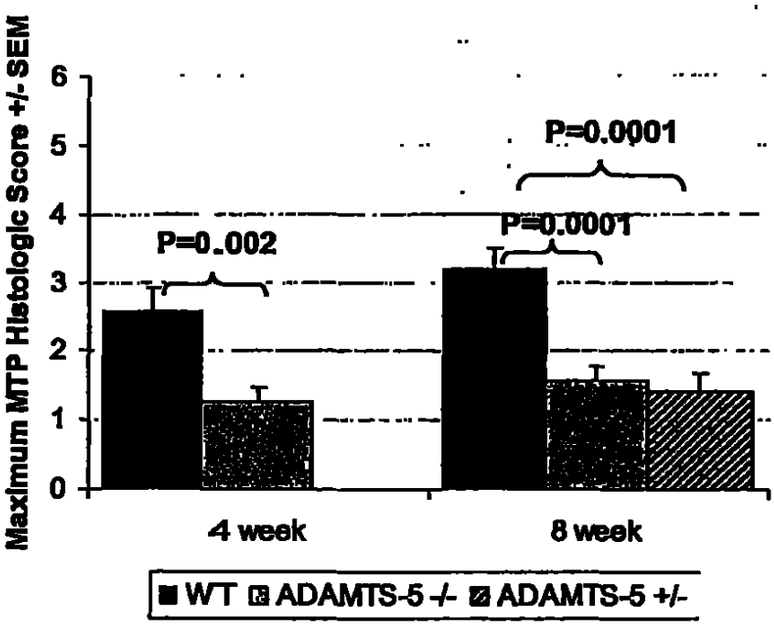
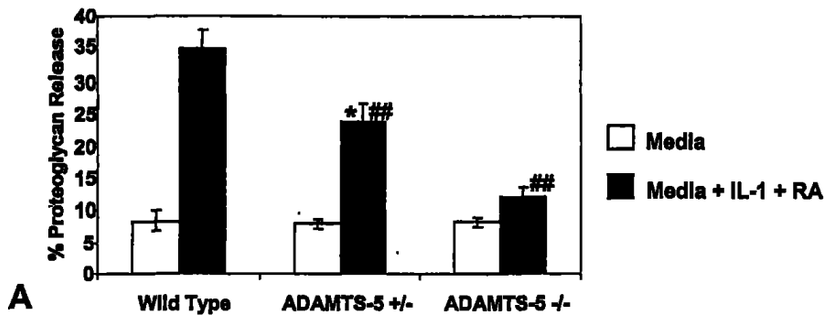

Maximum MTP Histologic Score +/- SEM
6
5
4
3
2
1
0
P=0.002
P=0.0001
P=0.0001
4 week
8 week
WT
ADAMTS-5 -/-
ADAMTS-5 +/-

Figure 4


% Proteoglycan Release
40
35
30
25
20
15
10
5
0
*T##
##
Media
Media + IL-1 + RA
A
Wild Type
ADAMTS-5 +/-
ADAMTS-5 -/-

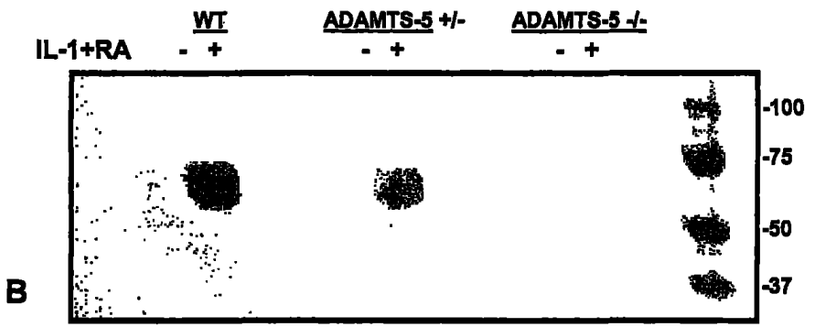

WT
ADAMTS-5 +/-
ADAMTS-5 -/-
IL-1+RA
- +
- +
- +
-100
-75
-50
-37
B

Figure 5



C

Figure 5

TÍTULO

MÉTODO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD ASOCIADA CON ADAMTS-5

REMISIÓN A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud tiene prioridad según el título 35 del código U.S.C. § 119(e) sobre la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 60/526.883 presentada el 4 de diciembre de 2003.

CAMPO DEL INVENTO

[0002] El presente invento se relaciona con un método para tratar una enfermedad asociada con ADAMTS-5, y particularmente la osteoartritis. En este documento, el término "ADAMTS" significa un motivo de tipo I de desintegrina y metaloproteasa con trombosondina. En este documento, el término "KO" se refiere a animales portadores de una mutación que causa una reducción significativa o ausencia de la expresión de un producto génico, tal como el producto génico ADAMTS-5 en las células del animal transgénico.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

[0003] La osteoartritis es una afección patológica en las articulaciones sinoviales caracterizada por una degradación de la matriz extracelular del cartílago. Un componente importante de la matriz extracelular del cartílago es el agrecano

proteoglucano. La escisión patológica de agrecano ocurre en dos sitios primarios dentro del dominio interglobular de la columna proteica, dando lugar a la liberación de la entidad funcional de la matriz extracelular. Un sitio ($N^{341-342}F$) es escindido por las metaloproteasas de la matriz (MPM), mientras que un segundo sitio de escisión, no de MPM sino que dentro del agrecano, ocurre en $E^{373-374}A$. El sitio de escisión $E^{373-374}A$ ha sido identificado como un sitio importante de degradación en las muestras del líquido sinovial osteoartrítico (Lohmander, Neame y Sandy, 1993, *Arthritis & Rhuem* 36:1214) y en cultivos de cartílago estimulados con citocina (Sandy et al., 1991, *J. Biol. Chem.* 266:8683). Varias enzimas ADAMTS han demostrado ser capaces de escindir el agrecano a nivel del sitio $E^{373-374}A$, o de "agrecanasa" (Kuno et al., 2000, *FEBS Letters* 478 :241; Rodriquez-Manzaneque et al., 2002, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293:501; Somerville et al., 2003, *Biol. Chem.* 278:9503; Patente de EE. UU. Nº 6.451.575). ADAMTS-4 y ADAMTS-5, o agrecanasa-1 y agrecanasa-2, respectivamente, parecen ser las dos enzimas capaces de ser sintetizadas por el cartílago articular con la actividad de "agrecanasa" más eficiente (>1000 veces) (Tortorella et al., 1999, *Science* 284:1664; y Abbaszade et al., 1999, *J. Biol. Chem.* 274:23443). Sin embargo, no está claro si estas enzimas serían responsables, colectiva o independientemente, de la degradación de agrecano en la osteoartritis.

[0004] La evidencia de ADAMTS-4 en la enfermedad articular se encuentra en varios informes de aumento de la expresión de ADAMTS-4 posterior al estímulo de los tejidos articulares con citocinas inflamatorias. Bau et al., 2002, *Arthritis & Rhuem* 46:2648-2657; Curtis et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275:721-724; Tortorella et al., 2001, *Osteoarthritis Cartilage* 9:539-552; Little et al., 2002, *Arthritis & Rhuem* 46:124-129; y Yamanashi et al., 2002, *J. Immunol.* 168:1405-1412. Los hallazgos *in vitro* indican que ADAMTS-4 es una de las pocas enzimas que pueden escindir eficientemente el agrecano en el sitio que es escindido en la enfermedad que se produce naturalmente. Tortorella et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275:18566-18573; Tortorella et al., 2002, *Matrix Biol.* 21:499-511.

[0005] Además, se sabe que las agrecanasas desempeñan un papel en otros trastornos en los cuales ocurre destrucción o degradación proteica extracelular, tales como cáncer,

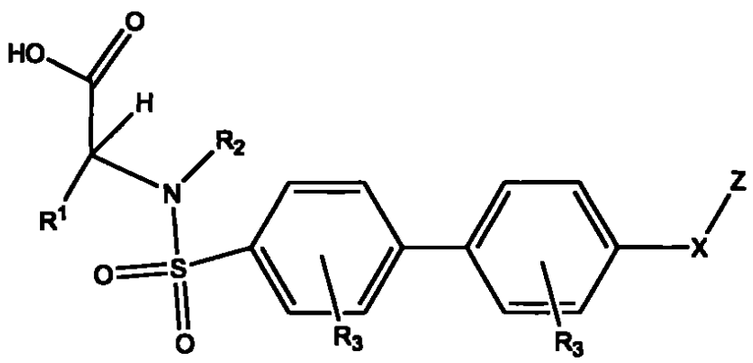
asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica ("EPOC"), ateroesclerosis, degradación macular relacionada con la edad, infarto de miocardio, ulceración corneal y otras enfermedades de la superficie ocular, hepatitis, aneurismas aórticos, tendinitis, enfermedades del sistema nervioso central, cicatrización anormal de heridas, angiogénesis, reestenosis, cirrosis, esclerosis múltiple, glomerulonefritis, enfermedad de injerto contra el huésped, diabetes, enfermedad intestinal inflamatoria, choque, degeneración de disco invertebral, apoplejía, osteopenia y enfermedades periodontales.

[0006] Se ha informado previamente la generación de los ratones KO ADAMTS-4 (Glasson et al., 2004, *Arthritis and Rheum*, 50:2547-2558). Aunque muchos informes mostraron al menos cierta evidencia de que ADAMTS-4 participa en el desarrollo de la osteoartritis, sorprendentemente este ratón no mostró diferencia alguna en la aparición de la osteoartritis con respecto a los de tipo salvaje (WT) y no exhibió diferencia alguna en la actividad de agrecanasa. A pesar de que sigue existiendo la posibilidad de que ADAMTS-4 participe en la osteoartritis en otros animales, incluso en el ser humano, hasta la fecha no se ha identificado la actividad de agrecanasa asociada con la acumulación patológica de productos de degradación de agrecano.

RESUMEN DEL INVENTO

[0007] El presente invento proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad asociada con ADAMTS-5, y particularmente la osteoartritis, que comprende la administración a un sujeto una cantidad eficaz de un agente inhibidor de ADAMTS-5. En una realización, el agente inhibidor de ADAMTS-5 inhibe la actividad de metaloproteinasa de ADAMTS-5. En otra realización, el agente inhibe la actividad de agrecanasa de ADAMTS-5. Los agentes particularmente preferidos, que son útiles para el tratamiento de las enfermedades asociadas con ADAMTS-5, y particularmente la osteoartritis, incluyen compuestos biarilsulfonamídicos y anticuerpos que se unen a ADAMTS-5 y lo inhiben.

[0008] Los compuestos biarilsulfonamídicos del invento son los de la fórmula I:



I

donde:

R^1 es H o C1-C6 alquilo;

R^2 es H, C1-C6 alquilo, $(CH_2)_nR^{2'}$, fenilo o bencilo;

n es 0-6;

$R^{2'}$ es arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo;

R^3 es, independientemente de cada incidencia, H, halógeno, $OC(halógeno)_3$, $C(halógeno)_3$, alcoxi o C1-C6 alquilo;

X se selecciona a partir de CH_2O, OCH_2, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)_2$-$C(R^3)_2$, $CH_2NHC(=O)$, $O(C=O)NH$, O, $C(=O)CH_2$, $SO_2CH_2C(=O)NH$, SO_2NH, $OC(=O)$, $CH_2S(O)$ y $CH_2S(O)_2$; y

Z es al menos una porción arilo o heteroarilo.

[0009] Las biarilsulfonamidas particularmente preferidas del invento se enumeran en la Tabla 1 a continuación, en el Ejemplo 4.

[0010] Además, el presente invento proporciona un método para identificar agentes que sirven para el tratamiento de la osteoartritis, usando los animales transgénicos del invento y las células aisladas de los mismos. En una realización en particular, los métodos constan de la administración de un agente terapéutico potencial a un animal transgénico ADAMTS-5 del invento y a un animal con actividad ADAMTS-5, y determinar si el agente terapéutico potencial es capaz de suprimir el comienzo de la osteoartritis inducida en el animal del tipo WT pero no en el animal transgénico ADAMTS-5. En otra realización, los métodos comprenden poner en contacto una célula derivada de un animal transgénico ADAMTS-5 y una célula derivada de un animal con actividad ADAMTS-5 con un agente terapéutico potencial, y determinar si

000197

el agente inhibe la actividad de metaloproteinasa en la célula con actividad ADAMTS-5 pero no en la célula del animal transgénico ADAMTS-5. Ambos métodos podrían, además, determinar si el agente inhibe la actividad de la agrecanasa o de la metaloproteinasa ADAMTS-5.

[0011] En otra realización, los métodos para identificar los agentes potenciales útiles para el tratamiento de enfermedades asociadas con ADAMTS-5, y particularmente la osteoartritis, comprenden identificar a los agentes que inhiben ADAMTS-5 por contacto con ADAMTS-5 y determinar si el agente inhibe ADAMTS-5. En una realización preferida, el agente inhibe la actividad de la metaloproteinasa de ADAMTS-5. En una realización particularmente preferida, el agente inhibe la actividad de agrecanasa de ADAMTS-5.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS GRÁFICOS

[0012] Estos y otros aspectos del invento se comprenderán más claramente si se consultan los gráficos y las descripciones detalladas de los ejemplos de realizaciones en los que:

[0013] La Figura 1 ilustra el trastorno objetivo del gen murino ADAMTS-5 (A) muestra un mapa de la secuencia de aminoácidos de ADAMTS-5, (B) muestra la caracterización alélica del animal KO ADAMTS-5 y la ubicación de los *primers* usados para generar productos de RCP, (C) muestra productos de RCP, generados usando los *primers* 1 y 2 que se muestran en 1B, y los productos de RCP generados usando los *primers* 3 y 4 que se muestran en 1B, (D) muestra un mapa del sitio de los *primers* usados en RCP-transcriptasa inversa (TI) para identificar ARNm en animales WT y KO, (E) muestra productos de RCP-TI generados usando los *primers* 4 y 5, y (G) muestra productos de RCP-TI generados usando los *primers* 4 y 6.

[0014] La Figura 2 muestra la ubicación inmunohistoquímica del neoepítopo $TEGE^{373}$ generado por agrecanasa en placas de cultivo de animales WT (arriba), animales KO ADAMTS-4 (abajo, izquierda) y animales KO ADAMTS-5 (abajo, derecha) de 14 a 18 semanas de vida;

[0015] La Figura 3 ilustra los puntajes histológicos de articulaciones de ratones WT, KO ADAMTS-5 homocigotos y ADAMTS-5 heterocigotos, 4 y 8 semanas después de la inducción de articulación quirúrgica en estabilidad (A) muestra los puntajes histológicos expresados como la clasificación media máxima de cada articulación y (B) muestra las clasificaciones histológicas expresadas como la media de la suma de las clasificaciones de cada sección histológica en las articulaciones;

[0016] La Figura 4 ilustra las clasificaciones histológicas medias máximas del plano tibial medial de animales WT, KO ADAMTS-5 homocigotos y KO ADAMTS-5 heterocigotos 4 y 8 semanas luego de la inducción de inestabilidad articular y

[0017] La Figura 5 ilustra la liberación de proteoglucano a partir del cartílago articular de animales WT y KO ADAMTS-5 (A) muestra el porcentaje de proteoglucano total liberado a partir del cartílago articular en cultivo, (B) muestra un análisis de inmunotransferencia del neoepítopo $TEGE^{373}$ liberado a partir del cartílago articular y

.. 000169

(C) muestra inmunotinción del cartílago articular de la cabeza femoral del cartílago articular de WT (arriba), KO ADAMTS-4 (centro) y KO ADAMTS-5 (abajo).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

[0018] El presente invento se relaciona con el descubrimiento de que la expresión de ADAMTS-5 está directamente relacionada con la osteoartritis. Los ratones transgénicos KO ADAMTS-5 son resistentes al comienzo de la osteoartritis cuando son estimulados para que desarrollen osteoartritis. Estos animales transgénicos representan el primer modelo animal en el que el trastorno en un gen individual resultó en la resistencia a la osteoartritis. En consecuencia, este descubrimiento nos llevó a la determinación de que ADAMTS-5 es una molécula objetivo de fármacos para el tratamiento de la osteoartritis y de que los inhibidores, preferiblemente los inhibidores de la agrecanasa, de ADAMTS-5 pueden usarse para tratar la osteoartritis.

[0019] Por consiguiente, el presente invento se relaciona con un método para prevenir o tratar la osteoartritis que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un agente que inhibe ADAMTS-5. Tales agentes incluyen, entre otros, ARN antisentido, compuestos farmacológicos, particularmente aquellos que se conjugan e inhiben el sitio de metaloproteinasa de ADAMTS-5, péptidos y proteínas, y anticuerpos capaces de conjugarse con ADAMTS-5 e inhibirlo.

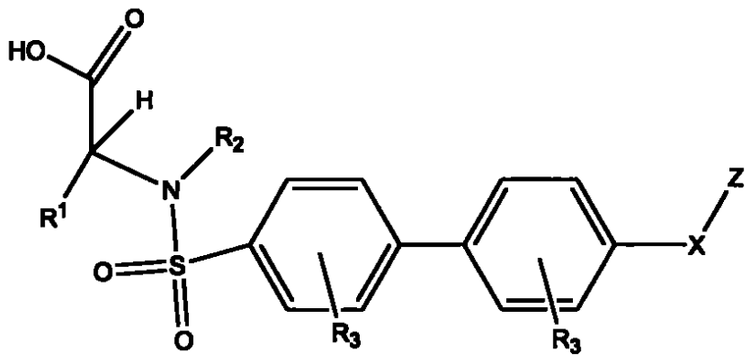
[0020] El término "cantidad eficaz", como se usa en este documento, se refiere a la cantidad de un agente que, cuando se administra a un sujeto, sirve para al menos aliviar parcialmente (y en realizaciones preferidas, prevenir o curar) una afección de la que se sospecha que sufre el sujeto.

[0021] En una realización preferida, el agente es un anticuerpo contra ADAMTS-5 que es capaz de inhibir la actividad de agrecanasa o la actividad de metaloproteinasa ADAMTS-5. En una realización particularmente preferida, el anticuerpo inhibe ADAMTS-5. Tales anticuerpos se desarrollan en profundidad a continuación, en el Ejemplo 5.

[0022] En otra realización preferida, el agente es un compuesto biarilsulfonamídico que ha demostrado actuar como un inhibidor de la metaloproteinasa o un inhibidor de la

agrecanasa. En una realización particularmente preferida, el agente es un compuesto biarilsulfonamídico que ha demostrado actuar como un inhibidor de ADAMTS-5 y es capaz de inhibir la actividad de agrecanasa de ADAMTS-5.

[0023] En una realización preferida, el compuesto biarilsulfonamídico es de la fórmula I:



I

donde:

R^1 es H o C1-C6 alquilo;

R^2 es H, C1-C6 alquilo, $(CH_2)_nR^{2'}$, fenilo o bencilo;

n es 0-6;

$R^{2'}$ es arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo;

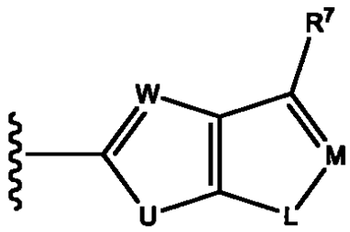
R^3 es, independientemente de cada incidencia, H, halógeno, $OC(halógeno)_3$, $C(halógeno)_3$, alcoxi o C1-C6 alquilo;

X se selecciona a partir de CH_2O, OCH_2, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)_2$-$C(R^3)_2$, $CH_2NHC(=O)$, $O(C=O)NH$, O, $C(=O)CH_2$, $SO_2CH_2C(=O)NH$, SO_2NH, $OC(=O)$, $CH_2S(O)$ y $CH_2S(O)_2$; y

Z es al menos una porción arilo o heteroarilo.

[0024] Se entiende que esta definición incluye sales y profármacos de estos compuestos, farmacéuticamente aceptables.

[0025] En una realización, Z es piridina, pirimidina, piracina, piridacina, fenilo, naftaleno, furano, tiofeno, pirrol, pirazol, imidazol, oxazol, isoxazol, tiazol, benzotiazol, quinolina o isoquinolina, o



donde:

U se selecciona a partir de S, O, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)=N$ y $N(R^4)$;

W se selecciona a partir de $C(R^3)$ y N;

M se selecciona a partir de $C(R^3)$ y N;

L se selecciona a partir de S, O, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)=N$ y $N(R^4)$;

R^4 y R^5 son, independientemente de cada incidencia, una unión al otro, H, C1-C6 alquilo o fenilo;

R^7 se selecciona a partir de una unión a R^3, H, halógeno, $C(halógeno)_3$, NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NHSO_2R^4$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, OR^4, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, fenilo, heteroarilo, C1-C6 alquilo, C2-C6 alquenilo o C2-C6 alquinilo, y

R^8 se selecciona a partir de H, fenilo, heteroarilo y C1-C6 alquilo.

R^7, cuando se sustituye, preferiblemente se sustituye con NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NHSO_2R^4$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, OR^8, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, fenilo o heteroarilo.

R^8, cuando se sustituye, preferiblemente se sustituye con NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NHSO_2R^4$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, OR^8, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, fenilo o heteroarilo.

[0026] Los preferidos entre los grupos R^1 mencionados son H y alquilo ramificado y, más preferiblemente, isopropilo.

[0027] Los preferidos entre los grupos R^3 mencionados son halógeno, CF_3, OCH_3 y CH_3.

[0028] Los preferidos entre los grupos X mencionados son CH_2O, OCH_2, $C(R^3)=C(R^3)$ y $CH_2NHC(=O)$.

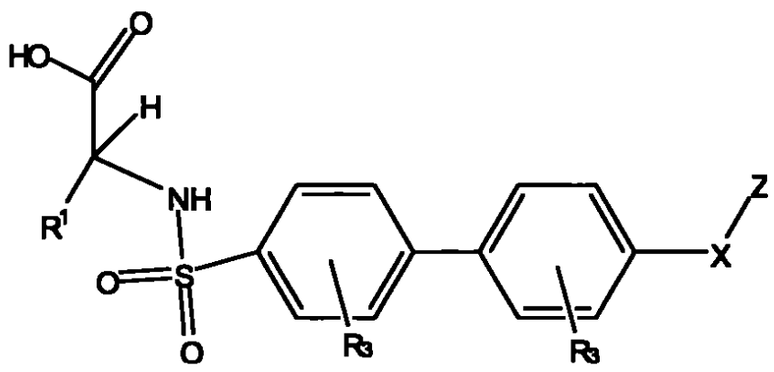
000172

[0029] Los preferidos entre los grupos R^7 mencionados son CH_3, etilo, isopropilo, CF_3, CN y OCH_3.

[0030] Los preferidos entre los grupos R^8 mencionados son CH_3, fenilo y bencilo.

[0031] En una realización, X es CH_2O y Z es arilo o heteroarilo, preferiblemente bicíclico.

[0032] En la Fórmula 2 a continuación, se presenta una biarilsulfonamida preferida:



donde

R1 es H o C_1-C_6 alquilo;

Rc es H, halógeno o C_1-C_6 alquilo;

X es 0, CH_2O o OCH_2 y

Z es al menos una porción arilo o heteroarilo.

Cuando Z es arilo, las porciones preferidas incluyen fenilo sustituido. Los sustitutos para el grupo fenilo incluyen preferiblemente OH, halógeno, C_1-C_6 alcoxi, benzoílo, C_1-C_6 alquilo o C_1-C_6 alcoleílo.

Cuando Z es un heteroarilo, las porciones preferidas incluyen bencilfuranilo, piridilo, indolilo.

[0033] En otra realización, X es OCH_2 y Z es arilo o heteroarilo, preferiblemente bicíclico.

[0034] En otra realización más, X es $C(R^3)=C(R^3)$ y Z es arilo o heteroarilo, preferiblemente bicíclico. Más preferiblemente, X es una unión doble *trans* carbono-carbono.

[0035] Incluso en otra realización más, X es $C(R^3)_2$-$C(R^3)_2$, Z es arilo o heteroarilo, preferiblemente bicíclico.

-- 000173

[0036] En una realización, X es CH_2NHCO, Z es arilo o heteroarilo, preferiblemente bicíclico.

[0037] Cuando X es carbamato O-CO-NH, Z es preferiblemente arilo o heteroarilo, preferiblemente bicíclico.

[0038] En una realización, X es CO2, Z es arilo o heteroarilo, preferiblemente bicíclico.

[0039] En otra realización, X es O, Z es arilo o heteroarilo, preferiblemente bicíclico.

[0040] En otra realización más, X es $C(=O)CH_2$, Z es arilo o heteroarilo, preferiblemente bicíclico.

[0041] En una realización, X es SO_2CH_2, Z es arilo o heteroarilo, preferiblemente bicíclico.

[0042] En una realización, X es OCH_2, Z es arilo o heteroarilo, preferiblemente bicíclico. Preferiblemente, si se sustituye, la sustitución se encuentra en el segundo anillo fenilo.

[0043] En una realización, X es OCH_2, Z es arilo o heteroarilo, preferiblemente bicíclico. Preferiblemente, si se sustituye, la sustitución se encuentra en el primer anillo fenilo.

[0044] En una realización, X es CH_2OCH_2, Z es arilo o heteroarilo, preferiblemente bicíclico. Preferiblemente, si se sustituye, la sustitución se encuentra en el primer anillo fenilo.

[0045] El término "alquilo" como se usa en este documento, ya sea solo o como parte de otro grupo, se refiere a una cadena de hidrocarburos alifáticos sustituidos o no sustituidos, e incluye, entre otras, cadenas rectas y ramificadas que contienen de 1 a 12 átomos de carbono, preferiblemente 1 a 6 átomos de carbono, a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, el término "alquilo" comprende metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, i-butilo y t-butilo. C1-C6 alquilo incluye grupos alifáticos de cadena recta y ramificada que tienen de 1 a 6 carbonos. En la definición de "alquilo" se incluyen específicamente las cadenas de hidrocarburos alifáticos sustituidas de manera opcional.

[0046] El número de carbonos que se usa en las definiciones de este documento se refiere a la columna y ramas de carbono pero no incluye los átomos de carbono de los sustitutos, tales como las sustituciones alcoxi y similares.

[0047] El término "alquenilo" como se usa en este documento, ya sea solo o como parte de otro grupo, se refiere a una cadena de hidrocarburos alifáticos sustituidos o no sustituidos, e incluye, entre otras, cadenas rectas y ramificadas que contienen de 2 a 8 átomos de carbono y al menos una unión doble. Preferiblemente, la porción alquenilo tiene 1 ó 2 uniones dobles. Estas porciones alquenilo pueden existir en las conformaciones E o Z, y los compuestos de este invento incluyen ambas conformaciones. C2-C6 alquenilo incluye una cadena de 1 a 6 carbonos, recta o ramificada, que contiene al menos una unión doble carbono-carbono. En la definición de "alquenilo" se incluyen específicamente las cadenas de hidrocarburos alifáticos sustituidas de manera opcional. Los heteroátomos, tales como O, S o N-R1, unidos a un alquenilo, no deben unirse a un átomo de carbono que se ha unido a una unión doble.

[0048] El término "alquinilo" se refiere a una porción hidrocarburo que contiene al menos una unión triple carbono-carbono. C2-C6 alquinilo incluye una cadena de 1 a 6 carbonos, recta o ramificada, que contiene al menos una unión triple carbono-carbono.

[0049] El término "cicloalquilo" se refiere a una porción hidrocarburo monovalente saturada monocíclica, bicíclica, tricíclica, fusionada, conectada o espiro en la que los átomos de carbono están situados dentro o fuera del sistema anular. Cualquier posición anular adecuada de la porción cicloalquílica puede estar covalentemente vinculada con la estructura química definida. Los ejemplos de porciones cicloalquílicas incluyen, entre otras, grupos químicos tales como ciclopropilo, ciclopropilmetilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo, ciclohexiletilo, cicloheptilo, norbornilo, adamantilo, espiro[4.5]decanilo y homólogos, isómeros y similares. C3-C6 cicloalquilo incluye anillos saturados monocíclicos de 3 a 6 carbonos, sustituidos con R^3 de manera opcional, o porción hidrocarburo insaturado espiro. Los ejemplos son ciclopentano, ciclohexano y ciclohexadieno.

[0050] El término "cicloalquenilo" se refiere a una porción hidrocarburo monovalente saturada monocíclica, bicíclica, tricíclica, fusionada, conectada o espiro en la que los átomos de carbono están situados dentro o fuera del sistema anular. Cualquier posición anular adecuada de la porción cicloalquílica puede estar covalentemente vinculada con la estructura química definida. Los ejemplos de porciones cicloalquílicas incluyen, entre otras, grupos químicos tales como ciclopropilo, ciclopropilmetilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo, ciclohexiletilo, cicloheptilo, norbornilo, adamantilo, espiro[4.5]decanilo y homólogos, isómeros y similares. C3-C6 cicloalquilo incluye anillos saturados monocíclicos de 3 a 6 carbonos, sustituidos con R3 de manera opcional.

[0051] "Arilo" se refiere a un hidrocarburo cíclico insaturado, con uno o más anillos, que puede fusionarse con un anillo carbocíclico o heterocíclico en cualquier posición posible. Los compuestos arílicos generalmente tienen moléculas con la estructura anular característica del benceno, naftaleno o similar.

[0052] "Heteroarilo" se refiere a un anillo arilo heterocíclico de 5 a 6 miembros, que contiene de 1 a 3 heteroátomos seleccionados a partir del grupo cuyo anillo está compuesto de átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre y que puede fusionarse con un anillo carbocíclico o heterocíclico en cualquier posición posible. Incluso heterocíclicos insaturados que no son aromáticos, tales como teinilo, furilo, pirrolilo y similares.

[0053] "Heterocicloalquilo" se refiere a un anillo saturado de 5 a 7 miembros que contiene átomos de carbono y de 1 a 2 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S.

[0054] El término "fenilo", como se usa en este documento, ya sea solo o como parte de otro grupo, se refiere a un grupo fenilo sustituido o no sustituido.

[0055] Una porción sustituida de manera opcional puede ser sustituida con uno o más sustitutos. Se pueden seleccionar los sustitutos opcionales adecuados independientemente a partir de H, halógeno, C1-C6 alquilo, C2-C6 alquenilo, C2-C6 alquinilo, NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NHSO_2R^4$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, OR^4, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$ y CN.

[0056] Cuando estas porciones son sustituidas, por ejemplo, típicamente pueden ser mono, di, tri o persustituidas. Los ejemplos de un sustituto halógeno incluyen 1-bromovinilo; 1-fluorovinilo; 1,2-difluorovinilo; 2,2-difluorovinilo; 1,2,2-trifluorovinilo; 1,2-dibromoetano; 1,2 difluoroetano; 1-fluoro-2-bromoetano; CF_2CF_3, $CF_2CF_2CF_3$ y similares.

[0057] El término halógeno incluye bromo, cloro, flúor y yodo.

[0058] Para simplificar, no se representan los puntos de conexión ("-"). Cuando un átomo o compuesto se describe para definir una variable, se entiende que intenta reemplazar la variable en una forma que satisfaga la valencia del átomo o el compuesto. Por ejemplo, cuando L es $C(R^3)=C(R^3)$, ambos átomos de carbono forman una parte del anillo para satisfacer sus respectivas valencias.

[0059] El término "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en este documento, se refiere a sales derivadas de ácidos orgánicos e inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético, propiónico, láctico, cítrico, tartárico, succínico, fumárico, maleico, malónico, mandélico, málico, ftálico, clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, metalsulfónico, naftalensulfónico, bencensulfónico, toluensulfónico, canforsulfónico y ácidos aceptables similarmente conocidos cuando un compuesto de este invento contiene una porción básica. Las sales pueden estar formadas a partir de bases orgánicas e inorgánicas, preferiblemente sales metales alcalinas, por ejemplo, sodio, litio o potasio, cuando un compuesto de este invento contiene una porción carboxilato o fenólica, o porción similar capaz de formar sales de adición de base.

[0060] El término "sujeto" como se usa en este documento se refiere a un mamífero, preferiblemente a un ser humano.

[0061] Los términos "administrar", "administrando" o "administración", como se usan en este documento, se refieren a la administración directa de un compuesto o una composición a un paciente, o la administración de un profármaco derivado o análogo del compuesto al paciente, que formará una cantidad equivalente del compuesto activo o la sustancia en el cuerpo del paciente.

[0062] El término "portador", como se usa en este documento, comprenderá portadores, excipientes y diluyentes.

[0063] Los compuestos de este invento pueden contener un átomo de carbono asimétrico y algunos de los compuestos de este invento pueden contener uno o más centros asimétricos y, por ende, pueden dar lugar a diastereómeros e isómeros ópticos. Aunque se muestra sin referencia a la estereoquímica en la fórmula I, el presente invento incluye tales diastereómeros e isómeros ópticos, así como los estereoisómeros R y S enantioméricamente puros, racémicos y resueltos, al igual que otras mezclas de los estereoisómeros R y S y sus sales farmacéuticamente aceptables. Cuando se prefiera un estereoisómero, podrá proporcionarse en algunas realizaciones sustancialmente libre del enantiómero correspondiente. Por consiguiente, un enantiómero sustancialmente libre del enantiómero correspondiente, se refiere a un compuesto que está aislado o separado mediante técnicas de separación o preparado sin el enantiómero correspondiente. "Sustancialmente libre", como se usa en este documento, significa que el compuesto está formado por una proporción significativamente mayor de un estereoisómero, preferiblemente menos de aproximadamente el 50%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 25% y aún más preferiblemente, menos de aproximadamente el 10% del enantiómero correspondiente.

[0064] El presente invento proporciona, por lo tanto, composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto biarilsulfonamídico y uno o más portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

[0065] Los expertos conocen muy bien los ejemplos de tales portadores y se preparan de acuerdo con procedimientos farmacéuticos aceptables, tales como, por ejemplo, los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th edition, ed. Alfonoso R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA (1985), que se incorpora en su totalidad como referencia. Los portadores farmacéuticamente aceptables son los que son compatibles con los demás ingredientes de la fórmula y biológicamente aceptables.

[0066] Se pueden administrar los compuestos de este invento por vía oral o parenteral, solos o combinados con portadores farmacéuticos convencionales. Los portadores sólidos correspondientes pueden incluir una o más sustancias que pueden también actuar como agentes aromatizantes, lubricantes, solubilizantes, de suspensión, rellenos, deslizantes, de ayuda en la compresión, aglutinantes o desintegrantes de tabletas o materiales de encapsulado. Estos se formulan de manera convencional, por ejemplo, en una forma similar a la usada para los agentes antihipertensivos, diuréticos y agentes β-bloqueadores conocidos. Las fórmulas orales que contienen los compuestos activos de este invento pueden comprender cualquier forma oral usada convencionalmente, incluso tabletas, cápsulas, formas bucales, grageas, pastillas y líquidos, suspensiones o soluciones orales. En polvos, el portador es un sólido finamente dividido, que es una mezcla con el ingrediente activo finamente dividido. En tabletas, el ingrediente activo se mezcla con un portador que tiene las propiedades de comprensión necesarias, en proporciones adecuadas y que se comprime en la forma y tamaño deseados. Los polvos y tabletas preferiblemente contienen hasta un 99% del ingrediente activo.

[0067] Las cápsulas pueden contener mezclas de los compuestos activos, con rellenos o diluyentes inertes, tales como los almidones farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, almidón de maíz, papa o tapioca), azúcares, agentes edulcorantes artificiales, celulosas en polvo, tales como celulosas cristalina y microcristalina, harinas, gelatinas, gomas y similares.

[0068] Las fórmulas útiles en tableta se pueden producir por compresión convencional, métodos de granulación húmeda o de granulación seca y utilizar diluyentes, agentes aglutinantes, lubricantes, desintegrantes, modificadores de superficie (incluso surfactantes), agentes de suspensión o estabilizantes, incluso, entre otros, estearato de magnesio, ácido esteárico, lauril sulfato de sodio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa cálcica, polivinilpirrolidina, ácido algínico, goma acacia, goma xantán, citrato de sodio, silicatos complejos, carbonato de calcio, glucina, sacarosa, sorbitol, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, lactosa, caolín, manitol, cloruro de sodio, ceras con bajo punto de fusión y resinas de

intercambio de iones farmacéuticamente aceptables. Los agentes modificadores de superficie preferidos incluyen agentes modificadores de superficie no iónicos y aniónicos. Los ejemplos representativos de agentes modificadores de superficie incluyen, entre otros, POLOAXEMER 188, un copolímero de bloque de etilenglicol y propilenglicol, cloruro de benzalconio, estearato de calcio, alcohol cetoestearílico, cera emulsionante cetomacrogol, ésteres de sorbitán, dióxido de silicona coloidal, fosfatos, dodecilsulfato de sodio, silicato de aluminio y magnesio y trietanolamina. Las fórmulas orales incluidas pueden utilizar fórmulas estándares demoradas o de liberación prolongada para alterar la absorción de los compuestos activos. La fórmula oral también puede comprender la administración del ingrediente activo en agua o jugo de frutas, con los agentes solubilizantes o emulsionantes apropiados que se necesiten.

[0069] Pueden usarse portadores líquidos en la preparación de las soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires. Es posible disolver o suspender el ingrediente activo de este invento en un portador líquido farmacéuticamente aceptable, como agua, un disolvente orgánico, una mezcla de ambos o aceites o grasas farmacéuticamente aceptables. El portador líquido puede contener otros aditivos farmacéuticamente adecuados, como agentes solubilizantes, emulsionantes, *buffers*, conservantes, edulcorantes, aromatizantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, colores, reguladores de la viscosidad, estabilizantes o reguladores osmóticos. Los ejemplos adecuados de portadores líquidos para la administración oral y parenteral incluyen agua (particularmente con aditivos como los mencionados anteriormente, por ejemplo, derivados de celulosa, preferiblemente solución de carboximetilcelulosa sódica), alcoholes (incluso alcoholes monohídricos y polihídricos, por ejemplo, glucoles) y sus derivados, y aceites (por ejemplo, aceite fraccionado de coco y aceite de araquís). Para la administración parenteral, el portador también puede ser un éster oleoso como el oleato etílico y el miristato isopropílico. Los portadores líquidos estériles se usan en composiciones en forma líquida estéril para la administración parenteral. El portador líquido para composiciones a presión puede ser hidrocarburo halogenado u otro agente de propulsión farmacéuticamente aceptable.

[0070] Las composiciones farmacéuticas líquidas, que son soluciones o suspensiones estériles, pueden ser utilizadas, por ejemplo, para inyección intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. Las soluciones estériles también pueden administrarse por vía intravenosa. Las composiciones para la administración oral pueden estar en forma líquida o sólida.

[0071] Preferiblemente, la composición farmacéutica viene en forma de unidad posológica, por ejemplo, tabletas, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, gránulos o supositorios. En esta forma, la composición se subdivide en dosis unitarias que contienen las cantidades apropiadas del ingrediente activo; las formas en unidades posológicas pueden ser composiciones envasadas, por ejemplo, polvos envasados, frascos, ampollas, jeringas cargadas o sobrecitos que contienen líquidos. La forma de unidad posológica puede ser, por ejemplo, una cápsula o una tableta, o puede ser la cantidad apropiada de cualquiera de estas composiciones envasada. Estas unidades posológicas pueden contener entre 1 mg/kg hasta aproximadamente 250 mg/kg y se pueden administrar en una sola dosis, en dos dosis o en más. Tales dosis se pueden administrar de cualquier manera, siempre que sirva para dirigir los compuestos activos a la circulación sanguínea del receptor, incluso por vía oral, por medio de implantes, o vía parenteral (incluso inyecciones intravenosas, intraperitoneales y subcutáneas), rectal, vaginal y transdérmica. La administración se puede realizar usando estos compuestos, o bien sus sales farmacéuticamente aceptables, en lociones, cremas, espumas, parches, suspensiones, soluciones y supositorios (rectales y vaginales).

[0072] Cuando se administran para el tratamiento o la inhibición de un estado patológico o trastorno en particular, se entiende que la posología eficaz puede variar de acuerdo al compuesto específico que se utilice, el modo de administración, el estado y la gravedad de la afección que se está tratando, así como los diversos factores físicos relacionados con el individuo que se está tratando. En la aplicación terapéutica, los compuestos del presente invento se proporcionan a un paciente que sufre de una enfermedad cuyo estado es lo suficientemente grave para curar o al menos aliviar parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. La cantidad adecuada para lograr esto se define como una "cantidad terapéuticamente eficaz". La

posología que se usará en el tratamiento de un caso específico la determinará subjetivamente el médico de cabecera. Las variables incluyen la afección específica y el tamaño, la edad y el patrón de respuesta del paciente.

[0073] En algunos casos, puede ser aconsejable administrar los compuestos directamente en las vías respiratorias con un aerosol. Para la administración por inhalación intranasal o intrabraquial, los compuestos de este invento pueden formularse en una solución acuosa o parcialmente acuosa.

[0074] Se pueden administrar los compuestos de este invento por vía parenteral o intraperitoneal. Las soluciones o suspensiones de estos compuestos activos como base libre o sal farmacéuticamente aceptable pueden prepararse en agua mezclada de manera adecuada con un agente surfactante, tal como hidroxilpropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y sus mezclas en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para inhibir el crecimiento de microorganismos.

[0075] Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida para permitir la administración con jeringa. Debe ser estable en condiciones de fabricación y almacenamiento y poder conservarse ante la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), sus mezclas adecuadas y aceites vegetales.

[0076] Los compuestos de este invento se pueden administrar a nivel transdérmico mediante el uso de un parche transdérmico. A los fines de esta divulgación, se entiende que las administraciones transdérmicas incluyen todas las administraciones que se realizan en toda la superficie corporal y paredes internas de los pasajes corporales, incluso los tejidos epiteliales y mucosos. La administración se puede realizar usando estos

compuestos, o bien sus sales farmacéuticamente aceptables, en lociones, cremas, espumas, parches, suspensiones, soluciones y supositorios (rectales y vaginales).

[0077] La administración transdérmica se puede lograr mediante el uso de un parche transdérmico que contenga el compuesto activo y un portador que sea inerte frente al compuesto activo, que no sea tóxico para la piel y que permita la liberación del agente para la absorción sistémica en la circulación sanguínea a través de la piel. El portador puede venir en forma de cremas y ungüentos, pastas, gelatinas y dispositivos oclusivos. Las cremas y ungüentos pueden ser líquidos viscosos o emulsiones semisólidas del tipo de aceite en agua o agua en aceite. Pueden ser adecuadas las pastas compuestas de polvos absorbentes dispersos en petróleo o petróleo hidrófilo que contiene el ingrediente activo. Puede usarse una variedad de dispositivos oclusivos para liberar el ingrediente activo en la circulación sanguínea, tales como membranas semipermeables que cubren un depósito que contiene el ingrediente activo con o sin el agente portador, o una matriz que contiene el ingrediente activo. Se han publicado otros dispositivos oclusivos.

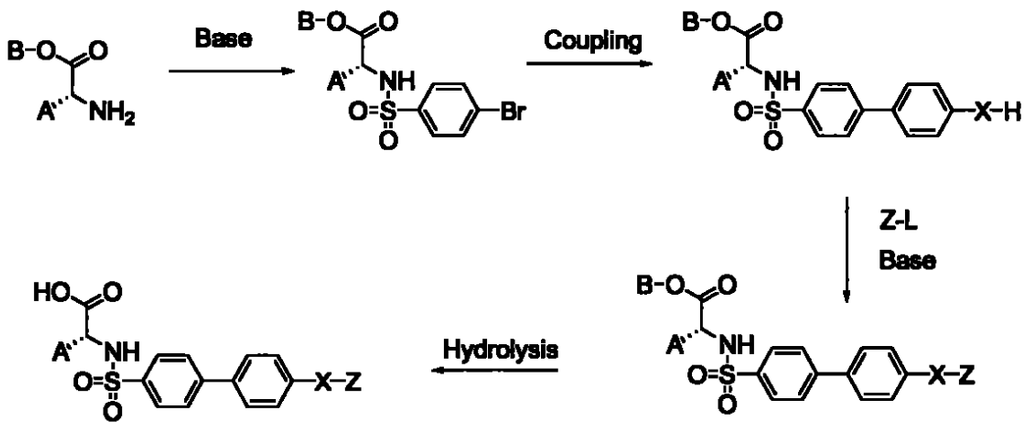
[0078] Los compuestos de este invento se pueden administrar por vía rectal o vaginal, en forma de un supositorio convencional. Las fórmulas en supositorios se pueden producir con materiales tradicionales, incluso con mantequilla de cacao, con o sin el añadido de ceras para alterar el punto de fusión del supositorio, y glicerina. También pueden usarse bases de supositorios solubles en agua, tales como polietilenglicoles de varios pesos moleculares.

[0079] En ciertas realizaciones, el presente invento se dirige a profármacos de compuestos biarilsulfonamídicos. Se conocen varias formas de profármacos en la tecnología, por ejemplo, como se describe en Bundgaard, (red.), Design of Prodrugs, Elsevier (1985); Widder, et al. (ed.), Methods in Enzymology, vol. 4, Academic Press (1985); Krogsgaard-Larsen, et al. (ed.), "Design and Application of Prodrugs", Textbook of Drug Design and Development, Capítulo 5, 113-191 (1991), Bundgaard, et al., Journal of Drug Deliver reviews, 8:1-38 (1992), Bundgaard, J. of Pharmaceutical Sciences, 77:285 et seq. (1988); e Higuchi y Stella (ed.) Prodrugs as Novel Drug Delivery Systems, American Chemical Society (1975), cada uno de los cuales se incorpora aquí en su totalidad como referencia.

[0080] Se entiende que la posología, el régimen y el modo de administración de los compuestos del invento variarán de acuerdo con la enfermedad y el individuo que se esté tratando, y estarán sujetos al criterio del profesional médico involucrado. Se prefiere que la administración de uno o más de los compuestos aquí incluidos comience con una dosis baja y que se aumente hasta lograr el efecto deseado.

[0081] Los compuestos del invento actual se prepararon de acuerdo con el siguiente esquema sintético general, a partir de materias primas disponibles comercialmente, materiales preparados como se describió en procedimientos publicados, o nuevos intermediarios descritos en los esquemas y procedimientos experimentales. Este esquema general cubre la mayoría de los ejemplos. Para obtener más información, sírvase consultar los esquemas citados en la sección de Ejemplos a continuación.

Esquema sintético general

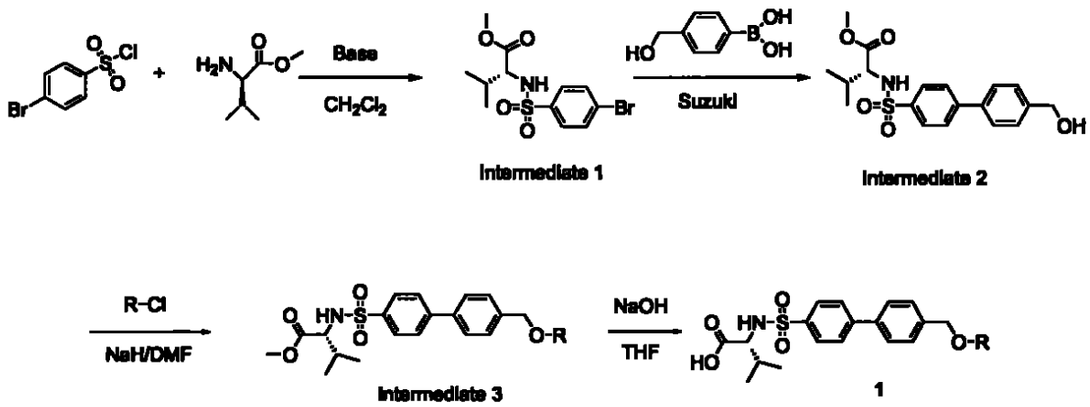


[0082] Las bases usadas aquí son trietilamina, carbonato de potasio, NaH, base Hunig, etc. Por lo general, el acoplado se concluyó mediante acoplado de Suzuki o de Stille. La hidrólisis se llevó a cabo usando TFA, NaOH, LiOH, H_2CO3, etc.

[0083] Las rutas sintéticas más específicas para muchos de los compuestos del invento se incluyen en los siguientes esquemas. Es un hecho conocido por los expertos que los pasos de protección y desprotección que no se muestran en los esquemas pueden ser necesarios para estas síntesis y que el orden de los pasos puede cambiar para acomodar la funcionalidad en las moléculas objetivo.

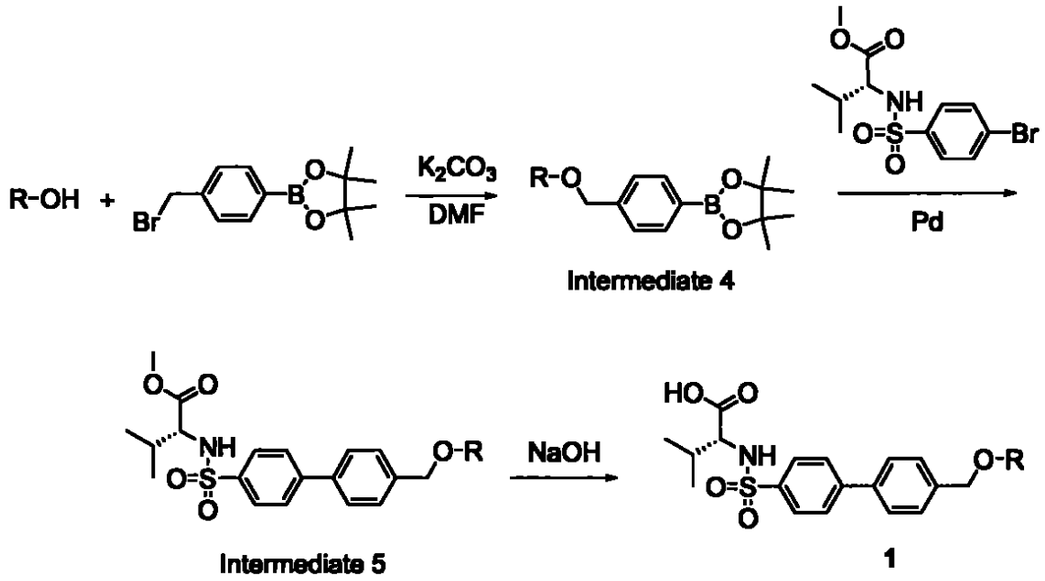
[0084] En el Esquema 1, los compuestos del invento, **1**, se preparan en 4 pasos. La sulfonilación del éster metílico de valina con cloruro de 4-bromo-bencensulfonilo se llevó a cabo en presencia de la base Hunig para dar sulfonamida Intermedia 1. Este 4-bromo-bencensulfonamida se acopló con éster boronato usando catalizador de paladio bajo condición de acoplamiento de Suzuki, para dar bifenilsulfonamida Intermedia 2. La bifenilsulfonamida Intermedia 2 se alquiló entonces con varios reactivos alquilantes para proporcionar el éster de bifenilsulfonamida (Intermedio 3). La hidrólisis del Intermedio 3 se llevó a cabo usando bases tales como NaOH o LiOH para formar el producto final **1**.

Esquema 1



[0085] En el Esquema 2 se muestra una ruta alternativa a los compuestos 1. El derivado de fenol se convirtió en pinacolborano (Intermedio 4) bajo condición básica en DMF. El pinacolborano se acopló entonces con 4-bromo-bencensulfonamida bajo condición de Suzuki para proporcionar bifenilsulfonamida Intermedia 5 que se hidrolizó al producto final en condiciones básicas.

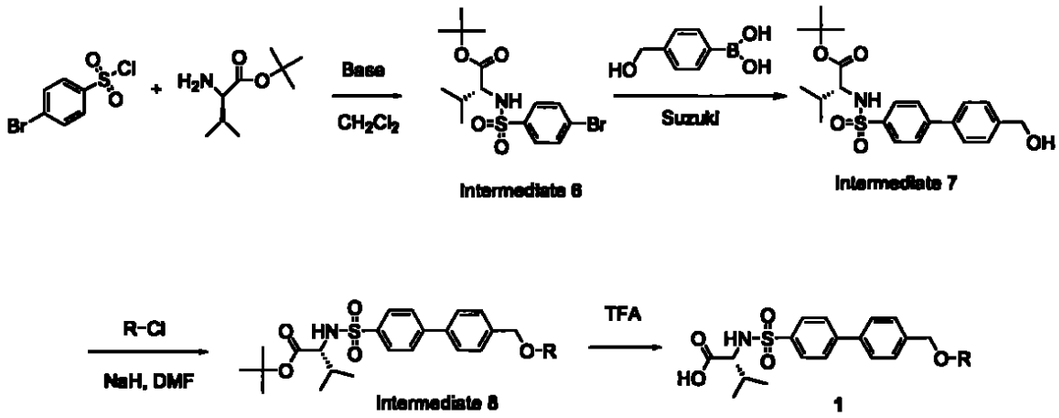
Esquema 2



[0086] Una tercera opción para preparar compuestos del invento, 1, se lleva a cabo en base al Esquema 3. La secuencia sintética en el Esquema 3 es similar a la del Esquema 1 pero

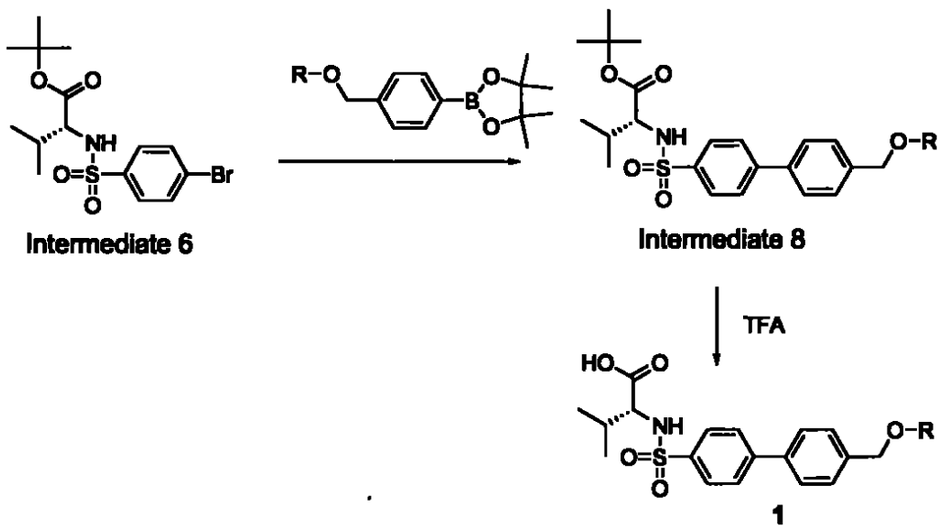
usa una materia prima diferente, el éster terc-butílico de valina. Por consiguiente, el paso final para formar el producto 1 se llevó a cabo usando TFA para desproteger el grupo de éster terc-butílico del Intermedio 8.

Esquema 3



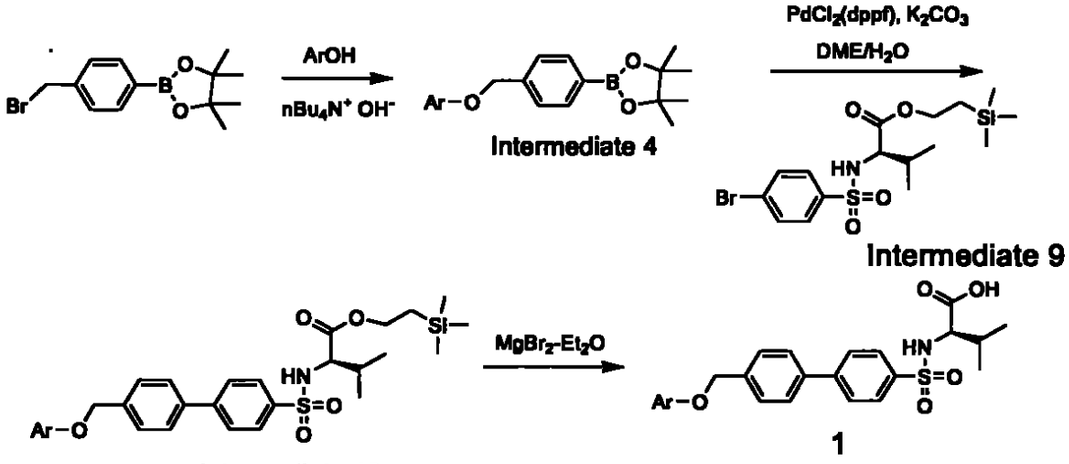
[0087] Puede efectuarse una ligera modificación al Esquema 3 para producir los compuestos del invento 1. Esto se ilustra en el Esquema 4A. En este caso, se adquiere éster boronato con porción etérea adecuada de una fuente comercial y se usa para acoplamiento de Suzuki para proporcionar el Intermedio 8. La desprotección con TFA del éster terc-butílico del Intermedio 8 resultó en el producto final 1 deseado.

Esquema 4A



[0088] Los compuestos del invento I también pueden prepararse por hidrólisis de un éster adecuado, tal como el Intermedio 10.

Esquema 4B



[0089] El Esquema 4B cuenta con una alquilación, un acoplamiento de Suzuki y un paso de desprotección como se muestra a continuación.

[0090] *Alquilación*: El derivado de fenol (4,14 mmol) se disuelve en metanol (6 ml) y se trata con hidróxido de tetrabutilamonio (4,14 mmol). La mezcla se agita durante 10

minutos y el disolvente se retira bajo presión reducida. El residuo se disuelve en THF (10 ml) y se trata con una solución del bromuro bencílico (4,14 mmol) en THF (5 ml). La reacción se agita a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se retira bajo presión reducida y se vuelve a disolver en diclorometano (5 ml) y éter (50 ml). La solución orgánica se lava con agua (4 x 50 ml) y solución de cloruro de sodio saturada (50 ml) y se seca sobre sulfato de magnesio. La solución orgánica se filtra y concentra bajo presión reducida. El material crudo se purifica mediante cromatografía instantánea de gel de sílice para producir el producto purificado con un rendimiento del 53%, que es un éster boronato Intermedio 4.

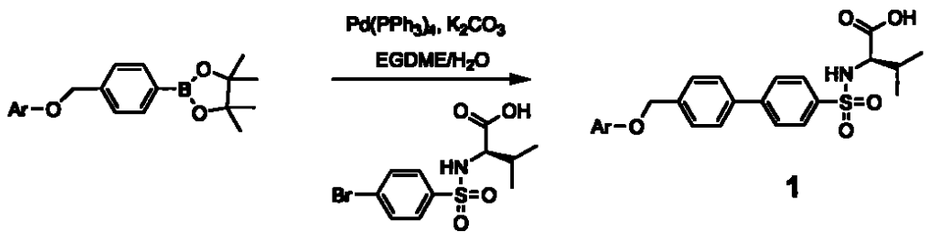
[0091] *Acoplamiento de Suzuki*: El éster boronato (1,07 mmol) y el bromuro de arilo (1,07 mmol) se disuelven en éter dimetílico de etilenglicol (10 ml) y la solución obtenida se trata con tetraquis(trifenilfosfin)paladio(0) (0,054 mmol). Se añade una solución de carbonato de potasio (2,14 mmol) en agua (3,5 ml) y la reacción se calienta a reflujo durante 1 hora. La reacción se enfría, se filtra para extraer los sólidos, se diluye en agua (10 ml) y se concentra bajo presión reducida. El residuo se extrae con diclorometano (3 x 25 ml) y las capas orgánicas se lavan con agua (25 ml) y solución de cloruro de sodio saturado (25 ml). La solución orgánica se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra bajo presión reducida. La purificación mediante cromatografía instantánea con gel de sílice proporciona el producto Intermedio 10, un éster (trimetilsilil)etílico del producto deseado, con un rendimiento del 57%. En algunos casos se usó PdCl2(dppf) como catalizador en lugar de tetraquis(trifenilfosfin)paladio(0).

[0092] *Desprotección con $MgBr_2$*: El éster 2-(trimetilsilil)etílico (0,0621 mmol) se disuelve en diclorometano (58 ml) y se trata con eterato de bromuro de magnesio (0,186 mmol). La mezcla se agita vigorosamente durante la noche o hasta completarse la reacción y luego se agita con HCl al 10% (3 x 25 ml) y solución de cloruro de sodio saturada (25 ml). La solución orgánica se seca entonces sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra bajo presión reducida para dar el producto con un rendimiento del 95%. El producto crudo puede purificarse mediante CLAR cuando sea necesario.

[0093] Como se muestra en el Esquema 4C, el acoplamiento de Suzuki puede llevarse a cabo en ácido libre con éster boronato. Por consiguiente, se evita la hidrólisis de los ésteres

(como en el Intermedio 10). Esto resulta en la preparación directa de los compuestos **1**.

Esquema 4C

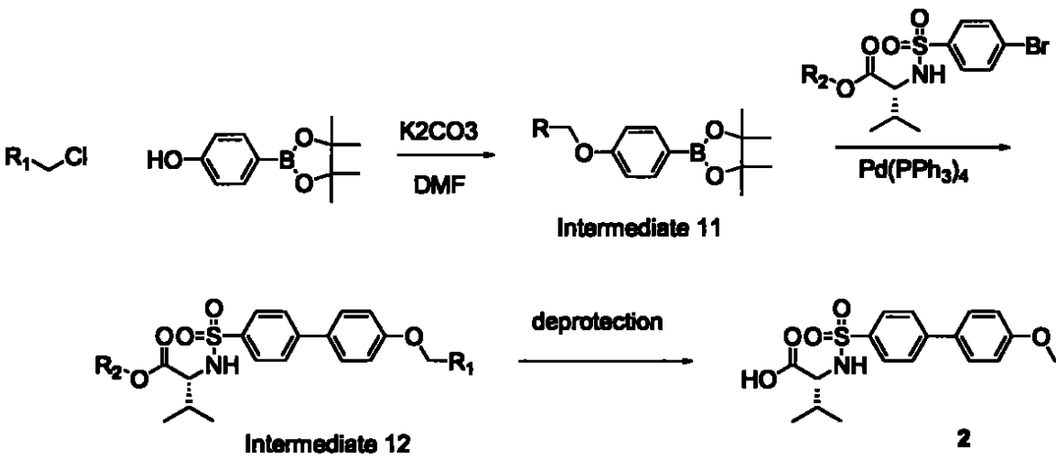


[0094] Acoplamiento de Suzuki con ácido libre: El éster boronato (1,36 mmol) y el bromoácido (1,36 mmol) se disuelven en éter dimetílico de etilenglicol (13,8 ml) y la solución obtenida se trata con tetraquis(trifenilfosfin)paladio(0) (0,068 mmol). Después de agitar durante 10 minutos a temperatura ambiente, se añade una solución de carbonato de potasio (4,08 mmol) en agua (4,8 ml). La solución se calienta a reflujo durante 2 horas y luego se deja enfriar a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentra hasta un residuo acuoso bajo presión reducida y se añade acetato etílico (50 ml). La mezcla orgánica se lava con HCl al 10% (2 x 25 ml) y cloruro de sodio saturado (25 ml). La solución orgánica se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra hasta un residuo crudo, que se purifica usando cromatografía instantánea con gel de sílice para obtener el producto con un rendimiento del 64%.

[0095] En el Esquema 5, los compuestos del invento, **2**, se preparan en 3 pasos. El éster boronato (Intermedio 11) se prepara por alquilación bajo condición básica. El Intermedio 11 obtenido de esta manera puede acoplarse fácilmente con el derivado de 4-bromo-bencensulfonamida para proporcionar el análogo bifenilsulfonamida (Intermedio 12).

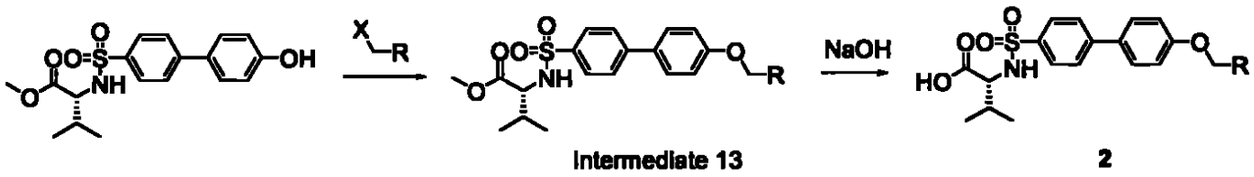
[0096] El grupo funcional de éster en el Intermedio 12 puede hidrolizarse en varias condiciones para producir el producto **2** bifenilsulfonamida deseado.

Esquema 5



. **[0097]** En el Esquema 6 se muestra una ruta alternativa para proporcionar compuestos, 2. La materia prima del derivado de 4-hidroxibifenilsulfonamida estuvo fácilmente disponible a través del acoplamiento de Suzuki. La alquilación de 4-hidroxibifenilsulfonamida en condiciones básicas proporciona el éster de bifenilsulfonamida, Intermedio 13, con un vínculo etéreo. La hidrólisis del éster (Intermedio 13) usando NaOH acuoso proporciona el producto deseado del invento, **2**.

Esquema 6



La desprotección de ésteres, como los ésteres metílicos, que se muestra en el Esquema 6 puede realizarse empleando la ruta descrita en el Esquema 6A.

000191

Esquema 6A

Desprotección de los ésteres metílicos:

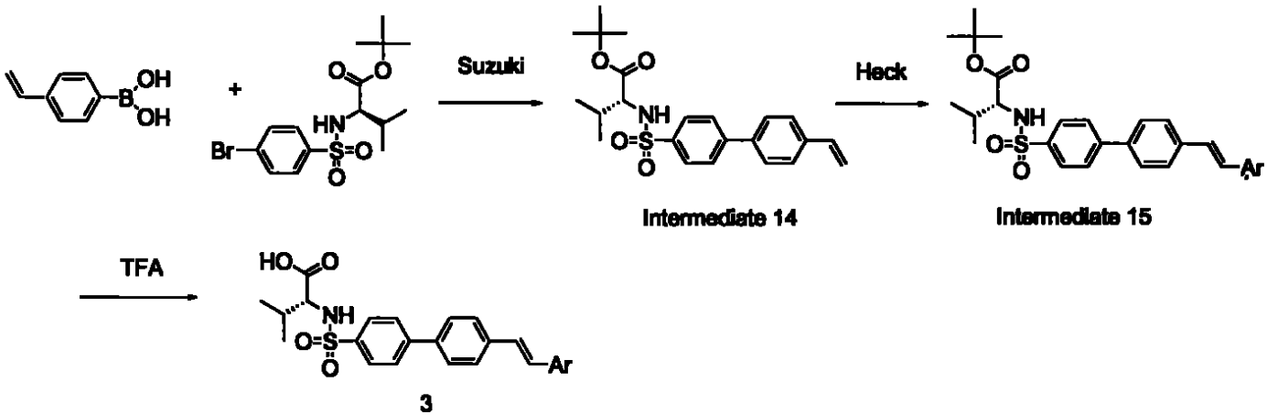


Intermedio 13A

[0098] El éster metílico Intermedio 13A (0,294 mmol) se disolvió en THF:MeOH (2:1)(2 ml) y se añadió LiOH 1M (0,881mmol). La mezcla de la reacción se agitó durante 3 días. El disolvente se extrajo y el sólido blanco restante se disolvió en H2O. El H2O se extrajo con éter. La capa de éter se extrajo y la capa acuosa se acidificó a pH 2 con HCl (concentrado) y se formó una solución turbia. Esta solución se extrajo con CH2Cl2. La capa acuosa obtenida se extrajo y la capa orgánica restante se lavó con salmuera. Se extrajo el solvente y el sólido restante se disolvió en CH2Cl2 mínimo y luego se añadió hexano que precipitó un sólido blanco. El sólido se filtró y secó a presión reducida para proporcionar el producto deseado.

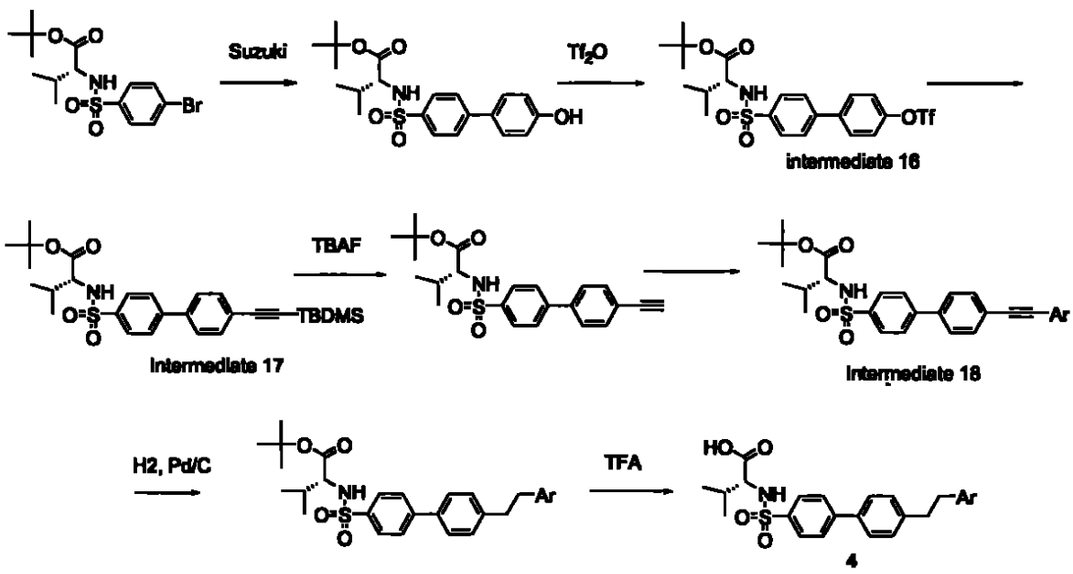
[0099] Los compuestos del invento, 3, se preparan en base al Esquema de síntesis 7. Se hicieron reaccionar ácido 4-vinilfenilborónico y derivado de 4-bromobencensulfonamida mediante acoplamiento de Suzuki catalizado con catalizador de paladio para dar el Intermedio 14. La reacción Heck del Intermedio 14 con haluro de arilo generó el Intermedio 15. El Intermedio 15 es un derivado de bifenilsulfonamida con una unión doble como vínculo conectado a un anillo de arilo. La desprotección TFA regular del éster terc-butílico del Intermedio 15 proporciona el producto deseado 3 con alto rendimiento.

Esquema 7



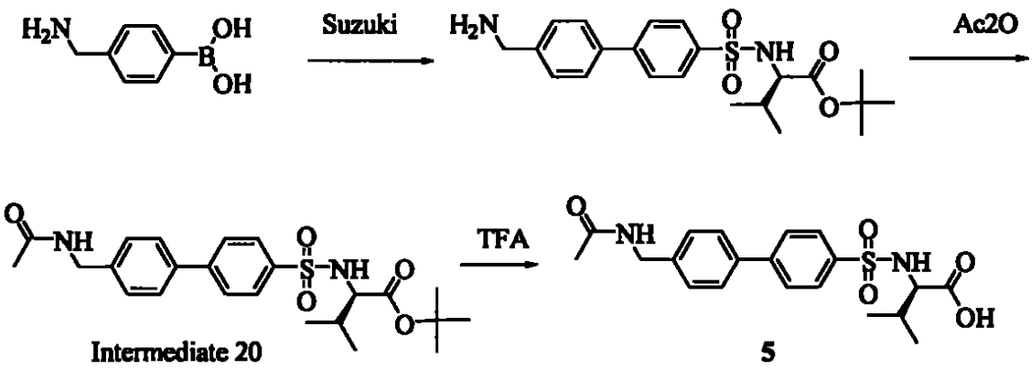
[00100] El Esquema 8 muestra una síntesis de pasos múltiples que conduce a los compuestos del invento, 4. Un acoplamiento de Suzuki regular, seguido de alquilación con anhídrido tríflico proporciona triflato Intermedio 16. El triflato Intermedio 16 se convirtió en el producto 17 de alquinilación mediante una reacción de Sonagoshira. TBDMS que protegía el grupo en 17 fue extraído por TBAF seguido de otra reacción de Sonagoshira para proporcionar Intermedio 18 con una triple unión ligando el grupo bifenilo con la porción arilo. El Intermedio 18 se redujo entonces por hidrogenación y luego la desprotección de TFA extrajo el grupo éster para dar el producto 4 deseado.

Esquema 8



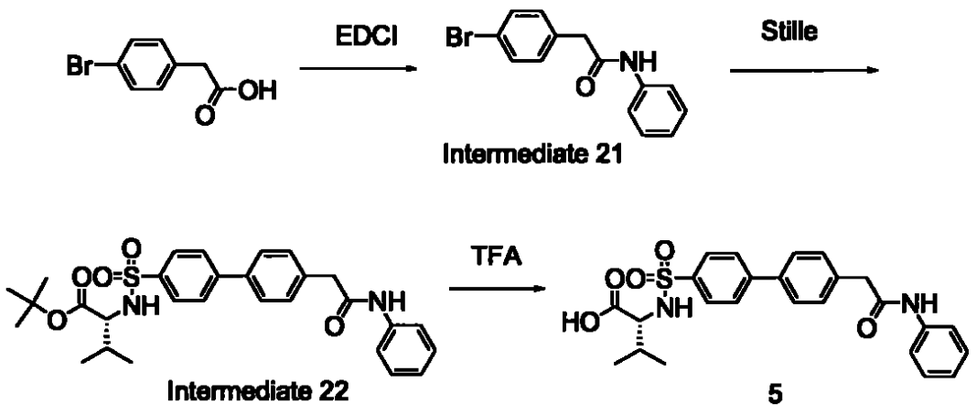
[00101] Las rutas a compuestos de la estructura 5 se presentan en el Esquema 9. Se usó ácido 4-aminometil fenilborónico para acoplamiento de Suzuki para producir el Intermedio 19. La acilación del Intermedio 19 con anhídrido acético, seguida de la desprotección de TFA, proporcionó compuestos con la estructura 5.

Esquema 9



[00102] Una ruta alternativa para producir estructuras de 5 se presenta en el Esquema 10. El Intermedio 21 se formó por acoplamiento EDCL de ácido 4-bromofenilacético con fenilamina en DMF. El acoplamiento de Still del Intermedio 21, con el reactivo de estaño correspondiente, seguido de desprotección de TFA proporcionó el producto 5.

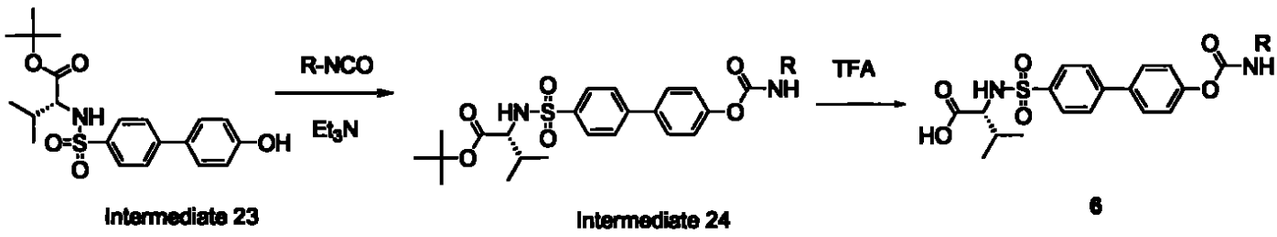
Esquema 10



000194

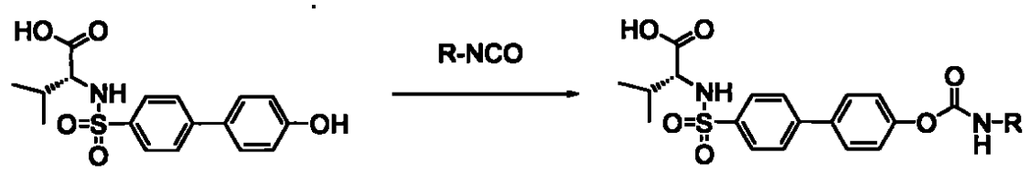
[00103] En el Esquema 11, los compuestos del invento, 6, se preparan por reacción del derivado de 4-hidroxibifenilsulfonamida con un isocianato en presencia de trietilamina. El carbamato (Intermedio 24) obtenido de esta manera fue tratado con TFA para extraer el grupo protector de éster terc-butílico para proporcionar el compuesto 6.

Esquema 11



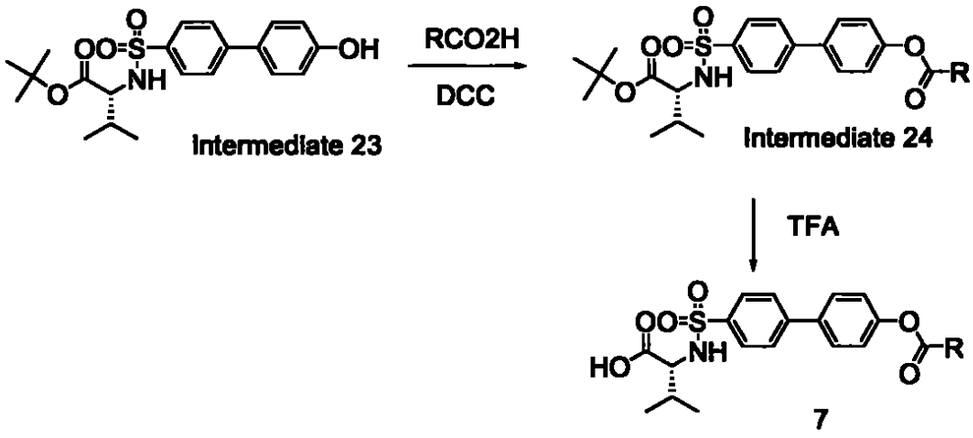
[00104] Una ruta alternativa para preparar compuestos 6 se presenta en el Esquema 12 usando ácido libre de 4-hidroxibifenilsulfonamida para lograr una reacción con isocianato en presencia de trietilamina. Los compuestos 6 se obtienen de esta manera directamente, sin el paso de desprotección.

Esquema 12



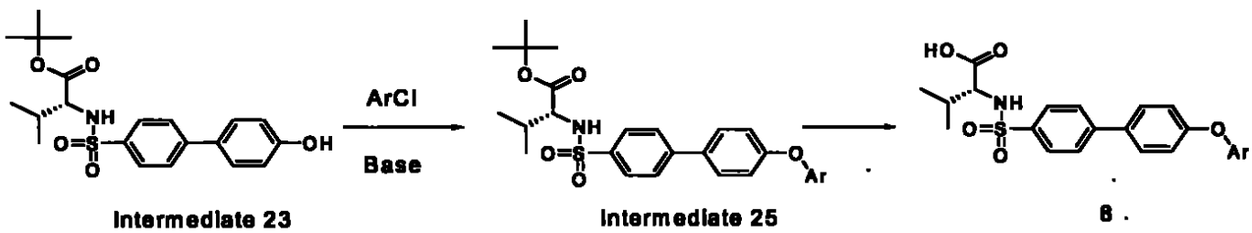
[00105] Las rutas a compuestos de la estructura 7 se presentan en el Esquema 13. El Intermedio 23 se acopló con ácido carboxílico usando reactivo DCC para proporcionar éster 24. El Intermedio 24 fue tratado con TFA para extraer selectivamente el grupo terc-butílico y proporcionar el compuesto 7.

Esquema 13



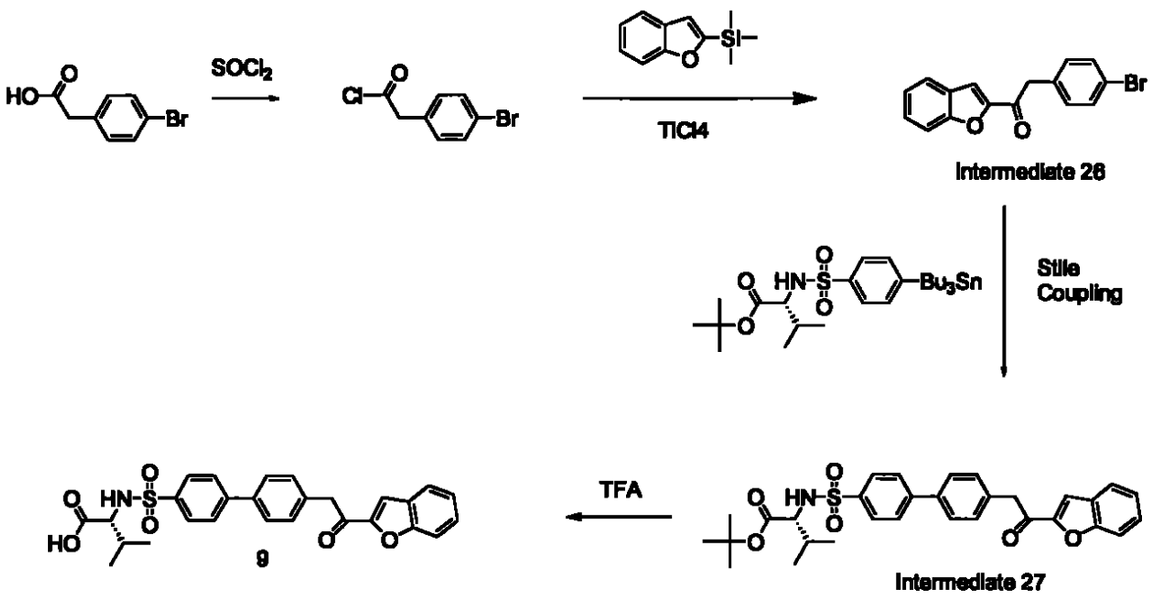
[00106] En el Esquema 14, los compuestos del invento, 8, se preparan a partir del Intermedio 23 por alquilación seguida de desprotección (retiro del grupo protector terc-butílico) con TFA.

Esquema 14



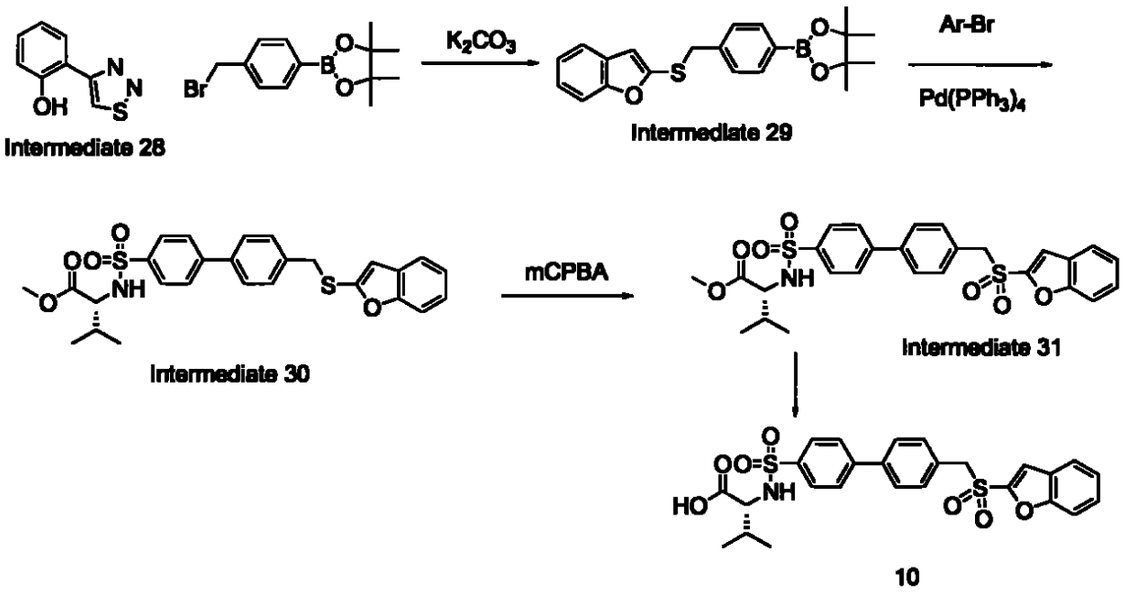
[00107] En el Esquema 15, los compuestos del invento, 9, se preparan en una síntesis de pasos múltiples. El Intermedio 26 se preparó según el procedimiento publicado conocido. El acoplamiento de Stille, seguido de desprotección de TFA, proporcionó el producto 9 deseado.

Esquema 15



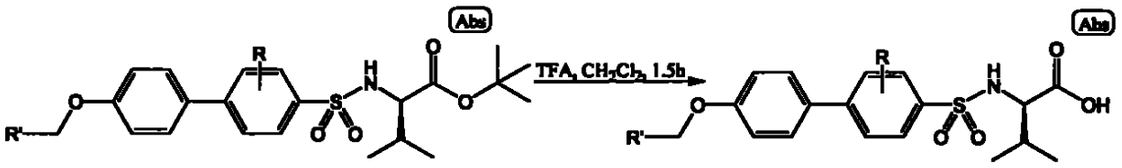
[00108] Las rutas a los compuestos de la estructura 10 se muestran en el Esquema 16. El Intermedio 28 (2-[1,2,3]tiazol4-il-fenol) se preparó de acuerdo con el procedimiento publicado. La alquilación con el derivado de bromuro de bencilo, seguida de condensación, resultó en el tioéter Intermedio 29. El acoplamiento de Suzuki de 29 con 4-bromobencensulfonamida generó el Intermedio 30. La oxidación con mCPBA, seguida de hidrólisis, proporcionó el compuesto 10.

Esquema 16



Extracción del grupo protector de éster t-butílico con TFA

Esquema 17



[00109] La bifenilsulfonamida (0,505 mmol) protegida por el éster t-butílico se disolvió en CH_2Cl_2 (2,5 ml). TFA (2,5ml) se disolvió en CH_2Cl_2 (2,5 ml) y esto se añadió lentamente al éster disuelto y se agitó durante una hora y media. El disolvente se extrajo a presión reducida y el aceite restante se disolvió en tolueno y luego se extrajo el tolueno. Finalmente, el aceite se disolvió en una cantidad mínima de CH_2Cl_2 y se agregó hexano para precipitar un sólido blanco. El disolvente se extrajo a presión reducida y, después del secado con bomba de vacío, se desecó un sólido para dar un rendimiento del 98%.

[00110] El presente invento se relaciona, además, con métodos para identificar agentes útiles para el tratamiento de la osteoartritis. Los métodos para identificar agentes útiles para el tratamiento de la osteoartritis comprenden determinar si un agente en

particular posee una actividad inhibidora de agrecanasa específica de ADAMTS-5. Los métodos pueden también utilizar animales transgénicos ADAMTS-5 para determinar si un agente potencial útil para el tratamiento de la osteoartritis es eficaz en un animal que presenta actividad de ADAMTS-5 pero no es eficaz en un animal sin actividad de ADAMTS-5.

[00111] Como se describe además en los ejemplos a continuación, el alelo del gen de ADAMTS-5 se trastorna funcionalmente en una célula por la recombinación homocigota entre el alelo y un gen ADAMTS-5 mutante, o una porción del mismo. La célula puede ser un tipo de célula diferenciada que normalmente expresa ADAMTS-5, tal como un macrófago o monocito, o una línea celular de tipo macrófago o monocito. Otra posibilidad es que la célula puede ser una célula progenitora pluripotente que puede desarrollarse para formar un animal, tal como una célula troncal embrionaria. En una realización preferida, se usa una célula troncal embrionaria. La célula troncal embrionaria puede introducirse en un blastocisto y el blastocisto se introduce en un animal pseudopreñado para producir un animal con células somáticas y germinales en las que un alelo del gen de ADAMTS-5 está trastornado a nivel funcional. Dicho animal es un animal "recombinante homólogo". Un animal recombinante homólogo preferido del invento es el ratón. Los ratones son animales preferidos porque se pueden utilizar más fácilmente para los estudios de laboratorio y porque proporcionan un modelo reconocido en la tecnología, como se describe más detalladamente en los siguientes ejemplos. Sin embargo, cualquier animal puede usarse, incluso, entre otros, los cerdos, vacas, ovejas y cabras. En una realización particularmente preferida, el animal es un ratón endogámico.

[00112] Para crear una célula o animal recombinante homólogo, se puede preparar un vector de selección de objetivo que contenga ADN y que codifique una proteína ADAMTS-5, o una porción de la misma, en la cual se ha introducido una mutación. El vector de selección de objetivo puede incluir una porción no homóloga de reemplazo de ADAMTS-5 que preferiblemente incluya sitios Cre/Lox-P; una primera región de homología situada hacia arriba de la porción no homóloga que tenga una identidad sustancial con una primera secuencia del gen ADAMTS-5; y una segunda región de homología situada hacia abajo de la porción no homóloga que tenga una identidad

sustancial con una segunda secuencia del gen ADAMTS-5. La expresión "identidad sustancial" como se usa en este documento describe una secuencia de nucleótidos que presenta suficiente homología con un gen ADAMTS-5 como para permitir la recombinación homóloga entre la secuencia de nucleótidos y una secuencia endógena para permitir la recombinación homóloga entre la secuencia de nucleótidos y la secuencia ADAMTS endógena en una célula huésped. Típicamente, las secuencias de nucleótidos de las regiones de homología de flanqueo tienen aproximadamente entre un 80% y un 100% de similitud con las secuencias endógenas. En una realización particularmente preferida, la similitud es del 100%. Las regiones de homología también tienen la longitud suficiente para permitir la recombinación homóloga con el gen endógeno en la célula huésped, es decir, al menos 1 kilobase de longitud y, más preferiblemente, al menos varios kilobases de longitud.

[00113] El vector de selección de objetivo puede además incluir cassettes de selección positiva y negativa. Estos cassettes incluyen secuencias de nucleótidos que codifican marcadores de selección positiva y negativa unidos operativamente a elementos reguladores que controlan la expresión del marcador de selección.

[00114] Para trastornar funcionalmente un alelo del gen ADAMTS-5 endógeno en una célula huésped, se introduce un vector de selección de objetivo en la célula huésped, por ejemplo, una célula diferenciada o una célula troncal embrionaria. El vector de selección de objetivo puede introducirse en la célula usando cualquier técnica conocida en la tecnología, entre ellas, la precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrán, microinyección, lipofección, electroporación y similares. Luego de la introducción del vector en la célula huésped, ésta se cultiva por un período de tiempo y en las condiciones para permitir la recombinación homóloga entre el vector de selección de objetivo introducido y el gen ADAMTS-5 endógeno. Las células huéspedes se seleccionan (por ejemplo, por selección positiva o negativa) y se las somete a estudios para observar la recombinación homóloga en el *locus* del gen ADAMTS-5 endógeno usando técnicas estándares en la tecnología (por ejemplo, hibridaciones de Southern o RCP con sondas o *primers* que distinguen el alelo endógeno normal del alelo recombinante homólogo).

000200

[00115] Para crear un animal recombinante homólogo, se introduce una célula embrionaria con al menos un alelo de gen ADAMTS-5 funcionalmente trastornado en un blastocisto, éste se implanta en una madre adoptiva pseudopreñada y se deja que el embrión se desarrolle a término. El animal resultante es un animal quimera con células que descienden de la célula troncal embrionaria. Los animales quiméricos, en los cuales la célula troncal embrionaria ha contribuido con las células germinales del animal, pueden aparearse con animales WT para obtener animales heterocigotos para el trastorno del gen ADAMTS-5 en todas las células somáticas y germinales. Los animales heterocigotos pueden entonces aparearse para crear animales homocigotos para el trastorno del gen ADAMTS-5 (es decir, con ambos alelos del gen ADAMTS-5 funcionalmente trastornados). En un animal transgénico puede introducirse cualquier tipo de mutación, incluso la mutación nula y puntual. Una mutación puntual puede resultar en la expresión normal del producto genético ADAMTS-5, pero el producto puede tener una actividad aberrante; por ejemplo, puede no tener actividad de agrecanasa.

[00116] Además, las células del animal homocigoto para el trastorno del gen ADAMTS-5 pueden aislarse de los animales y cultivarse *in vitro* para realizar varios estudios, incluso para las pruebas de selección.

[00117] Los animales transgénicos ADAMTS-5 y las células derivadas de estos son útiles como controles positivos para evaluar la eficacia de los inhibidores de ADAMTS-5. Los animales homocigotos y heterocigotos proporcionan tales estándares. En una prueba de selección destinada a identificar y evaluar la eficacia de inhibidores de ADAMTS-5, un animal WT (o las células derivadas del mismo) no tratado con inhibidor se usa como el estándar de inhibición del 0%, un animal homocigoto para el trastorno de ADAMTS-5 se usa como el estándar de inhibición del 100%, mientras que un animal heterocigoto para el trastorno del gen ADAMTS-5 se usa como el estándar de inhibición menor que el 100% y mayor que el 0%. Luego se evalúa la cantidad de actividad de ADAMTS-5 en un sujeto tratado con un inhibidor de ADAMTS-5 y se compara con estos estándares. La inhibición puede medirse por el porcentaje de inhibición de la actividad de agrecanasa o el porcentaje de reducción de los síntomas de osteoartritis.

000201

[00118] Los animales transgénicos y las células derivadas de estos también pueden usarse para estudiar a los inhibidores de ADAMTS-5 y buscar efectos secundarios o toxicidad causados por la acción del inhibidor al objetivo que no sea ADAMTS-5 (por ejemplo, las isoformas de ADAMTS-5 o ADAMTS-4). Por ejemplo, se puede administrar un inhibidor de ADAMTS-5 a un animal ADAMTS-5 del invento para evaluar los efectos secundarios o la toxicidad del inhibidor. Como el animal transgénico ADAMTS-5 carece del objetivo normal para el inhibidor, un efecto observado al administrarse el inhibidor al mutante nulo ADAMTS-5 puede atribuirse a un efecto secundario del inhibidor de ADAMTS-5 sobre otros objetivos. Por consiguiente, los animales transgénicos ADAMTS-5 son útiles para distinguir estos efectos secundarios de los efectos directos del inhibidor sobre la actividad de ADAMTS-5.

[00119] También se puede utilizar a los animales transgénicos para las pruebas de selección *in vivo* para identificar enfermedades en las que ADAMTS-5 desempeña un papel en la patogénesis de dicha enfermedad. Estas pruebas de selección son útiles, además, para identificar otras enfermedades que pueden ser tratadas con los inhibidores de ADAMTS-5. Por ejemplo, los animales transgénicos pueden ser útiles para evaluar el papel de ADAMTS-5 en otros trastornos en los que se produce destrucción o degradación proteica extracelular, tales como cáncer, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica ("EPOC"), ateroesclerosis, degradación macular relacionada con la edad, infarto de miocardio, ulceración corneal y otras enfermedades de la superficie ocular, hepatitis, aneurismas aórticos, tendinitis, enfermedades del sistema nervioso central, cicatrización anormal de heridas, angiogénesis, reestenosis, cirrosis, esclerosis múltiple, glomerulonefritis, enfermedad de injerto contra el huésped, diabetes, enfermedad intestinal inflamatoria, choque, degeneración de disco invertebral, apoplejía, osteopenia, artritis reumatoidea y otras formas de artritis y enfermedad periodontal. Puede administrarse un estímulo a los animales transgénicos del invento para inducir la enfermedad, tal como se describe en más detalle a continuación en los ejemplos de osteoartritis. Como alternativa, los animales transgénicos del invento pueden ser apareados con un animal genéticamente propenso a una enfermedad en particular. Luego de la inducción de la enfermedad en el animal mutante nulo ADAMTS-4 o ADAMTS-5, se determina la sensibilidad o resistencia del animal a la

afección. La resistencia del animal a la afección, en comparación con WT, indica que la patología de la enfermedad implica la acción de ADAMTS-4 o ADAMTS-5 y, por lo tanto, la enfermedad puede tratarse con un inhibidor de ADAMTS-4 o ADAMTS-5, respectivamente. Como ejemplo de esta utilidad, el Ejemplo 1 más adelante y las Figuras 3A y 3B demuestran que los animales transgénicos ADAMTS-5 homocigotos y heterocigotos son resistentes a la osteoartritis inducida.

[00120] La mutación nula ADAMTS-5 homocigota de los animales transgénicos ADAMTS-5, o una célula derivada de los mismos, puede reconstituirse con un equivalente humano del gen para crear un animal o una célula no humana que exprese un producto génico ADAMTS-5 humano. Estas células y animales pueden usarse para estudiar compuestos para identificar agentes que inhiban la actividad de ADAMTS-5 humano, sea en cultivos celulares o *in vivo*. Dichos animales y células pueden producirse mediante técnicas conocidas por expertos. Un animal no humano con células que expresan polipéptido ADAMTS-5 humano, o células derivadas del mismo, puede usarse para estudiar e identificar agentes que puedan inhibir ADAMTS-5 humano *in vivo*.

[00121] Los animales transgénicos ADAMTS-5 también son útiles para determinar si una sustancia en particular es un sustrato de ADAMTS-5. Los ADAMTS-5 son metaloproteinasas con actividad de agrecanasa. Para poder evaluar si ADAMTS-5 escinde una forma precursora de un supuesto sustrato, se puede evaluar la presencia o ausencia de producto escindido en los animales ADAMTS-5. El producto escindido se verá sustancialmente reducido o estará ausente en los animales transgénicos.

[00122] Los siguientes ejemplos tienen como objetivo ilustrar, sin limitar, el presente invento.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Generación de ratones KO ADAMTS5

[00123] Los ratones KO ADAMTS-5 usados en estos estudios fueron generados a partir de ratones endogámicos 129SvEv-Brd, portadores del alelo KO condicional de tipo Cre/LoxP del gen ADAMTS5 (Lexicon Genetics, The Woodlands, TX). El alelo condicional contenía sitios LoxP al flanco de exón 3 de modo que la recombinación Cre resultó en la eliminación del exón 3 que codifica la mayoría del sitio con actividad enzimática, como se muestra en la Figura 1A.

[00124] Los ratones portadores del alelo KO condicional ADAMTS-5 se crearon por recombinación homóloga en células ES seguidas de inyección de blastocistos para generar ratones quiméricos. La línea de ratones KO ADAMTS-5 se produjo cruzando ratones KO condicionales con ratones transgénicos Protamine-Cre (proporcionados por Lexicon Genetics) lo que resultó en la eliminación mediada por Cre del exón 3 en el semen de las crías machos portadoras tanto del mutante ADAMTS-5 como de los alelos Prot-Cre, como se muestra en la Figura 1B.

Determinación del genotipo de WT ADAMTS5, KO condicional y alelos KO

[00125] La determinación de genotipos de alelos del gen ADAMTS-5 se realizó por RCP usando una plantilla de ADN obtenida del material de digestión con proteinasa K cruda de biopsias de la cola. Se identificaron los alelos KO heterocigotos y de tipo salvaje por RCP usando un *primer* directo de la secuencia (5'TGT TCA CCC AAA GCA ACT AC3') (*primer* 1) y un *primer* inverso de la secuencia (5'TAG AGG AGA GGA GAG GAG G3') (*primer* 2). Estos *primers* flanquearon el sitio de inserción del sitio LoxP (5') y produjeron un amplicón de 230 bp en los animales WT y heterocigotos y ningún amplicón en los animales KO (Figura 1B, C). Se identificó al alelo de animales con genes inactivados (KO) usando el *primer* directo (5'GTG AAC CAC ATG GAC TTT GG3') (*primer* 3) y el *primer* inverso (5'TCG TAG CAA ACA CCC ACC TG3') (*primer* 4), lo que resultó en un producto de RCP de 500 bp del alelo (KO) con eliminación del exón 3 (Figura 1B, C).

Preparación de ARN para RCP-TI:

[00126] El ARN total se preparó a partir del bazo de ratones WT y KO, usando el kit RNAeasy (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se

000204

confirmó la calidad de las muestras de ARN en una prueba de ARN 6000 Nano usando un bioanalizador (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Los *primers* de RCP fueron diseñados y sintetizados (BioSource International, Camarillo, CA) de la siguiente manera:

Primer 5, 5'CGACCCTCAAGAACTTTTGC3'; ID DE SEC. Nº: 4

Primer 6, 5'CTCAGGCCCAAATGTCAAGT3'; ID DE SEC Nº: 5

Primer 7, 5'CGTCATGAGAAAGGCCAAGT3'; ID DE SEC Nº: 6.

La RCP-TI se realizó usando el kit de RCP-TI Qiagen OneStep con una concentración de 600 nM de cada *primer* y 200 ng de ARN total en un ciclador térmico de ADN Engine Dyad (MJ Research, Waltham, MA). La RCP-TI se llevó a cabo por 30 minutos a 50 °C, 15 minutos a 95 °C y 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 59 °C y 30 segundos a 72 °C. Los *primers* de RCP-TI se presentan en la Figura 1D y los productos de RCP-TI se presentan las Figuras 1E y 1F. Usando los *primers* 5 y 6, la Figura 1E muestra que el ARNm de WT es de 506 bp y el de KO es de 338 bp. Usando los *primers* 5, 4 y 7, la Figura 1F muestra que el ARNm de WT es de 258 bp y no hay producto, como es de esperar, en KO porque el *primer* 7 está situado en el exón 3, que fue eliminado en el KO.

Histología y evaluación patológica de ratones jóvenes y adultos:

[00127] Se realizaron necropsias completas en 22 machos WT y 20 KO ADAMTS-5 a las 18 semanas de vida. Las necropsias incluyeron observaciones macroscópicas, pesos corporales y de los órganos, hematología, química sérica completa y examen microscópico del cerebro, articulaciones, corazón, pulmones, timo, bazo, hígado, riñones, glándulas salivales, ganglios linfáticos mandibulares, testículos, epidídimo, ojos, glándulas harderianas, glándulas lacrimales, esternón y húmero. Se colocaron todos los tejidos en formalina neutra amortiguada al 10%, se descalcificaron si estaban mineralizados, se procesaron de manera rutinaria, se incrustaron en parafina y se prepararon como las secciones teñidas con hematoxilina y eosina de rutina. Un patólogo veterinario certificado (BS) evaluó todos los portaobjetos para confirmar la presencia o ausencia de lesiones patológicas.

Inducción quirúrgica de la osteoartritis:

[00128] Todos los estudios se realizaron con la aprobación del Comité de Wyeth Institutional Animal Care and Use. La inducción quirúrgica de la osteoartritis en ratones es un modelo reconocido en la tecnología para el estudio de la osteoartritis. En consecuencia, se anestesiaron ratones de diez semanas de vida con 250 mg/kg de tribromoetanol intraperitoneal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se prepararon las rodillas para la cirugía aséptica. Se hizo una incisión parapatelar medial para exponer y seccionar transversalmente el ligamento meniscotibial (anclando el menisco medial al plano tibial) lo que resultó en la desestabilización del menisco medial (DMM). La cápsula articular y la capa subcutánea se cerraron con suturas de Vicryl 8-0 y 9-0 (Ethicon, Inc., Somerville, NJ) respectivamente, y la piel se cerró con adhesivo tisular Nexaband®S/C (Abbott Laboratories, North Chicago, IL). Se proporcionó 0,03 mg/kg de buprenorfina (Buprenex, Reckitt and Coleman Products, Hull, Inglaterra) antes y después de la operación. Cuatro semanas después de la cirugía DMM, se sacrificaron 19 ratones WT y 19 KO con dióxido de carbono. Ocho semanas después de la cirugía, se sacrificaron 33 ratones WT, 20 KO heterocigotos y 28 homocigotos. Un subgrupo pequeño de animales fue sometido a cirugía fingida para determinar el efecto de la inflamación secundaria a la artrotomía sobre la evolución de la enfermedad. Los puntajes histológicos de los animales a las 4 u 8 semanas después de la cirugía fingida no fueron estadísticamente diferentes a los de los animales que no fueron sometidos a cirugía alguna.

Evaluación de la evolución y gravedad de la osteoartritis:

[00129] Las articulaciones de rodilla intactas se colocaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas y luego se descalcificaron en EDTA al 20% por 5 días. Las articulaciones se incrustaron en parafina y se tomaron secciones frontales de 6 μm de toda la articulación. Las muestras se tiñeron con Safranina-O/verde inalterable y se clasificaron en intervalos de 70 μm en toda la articulación por tres clasificadores independientes a ciegas. El sistema semicuantitativo de clasificación fue modificado a partir del de Chambers et al. (Chambers et al, 2001, *Arthritis & Rheum* 44:1455) donde 0 representa el cartílago normal; 0,5 representa pérdida de Safranina-O sin cambios estructurales; 1 representa una superficie articular áspera y fibrilaciones pequeñas; 2 representa fibrilación hasta la capa inmediatamente inferior a la capa

superficial y pérdida de la lámina superficial; 3 representa una pérdida leve (<20%) de cartílago no calcificado, 5 representa una pérdida moderada (20-80%) y 6 representa una pérdida severa (>80%): Todos los cuadrantes de la articulación (plano tibial medial (PTM), cóndilo femoral medial, plano tibial lateral y cóndilo femoral lateral) se clasificaron por separado. Se clasificaron aproximadamente 12 niveles para cada articulación de rodilla, continuándose la clasificación hasta que ya no se observara cartílago articular en cuadrante alguno. Las clasificaciones se expresaron como la clasificación histológica máxima hallada en todos los niveles de la articulación, como se muestra en la Figura 3A. Se añadieron clasificaciones de todos los niveles de los cuatro cuadrantes para obtener la clasificación histológica total, como se muestra en la Figura 3B, y así reflejar la gravedad de la lesión OA así como la superficie afectada.

[00130] Para comparar los resultados con los publicados sobre la evolución de la osteoartritis en ratones IL-1β, IL-1βr, INOS, y KO ICE (Clements et al., 2003, *Arthritis & Rhuem* 48:3452) también se expresaron los resultados como clasificaciones medias del plano tibial medial de cada grupo experimental. La Figura 4 muestra que estas clasificaciones también se redujeron significativamente en los animales KO ADAMTS-5 homocigotos y heterocigotos.

Preparación y cultivo de los explantes de cartílago:

[00131] Se extrajeron las cabezas femorales de ratones WT y KO de 4 semanas de vida y se separó el cartílago del hueso subcondral subyacente. Las muestras de cartílago se cultivaron como explantes, a 37°C, en una atmósfera humidificada de 5% de CO_2 y 95% de aire, en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía un 1% de antimicótico-antibiótico (Sigma, Aldrich), glutamina 2 mM, Hepes 10 mM, 50 mg/ml de ascorbato y SBF al 10% por 48 horas. Los explantes se lavaron 3 veces y se cultivaron por otras 72 horas en DMEM sin suero + 10 ng de IL-1α murino/ml (Sigma, Aldrich) y ácido retinoico 10^{-5} M (Sigma, Aldrich). Se recogieron los medios condicionados y se extrajo el cartílago al finalizar del período de cultivo.

Cuantificación de proteoglucano

[00132] El contenido de proteoglucano en el medio se midió como glucosaminoglucano (GAG) sulfatado mediante ensayo colorimétrico usando azul de dimetilmetileno

(DMMB) y sulfato de condroitina C de cartílago de tiburón (Sigma, Aldrich) como estándar, de acuerdo con un procedimiento comunicado previamente (Farndale et al., 1986, *Biochim Biophys Acta* 883:173). Las muestras de cartílago tomadas se digirieron con proteinasa K (Sigma, Aldrich) por 16 horas, se centrifugaron y se recogió el material sobrenadante. El contenido de proteoglucano en el cartílago digerido también se midió para proporcionar el contenido total de proteoglucano en el cartílago y permitir calcular el porcentaje de liberación del proteoglucano durante el protocolo experimental.

Análisis de inmunotransferencia

[00133] Los fragmentos de agrecano en medio condicionado se analizaron por análisis de inmunotransferencia, usando anticuerpos de neoepítopos diseñados para reconocer los fragmentos generados por agrecanasa. El medio condicionado se dializó contra Tris-acetato 50 mM (pH 6,5) y se digirió con condroitinasa ABC (Sigma; 1 mU/µg de GAG), queratinasa I (Seikagaku America, Falmouth, MA; 1 mU/µg de GAG) y queratinasa II (Seikagaku; 0,02 mU/µg de GAG) por 2 horas a 37°C. Las muestras se concentraron por dispositivo de filtro centrífugo YM-10 (Millipore Corp., Bedford, MA), se liofilizaron y reconstituyeron con agua a una concentración de 1 mg/ml de GAG medida por DMMB. Se separó una cantidad igual de GAG para cada muestra en condiciones reductoras con geles de Tris-glicina (Invitrogen, Carlsbad, CA) con gradiente del 4-12% y se transfirió a membranas de nitrocelulosa. Se realizaron inmunotransferencias usando anticuerpos monoclonales (AcM) AGG-C1 (0,04 µg/ml) (Collins-Racie et al., 2004, *Matrix Biol.* 23:219-230) reconociendo el neoepítopo interglobular de terminal C generado por agrecanasa, NITEGE^{373}. Se realizó incubación con IgG primaria y antimurina de cabra secundaria conjugada con fosfatasa alcalina (Promega Corp., Madison, WI; 1:7500) durante la noche, a 4°C y a temperatura ambiente por 1 hora, respectivamente. Las inmunotransferencias se incubaron con sustrato de NBT/BCIP (Promega) a temperatura ambiente durante 2 a 15 minutos para lograr un desarrollo óptimo del color.

Identificación inmunohistoquímica del neoepítopo TEGE^{373} en cartílago articular murino

[00134] Se sintetizó el anticuerpo policlonal TEGE^{373} usando la tecnología de anticuerpos policlonales estándar (Glasson et al., 2004, *Arthritis & Rheum.* 50:2547-2558.). El

000208

anticuerpo reaccionó con G1-TEGE^{373} generado por digestión ADAMTS-4 de agrecano bovino, pero no reaccionó con agrecano intacto (no digerido) validándolo como un anticuerpo "neoepitópico". El suero positivo se purificó por cromatografía de afinidad, usando el péptido inmunizante.

[00135] Para la inmunotinción del neoepítopo TEGE^{373} en el cartílago articular murino, se tomaron las cabezas femorales de animales KO ADAMTS-4, KO ADAMTS-5 y WT después de 3 días de cultivo tisular en presencia o ausencia de 10 ng de IL-1α/ml [iş thís_y or α] (Sigma) y ácido retinoico 10^{-5} M (Sigma). Los tejidos se congelaron en OCT y se cortaron secciones de 5 micrones. La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó con peroxidasa hidrogenada (DakoCytomation, Carpinteria, CA) y las secciones se desglucosilaron con 0,1 U de condroitinasa ABC/ml (Sigma), 0,1 U de queratanasa I/ml (Seikagaku Corp., Tokio, Japón) y 0,1 U de queratinasa II/ml (Seikagaku Corp., Tokio, Japón) durante 1 hora a 37°C. Se añadió anticuerpo primario o suero normal de conejo a las secciones durante 12 horas, y se añadió anticuerpo secundario (anticonejo de burro, Rockland, Inc, Gilbertsville PA) durante 30 minutos. Las secciones se incubaron con ABC-peroxidasa seguida de sustrato de DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se sometieron las secciones a tinción de contraste con hematoxilina.

Ejemplo 2: Resultados y comentarios

[00136] Se generó el KO ADAMT-4 (Glasson et al., 2004, *Arthritis & Rheum.* 50:2547-2558.). Como se explicó anteriormente, se creó el KO ADAMTS-5 por recombinación mediada por Cre-Lox dando lugar a la eliminación de 56 aminoácidos codificados por exón 3, incluso el trastorno del sitio de unión de cinc y la eliminación del "*met turn*" (Figura 1A). Los productos de RCP de ratones WT y heterocigotos usando *primers* 1 y 2 generaron un producto de 230 bp. El *primer* 2 fue localizado dentro de la porción eliminada que comprendía exón 3 y, por lo tanto, no generó un producto de RCP en los animales KO homocigotos. Los *primers* 3 y 4 generaron un producto de 500 bp en los animales KO heterocigotos y homocigotos debido a la eliminación de exón 3. El uso de dos *primers* directos (1 y 3) fue necesario para la amplificación óptima con respecto a los *primers* inversos (2 y 4). Debido a las diferencias en la eficiencia de la amplificación entre los amplicones largos y cortos, el

uso de amplicones cortos, específicos para alelos, ofreció más confianza para determinar el genotipo en comparación con el uso de un amplicón corto (eliminación) y uno largo (wt) generado a partir de un solo par de *primers* (es decir, 3 y 4). La Figura 1E muestra la RCP-TI del ARN total del bazo, ARNm generado por productos de RCP a partir de *primers* que cubrían exón 3, reducido en tamaño en el KO. La presencia de ARNm indica que esta eliminación en marco no causó inestabilidad del mensaje. La presencia de una proteína traducida que carece del dominio catalítico no pudo confirmarse.

[00137] Se permitió que los ratones WT y KO homocigotos, machos y hembras, vivieran por 14-18 semanas. Se examinaron los animales en busca de cualquier anormalidad visible, se tomaron muestras de sangre para realizar recuentos sanguíneos completos y química sérica y se obtuvieron 17 tejidos que fueron examinados por un patólogo veterinario certificado (BS). Los tejidos examinados incluyeron el corazón, los pulmones, el timo, el bazo, el hígado, el riñón, el cerebro, las glándulas salivales, los ganglios linfáticos mandibulares, los testículos, el epidídimo, el ojo, la glándula harderiana, la glándula lacrimal, el esternón completo, el fémur y toda la zarpa. No hubo anormalidades en el peso corporal total, los análisis de sangre o suero o el aspecto histológico de los tejidos examinados, indicando que no se necesitaba actividad de la enzima ADAMTS-5 para un desarrollo y crecimiento normales.

[00138] El agrecano es un componente abundante del cartílago dentro de la placa de crecimiento, así como el cartílago articular de las articulaciones. La Figura 2 muestra un análisis de las placas de crecimiento de animales WT, KO ADAMTS-4 y KO ADAMTS-5, por inmunotinción de las placas de crecimiento tibial proximal con un anticuerpo policlonal elevado contra la nueva terminal C de agrecano luego de la escisión por las agrecanasas, G1-TEGE^{373}.

[00139] Como se ve en la Figura 2, los ratones WT demostraron hibridación significativa del anticuerpo dentro de las células de la placa de crecimiento tibial proximal, y esta tinción ya no estaba presente en los animales KO ADAMTS-4. Por el contrario, la hibridación del anticuerpo anti-TEGE^{373} dentro de la placa de crecimiento de los ratones KO ADAMTS-5 se asemejó a la tinción de las placas de crecimiento de los ratones WT. Estos resultados sugieren que el recambio de agrecano en la placa de

crecimiento es un resultado de la actividad enzimática de ADAMTS-4 y no de ADAMTS-5. Es notable que la apariencia visible de los animales, la longitud de los huesos largos y el aspecto histológico de las placas de crecimiento en ambos animales KO fueron idénticos a los de los WT. Por lo tanto, es probable que cualquier actividad de degradación de agrecano atribuida a ADAMTS-4 en la placa de crecimiento pueda ser compensada debidamente por otras enzimas ante la ausencia de ADAMTS-4.

[00140] Como se describe en detalle en el Ejemplo 1, la inestabilidad articular unilateral fue generada por la sección transversal quirúrgica del ligamento menisco tibial anterior causando una desestabilización del menisco medial (DMM). Los datos se presentan en las Figuras 3A y 3B. Los ratones se sacrificaron a las 4 y 8 semanas después de la cirugía, y las secciones realizadas en la articulación se clasificaron usando un sistema de clasificación conocido (Chambers et al., 2001, *Arthritis & Rheum* 44:1455). Los puntajes se expresaron como clasificación máxima media de WT y de KO ADAMTS-5 homocigoto y heterocigoto. Además, las clasificaciones de cada sección de la articulación se sumaron para expresar la gravedad de la OA, como el promedio de la suma, en cada grupo de tratamiento y en cada intervalo. Este segundo método de clasificación tiene en cuenta la gravedad de la lesión, así como la superficie de la articulación afectada. Como se muestra en las Figuras 3A y 3B, ambos métodos de análisis revelaron una reducción significativa ($p<0,05$) en las clasificaciones de los ratones KO ADAMTS-5 homocigotos y heterocigotos en comparación con los ratones WT (Figura 3). Las clasificaciones sumadas de los animales KO ADAMTS-5 se redujeron a menos del 50% de las de los WT, indicando una reducción de la gravedad y de la superficie afectada. Es notable que previamente informáramos que no existía una diferencia en las clasificaciones del modelo quirúrgico idéntico utilizado en ratones KO ADAMTS-4. Además, estudios similares publicados que describen la inducción de OA en ratones KO IL-1β, IL-1βr, INOS e ICE KO informaron una mayor gravedad de la patología en los ratones genéticamente manipulados (Clements et al., 2003, *Arthritis & Rheum* 48:3452). Para poder comparar los resultados con los publicados sobre la evolución de la osteoartritis en ratones KO IL-1β, IL-1βr, INOS, e ICE, también se expresaron los resultados como clasificaciones medias del plano tibial medial de cada grupo experimental. La Figura 4 muestra que estas

clasificaciones también se redujeron significativamente en los animales KO ADAMTS-5 homocigotos y heterocigotos.

[00141] El cartílago articular de la cabeza femoral se extrajo de los ratones KO ADAMTS-4, KO ADAMTS-5 y WT y se colocaron en cultivo de tejidos. Se añadieron citocinas inflamatorias (IL-1 y ácido retinoico) al sistema de cultivo para inducir actividad enzimática degradante y se evaluaron los análisis de los productos de degradación de agrecano liberado por el cartílago mediante la cuantificación de la liberación total de proteoglucano e inmunotransferencia usando un anticuerpo neoepítopo monoclonal generado contra la nueva terminal C de agrecano después de la escisión por una "agrecanasa" (G1-TEGE^{373}) (Collins-Racie et al., 2004, Matrix Biology 23:219-230). Los resultados exhibidos en las Figuras 5A y 5B demostraron liberación de proteoglucano total equivalente y generación equivalente del neoepítopo TEGE^{373} en el cartílago articular de ratones WT y KO ADAMTS-4, mientras que no hubo evidencia de fragmentos generados por agrecanasa en medios condicionados del cartílago articular de los ratones KO ADAMTS-5. La Figura 5C muestra el análisis inmunohistoquímico de estas cabezas femorales usando un anticuerpo policlonal generado contra el neoepítopo TEGE^{373} donde se produce una hibridación significativa del neoepítopo agrecano generado por agrecanasa en el cartílago articular de los ratones WT y KO ADAMTS-4 e hibridación insignificante en el cartílago de los ratones KO ADAMTS-5 .

[00142] Este trabajo examinó el efecto de la eliminación de la actividad de ADAMTS-5 (agrecanasa-2) sobre el desarrollo, crecimiento y fisiología murinos normales. Similar a los informes previos que estudiaron el ratón KO ADAMTS-4, la eliminación de la actividad de ADAMTS-5 no afectó negativamente a ninguna de estas funciones. La eliminación de la actividad de ADAMTS-5 no afectó el recambio de agrecano generado por agrecanasa en las placas de crecimiento. Sin embargo, y sorprendentemente, la eliminación de la actividad de ADAMTS-5 inhibió significativamente la evolución de la osteoartritis en estos ratones, mientras que la eliminación de la actividad de ADAMTS-4 no tuvo este efecto. Esta inhabilidad para escindir agrecano en el sitio de "agrecanasa" dentro del dominio interglobular del sustrato en el ratón KO ADAMTS-5 la terminó de confirmar la falta de aparición de

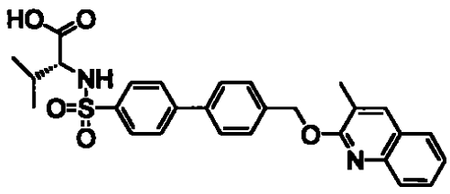
000272

estos fragmentos después de la estimulación con citocina del cartílago articular *in vitro* en el ratón KO ADAMTS-5. Se ha informado que varias enzimas pueden escindir el agrecano en el sitio $E^{373-374}A$ dentro del dominio interglobular de agrecano, incluso ADAMTS-1, ADAMTS-4, ADAMTS-5 y ADAMTS-9. Este invento muestra que ADAMTS-5 es la enzima responsable de la degradación de la matriz extracelular del cartílago articular en la osteoartritis. Este es el primer informe de la eliminación de un solo gen capaz de suprimir la evolución de la osteoartritis en un modelo animal. A partir de estos resultados, es evidente que ADAMTS-5 es la "agrecanasa" primaria responsable de la degradación de agrecano en la osteoartritis murina.

Ejemplo 3: Preparación de biarilsulfonamidas

[00143] Los Ejemplos 3.1 y 3.2 se prepararon en base al Esquema 1.

Ejemplo 3.1



Ácido 3-metil-2-[4'-(3-metil-quinolín-2-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

[00144] Paso 1A: [Intermedio 1] A un balón seco se agregaron cloruro de 4-bromo-bencensulfonilo (12,2 g; 47,7 mmol; 1 equivalente), cloruro de metileno anhidro (170 ml) y H-D-Val-OMe (8,0 g; 47,7 mmol; 1 equivalente). La mezcla se enfrió a 0°C en un baño de hielo, seguido del añadido de base Hunig (19,11 ml; 109,7 mmol; 2,3 equivalentes). La mezcla de la reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La reacción se completó según determinación de CCD. A continuación, la mezcla se diluyó con diclorometano (100 ml) y se lavó con salmuera. La capa orgánica se desecó sobre $MgSO_4$ anhidro, el disolvente se evaporó y se produjo éster metílico del ácido 2-(4-bromo-bencensulfonilamino)-3-metilbutírico con un rendimiento del 96% (16,0 g). 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,87 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,96 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 2,04 (m, 1 H) 3,49 (s, 3 H) 3,74 (d, *J*=14,40 Hz, 1 H) 5,10 (d, *J*=9,85 Hz, 1 H) 7,66 (m, 4 H).

[00145] Paso 1B: [Intermedio 2] Se disolvieron éster metílico del ácido 2-(4-bromo-bencensulfonilamino)-3-metilbutírico (3,4 g; 9,71mmol), ácido 4-hidroximetil fenilborónico (1,48 g; 9,71 mmol; 1 equivalente), $Pd(PPh_3)_4$ (561 mg; 0,48 mmol; 0,05 equivalentes) en éter dimetílico de etilenglicol (90 ml) en atmósfera de N_2 y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se introdujo K_2CO_3 (2,68 g; 19,4 mmol; 2 equivalentes) en H_2O (30 ml) a la mezcla de la reacción y se calentó a reflujo durante la noche. Una vez completa la reacción, que se confirmó por CCD, el disolvente se extrajo por rotovap, el residuo se sometió a partición entre EtOAc y salmuera, la capa orgánica se desecó sobre $MgSO_4$, el solvente se extrajo, el residuo crudo se trituró con EtOAc para producir éster metílico del ácido 2-(4'-hidroximetil-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico con un rendimiento del 67% (2,46 g).

[00146] 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,90 (d, *J*=7,07 Hz, 3 H) 0,97 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,57 (s, 1 H) 2,04 (m, 1 H) 3,43 (s, 3 H) 3,79 (dd, *J*=10,11, 5,05 Hz, 1 H) 4,78 (s, 2 H) 5,11 (d, *J*=10,36 Hz, 1 H) 7,49 (d, *J*=8,34 Hz, 2 H) 7,60 (d, *J*=8,34 Hz, 2 H) 7,70 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,88 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H).

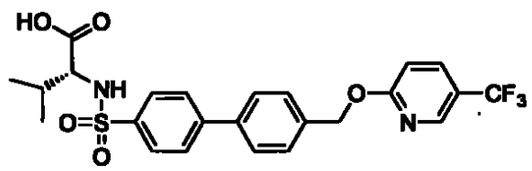
[00147] Paso 1C: [Intermedio 3] Se disolvieron éster metílico del ácido 2-(4'-hidroximetil-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico (1,2 g; 3,2 mmol; 1,0 equivalente), 2-cloro-3-metilquinolina (2,26 g; 12,7 mmol; 4 equivalentes) en DMF (30 ml) seguido del añadido de NaH (382 mg; 60% en aceite; 9,54 mmol; 3 equivalentes). La mezcla se agitó a 100°C durante 5 horas y luego a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de la reacción se vertió en agua fría y el sólido precipitado a partir de la mezcla se recogió por filtración y se lavó con agua. Cromatografía regular de columna (gel de sílice, 1% de $MeOH/CH_2Cl_2$) para lograr 203 mg de éster metílico del ácido 3-metil-2-[4'-(3-metilquinolín-2-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico con un rendimiento del 12%.

[00148] H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,89 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,97 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 2,04 (m, 1 H) 2,40 (s, 3 H) 3,43 (s, 3 H) 3,78 (dd, *J*=10,11, 5,31 Hz, 1 H) 5,09 (d, *J*=10,11 Hz, 1 H) 5,64 (s, 2 H) 7,37 (m, 1 H) 7,64 (m, 8 H) 7,86 (m, 4 H).

[00149] Paso 1D: Se disolvió éster metílico del ácido 3-metil-2-[4'-(3-metilquinolín-2-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico (203 mg; 0,39 mmol; 1 equivalente) en THF (8 ml) y MeOH (4 ml) y se hidrolizó con NaOH 1N (5,83 ml; 5,83 mmol; 13 equivalentes). Después de agitarlo durante 3 días, se extrajo el disolvente y el residuo se disolvió en H_2O. La mezcla se acidificó a pH 3 usando HCl 1N. Se recogió el sólido precipitado de la mezcla mediante filtración y se lavó con agua. Después de desecar en horno al vacío, se obtuvieron 101 mg de ácido 3-metil-2-[4'-(3-metilquinolín-2-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico con un rendimiento del 76,3%.

[00150] 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,81 (d, *J*=6,57 Hz, 3 H) 0,84 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,95 (m, 1 H) 2,36 (s, 3 H) 3,56 (dd, *J*=9,09, 5,81 Hz, 1 H) 5,61 (s, 2 H) 7,42 (t, *J*=7,45 Hz, 1 H) 7,61 (t, *J*=7,71 Hz, 1 H) 7,67 (d, *J*=7,83 Hz, 2 H) 7,83 (m, 8 H) 8,08 (d, *J*=8,34 Hz, 2 H) 12,58 (s, 1 H).

Ejemplo 3.2



Ácido 3-metil-2-[4'-(5-trifluorometil-piridín-2-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

[00151] El compuesto del título, ácido 3-metil-2-[4'-(5-trifluorometil-piridín-2-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se preparó de acuerdo con los procedimientos similares a los descritos para el Ejemplo 3.1.

[00152] Paso 1C: Se disolvieron éster metílico del ácido 2-(4'-hidroximetil-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico (350 mg; 0,93 mmol; 1 equivalente), 2-cloro-5-trifluorometilpiridina (841 mg; 4,64 mmol; 5 equivalentes) en DMF (7 ml) seguido del añadido de NaH (111mg; 2,78 mmol; 3 equivalentes) en atmósfera de N_2. La mezcla se calentó a 100ºC durante 2 horas y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se vertió en agua fría y el sólido obtenido se recogió por filtración. La purificación posterior se realizó mediante cromatografía de columna

(gel de sílice, EtOAc al 20% / hexano) para dar 259 mg de G9058-182-2 con un rendimiento del 54%.

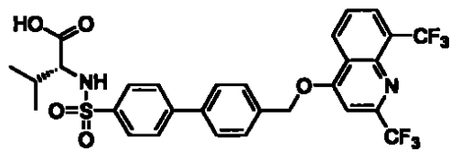
[00153] 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,82 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,90 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,98 (m, 1 H) 3,36 (s, 3 H) 3,72 (dd, *J*=10,11, 5,05 Hz, 1 H) 5,02 (d, *J*=10,11 Hz, 1 H) 5,43 (s, 2 H) 6,84 (d, *J*=8,84 Hz, 1 H) 7,52 (m, 4 H) 7,64 (d, *J*=6,82 Hz, 2 H) 7,74 (d, *J*=8,84 Hz, 1 H) 7,82 (m, 2 H) 8,40 (s, 1 H).

[00154] Paso 1D: Se preparó ácido 3-metil-2-[4'-(5-trifluorometil-piridín-2-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico (rendimiento del 86,4%; 210 mg) de acuerdo con los procedimientos del Paso 1D para el Ejemplo 1A, usando éster metílico del ácido 3-metil-2-[4'-(5-trifluorometil-piridín-2-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico (250 mg) como materia prima.

[00155] 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,81 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,84 (d, *J*=6,57 Hz, 3 H) 1,95 (m, 1 H) 3,56 (m, 1 H) 5,51 (d, 2 H) 7,12 (d, *J*=8,84 Hz, 1 H) 7,59 (d, *J*=8,34 Hz, 2 H) 7,77 (d, *J*=8,34 Hz, 2 H) 7,86 (m, 4 H) 8,11 (m, 2 H) 8,63 (m, 1 H) 12,57 (s, 1 H).

[00156] Los Ejemplos 3.3 y 3.4 se prepararon en base al Esquema 2.

Ejemplo 3.3



Ácido 2-[4'-(2,8-bis-trifluorometil-quinolín-4-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

[00157] Paso 2A: [Intermedio 4, G9591-157-1] A una solución de 2,8-bis-trifluorometil-quinolín-4-ol (3,85 g; 13,7 mmol; 1,1 equivalente) en DMF (40 ml) se añadieron 2-(4-bromometil-fenil)-4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano (3,7 g; 12,5 mmol; 1,0 equivalente) y K_2CO_3 (3,45 g; 24,92 mmol; 2,2 equivalentes) en atmósfera de N_2. La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción

0002/6 43

se completó según determinación de CCD. La mezcla de la reacción se vertió en agua fría, el precipitado blanco formado se recogió por filtración, se lavó con agua, se secó al vacío para dar 4-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-benciloxi]-2,8-bis-trifluorometil-quinolina con un rendimiento del 73% (4,95 g).

[00158] 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 1,36 (s, 12 H) 5,38 (s, 2 H) 7,21 (s, 1 H) 7,51 (d, *J*=8,34 Hz, 2 H) 7,65 (t, *J*=7,83 Hz, 1 H) 7,90 (d, *J*=8,08 Hz, 2 H) 8,14 (d, *J*=7,33 Hz, 1 H) 8,50 (d, *J*=8,59 Hz, 1 H).

[00159] Paso 2B: [Intermedio 5, G9591-162] A 4-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-benciloxi]-2,8-bis-trifluorometil-quinolina (1,5 g; 3,0 mmol; 1 equivalente) en 45 ml de éter dimetílico de etilenglicol se añadió éster metílico del ácido 2-(4-bromo-bencensulfonilamino)-3-metil-butírico (1,06 g; 3,0 mmol; 1,0 equivalente) y $Pd(PPh_3)_4$ (174 mg; 0,15 mmol; 0,05 equivalente) en N_2. La mezcla de la reacción se agitó durante media hora, y luego se añadió una solución acuosa de K_2CO_3 (834 mg; 6,0 mmol; 2 equivalentes). La mezcla se calentó a reflujo durante la noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, el disolvente se extrajo por vacío. El residuo se diluyó con EtOAc (100 ml) y se lavó con solución de salmuera. La capa orgánica se desecó sobre $MgSO_4$ anhidro, el disolvente se evaporó al vacío y el producto crudo se purificó sobre columna de gel de sílice (EtOAc al 30%/Hexano) para dar 1,026 g de éster metílico del ácido 2-[4'-(2,8-bis-trifluorometil-quinolín-4-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico con un rendimiento del 53%.

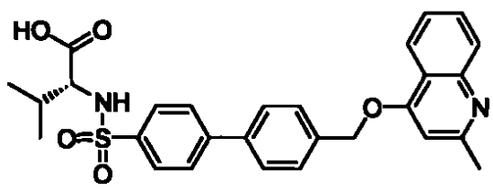
[00160] 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,90 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,98 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 2,07 (m, 1 H) 3,45 (s, 3 H) 3,81 (dd, *J*=10,11, 5,05 Hz, 1 H) 5,12 (d, *J*=10,11 Hz, 1 H) 5,44 (s, 2 H) 7,25 (s, 1 H) 7,70 (m, 7 H) 7,92 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 8,16 (d, *J*=7,33 Hz, 1 H) 8,52 (d, *J*=8,59 Hz, 1 H).

[00161] Paso 2C: Se disolvió éster metílico del ácido 2-[4'-(2,8-bis-trifluorometil-quinolín-4-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico (1,026 g; 1,6 mmol; 1 equivalente) en THF (15 ml) y se añadió MeOH (6 ml) y NaOH 1N (17,6 ml; 11 equivalentes). La reacción se controló por CCD. Se completó en 3 días. El disolvente se extrajo por rotovap y el residuo se disolvió en H_2O. La mezcla se acidificó a pH 3 con HCl 1N. El precipitado obtenido se recogió por filtración, se lavó con agua fría y

se dejó secar durante la noche. Se obtuvieron 460 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 46%.

[00162] 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,82 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,85 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,96 (m, 1 H) 3,57 (dd, *J*=9,35, 6,32 Hz, 1 H) 5,66 (s, 2 H) 7,83 (m, 10 H) 8,11 (d, *J*=9,35 Hz, 1 H) 8,35 (d, *J*=7,33 Hz, 1 H) 8,58 (d, *J*=7,83 Hz, 1 H) 12,57 (s, 1 H).

Ejemplo 3.4



Ácido D-3-metil-2-[4'-(2-metilquinolín-4-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

[00163] El compuesto del título, ácido D-3-metil-2-[4'-(2-metilquinolín-4-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los descritos para el Ejemplo 3.3.

[00164] Paso 2A: La alquilación de 2-metilquinolín-4-ol con 2-(4-bromometil-fenil)-4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano se realizó de acuerdo con los procedimientos en el Paso 2A para el Ejemplo 1C para dar 2-metil-4-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-benciloxi]-quinolina, con un rendimiento del 28%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 1,3 (s, 12 H) 2,6 (s, 3 H) 5,4 (s, 2 H) 7,0 (s, 1 H) 7,5 (m, 1 H) 7,6 (d, *J*=8,1 Hz, 2 H) 7,7 (m, 1 H) 7,7 (d, *J*=8,1 Hz, 2 H) 7,9 (d, *J*=8,1 Hz, 1 H) 8,1 (dd, *J*=8,3, 0,8 Hz, 1 H).

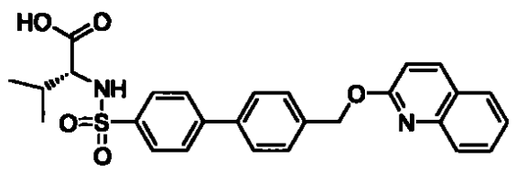
[00165] Paso 2B: El acoplamiento de Suzuki de éster metílico del ácido D-2-(4-bromo-bencensulfonilamino)-3-metil-butírico con 2-metil-4-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-benciloxi]-quinolina se realizó de acuerdo con los procedimientos en el Paso 2B para el Ejemplo 3.3 con un rendimiento del 80%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, *J*=15,0; 6,7 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 2,6 (s,

3 H) 3,3 (s, 3 H) 3,6 (dd, *J*=9,3, 7,1 Hz, 1 H) 5,5 (s, 2 H) 7,1 (s, 1 H) 7,5 (t, *J*=7,6 Hz, 1 H) 7,7 (m, 3 H) 7,8 (d, *J*=7,6 Hz, 4 H) 7,9 (m, 1 H) 7,9 (m, 2 H) 8,1 (d, *J*=8,3 Hz, 1 H) 8,3 (d, *J*=9,3 Hz, 1 H).

[00166] Paso 2C: La hidrólisis del éster metílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(2-metilquinolín-4-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos del Paso 2C para el Ejemplo 3.3 con rendimiento cuantitativo. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=40,2, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 2,6 (s, 3 H) 3,0 (s, 1 H) 5,4 (s, 2 H) 7,1 (s, 1 H) 7,5 (t, J=8,1 Hz, 1 H) 7,7 (t, J=7,7 Hz, 3 H) 7,8 (m, 7 H) 8,1 (d, J=9,3 Hz, 1 H).

[00167] El Ejemplo 3.5 se preparó en base al Esquema 3.

Ejemplo 3.5



[00168] Paso 3A: A un balón se añadió cloruro de 4-bromo-bencensulfonilo (24,37 g; 95,4 mmol; 1 equivalente), cloruro de metileno anhidro (350 ml) y H-D-Val-OtBu (20 g; 95,4 mmol; 1 equivalente). La mezcla se enfrió a 0°C, seguido del añadido de base Hunig (38,2 ml; 219 mmol; 2,3 equivalentes). Luego se retiró el baño de enfriamiento y se dejó que la mezcla de la reacción se calentara a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La materia prima se consumió según determinación de CCD. La mezcla de la reacción se diluyó con cloruro de metileno (200 ml) y se lavó con H_2O (500 ml), salmuera (250 ml). La capa orgánica se desecó sobre $MgSO_4$ anhidro, se evaporó al vacío para lograr éster *terc*-butílico del ácido 2-(4-bromo-bencensulfonilamino)-3-metil-butírico, con un rendimiento cuantitativo (35,0 g).

[00169] 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,82 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,84 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,19 (s, 9 H) 1,93 (m, 1 H) 3,46 (dd, *J*=9,35, 6,06 Hz, 1 H) 7,69 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,79 (m, 2 H) 8,24 (d, *J*=9,60 Hz, 1 H).

[00170] Paso 3B: Se cargaron éster terc-butílico del ácido 2-(4-bromo-bencenesulfonilamino)-3-metil-butírico (11,96 g; 30,47 mmol; 1 equivalente), ácido 4-(hidroximetilbenceno) borónico (4,63 g; 30,5 mmol; 1 equivalente) y $Pd(PPh_3)_4$ (1,76 g; 1,52 mmol; 0,05 equivalentes) a un frasco de reacción y se agregó éter dimetílico de etilenglicol (300 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se introdujo una solución de K_2CO_3 (8,43 g; 60,9 mmol; 2 equivalentes) disuelta en 100 ml de H_2O. La mezcla de la reacción se calentó a reflujo durante la noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, el disolvente se extrajo por rotavap y se sometió al residuo a partición entre EtOAc y salmuera. La capa orgánica se separó y desecó sobre $MgSO_4$. Después de extraer el disolvente por rotavap, se obtuvieron 8,3 g de sólido blanco de éster terc-butílico del ácido 2-(4'-hidroximetil-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico con un rendimiento del 65%.

[00171] 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 1,05 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,12 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,33 (s, 9 H) 2,16 (m, 1 H) 3,73 (d, *J*=5,56 Hz, 1 H) 4,81 (s, 2 H) 7,62 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,78 (d, *J*=8,34 Hz, 2 H) 7,92 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 8,04 (m, 2 H).

[00172] Paso 3C: Se disolvió éster terc-butílico del ácido 2-(4'-hidroximetil-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico (700 mg; 1,68 mmol; 1 equivalente), 2-cloroquinolina (1,1g; 6,7 mmol; 4 equivalentes) en DMF (20 ml) y se agregó NaH (202 mg; 60% en aceite; 5,04 mmol; 3 equivalentes). La mezcla se calentó a 100°C durante 2 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de la reacción se apagó con NH_4Cl (acuoso) saturado. Después de agitar durante media hora, se precipitó un sólido a partir de la mezcla. El sólido se recogió por filtración, se lavó con agua y se dejó secar durante la noche para producir 793 mg de éster terc-butílico del ácido 2-[4'-(isoquinolín-3-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico con un rendimiento del 87%.

[00173] 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,87 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,03 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,19 (s, 9 H) 2,05 (m, 1 H) 3,66 (dd, *J*=9,85, 4,55 Hz, 1 H) 5,14 (d, *J*=9,85 Hz, 1 H) 5,62 (s, 2 H) 6,98 (d, *J*=8,84 Hz, 1 H) 7,40 (m, 1 H) 7,66 (m, 9 H) 7,89 (m, 2 H) 8,03 (d, *J*=8,59 Hz, 1 H).

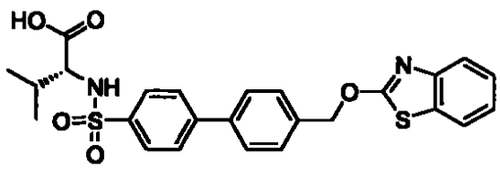
000220

[00174] Paso 3D: Se disolvió éster terc-butílico del ácido 2-[4'-(isoquinolín-3-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico (480 mg; 0,88 mmol) en 15 ml de diclorometano. La solución se enfrió a 0°C seguido del añadido de 5 ml de TFA. La mezcla obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente se extrajo por rotavap y el residuo se lavó con MeOH. El sólido obtenido de esta manera se secó durante la noche al vacío para dar 60 mg de ácido 2-[4'-(isoquinolín-3-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico con un rendimiento del 14%.

[00175] 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,81 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,84 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,95 (m, 1 H) 3,56 (dd, *J*=9,35, 6,06 Hz, 1 H) 5,58 (s, 2 H) 7,11 (d, *J*=8,84 Hz, 1 H) 7,46 (dd, *J*=7,58, 6,32 Hz, 1 H) 7,79 (m, 11 H) 8,08 (d, *J*=9,35 Hz, 1 H) 8,29 (d, *J*=8,59 Hz, 1 H) 12,57 (s, 1 H).

El Ejemplo 3.6 se preparó en base al Esquema 4.

Ejemplo 3.6



Ácido 2-[4'-(benzotiazol-2-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

[00176] A 2-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-benciloxi]-benzotiazol (300 mg; 0,604 mmol; 1 equivalente) en 9 ml de dimetoxietano se añadió éster terc-butílico del ácido 2-(4-bromo-bencensulfonilamino)-3-metil-butírico (237 mg; 0,604 mmol; 1 equivalente) y Pd(PPh3)4 (35 mg; 0,03 mmol; 0,05 equivalente). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se añadió K_2CO_3 (167 mg; 1,208 mmol; 2 equivalentes) en H_2O (3 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante la noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, el disolvente se extrajo por rotavap. El residuo se disolvió en cloruro de metileno y se lavó con agua, salmuera. Capa orgánica desecada sobre $MgSO_4$, disolvente extraído al vacío, mezcla cruda purificada por cromatografía de columna (EtOAc al 30% / Hexano) para dar 285 mg con un rendimiento del 85%.

000221

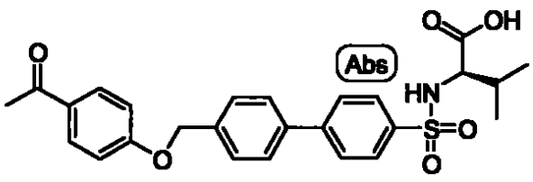
[00177] 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 1,07 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,23 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,39 (s, 9 H) 1,47 (t, *J*=7,20 Hz, 1 H) 3,86 (dd, *J*=9,85, 4,55 Hz, 1 H) 5,42 (s, 2 H) 6,99 (s, 1 H) 7,22 (d, *J*=7,07 Hz, 1 H) 7,39 (m, 2 H) 7,61 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,67 (d, *J*=6,32 Hz, 1 H) 7,72 (m, 2 H) 7,84 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 8,09 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H).

[00178] Paso 4B Se disolvió éster terc-butílico del ácido 2-[4'-(benzotiazol-2-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico (140 mg; 0,25 mml) en 6 ml de cloruro de metileno seguido del añadido de TFA (3 ml).La reacción se completó en 6 horas según determinación de CCD. El disolvente se extrajo y el residuo se disolvió en EtOAc. Se añadió n-hexano a la solución y se precipitó un sólido a partir de la mezcla. El precipitado se recogió y secó para dar 86 mg con un rendimiento del 68%.

[00179] 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,80 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,83 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,93 (m, 1 H) 3,54 (dd, *J*=9,35, 6,06 Hz, 1 H) 5,26 (s, 2 H) 7,21 (m, 1 H) 7,33 (m, 2 H) 7,44 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,71 (t, *J*=8,46 Hz, 3 H) 7,82 (s, 4 H) 8,07 (d, *J*=9,35 Hz, 1 H) 12,55 (s, 1 H).

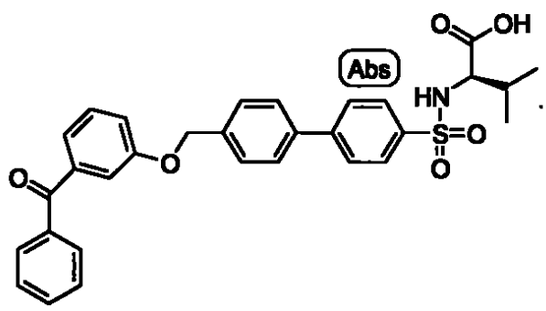
[00180] Los ejemplos 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17 y 3.18 se prepararon en base al Esquema 4B.

Ejemplo 3.7



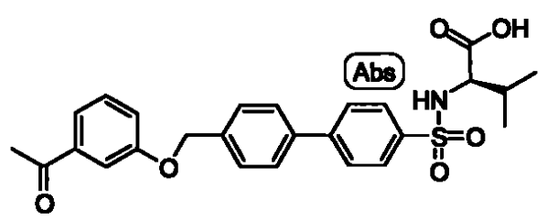
ES-480,1 (M-H)-HRMS: 482,16311 (M+Na)+; 482,16319 calculado

Ejemplo 3.8



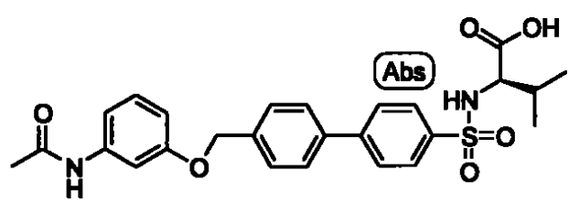
ES+ 544,2 (M+H)+HRMS: 544,17694 (M+H); 544,17884 calculado

Ejemplo 3.9



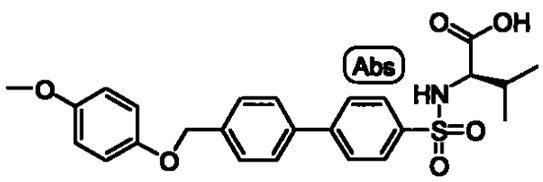
ES- 480,2 (M-H)-HRMS: 482,1635 (M+H)+; 482,16319 calculado

Ejemplo 3.10



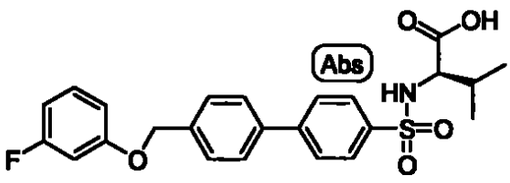
ES- 495,2 (M-H)-HRMS: 497,17284 (M+H)+; 497,17409 calculado

Ejemplo 3.11



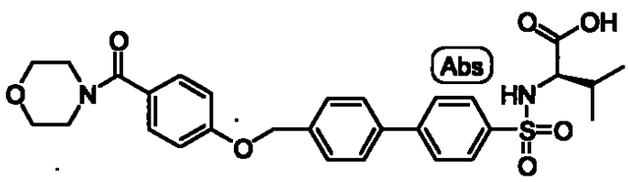
ES- 468,2 (M-H)-HRMS: 470,16231 (M+H)+; 470,16319 calculado

Ejemplo 3.12



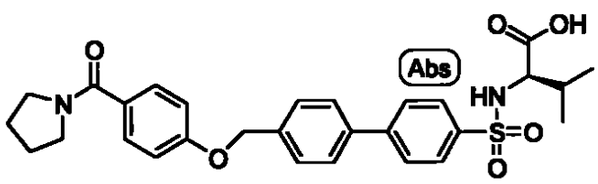
ES- 456,1 (M-H)-HRMS: 458,14323 (M+H)+; 458,1432 calculado

Ejemplo 3.13



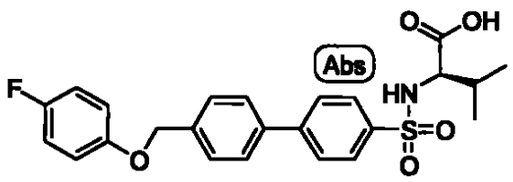
ES- 551,2 (M-H)-HRMS: 553,19849 (M+H)+; 553,2003 calculado

Ejemplo 3.14



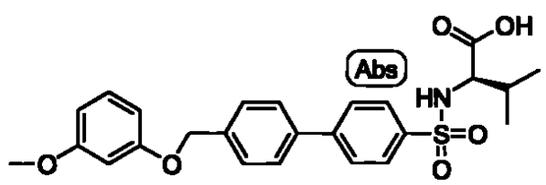
ES- 535,2 (M-H)-HRMS: 537,20469 (M+H)+; 537,20539 calculado

Ejemplo 3.15



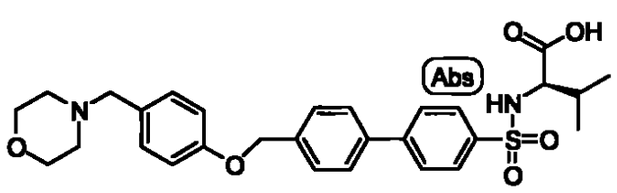
ES- 456,1 (M-H)-HRMS: 458,14389 (M+H)+; 458,1432 calculado

Ejemplo 3.16



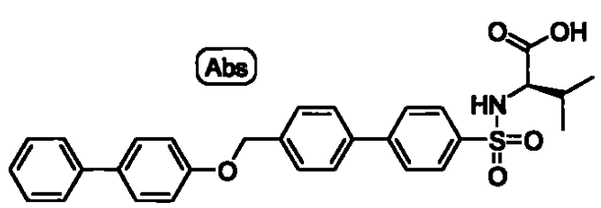
ES- 468,2 (M-H)-HRMS: 470,16151 (M+H)+; 470,16319 calculado

Ejemplo 3.17



ES+ 539,1 (M+H)+HRMS: 539.22021 (M+H)+; 539,22104 calculado

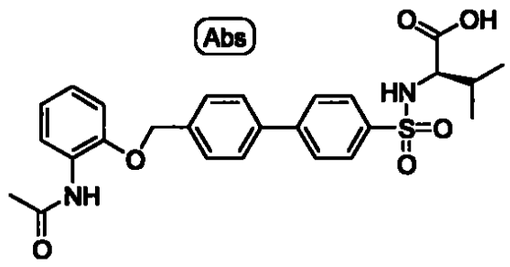
Ejemplo 3.18



ES-514,1 (M-H)-HRMS: 516,18313 (M+H)+; 516,18392 calculado

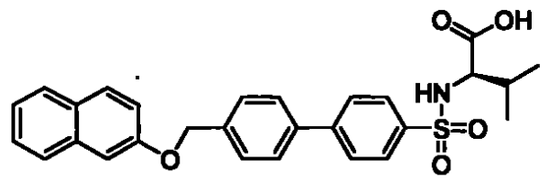
[00181] Los ejemplos 3.19, 3.20, 3.21, 3.22, 3.23, 3.24, 3.25, 3.26, 3.27, 3.28, 3.29, 3.30 y 3.32 se prepararon en base al Esquema 4C.

Ejemplo 3.19



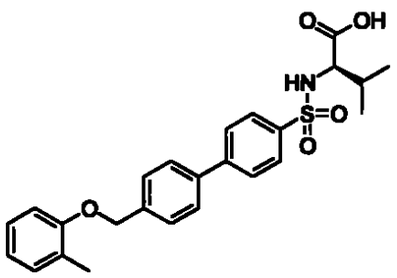
ES-495,1 (M-H)-HRMS: 497,17429 (M+H)+; 497,17409 calculado

Ejemplo 3.20



ES- 488,1 (M-H)-HRMS: 490,16864 (M+H)+; 490,16827 calculado

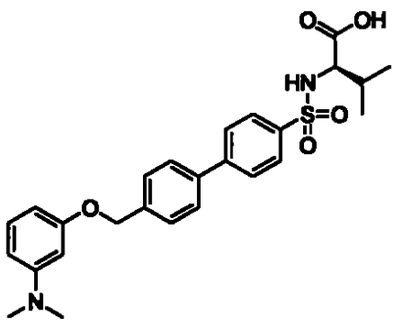
Ejemplo 3.21



ES^+ m/z 452,1 (M-H)-HRMS: 454,16745 (M+H)+; 454,16827 calculado

^1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0,82 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 0,94 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,06 (m, 1H), 2,31 (s, 3H), 3,80 (dd, 1H, *J* = 4,4, 10Hz), 5,13 (m, 3H), 6,90 (m, 2H), 7,17 (m, 2H), 7,55 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,60 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,66 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,86 (d, 2H, *J* = 8Hz).

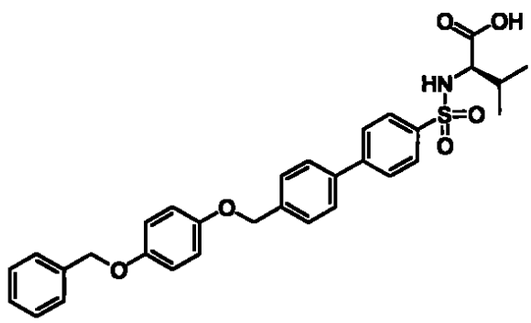
Ejemplo 3.22



ES^+ m/z 481,2 (M+H)+HRMS: 483,19410 (M+H)+; 483,19482 calculado

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 0,90 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 0,99 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,06 (m, 1H), 2,92 (s, 6H), 3,42 (s, 3H), 3,70 (d, 1H, *J* = 5,6, 10Hz), 5,14 (s, 2H), 6,41 (m, 3H), 7,11 (m, 1H), 7,57 (d, 2H, 8Hz), 7,71 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,80 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,92 (d, 2H, *J* = 8Hz).

Ejemplo 3.23

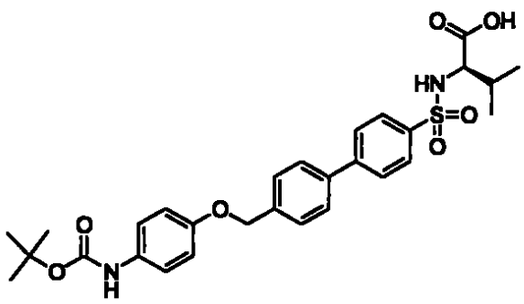


ES^+ m/z 544,1 (M+H)+HRMS: 546,19448 (M+H)+; 546,19449 calculado

000227

^{1}H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 0,93 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 0,99 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,07 (m, 1H), 3,70 (d, 1H, *J* = 5,6), 5,03 (s, 2H), 5,10 (s, 2H), 6,94 (s, 4H), 7,31 (m, 1H), 7,37 (m, 2H), 7,43 (m, 2H), 7,55 (d, 2H, 8Hz), 7,71 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,80 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,92 (d, 2H, *J* = 8Hz).

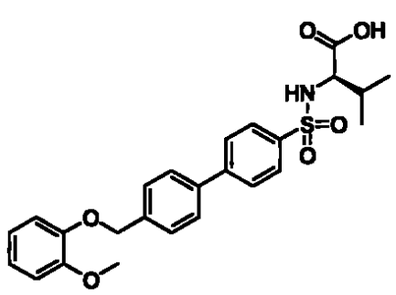
Ejemplo 3.24



ES^+ m/z 553,2 (M-H)-HRMS: 577,19777 (M+Na)+; 577,19789 calculado

[00182] ^{1}H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 0,91 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 0,97 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 1,50 (s, 9H), 2,04 (m, 1H), 3,68 (d, 1H, *J* = 5,6Hz), 5,10 (s, 2H), 6,92 (s, 2H), 7,28 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,54 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,70 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,79 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,91 (d, 2H, *J* = 8Hz)

Ejemplo 3.25

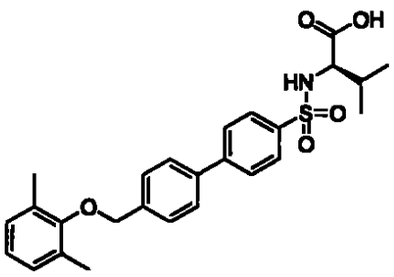


ES^+ m/z 470,2 (M+H)+HRMS: 470,16364 (M+H)+; 470,16319 calculado

000228

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0,89 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 0,96 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,10 (m, 1H), 3,82 (m, 1H), 3,90 (s, 3H), 5,07 (d, 1H, *J* = 9,6Hz), 5,21 (s, 2H), 6,93 (m, 4H), 7,54 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,58 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,65 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,89 (d, 2H, *J* = 8Hz).

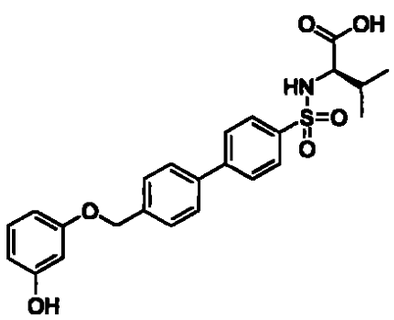
Ejemplo 3.26



ES^+ m/z 466,2 (M-H)-HRMS: 468,18540 (M+H)+; 468,18392 calculado

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0,83 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 0,95 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,05 (m, 1H), 2,33 (s, 6H), 3,82 (dd, 1H, *J* = 5,2, 10Hz), 4,88 (s, 2H), 5,07 (d, 1H, *J* = 10 Hz), 6,97 (m, 1H), 7,05 (m, 2H), 7,64 (m, 4H), 7,67 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,87 (d, 2H, *J* = 8Hz).

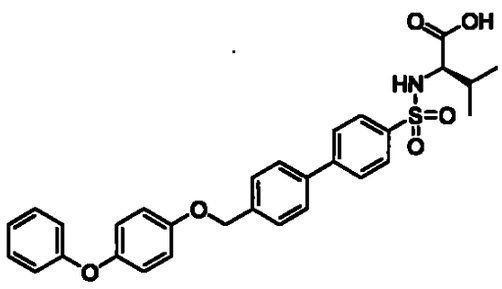
Ejemplo 3.27



ES^+ m/z 454,1 (M-H)-HRMS: 456,14707 (M+H)+; 456,14754 calculado

^{1}H RMN (400 MHz, acetona(d_6)): δ 0,92 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 0,98 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,10 (m, 1H), 3,16 (m, 1H), 5,16 (s, 2H), 6,45 (d, 1H, *J* = 8Hz), 6,53 (m, 2H), 7,10 (t, 1H, *J* = 8Hz), 7,61 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,76 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,86 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,94 (d, 2H, *J* = 8Hz).

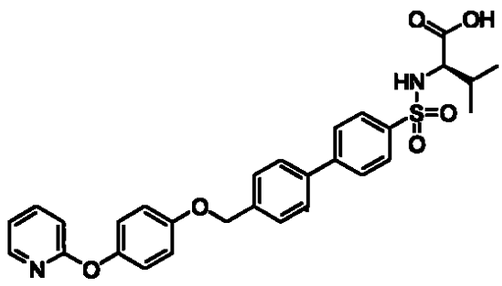
Ejemplo 3.28



ES^+ m/z 530,1 (M-H)-HRMS: 532,17709 (M+H)+; 532,17884 calculado

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 0,93 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 0,99 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,06 (m, 1H), 3,70 (d, 1H, *J* = 5,6, 10Hz), 5,16 (s, 2H), 6,93 (m, 3H), 7,04 (m, 3H), 7,31 (m, 2H), 7,58 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,72 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,81 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,93 (d, 2H, *J* = 8Hz).

Ejemplo 3.29

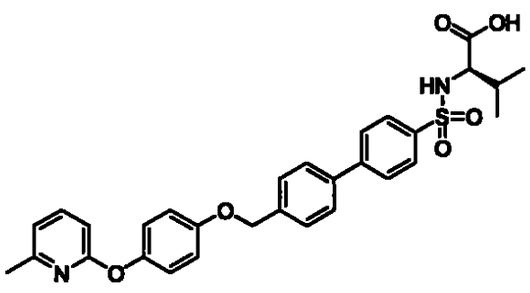


ES^+ m/z 531,1 (M-H)-HRMS: 533,17293 (M+H)+; 533,17409 calculado

^1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0,88 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 1,00 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,13 (m, 1H), 3,83 (m, 1H), 5,13 (m, 3H), 6,82 (m, 1H), 7,02 (m, 5H), 7,56 (m, 4H), 7,67 (m, 3H), 7,89 (m, 2H), 8,16 (m, 1H).

000230

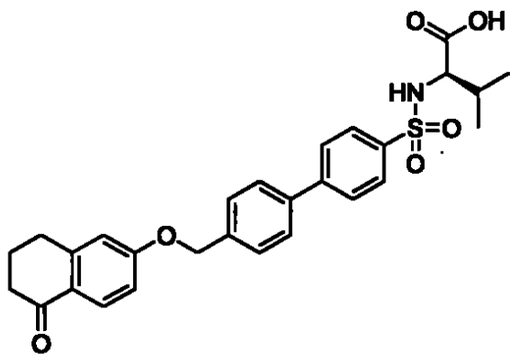
Ejemplo 3.30



ES^+ m/z 545,2 (M-H)-HRMS: 547,19006 (M+H)+; 547,18974 calculado

^1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0,89 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 1,01 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,19 (m, 1H), 2,44 (s, 3H), 3,83 (m, 1H), 5,04 (s, 2H), 6,39 (d, 1H, *J* = 8 Hz), 6,83 (m, 1H), 6,90 (m, 2H, *J* = 8 Hz), 6,97 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 7,52 (m, 5H), 7,60 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,90 (d, 2H, *J* = 8Hz).

Ejemplo 3.31

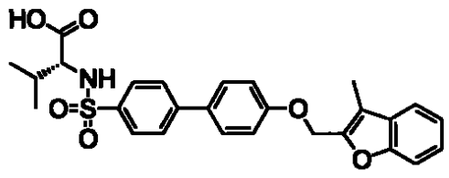


ES^+ m/z 506,2 (M-H)-HRMS: 508,17782 (M+H)+; 508,17884 calculado

^1H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,81 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 0,84 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 1,98 (m, 3H), 2,64 (d, 2H), 2,91 (t, 2H, *J* = 6Hz), 3,56 (dd, 1H, *J* = 6, 9,2Hz), 5,27 (s, 2H), 6,99 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,59 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 7,78 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,85 (m, 4H), 8,08 (d, 1H, 8Hz).

[00183] Los ejemplos 3.32, 3.33, 3.34, 3.35, 3.36, 3.37, 3.38, 3.39, 3.40 y 3.41 se prepararon en base al Esquema 5.

Ejemplo 3.32



Ácido D-3-metil-2-[4'-(3-metil-benzofurán-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

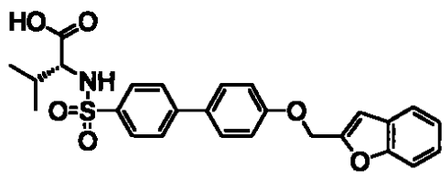
[00184] Paso 5A: Una mezcla de 2-clorometil-3-metil-benzofurano (675,9 mg; 3,75 mmol), 4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolán-2-il)-fenol (825 mg; 3,75 mmol; 1 equivalente), K_2CO_3 (2,1 g; 15,2 mmol; 4 equivalentes) en 20 ml de CH_3CN se calentó a reflujo en atmósfera de nitrógeno. La reacción se completó después de 12 horas. Trabajo regular y purificación por columna (EtOAc al 5%/hexano) para dar 3-metil-2-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolán-2-il)-fenoximetil]-benzofurano con un rendimiento del 44% (601 mg). 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 1,3 (s, 12 H) 2,3 (s, 3 H) 5,2 (s, 2 H) 7,0 (d, *J*=8,6 Hz, 2 H) 7,3 (m, 2 H) 7,5 (dd, *J*=21,6, 7,7 Hz, 2 H) 7,8 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H).

[00185] Paso 5B: Una mezcla de éster metílico de ácido D-2-(4-bromo-bencensulfonilamino)-3-metil-butírico (568,07 mg; 1,62 mmol), 3-metil-2-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolán-2-il)-fenoximetil]-benzofurano (590,7 mg; 1,62 mmol; 1 equivalente), $Pd(PPh_3)_4$ (93,7 mg; 0,08 mmol; 0,05 equivalente) y K_2CO_3 (448,35 mg; 3,24 mmol; 2 equivalentes) en 5 ml de DME y 5 ml de H_2O se calentó a reflujo por 12 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se cargó en una columna para su purificación. Se obtuvieron 616 mg de producto G8475-146 con un rendimiento del 75%. 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,8 (d, *J*=6,8 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 2,2 (s, 3 H) 3,2 (s, 3 H) 3,5 (d, *J*=6,6 Hz, 1 H) 5,1 (s, 2 H) 7,0 (m, *J*=9,1 Hz, 2 H) 7,1 (m, 1 H) 7,2 (m, 1 H) 7,3 (m, 1 H) 7,4 (m, 1 H) 7,5 (d, *J*=9,1 Hz, 2 H) 7,6 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H) 7,7 (m, 2 H).

[00186] Paso 5C: El éster metílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(3-metil-benzofurán-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico (364 mg) se disolvió en THF (10 ml) y

MeOH (3 ml). Se añadió LiOH 1N (3 ml) y la mezcla se agitó durante la noche. Trabajo regular y purificación por columna para dar ácido D-3-metil-2-[4'-(3-metilbenzofurán-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico cuantitativamente. 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,8 (dd, J=30,3, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 2,2 (s, 3 H) 3,5 (d, J=5,3 Hz, 1 H) 5,1 (s, 2 H) 7,1 (d, J=9,1 Hz, 2 H) 7,1 (m, 1 H) 7,2 (m, 1 H) 7,3 (d, J=8,3 Hz, 1 H) 7,5 (d, J=8,3 Hz, 1 H) 7,5 (d, J=9,1 Hz, 3 H) 7,6 (d, J=8,6 Hz, 2 H) 7,8 (d, J=8,8 Hz, 2 H).

Ejemplo 3.33



Ácido D-2- [4'-(benzofurán-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

[00187] El compuesto del título, ácido D-2- [4'-(benzofurán-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.32.

[00188] Paso 5A: A 2-bromometil-benzofurano (1,5 g; 7,1 mmol; 1 equivalente), 4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolán-2-il)-fenol (1,56 g; 7,1 mmol; 1equivalente), carbonato de potasio (1,96 g; 14,2 mmol; 2 equivalentes) se disolvió en acetonitrilo (50 ml) bajo argón y se calentó a 70°C durante 16 horas. Después de procesar y cromatografía instantánea de columna, se obtiene 2-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolán-2-il)-fenoximetil]-benzofurano. Rendimiento: 63%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 1,3 (s, 12 H) 5,3 (s, 2 H) 7,1 (m, 3 H) 7,3 (m, 1 H) 7,3 (m, 1 H) 7,6 (m, 4 H).

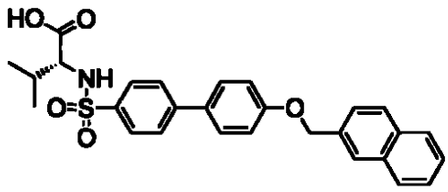
[00189] Paso 5B: Se realizó acoplamiento de 2-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolán-2-il)-fenoximetil]-benzofurano con éster terc-butílico del ácido D-2-(4-bromo-bencensulfonilamino)-3-metil-butírico para obtener éster terc-butílico del ácido D-2-[4'-(benzofuran-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico de acuerdo con los procedimientos en el Paso 5B para el Ejemplo 3.32 . Rendimiento: 33%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, *J*=8,3, 7,1 Hz, 6 H) 1,2 (s, 9 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, *J*=9,7, 6,2 Hz, 1 H) 5,3 (s, 2 H) 7,1 (s, 1 H) 7,2 (d, *J*=8,6 Hz, 2 H) 7,3

(m, 1 H) 7,3 (m, 1 H) 7,6 (dd, *J*=8,2, 0,6 Hz, 1 H) 7,7 (m, 3 H) 7,8 (d, *J*=3,3 Hz, 4 H) 8,1 (d, *J*=9,9 Hz, 1 H).

[00190] Paso 5C: Ester terc-butílico del ácido D-2-[4'-(benzofuran-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico (126 mg; 0,23 mmol; 1 equivalente), cloruro de cerio heptahidratado (175 mg; 0,47 mmol; 2 equivalentes), yoduro de potasio (51 mg; 0,30 mmol; 1,3 equivalente) en acetonitrilo (10 ml) se calentaron a 70°C durante 16 horas. Después de procesarse y de cromatografía instantánea de columna se obtuvo ácido D-2-[4'-(benzofuran-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico.

Rendimiento: 25%. RMN: 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=12,5, 6,7 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 3,5 (dd, J=9,2, 5,9 Hz, 1 H) 5,3 (s, 2 H) 7,1 (s, 1 H) 7,2 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,3 (dd, J=8,1, 0,8 Hz, 1 H) 7,3 (m, 1 H) 7,6 (d, J=8,1 Hz, 1 H) 7,7 (m, 1 H) 7,7 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (d, 4 H) 8,0 (d, J=9,3 Hz, 1 H).

Ejemplo 3.34



Ácido D-3-metil-2-[4'-(naftalen-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

[00191] El compuesto del título, ácido D-3-metil-2-[4'-(naftalen-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.32.

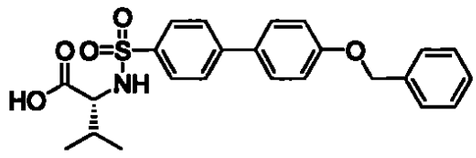
[00192] Paso 5A: Se llevó a cabo alquilación de 2-bromometil-naftaleno con 4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-fenol de acuerdo con los procedimientos del Paso 5A en el Ejemplo 3.32 para dar 4,4,5,5-tetrametil-2-[4-(naftalen-2-ilmetoxi)-fenil]-[1,3,2]dioxaborolano con un rendimiento del 85%. 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 1,3 (s, 12 H) 5,3 (s, 2 H) 7,0 (d, *J*=8,6 Hz, 2 H) 7,5 (m, 2 H) 7,5 (dd, *J*=8,3, 1,8 Hz, 1 H) 7,8 (d, *J*=8,6 Hz, 2 H) 7,9 (m, 4 H).

[00193] Paso 5B: El acoplamiento de Suzuki de 4,4,5,5-tetrametil-2-[4-(naftalén-2-ilmetoxi)-fenil]-[1,3,2]dioxaborolano con éster metílico del ácido D-2-(4-bromo-

bencensulfonilamino)-3-metil-butírico se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos del Paso 5B para el Ejemplo 3.32 para dar éster metílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(naftalén-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico con un rendimiento del 44%. 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,9 (dd, *J*=32,1, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 3,4 (s, 3 H) 3,8 (dd, *J*=10,2, 5,2 Hz, 1 H) 5,1 (d, *J*=10,1 Hz, 1 H) 5,3 (s, 2 H) 7,1 (d, *J*=9,1 Hz, 2 H) 7,5 (m, 2 H) 7,6 (m, 3 H) 7,7 (d, *J*=8,6 Hz, 2 H) 7,9 (m, 6 H).

[00194] Paso 5C: La hidrólisis del éster metílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(naftalén-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se realizó de acuerdo con los procedimientos del Paso 5C para el Ejemplo 3.32 con rendimiento cuantitativo. 1H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,8 (dd, J=32,6, 6,8 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (d, J=5,3 Hz, 1 H) 5,2 (s, 2 H) 7,1 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,4 (m, 2 H) 7,5 (dd, J=8,6, 1,8 Hz, 1 H) 7,5 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,6 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (m, 5 H) 7,8 (s, 1 H).

Ejemplo 3.35



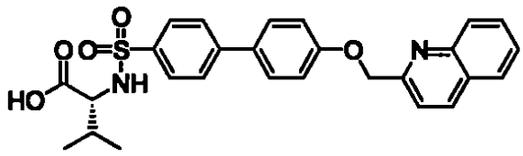
Ácido D-2-(4'-benciloxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico

[00195] El compuesto del título, ácido D-2-(4'-benciloxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.32.

[00196] Paso 5B: El acoplamiento de Suzuki del ácido 4-benciloxifenilborónico con el éster terc-butílico del ácido D-2-(4-bromo-bencensulfonilamino)-3-metil-butírico se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos del Paso 5B para el Ejemplo 3.32 para dar éster terc-butílico del ácido D-2-(4'-benciloxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico con un rendimiento del 73%. 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,8 (dd, *J*=29,7, 6,7 Hz, 6 H) 1,1 (s, 9 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (d, *J*=5,8 Hz, 1 H) 5,0 (s, 2 H) 7,0 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H) 7,2 (t, *J*=7,3 Hz, 1 H) 7,3 (m, 2 H) 7,4 (d, *J*=6,8 Hz, 2 H) 7,5 (d, *J*=9,1 Hz, 2 H) 7,6 (d, *J*=8,6 Hz, 2 H) 7,8 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H).

[00197] Paso 5C: El ácido D-2-(4'-benciloxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico se preparó de acuerdo con los procedimientos del Paso 5C para el Ejemplo 3.32 con rendimiento cuantitativo. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=12,3, 6,7 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, J=9,3, 6,1 Hz, 1 H) 5,2 (s, 2 H) 7,1 (d, J=9,1 Hz, 2 H) 7,4 (m, 3 H) 7,5 (m, 2 H) 7,7 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (s, 4 H) 8,0 (d, J=9,3 Hz, 1 H).

Ejemplo 3.36



Ácido D-3-metil-2-[4'-(quinolín-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

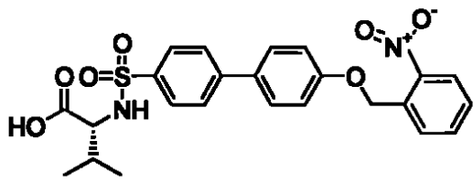
[00198] El compuesto del título, ácido D-3-metil-2-[4'-(quinolín-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.32.

[00199] Paso 5A: Se llevó a cabo alquilación de 2-clorometil-quinolina con 4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-fenol de acuerdo con los procedimientos en el Paso 5A para el Ejemplo 3.32 para dar 2-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-fenoximetil]-quinolina con un rendimiento del 90%. 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 1,2 (s, 12 H) 5,3 (s, 2 H) 7,0 (d, *J*=8,6 Hz, 2 H) 7,5 (m, 1 H) 7,6 (dd, *J*=11,4, 8,6 Hz, 3 H) 7,7 (m, 1 H) 7,8 (dd, *J*=8,1, 1,5 Hz, 1 H) 7,9 (d, *J*=8,6 Hz, 1 H) 8,3 (d, *J*=8,6 Hz, 1 H).

[00200] Paso 5B: El acoplamiento de Suzuki de 2-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-fenoximetil]-quinolina con el éster terc-butílico del ácido D-2-(4-bromo-bencensulfonilamino)-3-metil-butírico se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos en el Paso 5B para el Ejemplo 3.32 para dar éster terc-butílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(quinolín-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico con un rendimiento del 70%. 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,8 (dd, *J*=29,8, 6,8 Hz, 6 H) 1,1 (s, 9 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (d, *J*=5,6 Hz, 1 H) 5,3 (s, 2 H) 7,1 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H) 7,5 (m, 3 H) 7,6 (t, *J*=8,6 Hz, 3 H) 7,7 (m, 1 H) 7,8 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H) 7,9 (dd, *J*=8,2, 0,9 Hz, 1 H) 8,0 (m, 1 H) 8,3 (d, *J*=8,8 Hz, 1 H).

[00201] Paso 5C: La extracción del éster t-butílico se hizo de acuerdo con los procedimientos del Paso 5C para el Ejemplo 3.32, con rendimiento cuantitativo. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, *J*=12,5, 6,7 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, *J*=9,3, 6,1 Hz, 1 H) 5,5 (s, 2 H) 7,2 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H) 7,7 (m, 1 H) 7,7 (dd, *J*=8,7, 1,9 Hz, 3 H) 7,8 (s, 5 H) 8,0 (m, 3 H) 8,5 (d, *J*=8,6 Hz, 1 H).

Ejemplo 3.37



Ácido D-3-metil-2-[4'-(2-nitro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

[00202] El compuesto del título, ácido D-3-metil-2-[4'-(2-nitro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.32.

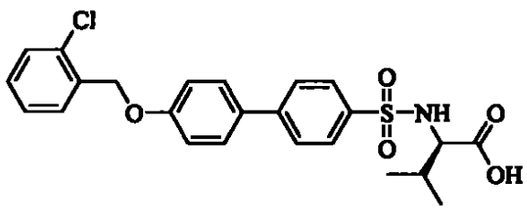
[00203] Paso 5A: Se llevó a cabo la alquilación de 1-bromometil-2-nitro-benceno con 4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-fenol de acuerdo con los procedimientos del Paso 5A para el Ejemplo 3.32 para dar 4,4,5,5-tetrametil-2-[4-(2-nitro-benciloxi)-fenil]-[1,3,2]dioxaborolano con un rendimiento del 62%. 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 1,3 (s, 12 H) 5,5 (s, 2 H) 7,0 (d, *J*=8,6 Hz, 2 H) 7,5 (m, 1 H) 7,7 (m, 1 H) 7,8 (d, *J*=8,6 Hz, 2 H) 7,9 (dd, *J*=7,8, 1,0 Hz, 1 H) 8,2 (dd, *J*=8,1, 1,3 Hz, 1 H).

[00204] Paso 5B: El acoplamiento de Suzuki de 4,4,5,5-tetrametil-2-[4-(2-nitro-benciloxi)-fenil]-[1,3,2]dioxaborolano con éster terc-butílico del ácido D-2-(4-bromo-bencensulfonilamino)-3-metil-butírico fue realizado de acuerdo con los procedimientos del Paso 5B para el Ejemplo 3.32 para dar éster terc-butílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(2-nitro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico, con un rendimiento del 20%. 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,8 (dd, *J*=30,1, 6,8 Hz, 6 H) 1,1 (s, 9 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (d, *J*=5,6 Hz, 1 H) 5,4 (s, 2 H) 7,0 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H)

7,5 (m, 1 H) 7,5 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H) 7,6 (m, 3 H) 7,8 (d, *J*=8,6 Hz, 3 H) 8,1 (dd, *J*=8,1, 1,3 Hz, 1 H).

[00205] Paso 5C: La extracción del éster t-butílico se hizo de acuerdo con los procedimientos del Paso 5C para el Ejemplo 3.32, con rendimiento cuantitativo. 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,8 (dd, J=24,3, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 3,6 (d, J=5,8 Hz, 1 H) 5,4 (s, 2 H) 7,0 (d, J=8,6 Hz, 2 H) 7,5 (t, J=7,7 Hz, 1 H) 7,6 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,7 (m, 3 H) 7,8 (m, 3 H) 8,1 (d, J=9,6 Hz, 1 H).

Ejemplo 3.38



Ácido D-2-[4'-(2-cloro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

[00206] El compuesto del título, ácido D-2-[4'-(2-cloro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.32.

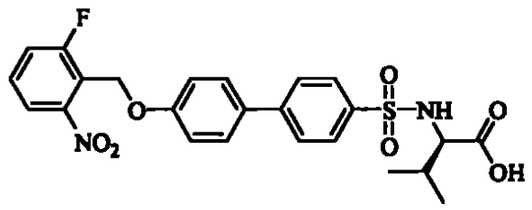
[00207] Paso 5A: El acoplamiento de bromuro de 2-clorobencilo con éster 4-hidroxifenil-borónico para obtener 2-[4-(2-cloro-benciloxi)-fenil]-4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano se hizo de acuerdo con los procedimientos en el Paso 5A para el Ejemplo 2A. Rendimiento: 85%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 1,3 (s, 12 H) 5,2 (s, 2 H) 7,0 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,4 (m, 2 H) 7,5 (m, 1 H) 7,6 (m, 1 H) 7,6 (d, J=8,8 Hz, 2 H).

[00208] Paso 5B: El acoplamiento de 2-[4-(2-cloro-benciloxi)-fenil]-4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano con éster metílico del ácido D-2-(4-bromo-bencenesulfonilamino)-3-metil-butírico para obtener éster metílico del ácido D-2-[4'-(2-cloro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico de acuerdo con los procedimientos del Paso 5B para el Ejemplo 3.32. Rendimiento: 73%. 1H RMN (400

MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=15,4, 6,6 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,3 (s, 3 H) 3,6 (dd, J=9,3, 7,1 Hz, 1 H) 5,2 (s, 2 H) 7,2 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,4 (m, 2 H) 7,5 (m, 1 H) 7,6 (m, 1 H) 7,7 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (d, J=8,6 Hz, 2 H) 7,8 (m, 2 H) 8,3 (d, J=9,3 Hz, 1 H).

[00209] Paso 5C: La hidrólisis del éster metílico del ácido D-2-[4'-(2-cloro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico a ácido D-2-[4'-(2-cloro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se hizo de acuerdo con procedimientos en el Paso 5C para el Ejemplo 3.32. Rendimiento: 55%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=12,6, 6,8 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, J=9,2, 5,9 Hz, 1 H) 5,2 (s, 2 H) 7,2 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,4 (m, 2 H) 7,5 (m, 1 H) 7,6 (m, 1 H) 7,7 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (s, 4 H) 8,0 (d, J=9,3 Hz, 1 H) 12,6 (s, 1 H).

Ejemplo 3.39



Ácido D-2-[4'-(2-fluoro-6-nitro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

[00210] El compuesto del título, ácido D-2-[4'-(2-fluoro-6-nitro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.32.

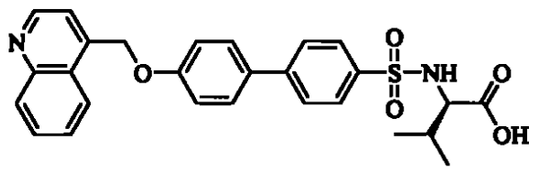
[00211] Paso 5A: El acoplamiento del bromuro de 2-fluoro-6-nitrobencilo con éster 4-hicroxifenil borónico para obtener 2-[4-(2-fluoro-6-nitro-benciloxi)-fenil]-4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano se hizo de acuerdo con procedimientos en el Paso 5A para el Ejemplo 3.32. Rendimiento: 95%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 1,3 (s, 12 H) 5,3 (d, J=1,3 Hz, 2 H) 7,0 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,6 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,7 (m, 2 H) 7,9 (m, 1 H).

000239 166

[00212] Paso 5B: El acoplamiento de 2-[4-(2-fluoro-6-nitro-benciloxi)-fenil]-4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano con éster metílico del ácido D-2-(4-bromo-bencensulfonilamino)-3-metil-butírico para obtener éster metílico del ácido D-2-[4'-(2-fluoro-6-nitro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se hizo de acuerdo con procedimientos en el Paso 5B para el Ejemplo 3.32. Rendimiento: 49%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=15,2, 6,8 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,3 (s, 3 H) 3,6 (dd, J=9,5, 7,2 Hz, 1 H) 5,4 (d, J=1,3 Hz, 2 H) 7,1 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (m, 6 H) 7,8 (m, 2 H) 7,9 (m, 1 H) 8,3 (m, J=9,3 Hz, 1 H).

[00213] Paso 5C: La hidrólisis del éster metílico del ácido D-2-[4'-(2-fluoro-6-nitro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico a ácido D-2-[4'-(2-fluoro-6-nitro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se hizo de acuerdo con procedimientos en el Paso 5C para el Ejemplo 3.32, excepto por la purificación mediante prep-CLAR. Rendimiento: 30%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=12,9, 6,8 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, J=9,2, 5,9 Hz, 1 H) 5,4 (d, J=1,3 Hz, 2 H) 7,1 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,7 (m, 4 H) 7,8 (d, J=0,8 Hz, 4 H) 7,9 (m, 2 H) 8,0 (d, J=9,1 Hz, 1 H).

Ejemplo 3.40



Ácido D-3-metil-2-[4'-(quinolín-4-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

[00214] El compuesto del título, ácido D-3-metil-2-[4'-(quinolín-4-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.32.

[00215] Paso 5A: El acoplamiento de 4-clorometil-quinolina con éster 4-hidroxifenil borónico para obtener 4-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-fenoximetil]-quinolina se hizo de acuerdo con procedimientos en el Paso 5A para el Ejemplo 3.32. Rendimiento: 62%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 1,3 (s, 12 H) 5,7 (d,

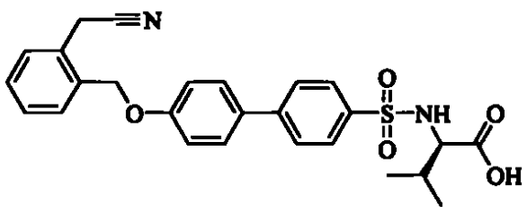
000287 740

J=0,5 Hz, 2 H) 7,1 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,7 (m, 4 H) 7,8 (m, 1 H) 8,1 (dd, J=8,5, 0,9 Hz, 1 H) 8,2 (d, J=8,3 Hz, 1 H) 8,9 (d, J=4,5 Hz, 1 H).

[00216] Paso 5B: El acoplamiento de 4-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-fenoximetil]-quinolina con éster metílico del ácido D-2-(4-bromo-bencensulfonilamino)-3-metil-butírico para obtener éster metílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(quinolín-4-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se hizo de acuerdo con procedimientos en el Paso 5B para el Ejemplo 3.32. Rendimiento: 47%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=15,2, 6,8 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,3 (s, 3 H) 3,6 (dd, J=9,3, 7,1 Hz, 1 H) 5,8 (s, 2 H) 7,3 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (m, 9 H) 8,1 (d, J=8,6 Hz, 1 H) 8,2 (d, J=8,6 Hz, 1 H) 8,3 (d, J=9,3 Hz, 1 H) 8,9 (d, J=4,3 Hz, 1 H).

[00217] Paso 5C: La hidrólisis del éster metílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(quinolín-4-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico a ácido D-3-metil-2-[4'-(quinolín-4-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se hizo de acuerdo con procedimientos en el Paso 5C para el Ejemplo 3.32. Rendimiento: 54%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=43,6, 6,9 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 3,0 (d, J=3,0 Hz, 1 H) 5,8 (d, 2 H) 7,3 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,7 (m, 4 H) 7,8 (m, 5 H) 8,1 (m, 1 H) 8,2 (dd, J=8,3, 0,8 Hz, 1 H) 8,9 (d, J=4,5 Hz, 1 H).

Ejemplo 3.41



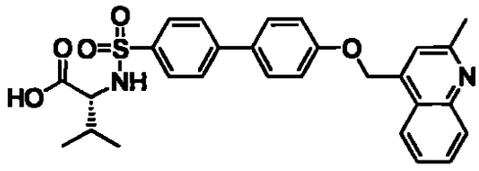
Ácido D-2-[4'-(2-cianometil-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

[00218] El compuesto del título, ácido D-3-metil-2-[4'-(quinolín-4-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.32.

[00219] Paso 5C: La hidrólisis del éster metílico del ácido D-2-[4'-(2-cianometil-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico (preparado de acuerdo con el paso 3) a ácido D-2-[4'-(2-cianometil-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se hizo de acuerdo con procedimientos en el Paso 5C para el Ejemplo 3.32. Se usó prep-CLAR para la purificación. Rendimiento: 75%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=23,7, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 2,8 (d, J=6,6 Hz, 1 H) 4,1 (s, 2 H) 5,2 (s, 2 H) 7,2 (d, J=9,1 Hz, 2 H) 7,4 (m, 2 H) 7,5 (m, 1 H) 7,6 (m, 1 H) 7,7 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (d, J=2,0 Hz, 4 H).

[00220] Los ejemplos 3.42, 3.43, 3.44, 3.45, 3.46, 3.47, 3.48 y 3.49 se prepararon en base al Esquema 6.

Ejemplo 3.42

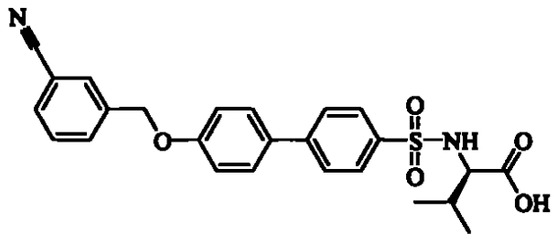


Ácido D-3-metil-2-[4'-(2-metil-quinolín-4-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

[00221] Paso: Una mezcla de 4-clorometil-2-metilquinolina (165 mg; 0,86 mmol; 1 equivalente), éster metílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico (314 mg; 0,86 mmol; 1 equivalente) y K_2CO_3 (270 mg; 1,13 mmol; 1,3 equivalente) en 8 ml de DMF bajo nitrógeno se calentó a 90°C durante 12 horas. Después del proceso y cromatografía de columna (EtOAc al 30-60% en hexano) se obtuvo éster metílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(2-metilquinolín-4-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico con un rendimiento del 34% (150 mg). 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, *J*=15,0, 6,7 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 2,7 (s, 3 H) 3,3 (s, 3 H) 3,6 (dd, *J*=9,2, 7,2 Hz, 1 H) 5,7 (s, 2 H) 7,3 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H) 7,6 (m, 2 H) 7,8 (m, 4 H) 7,8 (m, 2 H) 8,0 (d, *J*=9,3 Hz, 1 H) 8,1 (d, *J*=8,3 Hz, 1 H) 8,1 (ninguno H) 8,3 (d, *J*=9,6 Hz, 1 H).

[00222] Paso 6B: El éster metílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(2-metilquinolín-4-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico (150 mg) se disolvió en THF (8 ml) y MeOH (4 ml) y se añadió con LiOH 1N (3 ml, 3 mmol). La solución obtenida se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se completó según determinación de CCD. Los disolventes se extrajeron y se procesaron regularmente, se realizó cromatografía de columna para obtener 148 mg de rendimiento cuantitativo. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=31,8, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 2,7 (s, 3 H) 3,2 (s, 1 H) 5,7 (s, 2 H) 7,3 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,6 (m, 2 H) 7,8 (m, 7 H) 8,0 (d, J=7,6 Hz, 1 H) 8,1 (d, J=6,8 Hz, 1 H).

Ejemplo 3.43



Ácido D-2-[4'-(3-ciano-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

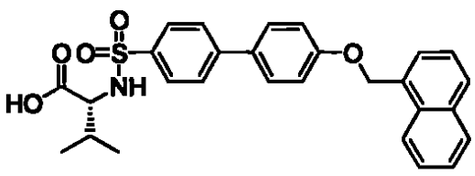
[00223] El compuesto del título, ácido D-2-[4'-(3-ciano-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.42.

[00224] Paso 6A: El acoplamiento de α-bromo-m-tolunitrilo con el éster metílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico para obtener el éster metílico del ácido D-2-[4'-(3-ciano-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se realizó de acuerdo con procedimientos en el Paso 6A para el Ejemplo 3.42. Rendimiento: 25%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=14,9, 6,8 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,3 (s, 3 H) 3,6 (dd, J=9,5, 7,2 Hz, 1 H) 5,3 (s, 2 H) 7,2 (d, J=9,1 Hz, 2 H) 7,6 (t, J=8,0 Hz, 1 H) 7,7 (m, 4 H) 7,8 (m, 4 H) 8,0 (s, 1 H) 8,3 (d, J=9,3 Hz, 1 H).

[00225] Paso 6B: La hidrólisis del éster metílico del ácido D-2-[4'-(3-ciano-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico a ácido D-2-[4'-(3-ciano-benciloxi)-bifenil-

4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se hizo de acuerdo con procedimientos en el Paso 6B para el Ejemplo 3.42. Rendimiento: 24%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=26,0, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 2,7 (s, 1 H) 5,2 (s, 2 H) 7,2 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,6 (d, J=7,6 Hz, 1 H) 7,7 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (m, 6 H) 8,0 (s, 1 H).

[00226] Ejemplo 3.44



Ácido D-3-metil-2-[4'-(naftalen-1-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

[00227] El compuesto del título, ácido D-3-metil-2-[4'-(naftalen-1-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.42.

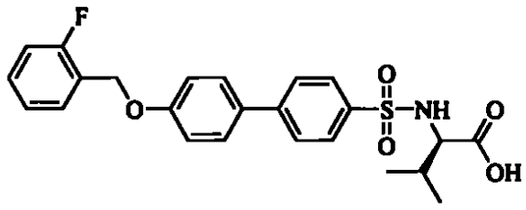
[00228] Paso 6A: La alquilación de 1-clorometil-naftaleno con el éster metílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos en el Paso 6A para el Ejemplo 3.42 para dar éster metílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(naftalén-1-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico con un rendimiento del 34%. 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,9 (dd, *J*=32,3, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 3,4 (s, 3 H) 3,8 (dd, *J*=10,1, 5,1 Hz, 1 H) 5,1 (d, *J*=10,1 Hz, 1 H) 5,6 (s, 2 H) 7,2 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H) 7,5 (dd, *J*=8,2, 6,9 Hz, 1 H) 7,6 (m, 4 H) 7,6 (d, *J*=6,6 Hz, 1 H) 7,7 (d, *J*=8,6 Hz, 2 H) 7,9 (m, 4 H) 8,1 (dd, *J*=8,5, 1,4 Hz, 1 H).

[00229] Paso 6B: La hidrólisis del éster metílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(naftalén-1-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se realizó de acuerdo con los procedimientos del Paso 6B para el Ejemplo 3.42 con rendimiento cuantitativo. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=15,4, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 3,5 (s,

000247

1 H) 5,6 (s, 2 H) 7,2 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,6 (m, 3 H) 7,7 (m, 3 H) 7,8 (d, J=2,8 Hz, 4 H) 8,0 (m, 3 H) 8,1 (m, 1 H).

Ejemplo 3.45



Ácido D-2-[4'-(2-fluoro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

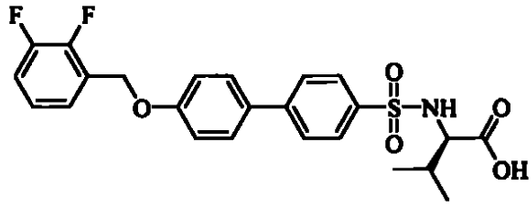
[00230] El compuesto del título, ácido D-2-[4'-(2-fluoro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.42.

[00231] Paso 6A: El acoplamiento del bromuro de 2-fluorobencilo con el éster metílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico para obtener el éster metílico del ácido D-2-[4'-(2-fluoro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se realizó de acuerdo con procedimientos en el Paso 6A para el Ejemplo 3.42. Rendimiento: 47%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=15,2, 6,8 Hz, 6 H) 1,9 (dd, 1 H) 3,3 (s, 3 H) 3,6 (dd, J=9,3, 7,1 Hz, 1 H) 5,2 (s, 2 H) 7,2 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,3 (m, 2 H) 7,4 (m, 1 H) 7,6 (m, 1 H) 7,7 (m, 4 H) 7,8 (m, 2 H) 8,3 (d, J=9,3 Hz, 1 H).

[00232] Paso 6B: La hidrólisis del éster metílico del ácido D-2-[4'-(2-fluoro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico a ácido D-2-[4'-(2-fluoro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se hizo de acuerdo con procedimientos en el Paso 6B para el Ejemplo 3.42. Rendimiento: 67%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=43,7, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 2,9 (d, J=2,8 Hz, 1 H) 5,2 (s, 2 H) 6,8 (s, 1 H) 7,2 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,3 (m, 2 H) 7,4 (m, 1 H) 7,6 (m, 1 H) 7,7 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (s, 4 H).

[00233] Ejemplo 3.46

172
000242 2/45



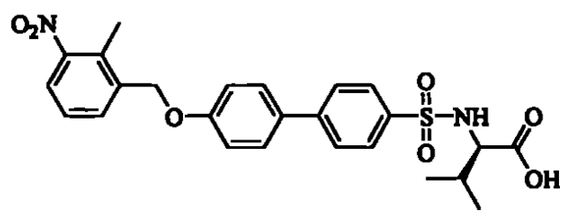
Ácido D-2-[4'-(2,3-difluoro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

[00234] El compuesto del título, ácido D-2-[4'-(2,3-difluoro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.42.

[00235] Paso 6A: El acoplamiento del bromuro de 2,3-difluorobencilo con el éster metílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico para obtener el éster metílico del ácido D-2-[4'-(2,3-difluoro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se realizó de acuerdo con procedimientos en el Paso 6A para el Ejemplo 3.42, pero a temperatura ambiente durante 16 horas. Rendimiento: 42%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm (s, 2 H) 7,2 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,3 (m, 1 H) 7,5 (m, 2 H) 7,7 (m, 4 H) 7,8 (m, 2 H) 8,3 (d, J=9,3 Hz, 1 H).

[00236] Paso 6B: La hidrólisis del éster metílico del ácido D-2-[4'-(2,3-difluoro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico a ácido D-2-[4'-(2,3-difluoro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se hizo de acuerdo con procedimientos en el Paso 6B para el Ejemplo 3.42. Rendimiento: 63%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=12,4, 6,8 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, J=9,3, 6,1 Hz, 1 H) 5,3 (s, 2 H) 7,2 (d, J=9,1 Hz, 2 H) 7,3 (m, 1 H) 7,5 (m, 2 H) 7,7 (d, J=9,1 Hz, 2 H) 7,8 (d, J=1,8 Hz, 4 H) 8,0 (d, J=9,3 Hz, 1 H) 12,6 (s, 1 H).

[00237] Ejemplo 2P



Ácido D-3-metil-2-[4'-(2-metil-3-nitro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

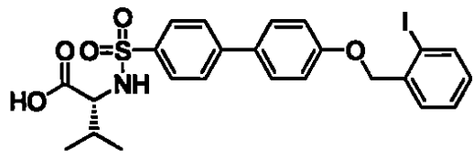
000248 173

[00238] El compuesto del título, ácido D-3-metil-2-[4'-(2-metil-3-nitro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.42.

[00239] Paso 6A: El acoplamiento del bromuro de 2-metil-3-nitrobencilo con el éster metílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico para obtener el éster metílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(2-metil-3-nitro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se realizó de acuerdo con procedimientos en el Paso 6A para el Ejemplo 3.42, pero a temperatura ambiente durante 16 horas. El producto se purificó aun más mediante recristalización (EtOAc / hexano). Rendimiento: 26%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=15,2, 6,8 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 2,4 (s, 3 H) 3,3 (s, 3 H) 3,6 (m, 1 H) 5,3 (s, 2 H) 7,2 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,5 (t, J=7,8 Hz, 1 H) 7,8 (m, 8 H) 8,3 (d, J=9,3 Hz, 1 H).

[00240] Paso 6B: La hidrólisis del éster metílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(2-metil-nitro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico a ácido D-3-metil-2-[4'-(2-metil-3-nitro-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se hizo de acuerdo con procedimientos en el Paso 6B para el Ejemplo 3.42. Rendimiento: 33%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=12,4, 6,8 Hz, 6 H) 1,9 (dd, 1 H) 3,5 (dd, J=9,3, 6,1 Hz, 1 H) 5,3 (s, 2 H) 7,2 (d, J=9,1 Hz, 2 H) 7,3 (m, 1 H) 7,5 (m, 2 H) 7,7 (d, J=9,1 Hz, 2 H) 7,8 (d, J=1,8 Hz, 4 H) 8,0 (d, J=9,3 Hz, 1 H) 12,6 (s, 1 H).

[00241] Ejemplo 3.48



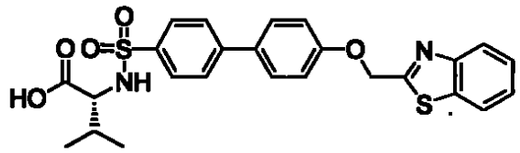
Ácido D-2-[4'-(2-yodo-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

[00242] El compuesto del título, ácido D-2-[4'-(2-yodo-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.42.

[00243] Paso 6A: La alquilación de 1-clorometil-2-yodo-benceno con el éster metílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos en el Paso 6A para el Ejemplo 3.42 para dar éster metílico del ácido D-2-[4'-(2-yodo-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico con un rendimiento del 55%. 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, *J*=15,3, 6,7 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,3 (s, 3 H) 3,6 (dd, *J*=9,5, 7,2 Hz, 1 H) 7,1 (m, 3 H) 7,5 (m, 1 H) 7,6 (m, 1 H) 7,7 (m, 4 H) 7,8 (m, 2 H) 7,9 (dd, *J*=8,0, 1,1 Hz, 1 H) 8,3 (d, *J*=9,3 Hz, 1 H).

[00244] Paso 6B: La hidrólisis del éster metílico del ácido D-2-[4'-(2-yodo-benciloxi)-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se realizó de acuerdo con los procedimientos del Paso 6A para el Ejemplo 3.42 con rendimiento cuantitativo. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=12,1, 6,8 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, J=9,3, 6,1 Hz, 1 H) 5,1 (s, 2 H) 7,1 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,5 (m, 1 H) 7,6 (d, J=7,6 Hz, 1 H) 7,7 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (s, 4 H) 7,9 (dd, J=7,8, 1,3 Hz, 1 H) 8,0 (d, J=9,3 Hz, 1 H).

[00245] Ejemplo 3.49



Ácido D-2- [4'-(benzotiazol-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

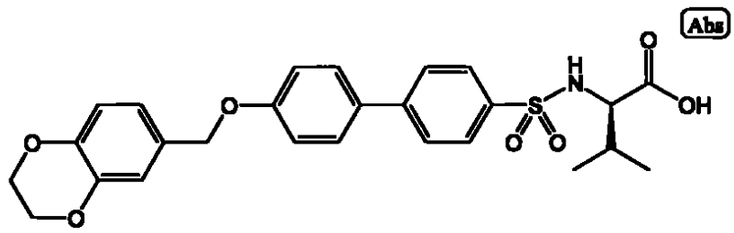
[00246] El compuesto del título, ácido D-2- [4'-(benzotiazol-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.42.

[00247] Paso 6A: La alquilación de 2-bromometil-benzotiazol con el éster metílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos en el Paso 6A para el Ejemplo 3.42 para dar éster metílico del ácido D-2-[4'-(benzotiazol-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico con un rendimiento del 20%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, *J*=15,0, 6,7 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,6 (dd, *J*=9,5, 7,2 Hz, 1 H) 5,7 (s, 2 H) 7,2 (m, *J*=8,8 Hz, 2 H) 7,5 (m, 1 H) 7,6 (m, 1 H) 7,7 (m, 4 H) 7,8 (m, 2 H) 8,0 (d, *J*=7,3 Hz, 1 H) 8,1 (d, *J*=7,8 Hz, 1 H) 8,3 (d, *J*=9,6 Hz, 1 H).

[00248] Paso 6B: La hidrólisis del éster metílico del ácido D-2-[4'-(benotiazol-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se realizó de acuerdo con los procedimientos del Paso 6B para el Ejemplo 3.42 con rendimiento cuantitativo. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=12,4, 6,8 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, J=9,3, 5,8 Hz, 1 H) 5,7 (s, 2 H) 7,2 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,5 (m, 1 H) 7,6 (m, 1 H) 7,7 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (d, J=2,3 Hz, 4 H) 8,0 (dd, J=9,1, 4,5 Hz, 2 H) 8,1 (d, J=8,6 Hz, 1 H). 97%.

[00249] Los Ejemplos 3.50, 3.51, 3.52, 3.53, 3.54, 3.55 y 3.56 se prepararon en base al Esquema 6B.

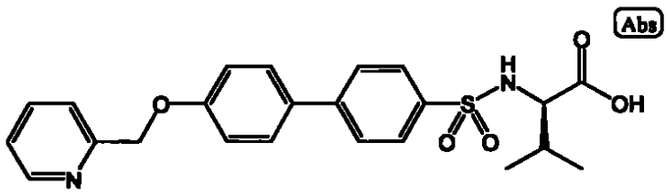
Ejemplo 3.50



Ácido 2-[4'-(2,3-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,778(d, 3H), 0,845(d, 3H), 1,99(dd, 1H), 3,17(bs, 1H), 4,24(s, 4H), 5,04(s, 2H), 6,91(m, 3H), 7,10(d, 2H), 7,68(d, 2H); ES^+ m/z 496,0 (M-H); HRMS (C26H27NO7S): calculado; 520,14004 ; hallado; 520,13995 (M+Na).

Ejemplo 3.51

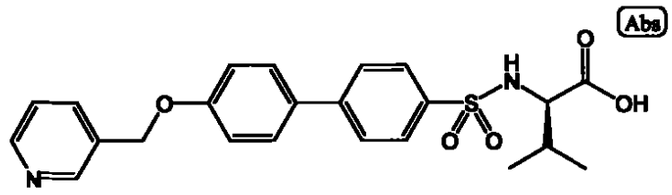


Ácido 3-metil-2-[4'-(piridín-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,800(d, 3H), 0,803(d, 3H), 1,94(m, 1H), 3,51(bs, 1H), 5,25(s, 2H), 7,15(d, 2H), 7,36(m, 1H), 7,54(d, 2H), 7,71(d, 2H), 7,83(m, 3H), 8,59(d, 2H);

ES^+ m/z 441,2 (M+H); HRMS (C23H24N2O5S): calculado; 440,14004; hallado; 440,14037 (M+H).

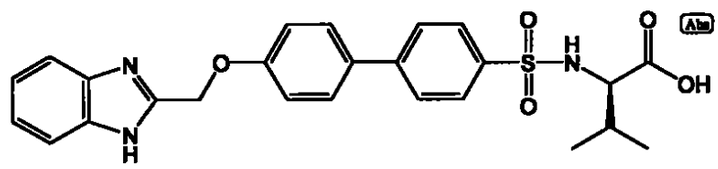
Ejemplo 3.52



Ácido 3-metil-2-[4'-(piridín-3-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

^1H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,800(d, 3H), 0,803(d, 3H), 1,95(m, 1H), 3,49(bs, 1H), 5,23(s, 2H), 7,16(d, 2H), 7,45(m, 1H), 7,71(d, 2H), 7,80(m, 3H), 7,90(d, 2H), 8,56(d, 1H), 8,70(bs, 1H); ES^+ m/z 441,1 (M+H); HRMS (C23+H24N2O5S): calculado; 441,14787; hallado; 441,14617 (M+H).

Ejemplo 3.53

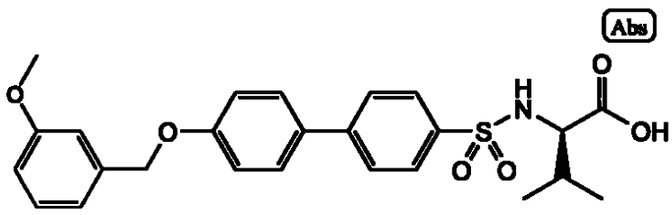


Ácido 2-[4'-(1H-benzoimidazol-2-iloximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

[00250] ^1H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,802(d, 3H), 0,833(d, 3H), 1,94(m, 1H), 3,54(m, 1H), 5,51(s, 2H), 6,88(d, 2H), 7,24(d, 1H), 7,34(m, 1H), 7,58(d, 2H), 7,66(m, 1H), 7,78(m, 4H), 8,03(d, 1H); ES^+ m/z 480,1 (M+H); HRMS (C25H25N3O5S): calculado; 480,15877; hallado; 480,15787 (M+H).

000247

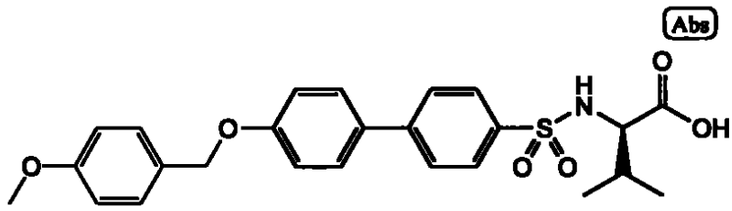
Ejemplo 3.54



Ácido 2-[4'-(3-metoxi-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,804(d, 3H), 0,835(d, 3H), 1,95(m, 1H), 3,54(m, 1H), 3,77(s, 3H), 5,15(s, 2H), 6,89(m, 2H), 7,04(m, 2H), 7,13(m, 2H), 7,32(m, 1H), 7,58(d, 1H), 7,69(d, 2H), 7,80(m, 1H), 8,01(d, 1H); ES$^+$ m/z 470,1 (M+H); HRMS (C25H27NO6S): calculado; 470,16319; hallado; 470,16183 (M+H).

[00251] Ejemplo 3.55

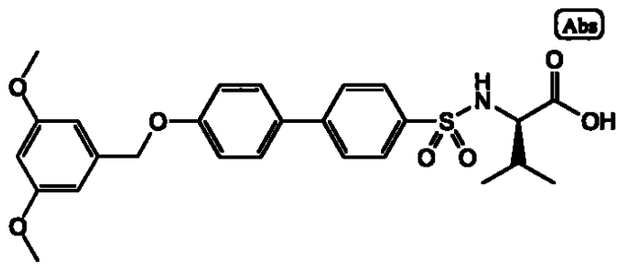


Ácido 2-[4'-(4-metoxi-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

[00252] ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,805(d, 3H), 0,836(d, 3H), 1,94(m, 1H), 3,54(m, 1H), 3,76(s, 3H), 5,09(s, 2H), 6,96(d, 2H), 7,12(d, 2H), 7,40(d, 2H), 7,69(d, 2H), 7,80(s, 3H), 8,01(d, 1H); ES$^+$ m/z 468,2 (M-H); HRMS (C25H27NO6S): calculado; 470,16319; hallado; 470,16248 (M+H).

.. 000248 251 120

Ejemplo 3.56

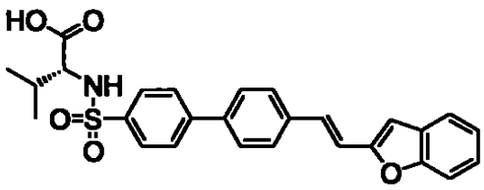


Ácido 2-[4'-(3,5-dimetoxi-benciloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,804(d, 3H), 0,835(d, 3H), 1,95(m, 1H), 3,55(m, 1H), 3,75(s, 6H), 5,11(s, 2H), 6,45(bs, 1H), 6,62(bs, 2H), 7,12(d, 2H), 7,70(d, 2H), 7,80(s, 3H), 8,01(d, 1H); ES^+ m/z 498,2 (M-H); HRMS (C26H29NO7S): calculado; 500,17375; hallado; 500,17223 (M+H).

[00253] El Ejemplo 3.57 se preparó en base al Esquema 7.

Ejemplo 3.57



Éster terc-butílico del ácido 3-metil-2-[4'-vinil-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

[00254] Paso 7A: El ácido 4-vinilfenilborónico (1,89 g; 12,7 mmol; 1 equivalente) y el éster terc-butílico del ácido 2-(4-bromo-bencensulfonilamino)-3-metil-butírico (5 g; 12,7 mmol; 1 equivalente) se disolvieron en éter dimetílico de etilenglicol (180 ml) y se añadieron con $Pd(Ph_3)_4$ (736,0 mg; 0,64 mmol) y agitaron a temperatura ambiente por 20 minutos. A continuación, la mezcla de la reacción se introdujo en solución acuosa de K_2CO_3 (3,52 g; 25,5 mmol; 2 equivalentes) y se calentó a reflujo durante la noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó y se sometió al residuo a partición entre EtOAc y H_2O. La capa orgánica se lavó con salmuera, se desecó sobre $MgSO_4$, se purificó por cromatografía de columna (gel de sílice, EtOAc al 10% / Hexano) y se obtuvo 808 mg de G9058-169 con un rendimiento del 15,2%.

[00255] ^{1}H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,80 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,95 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,12 (s, 9 H) 1,99 (m, 1 H) 3,59 (dd, *J*=9,85, 4,55 Hz, 1 H) 5,06 (d, *J*=10,11 Hz, 1 H) 5,25 (d, *J*=10,86 Hz, 1 H) 5,75 (d, *J*=16,93 Hz, 1 H) 6,70 (m, 1 H) 7,45 (m, 4 H) 7,61 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,82 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H).

[00256] Paso 7B: Se colocaron el éster terc-butílico del ácido 3-metil-2-(4'-vinil-bifenil-4-sulfonilamino)-butírico (300 mg; 0,72 mmol; 1,2 equivalentes), $Pd_2(dba)_3$ (11 mg; 0,012 mmol; 0,02 equivalentes), tetrafluoroborato de tri-t-butilfosfonio (14 mg; 0,048 mmol; 0,08 equivalentes) y dioxano (1,5 ml) en tubo de microondas bajo N_2. Se inyectaron 2-bromo-1-benzofurano (118 mg; 0,6 mmol; 1 equivalente) y diciclohexil metilamina (0,15 ml; 0,72 mmol; 1,2 equivalentes). Luego se irradió la mezcla en reactor de microondas a 180°C durante 30 minutos. A continuación, se particionó entre EtOAc y H_2O y la capa orgánica se desecó sobre $MgSO_4$. Se purificó el residuo crudo por cromatografía de columna (gel de sílice, EtOAc al 20% / hexano) para dar 80 mg de éster terc-butílico del ácido 2-[4'-(2-benzofurán-2-il-vinil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico (G9058-171) con un rendimiento del 25%.

[00257] ^{1}H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,80 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,96 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,14 (s, 9 H) 2,01 (m, 1 H) 3,60 (dd, *J*=9,98, 4,42 Hz, 1 H) 5,07 (d, *J*=9,85 Hz, 1 H) 6,66 (s, 1 H) 7,01 (d, *J*=15,92 Hz, 1 H) 7,14 (m, 1 H) 7,25 (m, 2 H) 7,42 (d, *J*=8,08 Hz, 1 H) 7,52 (m, 5 H) 7,64 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,84 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H).

[00258] Paso 7C: Se añadió éster *terc*-butílico del ácido 2-[4'-(2-benzofurán-2-il-vinil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico (80 mg) en dicloroetano (4,5 ml) a TFA (1,5 ml) y se agitó a temperatura ambiente. La reacción se completó al cabo de 3 horas, según determinación de CCD. Después de extraer el disolvente, el residuo crudo se purificó por cromatografía de columna (MeOH al 5-10% / CH_2Cl_2) para dar 22 mg de ácido 2-[4'-(2-benzofurán-2-il-vinil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico, G9058-172 con un rendimiento del 30,7%.

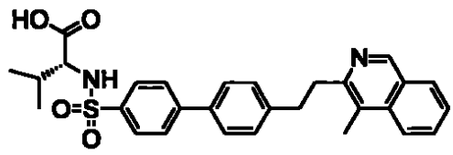
[00259] 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,79 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,86 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,23 (s, 2 H) 2,02 (m, 1 H) 3,18 (m, 1 H) 7,01 (s, 1 H) 7,25 (t, *J*=7,07 Hz, 1

000250 2/3

H) 7,33 (m, 1 H) 7,38 (d, *J*=14,65 Hz, 1 H) 7,59 (d, *J*=8,08 Hz, 1 H) 7,64 (d, *J*=8,08 Hz, 1 H) 7,79 (d, *J*=6,57 Hz, 4 H) 7,83 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,90 (m, 2 H).

[00260] El Ejemplo 3.58 se preparó en base al Esquema 8.

Ejemplo 3.58



N-({4'-[2-4-metilisoquinolín-3-il)etil]-1,1'-bifenil-4-il}sulfonil)-D-valina

[00261] Paso 8A. Se disolvieron éster *terc*-butílico del ácido 2-(4-bromo-bencensulfonilamino)-3-metil-butírico (10,65 g; 27,1 mmol; 1 equivalente), 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenol (5,97 g; 27,1 mmol; 1 equivalente), $Pd(PPh_3)_4$ (1,57 g; 1,4 mmol; 0,05 equivalente) en éter dimetílico de etilenglicol (210 ml) en atmósfera de N_2 y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se introdujo K_2CO_3 (7,5 g; 54,3 mmol; 2 equivalentes) en H_2O (70 ml) a la mezcla de la reacción y se calentó a reflujo durante la noche. La reacción se completó según determinación de CCD. El disolvente se extrajo por rotovap y el residuo se particionó entre diclorometano y salmuera. La capa orgánica se desecó sobre $MgSO_4$, se extrajo el disolvente, el material crudo se purificó por cromatografía de columna (gel de sílice, EtOAc al 30% / n-hexano) para dar 7,1 g de éster terc-butílico del ácido 2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico con un rendimiento del 65 %.

[00262] 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,79 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,95 (d, *J*=6,57 Hz, 3 H) 1,13 (s, 9 H) 1,51 (s, 1 H) 1,99 (m, 1 H) 3,59 (dd, *J*=10,11, 4,55 Hz, 1 H) 5,06 (d, *J*=9,85 Hz, 1 H) 6,86 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,38 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,55 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,79 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H).

[00263] Paso 8B: Se disolvió éster terc-butílico del ácido 2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico (330 mg; 0,81 mmol) en 20 ml de cloruro de metileno seco y se enfrió a 0°C. Se añadió NaH (83 mg; 60% en aceite; 2,0 mmol; 2,5

equivalentes) en atmósfera de N_2 y la mezcla se agitó durante 15 minutos. Se inyectó anhídrido tríflico (251 mg; 0,89 mmol; 1,1 equivalente) y la mezcla se calentó a temperatura ambiente por 1 hora. La CCD indicó que la reacción se había completado. La mezcla de la reacción se diluyó con cloruro de metileno y se neutralizó con HCl 1N. La mezcla se lavó con agua, salmuera y se desecó sobre $MgSO_4$. Cromatografía de columna regular (EtOAc al 40%/hexano) para dar 314 mg del producto deseado con un rendimiento del 72%.

[00264] 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,87 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,03 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,21 (s, 9 H) 2,01-2,20 (m, 1 H) 3,68 (dd, *J*=9,85, 4,55 Hz, 1 H) 5,18 (d, *J*=10,11 Hz, 1 H) 7,39 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,64 (dd, *J*=13,52, 8,72 Hz, 4 H) 7,93 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H).

[00265] Paso 8C: El tubo de reacción se llenó con triflato (300 mg; 0,56 mmol) del Paso 8B, cloruro de litio (24 mg; 0,56 mmol; 1 equivalente), CuI (11 mg; 0,05 mmol; 10%) y $PdCl_2(PPh_3)_2$ (19,6 mg; 0,028 mmol; 5%) bajo nitrógeno, seguido del añadido de DMF (5 ml). Se inyectó t-butildimetilacetileno (235 mg; 1,68 mmol; 3 equivalentes) y dietilamina (409 mg; 5,6 mmol; 10 equivalentes). Se irradió el tubo en reactor de microondas a 125°C durante 10 minutos. La materia prima se consumió según determinación de CCD. La mezcla se particionó entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica se recogió y se sometió a proceso regular y cromatografía de columna para dar 270 mg del producto acetilénico deseado, terc-butil N-[(4'-{[terc-butil(dimetil)silil]etinil}-1,1'-bifenil-4-il)sulfonil]-D-valinato con un rendimiento del 92%. 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,00 (s, 6 H) 0,66 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,81 (s, 9 H) 0,82 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,98 (s, 9 H) 1,75-1,98 (m, 1 H) 3,46 (dd, *J*=9,85, 4,55 Hz, 1 H) 4,93 (d, *J*=9,85 Hz, 1 H) 7,27-7,32 (m, 2 H) 7,33-7,39 (m, 2 H) 7,47 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,70 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H).

[00266] Paso 8D: Se disolvió terc-butil N-[(4'-{[terc-butil(dimetil)silil]etinil}-1,1'-bifenil-4-il)sulfonil]-D-valinato (600 mg; 1,14 mmol) en THF (8 ml) y se añadió con TBAF (1,7 ml; 1M; 1,7 mmol; 1,5 equivalentes). La solución se agitó a temperatura ambiente durante media hora y la reacción se completó. El disolvente se extrajo y el residuo se purificó con cromatografía de columna (gel de sílice, EtOAc al

20%/hexano). Se aislaron 469 mg del producto terc-butil N-[(4'-etinil-1,1'-bifenil-4-il)sulfonil]-D-valinato con rendimiento cuantitativo. 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,86 (d, *J*=6,82 Hz, 2 H) 1,02 (d, *J*=6,82 Hz, 2 H) 1,20 (s, 9 H) 1,88-2,29 (m, 1 H) 3,17 (s, 1 H) 3,67 (dd, *J*=9,85, 4,55 Hz, 1 H) 5,14 (d, *J*=10,11 Hz, 1 H) 7,52 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,56-7,62 (m, 2 H) 7,67 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,91 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H).

[00267] Paso 8E: Se colocaron terc-butil N-[(4'-etinil-1,1'-bifenil-4-il)sulfonil]-D-valinato (117 mg; 0,28 mmol), 2-cloro-3-metilisoquinolina (60 mg; 0,34 mmol; 1,2 equivalente), CuI (5,3 mg; 0,028 mmol; 10%) y PdCl2(PPh3)2 (9,8 mg; 0,014 mmol; 5%) en un tubo de reacción bajo atmósfera de N_2 y se añadieron con DMF (4 ml) y 10 equivalentes de dietilamina. Se irradió la mezcla a 125°C durante 10 minutos. La reacción se completó según determinación de LCMS. La mezcla se diluyó con EtOAc y se lavó con agua 3 veces, con salmuera una vez, y se desecó sobre $MgSO_4$. Cromatografía de columna (gel de sílice, EtOAc al 30%/hexano) para proporcionar 120 mg del producto deseado, terc-butil N-({4'-[(4-metilisoquinolín-3-il)etinil]-1,1'-bifenil-4-il}sulfonil)-D-valinato con un rendimiento del 76%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,86 (dd, *J*=8,59, 6,82 Hz, 6 H) 1,17 (s, 9 H) 1,94 (m, 1 H) 2,67 (s, 3 H) 3,50 (dd, *J*=10,61, 7,33 Hz, 1 H) 7,62 (t, *J*=7,45 Hz, 1 H) 7,69-7,78 (m, 1 H) 7,80-7,85 (m, 4 H) 7,87 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,90-7,97 (m, 2 H) 8,00 (d, *J*=8,59 Hz, 1 H) 8,20 (d, *J*=9,60 Hz, 1 H) 8,30 (s, 1 H).

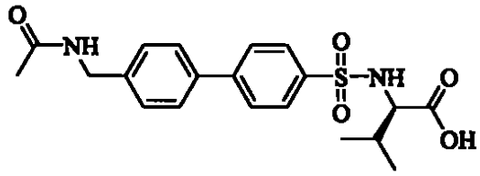
[00268] Paso 8F: Se disolvió terc-butil N-({4'-[(4-metilisoquinolín-3-il)etinil]-1,1'-bifenil-4-il}sulfonil)-D-valinato (46 mg; 0,08 mmol) en 25 ml de metanol y se añadió con cantidad catalítica de Pd/C (8,5 mg; 10% en peso sobre carbono; 0,008 mmol). La hidrogenación se llevó a cabo en una botella agitadora Parr sobre H_2 (50 psi). La reacción se concluyó al cabo de 5 horas y LCMS indicó que la reacción se había completado. La mezcla se filtró a través de Celite y se concentró el producto deseado G8594-178 con rendimiento cuantitativo (46 mg). 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,77-0,93 (m, 6 H) 1,15 (s, 9 H) 1,85-2,06 (m, 1 H) 2,51 (s, 3 H) 3,13-3,28 (m, 2 H) 3,25-3,39 (m, 2 H) 3,47 (d, *J*=8,84 Hz, 1 H) 7,47 (d, *J*=8,08 Hz, 2 H) 7,52 (t, *J*=7,45 Hz, 1 H) 7,59-7,71 (m, 3 H) 7,76-7,90 (m, 4 H) 7,97 (d, *J*=8,34 Hz, 1 H) 8,06 (s, 1 H) 8,15 (s, 1 H).

[00269] Paso 8G: Se disolvió terc-butil N-({4'-[2-(4-metilisoquinolín-3-il)etil]-1,1'-bifenil-4-il}sulfonil)-D-valinato (46 mg; 0,08 mmol) en 5 ml de cloruro de metileno, seguido del añadido de 2,5 ml de TFA. La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 3 horas y la CCD indicó que la reacción se había completado. El disolvente se extrajo por rotavap y el producto se desecó en horno al vacío durante la noche. Se obtuvieron 44 mg del producto N-({4'-[2-(4-metilisoquinolín-3-il)etil]-1,1'-bifenil-4-il}sulfonil-D-valina con un rendimiento del 95%.

[00270] 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,83 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,88 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,80-2,13 (m, 1 H) 2,57 (s, 3 H) 3,15 (t, *J*=7,83 Hz, 2 H) 3,45-3,55 (m, 2 H) 3,60 (d, *J*=5,56 Hz, 1 H) 7,25 (d, *J*=8,08 Hz, 2 H) 7,53 (d, *J*=8,08 Hz, 2 H) 7,65 (d, *J*=8,34 Hz, 2 H) 7,81 (d, *J*=8,59 Hz, 3 H) 7,98 (t, *J*=7,58 Hz, 1 H) 8,02-8,09 (m, 1 H) 8,13 (d, *J*=8,08 Hz, 1 H) 8,83 (s, 1 H).

[00271] El Ejemplo 3.59 se preparó en base al Esquema 9.

Ejemplo 3.59



Ácido D-2-[4'-(acetilamino-metil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

[00272] Paso 9A: Se combinaron ácido 4-aminometil fenil borónico (143 mg; 0,77 mmol; 1 equivalente), éster *terc*-butílico del ácido D-2-(4-bromo-bencensulfonilamino)-3-metil-butírico (300 mg; 0,77 mmol; 1 equivalente), tetrakis de paladio (44 mg; 0,038 mmol; 0,05 equivalentes) en dimetoxietano (10 ml) y se agitaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Se añadió carbonato de potasio (212 mg; 1,53 mmol; 2 equivalentes) en 4 ml de agua a la mezcla de la reacción y se calentó a 88°C por 4 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con acetato de etilo, se lavó con salmuera, se desecó sobre sulfato de magnesio y se agotó hasta sequedad. El residuo se purifica por cromatografía instantánea sobre gel de sílice eluyendo con MeOH al 4-10% en cloruro de metileno con Et_3N al 2% para obtener 200 mg de éster

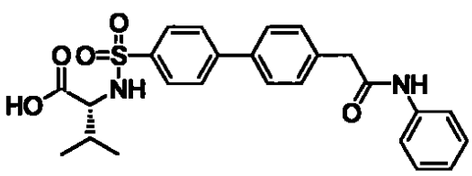
terc-butílico del ácido D-2-(4'-aminometil-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico. Rendimiento: 63%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,9 (dd, J=8,1, 7,1 Hz, 6 H) 1,1 (s, 9 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (d, J=6,3 Hz, 2 H) 3,8 (s, 2 H) 7,5 (d, J=8,3 Hz, 2 H) 7,6 (d, J=8,3 Hz, 2 H) 7,8 (d, J=2,0 Hz, 4 H).

[00273] Paso 9B: Al anhídrido acético (71 ul; 0,75 mmol; 1,05 equivalente) en CH_2Cl_2 (5 ml) se añadió piridina (70 ul; 0,86 mmol; 1,2 equivalente) bajo argón y se agitó por 5 minutos, después de lo cual se añadió éster terc-butílico del ácido D-2-(4'-aminometil-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico (300 mg; 0,72 mmol; 1 equivalente) y se agitó durante 16 horas. Después de procesarse y de cromatografía instantánea de columna se obtuvo éster *terc*-butílico del ácido D-2-[4'-(acetilamino-metil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico. Rendimiento: 32%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=9,1, 6,8 Hz, 6 H) 0,9 (t, J=7,3 Hz, 3 H) 1,2 (s, 9 H) 1,3 (m, 2 H) 1,5 (m, 2 H) 1,9 (m, 1 H) 2,5 (m, 2 H) 3,4 (dd, J=9,6, 6,3 Hz, 1 H) 7,0 (dd, 4 H) 7,1 (m, 2 H) 7,5 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,7 (d, J=9,6 Hz, 1 H) 8,6 (s, 1 H).

[00274] Paso 9C: A una solución de éster *terc*-butílico del ácido D-2-[4'-(acetilamino-metil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico (300 mg; 0,65 mmol) en 6 ml de dicloroetano se añadieron 3 ml de ácido trifluoroacético. La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente por 4 horas y la reacción se completó según determinación de la CCD. Se extrajo el disolvente y el residuo se desecó en horno de vacío para obtener 250 mg de ácido D-2-[4'-(acetilamino-metil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico. Rendimiento: 94%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, *J*=12,5, 6,7 Hz, 6 H) 1,9 (s, 3 H) 2,0 (m, 1 H) 3,6 (dd, *J*=9,3, 5,8 Hz, 1 H) 4,3 (d, *J*=5,8 Hz, 2 H) 7,4 (d, *J*=8,1 Hz, 2 H) 7,7 (d, *J*=8,3 Hz, 2 H) 7,8 (s, 4 H) 8,1 (d, *J*=9,3 Hz, 1 H) 8,4 (t, *J*=5,8 Hz, 1 H) 12,6 (s, 1 H).

[00275] Los Ejemplos 3.60 y 3.61 se prepararon en base al Esquema 10.

Ejemplo 3.60



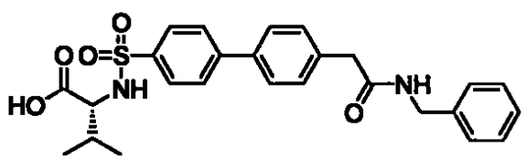
Ácido D-3-metil-2-(4'-fenilcarbamoilmetil-bifenil-4-sulfonilamino)-butírico

[00276] Paso 10A: Se agitó una mezcla de ácido 4-bromofenilacético (1,5 g; 7,0 mmol; 1 equivalente), EDC (2,67 g; 14,0 mmol; 2 equivalentes), DMAP (846 mg; 7,0 mmol; 1 equivalente) y fenilamina (0,765 ml; 8,4 mmol; 1,2 equivalente) en 15 ml de DMF bajo nitrógeno a temperatura ambiente por 3,5 horas. Después de proceso acuoso y recristalización se obtuvo 2-(4-bromofenil)-N-fenil-acetamida con un rendimiento del 69% (1,4 g). 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 3,6 (s, 2 H) 7,0 (m, 1 H) 7,3 (m, 4 H) 7,5 (m, 2 H) 7,6 (dd, *J*=8,7, 1,1 Hz, 2 H) 10,2 (s, 1 H).

[00277] Paso 10B: Una mezcla de 2-(4-bromofenil)-N-fenil-acetamida (107 mg; 0,37 mmol; 1,1 equivalente), éster terc-butílico del ácido D-3-metil-2-(4-tributilestananil-bencensulfonilamino)-butírico (202 mg; 0,34 mmol; 1 equivalente) y $Pd(PPh_3)_4$ (38,5 mg; 0,033 mmol; 0,1 equivalente) en 5 ml de tolueno se calentó a reflujo bajo nitrógeno. La reacción se completó al cabo de 5 horas. El proceso regular y purificación de columna rindió éster terc-butílico del ácido D-3-metil-2-(4'-fenilcarbamoilmetil-bifenil-4-sulfonilamino)-butírico con un rendimiento del 34% (60 mg). 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,9 (dd, *J*=8,3, 6,8 Hz, 6 H) 1,1 (s, 9 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, *J*=9,6, 6,3 Hz, 1 H) 3,7 (s, 2 H) 7,0 (t, *J*=7,3 Hz, 1 H) 7,3 (m, 2 H) 7,5 (d, *J*=8,3 Hz, 2 H) 7,6 (dd, *J*=8,6, 1,0 Hz, 2 H) 7,7 (d, *J*=8,3 Hz, 2 H) 7,8 (d, *J*=2,5 Hz, 4 H) 8,1 (d, *J*=9,6 Hz, 1 H) 10,2 (s, 1 H).

[00278] Paso 10C: La extracción del éster t-butílico del éster terc-butílico del ácido D-3-metil-2-(4'-fenilcarbamoilmetil-bifenil-4-sulfonilamino)-butírico se hizo usando TFA en dicloroetano (1:1). Luego de la evaporación del disolvente se obtuvo ácido D-3-metil-2-(4'-fenilcarbamoilmetil-bifenil-4-sulfonilamino)-butírico con rendimiento cuantitativo. 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,8 (dd, J=27,0, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 3,6 (d, J=5,6 Hz, 1 H) 3,6 (s, 2 H) 7,0 (m, 1 H) 7,2 (m, 2 H) 7,4 (d, J=8,3 Hz, 2 H) 7,5 (dd, J=8,7, 1,1 Hz, 2 H) 7,6 (d, J=8,3 Hz, 2 H) 7,7 (dd, J=48,0, 8,6 Hz, 4 H).

Ejemplo 3.61



Ácido D-2-[4'-(bencilcarbamoil-metil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

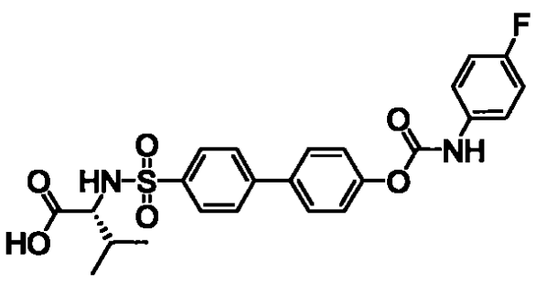
[00279] Paso 10A: Se realizó el acoplamiento de amida del ácido 4-bromofenilacético con bencilamina de acuerdo con los procedimientos del Paso 10A para el Ejemplo 3.60 para dar N-bencil-2-(4-bromo-fenil)-acetamida con un rendimiento del 82%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 3,5 (s, 2 H) 4,3 (d, *J*=5,8 Hz, 2 H) 7,2 (dd, *J*=7,8, 5,6 Hz, 5 H) 7,3 (m, 2 H) 7,5 (d, *J*=8,3 Hz, 2 H) 8,6 (t, *J*=5,9 Hz, 1 H).

[00280] Paso 10B: Se realizó acoplamiento de Stille de N-bencil-2-(4-bromo-fenil)-acetamida con éster terc-butílico del ácido D-3-metil-2-(4-tributilestananil-bencensulfonilamino)-butírico de acuerdo con los procedimientos en el Paso 10B para el Ejemplo 3.60 para dar éster terc-butílico del ácido D-2-[4'-(bencilcarbamoil-metil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico con un rendimiento del 31%. 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,9 (d, *J*=6,8 Hz, 3 H) 1,0 (d, *J*=6,6 Hz, 3 H) 1,2 (s, 9 H) 2,1 (m, 1 H) 3,7 (m, 3 H) 4,5 (d, *J*=5,8 Hz, 2 H) 5,1 (d, *J*=9,9 Hz, 1 H) 5,7 (s, 1 H) 7,3 (m, 5 H) 7,4 (d, *J*=8,1 Hz, 2 H) 7,5 (d, *J*=8,3 Hz, 2 H) 7,7 (d, *J*=8,3 Hz, 2 H) 7,9 (d, *J*=8,3 Hz, 2 H).

[00281] Paso 10C: La extracción del éster t-butílico se hizo de acuerdo con los procedimientos del Paso 10C para el Ejemplo 3.60 con rendimiento cuantitativo. 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,8 (dd, J=26,3, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 3,5 (s, 2 H) 3,6 (d, J=5,6 Hz, 1 H) 4,3 (d, J=5,6 Hz, 2 H) 7,2 (m, 5 H) 7,3 (d, J=8,3 Hz, 2 H) 7,5 (d, J=8,3 Hz, 2 H) 7,7 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 8,5 (s, 1 H).

[00282] Los Ejemplos 3.62, 3.63, 3.64, 3.65, 3.66, 3.67, 3.68, 3.69, 3.70, 3.71, 3.72, 3.73, 3.74, 3.75, 3.76, 3.77, 3.78, 3.79 y 3.80 se prepararon en base al Esquema 11.

Ejemplo 3.62



000257/60

Ácido 2-[4'-(4-fluoro-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

[00283] Paso 11A: Se disolvió éster *terc*-butílico del ácido 2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico (300 mg; 0,74 mmol; 1 equivalente) en éter dietílico (7,5 ml) seguido del añadido de 4-fluorofenilisocianato (101 mg; 0,74 mmol; 1 equivalente) y Et_3N (1 ml). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 50 minutos. Precipitó un sólido de la mezcla de la reacción. El sólido se recogió por filtración y se lavó con éter para dar éster terc-butílico del ácido 2-[4'-(4-fluoro-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico con un rendimiento del 57% (228 mg).

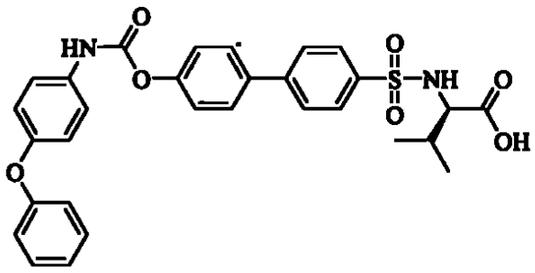
[00284] 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,87 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,03 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,20 (s, 9 H) 2,05 (m, 1 H) 3,67 (dd, *J*=9,98, 4,42 Hz, 1 H) 5,13 (d, *J*=9,85 Hz, 1 H) 6,95 (s, 1 H) 7,05 (d, *J*=9,09 Hz, 2 H) 7,30 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,43 (m, 2 H) 7,57 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,67 (s, 2 H) 7,90 (d, *J*=8,34 Hz, 2 H).

[00285] Paso 11B: Se disolvió éster terc-butílico del ácido 2-[4'-(4-fluoro-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico (223 mg) en dicloroetano (7,5 ml) y se añadió con TFA (2,5 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 5 horas y la CCD indicó que la reacción se había completado. Después de procesado regular y de cromatografía de columna se obtuvo ácido 2-[4'-(4-fluoro-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico con un rendimiento del 89% (178 mg).

[00286] 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,81 (d, *J*=6,57 Hz, 3 H) 0,84 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,96 (m, 1 H) 3,56 (dd, *J*=9,35, 6,06 Hz, 1 H) 7,19 (t, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,37 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,54 (dd, *J*=9,09, 4,80 Hz, 2 H) 7,79 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,86 (d, *J*=4,29 Hz, 4 H) 8,08 (d, *J*=9,35 Hz, 1 H) 10,34 (s, 1 H).

Ejemplo 3.63

000253 261 198



Ácido D-3-metil-2-[4'-(4-fenoxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

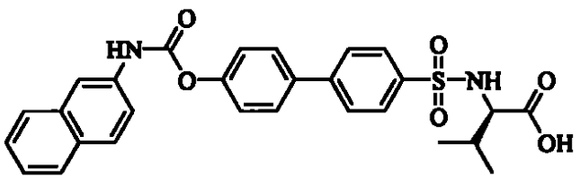
[00287] El compuesto del título, ácido D-3-metil-2-[4'-(4-fenoxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.62.

[00288] Paso 11A: La reacción de isocianato 4-fenoxifenílico con éster *terc*-butílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico para obtener éster *terc*-butílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(4-fenoxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se realizó de acuerdo con los procedimientos del Paso 11A para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 36%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,9 (dd, J=8,2, 6,9 Hz, 6 H) 1,2 (s, 9 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, J=9,6, 6,3 Hz, 1 H) 7,0 (dd, J=8,6, 1,0 Hz, 2 H) 7,0 (d, J=9,1 Hz, 2 H) 7,1 (m, 1 H) 7,4 (m, 4 H) 7,5 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,7 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,9 (m, 4 H) 8,2 (d, J=9,6 Hz, 1 H) 10,3 (s, 1 H).

[00289] Paso 11B: La conversión del éster *terc*-butílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(4-fenoxi-fenilcarbamoiloxi-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico a ácido D-3-metil-2-[4'-(4-fenoxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se hizo de acuerdo con los procedimientos del Paso 11B para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 87%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=12,1, 6,8 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,6 (dd, J=9,3, 6,1 Hz, 1 H) 7,0 (m, 2 H) 7,0 (d, J=9,1 Hz, 2 H) 7,1 (t, J=7,3 Hz, 1 H) 7,4 (m, 4 H) 7,5 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,9 (d, J=4,8 Hz, 4 H) 8,1 (d, J=9,3 Hz, 1 H) 10,3 (s, 1 H).

Ejemplo 3.64

000259 262 189



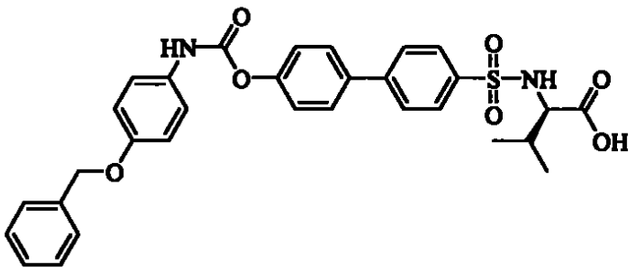
Ácido D-3-metil-2-[4'-(naftalén-2-ilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

[00290] El compuesto del título, ácido D-3-metil-2-[4'-(naftalén-2-ilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se preparó de acuerdo con procedimientos similares al del Ejemplo 3.62.

[00291] Paso 11A: La reacción de isocianato 2-naftílico con éster *terc*-butílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico para obtener éster *terc*-butílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(naftalén-2-ilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se realizó de acuerdo con los procedimientos del Paso 11A para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 16%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,9 (dd, J=8,2, 6,9 Hz, 6 H) 1,2 (s, 9 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, J=9,9, 6,3 Hz, 1 H) 7,4 (m, 3 H) 7,5 (m, 1 H) 7,6 (dd, J=8,8, 2,3 Hz, 1 H) 7,8 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,9 (m, 7 H) 8,1 (s, 1 H) 8,2 (d, J=9,9 Hz, 1 H) 10,5 (s, 1 H).

[00292] Paso 11B: La conversión del éster *terc*-butílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(naftalén-2-ilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico a ácido D-3-metil-2-[-4'-(naftalén-2-ilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se hizo de acuerdo con los procedimientos del Paso 11B para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 40%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=12,5, 6,7 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 3,6 (dd, J=9,1, 5,8 Hz, 1 H) 7,4 (m, 3 H) 7,5 (m, 1 H) 7,6 (dd, J=8,8, 2,3 Hz, 1 H) 7,9 (m, 9 H) 8,1 (m, 2 H) 10,5 (s, 1 H) 12,6 (s, 1 H).

Ejemplo 3.65



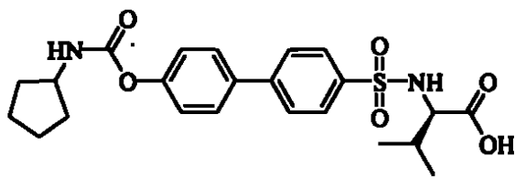
Ácido D-2-[4'-(4-benciloxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

[00293] El compuesto del título, ácido D-2-[4'-(4-benciloxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.62.

[00294] Paso 11A: La reacción de isocianato 4-benciloxifenílico con éster *terc*-butílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico para obtener éster *terc*-butílico del ácido D-2-[4'-(4-benciloxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se realizó de acuerdo con los procedimientos del Paso 11A para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 37%. RMN: G8701-142. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,9 (dd, J=8,1, 6,8 Hz, 6 H) 1,2 (s, 9 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, J=9,9, 6,3 Hz, 1 H) 5,1 (s, 2 H) 7,0 (d, J=9,1 Hz, 2 H) 7,4 (m, 9 H) 7,7 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,9 (m, 4 H) 8,2 (d, J=9,6 Hz, 1 H) 10,1 (s, 1 H).

[00295] Paso 11B: La conversión del éster *terc*-butílico del ácido D-2-[4'-(4-benciloxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico a ácido D-2-[4'-(4-benciloxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se hizo de acuerdo con los procedimientos del Paso 11B para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 60%. RMN: G8701-151. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=12,1, 6,8 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,6 (dd, J=9,3, 6,1 Hz, 1 H) 5,1 (s, 2 H) 7,0 (d, J=9,1 Hz, 2 H) 7,4 (m, 9 H) 7,8 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,9 (m, 4 H) 8,1 (d, J=9,3 Hz, 1 H) 10,1 (s, 1 H).

Ejemplo 3.66



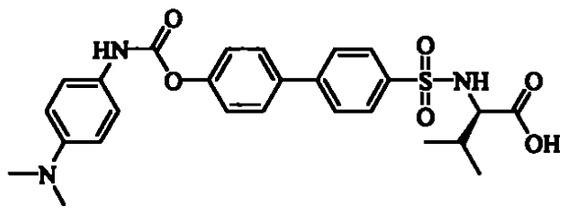
Ácido D-2-(4'-ciclopentilcarbamoiloxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico

[00296] El compuesto del título, ácido D-2-(4'-ciclopentilcarbamoiloxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.62.

[00297] Paso 11A: La reacción de isocianato ciclopentílico con éster *terc*-butílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico para obtener éster *terc*-butílico del ácido D-2-(4'-ciclopentilcarbamoiloxi-bifenil-4-sulfonilamino]-3-se realizó de acuerdo con los procedimientos del Paso 11A para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 70%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,9 (dd, J=8,1, 7,1 Hz, 6 H) 1,2 (s, 9 H) 1,5 (m, 4 H) 1,7 (m, 2 H) 1,8 (m, 2 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, J=9,6, 6,3 Hz, 1 H) 3,9 (m, 1 H) 7,2 (d, J=8,6 Hz, 2 H) 7,7 (d, J=8,6 Hz, 2 H) 7,8 (m, 5 H) 8,2 (d, J=9,6 Hz, 1 H).

[00298] Paso 11B: La conversión del éster *terc*-butílico del ácido D-2-(4'-ciclopentilcarbamoiloxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico a ácido D-2-(4'-ciclopentilcarbamoiloxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico se hizo de acuerdo con procedimientos del Paso 11B para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 91%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (m, 6 H) 1,5 (m, 4 H) 1,7 (d, J=4,5 Hz, 2 H) 1,8 (m, 2 H) 1,9 (m, 1 H) 3,6 (dd, J=9,3, 6,1 Hz, 1 H) 3,9 (m, 1 H) 7,2 (d, J=8,6 Hz, 2 H) 7,7 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (s, 5 H) 8,1 (d, J=9,3 Hz, 1 H) 12,6 (s, 1 H).

Ejemplo 3.67



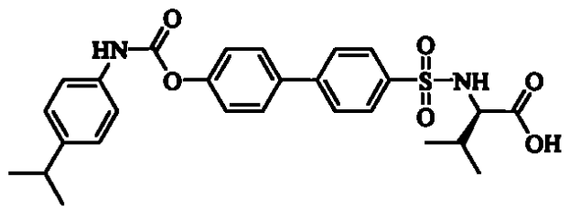
Ácido D-2-[4'-(4-dimetilamino-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

[00299] El compuesto del título, ácido D-2-[4'-(4-dimetilamino-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico, fue preparado de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.62.

[00300] Paso 11A: El acoplamiento del isocianato 4-(dimetilamino)fenílico con éster *terc*-butílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico para obtener éster *terc*-butílico del ácido D-2-[4'-(4-dimetilamino-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se realizó de acuerdo con los procedimientos del Paso 11A para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 28%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,9 (dd, J=8,1, 6,8 Hz, 6 H) 1,2 (s, 9 H) 1,9 (m, 1 H) 2,8 (s, 6 H) 3,5 (dd, J=9,6, 6,3 Hz, 1 H) 6,7 (d, J=9,1 Hz, 2 H) 7,3 (d, J=8,6 Hz, 4 H) 7,7 (d, J=8,6 Hz, 2 H) 7,8 (m, 4 H) 8,2 (d, J=9,9 Hz, 1 H) 9,9 (s, 1 H).

[00301] Paso 11B: La conversión del éster *terc*-butílico del ácido D-2-[4'-(4-dimetilamino-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico a ácido D-2-[4'-(4-dimetilamino-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se hizo de acuerdo con los procedimientos del Paso 11B para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 99%. RMN: G8701-161. 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,8 (dd, J=23,7, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 3,1 (s, 6 H) 3,6 (d, J=5,6 Hz, 1 H) 7,2 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,4 (d, J=9,1 Hz, 3 H) 7,6 (m, 6 H) 7,8 (d, J=8,8 Hz, 2 H).

Ejemplo 3.68



Ácido D-2-[4'-(4-isopropil-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

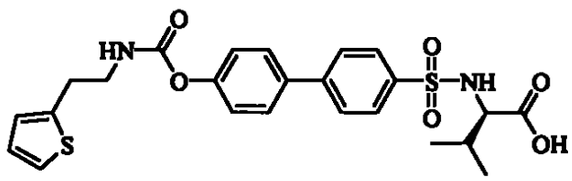
[00302] El compuesto del título, ácido D-2-[4'-(4-isopropil-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico fue preparado de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.62.

[00303] Paso 11A: La reacción de isocianato 4-isopropoilfenílico con éster *terc*-butílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico para obtener éster *terc*-butílico del ácido D-2-[4'-(4-isopropil-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se realizó de acuerdo con los procedimientos del Paso 11A para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 38%. RMN: G8701-158. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,9 (dd, J=8,3, 6,8 Hz, 6 H) 1,2 (m, 15 H) 1,9 (m, 1 H) 2,8 (m, 1 H) 3,5 (dd, J=9,9, 6,3 Hz, 1 H) 7,2 (d, J=8,6 Hz, 2 H) 7,4 (d, J=8,6 Hz, 2 H) 7,4 (d, J=8,6 Hz, 2 H) 7,7 (d, J=8,6 Hz, 2 H) 7,9 (m, 4 H) 8,2 (d, J=9,9 Hz, 1 H) 10,2 (s, 1 H).

[00304] Paso 11B: La conversión del éster *terc*-butílico del ácido D-2-[4'-(4-isopropil-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico a ácido D-2-[4'-(4-isopropil-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se hizo de acuerdo con los procedimientos del Paso 11B para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 34%. RMN: G8701-165. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=12,4, 6,8 Hz, 6 H) 1,2 (d, J=6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 2,8 (m, 1 H) 3,6 (dd, J=9,3, 6,1 Hz, 1 H) 7,2 (d, J=8,6 Hz, 2 H) 7,4 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,4 (d, J=8,6 Hz, 2 H) 7,8 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,9 (m, 4 H) 8,1 (d, J=9,3 Hz, 1 H) 10,2 (s, 1 H) 12,6 (s, 1 H).

194
000264 267

Ejemplo 3.69



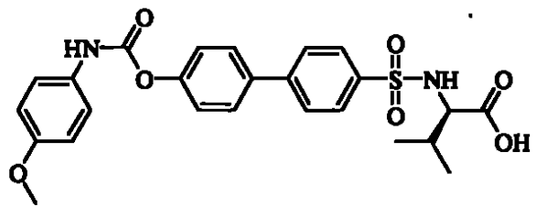
Ácido D-3-metil-2-[4'-(2-tiofen-2-il-etilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

[00305] El compuesto del título, ácido D-3-metil-2-[4'-(2-tiofen-2-il-etilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.62.

[00306] Paso 11A: La reacción de isocianato 2-(2-tienil)etílico con éster *terc*-butílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico para obtener éster *terc*-butílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(2-tiofén-2-il-etilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se realizó de acuerdo con los procedimientos del Paso 11A para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 63%. RMN: G8701-169. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,9 (dd, J=8,3, 7,1 Hz, 6 H) 1,2 (s, 9 H) 1,9 (m, 1 H) 3,0 (t, J=7,1 Hz, 2 H) 3,3 (m, 2 H) 3,5 (dd, J=9,6, 6,3 Hz, 1 H) 7,0 (m, 2 H) 7,2 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,4 (dd, J=5,1, 1,3 Hz, 1 H) 7,7 (d, J=8,6 Hz, 2 H) 7,8 (d, J=2,3 Hz, 4 H) 8,0 (t, J=5,7 Hz, 1 H) 8,2 (d, J=9,9 Hz, 1 H).

[00307] Paso 11B: La conversión del éster *terc*-butílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(2-tiofén-2-il-etilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico a ácido D-3-metil-2-[4'-(2-tiofén-2-il-etilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se hizo de acuerdo con los procedimientos del Paso 11B para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 43%. RMN: G8701-175. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, *J*=12,4, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 3,0 (t, *J*=7,1 Hz, 2 H) 3,3 (m, 2 H) 3,6 (dd, *J*=9,2, 5,9 Hz, 1 H) 6,9 (d, *J*=3,3 Hz, 1 H) 7,0 (dd, *J*=5,1, 3,3 Hz, 1 H) 7,2 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H) 7,4 (dd, *J*=5,1, 1,3 Hz, 1 H) 7,7 (d, *J*=8,6 Hz, 2 H) 7,8 (s, 4 H) 8,0 (t, *J*=5,8 Hz, 1 H) 8,1 (d, *J*=9,3 Hz, 1 H).

Ejemplo 3.70



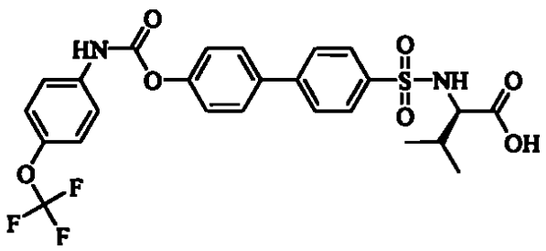
Ácido D-3-metil-2-[4'-(4-trifluorometoxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

[00308] El compuesto del título, ácido D-3-metil-2-[4'-(4-trifluorometoxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.62.

[00309] Paso 11A: La reacción de isocianato 4-metoxifenílico con éster *terc*-butílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico para obtener éster *terc*-butílico del ácido D-2-[4'-(4-metoxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se realizó de acuerdo con los procedimientos del Paso 11A para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 49%. RMN: G8701-199. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,9 (dd, J=8,3, 6,8 Hz, 6 H) 1,2 (s, 9 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, J=9,9, 6,3 Hz, 1 H) 3,7 (s, 3 H) 6,9 (d, J=9,1 Hz, 2 H) 7,4 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,4 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,7 (d, J=8,6 Hz, 2 H) 7,9 (m, 4 H) 8,2 (d, J=9,9 Hz, 1 H) 10,1 (s, 1 H).

[00310] Paso 11B: La reacción del éster *terc*-butílico del ácido D-2-[4'-(4-metoxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico a ácido D-3-metil-2-[4'-(4-trifluorometoxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se hizo de acuerdo con los procedimientos en el Paso 11B para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 91%. RMN: G9241-4. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=12,6, 6,8 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,6 (dd, J=9,3, 5,8 Hz, 1 H) 3,7 (s, 3 H) 6,9 (d, J=9,1 Hz, 2 H) 7,4 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,4 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (d, J=8,6 Hz, 2 H) 7,9 (m, 4 H) 8,1 (d, J=9,3 Hz, 1 H) 10,1 (s, 1 H) 12,6 (s, 1 H).

Ejemplo 3.71



Ácido D-3-metil-2-[4'-(4-trifluorometoxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

[00311] El compuesto del título, ácido D-3-metil-2-[4'-(4-trifluorometoxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.62.

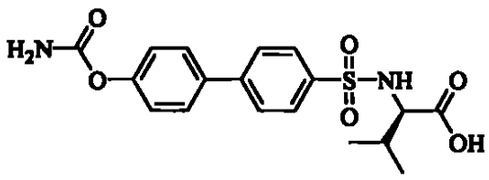
[00312] Paso 11A: A una solución de éster *terc*-butílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico (300 mg; 0,74 mmol; 1 equivalente) en éter dietílico (10 ml) se añadieron isocianato 4-(trifluorometoxi)fenílico (123 ul; 0,81 mmol; 1,1 equivalente) y trietilamina (124 ul; 0,89 mmol; 1,2 equivalente) bajo argón y se agitó a temperatura ambiente. Después de completarse la reacción, el proceso regular y la cromatografía instantánea de columna se obtuvo éster *terc*-butílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(4-trifluorometoxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico con un rendimiento del 37%. RMN: G8701-200. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,9 (dd, J=8,1, 6,8 Hz, 6 H) 1,2 (s, 9 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, J=9,9, 6,3 Hz, 1 RMN: G8701-200. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,9 (dd, J=8,1, 6,8 Hz, 6 H) 1,2 (s, 9 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, J=9,9, 6,3 Hz, 1 H) 7,4 (m, 4 H) 7,6 (d, J=9,3 Hz, 2 H) 7,8 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,9 (m, 4 H) 8,2 (d, J=9,6 Hz, 1 H) 10,5 (s, 1 H).

[00313] Paso 11B: La conversión del éster *terc*-butílico del ácido D-3-metil-2-[4'-(4-trifluorometoxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico a ácido D-3-metil-2-[4'-(4-trifluorometoxi-fenilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico se hizo de acuerdo con los procedimientos del Paso 11B para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 76%. RMN: G9241-5. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=12,4, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 3,6 (dd, J=9,3, 5,8 Hz, 1 H) 7,4 (m, 4 H) 7,6 (d,

.- 000267 2

J=9,1 Hz, 2 H) 7,8 (d, J=8,6 Hz, 2 H) 7,9 (m, 4 H) 8,1 (d, J=9,3 Hz, 1 H) 10,5 (s, 1 H).

Ejemplo 3.72



Ácido D-2-(4'-carbamoiloxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico

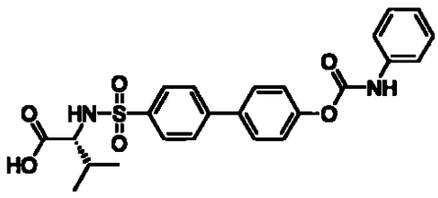
[00314] El compuesto del título, ácido D-2-(4'-carbamoiloxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.62.

[00315] Paso 11A: A una solución de éster *terc*-butílico del ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico (500 mg; 1,23 mmol; 1 equivalente) en CH_2Cl_2 (2 ml) se añadieron isocianato clorosulfonílico (107 ul; 1,23 mmol; 1 equivalente) bajo argón y se agitó a temperatura ambiente por 16 horas. La reacción se completó según determinación de CCD. Después de procesarse y de cromatografía instantánea de columna se obtuvo éster *terc*-butílico del ácido D-2-[4'-(carbamoiloxi-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico. Rendimiento: 45%. RMN: G9241-38. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,9 (dd, J=8,3, 6,8 Hz, 6 H) 1,1 (s, 9 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, J=9,9, 6,3 Hz, 1 H) 7,2 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,7 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (d, J=1,0 Hz, 4 H) 8,2 (d, J=9,6 Hz, 1 H).

[00316] Paso 11B: La conversión del éster *terc*-butílico del ácido D-2-(4'-carbamoiloxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico a ácido D-2-(4'-carbamoiloxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico se hizo de acuerdo con procedimientos del Paso 11B para el Ejemplo 3.62. Rendimiento: 85%. RMN: G9241-46. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=12,4, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 3,6 (dd, J=9,3, 5,8 Hz, 1 H) 7,0 (s, 1 H) 7,2 (m, 3 H) 7,7 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,8 (s, 4 H) 8,1 (d, J=9,3 Hz, 1 H).

000288
241 98

Ejemplo 3.73



Éster terc-butílico del ácido 3-metil-2-[4'-fenilcarbamoiloxi-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

[00317] El compuesto del título, éster terc-butílico del ácido D3-metil-2-(4'-fenilcarbamoiloxi-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.62.

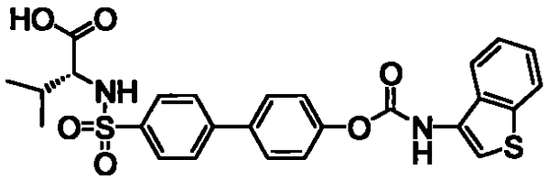
[00318] Paso 11A: Se disolvió éster *terc*-butílico del ácido 2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico (300 mg; 0,74 mmol; 1 equivalente) en éter dietílico (7,5 ml), seguido del añadido de fenilisocianato (0,08 ml; 0,74 mmol; 1 equivalente) y Et_3N (1 ml). La mezcla de la reacción se agitó durante 4 horas. Se recogió el sólido precipitado de la mezcla de la reacción mediante filtración, se lavó con éter y se obtuvo un rendimiento del 76% (295 mg).

[00319] 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,87 (d, *J*=7,07 Hz, 3 H) 1,03 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,20 (s, 9 H) 2,07 (m, 1 H) 3,67 (dd, *J*=9,98, 4,42 Hz, 1 H) 5,13 (d, *J*=9,85 Hz, 1 H) 6,96 (s, 1 H) 7,14 (m, 1 H) 7,31 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,36 (m, 2 H) 7,47 (d, *J*=8,34 Hz, 2 H) 7,58 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,66 (d, *J*=8,34 Hz, 2 H) 7,91 (m, 2 H).

[00320] Paso 11B: Se hidrolizó el éster terc-butílico del ácido 3-metil-2-(4'-fenilcarbamoiloxi-bifenil-4-sulfonilamino)-butírico (200 mg) de acuerdo con los procedimientos del Paso 11B para el Ejemplo 3.62 y se obtuvo ácido 3-metil-2-(4'-fenilcarbamoiloxi-bifenil-4-sulfonilamino)-butírico con un rendimiento del 88% (158 mg).

[00321] 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,82 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,85 (d, *J*=6,57 Hz, 3 H) 1,95 (m, 1 H) 3,56 (dd, *J*=9,22, 5,94 Hz, 1 H) 3,90 (s, 1 H) 7,07 (m, 1 H) 7,35 (m, 4 H) 7,53 (d, *J*=7,83 Hz, 2 H) 7,80 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,86 (d, *J*=22;23 Hz, 4 H) 8,08 (d, *J*=9,35 Hz, 1 H) 10,29 (s, 1 H).

Ejemplo 3.74



Éster terc-butílico del ácido 2-[4'-(benzo[b]tiofén-3-ilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

[00322] El compuesto del título, éster terc-butílico del ácido 2-[4'-(benzo[b]tiofén-3-ilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.62.

[00323] Paso 11A: Se disolvió éster terc-butílico del ácido 2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico (300 mg; 0,74 mmol; 1,0 equivalente) en éter dietílico (7,5 ml), seguido del añadido de isocianato de 1-benzotiofén-3-ílico (129,6 mg; 0,74 mmol; 1,0 equivalente) y 0,5 ml de Et_3N. Se precipitó un sólido de la mezcla de la reacción en 5 minutos. Se continuó agitando a la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas y el precipitado se recogió mediante filtración y se lavó con éter. El rendimiento fue del 43% (187 mg).

[00324] 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,87 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,03 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,20 (s, 9 H) 2,08 (m, 1 H) 3,68 (m, 1 H) 5,15 (d, *J*=10,11 Hz, 1 H) 7,35 (d, *J*=8,34 Hz, 2 H) 7,43 (m, 2 H) 7,60 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,67 (d, *J*=8,34 Hz, 3 H) 7,74 (s, 1 H) 7,90 (t, *J*=9,09 Hz, 3 H).

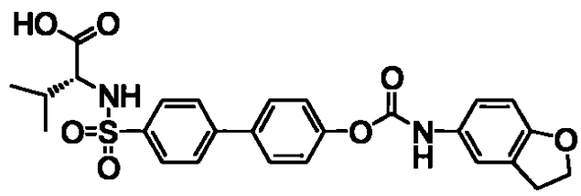
[00325] Paso 11B: Se disolvió el éster terc-butílico del ácido 2-[4'-(benzo[b]tiofén-3-ilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico (180 mg; 0,31 mmol) en cloruro de metileno en atmósfera de N_2, se añadió a TFA (2 ml) a 0°C y se agitó por 4

.. 000270 20 243

horas. El disolvente se evaporó, el producto se desecó al vacío elevado y se obtuvo ácido 2-[4'-(benzo[b]tiofén-3-ilcarbamoiloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico con un rendimiento del 66% (108 mg).

[00326] 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,82 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,89 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,20 (s, 1 H) 3,54 (d, *J*=5,05 Hz, 1 H) 7,30 (m, 2 H) 7,35 (m, 2 H) 7,58 (s, 1 H) 7,66 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,71 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,78 (d, *J*=7,83 Hz, 1 H) 7,84 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,92 (d, *J*=8,08 Hz, 1 H)

Ejemplo 3.75

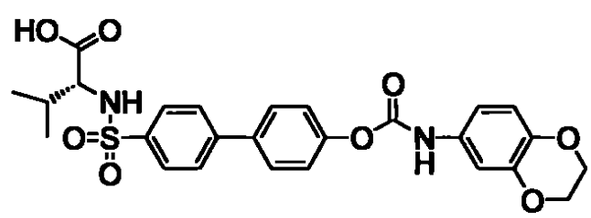


N-[(4'-{[2,3-dihidro-1-benzofurán-5-ilamino)carbonil]oxi}-1,1'-bifenil-4il)sulfonil]-D-valina

[00327] El compuesto del título, N-[(4'-{[2,3-dihidro-1-benzofurán-5-ilamino)carbonil]oxi}-1,1'-bifenil-4-il)sulfonil]-D-valina, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.62.

[00328] Pasos 11A y 11B: Rendimiento 40%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,80 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,85 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,98 (m, 1 H) 3,17 (t, *J*=8,97 Hz, 2 H) 3,39 (s, 1 H) 4,50 (t, *J*=8,59 Hz, 2 H) 6,72 (d, *J*=8,34 Hz, 1 H) 7,19 (d, *J*=8,84 Hz, 1 H) 7,34 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,40 (s, 1 H) 7,78 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,85 (d, *J*=1,77 Hz, 4 H) 10,05 (s, 1 H).

Ejemplo 3.76

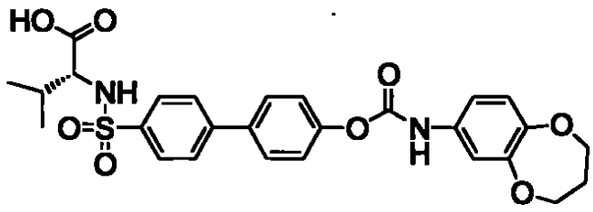


N-[(4'-{[2,3-dihidro-1,4-benzodioxín-6-ilamino)carbonil]oxi}-1,1'-bifenil-4-il)sulfonil]-D-valina

[00329] El compuesto del título, N-[(4'-{[2,3-dihidro-1,4-benzodioxín-6-ilamino)carbonil]oxi}-1,1'-bifenil-4-il)sulfonil]-D-valina, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.62.

[00330] Pasos 11A y 11B: Rendimiento 62%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,80 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,85 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,98 (m, 1 H) 3,42 (s, 1 H) 4,21 (m, 4 H) 6,81 (d, *J*=8,84 Hz, 1 H) 6,94 (d, *J*=10,86 Hz, 1 H) 7,09 (s, 1 H) 7,34 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,78 (d, *J*=8,84 Hz, 3 H) 7,85 (d, *J*=1,77 Hz, 4 H) 10,11 (s, 1H).

Ejemplo 3.77



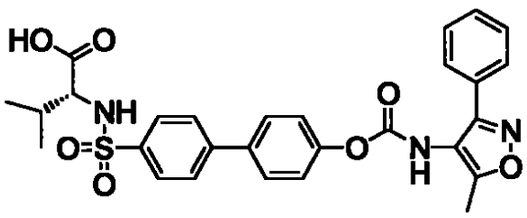
N-[(4'-{[3,4-dihidro-2H-1,5-benzodioxepín-7-ilamino)carbonil]oxi}-1,1'-bifenil-4-il)sulfonil]-D-valina

[00331] El compuesto del título, N-[(4'-{[3,4-dihidro-2H-1,5-benzodioxepín-7-ilamino)carbonil]oxi}-1,1'-bifenil-4-il)sulfonil]-D-valina, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.62.

[00332] Pasos 11A y 11B: Rendimiento 55%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,80 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,85 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,97 (m, 1 H) 2,08 (m, 2 H) 3,45 (s, 1 H) 4,08 (m, 4 H) 6,94 (d, *J*=8,59 Hz, 1 H) 7,06 (d, *J*=2,53 Hz, 1 H) 7,18 (d, *J*=2,27 Hz, 1 H) 7,35 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,79 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,85 (d, *J*=3,79 Hz, 4 H) 7,88 (s, 1 H) 10,21 (s, 1 H).

Ejemplo 3.78

000272
252
275

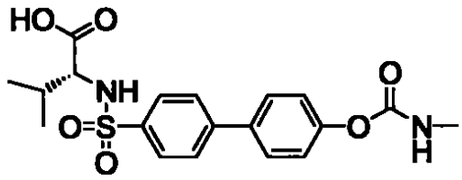


N-[(4'-{[5-metil-3-fenilisoxazol-4-il)amino)carbonil]oxi}-1,1'-bifenil-4-il)sulfonil]-D-valina

[00333] El compuesto del título, N-[(4'-{[5-metil-3-fenilisoxazol-4-il)amino)carbonil]oxi}-1,1'-bifenil-4-il)sulfonil]-D-valina, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.62.

[00334] Paso 11B: Rendimiento 75%. 1H RMN (400 MHz, ACETONITRILO-D3) δ ppm 0,63 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,74 (d, *J*=6,57 Hz, 3 H) 1,83-1,88 (m, 1 H) 2,20 (s, 1H) 2,34 (m, 3 H) 3,81 (s, 1 H) 6,56 (s, 1 H) 6,66 (s, 1 H) 7,12 (d, *J*=7,83 Hz, 1 H) 7,45 (d, *J*=4,80 Hz, 4 H) 7,59 (m, 4 H) 7,68 (d, *J*=3,54 Hz, 2 H) 7,80 (d, *J*=8,08 Hz, 2 H).

Ejemplo 3.79



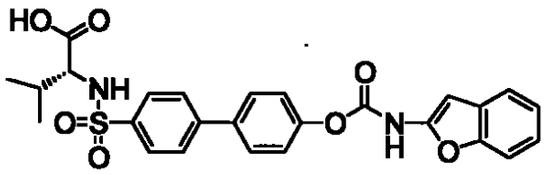
N-[(4'-{[(metilamino)carbonil]oxi}-1,1'-bifenil-4-il)sulfonil]-D-valina

[00335] El compuesto del título, N-[(4'-{[(metilamino)carbonil]oxi}-1,1'-bifenil-4-il)sulfonil]-D-valina, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.62.

[00336] Paso 11B: Rendimiento 90%. 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,80 (d, *J*=8,34 Hz, 3 H) 0,87 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,91-2,02 (m, 1 H) 2,71 (s, 3 H) 3,52 (d, *J*=5,05 Hz, 1 H) 7,11 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,58 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,66 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,81 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H).

000273 276

Ejemplo 3.80



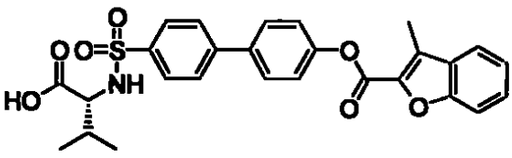
N-[(4'-{[1-benzofurán-2-ilamino)carbonil]oxi}-1,1'-bifenil-4-il)sulfonil]-D-valina

[00337] Paso 12A: Se añadió ácido 2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico (314 mg; 0,9 mmol) disuelto en cloruro de metileno (10 ml) y éter dietílico (20 ml) con isocianato de benzofurano (143 mg; 0,9 mmol; 1 equivalente) y trietilamina (363 mg; 3,6 mmol; 4 equivalentes). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El sólido precipitado a partir de la mezcla de la reacción se recogió por filtración seguida de cromatografía de columna (gel de sílice, MeOH al 5%/CH_2Cl_2). Se obtuvieron 76 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 16%.

[00338] 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,74-1,00 (m, 6 H) 1,90-2,07 (m, 1 H) 3,22-3,48 (m, 1 H) 6,86 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,10-7,28 (m, 2 H) 7,33-7,62 (m, 4 H) 7,69-7,83 (m, 4 H) 7,86 (s, 1 H).

[00339] Los Ejemplos 81 y 82.se prepararon en base al Esquema 13.

Ejemplo 81



Éster 4'-(1-carboxi-2-metil-propilsulfamoil)-bifenil-4-ílico de ácido D-3-metil-benzofurán-2-carboxílico

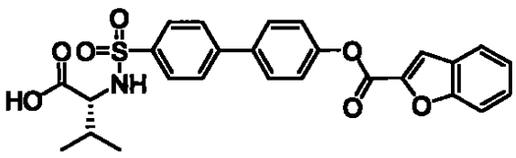
[00340] Paso 13A: Una mezcla de éster terc-butílico de ácido D-2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico (305 mg; 0,75 mmol; 1 equivalente), ácido 3-metil-benzofurán-2-carboxílico (131 mg; 0,74 mmol; 1 equivalente), 4-dimetilaminopiridina (DMAP; 95 mg; 0,77 mol; 1 equivalente) y 1,3-

000274

diciclohexilcarbodiimida (DCC; 240 mg; 1,17 mmol; 1,6 equivalente) se disolvió en 5 ml de diclorometano en atmósfera de nitrógeno, se la dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 3,5 horas. Proceso regular y cromatografía de columna (EtOAc al 10% en hexano) y se obtuvo éster 4'-(1-terc-butoxicarbonil-2-metil-propilsulfamoil)-bifenil-4-ílico de ácido D-3-metil-benzofurán-2-carboxílico (300 mg) con un rendimiento del 71%. RMN: G8475-101. 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,9 (d, *J*=7,1 Hz, 3 H) 1,0 (d, *J*=6,8 Hz, 3 H) 1,2 (s, 9 H) 2,1 (m, 1 H) 2,7 (s, 3 H) 3,7 (dd, *J*=10,0, 4,4 Hz, 1 H) 5,1 (d, *J*=9,9 Hz, 1 H) 7,4 (m, 3 H) 7,5 (m, 1 H) 7,6 (t, *J*=8,0 Hz, 3 H) 7,7 (m, 3 H) 7,9 (d, *J*=8,3 Hz, 2 H).

[00341] Paso 13B: La extracción del éster t-butílico se hizo de acuerdo con los procedimientos del Paso 11B para el Ejemplo 3.62 con rendimiento cuantitativo. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=12,1, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 2,7 (s, 3 H) 3,6 (dd, J=9,2, 5,9 Hz, 1 H) 7,4 (t, J=7,6 Hz, 1 H) 7,5 (d, J=8,8 Hz, 2 H) 7,6 (t, J=8,2 Hz, 1 H) 7,8 (d, J=8,3 Hz, 1 H) 7,9 (m, 7 H) 8,1 (d, J=9,3 Hz, 1 H).

Ejemplo 3.82



Éster 4'-(1-terc-butoxicarbonil-2-metil-propilsulfamoil)-bifenil-4-ílico de ácido benzofurán-2-carboxílico

[00342] El compuesto del título, éster 4'-(1-terc-butoxicarbonil-2-metil-propilsulfamoil)-bifenil-4-ílico del ácido benzofurán-2-carboxílico, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.81.

[00343] Paso 13A: Se agregó ácido 2-benzofurán carbocarboxílico (400,5 mg; 2,47 mmol; 1 equivalente) disuelto en CH_2Cl_2 seco (50 ml) con DCC (1,019 g; 4,94 mmol; 2 equivalentes) y se agitó bajo N_2 por 15 minutos. A continuación se introdujo éster terc-butílico del ácido 2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico (1,0 g; 2,47 mmol; 1 equivalente) a la mezcla de la reacción, seguido del añadido de DMAP

(50 mg; 0,41 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, la mezcla se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con H_2O y con salmuera. La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$ y el disolvente se extrajo para obtener el producto crudo. El residuo se disolvió en EtOAc y se purificó por cromatografía de columna (gel de sílice, EtOAc al 20% / n-hexano) para producir G9058-53-1 con un rendimiento del 30,5% (325 mg).

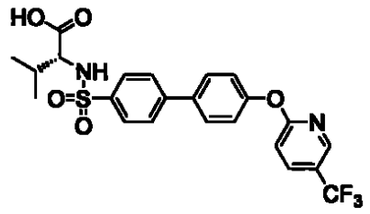
[00344] 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,87 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,03 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,21 (s, 9 H) 2,07 (m, 1 H) 3,68 (dd, *J*=9,85, 4,55 Hz, 1 H) 5,15 (d, *J*=9,85 Hz, 1 H) 7,37 (m, 3 H) 7,53 (t, *J*=7,83 Hz, 1 H) 7,66 (m, 5 H) 7,77 (m, 2 H) 7,92 (d, *J*=8,34 Hz, 2 H).

[00345] Paso 13B: El éster 4'-(1-terc-butoxicarbonil-2-metil-propilsulfamoil)-bifenil-4-ílico del ácido benzofurán-2-carboxílico (325 mg) se disolvió en diclorometano (15 ml) y se añadió con TFA. La solución se agitó a temperatura ambiente por 7 horas. El disolvente se extrajo por rotovap, el producto crudo se purificó por cromatografía de columna (MeOH al 5-20% / EtOAc) y se obtuvo éster 4'-(1-carboxi-2-metil-propilsulfamoil)-bifenil-4-ílico del ácido benzofurán-2-carboxílico con un rendimiento del 76% (241 mg).

[00346] 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,80 (d, *J*=6,57 Hz, 3 H) 0,87 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 2,04 (m, 1 H) 3,24 (m, 1 H) 7,43 (t, *J*=7,58 Hz, 1 H) 7,49 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,60 (t, *J*=7,96 Hz, 1 H) 7,70 (d, *J*=9,85 Hz, 1 H) 7,85 (m, 7 H) 8,08 (s, 1 H).

[00347] Los Ejemplos 3.83, 3.84, 3.85, 3.86, 3.87, 3.88 y 3.89 se prepararon en base al Esquema 14.

Ejemplo 3.83



000276 206 279

Éster terc-butílico del ácido 3-metil-2-[4'-(5-trifluorometil-piridín-2-iloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

[00348] Paso 14A: Se mezclaron éster terc-butílico del ácido 2-(4'-hyiroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico (100 mg; 0,25 mmol; 1,0 equivalente), 2-cloro-5-trifluoro metilpiridina (45,4 mg; 0,25 mmol; 1 equivalente) y K_2CO_3 (86,4 mg; 0,63 mmol; 2,5 equivalentes) en DMF (8 ml) y se calentaron a 110°C durante 4,5 horas. La reacción se completó según determinación de CCD. A continuación, la mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con EtOAc, se lavó con salmuera y se desecó sobre $MgSO_4$. Después de extraer el disolvente, el producto crudo se purificó por cromatografía de columna (gel de sílice, EtOAc al 20% / n-hexano) y se obtuvo G9058-109-1 con un rendimiento del 74% (100 mg).

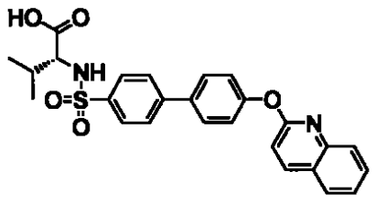
[00349] 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,80 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,96 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,14 (s, 9 H) 2,01 (m, 1 H) 3,61 (m, 1 H) 5,07 (d, *J*=9,85 Hz, 1 H) 7,03 (d, *J*=8,59 Hz, 1 H) 7,19 (s, 1 H) 7,21 (s, 1 H) 7,55 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,62 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,85 (d, *J*=2,02 Hz, 2 H) 7,88 (d, *J*=6,06 Hz, 1 H) 8,40 (s, 1 H).

[00350] Paso 14B: El éster terc-butílico del ácido 3-metil-2-[4'-(5-trifluorometil-piridín-2-iloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico (97 mg) se disolvió en CH_2Cl_2 (6 ml) y se añadió con TFA (2 ml). La reacción se completó al cabo de 6 horas, según determinación de CCD. Después de extraer el disolvente, el residuo se purificó por cromatografía de columna (MeOH al 10% / CH_2Cl_2) y se obtuvo ácido 3-metil-2-[4'-(5-trifluorometil-piridín-2-iloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico con un rendimiento del 66% (54,5 mg).

[00351] 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,81 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,88 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,97 (m, 1 H) 3,55 (d, *J*=5,31 Hz, 1 H) 7,09 (d, *J*=8,59 Hz, 1 H) 7,19 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,68 (dd, *J*=14,65, 8,59 Hz, 4 H) 7,83 (d, *J*=8,34 Hz, 2 H) 8,02 (d, *J*=11,37 Hz, 1 H) 8,35 (d, *J*=2,53 Hz, 1 H).

Ejemplo 3.84

000277



Éster terc-butílico del ácido 3-metil-2-[4'-(quinolín-2-iloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

[00352] El compuesto del título, éster terc-butílico del ácido 3-metil-2-[4'-(quinolín-2-iloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.83.

[00353] Paso 14A [9058-120-1]: Se mezclaron éster terc-butílico del ácido 2-(4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico (200 mg; 0,49 mmol; 1 equivalente), 2-cloroquinolina (242 mg; 1,48 mmol; 3 equivalentes) y Cs_2CO_3 (402 mg; 1,235 mmol; 2,5 equivalentes) en DMF (8 ml) y se agitaron a 100°C durante 7 horas. La mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente y luego se colocó en baño de hielo y se añadió agua. Se recogió el sólido precipitado de la mezcla mediante filtración y se lavó con agua. Después de desecar, se obtuvieron 174 mg de sólido amarillo con un rendimiento del 66%.

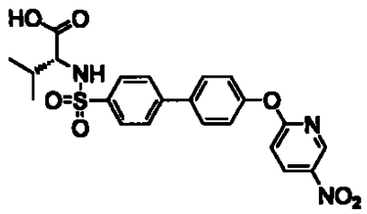
[00354] 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,88 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,03 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,22 (s, 9 H) 2,07 (m, 1 H) 3,68 (dd, *J*=9,85, 4,55 Hz, 1 H) 5,15 (d, *J*=9,85 Hz, 1 H) 7,15 (d, *J*=8,84 Hz, 1 H) 7,38 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,45 (m, 1 H) 7,63 (m, 3 H) 7,71 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,81 (t, *J*=8,72 Hz, 2 H) 7,91 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 8,17 (d, *J*=8,34 Hz, 1 H).

[00355] Paso 14B [9058-121-2]: Se disolvió éster terc-butílico del ácido 3-metil-2-[4'-(quinolín-2-iloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico (164 mg) en dicloroetano (12 ml) y se hidrolizó con TFA (4 ml) a temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente se extrajo, el material crudo se purificó por cromatografía de columna (eluyente MeOH al 10% / DCE) y se obtuvo ácido 3-metil-2-[4'-(quinolín-2-iloxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico con un rendimiento del 58% (84,8 mg).

208
000278 (3)

[00356] 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,82 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,88 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,97 (m, 1 H) 3,60 (d, *J*=5,56 Hz, 1 H) 7,10 (d, *J*=8,84 Hz, 1 H) 7,25 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,39 (t, *J*=6,82 Hz, 1 H) 7,56 (t, *J*=7,71 Hz, 1 H) 7,63 (d, *J*=0,51 Hz, 1 H) 7,65 (d, *J*=1,26 Hz, 1 H) 7,68 (m, 1 H) 7,69 (d, *J*=2,27 Hz, 1 H) 7,72 (m, 1 H) 7,74 (m, 1 H) 7,79 (dd, *J*=7,83, 1,26 Hz, 1 H) 7,82 (m, 1 H) 7,85 (m, 1 H) 8,23 (d, *J*=8,84 Hz, 1 H).

Ejemplo 3.85

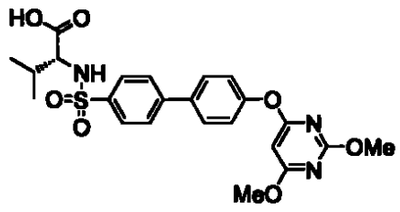


N-({4'-[5-nitropiridín-2-il)oxi]-1,1'-bifenil-4-il}sulfonil)-D-valina

[00357] El compuesto del título, N-({4'-[(5-nitropiridín-2-il)oxi]-1,1'-bifenil-4-il}sulfonil)-D-valina, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.83.

[00358] Pasos 14A y 14B: Rendimiento 60%. 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,82 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,88 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,96 (m, 1 H) 3,58 (d, *J*=5,31 Hz, 1 H) 7,11 (d, *J*=9,09 Hz, 1 H) 7,22 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,70 (dd, *J*=11,87, 8,84 Hz, 4 H) 7,83 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 8,52 (dd, *J*=9,09, 2,78 Hz, 1 H) 8,91 (d, *J*=3,28 Hz, 1 H).

Ejemplo 3.86

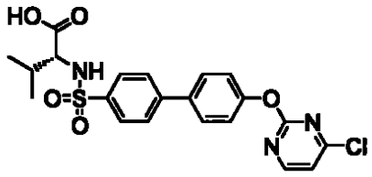


N-({4'-[(2,6-dimetoxipirimidín-4-il)oxi]-1,1'-bifenil-4-il}sulfonil)-D-valina

[00359] El compuesto del título, N-({4'-[(2,6-dimetoxipirimidín-4-il)oxi]-1,1'-bifenil-4-il}sulfonil)-D-valina, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.83.

[00360] Pasos 14A y 14B: Rendimiento 82%. 1H RMN (400 MHz, MeOD) δ ppm 0,81 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,88 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,97 (m, 1 H) 3,56 (d, *J*=5,31 Hz, 1 H) 3,78 (s, 3 H) 3,85 (s, 3 H) 5,73 (s, 1 H) 7,18 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,66 (d, *J*=8,84 Hz, 3 H) 7,70 (d, *J*=8,84 Hz, 3 H) 7,81 (s, 1 H) 7,83 (s, 1 H).

Ejemplo 3.87



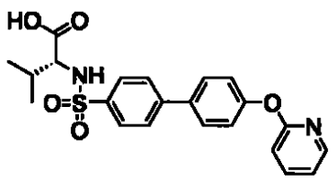
N-({4'-[4-cloropirimidín-2-il)oxi]-1,1'-bifenil-4-il}sulfonil)-D-valina

[00361] El compuesto del título, N-({4'-[(4-cloropirimidín-2-il)oxi]-1,1'-bifenil-4-il}sulfonil)-D-valina, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.83.

[00362] Pasos 14A y 14B: Rendimiento 59%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,80 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,85 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,97 (m, 1 H) 3,47 (s, 1 H) 7,24 (d, *J*=5,81 Hz, 1 H) 7,42 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,87 (d, 7 H) 8,66 (d, *J*=5,56 Hz, 1 H).

000289 210 283

Ejemplo 3.88

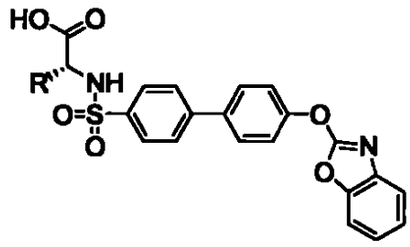


N-{[4'-(piridín-2-iloxi)-1,1'-bifenil-4-il]sulfonil}-D-valina

[00363] El compuesto del título, N-{[4'-{piridín-2-iloxi)-1,1'-bifenil-4-il]sulfonil}-D-valina, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.83.

[00364] Pasos 14A y 14B: Rendimiento 83%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,82 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,85 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,85-2,02 (m, 1 H) 3,57 (dd, *J*=10,48, 4,67 Hz, 1 H) 7,10 (d, *J*=9,85 Hz, 1 H) 7,17 (dd, *J*=7,20, 4,93 Hz, 1 H) 7,26 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,79 (d, *J*=8,84 Hz, 2 H) 7,82-7,95 (m, 4 H) 8,09 (d, *J*=9,35 Hz, 1 H) 8,13-8,28 (m, 1 H).

Ejemplo 3.89



N-{[4'-(1,3-benzoxazol-2-iloxi)-1,1'-bifenil-4-il]sulfonil}-D-valina

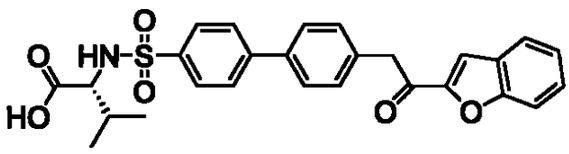
[00365] El compuesto del título, N-{[4'-{1,3-benzoxazol-2-iloxi)-1,1'-bifenil-4-il]sulfonil}-D-valina, se preparó de acuerdo con procedimientos similares a los del Ejemplo 3.83.

[00366] Pasos 14A y 14B: Rendimiento 85%. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,82 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,85 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,86-2,05 (m, 1 H) 3,58 (dd, *J*=9,22, 5,94 Hz, 1 H) 7,32 (d, *J*=9,35 Hz, 1 H) 7,53 (d, *J*=7,33 Hz, 1 H) 7,61-7,73 (m, 3 H) 7,81-7,99 (m, 6 H) 8,10 (d, *J*=9,35 Hz, 1 H).

[00367] El Ejemplo 3.90 se preparó en base al Esquema 15.

.. 000281 211
284

Ejemplo 3.90



N-({4'-[2-(1-benzofurán-2-il)-2-oxoetil]-1,1'-bifenil-4-il}sulfonil)-D-valina

[00368] Paso 15A: Ácido (4-bromofenil)-acético (5,0 g; 23,2 mmol; 1 equivalente) disuelto en cloruro de tionilo (50 ml) se calentó a reflujo por 1 hora en atmósfera de nitrógeno. La solución se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se evaporó. El residuo obtenido se disolvió en cloruro de metileno anhidro y se usó en el Paso 15B.

[00369] Paso 15B: Se disolvió benzofurán-2-il-trimetil-silano (3,4 g; 17,86 mmol) en cloruro de metileno (40 ml) y se enfrió a -78°C. Se añadió cloruro 4-bromofenil-acetílico (19,65 mmol; 1,1 equivalente) a esta temperatura. Bajo agitación vigorosa, se añadió gota a gota una solución de $TiCl_4$ (23 ml; 1M; 23,2 mmol; 1,3 equivalente) en CH_2Cl_2 y la agitación se continuó durante 20 minutos. Cuando la reacción se apagó con H_2O (100 ml), se retiró el baño frío y la mezcla se dejó calentar hasta temperatura ambiente. A continuación se diluyó con H_2O (100 ml) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 veces). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$ y el disolvente se evaporó. El producto crudo obtenido se sometió a purificación por columna (gel de sílice, EtOAc al 10% / hexano). Se obtuvieron 980 mg de 1-benzofurán-2-il-2-(4-bromo-fenil)-etanona con un rendimiento del 17%.

[00370] 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 4,34 (s, 2 H) 7,34 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,44 (d, 1 H) 7,58 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H) 7,62 (d, *J*=5,81 Hz, 1 H) 7,67 (s, 1 H) 7,71 (m, 1 H) 7,84 (t, *J*=6,19 Hz, 1 H).

[00371] Paso 15C: Una solución de éster *terc*-butílico del ácido 3-metil-2-(4-tributilestananil-bencensulfonilamino)-butírico (347,5 mg; 0,58 mmol; 1,0 equivalente), 1-benzofurán-2-il-2-(4-bromo-fenil)-etanona (200 mg; 0,64 mmol; 1,1 equivalente) y $Pd(PPh_3)_4$ (66 mg; 0,06 mmol; 10%) en tolueno anhidro (10 ml) se

calentó a reflujo por 7 horas. La reacción se completó según determinación de CCD. El disolvente se extrajo por rotovap, el producto crudo fue purificado por cromatografía de columna (gel de sílice, EtOAc al 20% / n-hexano) y se obtuvo éster terc-butílico del ácido 2-[4'-(2-benzofurán-2-il-2-oxo-etil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico con un rendimiento del 20% (62 mg).

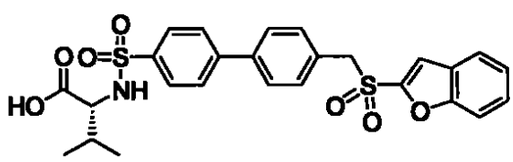
[00372] 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,79 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,95 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,11 (s, 9 H) 3,58 (dd, *J*=9,85, 4,55 Hz, 1 H) 4,26 (s, 2 H) 5,05 (d, *J*=9,85 Hz, 1 H) 7,26 (t, *J*=7,07 Hz, 1 H) 7,43 (m, 5 H) 7,56 (m, 4 H) 7,65 (d, *J*=7,83 Hz, 1 H) 7,81 (d, *J*=8,59 Hz, 2 H).

[00373] Paso 15D: Se disolvió éster terc-butílico del ácido 2-[4'-(2-benzofurán-2-il-2-oxo-etil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico (62 mg) en CH_2Cl_2 anhidro (6 ml) y se añadió con TFA (2 ml). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente por 3 horas. El disolvente se extrajo, el producto crudo se purificó por cromatografía de columna (MeOH al 10% / CH_2Cl_2) y se obtuvo ácido 2-[4'-(2-benzofurán-2-il-2-oxo-etil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico con un rendimiento del 19% (10,7 mg).

[00374] 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,79 (d, *J*=6,82 Hz, 3 H) 0,84 (m, *J*=6,82 Hz, 3 H) 1,97 (m, 1 H) 3,33 (s, 1 H) 4,42 (s, 2 H) 7,39 (t, *J*=7,07 Hz, 1 H) 7,47 (d, *J*=8,34 Hz, 2 H) 7,57 (t, *J*=8,59 Hz, 1 H) 7,73 (m, 3 H) 7,83 (d, 4 H) 7,88 (d, *J*=8,84 Hz, 1 H) 8,13 (s, 1 H) 10,08 (s, 1 H).

[00375] El Ejemplo 3.91 se preparó en base al Esquema 16.

Ejemplo 3.91



Ácido D-2- [4'-(benzofurán-2-sulfonilmetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

000287 213
286

[00376] Paso 16A: Se preparó la materia prima, 2-[1,2,3]tiadiazol-4-il-fenol de acuerdo con el procedimiento publicado (M. A. Abramov, W. Dehaen, B. D'hooge, M. L. Petrov, S. Smeets, S. Toppet y M. Voets Tetrahedron, 2000, 56, *3933-3940*). Se mezcló 2-[1,2,3]tiadiazol-4-il-fenol (241 mg; 1,35 mmol), 2-(4-bromometil-fenil)-4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolano (406 mg; 1,37 mmol; 1 equivalente) y K_2CO3 (396 mg; 2,87 mmol; 1,9 equivalente) en 8 ml de CH_3CN y se calentó a 90°C en atmósfera de nitrógeno. Después de completarse la reacción, monitoreada por CCD, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se evaporó. El material crudo obtenido se sometió a cromatografía de columna (EtOAc al 20% en hexano) y se obtuvo 2-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolán-2-il)-bencilsulfonil]-benzofurano (198 mg) con un rendimiento del 40%. RMN: G8475-125. 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 1,3 (s, 12 H) 4,1 (s, 2 H) 6,6 (d, *J*=1,0 Hz, 1 H) 7,2 (m, 4 H) 7,4 (d, *J*=7,8 Hz, 2 H) 7,7 (d, *J*=8,1 Hz, 2 H).

[00377] Paso 16B: Se realizó acoplamiento de Suzuki de éster metílico del ácido D-2-(4-bromo-bencensulfonilamino)-3-metil-butírico con 2-[4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolán-2-il)-bencilsulfanil]-benzofurano de acuerdo con los procedimientos del Paso 5B para el Ejemplo 2A y se obtuvo éster metílico del ácido D-2-[4'-(benzofurán-2-ilsulfanilmetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico con un rendimiento del 54%. RMN: G8475-165. 1H RMN (400 MHz, BENCENO-D6) δ ppm 0,7 (d, *J*=6,8 Hz, 3 H) 0,9 (d, *J*=6,8 Hz, 3 H) 1,9 (m, 1 H) 3,0 (s, 3 H) 4,0 (m, 3 H) 5,0 (d, *J*=10,1 Hz, 1 H) 6,6 (d, *J*=1,0 Hz, 1 H) 7,1 (m, 4 H) 7,3 (m, 6 H) 7,3 (s, 1 H) 7,4 (m, 1 H).

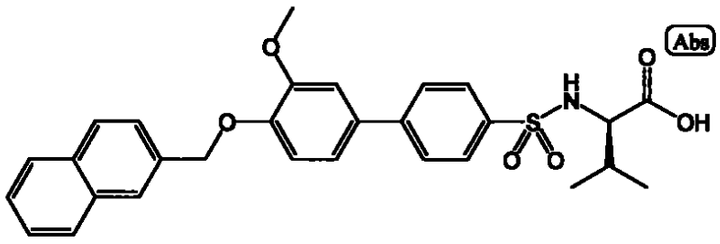
[00378] Paso 16C: Una solución de éster metílico del ácido D-2-[4'-(benzofurán-2-ilsulfanilmetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico (75 mg; 0,15 mmol; 1 equivalente) en 4 ml de THF se colocó en baño de hielo. Se agregaron gota a gota, 125 mg de MCPBA (77%; 0,55 mmol; 3,7 equivalentes) en 3 ml de THF. Después de completarse la adición, se retiró el baño de hielo y se permitió que la reacción se calentara a temperatura ambiente, agitándose por 12 horas. La CCD indicó que la reacción se había completado. Después de procesado regular y de cromatografía de columna (EtOAc al 20% en hexano) se obtuvo éster metílico del ácido D-2-[4'-(benzofurán-2-sulfonilmetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico (56 mg) con un

rendimiento del 70%. RMN: G8475-166. 1H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-D) δ ppm 0,9 (dd, *J*=33,3, 6,8 Hz, 6 H) 2,0 (m, 1 H) 3,4 (s, 3 H) 3,8 (dd, *J*=10,1, 5,3 Hz, 1 H) 4,6 (s, 2 H) 5,1 (d, *J*=10,1 Hz, 1 H) 7,4 (m, 4 H) 7,5 (m, 3 H) 7,6 (m, 1 H) 7,7 (m, 3 H) 7,9 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H).

[00379] Paso 16D: [La hidrólisis del éster metílico del ácido D-2-[4'-(benzofurán-2-sulfonilmetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico se realizó de acuerdo con los procedimientos del Paso 1D para el Ejemplo 1A con rendimiento cuantitativo. 1H RMN (400 MHz, DMSO-D6) δ ppm 0,8 (dd, J=12,1, 6,8 Hz, 6 H) 1,9 (m, 1 H) 3,5 (dd, J=9,3, 6,1 Hz, 1 H) 5,0 (s, 2 H) 7,4 (d, J=8,3 Hz, 2 H) 7,4 (m, 1 H) 7,6 (m, 1 H) 7,7 (d, J=1,0 Hz, 1 H) 7,7 (d, J=8,3 Hz, 2 H) 7,8 (m, 6 H) 8,1 (d, J=9,1 Hz, 1 H).

[00380] Los siguientes compuestos (3.92 y 3.93) se prepararon de acuerdo con el Esquema 6.63.

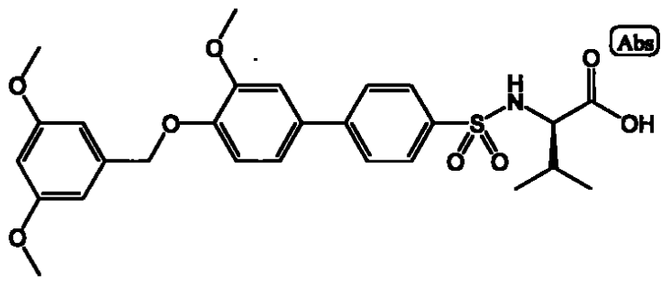
Ejemplo 3.92



Ácido 3-metil-2-[4'-(naftalén-2-ilmetoxi)-3'-metoxi-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,806(d, 3H), 0,837(d, 3H), 1,94(m, 1H), 3,53(t, 1H), 3,90(s, 3H), 5,33(s, 2H), 7,20(d, 1H), 7,27(m, 1H), 7,34(s, 1H), 7,54(d, 2H), 7,61(d, 1H), 7,89(m, 8H); ES^+ m/z 518,2 (M-H); HRMS (C29H29NO6S): calculado; 520,17884; hallado; 520,17839 (M+H).

Ejemplo 3.93

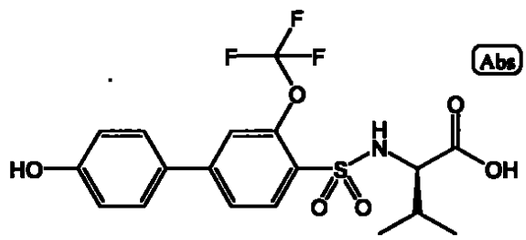


Ácido 2-[4'-(3,5-dimetoxi-benciloxi)-3'-metoxi-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,808(d, 3H), 0,838(d, 3H), 1,94(m, 1H), 3,74(s, 6H), 3,89(s, 3H), 5,09(s, 2H), 6,45(t, 1H), 6,62(d, 2H), 7,11(d, 1H), 7,25(d, 1H), 7,32(d, 1H), 7,79(d, 2H), 7,85(d, 2H), 8,02(d, 1H); ES$^+$ m/z 528,2 (M-H); HRMS (C27H31NO8S): calculado; 530,18432 ; hallado; 530,18367 (M+H).

[00381] Los siguientes compuestos (3.94-3.111) se prepararon usando los procedimientos descritos en el Esquema 17.

Ejemplo 3.94

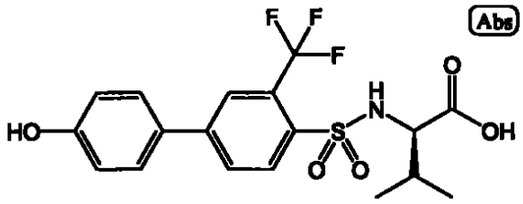


Ácido 2-(4'-hidroxi-3-trifluorometoxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico.

[00382] ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,825(d, 3H), 0,875(d, 3H), 2,04(m, 1H), 3,70(m, 1H), 6,89(d, 2H), 7,59(m, 2H), 7,75(dd, 1H), 7,94(d, 1H), 8,16(d, 1H); ES$^+$ m/z 432,1 (M-H); HRMS (C18H18F3NO6S): calculado; 451,11451; hallado; 451,11461 (M+NH4).

Ejemplo 3.95

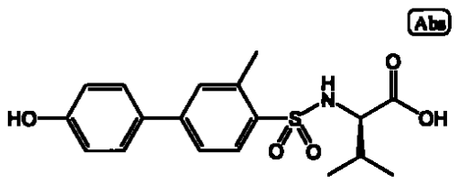
000286 216
289



[00383] Ácido 2-(4'-hidroxi-3-trifluorometil-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,850(m, 6H), 2,02(m, 1H), 3,60(m, 1H), 6,90(d, 2H), 7,67(d, 2H), 8,10(m, 3H); ES$^+$ m/z 416,0 (M-H); HRMS (C18H18F3NO5S): calculado; 435,11960; hallado; 435,11966 (M+NH4).

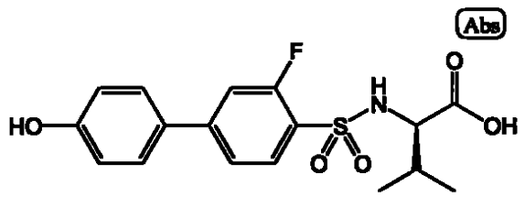
Ejemplo 3.96



Ácido 2-(4'-hidroxi-3-metil-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,810(t, 6H), 1,93(m, 1H), 2,64(s, 3H), 3,39(m, 1H), 6,87(m, 2H), 7,56(m, 3H), 7,81(d, 1H), 8,00(d, 1H); ES$^+$ m/z 362,1 (M-H); HRMS (C18H21NO5S): calculado; 381,14786; hallado; 381,14808 (M+NH4).

Ejemplo 3.97

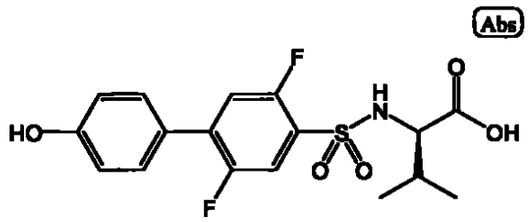


Ácido 2-(3-fluoro-4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico.

000287 2/6 212

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,850(m, 6H), 2,02(m, 1H), 3,63(m, 1H), 6,87(d, 2H), 7,61(m, 3H), 7,76(t, 1H), 8,22(d, 1H); ES$^+$ m/z 366,0 (M-H); HRMS (C17H18FNO5S): calculado; 385,12279; hallado; 385,12276 (M+NH4).

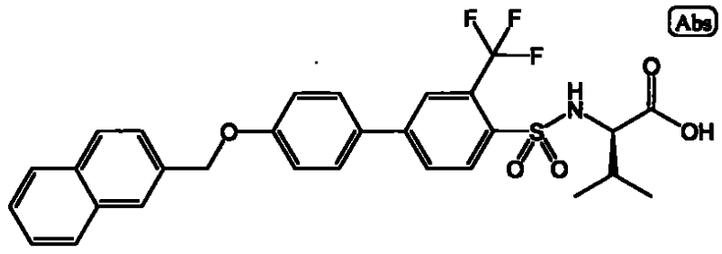
Ejemplo 3.98



Ácido 2-(2,5-difluoro-4'-hidroxi-bifenil-4-sulfonilamino)-3-metil-butírico.

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,880(m, 6H), 2,04(m, 1H), 3,69(m, 1H), 6,89(d, 1H), 7,45(m, 2H), 7,58(m, 2H), 8,45(d, 1H); ES$^+$ m/z 384,1 (M-H); HRMS (C17H17F2NO5S): calculado; 403,1137; hallado; 403,11328 (M+NH4).

Ejemplo 3.99

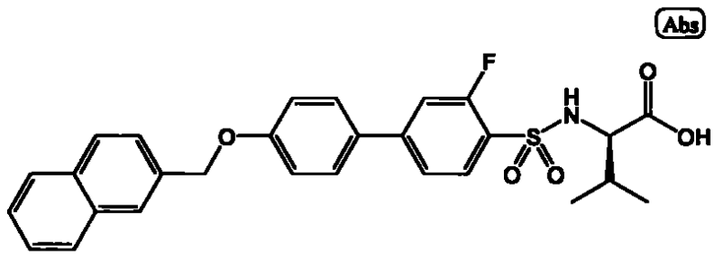


Ácido 3-metil-2-[4'-(naftalén-2-ilmetoxi)-3-trifluorometil-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico.

[00384] ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,900(d, 3H), 0,960(d, 3H), 2,06(m, 1H), 3,70(d, 1H), 4,19(s, 2H), 6,95(d, 1H), 7,43(m, 6H), 7,69(s, 1H), 7,75(m, 3H), 7,88(m, 1H), 7,97(s, 1H), 8,15(d, 1H); ES$^+$ m/z 556,1 (M-H); HRMS (C29H26F3NO5S): calculado; 558,15566; hallado; 558,15484 (M+H).

000288 291 218

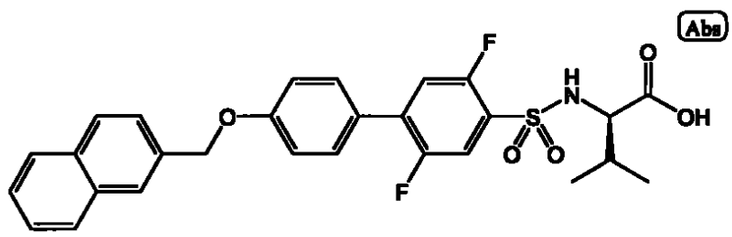
Ejemplo 3.100



Ácido 2-[3-fluoro-4'-(naftalén-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico.

^{1}H RMN (400 MHz, MeOH): δ 0,920(d, 3H), 0,980(d, 3H), 2,10(m, 1H), 3,76(d, 1H), 4,19(s, 2H), 6,94(d, 1H), 7,43(m, 7H), 7,70(s, 1H), 7,78(m, 4H); ES^+ m/z 506,1 (M-H); HRMS (C28H26FNO5S): calculado; 508,15885; hallado; 508,15818 (M+H).

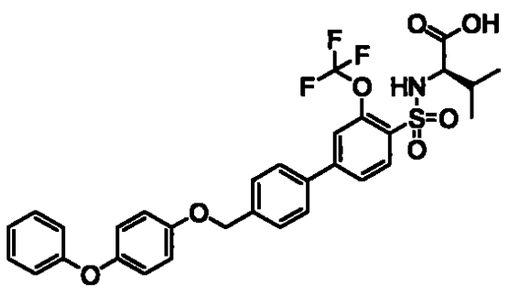
Ejemplo 3.101



Ácido 2-[2,5-difluoro-4'-(naftalén-2-ilmetoxi)-bifenil-4-sulfonilamino]-3-metil-butírico.

^{1}H RMN (400 MHz, MeOH): δ 0,910(d, 3H), 0,980(d, 3H), 2,09(m, 1H), 3,78(d, 1H), 4,16(s, 2H), 6,92(d, 1H), 7,37(m, 6H), 7,56(m, 1H), 7,67(s, 1H), 7,75(m, 4H); ES^+ m/z 524,1 (M-H); HRMS (C28H25F2NO5S): calculado; 526,14943; hallado; 526,14881 (M+H).

Ejemplo 3.102

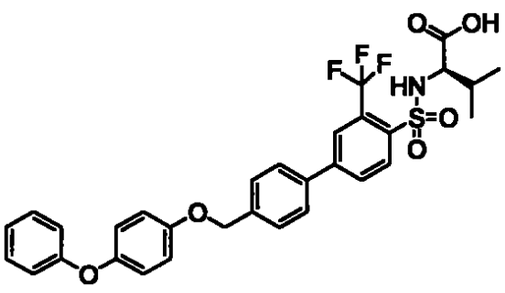


000289 219
292

ES^+ m/z 614,1 (M-H)-HRMS: 616,16053 (M+H)+; 616,16114 Calculado

H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,83 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), ,088 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,06 (m, 1H), 3,74 (dd, 1H, *J* = 5,6, 10Hz), 5,18 (s, 2H), 5,35 (d, 1H, *J* = 10Hz), 6,92 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,00 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,07 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,34 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,61 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,69 (s, 1H), 7,79 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,88 (m, 1H), 8,02 (d, 1H, *J* = 8Hz), 8,24 (m, 1H), 12,70 (s, 1H).

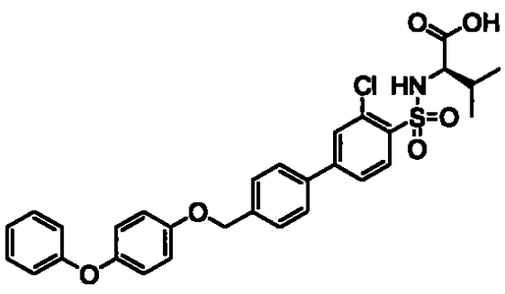
Ejemplo 3.103



ES^+ m/z 598,1 (M-H)-HRMS: 600,16554 (M+H)+; 600,16622 Calculado

H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,85 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 0,86 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,05 (m,

Ejemplo 3.104



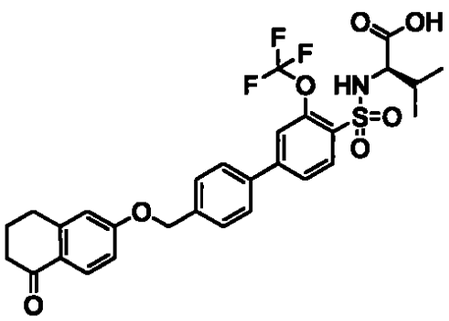
ES^+ m/z 564,1 (M-H)-HRMS: 566,13860 (M+H)+; 566,13987 Calculado

H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,84 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), ,0,86 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,02 (m, 1H), 3,57 (dd, 1H, *J* = 6, 9,2Hz), 5,17 (s, 2H), 6,92 (d, 2H, *J* = 8Hz), 6,99 (d, 2H, *J* = 8Hz),

000290 293 220

7,07 (m, 3H), 7,33 (m, 2H), 7,59 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,83 (m, 5H), 7,95 (d, 1H, *J* = 1,6Hz), 8,03 (d, 1H, *J* = 8Hz), 8,21 (m, 1H), 12,65 (s, 1H).

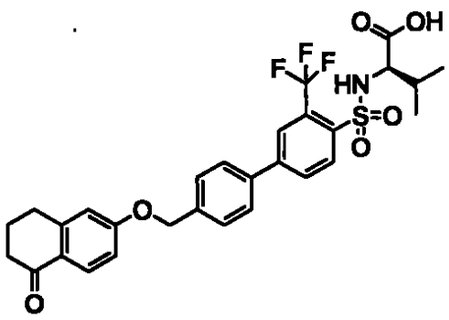
Ejemplo 3.105



ES^+ m/z 590,1 (M-H)-HRMS: 592,16098 (M+H)+; 592,16114 Calculado

^1H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,83 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 0,88 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,05 (m, 3H), 2,53 (t, 2H, *J* = 6Hz), 2,91 (t, 2H, *J* = 6Hz), 3,74 (dd, 1H, *J* = 5,6, 10Hz), 5,28 (s, 2H), 6,98 (m, 2H), 7,60 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,69 (s, 1H), 7,85 (m, 4H), 8,02 (d, 1H, *J* = 8Hz), 8,25 (d, 1H, *J* = 8Hz), 12,70 (s, 1H).

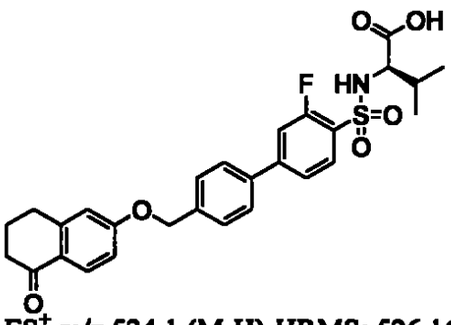
Ejemplo 3.106



ES$^+$ m/z 574,1 (M-H)-HRMS: 576,16522 (M+H)+; 576,16622 Calculado

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,85 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 0,86 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,04 (m, 3H), 2,53 (t, 2H, *J* = 6Hz), 2,91 (t, 2H, *J* = 6Hz), 3,63 (dd, 1H, *J* = 6, 10Hz), 5,29 (s, 2H), 6,98 (m, 2H), 7,61 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,85 (m, 3H), 8,20 (m, 4H), 12,70 (s, 1H).

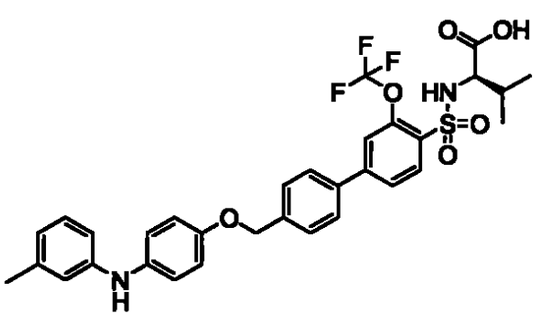
Ejemplo 3.107



ES$^+$ m/z 524,1 (M-H)-HRMS: 526,16859 (M+H)+; 526,16942 Calculado

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,84 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 0,87 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,02 (m, 3H), 2,53 (t, 2H, *J* = 6Hz), 2,91 (t, 2H, *J* = 6Hz), 3,66 (dd, 1H, *J* = 6, 9,2Hz), 5,27 (s, 2H), 6,98 (m, 2H), 7,58 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,70 (m, 1H), 7,83 (m, 5H), 8,30 (d, 1H, *J* = 10Hz), 12,65 (s, 1H).

Ejemplo 3.108

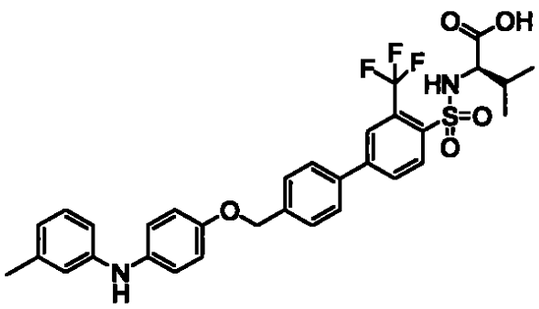


000292 222
295

ES$^+$ m/z 629,2 (M-H)-HRMS: 631,17159 (M+H)+; 631,17204 Calculado

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,83 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 0,88 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,07 (m, 1H), 2,30 (s, 3H), 3,74 (dd, 1H, *J* = 5,6, 9,6Hz), 5,20 (s, 2H), 6,68 (d, 1H, *J* = 8Hz), 6,95 (d, 1H, *J* = 8Hz), 7,06 (m, 4H), 7,62 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,69 (m, 2H), 7,80 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,87 (dd, 1H, *J* = 1,6, 8Hz), 8,03 (d, 1H, *J* = 8Hz), 8,25 (d, 2H, *J* = 9,2Hz), 12,70 (s, 1H).

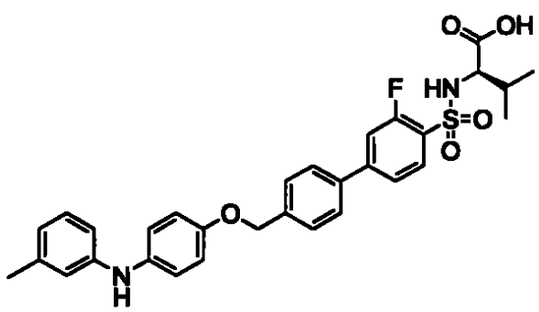
Ejemplo 3.109



ES$^+$ m/z 613,2 (M-H)-HRMS: 615,17639 (M+H)+; 615,17712 Calculado

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,85 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 0,87 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,05 (m, 1H), 2,30 (s, 3H), 3,63 (dd, 1H, *J* = 6, 9,6Hz), 5,20 (s, 2H), 6,68 (d, 1H, *J* = 8Hz), 6,95 (d, 1H, *J* = 8Hz), 7,06 (m, 4H), 7,63 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,69 (t, 1H, *J* = 8Hz), 7,87 (d, 2H, *J* = 8Hz), 8,21 (m, 4H), 12,70 (s, 1H).

Ejemplo 3.110

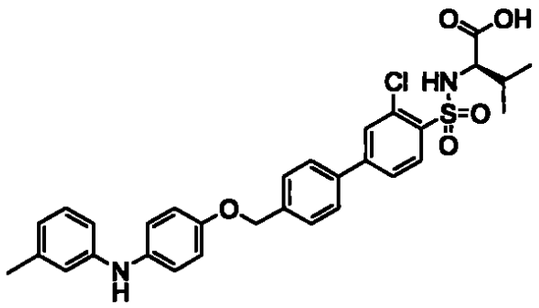


ES$^+$ m/z 563,2 (M-H)-HRMS: 565,18038 (M+H)+; 565,18032 Calculado

000293 296

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,84 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 0,87 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,04 (m, 1H), 2,30 (s, 3H), 3,66 (dd, 1H, *J* = 6, 9,6Hz), 5,19 (s, 2H), 6,68 (d, 1H, *J* = 8Hz), 6,95 (d, 1H, *J* = 8Hz), 7,06 (s, 4H), 7,60 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,70 (m, 2H), 7,83 (m, 4H), 8,31 (d, 1H, *J* = 9,2Hz), 12,70 (s, 1H).

Ejemplo 3.111



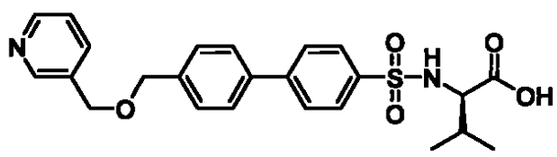
ES$^+$ m/z 579,1 (M-H)-HRMS: 581,15050 (M+H)+; 581,15077 Calculado

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,84 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 0,86 (d, 3H, *J* = 6,8Hz), 2,02 (m, 1H), 2,30 (s, 3H), 3,58 (dd, 1H, *J* = 6,4, 9,6Hz), 5,20 (s, 2H), 6,68 (d, 1H, *J* = 8Hz), 6,95 (d, 1H, *J* = 8Hz), 7,06 (s, 4H), 7,60 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,62 (d, 2H, *J* = 8Hz), 7,83 (m, 3H), 7,95 (d, 1H, *J* = 1,6), 8,03 (d, 1H, *J* = 8Hz), 8,22 (d, 1H, *J* = 9,6Hz), 12,70 (s, 1H).

[00385] Los Ejemplos 112, 113 y 114 se prepararon en base al Esquema 5.

Ejemplo 3.112

Abs

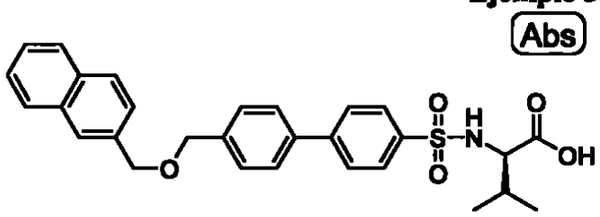


Ácido 3-metil-2-[4'-(piridín-3-ilmetoximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

^{1}H RMN (400 MHz, MeOD): δ; ES$^+$ m/z (M+H) 455,1; HRMS (M+H) m/z calculado 455,16352; hallado 455,16317; ($C_{24}H_{26}N_2O_5S$):

000294
294

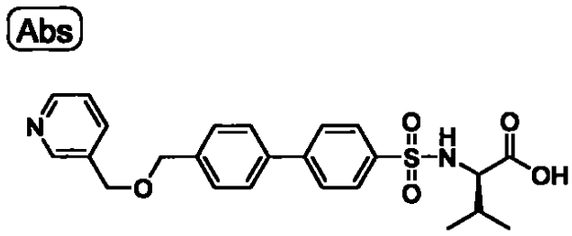
Ejemplo 3.113



Ácido 3-metil-2-[4'-(naftalén-2-ilmetoximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ0,85 (d, 3H), 0,95 (d, 3H), 2,10 (m, 1H), 3,83 (m, 1H), 4,63 (s, 2H), 4,74 (s, 2H), 5,25 (bs, 1H), 7,44-7,55 (m, 7H), 7,65 (d, 2H), 7,82-7,90 (m, 6H); ES^+ m/z (M-H) 502,1; HRMS (M+H) m/z calculado 504,18392; hallado 504,18503; ($C_{29}H_{29}NO_5S$):

Ejemplo 3.114



Ácido 3-metil-2-[4'-(piridín-3-ilmetoximetil)-bifenil-4-sulfonilamino]-butírico

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO): δ 0,81 (d, 3H), 0,84 (d, 3H), 1,95 (m, 1H), 3,55 (dd, 1H), 4,56 (s, 2H), 4,63 (d, 2H), 7,44 (d, 2H), 75,0 (d, 1H), 7,70 (d, 2H), 7,74 (d, 1H), 7,84 (m, 4H), 8,08 (m, 2H); ES^+ m/z (M+H) 455,1; HRMS (M+H) m/z calculado 455,16352; hallado 455,16290; ($C_{24}H_{26}N_2O_5S$).

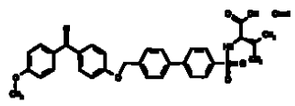
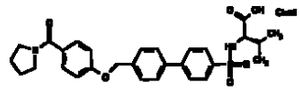
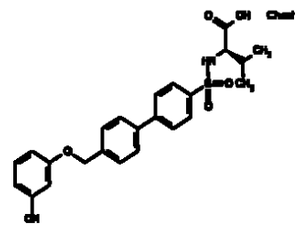
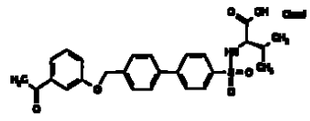
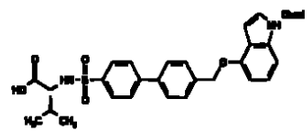
[00386] Ejemplo 4: Inhibición de la actividad de agrecanasa ADAMTS-5 usando los compuestos biarilsulfonamídicos del presente invento:

[00387] Los compuestos biarilsulfonamídicos del presente invento se examinaron para detectar su capacidad para inhibir la actividad de agrecanasa de ADAMTS-4 (Agr-1) y ADAMTS-5 (Agr-2). Los resultados se presentan en la Tabla 1 a continuación, que muestra la concentración de los compuestos en μM que inhiben el 50% de la actividad

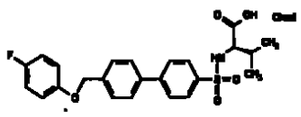
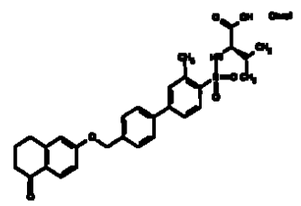
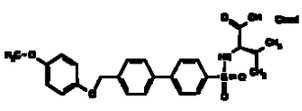
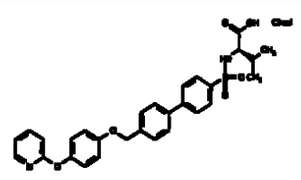
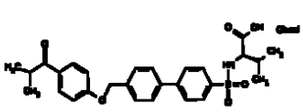
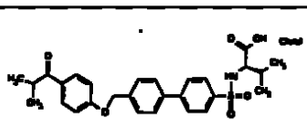
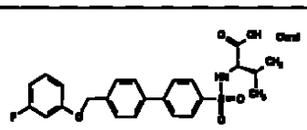
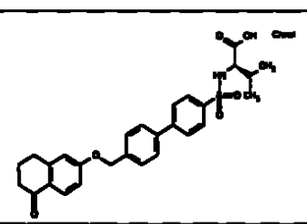
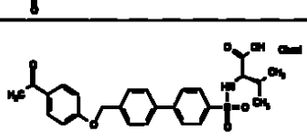
000295 225
298

de agrecanasa de la enzima (CI50). Los compuestos se enumeran de menor a mayor potencia para ADAMTS-5, siendo el último el más potente.

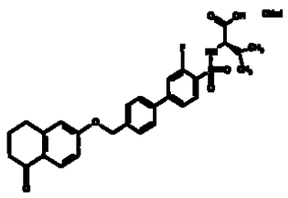
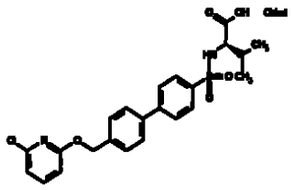
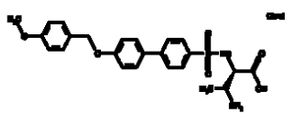
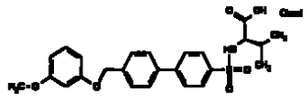
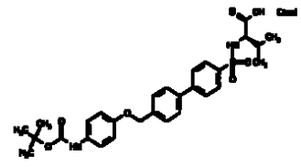
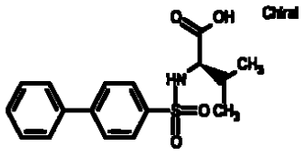
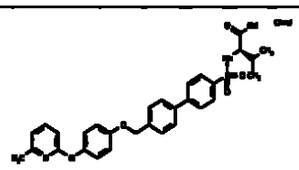
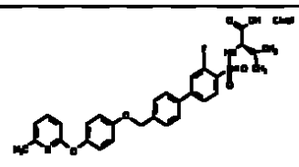
TABLA 1

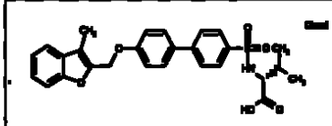
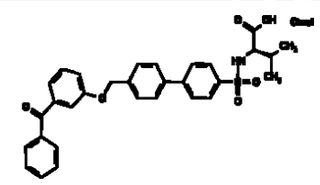
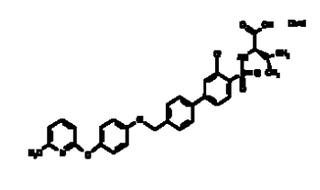
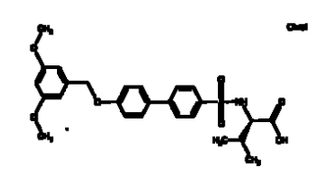
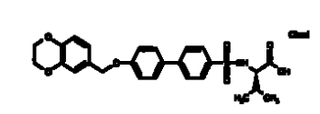
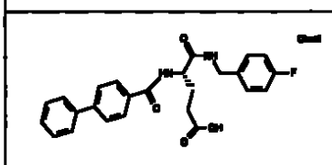
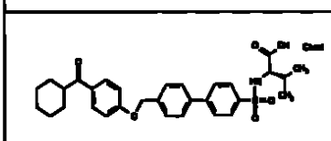
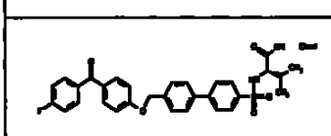
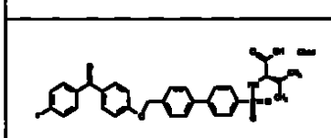
Compuesto	CI50 Agr-1 (uM)	Agr-2 (uM)
	0,1	> 200
	0,3	> 100
	1,9	67,0
	1,1	13,0
	1,0	12,6
	1,9	12,0

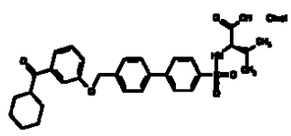
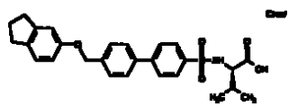
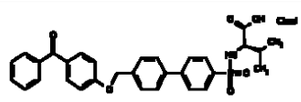
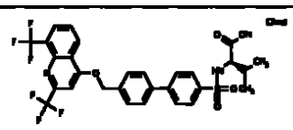
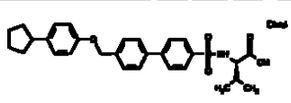
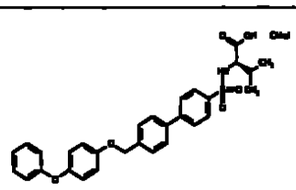
000296 226
289

	1,7	11,3
	0,9	11,2
	1,6	10,7
	0,9	10,6
	0,1	8,4
	0,1	8,4
	1,2	8,2
	0,2	7,5
	0,4	7,0

000297 227
300

	0,2	6,6
	0,4	6,5
	1,9	6,3
	1,8	5,8
	0,6	5,4
	2,6	5,0
	0,7	4,0
	0,9	3,5

	1,1	3,4
	0,2	3,4
	0,9	3,2
	1,9	3,2
	1,4	3,0
	0,2	2,8
	0,1	2,6
	0,1	2,5
	0,1	2,4

	0,4	2,4
	0,4	2,4
	0,2	2,0
	0,2	1,8
	0,4	0,8
	0,4	0,4

[00388] Se usó un ensayo continuo en el cual el sustrato sobre el que actúan Agr-1 y Agr-2 es un péptido sintético que contiene un grupo fluorescente que se apaga por transferencia de energía. La escisión del péptido por la enzima agrecanasa produce un gran aumento en la fluorescencia. Los índices iniciales de la reacción se comparan con los índices iniciales de reacciones que contienen los compuestos biarilsulfonamídicos para evaluar la potencia de inhibición de los compuestos.

[00389] La fuente de enzima en el ensayo es Agrecanasa-2 humana recombinante purificada. Más específicamente, la forma usada se identifica como Ag2t-Phe_{628}-Strep (PM =

000300, 30

303

41.737). Esta forma está truncada en relación con la enzima de longitud completa y contiene una marca de afinidad. Las alícuotas de esta enzima se almacenaron a –80°C en Tris 25 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 5 mM, $ZnCl_2$ 10 µM, glicerol al 10%.

[00390] El sustrato utilizado en el ensayo es un péptido sintético diseñado a partir de una porción de brevicano, uno de los sustratos naturales de Agrecanasa-2. Este péptido, conocido como WAKB-5, contiene el grupo fluorescente 2-aminobenzoílo (Abz) que se apaga por transferencia de energía a un grupo 2,4-dinitrofenilo (Dnp). WAKB-5 (masa = 1740) fue sintetizado especialmente por AnaSpec, Inc. (San José, CA) y demostró >95% de pureza según análisis por CLAR. WAKB-5 tiene la secuencia de Abz-TESESRGAIY-Dap(Dnp)-KK-NH_2. Se prepararon soluciones madre del sustrato con agua MilliQ y se almacenaron alícuotas a -80°C. Se determinó la concentración de este sustrato madre por medio de espectrofotometría con un coeficiente de extinción de 354 nm de 18.172 $M^{-1}cm^{-1}$. Se determinó que los valores de $V_{máx}$ y K_m para esta reacción de enzima / sustrato no eran sensibles a DMSO hasta al menos el 10% (*v/v*).

[00391] El *buffer* utilizado en el ensayo (pH 7,4) estaba compuesto por Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 5 mM, CHAPS al 0,1%, glicerol al 5%. Cada pocillo de placas negras de poliestireno de 96 ó 384 pocillos contenía una reacción compuesta por el *buffer* del ensayo, Agr-2 purificada (diluida con el *buffer* del ensayo) y concentraciones variables de inhibidor (preparado por dilución en serie en DMSO, en placas de polipropileno de 96 pocillos). Las placas se incubaron entonces a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las reacciones enzimáticas se iniciaron añadiendo sustrato hasta una concentración final de 25 µM y se mezclaron desplazando una pipeta hacia arriba y abajo. Los índices iniciales de las reacciones de escisión se determinaron a temperatura ambiente, con un lector de placa de fluorescencia inmediatamente después de añadir el sustrato.

[00392] A continuación se presenta un procedimiento detallado para reacciones de 100 µl en una placa de 96 pocillos, con una concentración final de DMSO del 4% y una concentración final de enzimas de 0,5 µg/ml (una concentración que demostró ser adecuada en la mayoría de los casos): (1) Los compuestos se diluyeron en una placa

de polipropileno de 96 pocillos, con DMSO al 100% hasta 25 veces la concentración final en el ensayo, (2) la Agr-2 se diluyó a 2,083 veces la concentración final (es decir 1,04 µg/ml) en el *buffer* del ensayo, (3) se añadieron 48,0 µl de 2,083X Agr-2 a los pocillos, (4) se transfirieron 4,0 µl de 25X del compuesto a la placa de prueba y los reactivos se mezclaron, (5) las placas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, (6) el sustrato se diluyó a 52,075 µM (2,083X la concentración final) con *buffer* del ensayo, (7) después de 10 minutos antes de la incubación, se añadieron 48,0 µl de 2,083X sustrato y los reactivos se mezclaron bien, (8) las reacciones se controlaron inmediatamente en un lector de placa de fluorescencia a temperatura ambiente en el Tecan Safire con una excitación de 316 nm, amplitud de banda de 12 nm, una emisión de 432 nm y amplitud de banda 12 nm.

[00393] El análisis de los resultados se realizó generando un gráfico del tiempo en función de las unidades de fluorescencia relativas (RFU) para cada muestra. Este gráfico se usó como la "curva de progresión" de la reacción. A continuación se determinó la pendiente de la porción de la curva de progresión que fuese la más lineal. Esta pendiente (RFU/minuto) se usó como el índice inicial de la reacción. Los trazados de la concentración del inhibidor frente al índice de escisión inicial se ajustaron entonces a la siguiente ecuación: $y = V_{máx}*(1-(x^n / (K^n + x^n)))$, donde x = concentración inhibidora, y = índice inicial, $V_{máx}$ = índice inicial en ausencia de inhibidor, n = factor de pendiente, y K = CI_{50} para la curva de inhibición. De esta manera se determinaron los cálculos CI50 presentados en la Tabla 1.

Ejemplo 5: Inhibición de la actividad de agrecanasa ADAMTS-5 usando los anticuerpos contra ADAMTS-5 del presente invento:

[00394] Los anticuerpos contra ADAMTS-5 del presente invento se examinaron para detectar su capacidad para inhibir la actividad de agrecanasa de ADAMTS-4 (Agr-1) y ADAMTS-5 (Agr-2). Los resultados se presentan en la Tabla 2, que muestra las características de cuatro anticuerpos monoclonales generados contra la reactividad demostrada por ADAMTS-5 humano recombinante con ADAMTS-5, pero no con ADAMTS-4 o albúmina sérica bovina (BSA) en un ELISA. Todos los anticuerpos identificaron rhADAMTS-5 mediante el análisis de inmunotransferencia.

232

TABLA 2

Clon	ELISA Longitud completa RhADAMT S-5	ELISA Truncada RhADAMT S-5	ELISA Longitud completa RhADAMT S-5	ELISA Truncada RhADAMT S-5	ELISA Longitud completa RhADAMT S-4	ELISA Longitud completa RhADAMT S-5	ELISA Longitud completa RhADAMT S-4	ELISA BSA	Inmuno-transferencia	Inmuno-transferencia
	6/01/03	6/01/03	6/11/03	6/11/03	6/11/03	6/12/03	6/12/03	BSA	6/25 Reducida	6/26 No reducida
17	2,522	2,645	3,194	3,348	0,067	3,758	0,115	0,094	+	+
18	2,432	2,666	3,107	3,406	0,043	3,839	0,291	0,122	+	+
34	2,589	2,654	3,258	3,328	0,068	3,786	0,207	0,064	+	+
41	2,622	2,627	3,422	3,538	0,276	4,000	0,374	0,104	+	+

P05/2000

Aunque se han descrito lo que se cree son las realizaciones preferidas del invento, los expertos en la tecnología reconocerán que es posible que se realicen otras modificaciones, por ejemplo, para adaptar el invento a diversas condiciones, u otros requisitos, sin apartarse del espíritu del presente invento, como se define en las siguientes afirmaciones.

000304
304

LO QUE SE AFIRMA ES:

1. Un método para tratar una enfermedad asociada con ADAMTS-5 en un sujeto que la presenta que consta de la administración al sujeto de un agente que inhiba a ADAMTS-5.

2. El método de la afirmación 1, donde el agente inhibe la actividad de metaloproteasa de ADAMTS-5.

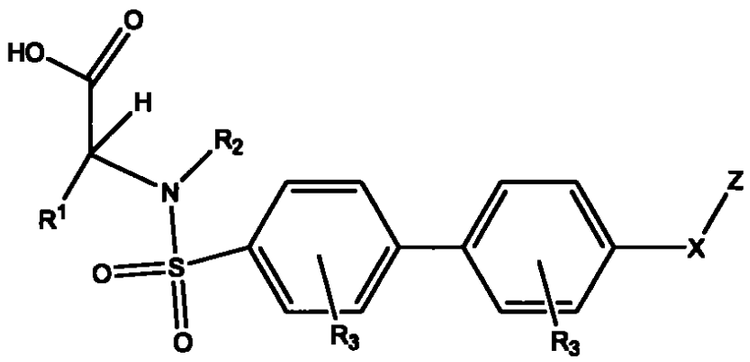
3. El método de la afirmación 1, donde el agente inhibe la actividad de agrecanasa de ADAMTS-5.

4. El método de la afirmación 1, donde la enfermedad asociada con ADAMTS-5 se selecciona a partir del grupo que comprende osteoartritis, cáncer, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica ("EPOC"), ateroesclerosis, degradación macular relacionada con la edad, infarto de miocardio, ulceración corneal y otras enfermedades de la superficie ocular, hepatitis, aneurismas aórticos, tendinitis, enfermedades del sistema nervioso central, cicatrización anormal de heridas, angiogénesis, reestenosis, cirrosis, esclerosis múltiple, glomerulonefritis, enfermedad de injerto contra el huésped, diabetes, enfermedad intestinal inflamatoria, choque, degeneración de disco invertebral, apoplejía, osteopenia, artritis reumatoidea y otras formas de artritis, y enfermedad periodontal.

5. El método de la afirmación 3 ó 4, donde la enfermedad es osteoartritis.

6. El método de la afirmación 5, donde el agente se selecciona a partir del grupo que comprende un anticuerpo contra ADAMTS-5 y un compuesto biarilsulfonamídico.

7. El método de la afirmación 6, donde el compuesto biarilsulfonamídico es un compuesto de fórmula I:



I

donde:

R^1 es H o C1-C6 alquilo;

R^2 es H, C1-C6 alquilo, $(CH_2)_nR^{2'}$, fenilo o bencilo;

n es 0-6;

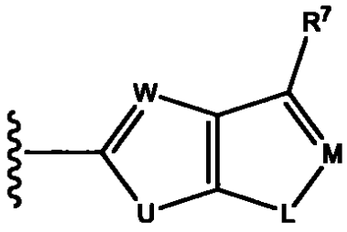
$R^{2'}$ es arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo;

R^3 es, independientemente de cada incidencia, H, halógeno, OC(halógeno)$_3$, C(halógeno)$_3$, alcoxi o C1-C6 alquilo;

X se selecciona a partir de CH_2O, OCH_2, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)_2$-$C(R^3)_2$, $CH_2NHC(=O)$, $O(C=O)NH$, O, $C(=O)CH_2$, $SO_2CH_2C(=O)NH$, SO_2NH, $OC(=O)$, $CH_2S(O)$ y $CH_2S(O)_2$; y

Z es al menos una porción arilo o heteroarilo.

8. El método de la afirmación 7, donde Z es piridina, pirimidina, piracina, piridacina, fenilo, naftaleno, furano, tiofeno, pirrol, pirazol, imidazol, oxazol, isoxazol, tiazol, benzotiazol, quinolina o isoquinolina, o



donde:

U se selecciona a partir de S, O, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)=N$ y $N(R^4)$;

W se selecciona a partir de $C(R^3)$ y N;

M se selecciona a partir de $C(R^3)$ y N;

P 000307
309

L se selecciona a partir de S, O, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)=N$ y $N(R^4)$;

R^4 y R^5 son, independientemente de cada incidencia, una unión al otro, H, C1-C6 alquilo o fenilo;

R^7 se selecciona a partir de una unión a R^3, H, halógeno, $C(halógeno)_3$, NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NHSO_2R^4$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, OR^4, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, fenilo, heteroarilo, C1-C6 alquilo, C2-C6 alquenilo o C2-C6 alquinilo, y

R^8 se selecciona a partir de H, fenilo, heteroarilo y C1-C6 alquilo.

9. El método de la afirmación 8, donde R^7 se sustituye con NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NHSO_2R^4$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, OR^8, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, fenilo o heteroarilo.

10. El método de la afirmación 8, donde R^8 se sustituye con NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NHSO_2R^4$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, OR^8, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, fenilo o heteroarilo.

11. El método de la afirmación 7 donde R^1 es H o alquilo ramificado.

12. El método de la afirmación 7 donde R^1 es isopropilo.

13. El método de la afirmación 7 donde R^3 es halógeno, CF_3, OCH_3, o CH_3.

14. El método de la afirmación 7 donde X es CH_2O, OCH_2, $C(R^3)=C(R^3)$ o $CH_2NHC(=O)$.

15. El método de la afirmación 7 donde R^7 es CH_3, etilo, isopropilo, CF_3, CN u OCH_3.

16. El método de la afirmación 7 donde R^8 es CH3, fenilo y bencilo.

17. El método de la afirmación 7 donde Z es bicíclico.

18. Un método para identificar un agente potencial útil para el tratamiento de una enfermedad asociada con ADAMTS-5-que comprende poner en contacto ADAMTS-5 con el agente potencial y medir la actividad de ADAMTS-5 en presencia del agente potencial, donde una reducción en la actividad indica que el agente potencial es útil para el tratamiento de la enfermedad.

19. El método de la afirmación 18, donde la actividad se selecciona a partir del grupo que comprende actividad de metaloproteinasa y actividad de agrecanasa.

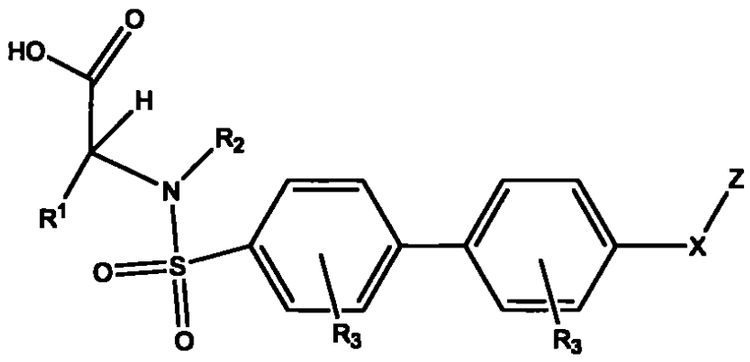
20. El método de la afirmación 18 ó 19, donde ADAMTS-5 está en una célula y la actividad se mide en la célula.

21. El método de la afirmación 20, que comprende además poner en contacto una célula que carece de ADAMTS-5 con el agente potencial, medir la actividad en la célula que carece de ADAMTS-5 y comparar la actividad con la actividad de la célula que posee ADAMTS-5.

22. El método de la afirmación 18, donde la enfermedad asociada con ADAMTS-5 se selecciona a partir del grupo que comprende osteoartritis, cáncer, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica ("EPOC"), ateroesclerosis, degradación macular relacionada con la edad, infarto de miocardio, ulceración corneal y otras enfermedades de la superficie ocular, hepatitis, aneurismas aórticos, tendinitis, enfermedades del sistema nervioso central, cicatrización anormal de heridas, angiogénesis, reestenosis, cirrosis, esclerosis múltiple, glomerulonefritis, enfermedad de injerto contra el huésped, diabetes, enfermedad intestinal inflamatoria, choque, degeneración de disco invertebral, apoplejía, osteopenia y enfermedad periodontal.

23. El método de la afirmación 18, donde la enfermedad asociada con ADAMTS-5 es osteoartritis.

24. Un método para modular la actividad de ADAMTS-5 que comprende poner en contacto a ADAMTS-5 con un compuesto de la fórmula I:



I

000318 38 34

donde:

R^1 es H o C1-C6 alquilo;

R^2 es H, C1-C6 alquilo, $(CH_2)_nR^{2'}$, fenilo o bencilo;

n es 0-6;

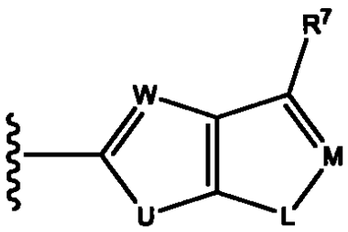
$R^{2'}$ es arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo;

R^3 es, independientemente de cada incidencia, H, halógeno, $OC(halógeno)_3$, $C(halógeno)_3$, alcoxi o C1-C6 alquilo;

X se selecciona a partir de CH_2O, OCH_2, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)_2$-$C(R^3)_2$, $CH_2NHC(=O)$, $O(C=O)NH$, O, $C(=O)CH_2$, $SO_2CH_2C(=O)NH$, SO_2NH, $OC(=O)$, $CH_2S(O)$ y $CH_2S(O)_2$; y

Z es al menos una porción arilo o heteroarilo.

25. El método de la afirmación 24, donde Z es piridina, pirimidina, piracina, piridacina, fenilo, naftaleno, furano, tiofeno, pirrol, pirazol, imidazol, oxazol, isoxazol, tiazol, benzotiazol, quinolina o isoquinolina, o



donde:

U se selecciona a partir de S, O, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)=N$ y $N(R^4)$;

W se selecciona a partir de $C(R^3)$ y N;

M se selecciona a partir de $C(R^3)$ y N;

L se selecciona a partir de S, O, $C(R^3)=C(R^3)$, $C(R^3)=N$ y $N(R^4)$;

R^4 y R^5 son, independientemente de cada incidencia, una unión al otro, H, C1-C6 alquilo o fenilo;

R^7 se selecciona a partir de una unión a R^3, H, halógeno, $C(halógeno)_3$, NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NHSO_2R^4$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, OR^4, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, fenilo, heteroarilo, C1-C6 alquilo, C2-C6 alquenilo o C2-C6 alquinilo, y

R^8 se selecciona a partir de H, fenilo, heteroarilo y C1-C6 alquilo.

000305
3/12

26. El método de la afirmación 25, donde R^7 se sustituye con NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NHSO_2R^4$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, OR^8, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, fenilo o heteroarilo.

27. El método de la afirmación 25, donde R^8 se sustituye con NR^4R^5, $N[(CH_2)_2]_2O$, $N[(CH_2)_2]_2NR^4$, $NHSO_2R^4$, $NR^4C(=O)R^5$, $NHC(=O)OR^4$, NO_2, $SO_2NR^4R^5$, SO_2R^4, OR^8, $C(=O)R^4$, $COOR^4$, $CONR^4R^5$, CN, fenilo o heteroarilo.

28. El método de la afirmación 24 donde R^1 es H o alquilo ramificado.

29. El método de la afirmación 24 donde R^1 es isopropilo.

30. El método de la afirmación 24 donde R^3 es halógeno, CF_3, OCH_3, o CH_3.

31. El método de la afirmación 24 donde X es CH_2O, OCH_2, $C(R^3)=C(R^3)$ o $CH_2NHC(=O)$.

32. El método de la afirmación 24 donde R^7 es CH_3, etilo, isopropilo, CF_3, CN u OCH_3.

33. El método de la afirmación 24 donde R^8 es CH3, fenilo y bencilo.

34. El método de la afirmación 24 donde Z es bicíclico.

35. El método de la afirmación 24, donde la actividad es actividad de metaloproteinasa.

36. El método de la afirmación 35, donde la actividad es actividad de agrecanasa.

37. El método de la afirmación 7 ó 24, donde el compuesto se selecciona a partir del grupo que comprende los compuestos enumerados en la Tabla 1.

38. El método de la afirmación 1 ó 18, donde el agente es un anticuerpo contra ADAMTS-5.

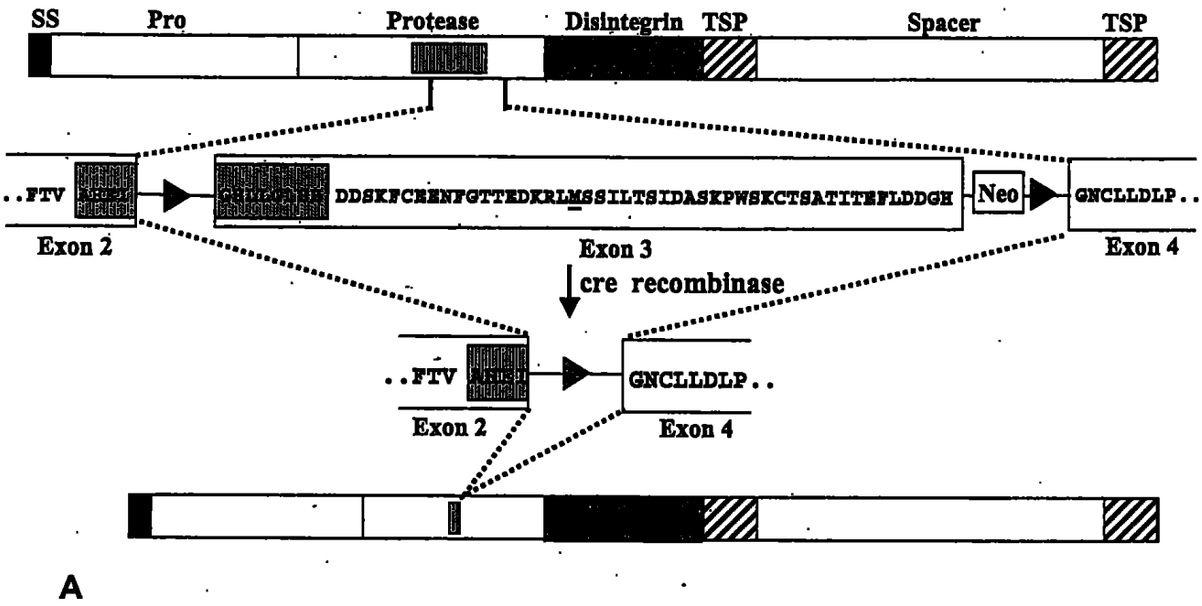
39. El método de la afirmación 38, donde el anticuerpo posee actividad inhibidora de la metaloproteasa.

40. El método de la afirmación 39, donde el anticuerpo posee actividad inhibidora de la agrecanasa.

3/3

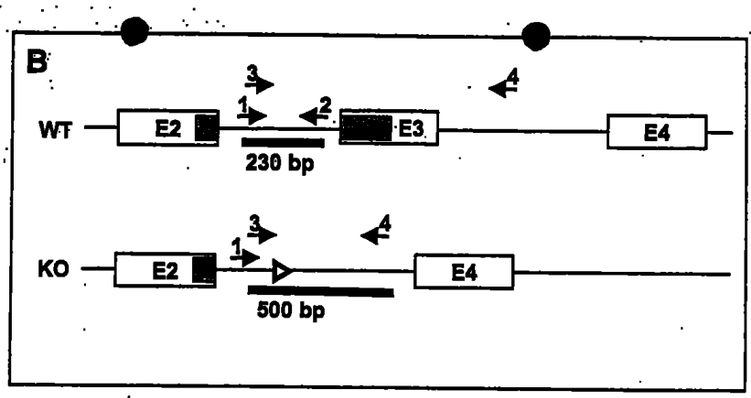
RESUMEN

El presente invento se relaciona con métodos para tratar enfermedades asociadas con ADAMTS-5, en especial la osteoartritis, que consta de la administración de un agente capaz de modular la actividad de ADAMTS-5 a un sujeto que presenta la enfermedad. El agente es preferiblemente un compuesto biarilsulfonamídico. El invento se basa, en parte, en el descubrimiento de que los animales transgénicos que no expresan ADAMTS-5 funcional, muestran una reducción en el grado de osteoartritis luego de la inducción de osteoartritis, cuando se los compara con animales WT. Además, los animales transgénicos ADAMTS-5 presentan actividad reducida de agrecanasa en el tejido articular, en comparación con los animales WT. Estos animales son buenos modelos para las enfermedades asociadas con ADAMTS-5, así como para investigar medicamentos que sirvan para el tratamiento o la prevención de dichas enfermedades. No hay otros modelos animales en los cuales la eliminación de la actividad de un solo gen sea capaz de suprimir la evolución de la osteoartritis. Por lo tanto, estos animales también muestran que la osteoartritis puede prevenirse o tratarse mediante la administración a un sujeto de un agente inhibidor de ADAMTS-5, y particularmente un agente capaz de inhibir la actividad de agrecanasa de ADAMTS-5.


SS
Pro
Protease
Disintegrin
TSP
Spacer
TSP
..FTV
DDSKFCRENFGTTEDKRLMSSILTSIDASKPWSKCTSATITEFLDDGH
Neo
GNCLLDLP..
Exon 2
Exon 3
Exon 4
cre recombinase
..FTV
GNCLLDLP..
Exon 2
Exon 4

A

Figure 1



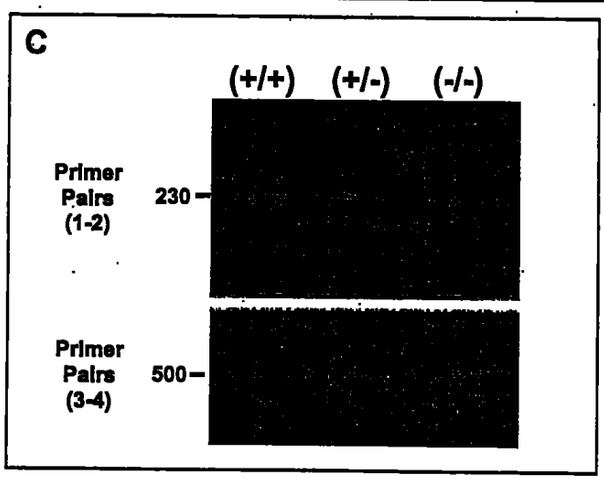
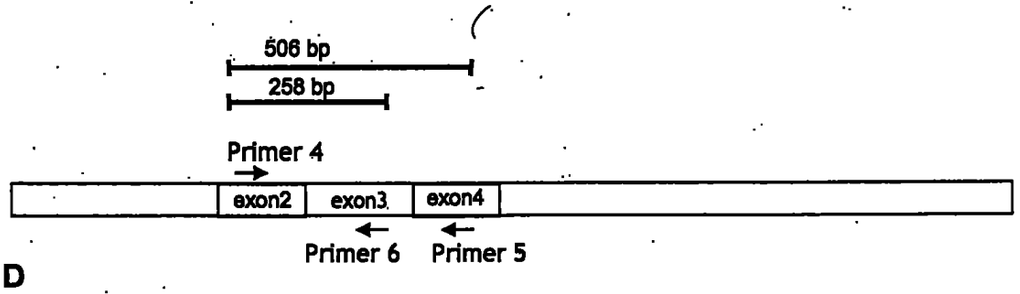
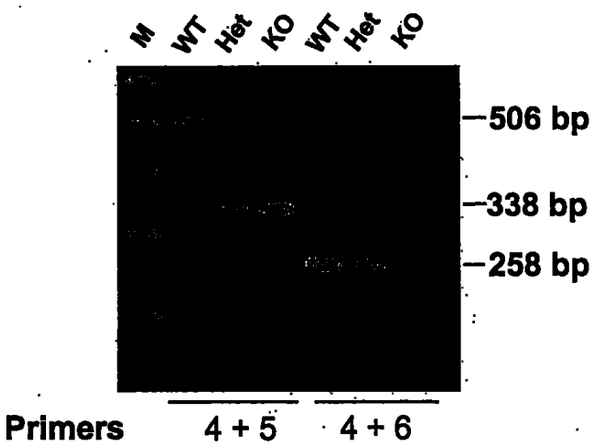


Figure 1

000812/3



D



E

Figure 1

0008400

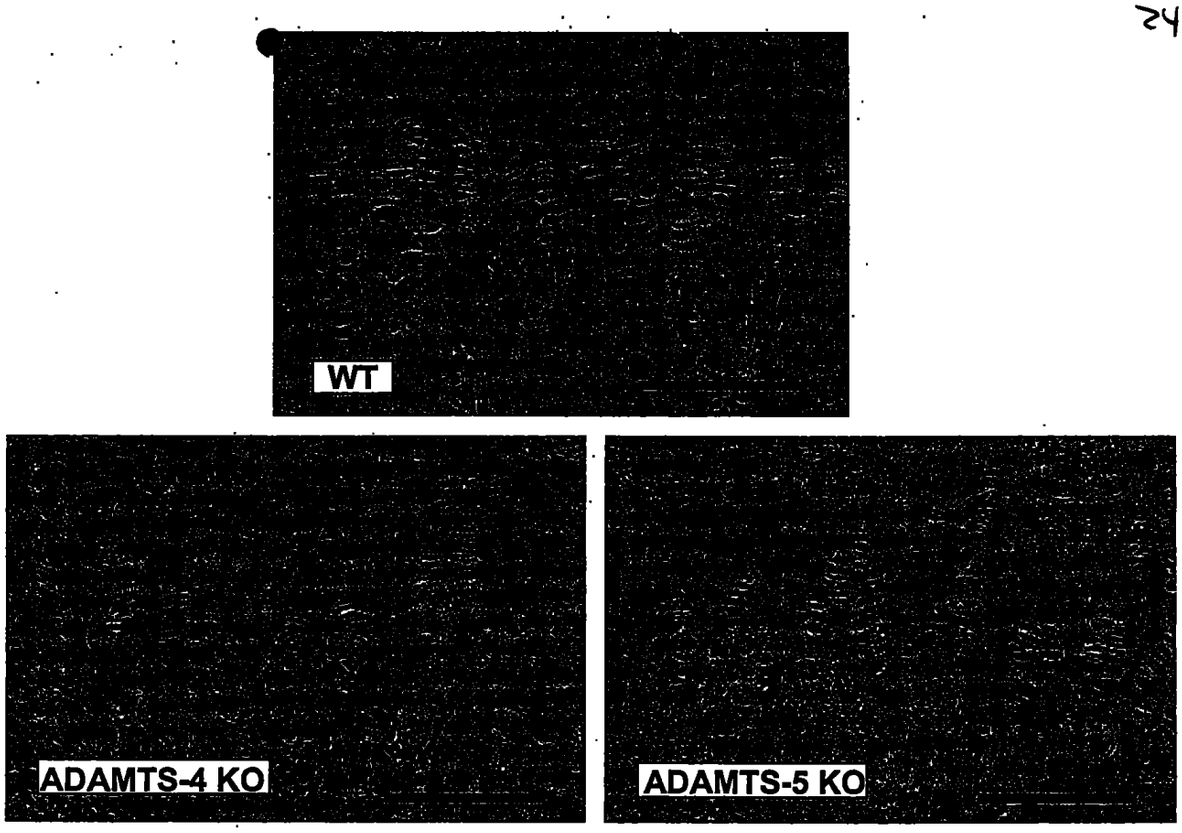


Figure 2

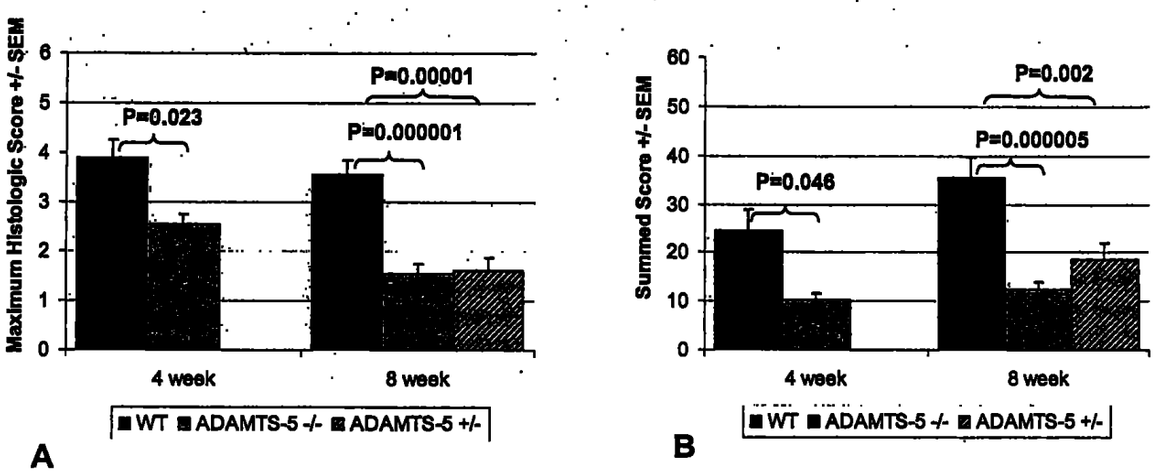

Maximum Histologic Score +/- SEM
6
5
4
3
2
1
0
P=0.023
P=0.00001
P=0.000001
4 week
8 week
WT
ADAMTS-5 -/-
ADAMTS-5 +/-
A
Summed Score +/- SEM
60
50
40
30
20
10
0
P=0.046
P=0.002
P=0.000005
4 week
8 week
WT
ADAMTS-5 -/-
ADAMTS-5 +/-
B

Figure 3

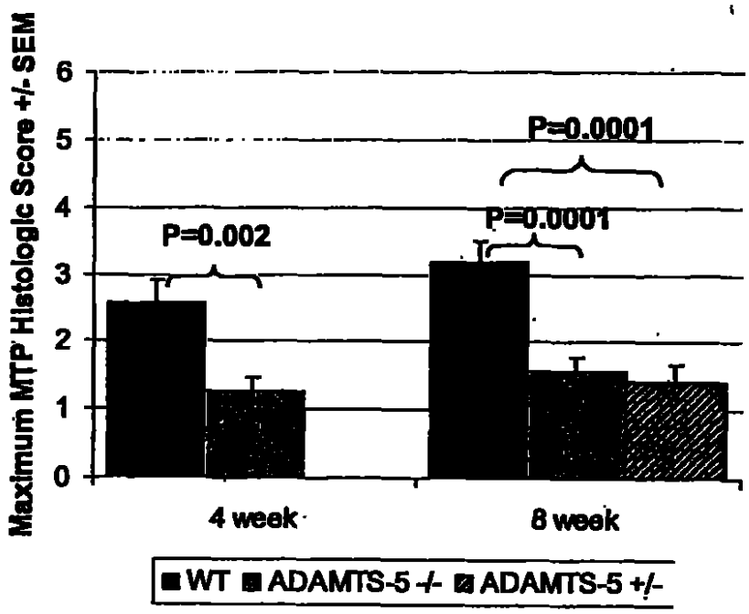
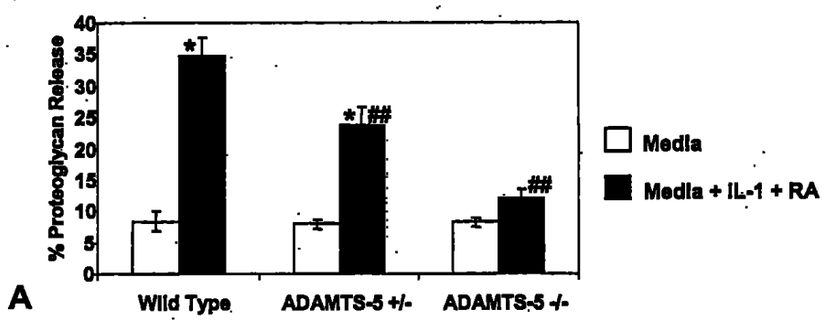

Maximum MTP Histologic Score +/- SEM
6
5
4
3
2
1
0
P=0.0001
P=0.0001
P=0.002
4 week
8 week
WT
ADAMTS-5 -/-
ADAMTS-5 +/-

Figure 4



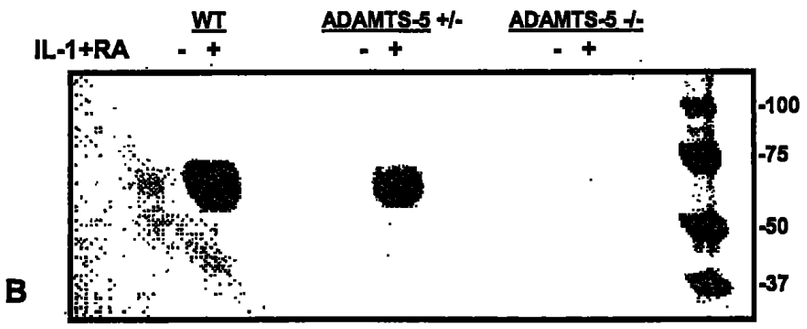


Figure 5

UNIGENE
320

C

Figure 5

0003878121

01997.037000.PC PATENT APPLICATION

IN THE RECEIVING OFFICE OF
THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE (RO/US)

In re Application of:	)	
	:	Authorized Officer: Rebecca Cook
WYETH	)	
	:	
International Application No.: PCT/US04/37169	)	
	:	
Filed: November 8, 2004	)	
	:	
For: METHOD FOR TREATING ADAMTS-5-ASSOCIATED DISEASE	)	
	:	
	)	August 1, 2005

Mail Stop PCT
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

PRELIMINARY AMENDMENT

Sir:

Prior to action on the merits, please amend the above-identified application as follows:

a.) Amendment to the Specification:

Please amend paragraph number 00123 at page 36 to read as follows.

ADAMTS-5 KO mice used in these studies were generated from inbred ~~129SvEv-Brd~~ 129SvEvBrd mice carrying a Cre/LoxP type conditional KO allele of the ADAMTS5 gene (Lexicon Genetics, The Woodlands, TX). The conditional allele contained LoxP sites flanking exon 3 so that Cre recombination resulted in deletion of exon 3, which encodes the majority of the enzyme active site, as shown in Figure 1A. In Figure 1A, exons 2, 3 and 4 are presented in the Sequence Listing as SEQ ID NOS: 1, 2 and 3, respectively.

Please amend paragraph number 00125 at pages 36-37 to read as follows.

Genotyping for alleles of the ADAMTS-5 gene was performed by PCR using DNA template from crude proteinase K digest of tail biopsies. The wild type and heterozygous KO alleles were identified by PCR using a forward primer of the sequence (5'TGT TCA CCC AAA GCA ACT AC3') ~~(primer 1)~~ (primer 1, SEQ ID NO:4) and a reverse primer of the sequence (5'TAG AGG AGA GGA GAG GAG G3') ~~(primer 2)~~ (primer 2, SEQ ID NO:5). These primers flanked the insertion site of the (5') LoxP site producing a 230 bp amplicon in the WT and heterozygous animals and no amplicon in the KO animals (Figure 1B, C). The knockout allele was identified using the forward primer (5'GTG AAC CAC ATG GAC TTT GG3') ~~(primer 3)~~ (primer 3, SEQ ID NO:6) and the reverse primer (5'TCG TAG CAA ACA CCC ACC TG3') ~~(primer 4)~~ (primer 4, SEQ ID NO:7) resulting in a 500 bp PCR product of the exon 3 deleted (KO) allele (figure 1B,C).

Please amend paragraph number 00126 at page 37 to read as follows:

Total RNA was prepared from WT and KO mice spleen using the RNAeasy kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. The quality of the RNA samples were confirmed in an RNA 6000 Nano assay using a Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). PCR primers were designed and synthesized (BioSource International, Camarillo, CA) as follows:

Primer 5, 5'CGACCCTCAAGAACTTTTGC3'; ~~SEQ ID NO:4~~ SEQ ID NO:8

Primer 6, 5'CTCAGGCCCAAATGTCAAGT3'; ~~SEQ ID NO:5~~ SEQ ID NO:9

Primer 7, 5'CGTCATGAGAAAGGCCAAGT3'; ~~SEQ ID NO:6~~ SEQ ID NO:10.

RT-PCR was performed by using Qiagen OneStep RT-PCR kit with a 600 nM concentration of each primer and 200 ng of total RNA in a DNA Engine Dyad thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA). The RT-PCR was run for 30 min at 50°C, 15 min at 95°C, and 35 cycles of 15 seconds at 95°C, 1 min at 59°C, and 30 seconds at 72°C. The RT-PCR primers are shown in Figure 1D and the RT-PCR products are shown in Figures 1E and 1F. Using primers 5 and 6, Figure 1E shows that the mRNA of the WT is 506 bp and the KO is 338 bp. Using primers 5, 4 and 7, Figure 1F shows that the mRNA of the WT is 258 bp and there is no product, as expected, in the KO because primer 7 is located in exon 3 which is deleted in the KO.

Please amend paragraph number 00390 at page 136 to read as follows.

The substrate in the assay is a synthetic peptide that is designed after a portion of brevican, one of the naturally occurring substrates of Aggrecanase-2. This peptide, denoted as WAKB-5, contains the fluorescent group 2-aminobenzoyl (Abz) that is quenched by energy transfer to a 2,4-dinitrophenyl group (Dnp). WAKB-5 (mass = 1740) was custom synthesized by AnaSpec, Inc. (San Jose, CA) and was >95% pure based on

HPLC analysis. WAKB-5 has the sequence of Abz-TESESRGAIY-Dap(Dnp)-KK-NH_2 (SEQ ID NO:11) Stock solutions of the substrate were prepared with MilliQ water and aliquots were stored at –80°C. The concentration of this substrate stock was spectrophotometrically determined using the extinction coefficient at 354nm of 18,172 $M^{-1}cm^{-1}$. The V_{max} and K_m for this enzyme/substrate reaction were determined to be insensitive to DMSO up to at least 10% (*v/v*).

000323 3/26

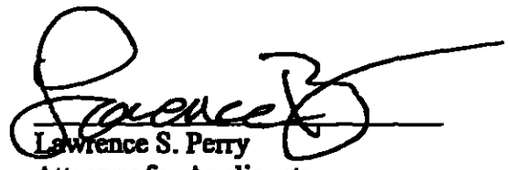
b.) Remarks

The specification has been amended to label the disclosure herein in conformity with the accompanying Sequence Listing. Substitute sheets presenting clean copies of the amended text are attached as well. No new matter is added.

Entry hereof is earnestly solicited.

Applicants' undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our below listed address.

Respectfully submitted,



Lawrence S. Perry
Attorney for Applicants
Registration No. 31,865

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
Facsimile: (212) 218-2200

LSP\ac

NY_Main 515352_1

ADAMTS-5, the presence or absence of cleaved product in the ADAMTS-5 animals may be assessed. The cleaved product will be substantially reduced or absent in the transgenic animals.

[00122] The following examples are offered to illustrate, but not to limit the present invention.

EXAMPLES

Example 1: Materials and Methods

Generation of ADAMTS5 KO mice

[00123] ADAMTS-5 KO mice used in these studies were generated from inbred 129SvEvBrd mice carrying a Cre/LoxP type conditional KO allele of the ADAMTS5 gene (Lexicon Genetics, The Woodlands, TX). The conditional allele contained LoxP sites flanking exon 3 so that Cre recombination resulted in deletion of exon 3, which encodes the majority of the enzyme active site, as shown in Figure 1A. In Figure 1A, exons 2, 3 and 4 are presented in the Sequence Listing as SEQ ID NOS: 1, 2 and 3, respectively.

[00124] Mice carrying the ADAMTS-5 conditional KO allele were created by homologous recombination in ES cells followed by blastocyst injection to generate chimeric mice. The ADAMTS-5 KO mouse line was produced by crossing conditional KO mice with Protamine-Cre transgenic mice (provided by Lexicon Genetics) which resulted in Cre mediated deletion of exon 3 in the sperm of male offspring carrying both the mutant ADAMTS-5 and Prot-Cre alleles, as shown in Figure 1B.

Genotyping for ADAMTS5 WT, conditional KO and KO alleles

[00125] Genotyping for alleles of the ADAMTS-5 gene was performed by PCR using DNA template from crude proteinase K digest of tail biopsies. The wild type and heterozygous KO alleles were identified by PCR using a forward primer of the sequence (5'TGT TCA CCC AAA GCA ACT AC3') (primer 1; SEQ ID NO:4) and a reverse primer of the sequence (5'TAG AGG AGA GGA GAG GAG G3') (primer 2; SEQ ID NO:5). These primers flanked the insertion site of the (5') LoxP site

producing a 230 bp amplicon in the WT and heterozygous animals and no amplicon in the KO animals (Figure 1B, C). The knockout allele was identified using the forward primer (5'GTG AAC CAC ATG GAC TTT GG3') (primer 3; SEQ ID NO:6) and the reverse primer (5'TCG TAG

CAA ACA CCC ACC TG3') (primer 4 SEQ ID NO:7) resulting in a 500 bp PCR product of the exon 3 deleted (KO) allele (figure 1B,C).

Preparation of RNA for RT-PCR:

[00126] Total RNA was prepared from WT and KO mice spleen using the RNAeasy kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. The quality of the RNA samples were confirmed in an RNA 6000 Nano assay using a Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). PCR primers were designed and synthesized (BioSource International, Camarillo, CA) as follows:
Primer 5, 5'CGACCCTCAAGAACTTTTGC3'; SEQ ID NO:8
Primer 6, 5'CTCAGGCCCAAATGTCAAGT3'; SEQ ID NO:9
Primer 7, 5'CGTCATGAGAAAGGCCAAGT3'; SEQ ID NO:10.
RT-PCR was performed by using Qiagen OneStep RT-PCR kit with a 600 nM concentration of each primer and 200 ng of total RNA in a DNA Engine Dyad thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA). The RT-PCR was run for 30 min at 50°C, 15 min at 95°C, and 35 cycles of 15 seconds at 95°C, 1 min at 59°C, and 30 seconds at 72°C. The RT-PCR primers are shown in Figure 1D and the RT-PCR products are shown in Figures 1E and 1F. Using primers 5 and 6, Figure 1E shows that the mRNA of the WT is 506 bp and the KO is 338 bp. Using primers 5, 4 and 7, Figure 1F shows that the mRNA of the WT is 258 bp and there is no product, as expected, in the KO because primer 7 is located in exon 3 which is deleted in the KO.

Histology and pathologic assessment of young and aged mice:
[00127] Complete necropsies were performed on 22 WT and 20 ADAMTS-5 KO males at 18 weeks of age. Necropsies included macroscopic observations, body and organ weights, hematology, complete serum chemistry and microscopic examination of brain, joints, heart, lungs, thymus, spleen, liver, kidneys, salivary glands, mandibular lymph nodes, testes, epididymides, eyes, harderian glands, lacrimal glands, sternum, and humerus. All tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin, decalcified if mineralized, routinely processed, paraffin-embedded and prepared as routine hematoxylin and eosin-stained sections. All slides were evaluated by a board-certified veterinary pathologist (BS) for presence or absence of pathologic lesions.

enzyme were stored at –80°C in 25mM Tris (pH 8.0), 100mM NaCl, 5mM $CaCl_2$, 10μM $ZnCl_2$, 10% glycerol.

[00390] The substrate in the assay is a synthetic peptide that is designed after a portion of brevican, one of the naturally occurring substrates of Aggrecanase-2. This peptide, denoted as WAKB-5, contains the fluorescent group 2-aminobenzoyl (Abz) that is quenched by energy transfer to a 2,4-dinitrophenyl group (Dnp). WAKB-5 (mass = 1740) was custom synthesized by AnaSpec, Inc. (San Jose, CA) and was >95% pure based on HPLC analysis. WAKB-5 has the sequence of Abz-TESESRGAIY-Dap(Dnp)-KK-NH_2 (SEQ ID NO:11). Stock solutions of the substrate were prepared with MilliQ water and aliquots were stored at –80°C. The concentration of this substrate stock was spectrophotometrically determined using the extinction coefficient at 354nm of 18,172 $M^{-1}cm^{-1}$. The V_{max} and K_m for this enzyme/substrate reaction were determined to be insensitive to DMSO up to at least 10% (*v/v*).

[00391] The assay buffer (pH 7.4) consisted of 50mM Hepes, 100mM NaCl, 5mM $CaCl_2$, 0.1% CHAPS, 5% glycerol. Each well of black polystyrene 96-well or 384-well plates contained a reaction consisting of assay buffer, purified Agg-2 (diluted with assay buffer), and varied concentrations of inhibitor (prepared by serial dilution in DMSO in 96-well polypropylene plates). The plates were then incubated at room temperature for 10 minutes. The enzymatic reactions were initiated by adding substrate to a final concentration of 25μM and were mixed by pipetting up and down. The initial rates of the cleavage reactions were determined at room temperature with a fluorescence plate reader immediately after substrate addition.

[00392] A detailed procedure for 100 μl reactions in a 96-well plate with a final DMSO concentration of 4% and a final enzyme concentration of 0.5 μg/ml (a concentration found to be suitable in most cases) is as follows: (1) the compounds were diluted in a 96-well polypropylene plate with 100% DMSO to 25X final concentration in the assay, (2) the Agg-2 was diluted to 2.083X final concentration (i.e., 1.04 μg/ml) in assay buffer, (3) 48.0 μl of 2.083X Agg-2 was then added to the wells, (4) 4.0 μl of 25X compound was transferred to the assay plate and the reagents

were mixed, (5) the plates were incubated for 10 minutes at room temperature, (6) the substrate was diluted to 52.075 μM (2.083X final concentration)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 1997.37000.PC	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US04/37169	International filing date (*day/month/year*) 08 November 2004 (08.11.2004)	(Earliest) Priority Date (*day/month/year*) 04 December 2003 (04.12.2003)
Applicant WYETH		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the Report
   a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
      ☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).
   b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.
2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)
3. ☒ Unity of invention is lacking (See Box No. III)
4. With regard to the title,
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,
   ☐ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☒ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,
   a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1
      ☒ as suggested by the applicant.
      ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
      ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
   b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/37169

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

3/31/2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/37169

Box IV TEXT OF THE ABSTRACT (Continuation of Item 5 of the first sheet)

NEW ABSTRACT

The present invention relates to methods of treating ADAMTS-5-associated diseases and particularly osteoarthritis comprising administering an agent capable of modulating ADMATS-5 activity to a subject afflicted with the disease. The agent is preferably a biaryl sulfonamide compound. The invention is based, in part, on the discovery that transgenic animals that do not express functional ADAMTS-5 show a reduction in the degree of osteoarthritis after the induction of osteoarthritis as compared to WT animals. Furthermore, the ADAMTS-5 transgenic animals have reduced aggrecanase activity in articular tissue as compared to WT animals. These animals are good models for ADAMTS-5-associated diseases, and for screening of drugs useful in the treatment and/or prevention of these diseases. There are no other animal models in which the deletion of the activity of a single gene is capable of abrogating the course of osteoarthritis. Accordingly, these animals also show that osteoarthritis can be prevented and/or treated by administering to a subject an ADAMTS-5 inhibitory agent and particularly an agent capable of inhibiting the aggrecanase activity of ADAMTS-5. Figure 1 illustrates the targeted disruption of the murine ADAMTS-5 gene.

000332

335 1/6 V

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/37169

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : A61K 31/19, 31/47, 31/54, 31/425; C12N 9/50, 9/64
US CL : 435/219, 226; 514/227.5, 228.2, 314, 369, 575
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 435/219, 226; 514/227.5, 228.2, 314, 369, 575

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Database HCAPLUS on STN (Columbus, OH, USA) DN 134:305005, Sing W et al, 'Arylalkylidene rhodanine with bulky and hydrophobic functional group as selective HCV NS3 protease inhibitor,' Bioorganic & Med Chem Let, 2001, 11(2) 91-94, abstract.	1-40
A	Database HCAPLUS on STN (Columbus, OH, USA) DN 137:183746, Malfait A et al, 'Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage,' J Biol Chem, 2002, 277(25) 22201-22208, abstract.	1-40
X	Database WPIX on STN (Columbus, OH, USA) AN 2003-229434, Balhorn R et al, 'Use of hydroxamic acid thrombospondin peptide analog compounds for treating diseases involving cartilage degradation, e.g.osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and septic arthritis in humans,' WO 2003005956 A2, 20030123, abstract.	1-6, 38-40
X	US 6,376,665 B1 (DUAN et al) 23 April 2002 (19.04.2002), column 1, lines 25-61.	1-6, 38-40
X	Database HCAPLUS on STN (Columbus, OH, USA) DN 139:175864, Georgiadis, K et al, 'Truncated aggrecanse-1 and aggrecanse-2enzymes with increased stability and higher levels of expression,' WO 2003066822 A2, 20030814, abstract.	18-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 June 2005 (25.06.2005)	19 AUG 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Robert Cook Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/37169

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,391,610 B1 (APTE et al) 21 May 2002 (25.05.2002) column 6, lines 17-27.	18-23

3/37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US04/37169

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

Group I, claim(s) 1-17 and 24-40, each in part, drawn to a method of treating an ADAMTS-5 associated disease comprising administering agent which inhibits ADAMTS-5 when the agent is an anti-ADAMTS-5 antibody.

Group II, claim(s) 1-17 and 24-40, each in part, drawn to a method of treating an ADAMTS-5 associated disease comprising administering agent which inhibits ADAMTS-5 when the agent is a biaryl sulfonamide compound.

Group III, claim(s) 18-23, drawn to a screening method.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:
the compounds of Group I and Group II are separate and distinct and do not share the same structural features. The methods of Groups I and II are distinct from the method of Group III, since the methods of Groups I and II are to a method of treatment and the method of Group III is to a screening method.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
REGISTRY, CAPLUS, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS; ADAMTS5 or ADAMTS-5, Aggrecanase 2, metalloproteinase, osteoarthritis, screen? activit? treat?

000335

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
LAWRENCE S. PERRY
FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 ROCKEFELLER PLAZA
NEW YORK, NY 10112-3801

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing (*day/month/year*)	19 AUG 2005
Applicant's or agent's file reference 1997.37000.PC	FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below

International application No.	International filing date (*day/month/year*)	Priority date (*day/month/year*)
PCT/US04/37169	08 November 2004 (08.11.2004)	04 December 2003 (04.12.2003)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

IPC(7): A61K 31/19, 31/47, 31/54, 31/425; C12N 9/50, 9/64 and US Cl.: 435/219, 226; 514/227.5, 228.2, 314, 369, 575

Applicant

WYETH

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I — Basis of the opinion
- ☐ Box No. II — Priority
- ☐ Box No. III — Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV — Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V — Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI — Certain documents cited
- ☐ Box No. VII — Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII — Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(*b*) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/ US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Rebecca Cook Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (January 2004)

FILE NO. 1997.37000 PCT
ATTORNEY LSP
DUE DATE 11/19/05
DOCKETED VMG 8/25/05

000336

359
266

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US04/37169

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material

☐ a sequence listing

☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐ in written format

☐ in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐ contained in international application as filed.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

000337

340
267

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US04/37169

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has:
   - ☒ paid additional fees
   - ☐ paid additional fees under protest.
   - ☐ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
   - ☐ complied with
   - ☒ not complied with for the following reasons:

   See the lack of unity section of the International Search Report(Form PCT/ISA/210)

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:
   - ☒ all parts.
   - ☐ the parts relating to claims Nos. ____.

000358

341/30
2G

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US04/37169

Box No. V Reasoned statement under Rule 43 *bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims 7-17, 24-37	YES
	Claims 1-6, 18-23, 38-40	NO
Inventive step (IS)	Claims 7-17, 24-37	YES
	Claims 1-6, 18-23, 38-40	NO
Industrial applicability (IA)	Claims 1-40	YES
	Claims NONE	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-6 and 38-40 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by U.S. A 6,376,665. 6,376,665 (column 3, lines 25-62, column 12, lines 55-64) discloses a method for treating and ADAMTS-5 associated disease by administering an agent which inhibits the metalloprotease activity and the aggrecanase activity of ADAMTS-5.

Claims 1-6 and 38-40 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by WPIX AN 2003-229434. PIX AN 2003-229434 (abstract) discloses a method for treating and ADAMTS-5 associated disease by administering an agent which inhibits the metalloprotease activity and the aggrecanase activity of ADAMTS-5.

Claims 18-23 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by HCAPLUS DN 139:175864. 139:175864 (abstract) discloses a method for identifying a potential agent useful for the treatment of an ADAMTS-5-associated disease.

Claims 18-23 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by U.S. A 6,391,610. 6,391,610 (column 6, lines 20-23) discloses a method for identifying a potential agent useful for the treatment of an ADAMTS-5-associated disease.

Claims 7-17 and 24-37 meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3), because the prior art does not teach or fairly suggest a method of using the biaryl sulfonamide compound for treating and ADAMTS-5 associated disease by administering an agent which inhibits the metalloprotease activity and the aggrecanase activity of ADAMTS-5.

Claims 1-40 the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus find industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.