

DERIVADOS DE S-ALANINATO SUSTITUIDOS

La invención se refiere a derivados de S-alaninato sustituidos y a procesos para su preparación, así como a su uso para preparar medicamentos para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades, en particular trastornos vasculares, de modo preferente trastornos trombóticos o tromboembólicos y/o complicaciones trombóticas o tromboembólicas.

- La hemostasia es el mecanismo crucial para proteger a los organismos de pérdidas de sangre excesivas y potencialmente mortales después de una lesión, que cierra las fugas en la pared del vaso arterial o venoso de forma rápida y fiable con un coágulo formado principalmente por una red de fibrina y plaquetas. La formación de fibrina se inicia en el sitio de la lesión, cuando el factor de tejido subendotelial se expone a la sangre después del daño de las células endoteliales y desencadena una cascada de reacciones enzimáticas complejas, en las que un factor de coagulación de la sangre activado convierte el siguiente zimógeno en su forma de proteasa activa. Tradicionalmente, los primeros pasos de la cascada se dividen en la vía extrínseca (o del factor tisular) y la vía intrínseca (o de activación por contacto), dependiendo de si el desencadenante puede ser el factor tisular unido a varios tipos de células o el factor XII activado en superficies cargadas negativamente. Ambas vías convergen en el nivel de activación del factor X, que es la enzima clave en la generación de trombina. Finalmente, a través de la transformación de una serie de sustratos, la trombina traduce las señales generadas en la cascada al estado de coagulación de la sangre: la trombina escinde el fibrinógeno, lo que conduce a la generación de la red de fibrina, activa el factor XIII a XIIIa, que es necesario para la estabilización del coágulo. Además, la trombina es un potente desencadenante de la agregación plaquetaria (a través de la activación de PAR-1), que también contribuye considerablemente a la formación de coágulos. Al activar TAFI (inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina) a TAFIa en un complejo con trombomodulina, la trombina inhibe la disolución del coágulo. En circuitos de retroalimentación positiva, la activación de los factores V, VIII y XI potencia la producción de trombina y, por tanto, amplifica la reacción de coagulación. Por el contrario, la activación de la proteína C por el complejo de trombina/trombomodulina conduce a la degradación del factor VIIIa en los complejos de tenasa y del factor Va en los complejos de protrombinasa y, por lo tanto, reduce la generación de trombina adicional.
- Los factores de coagulación a menudo existen en complejos sobre superficies, por ejemplo el factor Xa se une en el complejo de protrombinasa con el factor Va. Durante la formación de un coágulo de fibrina, la trombina y la protrombinasa se integran y se unen en la red de fibrina. Estas moléculas enzimáticas permanecen activas y son difíciles de alcanzar por los anticoagulantes endógenos, por ejemplo antitrombina III.
- La hemostasia está sujeta a un mecanismo regulador complejo entre la formación y disolución del coágulo. Si bien la cobertura de la fuga de la pared de un vaso es un procedimiento esencial para prevenir hemorragias, la formación excesiva de coágulos causada por trastornos de la pared del

vaso, como lesiones ateroscleróticas, procesos inflamatorios continuos en la sangre, como en el curso de infecciones, o reducciones en el flujo sanguíneo puede resultar en oclusiones de los vasos, que conducen a eventos de gran peligro para los tejidos circundantes, porque se dificulta el suministro de nutrientes y la eliminación de productos de degradación potencialmente dañinos.

5 Estos coágulos pueden bloquear venas, arterias o vasos linfáticos en el sitio de generación o pueden viajar como émbolos a través de los vasos, hasta que se atascan. Muchos de estos trombos se forman después de trastornos vasculares locales, por ejemplo. ruptura de placas ateroscleróticas o deficiencias del flujo sanguíneo en venas profundas. Estos pueden dar lugar a eventos graves, que pueden ocurrir en cualquier vaso, incluyendo accidente cerebrovascular, infarto de miocardio o

10 embolia pulmonar, que se encuentran entre las principales causas de muerte. En otros casos, la exposición al factor tisular en las células sanguíneas, por ejemplo en monocitos en el curso de infecciones, o exposición de superficies o macromoléculas cargadas negativamente al factor XII, por ejemplo después de la muerte celular, puede conducir a un estado de hipercoagulabilidad en todo el sistema, lo que resulta en trastornos microtrombóticos con posible daño orgánico

15 subsiguiente. Estos estados de hipercoagulabilidad pueden ser causados, por ejemplo, por infecciones con bacterias, virus u hongos o por traumatismos.

Además, la hipercoagulación sistémica puede dar lugar a coagulopatías por consumo en el contexto de una coagulopatía intravascular diseminada (DIC). Las complicaciones tromboembólicas se encuentran además en anemias hemolíticas microangiopáticas, procedimientos circulatorios

20 extracorpóreos, tales como hemodiálisis, en cavidades cardíacas, en válvulas cardíacas protésicas y stents, y durante trasplantes.

Los fármacos anticoagulantes se utilizan en el entorno profiláctico para prevenir la formación de trombos y durante eventos trombóticos/embólicos agudos para apoyar la lisis de la fibrina ya existente por la plasmina. Debido a que estos compuestos pueden no solo inhibir la generación de

25 trombos, sino también afectar los procesos hemostáticos, pueden ocurrir tiempos de sangrado prolongados, lo que puede limitar potencialmente las opciones para una fuerte eficacia anticoagulante. Por lo tanto, son ventajosos los compuestos con una amplia ventana terapéutica.

En contextos de intervención o profilácticos agudos, se desea un inicio rápido y suficiente capacidad de control de la eficacia anticoagulante, lo que puede lograrse mediante la

30 administración parenteral de compuestos con una acción farmacológica de corta duración. Por lo tanto, los compuestos anticoagulantes para administración oral, que incluyen principalmente antagonistas de la vitamina K y anticoagulantes orales directos (DOAC), no se prefieren en este contexto, debido a su inicio farmacológico retardado y acción farmacológica prolongada que limitan el control del tratamiento. Además, para muchos pacientes la administración de

35 medicamentos orales puede ser un desafío. Para poder aplicar tal compuesto anticoagulante por vía intravenosa, se necesita una solubilidad suficiente. Dado que los pacientes de cuidados intensivos a

menudo son tratados con más de un fármaco, es preferible un potencial bajo de interacción fármaco-fármaco aguda.

Los anticoagulantes conocidos de la técnica anterior, por ejemplo sustancias para inhibir o prevenir la coagulación de la sangre, presentan varias desventajas. Por consiguiente, en la práctica, los métodos de tratamiento eficaces o la profilaxis de trastornos trombóticos/tromboembólicos resultan muy difíciles e insatisfactorios.

En situaciones agudas, los estados de hipercoagulabilidad pueden iniciarse a través de la vía intrínseca o extrínseca. Por lo tanto, es beneficioso apuntar a la vía común con el factor Xa y la trombina en tales indicaciones. Mientras que la inhibición del factor Xa sola no inhibe la trombina preexistente en los coágulos ya formados, la inhibición de la trombina sola, por ejemplo con hirudina, bivalirudina o argatroban, podría ser desventajoso con respecto a la ventana terapéutica, posiblemente porque se necesitan grandes cantidades de compuestos para detener la cascada del sistema de coagulación justo en el paso final. Por lo tanto, los compuestos que pueden regular la generación de trombina mediante la inhibición del factor Xa e inhibir también la trombina preexistente, podrían ser de interés en el tratamiento de estados de hipercoagulabilidad, como los que existen, por ejemplo, en el curso de enfermedades infecciosas causadas, por ejemplo, por bacterias, virus y hongos. Además, estos pacientes a menudo están vinculados a sistemas extracorpóreos, en los que la sangre está expuesta a superficies procoagulantes, y pueden beneficiarse de la terapia de anticoagulación.

En la terapia y profilaxis de los trastornos tromboembólicos agudos se utiliza en primer lugar heparina, que se administra por vía intravenosa o subcutánea. Debido a las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas más favorables, en la actualidad se da cada vez más preferencia a la heparina de bajo peso molecular. Sin embargo, las desventajas conocidas descritas a continuación que se encuentran en la terapia con heparina no pueden evitarse de esta manera. Existe un alto riesgo de hemorragia, en particular hemorragias cerebrales y hemorragias gastrointestinales, y el tratamiento durante días aumenta el riesgo de desarrollar trombocitopenia inducida por heparina (HIT). Las heparinas inhiben el factor Xa y la trombina indirectamente al acelerar la unión de la antitrombina-III (ATIII) al factor Xa y la trombina, lo que conduce a un consumo adicional de ATIII. Dado su papel protector hacia el endotelio, un aumento en el agotamiento de ATIII inducido por heparina es adicionalmente crítico durante una coagulopatía por consumo. Además, las heparinas contribuyen muy poco a la inhibición de la trombina unida al coágulo y el factor Xa.

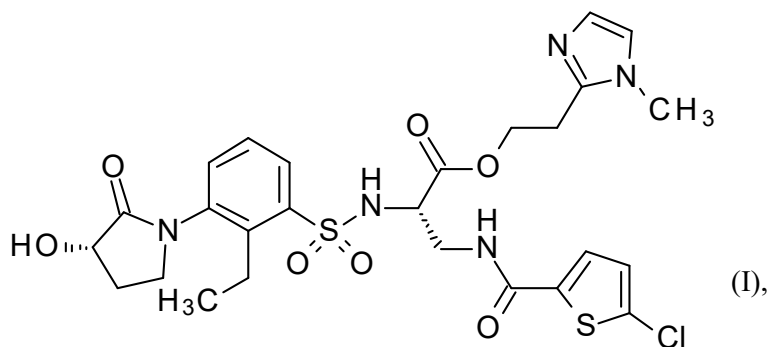
Últimamente, se han descrito moléculas pequeñas que combinan la inhibición de la trombina y el factor Xa con proporciones variables dentro de una molécula. Estos enfoques se han probado *in vitro* e *in vivo* y han demostrado un notable potencial sinérgico.

EP42675 combina una parte peptidomimética para la inhibición directa de la trombina y una parte similar a Fondaparinux, que inhibe indirectamente el factor Xa. Esta molécula, sin embargo, depende de la presencia de ATIII. Tanogitrán es otro compuesto de molécula pequeña, que inhibe tanto la trombina como el factor Xa *in vitro* pero con una mayor eficacia hacia la trombina. En gran medida, el tanogitrán se elimina sin metabolizar por vía renal y, por lo tanto, requeriría adaptaciones de la dosis y una estrecha vigilancia en pacientes con insuficiencia renal.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar nuevos compuestos que actúen como inhibidores del factor Xa y de la trombina para el tratamiento de trastornos cardiovasculares, en particular de trastornos trombóticos o tromboembólicos y/o complicaciones trombóticas o tromboembólicas, en seres humanos y animales, compuestos que tengan una amplia ventana terapéutica, buena solubilidad y una corta duración de la acción farmacológica para lograr una controlabilidad suficiente.

Los documentos WO2009/103440, WO2014/174102 y J. Meneyrol, et al., J. Med. Chem. 2013, 56, 9441–945 describen, entre otras cosas, clorotiofeno-amidas sustituidas como inhibidores del factor Xa y la trombina. J.-M. Altenburger, et al., Bioorg. Med. Chem. 2004, 12, 1713–1730 describen, entre otras cosas, sulfonamidas sustituidas como inhibidores de la trombina.

La invención proporciona 3-[(5-clorotiofeno-2-carbonil)amino]-N-{2-etil-3-[(3S)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]bencen-1-sulfonyl}-S-alaninato de 2-(1-Metil-1H-imidazol-2-il)etilo de la fórmula (I)



y sus sales, sus solvatos y los solvatos de sus sales.

Los compuestos de la invención pueden, dependiendo de su estructura, existir en diferentes formas estereoisómeras, es decir, en forma de isómeros configuracionales o, si es apropiado, de isómeros conformacionales (enantiómeros y/o diastereómeros, incluidos aquellos en el caso de rotámeros y atropisómeros). Por lo tanto, la presente invención abarca los enantiómeros y diastereómeros, y las respectivas mezclas de los mismos. Los constituyentes estereoisoméricamente uniformes se pueden aislar de tales mezclas de enantiómeros y/o diastereómeros de manera conocida; para ello se utilizan

preferentemente procesos de cromatografía, especialmente cromatografía HPLC en una fase acirral o quiral.

Si los compuestos de acuerdo con la invención pueden presentarse en formas tautoméricas, la presente invención abarca todas las formas tautoméricas.

- 5 La presente invención también abarca todas las variantes isotópicas adecuadas de los compuestos de acuerdo con la invención. Una variante isotópica de un compuesto inventivo se entiende en el presente documento como un compuesto en el que al menos un átomo dentro del compuesto inventivo se ha intercambiado por otro átomo del mismo número atómico, pero con una masa atómica diferente a la masa atómica que usualmente o predominantemente ocurre en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que
- 10 se pueden incorporar a un compuesto de acuerdo con la invención son aquellos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor, cloro, bromo y yodo, tales como ^2H (deuterio), ^3H (tritio), ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{33}S , ^{34}S , ^{35}S , ^{36}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{129}I y ^{131}I . Las variantes isotópicas particulares de un compuesto de acuerdo con la invención, especialmente aquellas en las que se han incorporado uno o más isótopos radiactivos, pueden ser beneficiosas, por ejemplo, para
- 15 el examen del mecanismo de acción o de la distribución del ingrediente activo en el cuerpo; debido a su preparabilidad y detectabilidad comparativamente fáciles, especialmente los compuestos marcados con isótopos ^3H o ^{14}C son adecuados para este propósito. Además, la incorporación de isótopos, por ejemplo de deuterio, puede conducir a beneficios terapéuticos particulares como consecuencia de una mayor estabilidad metabólica del compuesto, por ejemplo una extensión de la
- 20 vida media en el cuerpo o una reducción en la dosis activa requerida; tales modificaciones de los compuestos inventivos pueden por lo tanto, en algunos casos, también constituir una forma de realización preferida de la presente invención. Las variantes isotópicas de los compuestos de acuerdo con la invención se pueden preparar mediante los procesos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo mediante los métodos descritos más adelante y los procedimientos descritos
- 25 en los ejemplos de trabajo, utilizando las modificaciones isotópicas correspondientes de los respectivos reactivos y/o compuestos de partida.

Las sales preferidas en el contexto de la presente invención son sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de acuerdo con la invención. Sin embargo, la invención también abarca sales que en sí mismas no son adecuadas para aplicaciones farmacéuticas pero que se pueden utilizar, por

30 ejemplo, para el aislamiento o la purificación de los compuestos de acuerdo con la invención.

Las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de acuerdo con la invención incluyen sales de adición de ácidos de ácidos minerales, ácidos carboxílicos y ácidos sulfónicos, por ejemplo, sales de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido

35 naftalendisulfónico, ácido acético, ácido trifluoracético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico y ácido benzoico. Las sales

fisiológicamente aceptables preferidas de los compuestos de acuerdo la invención incluyen sales de adición de ácido de ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido tartárico, ácido málico y ácido cítrico.

Las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de acuerdo con la invención también
5 incluyen sales de bases convencionales, a modo de ejemplo y con preferencia sales de metales alcalinos (por ejemplo, sales de sodio y potasio), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, sales de calcio y magnesio) y sales de amonio derivadas de amoníaco o aminas orgánicas que tienen de 1 a 16 átomos de carbono, a modo de ejemplo y con preferencia etilamina, dietilamina, trietilamina, etildiisopropilamina, monoetanolamina, dietanolamina, trietanolamina,
10 diciclohexilamina, dimetilaminoetanol, procaína, dibencilamina, *N*-metilmorfolina, arginina, lisina, etilendiamina, *N*-etilpiperidina y colina.

Los solvatos en el contexto de la invención se describen como aquellas formas de los compuestos de la invención que forman un complejo en estado sólido o líquido por coordinación con moléculas de solvente. Los hidratos son una forma específica de los solvatos en los que la coordinación es con
15 el agua.

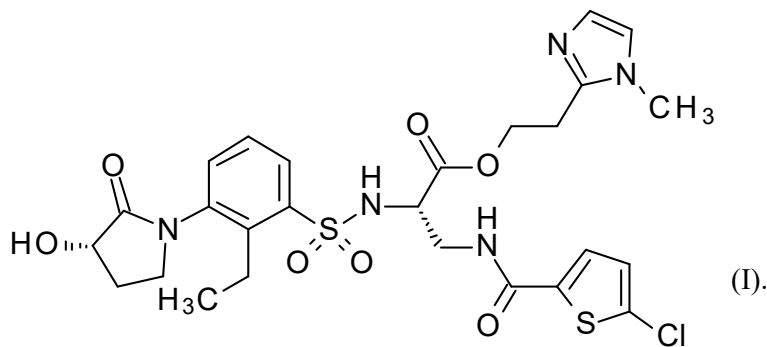
Además, la presente invención también abarca profármacos de los compuestos inventivos. El término "profármacos" abarca compuestos que, por su parte, pueden ser biológicamente activos o inactivos, pero que se convierten durante su tiempo de residencia en el cuerpo en compuestos de acuerdo con la invención (por ejemplo, mediante metabolismo o hidrólisis).

20 En el contexto de la presente invención, el término "tratamiento" o "tratar" incluye la inhibición, el retraso, el control, el alivio, la atenuación, la restricción, la reducción, la supresión, el rechazo o la curación de una enfermedad, una afección, un trastorno, una lesión o un problema de salud, o el desarrollo, el curso o la progresión de tales estados y/o los síntomas de tales estados. El término "terapia" se entiende en el presente documento como sinónimo del término "tratamiento".

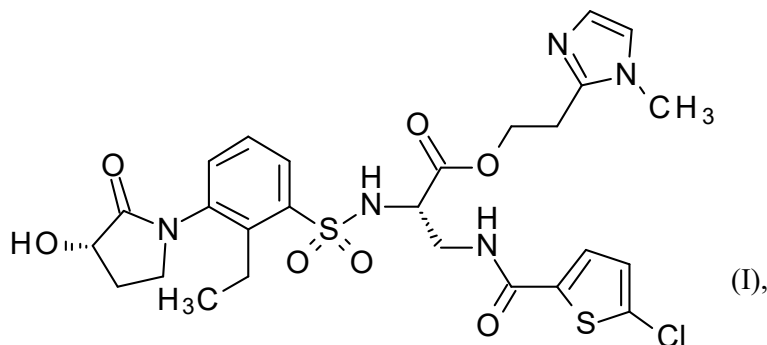
25 Los términos "prevención", "profilaxis" y "preclusión" se utilizan como sinónimos en el contexto de la presente invención y se refieren a evitar o reducir el riesgo de contraer, experimentar, padecer o tener una enfermedad, una afección, un trastorno, una lesión o un problema de salud, o un desarrollo o avance de tales estados y/o los síntomas de tales estados.

El tratamiento o prevención de una enfermedad, una afección, un trastorno, una lesión o un
30 problema de salud puede ser parcial o total.

Se da preferencia al compuesto 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonil}-*S*-alaninato de 2-(1-Metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo de la fórmula (I)



También se da preferencia al compuesto 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonyl}-*S*-alaninato de 2-(1-Metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo de la fórmula (I)



5

y las sales fisiológicamente aceptables de los mismos.

También se da preferencia a una sal fisiológicamente aceptable del compuesto de fórmula (I) que se selecciona del grupo que consiste en

10 Clorhidrato de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonyl}-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo

y

Sulfato de 3-{[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]fenil}sulfonyl}-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo

y

15 Metanosulfonato de 3-{[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]fenil}sulfonyl}-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo

y

4-Metilbenceno-sulfonato de 3-{[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]fenil}sulfonyl}-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo

y

Maleato de 3-[[[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-N-(2-etil-3-[(3S)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]fenil)sulfonil]-S-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo

y

5 Fosfato de 3-[[[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-N-(2-etil-3-[(3S)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]fenil)sulfonil]-S-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo

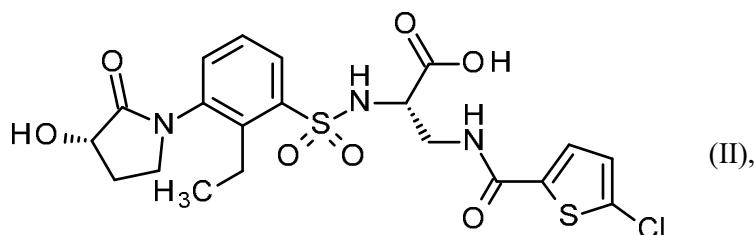
y

(2R,3R)-Tartrato de 3-[[[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-N-(2-etil-3-[(3S)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]fenil)sulfonil]-S-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo

10 y

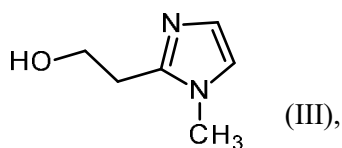
Citrato de 3-[[[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-N-(2-etil-3-[(3S)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]fenil)sulfonil]-S-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo.

La invención proporciona además un método para preparar el compuesto de fórmula (I), o sales del mismo, solvatos del mismo o solvatos de las sales del mismo, en donde el compuesto de fórmula



15

se hace reaccionar con el compuesto de fórmula



en presencia de un agente deshidratante para proporcionar el compuesto de fórmula (I),

y el compuesto de fórmula (I) se convierte opcionalmente con los correspondientes (i) solventes y/o

20 (ii) bases o ácidos en sus solvatos, sales y/o solvatos de las sales.

La reacción se lleva a cabo generalmente en disolventes inertes, si es apropiado en presencia de una base, de modo preferente en un intervalo de temperatura de -20°C a 80°C a presión atmosférica.

Los agentes deshidratantes adecuados en el presente documento son, por ejemplo, carbodiimidas tales como *N,N'*-dietil-, *N,N'*-dipropil-, *N,N'*-diisopropil-, *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida, clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDCI), *N*-ciclohexilcarbodiimida-

25

N-propiloximetil-poliestireno (PS-carbodiimida) o compuestos de carbonilo tales como carbonildiimidazol, o compuestos de 1,2-oxazolio tales como 3-sulfato de 2-etil-5-fenil-1,2-oxazolio o perclorato de 2-terc-butil-5-metil-isoxazolio, o compuestos de acilamino tales como 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, o cloroformiato de isobutilo, o cloruro de bis-(2-oxo-3-oxazolidinil)fosforilo o hexafluorofosfato de benzotriazoliloxi-tri(dimetilamino)-fosfonio, o hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HBTU), tetrafluorborato de 2-(2-oxo-1-(2H)-piridil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TPTU), fluorborato de (benzotriazol-1-iloxi)bisdimetilaminometilio (TBTU) o hexafluor-fosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HATU), o 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), o hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetil-amino)fosfonio (BOP), o ciano(hidroxiimino)acetato de etilo (Oxyma), o hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminoxi)dimetilamino-morfolino-carbenio (COMU), o hexafluorofosfato de *N*-[(dimetilamino)(3*H*-[1,2,3]triazol[4,5-*b*]piridin-3-iloxi)metiliden]-*N*-metilmetan-aminio, o 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrisfosfinano-2,4,6-trióxido (T3P), o mezclas de estos con bases. Se prefiere la condensación con ciano(hidroxiimino)acetato de etilo (Oxyma) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI).

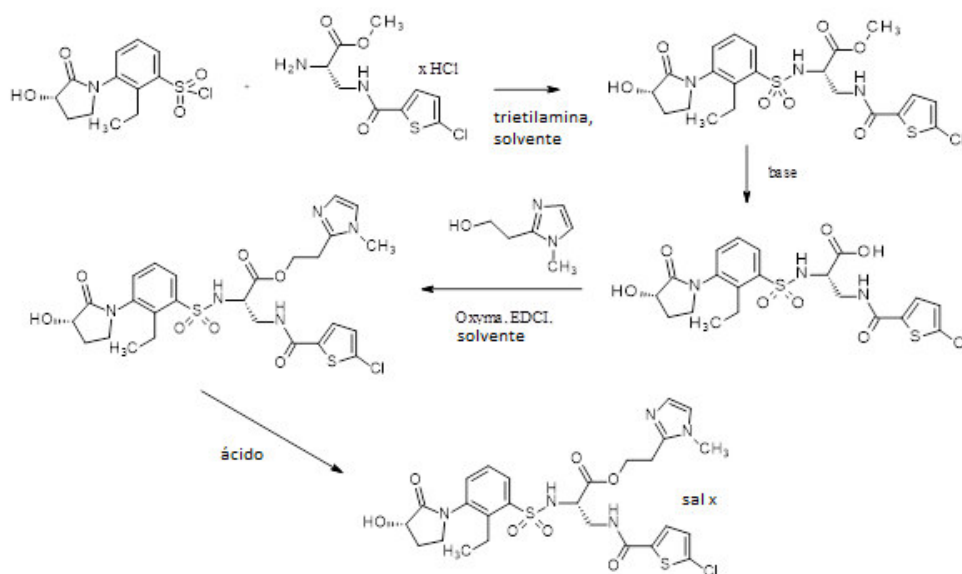
Las bases son, por ejemplo, bases orgánicas tales como trialkilaminas, por ejemplo, trietilamina, *N*-metilmorfolina, *N*-metilpiperidina, 4-dimetilaminopiridina o diisopropiletilamina o piridina. Se da preferencia a una condensación sin una base.

Los solventes inertes son, por ejemplo, hidrocarburos halogenados tales como diclorometano o triclorometano, hidrocarburos tales como benceno o tolueno u otros solventes tales como 1,4-dioxano, éter dietílico, tetrahidrofurano, acetato de etilo, *N,N*-dimetilformamida, dimetilsulfóxido o acetonitrilo, o mezclas de los solventes. Se da preferencia a una mezcla de diclorometano y *N,N*-dimetilformamida.

Los compuestos de fórmula (II) y (III) son conocidos, se pueden sintetizar a partir de los compuestos de partida correspondientes mediante procesos conocidos o se pueden preparar de manera análoga a los procesos descritos en la sección A) Ejemplos.

La preparación de los compuestos de partida y de los compuestos de fórmula (I) puede ilustrarse mediante el siguiente esquema de síntesis.

Esquema:



Los compuestos de acuerdo con la invención tienen un espectro de actividad farmacológica útil imprevisible y buenas propiedades farmacocinéticas. Son compuestos que inhiben el factor Xa y la trombina. Por lo tanto, son adecuados para su uso como medicamentos para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades en seres humanos y animales.

La presente invención proporciona además el uso de los compuestos de acuerdo con la invención para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos, en particular trastornos vasculares, de modo preferente trastornos trombóticos o tromboembólicos y/o complicaciones trombóticas o tromboembólicas tales como coagulación intravascular diseminada, y/o o trastornos inflamatorios.

El factor Xa (FXa) y el factor IIa (FIIa, es decir, la trombina) son enzimas cruciales involucradas en la coagulación. La trombina se activa directamente por FXa en el complejo de protrombinasa y, a su vez, activa el fibrinógeno en fibrina, uno de los principales componentes de los coágulos sanguíneos.

Como parte de la vía "común" de la coagulación, el FXa y la trombina son componentes importantes para el inicio intrínseco y extrínseco de la coagulación. En la vía extrínseca, la coagulación se desencadena a través del factor tisular (TF), que se expresa en la adventicia vascular y se expone a la sangre como resultado de una lesión vascular. El factor tisular también se puede secretar por los monocitos o las células endoteliales activadas ante ciertos factores desencadenantes (por ejemplo, endotoxinas bacterianas). En la vía intrínseca, el sistema de coagulación se puede activar especialmente en superficies cargadas negativamente, que incluyen no solo estructuras superficiales de células extrañas (por ejemplo, bacterias), sino también superficies artificiales tales como prótesis vasculares, stents y circulación extracorpórea. En la superficie, inicialmente el factor XII (FXII) se activa a factor XIIa (FXIIa) que posteriormente activa el factor XI (FXI), unido a las

superficies celulares, a factor XIa (FXIa). Tanto la vía extrínseca como la intrínseca convergen en la vía común, en la que FXa activa la protrombina a trombina, que a su vez 1) propagará aún más la cascada de coagulación corriente abajo que da como resultado la generación de fibrina y la formación de coágulos como se describió anteriormente y 2) reiniciará la cascada de coagulación en un circuito de retroalimentación a través de la activación de FXI a FXIa.

Por consiguiente, los compuestos de acuerdo con la invención son adecuados para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos o complicaciones que pueden surgir de la formación de coágulos.

En el sentido de la presente invención, los "trastornos tromboticos o tromboembolicos" incluyen trastornos que se producen tanto en la vasculatura arterial como en la venosa y que pueden tratarse con los compuestos de acuerdo con la invención, en particular para el tratamiento y prevención de la coagulación intravascular diseminada (DIC) que puede ocurrir en relación con la sepsis, entre otras cosas, pero también debido a intervenciones quirúrgicas, trastornos neoplásicos, quemaduras u otras lesiones que pueden provocar daños graves en los órganos a través de microtrombosis. En el curso de una infección, puede haber una activación generalizada del sistema de coagulación (coagulación intravascular diseminada o coagulopatía por consumo, en lo sucesivo denominada "DIC") con microtrombosis en varios órganos y complicaciones hemorrágicas secundarias. Durante la DIC, hay una activación masiva del sistema de coagulación en la superficie de las células endoteliales dañadas, las superficies de cuerpos extraños o el tejido extravascular entrecruzado. En consecuencia, hay coagulación en vasos pequeños de varios órganos con hipoxia y disfunción orgánica subsiguiente. Un efecto secundario es el consumo de factores de coagulación (por ejemplo, factor X, protrombina y fibrinógeno) y plaquetas, lo que reduce la coagulabilidad de la sangre y puede provocar sangrado abundante. Además, puede haber daño endotelial con aumento de la permeabilidad de los vasos y difusión de líquido y proteínas al espacio extravasal.

Los compuestos de acuerdo con la invención también son adecuados para prevenir o tratar las complicaciones que pueden surgir en el contexto de una enfermedad infecciosa y/o del síndrome inflamatorio sistémico (SRIS), tales como disfunción séptica de órganos, insuficiencia séptica de órganos e insuficiencia multiorgánica, síndrome de dificultad respiratoria agudo (ARDS), lesión pulmonar aguda (ALI), shock séptico y/o insuficiencia orgánica séptica.

Las complicaciones tromboembolicas ocurren además en anemias hemolíticas microangiopáticas y por contacto de la sangre con superficies extrañas en el contexto de la circulación extracorpórea tal como, por ejemplo, hemodiálisis, ECMO ("oxigenación de membrana extracorpórea"), LVAD ("dispositivo de asistencia ventricular izquierda") y métodos similares, fistulas AV, prótesis vasculares y de válvulas cardíacas.

Además, los compuestos de la invención son adecuados para el tratamiento y prevención de trastornos en las arterias coronarias del corazón, tales como síndrome coronario agudo (ACS),

infarto de miocardio con elevación del segmento ST (STEMI) y sin elevación del segmento ST (no STEMI), angina de pecho estable, angina de pecho inestable, reoclusiones y reestenosis después de intervenciones coronarias tales como angioplastia, implantación de stent o bypass aortocoronario.

- Los compuestos de la invención también son adecuados para la prevención y el tratamiento de
- 5 tromboembolismos cardiogénicos, por ejemplo, isquemias cerebrales, accidentes cerebrovasculares y tromboembolismos e isquemias sistémicos, en pacientes con arritmias cardíacas agudas, intermitentes o persistentes, por ejemplo, fibrilación auricular, y en pacientes sometidos a cardioversión, y también en pacientes con trastornos de las válvulas cardíacas o con válvulas cardíacas artificiales
- 10 Los compuestos de acuerdo con la invención también se pueden utilizar para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos en las arterias cerebrovasculares, tales como ataques isquémicos transitorios (TIA), accidentes cerebrovasculares isquémicos que incluyen accidentes cerebrovasculares cardioembólicos, tales como accidentes cerebrovasculares debidos a fibrilación auricular, accidentes cerebrovasculares no-cardioembólicos, tales como accidente cerebrovascular lacunar,
- 15 accidentes cerebrovasculares debidos a enfermedades de las arterias grandes o pequeñas, o accidentes cerebrovasculares debido a una causa indeterminada, accidentes cerebrovasculares criptogénicos, accidentes cerebrovasculares embólicos, accidentes cerebrovasculares embólicos de origen indeterminado, o eventos de origen trombótico y/o tromboembólico que conducen a un accidente cerebrovascular o TIA.
- 20 Los compuestos de acuerdo con la invención también se pueden utilizar para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos de las arterias periféricas, que conducen a enfermedad arterial periférica, incluyendo oclusión de arteria periférica, isquemia aguda de extremidades, amputación, reoclusiones y restenosis después de intervenciones tales como angioplastia, implantación de stent o cirugía y bypass, y/o trombosis del stent.
- 25 Además, los compuestos de acuerdo con la invención también se pueden utilizar para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos en los vasos venosos, que conducen a trombosis venosas, en particular, entre otros, en venas profundas de las piernas, venas renales, venas retinianas y/o venas de los senos cerebrovasculares, y/o tromboembolismos venosos que pueden resultar potencialmente en émbolos de la arteria pulmonar.
- 30 La estimulación del sistema de coagulación puede ocurrir por diversas causas o trastornos asociados. En el contexto de intervenciones quirúrgicas, inmovilidad, confinamiento en cama, infecciones, inflamación o cáncer o terapia del cáncer, entre otros, el sistema de coagulación puede estar muy activado y pueden presentarse complicaciones trombóticas, en particular trombosis venosas. Los compuestos de acuerdo con la invención son por lo tanto adecuados para la profilaxis
- 35 de trombosis en el contexto de intervenciones quirúrgicas en pacientes que padecen cáncer.

Los compuestos de acuerdo con la invención también son adecuados para la profilaxis primaria de trastornos trombóticos o tromboembólicos y/o trastornos inflamatorios y/o trastornos con aumento de la permeabilidad vascular en pacientes en los que las mutaciones genéticas conducen a un aumento de la actividad de las enzimas, o niveles aumentados de los zimógenos y estos se establecen mediante pruebas/medidas relevantes de la actividad enzimática o concentraciones de zimógeno.

Otro objetivo de la presente invención es el uso de los compuestos de acuerdo con la invención para el tratamiento y/o la profilaxis de trastornos, especialmente los trastornos mencionados anteriormente.

10 La presente invención proporciona además el uso de los compuestos de acuerdo con la invención para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos, especialmente los trastornos mencionados anteriormente.

La presente invención proporciona además un método para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos, especialmente los trastornos mencionados anteriormente, utilizando una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención.

La presente invención proporciona además los compuestos de acuerdo con la invención para uso en un método para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos, especialmente los trastornos mencionados anteriormente, utilizando una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención.

20 En particular, la presente invención proporciona los compuestos de acuerdo con la invención para utilizar en un método para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos trombóticos o tromboembólicos utilizando una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención.

La presente invención proporciona además medicamentos que comprenden un compuesto de acuerdo con la invención y uno o más compuestos activos adicionales.

Además, los compuestos de acuerdo con la invención también se pueden utilizar para prevenir la coagulación *ex vivo*, por ejemplo para la protección de trasplantes de órganos contra daños causados por la formación de coágulos y para proteger al receptor del órgano contra tromboémbolos del órgano trasplantado, para conservar la sangre y productos de plasma, para la limpieza/pretratamiento de catéteres y otros auxiliares e instrumentos médicos, para recubrir superficies sintéticas de auxiliares e instrumentos médicos utilizados *in vivo* o *ex vivo* o para muestras biológicas que puedan contener factor Xa o trombina.

La presente invención proporciona además medicamentos que contienen un compuesto de acuerdo con la invención y uno o más compuestos activos, en particular para el tratamiento y/o profilaxis de

los trastornos mencionados anteriormente. Los ejemplos preferidos de compuestos activos adecuados para combinaciones incluyen:

- Sustancias hipolipemiantes, especialmente inhibidores de la HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A) reductasa, por ejemplo, lovastatina (Mevacor), simvastatina (Zocor), pravastatina (Pravachol), fluvastatina (Lescol) y atorvastatina (Lipitor) ;
- vasodilatadores/terapéuticos coronarios, especialmente inhibidores de la ACE (enzima convertidora de angiotensina), por ejemplo, captopril, lisinopril, enalapril, ramipril, cilazapril, benazepril, fosinopril, quinapril y perindopril, o antagonistas de los receptores AII (angiotensina II), por ejemplo, embusartán, losartán, valsartán, irbesartán, candesartán, eprosartán y temisartán, o antagonistas de los β -adrenoceptores, por ejemplo carvedilol, alprenolol, bisoprolol, acebutolol, atenolol, betaxolol, carteolol, metoprolol, nadolol, penbutolol, pindolol, propanolol y timolol, o antagonistas de los adrenoceptores alfa-1, por ejemplo, prazosina, bunazosina, doxazosina y terazosina, o diuréticos, por ejemplo, hidroclorotiazida, furosemida, bumetanida, piretanida, torasemida, amilorida y dihidralazina, o bloqueadores de los canales de calcio, por ejemplo, verapamilo y diltiazem, o derivados de dihidropiridina, por ejemplo, nifedipina (Adalat) y nitrendipina (bayotensina), o preparaciones de nitro, por ejemplo, isosorbida 5-mononitrato, isosorbida dinitrato y trinitrato de glicerol, o sustancias que provocan un aumento del monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), por ejemplo estimuladores de la guanilato ciclase soluble, por ejemplo riociguat;
- activadores del plasminógeno (trombolíticos/fibrinolíticos) y compuestos que promueven la trombólisis/fibrinólisis tales como inhibidores del inhibidor del activador del plasminógeno (inhibidores PAI) o inhibidores del inhibidor de la fibrinólisis activada por trombina (inhibidores TAFI) tales como, por ejemplo, el activador tisular del plasminógeno (t-PA, por ejemplo Actilyse®), estreptoquinasa, reteplasa y uroquinasa o sustancias moduladoras del plasminógeno que provocan una mayor formación de plasmina;
- sustancias anticoagulantes (anticoagulantes) tales como, por ejemplo, heparina (UFH), heparinas de bajo peso molecular (LMW), por ejemplo tinzaparina, certoparina, parnaparina, nadroparina, ardeparina, enoxaparina, reviparina, dalteparina, danaparoides, semuloparina (AVE 5026), adomiparina (M118) y EP-42675/ORG42675;
- inhibidores directos de trombina (DTI) tales como, por ejemplo, Pradaxa (dabigatrán), atecetrán (AZD-0837), DP-4088, SSR-182289A, argatrobán, bivalirudina y tanogitrán (BIBT-986 y profármaco BIBT-1011), hirudin;
- inhibidores directos del factor Xa como, por ejemplo, rivaroxabán, apixabán, edoxabán (DU-176b), betrixabán (PRT-54021), R-1663, darexabán (YM-150), otamixabán (FXV-

673/RPR-130673), letaxabán (TAK-442), razaxabán (DPC-906), DX-9065a, LY-517717, tanogitrán (BIBT-986, profármaco: BIBT-1011), idraparinux y fondaparinux,

- sustancias que inhiben la agregación de plaquetas (inhibidores de la agregación de plaquetas, inhibidores de la agregación de trombocitos), tales como, por ejemplo, ácido acetilsalicílico (tales como, por ejemplo, aspirina), antagonistas de P2Y₁₂ tales como, por ejemplo, ticlopidina (Ticlid), clopidogrel (Plavix), prasugrel, ticagrelor, cangrelor, elinogrel, antagonistas de PAR-1 tales como, por ejemplo, vorapaxar, antagonistas de PAR-4, antagonistas de EP3 tales como, por ejemplo, DG041;
- inhibidores de la adhesión plaquetaria tales como GPVI y/o antagonistas de GPIIb tales como, por ejemplo, Revacept o caplacizumab;
- antagonistas de los receptores de fibrinógeno (antagonistas de glicoproteína IIb/IIIa), por ejemplo, abciximab, eptifibatide, tirofiban, lamifiban, lefradafiban y fradafiban;
- proteína C activada humana recombinante tal como, por ejemplo, Xigris o trombomodulina recombinante;
- y también antiarrítmicos;
- corticosteroides tales como, por ejemplo, anecortave, betametasona, dexametasona, triamcinolona, fluocinolona y acetónido de fluocinolona;
- inhibidores de ciclooxigenasa tales como, por ejemplo, bromfenac y nepafenac;
- inhibidores del sistema calicreína-cinina tales como, por ejemplo, safotibant y ecallantida;
- inhibidores de las vías de señal de esfingosina 1-fosfato tales como, por ejemplo, sonenpcizumab;
- inhibidores del receptor complemento-C5a como, por ejemplo, eculizumab;
- inhibidores del receptor 5HT_{1a} como, por ejemplo, tandospirona;
- inhibidores del factor de coagulación XI o XIa como, por ejemplo, osocimab, abelacimab, asundexian y milvexian;
- agentes vasoconstrictores tales como, por ejemplo, epinefrina, norepinefrina y dopamina;
- antibióticos tales como, por ejemplo, piperacilina, combactam, eritromicina, metronidazol, ciprofloxacino y vancomicina;
- compuestos para mantener la función de órganos diana durante el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria aguda o lesión renal aguda.

En el sentido de la invención, se entiende por “combinaciones” no solo las formas de dosificación que contienen todos los componentes (las denominadas combinaciones fijas) y los paquetes de

combinación que contienen los componentes separados unos de otros, sino también los componentes que se administran de forma simultánea o secuencial, siempre que se utilizan para la profilaxis y/o el tratamiento de la misma enfermedad. Asimismo, es posible combinar dos o más ingredientes activos entre sí, lo que significa que cada uno de ellos se encuentra en combinaciones de dos o varios componentes.

Los compuestos de la invención pueden actuar sistémica y/o localmente. Para ello, pueden administrarse de manera adecuada, por ejemplo por vía oral, parenteral, pulmonar, nasal, sublingual, lingual, bucal, rectal, dérmica, transdérmica, conjuntival u ótica, o como implante o stent.

- 10 Los compuestos de la invención se pueden administrar en formas de administración adecuadas para estas vías de administración.

Las formas de administración adecuadas para la administración oral son aquellas que funcionan de acuerdo con el arte anterior y liberan los compuestos de la invención de forma rápida y/o modificada, y que contienen los compuestos de la invención en forma cristalina y/o amorfa y/o

- 15 disuelta, por ejemplo comprimidos (comprimidos sin recubrir o recubiertos, por ejemplo con recubrimientos entéricos o recubrimientos que son insolubles o se disuelven con retraso, que controlan la liberación del compuesto de acuerdo con la invención), comprimidos que se desintegran rápidamente en la boca, o películas/oblas, películas/lioofilizados, cápsulas (por ejemplo, cápsulas de gelatina dura o blanda), comprimidos recubiertos de azúcar, gránulos, 20 grageas, polvos, emulsiones, suspensiones, aerosoles o soluciones.

- La administración parenteral se puede lograr evitando un paso de reabsorción (por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intraespinal o intralumbal) o con la inclusión de una reabsorción (por ejemplo, por vía intramuscular, subcutánea, intracutánea, percutánea o intraperitoneal). Las formas de administración adecuadas para la administración parenteral 25 incluyen preparaciones para inyección e infusión en forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, liofilizados o polvos estériles.

Se da preferencia a la administración parenteral.

- Las formas de administración adecuadas para las otras vías de administración son, por ejemplo, formas farmacéuticas para inhalación (incluyendo inhaladores de polvo, nebulizadores), gotas 30 nasales, soluciones o aerosoles; comprimidos para administración lingual, sublingual o bucal, películas/oblas o cápsulas, supositorios, preparaciones para los oídos o los ojos, cápsulas vaginales, suspensiones acuosas (lociones, mezclas para agitar), suspensiones lipófilas, ungüentos, cremas, sistemas terapéuticos transdérmicos (por ejemplo, parches), leche, pastas, espumas, polvos, implantes o stents.

- Los compuestos de la invención se pueden convertir en las formas de administración mencionadas. Esto se puede lograr de una manera conocida per se mezclando con excipientes inertes, no tóxicos y farmacéuticamente adecuados. Estos excipientes incluyen portadores (por ejemplo, celulosa microcristalina, lactosa, manitol), solventes (por ejemplo, polietilenglicoles líquidos),
- 5 emulsionantes y agentes dispersantes o humectantes (por ejemplo, dodecilsulfato de sodio, oleato de polioxisorbitán), aglutinantes (por ejemplo, polivinilpirrolidona), polímeros sintéticos y naturales. (por ejemplo, albúmina), estabilizantes (por ejemplo, antioxidantes, por ejemplo, ácido ascórbico), colorantes (por ejemplo, pigmentos inorgánicos, por ejemplo, óxidos de hierro) y correctores de sabor y/u olor.
- 10 La presente invención proporciona además medicamentos que comprenden al menos un compuesto de la invención, de modo preferente junto con uno o más excipientes farmacéuticamente adecuados, no tóxicos e inertes, y el uso de los mismos para los fines mencionados anteriormente.
- En el caso de la administración parenteral, generalmente se ha encontrado que es ventajoso administrar cantidades de aproximadamente 100 mg a 15 g cada 24 horas para lograr resultados
- 15 efectivos, se prefiere administrar cantidades de aproximadamente 500 mg a 7,5 g cada 24 horas. y es muy preferible administrar cantidades de aproximadamente 1 g a 3,5 g cada 24 horas.
- A pesar de esto, puede ser necesario, si es apropiado, desviarse de las cantidades especificadas, específicamente dependiendo del peso corporal, vía de administración, comportamiento individual hacia el ingrediente activo, tipo de formulación y tiempo o intervalo de administración.
- 20 A menos que se indique lo contrario, los porcentajes en las pruebas y ejemplos que siguen son porcentajes en peso; las partes son partes en peso. Las proporciones de solvente, las proporciones de dilución y los datos de concentración para las soluciones líquido/líquido se basan en cada caso en el volumen. "p/v" significa "peso/volumen". Por ejemplo, "10% p/v" significa: 100 ml de solución o suspensión contienen 10 g de sustancia.

25

A) Ejemplos

Abreviaturas:

Abreviatura	Significado
Boc	<i>tert</i> -butiloxycarbonilo
br	amplio (RMN)
CI	ionización química
d	doblete (RMN)
d	día(s)

DCM	diclorometano
dd	doble de doblete (RMN)
DIPEA	diisopropiletilamina
DMAP	4-(dimetilamino)piridina
DMEDA	<i>N,N'</i> -dimetiletano-1,2-diamina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
EDCI	Clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ESI	ionización por electropulverización (ES)
h	hora(s)
H	protón
HBTU	Hexafluorofosfato de (2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HCl	ácido clorhídrico
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
IC	cromatografía iónica
IR	espectroscopia infrarroja
LC-MS	cromatografía líquida-espectrometría de masas
m	multiplete (RMN)
M	molar
min	minute(s)
Abreviatura	Significado
NCS	<i>N</i> -clorosuccinimida
MS	espectrometría de masas
NMR	Espectroscopía de Resonancia magnética nuclear
Oxyma	cianohidroxiiminoacetato de etilo
RP	fase inversa (HPLC)
ta	temperatura ambiente
T _r	tiempo de retención (HPLC, LC/MS)
S	singlete (RMN)
T	triplete (RMN)
TBTU	Tetrafluorborato de 2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-

	tetrametilaminio
terc	terciario
TFA	ácido trifluoracético
THF	tetrahidrofurano
UV	espectroscopía ultravioleta
%p	porcentaje en peso
XRPD	Difracción de rayos X en polvo

Métodos HPLC y LC-MS:

5 Método 1 (HPLC preparativa): Columna: Chromatorex C18, 10 µm, 205 x 50 mm; eluyente A: agua, eluyente B: acetonitrilo; inyección a los 3 min; gradiente: 0,0 min 10% B → 6,0 min 10% B → 27 min 95% B → 38 min 95% B → 39 min 10% B → 40,2 min 10% B; caudal: 150 ml/min; UV– detección: 210 nm.

Método 2 (HPLC preparativa): Columna: columna RP18, eluyente: acetonitrilo/gradiente de agua con TFA al 0,1% agregado a la fase acuosa.

10 Método 3 (HPLC preparativa): Columna: Chromatorex C18, 10 µm, 205 x 50 mm; eluyente A: agua, eluyente B: acetonitrilo; inyección a los 3 min; gradiente: 0,0 min 10% B → 5,5 min 10% B → 17,65 min 95% B → 19,48 min 95% B → 19,66 min 10% B → 20,51 min 10% B; caudal: 150 ml/min; UV– detección: 210 nm.

15 Método 4 (HPLC preparativa): Chromatorex C18, 10 µm, 250 x 50 mm 30% de acetonitrilo / 70% de agua (+ 0,1% TFA) → Gradiente durante 38 min → 95% de acetonitrilo / 5% de agua (+ 0,1% de TFA).

20 Método 5 (HPLC preparativa): Chromatorex C18, 10 µm, 125 x 30 mm; eluyente A: agua + 0,1% de TFA, eluyente B: acetonitrilo; inyección a los 3 min; gradiente: 0,0 min 10% B → 6,0 min 10% B → 27 min 95% B → 38 min 95% B → 39 min 10% B → 40,2 min 10% B; caudal: 75 ml/min; UV– detección: 210 nm.

Método 6 (HPLC preparativa): Chromatorex C18, 10 µm, 125 x 30 mm; eluyente A: agua + 0,01% de HCl, eluyente B: acetonitrilo; inyección a los 3 min; gradiente: 0,0 min 10% B → 6,0 min 10% B → 27 min 95% B → 38 min 95% B → 39 min 10% B → 40,2 min 10% B; caudal: 75 ml/min, UV– detección: 210 nm.

25 Método 7 (LC/MS): Sistema MS: Thermo Scientific FT-MS; Sistema UHPLC+: Thermo Scientific UltiMate 3000; Columna: Waters, HSST3, 2,1 x 75 mm, C18 1,8 µm; eluyente A: 1 l de agua +

0,01% de ácido fórmico; eluyente B: 1 l de acetonitrilo + 0,01% de ácido fórmico; gradiente: 0,0 min 10% B → 2,5 min 95% B → 3,5 min 95% B; horno: 50°C; caudal: 0,90 ml/min; UV–detección: 210 nm / vía de integración óptima 210–300 nm.

Método 8 (LC/MS): Instrumento: Waters ACQUITY SQD UPLC System; Columna: Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 µm 50 x 1 mm; eluyente A: 1 l de agua + 0,25 ml 99% de ácido fórmico, eluyente B: 1 l de acetonitrilo + 0,25 ml 99% de ácido fórmico; gradiente: 0,0 min 90% A → 1,2 min 5% A → 2,0 min 5% A; horno: 50°C; caudal: 0,40 ml/min; UV–detección: 210 nm.

Método 9 (LC/MS): Instrumento: Agilent MS Quad 6150; HPLC: Agilent 1290; Columna: Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 µm 50 x 2,1 mm; eluyente A: 1 l de agua + 0,25 ml 99% de ácido fórmico, eluyente B: 1 l de acetonitrilo + 0,25 ml 99% de ácido fórmico; gradiente: 0,0 min 90% A → 0,3 min 90% A → 1,7 min 5% A → 3,0 min 5% A; horno: 50°C; caudal: 1,20 ml/min; UV–detección: 205–305 nm.

Método 10 (HPLC quiral): Columna: Daicel Chiralpak IG, 5 µm, 250 x 4,6 mm; eluyente A: 50% de iso–hexano, 50% de etanol + 1% de agua + 0,2% de TFA; caudal: 1,0 ml/min, temperatura: 40°C.

Método 11 (HPLC quiral): Columna: Daicel Chiralcel IG, 5 µm, 250 x 4,6 mm; eluyente A: 50% de n–heptano, 50% de etanol + 0,2% de dietilamina; caudal: 1,0 ml/min, temperatura: 60°C.

Cuando los compuestos de acuerdo con la invención se purifican mediante HPLC preparativa mediante los métodos descritos anteriormente en los que los eluyentes contienen aditivos, por ejemplo ácido trifluoracético, ácido fórmico o amoníaco, los compuestos de acuerdo con la invención pueden obtenerse en forma de sal, por ejemplo como trifluoracetato, formiato o sal de amonio, si los compuestos de acuerdo con la invención contienen una funcionalidad suficientemente básica o ácida. Dicha sal se puede convertir en la correspondiente base libre o ácido mediante varios métodos conocidos por los expertos en la materia.

En el caso de los intermediarios de síntesis y los ejemplos de trabajo de la invención descritos a continuación, cualquier compuesto especificado en forma de sal de la base o ácido correspondiente es generalmente una sal de composición estequiométrica exacta desconocida, obtenida por la preparación respectiva y/o proceso de purificación. A menos que se especifique con más detalle, las adiciones a los nombres y fórmulas estructurales, tal como "clorhidrato", "trifluoracetato", "sal de sodio" o "x HCl", "x CF₃COOH", "x Na⁺" u otras sales, por lo tanto, no deben entenderse en un sentido estequiométrico en el caso de dichas sales, pero tienen un carácter meramente descriptivo con respecto a los componentes formadores de sal presentes en las mismas.

Esto se aplica correspondientemente si los intermediarios de síntesis o ejemplos de trabajo o sus sales se obtuvieron en forma de solvatos, por ejemplo hidratos, de composición estequiométrica desconocida (si son de un tipo definido) mediante los procesos de preparación y/o purificación descritos.

- 5 Microondas: El reactor de microondas utilizado fue un instrumento "monomodo" del tipo Biotage Initiator™ o Initiator Plus™.

Cromatografía iónica cuantitativa (IC): Determinación de iones con patrones externos; instrumento: Thermo Scientific ICS 5000+; columnas IC capilares: IonPac AS11–HC e IonPac CS16; eluyente: gradiente de eluyente $[H]^+$ $[OH]^-$; detector: detección de conductividad.

- 10 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones (1H -RMN): Los espectros de 1H -RMN se registraron en solvente deuterado (DMSO- d_6) con espectrómetros Bruker Avance funcionando a 400, 500 o 600 MHz, como se indica. Los cambios químicos se informan en ppm en relación con el tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Las descripciones de los patrones de acoplamiento de las señales de 1H RMN se basan en la apariencia óptica de las señales y no reflejan necesariamente la interpretación físicamente correcta. En general, la información de desplazamiento químico se refiere al centro de la señal. En el caso de multipletes, se dan intervalos. Las señales oscurecidas o parcialmente oscurecidas por solvente o agua se asignaron tentativamente o no se han enumerado. Las señales significativamente ampliadas, causadas, por ejemplo, por la rotación rápida de los restos moleculares o por el intercambio de protones, también se asignaron tentativamente (a menudo denominadas multiplete amplio o singlete amplio) o no se enumeraron.
- 15
- 20

- Difracción de rayos X en polvo (XRPD): Los patrones de difracción de rayos X se registraron a temperatura ambiente utilizando difractómetros XRD X'Pert PRO (PANalytical) (radiación Cu K alfa 1, longitud de onda 1,5406 Å). No hubo preparación de muestras. Todos los reflejos de rayos X se citan como valores de 2θ (theta) (pico máximo) con una resolución de $\pm 0,2^\circ$.
- 25

Espectroscopía infrarroja (IR): Los espectros IR se registraron a temperatura ambiente utilizando un espectrofotómetro FT–IR utilizando un dispositivo Tensor 37 de Bruker. La resolución fue 2 cm^{-1} .

- En los espectros de RMN de mezclas de estereoisómeros, los números mencionados con “y” indican que los estereoisómeros muestran señales separadas para el átomo de hidrógeno respectivo, es decir, “.... y (2 x s, 1H)” significa que un átomo de hidrógeno está representado por 2 singuletes, cada singulete de uno o más estereoisómero(s) diferente(s).
- 30

Explicación de las figuras:

Figura 1: espectro infrarrojo del Ejemplo 1

Figura 2: espectro infrarrojo del Ejemplo 2

Figura 3: Espectro infrarrojo del Ejemplo 3

5 Figura 4: Espectro infrarrojo del Ejemplo 4

Figura 5: Espectro infrarrojo del Ejemplo 5

Figura 6: Espectro infrarrojo del Ejemplo 6

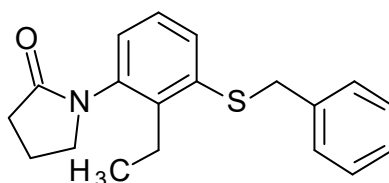
Figura 7: Espectro infrarrojo del Ejemplo 7

Figura 8: Espectro infrarrojo del Ejemplo 8

10 Figura 9: Espectro infrarrojo del Ejemplo 9

Compuestos de partida**Intermediario 1**

1-[3-(Bencilsulfanil)-2-etilfenil]pirrolidin-2-ona



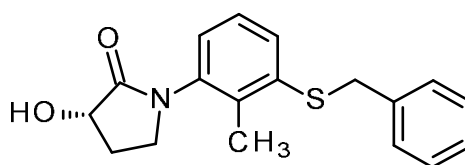
- 15 A una solución de 1-(bencilsulfanil)-3-bromo-2-etilbenceno (13,0 g, 42,3 mmol; para su preparación, véase *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441–9456, compuesto 40b) y pirrolidin-2-ona (14,5 ml, 190 mmol) en dioxano (345 ml) y DMF (87 ml) bajo argón, DMEDA (5,5 ml, 50,8 mmol), yoduro de cobre(I) (9,67 g, 50,8 mmol) y carbonato de potasio (35,1 g, 254 mmol) y se burbujeó argón a través de la mezcla durante 5 minutos más. Luego, la mezcla se agitó
- 20 a 110 °C durante 16 h en un autoclave cerrado sin ajuste de presión adicional. Después de enfriar hasta ta, la mezcla se filtró y el solvente se eliminó a presión reducida. El residuo se recogió en agua y acetato de etilo y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo, después de lo cual las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución saturada de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El residuo se purificó mediante
- 25 cromatografía flash (sílice, ciclohexano/acetato de etilo 1:1) para proporcionar un primer lote del compuesto del título (9,30 g, 65% de la teoría, 92% de pureza). Se obtuvo un segundo lote (280 mg, 2% de la teoría, 99% de pureza) después de una cromatografía flash adicional (Biotage Isolera, cartucho SNAP Ultra de gel de sílice de 50 g, gradiente de ciclohexano/acetato de etilo).

LC-MS (Método 7): $T_r = 2,03$ min; MS (ESIpos): $m/z = 312$ $[M+H]^+$

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 7,41–7,36 (m, 3H), 7,34–7,29 (m, 2H), 7,28–7,19 (m, 2H), 7,02 (dd, 1H), 4,25 (s, 2H), 3,61 (t, 2H), 2,59–2,50 (m, 2H, parcialmente oscurecido), 2,40 (t, 2H), 2,16–2,05 (m, 2H), 1,01 (t, 3H)

Intermediario 2

5 (3S)-1-[3-(Bencilsulfanil)-2-metilfenil]-3-hidroxi-pirrolidin-2-ona

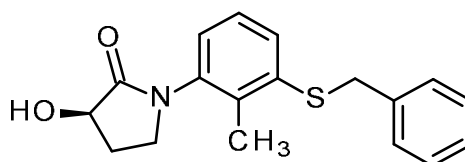


En atmósfera de argón, se mezcló 1-(bencilsulfanil)-3-bromo-2-metilbenceno (4,50 g, 15,3 mmol; para la preparación, véase el documento WO 2009/103440, página 81, intermediario 83) con (3S)-3-hidroxi-pirrolidin-2-ona (3,10 g, 30,7 mmol), yoduro de cobre (I) (4,09 g, 21,5 mmol) y carbonato de potasio (8,48 g, 61,4 mmol), seguido de la adición de dioxano (120 ml) y DMF (31 ml). Luego se agregó DMEDA (2,3 ml, 21,5 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche a 110°C. Después de enfriar hasta ta, la mezcla se combinó con mezclas de dos reacciones de prueba que se habían obtenido en condiciones similares a partir de 100 mg y 1,0 g de 1-(bencilsulfanil)-3-bromo-2-metilbenceno, respectivamente. Las mezclas combinadas se filtraron sobre Celite, se lavaron con acetato de etilo y el solvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en acetato de etilo y agua y se filtró de nuevo sobre Celite. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución saturada de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (Biotage Isolera, cartucho de sílice, gradiente de ciclohexano/acetato de etilo) para proporcionar el compuesto del título (4,24 g, 65% de la teoría, 92% de pureza). El rendimiento se basa en los experimentos combinados.

LC-MS (Método 9): T_r = 1,18 min; MS (ESIpos): m/z = 314 [M+H]⁺
¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 7,38 (d, 2H), 7,34–7,29 (m, 3H), 7,27–7,23 (m, 1H), 7,21 (t, 1H), 7,05 (d, 1H), 5,65 (d, 1H), 4,33–4,25 (m, 1H), 4,23 (s, 2H), 3,59–3,54 (m, 1H), 3,54–3,48 (m, 1H), 2,45–2,38 (m, 1H), 2,05 (s, 3H), 1,98–1,89 (m, 1H).

Intermediario 3

(3R)-1-[3-(Bencilsulfanil)-2-metilfenil]-3-hidroxi-pirrolidin-2-ona



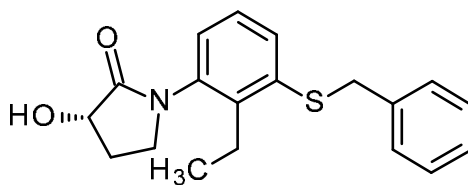
En atmósfera de argón, se mezcló 1-(bencilsulfanil)-3-bromo-2-metilbenceno (3,00 g, 10,2 mmol; para la preparación, véase el documento WO 2009/103440, página 81, intermediario 83) con (3R)-3-hidroxi-pirrolidin-2-ona (1,86 g, 18,4 mmol), yoduro de cobre (I) (2,73 g, 14,3 mmol) y carbonato de potasio (5,66 g, 40,9 mmol), seguido de la adición de dioxano (82 ml) y DMF (21 ml). Luego se añadió DMEDA (1,5 ml, 14 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche a 110°C. Después de enfriar hasta ta, la mezcla se combinó con una mezcla de una reacción de prueba que se había obtenido en condiciones similares a partir de 42 mg de 1-(bencilsulfanil)-3-bromo-2-metilbenceno. Las mezclas combinadas se filtraron sobre Celite, se lavaron con acetato de etilo y el solvente se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en acetato de etilo y agua y se filtró de nuevo sobre Celite. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución saturada de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (Biotage Isolera, cartucho de sílice, gradiente de ciclohexano/acetato de etilo) para proporcionar el compuesto del título (2,27 g, 54% de la teoría, 79% de pureza). El rendimiento se basa en los experimentos combinados.

LC-MS (Método 9): $T_r = 1,18$ min; MS (ESIpos): $m/z = 314$ $[M+H]^+$

1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 7,42 (d, 2H), 7,38–7,33 (m, 3H), 7,31–7,27 (m, 1H), 7,25 (t, 1H), 7,08 (d, 1H), 5,69 (d, 1H), 4,34–4,30 (m, 1H), 4,27 (s, 2H), 3,63–3,57 (m, 1H), 3,57–3,57 (m, 1H), 2,49–2,42 (m, 1H), 2,09 (s, 3H), 2,02–1,94 (m, 1H).

20 **Intermediario 4**

(3S)-1-[3-(Bencilsulfanil)-2-etilfenil]-3-hidroxi-pirrolidin-2-ona



A una mezcla de 1-(bencilsulfanil)-3-bromo-2-etilbenceno (4,05 g, 13,19 mmol; para la preparación, consulte *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441–9456, compuesto 40b) y (3S)-3-hidroxi-2-pirrolidinona (4,0 g, 39,56 mmol) en dioxano (105 ml) y DMF (27 ml) bajo argón se agregaron DMEDA (1,14 ml, 10,55 mmol), yoduro de cobre (I) (2,01 g, 10,55 mmol) y carbonato de potasio (7,29 g, 52,75 mmol). La mezcla se repartió por igual en 8 recipientes para microondas y se tapó. 2 de estos recipientes se calentaron en un microondas durante 16 h a 110 °C, mientras que los otros 6 recipientes se agitaron durante 16 h a 110 °C en un bloque calefactor. Después de enfriar hasta ta, las mezclas combinadas se filtraron y el solvente se eliminó. El residuo se recogió en acetato de etilo y agua y, después de la separación de fases, la fase acuosa se extrajo

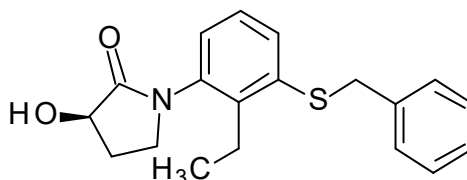
tres veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron una vez con solución saturada de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El residuo se adsorbió en Isolute y se purificó mediante cromatografía flash (Biotage Isolera, 100 g de gel de sílice SNAP-Ultra, gradiente de ciclohexano–acetato de etilo). Las fracciones de producto combinadas se concentraron y se secaron al vacío para proporcionar el compuesto del título (2,17 g, 49% de la teoría, 98% de pureza).

LC–MS (Método 8): $T_r = 0,92$ min; MS (ESIpos): $m/z = 328$ $[M+H]^+$

1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 7,41–7,36 (m, 3H), 7,34–7,29 (m, 2H), 7,28–7,20 (m, 2H), 7,01 (dd, 1H), 5,69 (d, 1H), 4,30–4,24 (m, 3H), 3,58–3,52 (m, 1H), 3,50–3,42 (m, 1H), 2,60–2,47 (m, 2H, parcialmente oscurecido), 2,45–2,36 (m, 1H), 1,98–1,87 (m, 1H), 1,01 (t, 3H).

Intermediario 5

(3R)–1–[3–(Bencilsulfanil)–2–etilfenil]–3–hidroxipirrolidin–2–ona



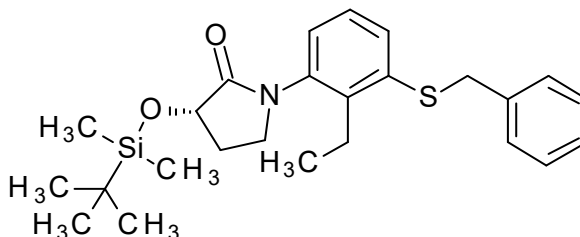
A 1–(bencilsulfanil)–3–bromo–2–etilbenceno (844 mg, 2,75 mmol; para la preparación véase *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441–9456, compuesto 40b) bajo argón se le agregó (3R)–3–hidroxi–2–pirrolidinona (500 mg, 4,95 mmol), yoduro de cobre (I) (733 mg, 3,85 mmol), carbonato de potasio (1,52 g, 11,0 mmol), dioxano (22 ml), DMF (5,6 ml) y DMEDA (0,41 ml, 3,85 mmol). La mezcla se agitó durante la noche a 110°C. Después de enfriar hasta ta, las mezclas se filtraron sobre Celite y se eliminó el solvente. El residuo se recogió en acetato de etilo y agua, se filtró de nuevo sobre Celite y, tras la separación de fases, la fase acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron una vez con solución saturada de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (gel de sílice, gradiente de ciclohexano–acetato de etilo). Las fracciones de producto combinadas se concentraron y se secaron al vacío para proporcionar el compuesto del título (548 mg, 60% de la teoría, 99% de pureza).

LC–MS (Método 7): $T_r = 1,78$ min; MS (ESIpos): $m/z = 328$ $[M+H]^+$

1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 7,41–7,36 (m, 3H), 7,34–7,29 (m, 2H), 7,28–7,20 (m, 2H), 7,01 (d, 1H), 5,66 (d, 1H), 4,30–4,24 (m, 3H), 3,58–3,52 (m, 1H), 3,50–3,42 (m, 1H), 2,60–2,47 (m, 2H, parcialmente oscurecido), 2,45–2,36 (m, 1H), 1,98–1,87 (m, 1H), 1,01 (t, 3H).

Intermediario 6

(3S)-1-[3-(Bencilsulfanil)-2-etilfenil]-3-{[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}pirrolidin-2-ona



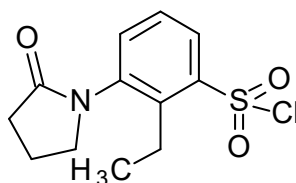
A una solución de (3S)-1-[3-(bencilsulfanil)-2-etilfenil]-3-hidroxipirrolidin-2-ona (2,17 g, 6,64 mmol, Intermediario 4) en DCM (19 ml) y DMF (4,8 ml) se agregaron cloruro de *tert*-butildimetilsililo (3,0 g, 19,93 mmol), DIPEA (2,9 ml, 16,61 mmol) y DMAP (16 mg, 0,13 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche a ta. La mezcla se concentró y el residuo se recogió en acetonitrilo y agua y se purificó mediante HPLC preparativa (Método 1). Las fracciones de producto combinadas se liofilizaron para proporcionar el compuesto del título (2,0 g, 68% de la teoría, 100% de pureza).

10 LC-MS (Método 7): $T_r = 2,84$ min; MS (ESIpos): $m/z = 442$ $[M+H]^+$

1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 7,41–7,36 (m, 3H), 7,34–7,29 (m, 2H), 7,28–7,20 (m, 2H), 7,02 (d, 1H), 4,48 (t, 1H), 4,26 (s, 2H), 3,62–3,53 (m, 1H), 3,53–3,45 (m, 1H), 2,59–2,40 (m, 3H, parcialmente oscurecido), 2,03–1,90 (m, 1H), 1,01 (t, 3H), 0,9 (s, 9H), 0,13 (s, 3H), 0,12 (s, 3H).

15 Intermediario 7

Cloruro de 2-etil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)benceno-1-sulfonilo

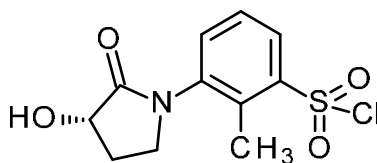


A una solución de 1-[3-(bencilsulfanil)-2-etilfenil]pirrolidin-2-ona (9,30 g, 29,86 mmol, sin ajustar por pureza, Intermediario 1) en ácido acético (550 ml), se agregó cloruro de sulfurilo (9,60 ml, 119,4 mmol) y la mezcla se agitó durante 1 h a ta. Se agregó agua y la mezcla se extrajo tres veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se lavaron tres veces con solución saturada de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El residuo se recogió en ciclohexano y se purificó mediante cromatografía flash (Biotage Isolera One, cartucho de gel de sílice SNAP Ultra de 100 g, gradiente de ciclohexano/acetato de etilo) para proporcionar el compuesto del título (5,15 g, 55% de la teoría, 91% de pureza).

LC-MS (Método 7): $T_r = 1,66$ min; MS (ESIpos): $m/z = 288$ $[M+H]^+$

Intermediario 8

Cloruro de 3-[(3S)-3-Hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]-2-metilbenceno-1-sulfonilo

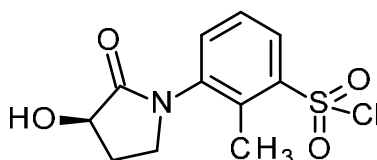


A una solución de (3S)-1-[3-(bencilsulfanil)-2-metilfenil]-3-hidroxipirrolidin-2-ona (4,24 g, 92% de pureza, 12,45 mmol, Intermediario 2) en DCM (73 ml) y se agregó ácido acético (290 ml), NCS (6,65 g, 49,8 mmol) y la mezcla se agitó a ta durante 1 h. Se agregó agua y la mezcla se extrajo tres veces con diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se lavaron tres veces con solución saturada de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El residuo se recogió en DCM y se lavó tres veces con solución saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró, y el residuo se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título (3,94 g, 80% de la teoría, 73% de pureza).

LC-MS (Método 7): $T_r = 1,26$ min; MS (ESIpos): $m/z = 290$ $[M+H]^+$.

Intermediario 9

Cloruro de 3-[(3R)-3-Hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]-2-metilbenceno-1-sulfonilo



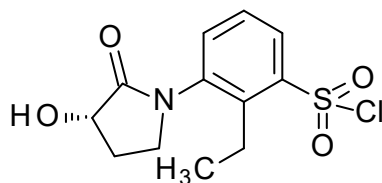
15

A una solución de (3R)-1-[3-(bencilsulfanil)-2-metilfenil]-3-hidroxipirrolidin-2-ona (2,27 g, 79% de pureza, 5,72 mmol, Intermediario 3) en DCM (34 ml) y se agregó ácido acético (135 ml), NCS (3,06 g, 22,9 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregó agua y la mezcla se extrajo tres veces con diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución saturada de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El residuo se recogió en DCM y se lavó tres veces con solución saturada de cloruro de sodio, seguido de una nueva extracción de las fases acuosas combinadas con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron, y el residuo se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título (1,90 g, 62% de la teoría, 54% de pureza).

25 LC-MS (Método 7): $T_r = 1,26$ min; MS (ESIpos): $m/z = 290$ $[M+H]^+$.

Intermediario 10

Cloruro de 2-etil-3-[(3S)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonilo

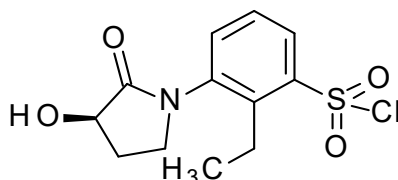


A una solución de (3S)-1-[3-(benzylsulfanyl)-2-ethylphenyl]-3-[(*tert*-butil(dimetil)silil)oxi]-pirrolidin-2-ona (2,0 g, 4,53 mmol, intermediario 6) en ácido acético (120 ml) se agregó cloruro de sulfúrico (1,50 ml, 18,1 mmol) y la mezcla se agitó a ta durante 1 h. La mezcla se diluyó con agua y se extrajo cinco veces con DCM, después de lo cual la fase acuosa se saturó con cloruro de sodio y se extrajo nuevamente con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron mediante un evaporador rotatorio a una temperatura del baño de 25°C. El residuo se purificó en dos porciones mediante cromatografía flash (Biotage Isolera, 100 g de gel de sílice SNAP-Ultra, gradiente de ciclohexano-acetato de etilo). Las fracciones de producto combinadas se concentraron mediante un evaporador rotatorio a una temperatura del baño de 25°C para proporcionar el compuesto del título (1,11 g, 72% de la teoría, 90% de pureza de acuerdo con LC-MS).

LC-MS (Método 7): $T_r = 1,39$ min; MS (ESIpos): $m/z = 304$ $[M+H]^+$.

Intermediario 11

15 Cloruro de 2-etil-3-[(3R)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonilo



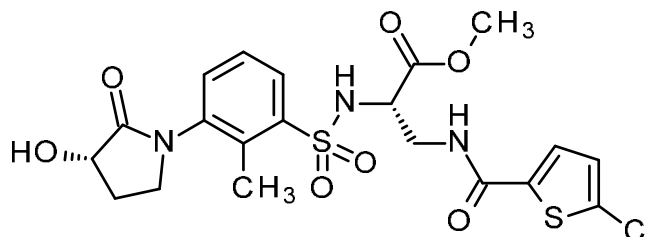
A una solución de (3R)-1-[3-(benzylsulfanyl)-2-ethylphenyl]-3-hidroxipirrolidin-2-ona (545 mg, 1,65 mmol, Intermediario 5) en DCM (10 ml) y ácido acético (39 ml) se agregó NCS (880 mg, 6,59 mmol) y la mezcla se agitó a ta durante 1 h. Luego, la mezcla se diluyó con agua y se extrajo tres veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se lavaron tres veces con una solución saturada de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron en un evaporador rotatorio a una temperatura del baño de 25°C. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (Biotage Isolera, gel de sílice SNAP-Ultra, gradiente de ciclohexano-acetato de etilo). Las fracciones del producto combinado se concentraron en un evaporador rotatorio a una temperatura del baño de 25°C para proporcionar el compuesto del título (450 mg, 84% de la teoría, 93% de pureza de acuerdo con RMN, que contenía algo de solvente).

LC-MS (Método 7): $T_r = 1,39$ min; MS (ESIpos): $m/z = 304$ $[M+H]^+$

^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ [ppm]: 7,80 (dd, 1H), 7,21–7,16 (m, 1H), 7,13 (dd, 1H), 4,27 (t, 1H), 3,63–3,57 (m, 1H), 3,55–3,46 (m, 1H), 3,02–2,87 (m, 2H), 2,46–2,38 (m, 1H), 1,97–1,89 (m, 1H), 1,05 (t, 3H).

Intermediario 12

- 5 3-[(5-Clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{3-[(3S)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]-2-metilbenceno-1-sulfonil}-*S*-alaninato de metilo

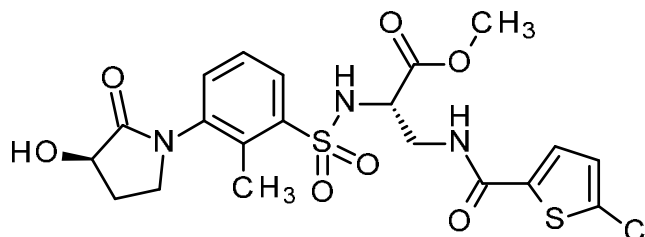


- A una solución de cloruro de 3-[(3S)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]-2-metilbenceno-1-sulfonilo (3,69 g, 7,39 mmol, 58% de pureza, Intermediario 8) en DCM (91 ml) se agregaron
 10 trietilamina (4,1 ml, 29,55 mmol) y metil-3-{[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-*S*-alaninato (2,04 g, 7,76 mmol; para la preparación consulte *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441–9456, compuesto 49), y la mezcla de reacción se agitó a ta durante 1,5 h. La mezcla se combinó con una mezcla de una reacción a menor escala que se había obtenido en condiciones similares, a partir de 250 mg (94% de pureza) de cloruro de 3-[(3S)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]-2-
 15 metilbenceno-1-sulfonilo. Las mezclas combinadas se diluyeron con DCM y se lavaron dos veces con agua, seguido de una nueva extracción de las fases acuosas combinadas con DCM. A continuación, la fase orgánica se lavó con solución saturada de cloruro sódico, se secó y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (gel de sílice, DCM/metanol 20:1) para proporcionar el compuesto del título (2,25 g, 46% de la teoría, 87% de pureza). El rendimiento
 20 se basa en los experimentos combinados.

LC-MS (Método 9): T_r = 0,99 min; MS (ESI^{neg}): m/z = 514 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Intermediario 13

- 3-[(5-Clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{3-[(3R)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]-2-metilbenceno-1-sulfonil}-*S*-alaninato de metilo

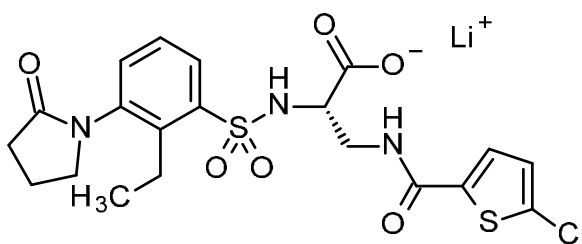


A una solución de cloruro de 3-[(3R)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]-2-metilbenceno-1-sulfonilo (1,90 g, 54% de pureza, 3,54 mmol, intermediario 9) en DCM (44 ml) se agregaron trietilamina (2,0 ml, 14,2 mmol) y metil-3-[[[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-S-alaninato (0,98 g, 3,72 mmol; para la preparación consulte *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441-9456, compuesto 49), y la mezcla de reacción se agitó a ta durante 1,5 h. La mezcla se diluyó con DCM y se lavó dos veces con agua, seguido de una nueva extracción de las fases acuosas combinadas con DCM. A continuación, la fase orgánica se lavó con solución saturada de cloruro sódico, se secó y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (gel de sílice, gradiente de DCM/metanol) para proporcionar el compuesto del título (882 mg, 46% de la teoría, 96% de pureza).

LC-MS (Método 9): $T_r = 0,99$ min; MS (ESI^{neg}): $m/z = 514$ $[M-H]^-$.

Intermediario 14

(2S)-3-[[[(5-Cloro-2-tienil)carbonil]amino}-2-({[2-etil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)fenil]-sulfonil}amino)propanoato de litio



15

A una solución de 3-[(5-clorotiofeno-2-carbonil)amino]-N-[2-etil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)benceno-1-sulfonil]-S-alaninato de metilo (2,0 g, 3,89 mmol, Referencia 5) en THF (30 ml) se agregaron monohidrato de hidróxido de litio (816 mg, 19,45 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. A continuación, la mezcla se concentró y el residuo se recogió en agua/metanol/acetonitrilo y se purificó mediante HPLC preparativa (Método 3). Las fracciones de producto combinadas se concentraron y el residuo se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título (1,56 g, 80% de la teoría, 100% de pureza).

20

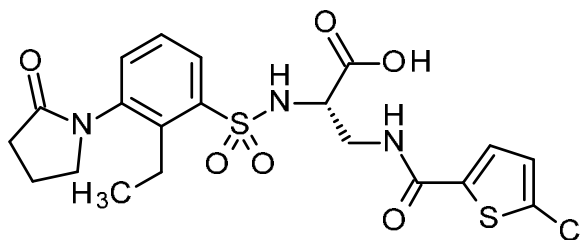
LC-MS (método 7): $T_r = 1.38$ min; MS (ESI^{pos}): $m/z = 500$ $[M+H]^+$

1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 8,65 (br s, 1H), 7,91 (d, 1H), 7,47 (d, 1H), 7,43 (d, 1H), 7,36 (t, 1H), 7,15 (d, 1H), 3,65 (br s, 2H), 3,57-3,48 (m, 1H), 3,38-3,27 (oscurecido, 2H), 2,98-2,88 (m, 1H), 2,88-2,80 (m, 1H), 2,42 (t, 2H), 2,17-2,08 (m, 2H), 1,08 (t, 3H).

25

Intermediario 15

3-[(5-Clorotiofen-2-carbonil)amino]-N-[2-etil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)benceno-1-sulfonil]-S-alanina



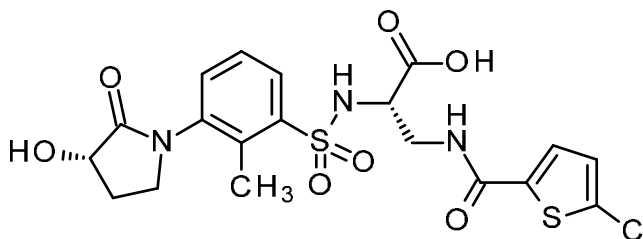
A una solución de 3-[(5-clorotiofeno-2-carbonil)amino]-*N*-[2-etil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)benceno-1-sulfonyl]-*S*-alaninato de metilo (515 mg, 1,00 mmol, Referencia 5) en THF (5 ml) se agregó solución de hidróxido de litio 1 M (5,0 ml, 5,0 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Luego, la mezcla se diluyó con agua y se lavó con éter dietílico. A continuación, la fase acuosa se trató con ácido clorhídrico 1 M (6 ml) y se extrajo tres veces con butanol. Las fases de butanol combinadas se concentraron y el residuo se recogió en acetonitrilo/agua y se liofilizó para proporcionar el compuesto del título (482 mg, 90% de la teoría, 94% de pureza).

10 LC-MS (Método 7): $T_r = 1,38$ min; MS (ESIpos): $m/z = 500$ $[M+H]^+$

1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 12,84 (s, 1H), 8,68 (t, 1H), 8,44 (d, 1H), 7,85 (d, 1H), 7,55 (d, 1H), 7,41 (d, 1H), 7,32 (t, 1H), 7,17 (d, 1H), 4,00 (dd, 1H), 3,66–3,57 (br m, 2H), 3,57–3,50 (m, 1H), 3,43–3,36 (m, 1H), 2,93–2,80 (m, 2H), 2,42 (t, 2H), 2,16–2,09 (m, 2H), 1,08 (t, 3H).

Intermediario 16

15 3-[(5-Clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]-2-metilbenceno-1-sulfonyl}-*S*-alanina



A una solución de 3-[(5-clorotiofeno-2-carbonil)amino]-*N*-{3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]-2-metilbenceno-1-sulfonyl}-*S*-alaninato de metilo (2,25 g, 87% de pureza, 3,79 mmol, Intermediario 12) en THF (8,1 ml) se agregó solución acuosa de hidróxido de litio (38 ml, 1,0 M, 38 mmol) y la mezcla se agitó a ta durante 2 h. Después de la evaporación de THF, la mezcla acuosa se acidificó lentamente con ácido clorhídrico 2 M hasta que se alcanzó un valor de pH de 1. La mezcla resultante se extrajo dos veces con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico, se concentraron y se secaron al vacío para proporcionar el compuesto

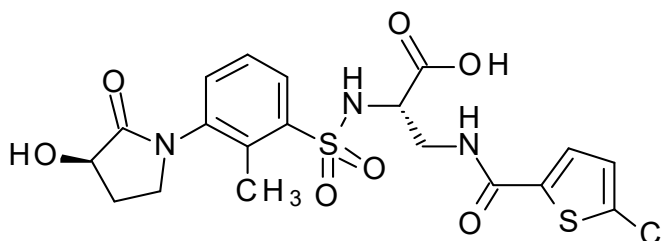
del título (1,96 g, 97% de la teoría, 94% de pureza, que contenía algo de solvente de acuerdo con RMN) .

LC-MS (Método 9): $T_r = 0,89$ min; MS (ESIpos): $m/z = 502$ $[M+H]^+$

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 12,84 (br s, 1H), 8,55 (t, 1H), 8,35 (d, 1H), 7,81 (d, 1H),
 5 7,48 (d, 1H), 7,40 (d, 1H), 7,31 (t, 1H), 7,15 (d, 1H), 5,70 (d, 1H), 4,33–4,28 (m, 1H), 4,02–3,97
 (m, 1H), 3,58–3,49 (m, 2H), 3,49–3,41 (m, 1H), 3,38–3,30 (m, 1H, parcialmente oscurecido), 2,47–
 2,39 (m, 1H), 2,35 (s, 3H), 1,97–1,89 (m, 1H).

Intermediario 17

3-[(5-Clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{3-[(3R)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]-2-
 10 metilbenceno-1-sulfonyl}-S-alanina



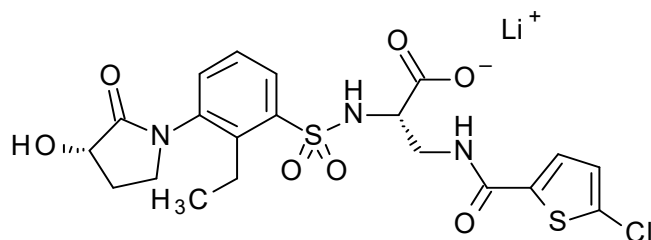
A una solución de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{3-[(3R)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-
 1-il]-2-metilbenceno-1-sulfonyl}-S-alaninato de metilo (882 mg, 1,71 mmol, Intermediario 13)
 en THF (3,6 ml) se agregó solución acuosa de hidróxido de litio (17 ml, 1,0 M, 17 mmol) y la
 15 mezcla se agitó a ta durante 2 h. Después de la evaporación de THF, la mezcla acuosa se acidificó
 lentamente con ácido clorhídrico 2 M hasta que se alcanzó un valor de pH de 1. La mezcla
 resultante se extrajo dos veces con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se secaron
 sobre sulfato sódico, se concentraron y se secaron al vacío para proporcionar el compuesto del
 título (784 mg, 81% de la teoría, 89% de pureza, que contenía algo de solvente de acuerdo con
 20 RMN) .

LC-MS (Método 9): $T_r = 0,89$ min; MS (ESIpos): $m/z = 502$ $[M+H]^+$

1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 12,76 (br s, 1H), 8,57 (t, 1H), 8,36 (d, 1H), 7,82 (d, 1H),
 7,50 (d, 1H), 7,42 (d, 1H), 7,32 (t, 1H), 7,16 (d, 1H), 5,70 (d, 1H), 4,31 (br t, 1H), 4,02–3,97 (m,
 1H), 3,58–3,50 (m, 2H), 3,50–3,44 (m, 1H), 3,39–3,33 (m, 1H), 2,47–2,39 (m, 1H), 2,36 (s, 3H),
 25 1,98–1,92 (m, 1H).

Intermediario 18

(2S)-3-{[(5-Cloro-2-tienil)carbonil]amino}-2-[(2-etil-3-[(3S)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-
 il]fenil)sulfonyl]amino]propanoato de litio



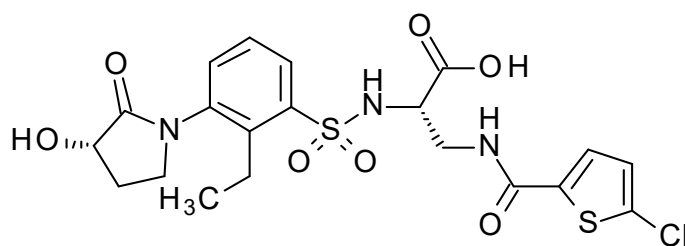
A una solución de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonyl}-*S*-alaninato de metilo (200 mg, 0,38 mmol, Referencia 6) en THF (2,1 ml) se agregaron monohidrato de hidróxido de litio (48 mg, 1,13 mmol) y dos gotas de agua y la mezcla se agitó durante 1 h a ta. A continuación, la mezcla se concentró y el residuo se purificó mediante HPLC preparativa (Método 1). Las fracciones de producto combinadas se liofilizaron para proporcionar el compuesto del título (140 mg, 71% de la teoría, 100% de pureza).

LC-MS (Método 7): $T_r = 1,23$ min; MS (ESIpos): $m/z = 516$ $[M+H]^+$

1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 8,70–8,64 (m, 1H), 7,93 (d, 1H), 7,47–7,40 (m, 2H), 7,40–7,34 (m, 1H), 7,16 (d, 1H), 5,75 (br s, 1H), 4,28 (t, 1H), 3,65–3,57 (m, 1H), 3,56–3,47 (m, 2H), 3,38–3,20 (m, 4H, parcialmente oscurecido), 2,98–2,76 (m, 2H), 2,47–2,38 (m, 1H), 2,00–1,87 (m, 1H), 1,07 (t, 1H).

Intermediario 19

3-[(5-Clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonyl}-*S*-alanina



A una solución de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonyl}-*S*-alaninato de metilo (508 mg, 0,96 mmol, Referencia 6) en THF (2,0 ml) se agregó solución acuosa de hidróxido de litio (1 M, 9,6 ml, 9,6 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 h a ta. Después de la evaporación de THF, la mezcla acuosa se acidificó lentamente con ácido clorhídrico 1 M hasta que se alcanzó un valor de pH de 1. La mezcla resultante se extrajo dos veces con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se concentraron y se secaron al vacío para proporcionar el compuesto del título (391 mg, 75% de la teoría, 95% de pureza), que contenía algo de solvente de acuerdo con HNMR.

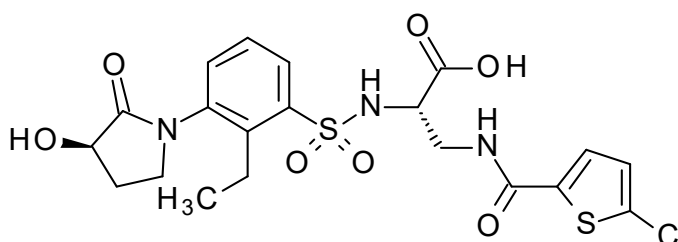
LC-MS (Método 8): $T_r = 0,65$ min; MS (ESIpos): $m/z = 516$ $[M+H]^+$

HPLC Quiral (Método 10): $T_r = 7,76$ min

1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 12,83 (br s, 1H), 8,60 (t, 1H), 8,40 (d, 1H), 7,86 (dd, 1H), 7,52 (d, 1H), 7,39 (dd, 1H), 7,33 (t, 1H), 7,16 (d, 1H), 5,70 (d, 1H), 4,32–4,26 (m, 1H), 4,05–4,00 (m, 1H), 3,59–3,51 (m, 2H), 3,49–3,36 (m, 2H), 2,91–2,81 (m, 2H), 2,47–2,37 (m, 1H), 1,97–1,87 (m, 1H), 1,06 (t, 3H).

Intermediario 20

3-[(5-Clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*R*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonyl}-*S*-alanina



10

A una solución de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*R*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonyl}-*S*-alaninato de metilo (620 mg, 95% de pureza, 1,11 mmol, Referencia 7) en THF (2,4 ml) se agregó solución acuosa de hidróxido de litio (11 ml, 1,0 M, 11 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la evaporación de THF, la mezcla acuosa se acidificó lentamente con ácido clorhídrico 1 M hasta que se alcanzó un valor de pH de 1. La mezcla resultante se extrajo dos veces con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico, se concentraron y se secaron al vacío para proporcionar el compuesto del título (570 mg, 99% de la teoría, 100% de pureza, que contenía algo de solvente de acuerdo con RMN).

20 LC-MS (Método 7): $T_r = 1,21$ min; MS (ESIpos): $m/z = 516$ $[M+H]^+$

HPLC Quiral (Método 10): $T_r = 6,31$ min

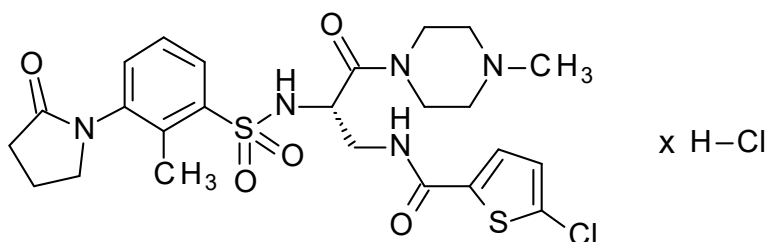
1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 12,90 (br s, 1H), 8,61 (t, 1H), 8,40 (d, 1H), 7,87 (dd, 1H), 7,54 (d, 1H), 7,40 (d, 1H), 7,33 (t, 1H), 7,17 (d, 1H), 5,71 (br s, 1H), 4,29 (br t, 1H), 4,06–3,99 (m, 1H), 3,61–3,50 (m, 2H), 3,49–3,44 (m, 1H), 3,44–3,37 (m, 1H), 2,94–2,80 (m, 2H), 2,48–2,40 (m, 1H), 1,97–1,91 (m, 1H), 1,07 (t, 3H).

25

Compuestos de referencia

Referencia 1

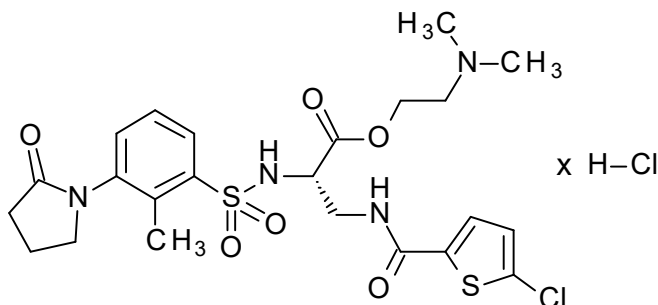
Clorhidrato de 5-cloro-N-[(2S)-2-({[2-metil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)fenil]sulfonil} amino)-3-(4-metilpiperazin-1-il)-3-oxopropil]tiofen-2-carboxamida



Para la preparación véase *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441–9456, compuesto 15.

5 Referencia 2

Clorhidrato de 3-{{[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-N-{[2-metil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)fenil]sulfonil}-S-alaninato de 2-(dimetilamino)etilo



A una solución de 3-{{[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-N-{[2-metil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)-fenil]-sulfonil}-S-alanina (150 mg, 0,31 mmol, para la preparación véase *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441–9456, compuesto 51) en THF (1,5 ml) se agregaron HBTU (140 mg, 0,37 mmol, CAS-RN 94790-37-1), DIPEA (0,16 ml, 0,93 mmol) y 2-(dimetilamino)etanol (37 µl, 370 µmol), y la mezcla se agitó durante 1 h a ta. Luego, la mezcla se concentró mediante un evaporador rotatorio y el residuo se recogió en acetonitrilo/agua y se purificó mediante HPLC preparativa con TFA agregado a la fase móvil (Método 5). Después de la liofilización, se obtuvo un lote que contenía TFA. Para generar el clorhidrato correspondiente, el lote que contenía TFA se disolvió primero en acetonitrilo/agua y la solución se agitó durante 1 hora con resina de intercambio iónico de cloruro (2,0 g de amberlita IRA405 Cl). Posteriormente, la solución se purificó mediante HPLC preparativa con adición de cloruro de hidrógeno a la fase móvil (Método 6) para proporcionar un primer lote del compuesto del título (96 mg, 52% de la teoría, 100% de pureza) y un segundo lote del compuesto del título (6 mg, 3% de la teoría, 94% de pureza).

LC-MS (Método 7): $T_r = 0,99$ min; MS (ESIpos): $m/z = 557$ $[M+H]^+$

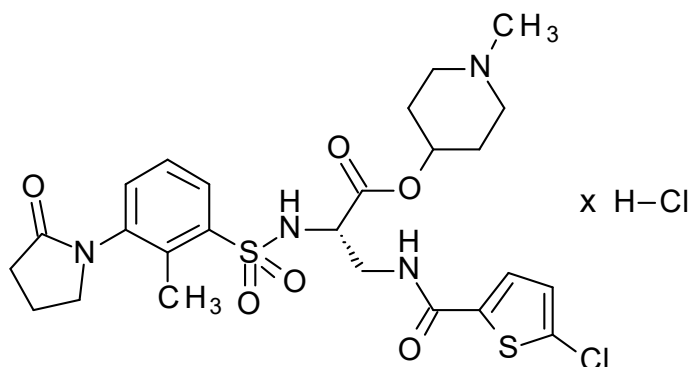
1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 10,28 (br s, 1H), 8,92 (t, 1H), 8,74 (d, 1H), 7,81 (d, 1H), 7,66 (d, 1H), 7,48 (d, 1H), 7,37 (t, 1H), 7,19 (d, 1H), 4,24–4,18 (m, 1H), 4,16–4,08 (m, 2H), 3,68–

5,57 (m, 3H), 3,52–3,45 (m, 1H), 3,23 (m, 2H), 2,75 (d, 3H), 2,73 (d, 3H), 2,45 (t, 2H), 2,39 (s, 3H), 2,18–2,11 (m, 2H).

IC: 6,0% en peso de cloruro, <1% en peso de TFA

Referencia 3

- 5 Clorhidrato de 1-metilpiperidin-4-il 3-{[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-N-{[2-metil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)fenil]sulfonil}-S-alaninato



- A una solución de 3-{[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-N-{[2-metil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)-fenil]-sulfonil}-S-alanina (150 mg, 0,31 mmol, para la preparación véase *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441–9456, compuesto 51) en THF (1,5 ml) se agregaron TBTU (119 mg, 0,37 mmol, CAS-RN 125700–67–6), DIPEA (0,16 ml, 0,93 mmol) y N-metil-4-piperidinol (44 µl, 370 µmol), y la mezcla se agitó durante la noche a ta. Luego, la mezcla se purificó mediante HPLC preparativa con cloruro de hidrógeno agregado a la fase móvil (Método 6) para proporcionar el compuesto del título (28 mg, 14% de la teoría, 100% de pureza).

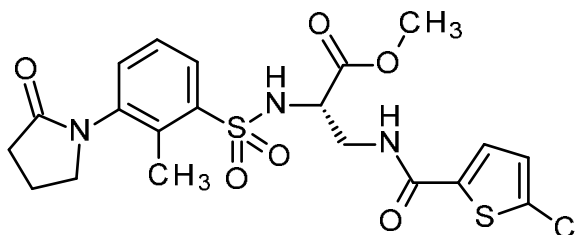
- 15 LC-MS (Método 7): $T_r = 1,00$ min; MS (ESIpos): $m/z = 583$ $[M+H]^+$

- 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 10,28 (br s, 1H), 8,86 and 8,81 (2 x t, 1 H), 8,75 and 8,74 (2 x d, 1H), 7,83 and 7,81 (2 x d, 1H), 7,62 and 7,58 (2 x d, 1H), 7,49–7,45 (m, 1H), 7,39–7,34 (m, 1H), 7,19–7,17 (m, 1H), 4,83–4,78 and 4,65–4,59 (2 x m, 1H), 4,14–4,08 and 4,04–3,98 (2 x m, 1H), 3,66–3,13 (3 x m, 6H, parcialmente oscurecido), 3,03–2,89 (m, 2H), 2,69–2,65 (m, 3H), 2,47–2,41 (m, 2H), 2,37 (s, 3H), 2,18–2,11 (m, 2H), 1,97–1,73 (2 x m, 2H), 1,67–1,50 (m, 2H).

IC: 5,6% en peso de cloruro

Referencia 4

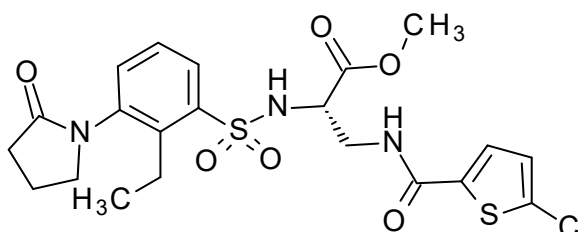
3-{[(5-Cloro-2-tienil)carbonil]amino}-N-{[2-metil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)fenil]sulfonil}-S-alaninato de metilo



Para la preparación véase *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441–9456, compuesto 50.

Referencia 5

3-[(5-Clorotiofen-2-carbonil)amino]-N-[2-etil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)bencen-1-sulfonyl]-S-
alaninato de metilo



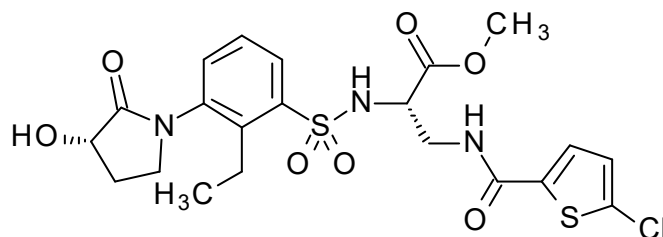
A una mezcla de cloruro de 2-etil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)benceno-1-sulfonylo (5,15 g, 17,90 mmol, Intermediario 7) en DCM (215 ml) se agregó clorhidrato de metil-3-[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-S-alaninato (5,89 g, 19,7 mmol, para la preparación véase *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441–9456, compuesto 49) y trietilamina (5,0 ml, 35,8 mmol) y la mezcla se agitó durante 1 h a ta. Luego, la mezcla se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía flash (Biotage Isolera, 100 g de gel de sílice SNAP-Ultra, gradiente de DCM/metanol). Las fracciones del producto combinadas se concentraron y secaron al vacío para proporcionar un primer lote del compuesto del título (8,35 g, 86% de la teoría, 95% de pureza) y un
segundo lote del compuesto del título (830 mg, 9% de la teoría, 100% pureza).

LC-MS (Método 8): $T_r = 0,85$ min; MS (ESIpos): $m/z = 514$ $[M+H]^+$

1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 8,68 (t, 1H), 8,63 (d, 1H), 7,81 (dd, 1H), 7,54 (d, 1H), 7,45 (dd, 1H), 7,37 (t, 1H), 7,18 (d, 1H), 4,12–4,00 (m, 1H), 3,73–3,49 (m, 3H), 3,46–3,35 (m, 4H), 2,98–2,74 (m, 2H), 2,43 (t, 2H), 2,19–2,08 (m, 2H), 1,08 (t, 3H).

Referencia 6

3-[(5-Clorotiofen-2-carbonil)amino]-N-{2-etil-3-[(3S)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonyl}-S-alaninato de metilo



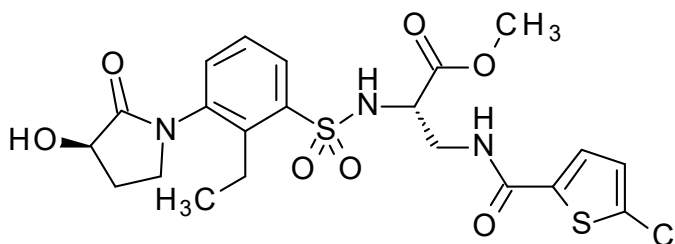
A una mezcla de cloruro de 2-etil-3-[(3S)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonilo (1,11 g, 3,66 mmol, Intermediario 10) en DCM (45 ml) se agregó clorhidrato de metil-3-[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-S-alaninato (1,64 g, 5,50 mmol, para la preparación, véase *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441–9456, compuesto 49) y trietilamina (1,0 ml, 7,32 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 h a ta. A continuación, la mezcla se concentró y el residuo se adsorbió en Isolute y se purificó mediante cromatografía flash (Biotage Isolera, 50 g de gel de sílice SNAP-Ultra, gradiente de ciclohexano/acetato de etilo/metanol). Las fracciones de producto combinadas se concentraron y se secaron al vacío para proporcionar el compuesto del título (892 mg, 44% de la teoría, 96% de pureza de acuerdo con LC-MS).

LC-MS (Método 7): Tr = 1,42 min; MS (ESIpos): m/z = 530 [M+H]⁺

¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 8,71–8,62 (m, 2H), 7,85–7,80 (m, 1H), 7,54 (d, 1H), 7,46–7,42 (m, 1H), 7,40–7,34 (m, 1H), 7,17 (d, 1H), 5,76–5,74 (m, 1H), 4,34–4,27 (m, 1H), 4,11–4,00 (m, 1H), 3,68–3,34 (m, 7H), 2,95–2,77 (m, 2H), 2,48–2,39 (m, 1H), 2,00–1,88 (m, 1H), 1,07 (t, 3H).

Referencia 7

3-[(5-Clorotiofen-2-carbonil)amino]-N-{2-etil-3-[(3R)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonol}-S-alaninato de metilo



A una mezcla de cloruro de 2-etil-3-[(3R)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonilo (445 mg, 93% de pureza, 1,36 mmol, Intermediario 11) en DCM (17 ml) se agregaron trietilamina (0,63 ml, 4,5 mmol) y clorhidrato de metil-3-[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-S-alaninato (481 mg, 1,61 mmol, para la preparación véase *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441–9456, compuesto 49) y la mezcla se agitó durante 15 min a ta. Se agregó más clorhidrato de metil-3-[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-S-alaninato (45 mg, 0,15 mmol) y la mezcla se agitó a

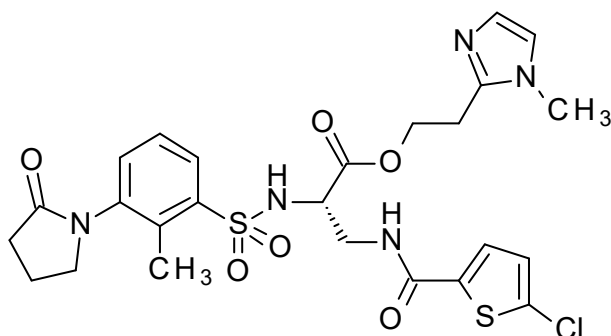
temperatura ambiente durante otros 10 minutos. Luego se agregó agua y se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo dos veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución saturada de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (gel de sílice, acetato de etilo/gradiente de metanol). Las fracciones del producto combinado se concentraron y secaron al vacío para proporcionar el compuesto del título (620 mg, 82% de la teoría, 95% de pureza de acuerdo con RMN).

LC-MS (Método 7): $T_r = 1,40$ min; MS (ESIpos): $m/z = 530$ $[M+H]^+$

1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 8,65 (t, 1H), 8,61 (d, 1H), 7,83 (d, 1H), 7,54 (d, 1H), 7,44 (d, 1H), 7,38 (t, 1H), 7,17 (d, 1H), 5,71 (d, 1H), 4,33–4,27 (m, 1H), 4,10–4,04 (m, 1H), 3,62–3,48 (m, 3H), 3,45–3,38 (m, 4H), 2,95–2,87 (m, 1H), 2,86–2,77 (m, 1H), 2,47–2,40 (m, 1H), 2,00–1,91 (m, 1H), 1,07 (t, 3H).

Referencia 8

3-[[[(5-Cloro-2-tienil)carbonil]amino}-N-{[2-metil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)fenil]sulfonil}-S-alaninato de 2-(1-metil-1H-imidazol-2-il)etilo



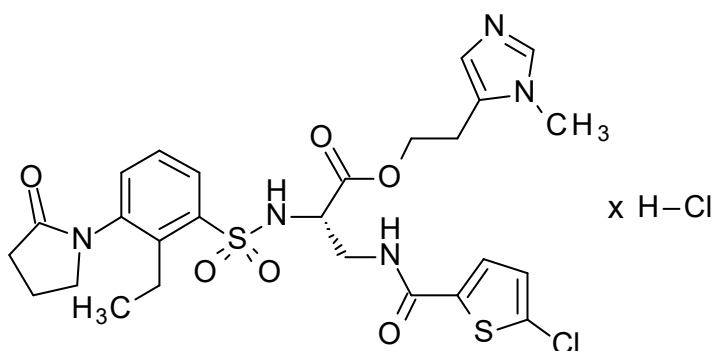
A una solución de 3-[[[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-N-{[2-metil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)-fenil]-sulfonil}-S-alanina (150 mg, 0,31 mmol, para la preparación véase *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441–9456, compuesto 51) en THF (3,0 ml) se agregaron HBTU (211 mg, 0,56 mmol, CAS-RN 94790–37–1), DIPEA (108 μ l, 0,62 mmol) y 2-(1-metil-1H-imidazol-2-il)etanol (117 mg, 0,93 mmol, CAS-RN 18994–70–2) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Luego, la mezcla se recogió en agua/acetonitrilo y se purificó mediante HPLC preparativa (Método 4). Las fracciones de producto combinadas se concentraron y el residuo se liofilizó. El liofilizado se disolvió en acetato de etilo y la solución se lavó varias veces con solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo resultante se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título (31 mg, 17% de la teoría, pureza 100 %).

LC-MS (Método 7): $T_r = 1,08$ min; MS (ESIpos): $m/z = 594$ $[M+H]^+$

^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ [ppm]: 13,94 (br s, 1H), 8,65 (t, 1H), 8,59 (d, 1H), 7,75 (dd, 1H), 7,58 (d, 1H), 7,54 (d, 1H), 7,48 (d, 1H), 7,44 (dd, 1H), 7,32 (t, 1H), 7,18 (d, 1H), 4,25–4,15 (m, 2H), 4,06–3,99 (m, 1H), 3,74 (s, 3H), 3,66–3,55 (m, 2H), 3,53–3,44 (m, 1H), 3,40–3,30 (1H, oscurecido), 3,17 (t, 2H), 2,44 (t, 2H), 2,34 (s, 3H), 2,18–2,10 (m, 2H).

5 Referencia 9

Clorhidrato de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-[2-etil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)benceno-1-sulfonil]-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-5-il)etilo



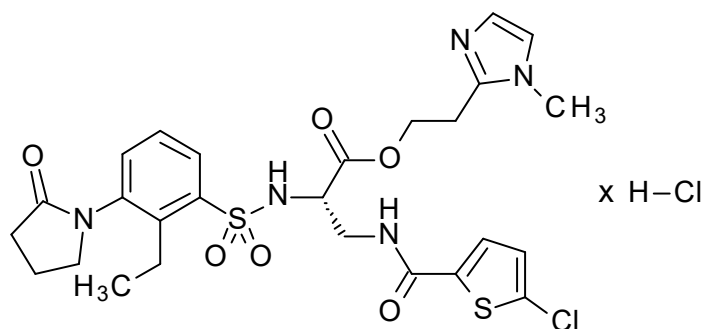
A una solución de 3-[(5-clorotiofeno-2-carbonil)amino]-*N*-[2-etil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)-benceno-1-sulfonil]-*S*-alanina (60 mg, 120 μmol , intermediario 15) en THF (2,3 ml) se agregaron HBTU (82 mg, 216 μmol , CAS-RN 94790-37-1), DIPEA (63 μl , 360 μmol) y 2-(1-metil-1*H*-imidazol-5-il)etanol (19 mg, 150 μmol , CAS-RN 802027-25-4), y la mezcla se agitó durante la noche a ta. Luego, la mezcla se concentró mediante un evaporador rotatorio a una temperatura del baño de agua de 30°C y el residuo se recogió en acetonitrilo/TFA/agua y se purificó mediante HPLC preparativa (Método 2). Después de la liofilización, se obtuvo un lote que contenía TFA. Para generar el clorhidrato correspondiente, el lote que contenía TFA se disolvió en acetonitrilo/agua y la solución se pasó diez veces a través de un intercambiador de iones de cloruro (1,0 g de resina amberlita IRA405 Cl, acondicionada con agua desionizada) por fuerza de gravedad. A continuación, la resina se enjuagó con agua desionizada/acetona y la solución se liofilizó para proporcionar el compuesto del título (64 mg, 81% de la teoría, 98% de pureza).

LC-MS (Método 7): $T_r = 1,11$ min; MS (ESIpos): $m/z = 608$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ [ppm]: 14,26 (br s, 1H), 8,99 (s, 1H), 8,84 (t, 1H), 8,70 (d, 1H), 7,81 (dd, 1H), 7,60 (d, 1H), 7,45 (dd, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,34 (t, 1H), 7,18 (d, 1H), 4,15 (t, 2H), 4,08–4,03 (m, 1H), 3,74 (s, 3H), 3,69–3,57 (m, 2H), 3,57–3,50 (m, 1H), 3,47–3,40 (m, 1H), 2,93–2,78 (m, 4H), 2,43 (t, 2H), 2,17–2,10 (m, 2H), 1,08 (t, 3H).

Referencia 10

Clorhidrato de 3-{[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-*N*-{[2-etil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)fenil]sulfonil}-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo



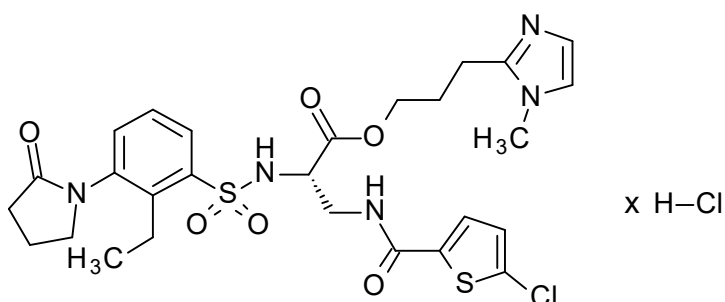
A una solución de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-[2-etil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)-benceno-1-sulfonyl]-*S*-alanina (350 mg, 0,70 mmol, Intermediario 15) en THF (13,6 ml) se agregaron HBTU (478 mg, 1,26 mmol, CAS-RN 94790-37-1), DIPEA (0,37 ml, 2,10 mmol) y 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etanol (116 mg, 0,88 mmol, 95% de pureza, CAS-RN 18994-70-2), y la mezcla se agitó durante 4 h a ta. Luego, la mezcla se concentró mediante un evaporador rotatorio a una temperatura del baño de agua de 30 °C y el residuo se recogió en acetonitrilo/TFA/agua y se purificó mediante HPLC preparativa (Método 2). Después de la liofilización, se obtuvo un lote que contenía TFA. Para generar el clorhidrato correspondiente, el lote que contenía TFA se disolvió en acetonitrilo/agua y la solución se pasó diez veces a través de un intercambiador de iones de cloruro (4,67 g de resina amberlita IRA405 Cl, acondicionada con agua desionizada) por fuerza de gravedad. A continuación, la resina se enjuagó con agua desionizada/acetona y la solución se liofilizó para proporcionar el compuesto del título (321 mg, 90% de la teoría, 99% de pureza).

LC-MS (Método 8): $T_r = 0,63$ min; MS (ESIpos): $m/z = 608$ $[M+H]^+$

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 14,43 (br s, 1H), 9,00–8,93 (m, 1H), 8,70 (d, 1H), 7,80 (dd, 1H), 7,70–7,66 (m, 1H), 7,58 (d, 1H), 7,53 (d, 1H), 7,44 (d, 1H), 7,32 (t, 1H), 7,18 (d, 1H), 4,28–4,20 (m, 2H), 4,08–4,03 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,70–3,57 (m, 2H), 3,54–3,47 (m, 1H), 3,46–3,39 (m, 1H), 3,23 (t, 2H), 2,91–2,83 (m, 1H), 2,83–2,74 (m, 1H), 2,42 (t, 2H), 2,17–2,09 (m, 2H), 1,06 (t, 3H).

20 Referencia 11

Clorhidrato de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-[2-etil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)benceno-1-sulfonyl]-*S*-alaninato de 3-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)propilo



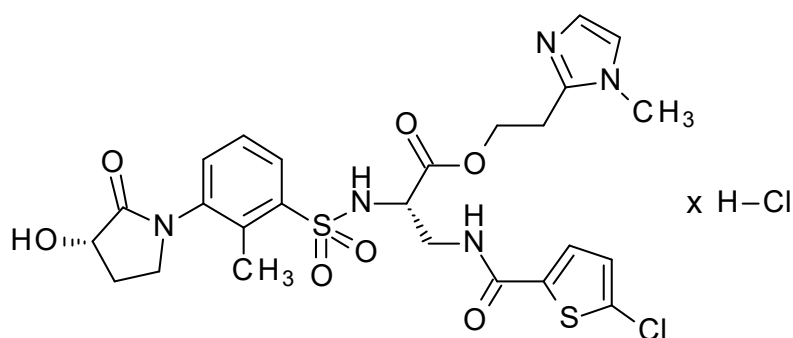
A una solución de 3-[(5-clorotiofeno-2-carbonil)amino]-*N*-[2-etil-3-(2-oxopirrolidin-1-il)-benceno-1-sulfonil]-*S*-alanina (50,0 mg, 100 μ mol, Intermediario 15) en THF (1,9 ml) se agregaron HBTU (68 mg, 180 μ mol, CAS-RN 94790-37-1), DIPEA (52 μ l, 300 μ mol) y 3-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)propan-1-ol (18 mg, 95% de pureza, 125 μ mol, CAS-RN 136609-58-0), y la mezcla se agitó durante 2 h a ta. Luego, la mezcla se concentró mediante un evaporador rotatorio a una temperatura del baño de agua de 30°C y el residuo se recogió en acetonitrilo/TFA/agua y se purificó mediante HPLC preparativa (Método 2). Después de la liofilización, se obtuvo un lote que contenía TFA. Para la generación del clorhidrato correspondiente, el lote que contenía TFA se disolvió en acetonitrilo/agua y la solución se pasó diez veces a través de un intercambiador de iones de cloruro (400 mg de resina amberlite IRA405 Cl, acondicionada con agua desionizada) mediante la fuerza de gravedad. A continuación, la resina se enjuagó con agua desionizada/acetona y la solución se liofilizó para proporcionar el compuesto del título (33 mg, 49% de la teoría, 97% de pureza).

LC-MS (Método 7): $T_r = 1,16$ min; MS (ESIpos): $m/z = 622$ $[M+H]^+$

1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 14,25 (br s, 1H), 8,92 (t, 1H), 8,74 (d, 1H), 7,84 (dd, 1H), 7,65 (d, 1H), 7,58 (d, 1H), 7,54 (d, 1H), 7,45 (dd, 1H), 7,35 (t, 1H), 7,16 (d, 1H), 4,10-4,02 (m, 1H), 3,98-3,92 (m, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,69-3,51 (m, 3H), 3,50-3,40 (m, 1H), 2,95-2,79 (m, 4H), 2,42 (t, 2H), 2,17-2,09 (m, 2H), 1,92-1,83 (m, 2H), 1,08 (t, 3H).

Referencia 12

Clorhidrato de 3-[(5-clorotiofeno-2-carbonil)amino]-*N*-{3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]-2-metilbenceno-1-sulfonil}-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo



A una solución de 3-[(5-clorotiofeno-2-carbonil)amino]-*N*-{3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]-2-metilbenceno-1-sulfonil}-*S*-alanina (60 mg, 94% de pureza, 0,11 mmol, Intermediario 16) en THF (2,2 ml) se agregaron HBTU (77 mg, 0,20 mmol, CAS-RN 94790-37-1), DIPEA (0,10 ml, 0,56 mmol) y 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etanol (18 mg, 0,14 mmol, CAS-RN 18994-70-2), y la mezcla se agitó durante la noche a ta. Luego, la mezcla se concentró mediante un evaporador rotatorio a una temperatura del baño de agua de 30°C y el residuo se recogió en

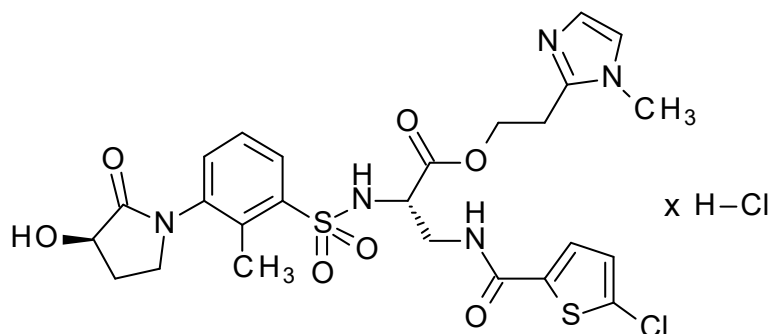
acetonitrilo/TFA/agua y se purificó mediante HPLC preparativa (Método 2). Después de la liofilización, se obtuvo un lote que contenía TFA. Para la generación del clorhidrato correspondiente, el lote que contenía TFA se disolvió en acetonitrilo/agua y la solución se pasó diez veces a través de un intercambiador de iones de cloruro (400 mg de resina amberlite IRA405 Cl, acondicionada con agua desionizada) mediante la fuerza de gravedad. A continuación, la resina se enjuagó con agua desionizada y la solución se liofilizó para proporcionar el compuesto del título (33 mg, 45% de la teoría, 98% de pureza).

LC-MS (Método 7): $T_r = 0,96$ min; MS (ESIpos): $m/z = 610$ $[M-HCl+H]^+$

1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 14,27 (br s, 1H), 8,82 (t, 1H), 8,64 (d, 1H), 7,76 (d, 1H), 7,59 (d, 2H), 7,57 (d, 1H), 7,52 (d, 1H), 7,42 (d, 1H), 7,32 (t, 1H), 7,17 (d, 1H), 5,73 (br s, 1H), 4,32 (t, 1H), 4,29–4,17 (m, 2H), 4,06–4,01 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,57–3,44 (m, 3H), 3,41–3,35 (m, 1H), 3,20 (t, 2H), 2,47–2,38 (m, 1H), 2,34 (s, 3H), 2,02–1,91 (m, 1H).

Referencia 13

Clorhidrato de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{3-[(3*R*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]-2-metilbenceno-1-sulfonyl}-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo



A una solución de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{3-[(3*R*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]-2-metilbenceno-1-sulfonyl}-*S*-alanina (60 mg, 89% de pureza, 0,11 mmol, Intermediario 17) en THF (2,1 ml) se agregaron HBTU (73 mg, 0,19 mmol, CAS-RN 94790-37-1), DIPEA (0,09 ml, 0,53 mmol) y 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etanol (17 mg, 0,13 mmol, CAS-RN 18994-70-2), y la mezcla se agitó durante la noche a ta. Luego, la mezcla se concentró mediante un evaporador rotatorio a una temperatura del baño de agua de 30°C y el residuo se recogió en acetonitrilo/TFA/agua y se purificó mediante HPLC preparativa (Método 2). Después de la liofilización, se obtuvo un lote que contenía TFA. Para la generación del clorhidrato correspondiente, el lote que contenía TFA se disolvió en acetonitrilo/agua y la solución se pasó diez veces a través de un intercambiador de iones de cloruro (600 mg de resina amberlite IRA405 Cl, acondicionada con agua desionizada) mediante fuerza de gravedad. A continuación, la resina se

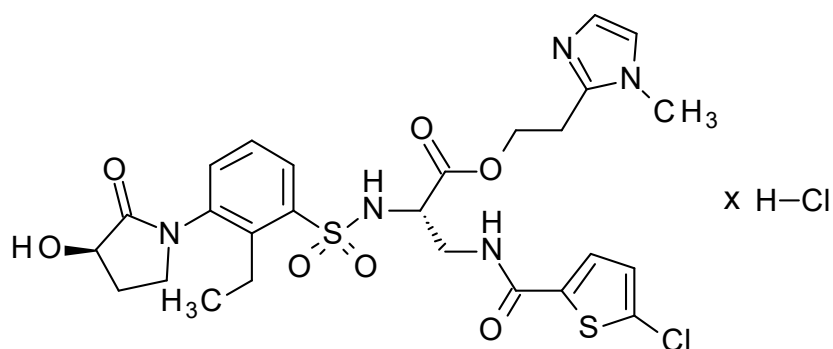
enjuagó con agua desionizada y la solución se liofilizó para proporcionar el compuesto del título (45 mg, 62% de la teoría, 95% de pureza).

LC-MS (Método 7): $T_r = 0,96$ min; MS (ESIpos): $m/z = 610$ $[M-HCl+H]^+$

1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 14,35 (br s, 1H), 8,87 (t, 1H), 8,66 (d, 1H), 7,77 (d, 1H),
 5 7,62 (d, 1H), 7,58 (d, 1H), 7,53 (d, 1H), 7,44 (d, 1H), 7,33 (t, 1H), 7,17 (d, 1H), 5,71 (br s, 1H),
 4,32 (t, 1H), 4,26–4,17 (m, 2H), 4,09–4,03 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,58–3,46 (m, 3H), 3,43–3,38 (m,
 1H), 3,21 (t, 2H), 2,48–2,40 (m, 1H), 2,33 (s, 3H), 2,02–1,93 (m, 1H).

Referencia 14

Clorhidrato de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*R*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonyl}-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo



A una solución de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*R*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonyl}-*S*-alanina (120 mg, 0,23 mmol, Intermediario 20) en THF (4,5 ml) se agregaron HBTU (159 mg, 0,42 mmol, CAS-RN 94790-37-1), DIPEA (0,12 ml,
 15 0,70 mmol) y 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etanol (37 mg, 0,29 mmol, CAS-RN 18994-70-2), y la mezcla se agitó durante la noche a ta. Luego, la mezcla se concentró mediante un evaporador rotatorio a una temperatura del baño de agua de 30°C y el residuo se recogió en acetonitrilo/TFA/agua y se purificó mediante HPLC preparativa (Método 2). Después de la liofilización, se obtuvo un producto que contenía TFA. Para generar el clorhidrato, el producto que
 20 contenía TFA se disolvió en acetonitrilo/agua y la solución se eluyó diez veces a través de un intercambiador de iones de cloruro (1,5 g de resina amberlita IRA405 Cl, acondicionada con agua desionizada). A continuación, la resina se enjuagó con agua desionizada y la solución se liofilizó para proporcionar el compuesto del título (95 mg, 61% de la teoría, 99% de pureza).

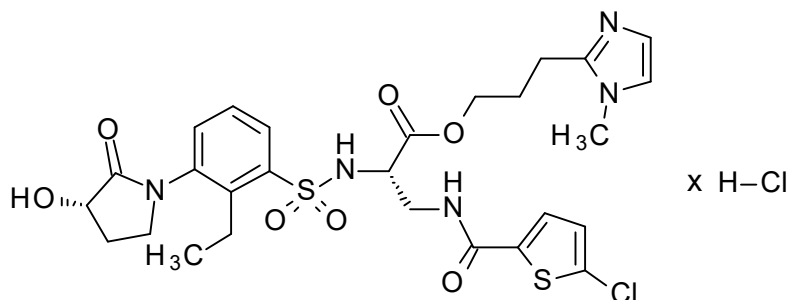
LC-MS (Método 7): $T_r = 1,02$ min; MS (ESIpos): $m/z = 624$ $[M+H]^+$

1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 14,20 (s, 1H), 8,81 (br s, 1H), 8,66 (d, 1H), 7,81 (d, 1H),
 25 7,60 (d, 1H), 7,58 (d, 1H), 7,54 (d, 1H), 7,43 (d, 1H), 7,34 (t, 1H), 7,18 (d, 1H), 4,30 (t, 1H), 4,27–
 4,21 (m, 2H), 4,06 (dd, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,63–3,56 (m, 1H), 3,55–3,47 (m, 2H), 3,46–3,39 (m,

1H), 3,22 (t, 2H), 2,92–2,84 (m, 1H), 2,83–2,75 (m, 1H), 2,48–2,40 (m, 1H), 2,00–1,91 (m, 1H), 1,06 (m, 3H)

Referencia 15

Clorhidrato de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonyl}-*S*-alaninato de 3-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)propilo



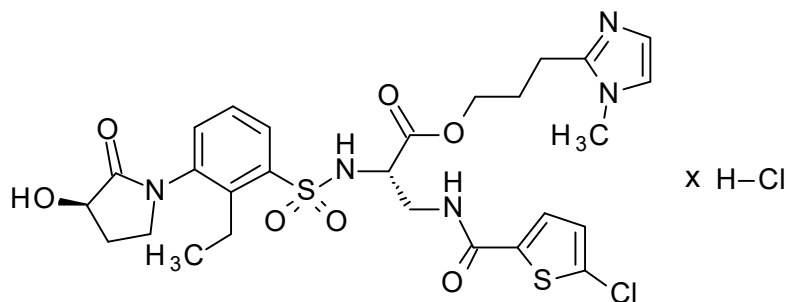
A una solución de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonyl}-*S*-alanina (60 mg, 0,12 mmol, Intermediario 19) en THF (2,3 ml) se agregaron HBTU (79 mg, 0,21 mmol, CAS-RN 94790-37-1), DIPEA (0,08 ml, 0,47 mmol) y 3-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)propan-1-ol (24,5 mg, 0,17 mmol, CAS-RN 136609-58-0), y la mezcla se agitó durante 2 h a ta. A continuación, la mezcla se recogió en acetonitrilo/TFA/agua y se purificó mediante HPLC preparativa (Método 2). Después de la liofilización, se obtuvo un lote que contenía TFA. Para generar el clorhidrato correspondiente, el lote que contenía TFA se disolvió en acetonitrilo/agua y la solución se pasó diez veces a través de un intercambiador de iones de cloruro (880 mg de resina amberlite IRA405 Cl, acondicionada con agua desionizada) por fuerza de gravedad. A continuación, la resina se enjuagó con agua desionizada y la solución se liofilizó para proporcionar el compuesto del título (19 mg, 22% de la teoría, 90% de pureza).

LC-MS (Método 9): $T_r = 0,83$ min; MS (ESIpos): $m/z = 638$ $[M-HCl+H]^+$

1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 14,06 (br s, 1H), 8,80 (t, 1H), 8,72 (d, 1H), 7,85 (dd, 1H), 7,60–7,57 (m, 2H), 7,54 (d, 1H), 7,43 (dd, 1H), 7,37 (t, 1H), 7,16 (d, 1H), 5,75 (br s, 1H), 4,31 (t, 1H), 4,12–4,02 (m, 1H), 3,97 (t, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,65–3,53 (m, 2H), 3,51–3,42 (m, 2H), 2,96–2,84 (m, 4H), 2,47–2,40 (m, 1H), 1,99–1,80 (m, 3H), 1,07 (t, 3H).

Referencia 16

Clorhidrato de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*R*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonyl}-*S*-alaninato de 3-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)propilo



A una solución de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*R*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonil}-*S*-alanina (60 mg, 0,12 mmol, Intermediario 20) en THF (2,3 ml) se agregaron HBTU (79 mg, 0,21 mmol, CAS-RN 94790-37-1), DIPEA (0,08 ml, 0,47 mmol) y 3-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)propan-1-ol (24,5 mg, 0,17 mmol, CAS-RN 136609-58-0), y la mezcla se agitó durante 2 h a ta. A continuación, la mezcla se recogió en acetnitrilo/TFA/agua y se purificó mediante HPLC preparativa (Método 2). Después de la liofilización, se obtuvo un lote que contenía TFA. Para la generación del clorhidrato correspondiente, el lote que contenía TFA se disolvió en acetnitrilo/agua y la solución se pasó diez veces a través de un intercambiador de iones de cloruro (500 mg de resina amberlite IRA405 Cl, acondicionada con agua desionizada) por fuerza de gravedad. A continuación, la resina se enjuagó con agua desionizada y la solución se liofilizó para proporcionar el compuesto del título (43 mg, 49% de la teoría, 90% de pureza).

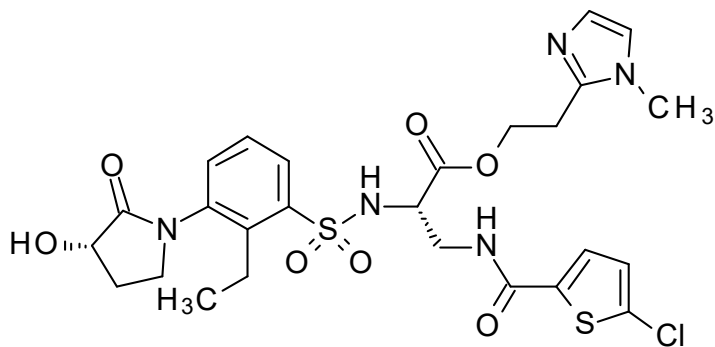
LC-MS (Método 9): $T_r = 0,83$ min; MS (ESIpos): $m/z = 638$ $[M-HCl+H]^+$

1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 14,10 (br s, 1H), 8,84 (br s, 1H), 8,72 (d, 1H), 7,86 (dd, 1H), 7,62–7,57 (m, 2H), 7,55 (d, 1H), 7,44 (d, 1H), 7,37 (t, 1H), 7,16 (d, 1H), 5,75 (br s, 1H), 4,31 (t, 1H), 4,11–4,02 (m, 1H), 4,00–3,91 (m, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,63–3,40 (m, 4H), 2,96–2,77 (m, 4H), 2,47–2,40 (m, 1H), 1,99–1,82 (m, 3H), 1,07 (t, 3H).

Ejemplos de trabajo

20 Ejemplo 1

3-[(5-Clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonil}-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo



A una solución de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonyl}-*S*-alanina (2,0 g, 3,88 mmol, Intermediario 19) en DCM (20 ml) y DMF (4 ml) se agregó 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etanol (978 mg, 7,75 mmol, CAS-
 5 RN 18994-70-2), y la solución se enfrió hasta 0°C. Luego, se agregó en porciones Oxyma (661 mg, 4,65 mmol, CAS-RN 3849-21-6), seguido de EDCI (892 mg, 4,65 mmol, CAS-RN 25952-53-8), y la mezcla se agitó durante 1,5 h a 0°C. La mezcla se lavó con agua helada (20 ml) y después de la separación de fases, la fase orgánica se lavó tres veces con agua helada. Mientras se lavaba por tercera vez, se agregaron DCM (10 ml) y solución acuosa de cloruro de sodio al 10%
 10 (10 ml) para mejorar la separación de fases. A continuación, la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. Después de secar al vacío, el residuo se purificó mediante cromatografía flash utilizando una fase básica de gel de sílice (Isolera, KP-NH 28 g, gradiente de DCM/acetona 9:1 → 1:9). Las fracciones de producto combinadas se concentraron y el residuo se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título (1,51 g, 62% de la teoría, 100% de pureza).

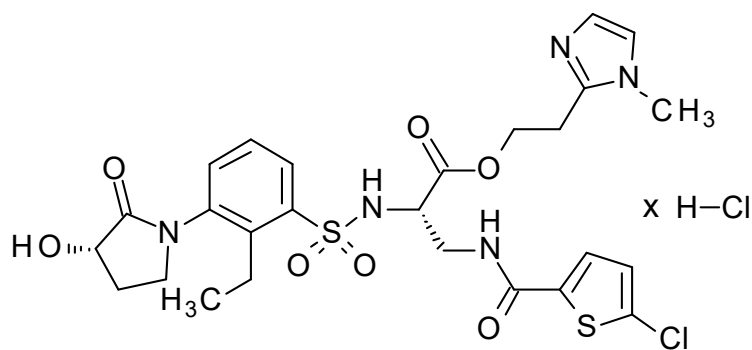
15 LC-MS (Método 7): $T_r = 1,02$ min; MS (ESIpos): $m/z = 624$ $[M+H]^+$

1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 9,09 (t, 1H), 8,65 (d, 1H), 7,82 (dd, 1H), 7,57 (d, 1H), 7,44 (dd, 1H), 7,38 (t, 1H), 7,17 (d, 1H), 7,03 (d, 1H), 6,74 (d, 1H), 5,75 (d, 1H), 4,34-4,01 (m, 4H), 3,66-3,56 (m, 1H), 3,51 (s, 3H), 3,50-3,39 (m, 3H), 2,94-2,70 (m, 4H), 2,48-2,38 (m, 1H), 2,01-1,87 (m, 1H), 1,06 (t, 3H).

20 IR: Véase la Figura 1

Ejemplo 2

Clorhidrato de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonyl}-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo



Síntesis Alternativa A

A una solución de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonilo}-*S*-alanina (190 mg, 0,37 mmol, Intermediario 19) en THF (7,2 ml) se agregaron HBTU (251 mg, 0,66 mmol, CAS-RN 94790-37-1), DIPEA (0,19 ml, 1,11 mmol) y 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etanol (93 mg, 0,74 mmol, CAS-RN 18994-70-2) y la mezcla se agitó durante 2 h a ta. Luego, la mezcla se concentró mediante un evaporador rotatorio a una temperatura del baño de agua de 30°C y el residuo se recogió en acetonitrilo/TFA/agua y se purificó mediante HPLC preparativa (Método 2). Después de la liofilización, se obtuvo un lote que contenía TFA. Para generar el clorhidrato correspondiente, el lote que contenía TFA se disolvió en acetonitrilo/agua y la solución se pasó diez veces a través de un intercambiador de iones de cloruro (2,66 g de resina amberlita IRA405 Cl, acondicionada con agua desionizada) por fuerza de gravedad. A continuación, la resina se enjuagó con agua desionizada y la solución se liofilizó para proporcionar el compuesto del título (122 mg, 49% de la teoría, 98% de pureza).

LC-MS (Método 7): $T_r = 1,01$ min; MS (ESIpos): $m/z = 624$ $[M+H]^+$

1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 14,30 (br s, 1H), 8,88 (t, 1H), 8,69 (d, 1H), 7,81 (d, 1H), 7,63 (d, 1H), 7,57 (d, 1H), 7,53 (d, 1H), 7,43 (d, 1H), 7,33 (t, 1H), 7,18 (d, 1H), 5,74 (br s, 1H), 4,30 (t, 1H), 4,29–4,19 (m, 2H), 4,05 (dd, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,63–3,56 (m, 1H), 3,54–3,39 (m, 3H), 3,22 (t, 2H), 2,90–2,76 (m, 2H), 2,48–2,40 (m, 1H), 2,00–1,87 (m, 1H), 1,05 (t, 3H).

IC: 4,6% en peso de cloruro, <1% en peso de TFA

Síntesis Alternativa B

A una solución de 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonilo}-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo (2,31 g, 3,70 mmol, Ejemplo 1) en DCM (3,5 ml) se agregó gota a gota, mientras se agitaba vigorosamente y se enfriaba con un baño de hielo, una solución de cloruro de hidrógeno 1 M en éter dietílico (4,07 ml, 4,07 mmol), seguido de más éter dietílico (70 ml) para mejorar la capacidad de agitación. Después de agitar durante 10 min con enfriamiento y 15 min a temperatura ambiente, el precipitado se filtró y se lavó con éter dietílico (100 ml). Luego, el precipitado se disolvió

nuevamente en agua helada (20 ml) con la ayuda de un breve tratamiento con ultrasonido y la solución se liofilizó. Para eliminar las trazas de éter dietílico, se repitió la liofilización para proporcionar el compuesto del título (2,06 g, 84% de la teoría, 99% de pureza).

LC-MS (Método 7): $T_r = 0,99$ min; MS (ESIpos): $m/z = 624$ $[M+H]^+$

5 HPLC Quiral (Método 11): $T_r = 9,10$ min

1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 14,42 (br s, 1H), 8,98 (t, 1H), 8,75 (d, 1H), 7,80 (dd, 1H), 7,68 (d, 1H), 7,58 (d, 1H), 7,54 (d, 1H), 7,43 (d, 1H), 7,33 (t, 1H), 7,19 (d, 1H), 5,80 (br s, 1H), 4,31 (t, 1H), 4,29–4,19 (m, 2H), 4,08–4,01 (m, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,63–3,56 (m, 1H), 3,54–3,39 (m, 3H), 3,23 (t, 2H), 2,90–2,73 (m, 2H), 2,48–2,40 (m, 1H), 2,00–1,87 (m, 1H), 1,05 (t, 3H).

10 IC: 4,7% en peso de cloruro

Síntesis Alternativa C

A acetato de etilo (2,0 ml) a 60°C se agregó 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonil}-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo (30 mg, 48,1 mmol, Ejemplo 1) mientras se agitaba. La solución se enfrió hasta
15 ta, se agregó ácido clorhídrico 1 M (50,2 mg, 49,22 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 días a ta en un vial de vidrio tapado. Luego, se reemplazó la tapa con una cinta Parafilm, se perforaron de 2–5 orificios en la cinta con una aguja y la mezcla se agitó suavemente durante otros 10 días a temperatura ambiente, permitiendo que el solvente se evaporara lentamente. El compuesto del título se obtuvo como un sólido.

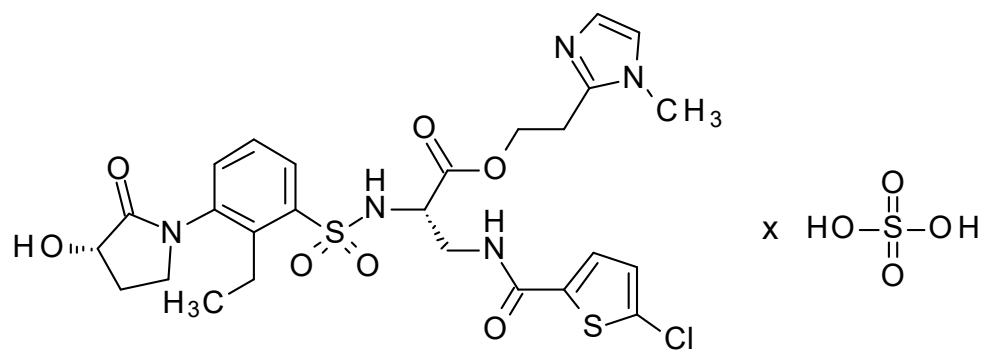
20 LC-MS (Método 7): $T_r = 1,03$ min; MS (ESIpos): $m/z = 624$ $[M+H]^+$

1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 14,40 (br s, 1H), 8,97 (t, 1H), 8,74 (d, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,67 (d, 1H), 7,58 (d, 1H), 7,54 (d, 1H), 7,43 (d, 1H), 7,33 (t, 1H), 7,19 (d, 1H), 5,75 (br s, 1H), 4,31 (t, 1H), 4,28–4,19 (m, 2H), 4,08–4,00 (m, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,63–3,56 (m, 1H), 3,54–3,39 (m, 3H), 3,23 (t, 2H), 2,90–2,74 (m, 2H), 2,48–2,41 (m, 1H), 1,98–1,92 (m, 1H), 1,05 (t, 3H).

25 XRPD: amorfo; IR: Véase la Figura 2

Ejemplo 3

Sulfato de 3-[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-*N*-(2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]fenil)sulfonil}-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo



A acetato de etilo (2,0 ml) a 60°C se agregó 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonil}-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo (30 mg, 48,1 mmol, Ejemplo 1) mientras se agitaba. La solución se enfrió hasta
 5 ta, se agregó ácido sulfúrico 0,5 M (100,6 mg, 47,90 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 días a ta en un vial de vidrio tapado. Luego, se reemplazó la tapa con una cinta Parafilm, se perforaron de 2-5 orificios en la cinta con una aguja y la mezcla se agitó suavemente durante otros 10 días a temperatura ambiente, permitiendo que el solvente se evaporara lentamente. El compuesto del título se obtuvo como un sólido.

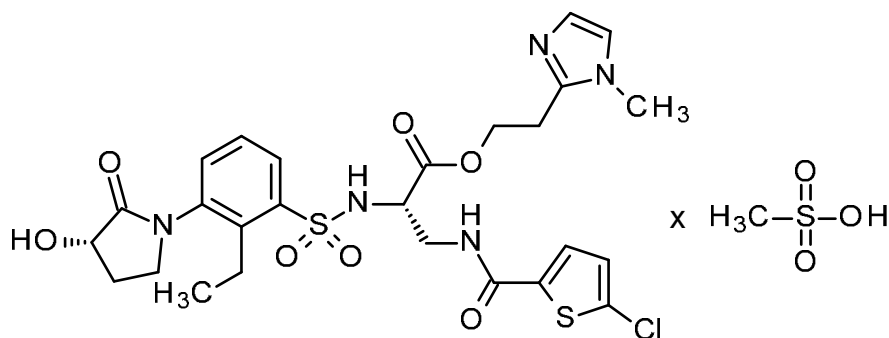
10 LC-MS (Método 7): $T_r = 1,03$ min; MS (ESIpos): $m/z = 624$ $[M+H]^+$

1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 13,94 (br s, 1H), 8,70 (t, 1H), 8,64 (d, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,62-7,56 (m, 1H), 7,55 (d, 1H), 7,52 (d, 1H), 7,43 (d, 1H), 7,34 (t, 1H), 7,21-7,17 (m, 1H), 4,36-4,27 (m, 1H), 4,27-4,17 (m, 2H), 4,11-3,97 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,64-3,55 (m, 1H), 3,55-3,34 (m, 3H), 3,21 (t, 2H), 2,91-2,75 (m, 2H), 2,49-2,41 (m, 1H), 2,01-1,92 (m, 1H), 1,06 (t, 3H).

15 XRPD: amorfo; IR: Véase la Figura 3

Ejemplo 4

Metansulfonato de 3-[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-*N*-(2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]fenil)sulfonil)-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo



20 A acetato de etilo (2,0 ml) a 60°C se agregó 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonil}-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo

imidazol-2-il)etilo (30 mg, 48,1 mmol, Ejemplo 1) mientras se agitaba. La solución se enfrió hasta
ta, se agregó ácido metansulfónico (4,9 mg, 51,0 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 días a ta en
un vial de vidrio tapado. Luego, se reemplazó la tapa con una cinta Parafilm, se perforaron de 2–5
orificios en la cinta con una aguja y la mezcla se agitó suavemente durante otros 10 días a
5 temperatura ambiente, permitiendo que el solvente se evaporara lentamente. El compuesto del
título se obtuvo como un sólido.

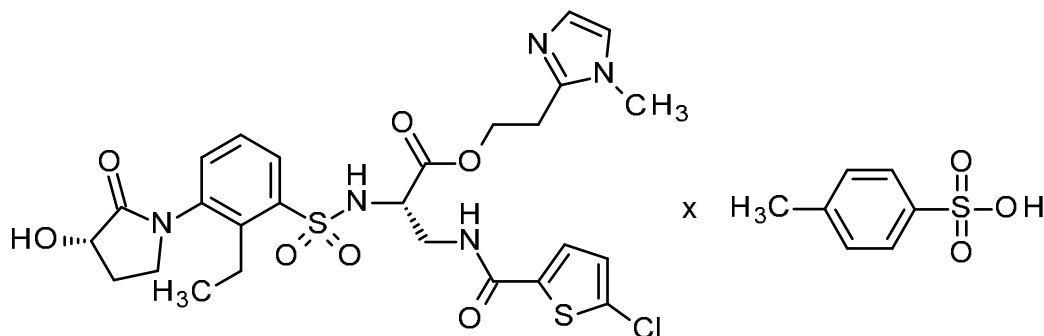
LC–MS (Método 7): $T_r = 1,02$ min; MS (ESIpos): $m/z = 624$ $[M+H]^+$

1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 13,97 (br s, 1H), 8,72 (t, 1H), 8,65 (d, 1H), 7,80 (d, 1H),
7,59 (s, 1H), 7,55 (d, 1H), 7,53 (d, 1H), 7,43 (d, 1H), 7,34 (t, 1H), 7,19 (d, 1H), 5,75 (br s, 1H),
10 4,31 (t, 1H), 4,27–4,18 (m, 2H), 4,09–3,98 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,63–3,57 (m, 1H), 3,55–3,36 (m,
3H), 3,21 (br t, 2H), 2,91–2,74 (m, 2H), 2,48–2,41 (m, 1H), 2,34 (s, 3H), 1,98–1,88 (m, 1H), 1,06
(t, 3H).

XRPD: amorfo; IR: Véase la Figura 4

Ejemplo 5

15 4-Metilbencenosulfonato de 3-[[5-cloro-2-tienil]carbonil]amino}-N-(2-etil-3-[(3S)-3-
hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]fenil)sulfonil)-S-alaninato de 2-(1-metil-1H-imidazol-2-il)etilo



A acetato de etilo (2,0 ml) a 60°C se agregó 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-N-{2-etil-3-
[(3S)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonil}-S-alaninato de 2-(1-metil-1H-
20 imidazol-2-il)etilo (30 mg, 48,1 mmol, Ejemplo 1) mientras se agitaba. La solución se enfrió hasta
ta, se agregó ácido 4-toluensulfónico (9,6 mg, 55,7 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 días a ta
en un vial de vidrio tapado. Luego, se reemplazó la tapa con una cinta Parafilm, se perforaron 2–5
orificios en la cinta con una aguja y la mezcla se agitó suavemente durante otros 10 días a
temperatura ambiente, permitiendo que el solvente se evaporara lentamente. El compuesto del
25 título se obtuvo como un sólido.

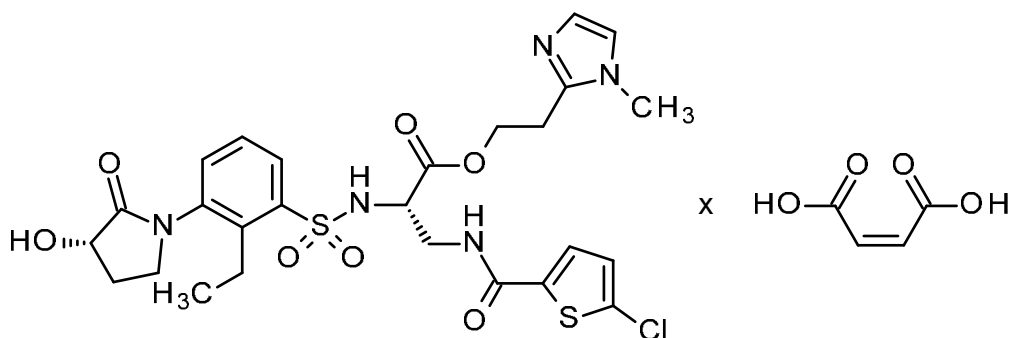
LC–MS (Método 7): $T_r = 1,02$ min; MS (ESIpos): $m/z = 624$ $[M+H]^+$ y $T_r = 0,57$ min, MS
(ESIneg): $m/z = 171$ $[M-H]^-$

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 13,92 (br s, 1H), 8,69 (br t, 1H), 8,64 (d, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,60–7,56 (m, 1H), 7,55 (d, 1H), 7,52 (d, 1H), 7,48 (d, 2H), 7,43 (d, 1H), 7,36–7,31 (m, 1H), 7,21–7,16 (m, 1H), 7,11 (d, 2H), 4,35–4,28 (m, 1H), 4,27–4,17 (m, 2H), 4,07–4,00 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,63–3,56 (m, 1H), 3,54–3,36 (m, 3H), 3,20 (br t, 2H), 2,91–2,75 (m, 2H), 2,48–2,41 (m, 1H), 2,29 (s, 3H), 2,02–1,92 (m, 1H), 1,09–1,03 (m, 3H).

XRPD: amorfo; IR: Véase la Figura 5

Ejemplo 6

Maleato de 3-[[[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-*N*-(2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]fenil)sulfonil]-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo



10

A acetato de etilo (2,0 ml) a 60°C se agregó 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-(2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonil)-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo (30 mg, 48,1 mmol, Ejemplo 1) mientras se agitaba. La solución se enfrió hasta ta, se agregó ácido maleico (5,8 mg, 50,0 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 días a ta en un vial de vidrio tapado. Luego, se reemplazó la tapa con una cinta Parafilm, se perforaron 2–5 orificios en la cinta con una aguja y la mezcla se agitó suavemente durante otros 10 días a temperatura ambiente, permitiendo que el solvente se evaporara lentamente. El compuesto del título se obtuvo como un sólido.

15

LC-MS (Método 7): *T*_r = 1,03 min; MS (ESIpos): *m/z* = 624 [M+H]⁺

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]: 8,75 (br t, 1H), 8,65 (br d, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,52 (d, 1H), 7,50 (d, 1H), 7,45–7,40 (m, 2H), 7,38–7,32 (m, 1H), 7,19 (d, 1H), 6,07 (s, 2H), 5,76 (br s, 1H), 4,31 (t, 1H), 4,23 (br t, 2H), 4,09–3,99 (m, 1H), 3,72 (s, 3H), 3,65–3,56 (m, 1H), 3,52–3,37 (m, 3H), 3,13 (br t, 2H), 2,91–2,75 (m, 2H), 2,48–2,41 (m, 1H), 1,97–1,90 (m, 1H), 1,06 (t, 3H).

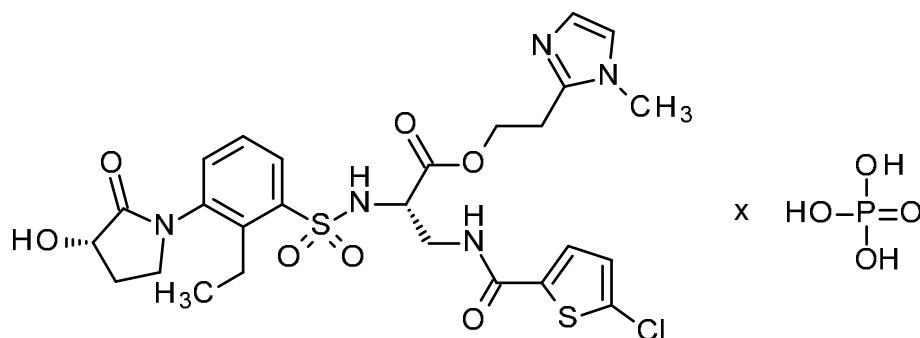
20

XRPD: amorfo; IR: Véase la Figura 6

Ejemplo 7

Fosfato de 3-[[[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-*N*-(2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]fenil)sulfonil)-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo

25



A acetato de etilo (2,0 ml) a 60°C se agregó 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonil}-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo (30 mg, 48,1 mmol, Ejemplo 1) mientras se agitaba. La solución se enfrió hasta
 5 ta, se agregó ácido fosfórico 1 M (48,7 mg, 46,38 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 días a ta en un vial de vidrio tapado. Luego, se reemplazó la tapa con una cinta Parafilm, se perforaron 2-5 orificios en la cinta con una aguja y la mezcla se agitó suavemente durante otros 10 días a temperatura ambiente, permitiendo que el solvente se evaporara lentamente. El compuesto del título se obtuvo como un sólido.

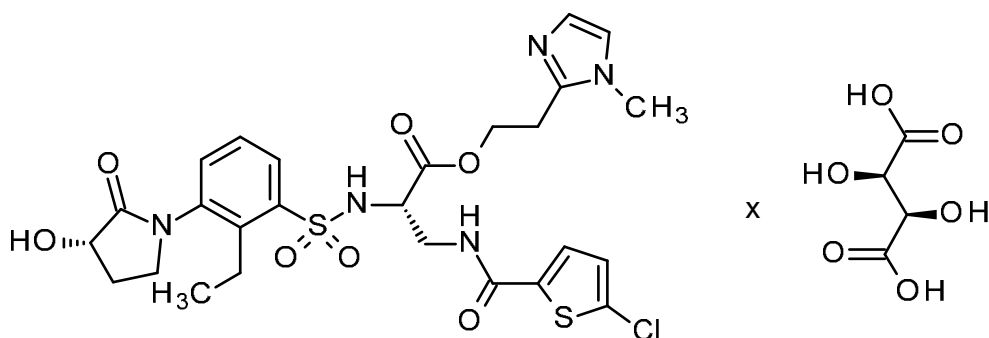
10 LC-MS (Método 7): $T_r = 1,03$ min; MS (ESIpos): $m/z = 624$ $[M+H]^+$

^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 9,10 (t, 1H), 8,79-8,58 (br m, 1H), 7,82 (d, 1H), 7,57 (d, 1H), 7,47-7,40 (m, 1H), 7,40-7,35 (m, 1H), 7,17 (d, 1H), 7,08 (s, 1H), 6,82 (s, 1H), 4,30 (t, 1H), 4,25-4,11 (m, 2H), 4,09-4,04 (m, 1H), 3,65-3,57 (m, 1H), 3,54 (s, 3H), 3,51-3,37 (m, 3H), 2,93-2,77 (m, 4H), 2,47-2,39 (m, 1H), 1,97-1,90 (m, 1H), 1,06 (t, 3H).

15 XRPD: amorfo; IR: Véase la Figura 7

Ejemplo 8

(2*R*,3*R*)-Tartrato de 3-{[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-*N*-(2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]fenil)sulfonil)-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo



20 A acetato de etilo (2,0 ml) a 60°C se agregó 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-{2-etil-3-[(3*S*)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonil}-*S*-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-

imidazol-2-il)etilo (30 mg, 48,1 mmol, Ejemplo 1) mientras se agitaba. La solución se enfrió hasta ta, se agregó ácido (2R,3R)-tartárico (7,4 mg, 49,3 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 días a ta en un vial de vidrio tapado. Luego, se reemplazó la tapa con una cinta Parafilm, se perforaron 2-5 orificios en la cinta con una aguja y la mezcla se agitó suavemente durante otros 10 días a

5 temperatura ambiente, permitiendo que el solvente se evaporara lentamente. El compuesto del título se obtuvo como un sólido.

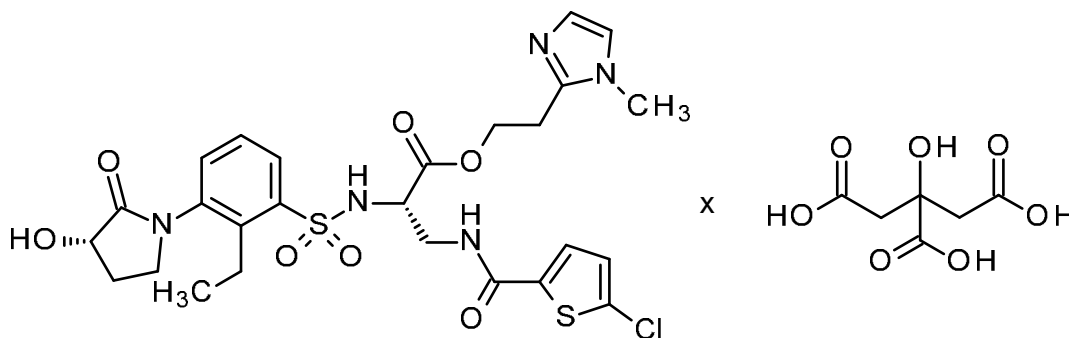
LC-MS (Método 7): $T_r = 1,03$ min; MS (ESIpos): $m/z = 624$ $[M+H]^+$

1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 9,09 (br t, 1H), 8,67 (br s, 1H), 7,82 (d, 1H), 7,57 (d, 1H), 7,44 (d, 1H), 7,38 (t, 1H), 7,17 (d, 1H), 7,06 (s, 1H), 6,78 (s, 1H), 4,30 (t, 1H), 4,25-4,22 (m, 2H), 4,22-4,10 (m, 2H), 4,06-4,00 (m, 1H), 3,53 (s, 3H), 3,50-3,38 (m, 3H), 2,92-2,74 (m, 4H), 2,47-2,40 (m, 1H), 1,98-1,90 (m, 1H), 1,06 (t, 3H).

XRPD: amorfo; IR: Véase la Figura 8

Ejemplo 9

Citrato de 3-{[(5-cloro-2-tienil)carbonil]amino}-*N*-(2-etil-3-[(3S)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]fenil)sulfonyl)-S-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo



A acetato de etilo (10,0 ml) a 60°C se agregó 3-[(5-clorotiofen-2-carbonil)amino]-*N*-(2-etil-3-[(3S)-3-hidroxi-2-oxopirrolidin-1-il]benceno-1-sulfonyl)-S-alaninato de 2-(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)etilo (100 mg, 160,2 mmol, Ejemplo 1) mientras se agitaba. La solución se enfrió hasta ta y se agregó una solución de ácido cítrico (31 mg, 161,4 mmol) en acetato de etilo (8 ml) a ta, dando como resultado la precipitación de un sólido blanco. La mezcla se agitó durante 5 días a temperatura ambiente en un vial de vidrio tapado, después de lo cual el precipitado se filtró y se secó al aire para proporcionar el compuesto del título como un sólido.

LC-MS (Método 7): $T_r = 1,02$ min; MS (ESIpos): $m/z = 624$ $[M+H]^+$

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]: 9,01 (t, 1H), 8,66 (d, 1H), 7,82 (dd, 1H), 7,56 (d, 1H), 7,44 (dd, 1H), 7,37 (t, 1H), 7,17 (d, 1H), 7,15 (d, 1H), 6,91 (s, 1H), 4,30 (t, 1H), 4,25-4,11 (m, 2H),

4,07–4,01 (m, 1H), 3,65–3,58 (m, 1H), 3,57 (s, 3H), 3,50–3,40 (m, 3H), 2,92–2,79 (m, 4H), 2,70 (d, 2H), 2,61 (d, 2H), 2,48–2,40 (m, 1H), 1,98–1,90 (m, 1H), 1,06 (t, 3H).

XRPD: amorfo; IR: Véase la Figura 9

Tabla 1: Espectroscopía infrarroja del Ejemplo 1 y las formas de sal (Ejemplo 2 a 9)

Banda máxima (cm ⁻¹)								
Ejemplo 1	Ejemplo 2 Sal de clorhidrato	Ejemplo 3 Sal de sulfato	Ejemplo 4 Sal de mesilato	Ejemplo 5 Sal de tosilato	Ejemplo 6 Sal de maleato	Ejemplo 7 Sal de fosfato	Ejemplo 8 Sal de tartrato	Ejemplo 9 Sal de citrato
552	552	575	552	566	572	575	574	576
577	577	608	576	610	610	609	610	609
609	609	694	609	680	650	671	660	651
618	618	730	694	711	694	695	670	668
655	655	745	728	730	727	730	697	695
668	668	770	746	746	745	745	744	728
694	694	784	772	769	784	769	768	746
728	728	809	809	784	806	784	784	770
745	745	856	879	815	864	807	807	784
770	770	915	915	877	912	874	876	808
784	784	1016	964	919	978	912	914	877
808	808	1042	1016	1009	993	950	926	913
878	878	1125	1039	1032	1012	1013	973	1014
922	922	1148	1124	1120	1043	1044	997	1043
973	973	1163	1163	1163	1106	1058	1013	1110
1013	1013	1190	1190	1190	1123	1080	1045	1124
1043	1043	1224	1306	1224	1147	1107	1056	1147
1122	1122	1281	1328	1282	1164	1123	1125	1164
1146	1146	1305	1373	1306	1194	1163	1164	1193
1164	1164	1328	1427	1328	1242	1198	1193	1243
1194	1194	1373	1463	1374	1280	1243	1241	1279
1242	1242	1426	1489	1426	1306	1279	1284	1306
1280	1280	1463	1524	1463	1328	1306	1304	1328
1304	1304	1489	1553	1494	1352	1327	1328	1373
1327	1327	1520	1609	1521	1373	1373	1373	1426
1373	1373	1553	1644	1552	1426	1426	1426	1463
1426	1426	1609	1695	1608	1461	1463	1461	1489
1462	1462	1635	1742	1645	1520	1489	1495	1520
1488	1488	1683		1699	1549	1520	1520	1552
1520	1520	1743		1745	1580	1549	1549	1587
1549	1549				1615	1635	1635	1611
1605	1605				1694	1683	1688	1637
1641	1641				1742	1738	1699	1699
1652	1652						1738	1730

Banda máxima (cm ⁻¹)								
Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo 6	Ejemplo 7	Ejemplo 8	Ejemplo 9
	Sal de clorhidrato	Sal de sulfato	Sal de mesilato	Sal de tosilato	Sal de maleato	Sal de fosfato	Sal de tartrato	Sal de citrato
1695	1695							
1699	1699							
1738	1738							

B) Evaluación de la eficacia fisiológica

La idoneidad de los compuestos de acuerdo con la invención para el tratamiento de trastornos tromboembólicos puede demostrarse en los siguientes sistemas de ensayo:

5 a) Descripciones de prueba (*in vitro*)

a.1) Medición de la inhibición del factor Xa en buffer

Para determinar la inhibición del factor Xa de las sustancias enumeradas anteriormente, se construye un sistema de ensayo biológico en el que se utiliza la conversión de un sustrato de factor Xa para determinar la actividad enzimática del factor Xa humano. Aquí, el factor Xa escinde la aminometilcumarina, que se mide con fluorescencia, del sustrato peptídico. Las determinaciones se realizan en placas de microtitulación.

Las sustancias a ensayar se disuelven en varias concentraciones en dimetilsulfóxido y se incuban durante 30 min con factor Xa humano (1,3 nmol/l disuelto en 50 mmol/l de buffer Tris [C,C,C-tris(hidroximetil)aminometano], 100 mmol/l de cloruro de sodio, 5 mmol/l de cloruro de calcio, 0,1% de BSA [albúmina de suero bovino], pH 7,4) a 22°C. A continuación se agrega el sustrato (5 µmol/l Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC de Bachem). Después de 30 min de incubación, la muestra se excita a una longitud de onda de 360 nm y se mide la emisión a 460 nm. Las emisiones medidas de los lotes de prueba con sustancia de prueba se comparan con los lotes de control sin sustancia de prueba (solo dimetilsulfóxido en lugar de sustancia de prueba en dimetilsulfóxido) y los valores IC₅₀ se calculan a partir de las relaciones de concentración/actividad. Los datos de actividad representativos de esta prueba se enumeran en la Tabla 2a y 2b a continuación.

a.2) Medición de la inhibición de trombina en buffer

Para determinar la inhibición de trombina de las sustancias enumeradas anteriormente, se construye un sistema de ensayo biológico en el que se utiliza la conversión de un sustrato de trombina para determinar la actividad enzimática de la trombina humana. Aquí, la trombina escinde la aminometilcumarina, que se mide con fluorescencia, del sustrato peptídico. Las determinaciones se realizan en placas de microtitulación.

Las sustancias a ensayar se disuelven en varias concentraciones en dimetilsulfóxido y se incuban durante 15 min con trombina humana (0,06 nmol/l disuelta en 50 mmol/l de buffer Tris [C,C,C-tris(hidroximetil)aminometano], 100 mmol/l de cloruro de sodio, 0,1% de BSA [albúmina de suero bovino], pH 7,4) a 22°C. A continuación se agrega el sustrato (5 µmol/l Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-AMC de Bachem). Después de 30 min de incubación, la muestra se excita a una longitud de onda de 360 nm y se mide la emisión a 460 nm. Las emisiones medidas de los lotes de prueba con sustancia de prueba se comparan con los lotes de control sin sustancia de prueba (solo dimetilsulfóxido en lugar de sustancia de prueba en dimetilsulfóxido) y los valores IC₅₀ se calculan a partir de las relaciones de concentración/actividad. Los datos de actividad representativos de esta prueba se enumeran en la Tabla 2a y 2b a continuación.

a.3) Determinación de la selectividad

Para demostrar la selectividad de las sustancias con respecto a la inhibición del factor Xa y la trombina, se examina la inhibición de las sustancias de prueba de otras serina proteasas humanas, como el factor factor XIa, la tripsina, la plasmina, el activador del plasminógeno tisular (TPA) y la calicreína plasmática. Las determinaciones se realizan en placas de microtitulación. Para determinar la actividad enzimática del factor XIa (0,15 nmol/l de Kordia), tripsina (42 mU/ml de Sigma), plasmina (0,1 µg/ml de Kordia), TPA (1 nmol/l de Kordia) y calicreína plasmática (0,2 nmol/l de Loxo), estas enzimas se disuelven (50 mmol/l de buffer Tris [C,C,C-tris(hidroximetil)aminometano], 100 mmol/l de cloruro de sodio, 0,1% de BSA [albúmina de suero bovino], 5 mmol/l de cloruro de calcio, pH 7,4) y se incuban durante 15 min con la sustancia de prueba en diversas concentraciones en dimetilsulfóxido y también con dimetilsulfóxido sin sustancia de prueba. A continuación, se inicia la reacción enzimática mediante la adición de los sustratos apropiados (5 µmol/l de Boc-Glu(OBzl)-Ala-Arg-AMC de Bachem para el factor XIa, 5 µmol/l de Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC de Bachem para Tripsina, 50 µmol/l de MeOSuc-Ala-Phe-Lys-AMC de Bachem para plasmina, 5 µmol/l de CH₃SO₂-D-Phe-Gly-Arg-AMC de Pentapharm para TPA y 5 µmol/l de H-Pro-Phe-Arg-AMC de Bachem para calicreína plasmática). Después de un tiempo de incubación de 30 min a 22°C, se mide la fluorescencia (excitación: 360 nm, emisión: 460 nm). Las emisiones medidas de los lotes de prueba con sustancia de prueba se comparan con los lotes de control sin sustancia de prueba (solo dimetilsulfóxido en lugar de sustancia de prueba en dimetilsulfóxido), y los valores IC₅₀ se calculan a partir de las relaciones de concentración/actividad. Los datos de actividad representativos de esta prueba se enumeran en la Tabla 2a y 2b a continuación.

Tabla 2a:

No. de Referencia	FXa IC ₅₀ [nM]	FIIa IC ₅₀ [nM]	FXIa IC ₅₀ [nM]	Tripsina IC ₅₀ [nM]	Plasmina IC ₅₀ [nM]	TPA IC ₅₀ [nM]	Calicreína IC ₅₀ [nM]
-------------------	---------------------------	----------------------------	----------------------------	--------------------------------	--------------------------------	---------------------------	----------------------------------

No. de Referencia	FXa IC ₅₀ [nM]	FIIa IC ₅₀ [nM]	FXIa IC ₅₀ [nM]	Tripsina IC ₅₀ [nM]	Plasmina IC ₅₀ [nM]	TPA IC ₅₀ [nM]	Calicreína IC ₅₀ [nM]
Referencia 1	0,43	0,19	> 49000	2700	22000	2300	2600
Referencia 2	1,1	15	> 50000	32000	> 50000	16000	11000
Referencia 3	2,3	300	> 50000	14000	> 50000	23000	7600
Referencia 4	0,49	26	> 50000	41000	> 50000	1200	5700
Referencia 5	0,54	9,7	> 50000	30000	> 50000	960	1200
Referencia 6	0,68	70	> 50000	20000	> 50000	3100	2300
Referencia 7	0,76	52	47000	15000	> 50000	790	1400
Referencia 8	0,45	1,7	17000	3200	9100	2300	650
Referencia 9	0,89	0,83	7200	1500	15000	7900	260
Referencia 10	0,63	0,74	9300	2600	13000	2500	230
Referencia 11	0,48	1,8	8300	3000	4900	1300	33
Referencia 12	0,61	16	> 50000	2000	19000	1100	1600
Referencia 13	1,1	35	33000	3500	21000	4000	2300
Referencia 14	0,68	4,9	7500	1400	13000	1800	520
Referencia 15	0,93	18	18000	2900	8300	> 4000	99
Referencia 16	0,79	10	8100	1300	4200	780	62

Los valores se redondean a dos dígitos significativos.

Tabla 2b:

No. de Ejemplo	FXa IC ₅₀ [nM]	FIIa IC ₅₀ [nM]	FXIa IC ₅₀ [nM]	Tripsina IC ₅₀ [nM]	Plasmina IC ₅₀ [nM]	TPA IC ₅₀ [nM]	Calicreína IC ₅₀ [nM]
Ejemplo 1	0,71	5,3	36000	3200	16000	7400	420
Ejemplo 2	0,66	4,9	31000	2700	15000	6500	380
Ejemplo 3	0,78	5,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ejemplo 4	0,52	4,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ejemplo 5	0,78	5,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ejemplo 6	0,51	4,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

No. de Ejemplo	FXa IC ₅₀ [nM]	FIIa IC ₅₀ [nM]	FXIa IC ₅₀ [nM]	Tripsina IC ₅₀ [nM]	Plasmina IC ₅₀ [nM]	TPA IC ₅₀ [nM]	Calicreína IC ₅₀ [nM]
Ejemplo 7	0,56	5,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ejemplo 8	0,85	6,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ejemplo 9	0,49	4,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: No determinado

Los valores se redondean a dos dígitos significativos.

a.4) Determinación de la actividad inhibidora del factor Xa de los inhibidores potenciales en muestras de plasma

- Para determinar la inhibición del factor Xa en muestras de plasma, el factor X presente en el plasma se activa por una proteasa de la toxina de serpiente de cascabel. A continuación, se mide la actividad del factor Xa o su inhibición por inhibidores potenciales mediante la adición de un sustrato cromogénico.
- 10 Se disuelven diversas concentraciones de las sustancias a ensayar en sulfóxido de dimetilo y se mezclan con una solución acuosa de refluidán (10 µg/ml). En placas transparentes de 96 pocillos con fondo plano, se mezclan 30 µl de plasma de citrato (Octapharma) con 10 µl de la sustancia diluida. Luego, 20 µl de una solución de una toxina de serpiente de cascabel (veneno de víbora de Russell (RVV); reactivo de RVV: Pentapharm 121-06, concentración final 0,6 mU) en una
 - 15 solución buffer acuosa de cloruro de calcio (concentración final de cloruro de calcio 0,05 M) o se agregan 20 µl de la solución acuosa de cloruro de calcio (concentración final de cloruro de calcio 0,05 M) sin reactivo RVV (como referencia para una muestra no estimulada). Después de agregar 20 µl de sustrato ChromozymX (concentración final 1,6 mmol/l, Bachem L-1565, diluido en agua), las muestras se miden en un Lector SpectraFluor utilizando un filtro de medición de 405 nm cada
 - 20 minuto durante un período de 20 minutos. El valor IC₅₀ se determina cuando se alcanza aproximadamente el 70% de la señal máxima (alrededor de 12 min). Los datos de actividad representativos de estas pruebas se enumeran en las Tablas 3a y 3b a continuación.

a.5) Determinación de la actividad inhibidora de trombina de los inhibidores potenciales en muestras de plasma

- 25 Se disuelven diversas concentraciones de las sustancias a ensayar en sulfóxido de dimetilo y se diluyen con agua. En placas blancas de 96 pocillos de fondo plano, se mezclan 20 µl de dilución de sustancia con 20 µl de solución de ecarin (reactivo de ecarin, de Sigma E-0504, concentración final 20 mU por lote) en buffer de Ca (200 mM de Hepes + 560 mM de cloruro de sodio + 10 mM de cloruro de calcio + PEG al 0,4%) o con 20 µl de buffer de Ca (como control no estimulado).
- 30 Además, se agregan 20 µl de sustrato de trombina fluorogénico (de Bachem I-1120, concentración

final 50 $\mu\text{mol/l}$) y 20 μl de plasma de citrato (de Octapharma) y se homogeneizan completamente. La placa se mide en un Lector SpectraFluorplus utilizando un filtro de excitación de 360 nm y un filtro de emisión de 465 nm cada minuto durante un período de 20 minutos. El valor IC_{50} se determina cuando se alcanza aproximadamente el 70% de la señal máxima (alrededor de 12 min).

- 5 Los datos de actividad representativos de estas pruebas se enumeran en las Tablas 3a y 3b a continuación.

Tabla 3a:

No. de Referencia	FXa IC_{50} [nM] en plasma	FIIa IC_{50} [nM] en plasma	Relación FIIa IC_{50} / FIIa IC_{50}
Referencia 1	3,3	16	4,8
Referencia 2	6,1	86	14
Referencia 3	19	140	7,4
Referencia 4	12	430	36
Referencia 5	16	190	12
Referencia 6	17	610	36
Referencia 7	13	510	39
Referencia 8	26	16	0,62
Referencia 9	3,4	2,9	0,85
Referencia 10	4,1	8,5	2,1
Referencia 11	10	21	2,1
Referencia 12	1,1	79	72
Referencia 13	9,0	160	18
Referencia 14	6,6	22	3,3
Referencia 15	42	63	1,5
Referencia 16	7,2	60	8,3

Los valores se redondean a dos dígitos significativos.

- 10 Tabla 3b:

No. de Ejemplo	FXa IC_{50} [nM] en plasma	FIIa IC_{50} [nM] en plasma	Relación FIIa IC_{50} / FIIa IC_{50}
Ejemplo 1	4,1	26	6,3
Ejemplo 2	9,2	22	2,4
Ejemplo 3	5,8	56	9,7
Ejemplo 4	4,1	27	6,6
Ejemplo 5	6,4	100	16

No. de Ejemplo	FXa IC ₅₀ [nM] en plasma	FIIa IC ₅₀ [nM] en plasma	Relación FIIa IC ₅₀ / FIIa IC ₅₀
Ejemplo 6	5,1	22	4,3
Ejemplo 7	0,96	28	29
Ejemplo 8	2,1	31	15
Ejemplo 9	7,1	44	6,2

Los valores se redondean a dos dígitos significativos.

a.6) Ensayo de generación de trombina (trombograma)

El efecto de las sustancias de prueba sobre el trombograma (ensayo de generación de trombina de acuerdo con Hemker) se determina *in vitro* en plasma humano (Octaplas® de Octapharma). En el ensayo de generación de trombina de acuerdo con Hemker, la actividad de la trombina en el plasma coagulado se determina midiendo los productos de escisión fluorescentes del sustrato I-1140 (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, Bachem). Los reactivos de Thrombinoscope (reactivo PPP: factor tisular recombinante 30 pM, fosfolípidos 24 µM en HEPES) se utilizan para iniciar la reacción de coagulación. La reacción se lleva a cabo en presencia de concentraciones variables de sustancia de ensayo o del solvente correspondiente. Además, se utiliza un calibrador de trombina de Thrombinoscope cuya actividad amidolítica se requiere para calcular la actividad de trombina en una muestra de plasma.

La prueba se lleva a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Thrombinoscope BV): 4 µl de la sustancia de prueba o del solvente, 76 µl de plasma y 20 µl de reactivo PPP o calibrador de trombina se incuban a 37°C durante 5 min. Después de la adición de 20 µl de sustrato de trombina 2,5 mM en Hepes 20 mM, 60 mg/ml de BSA, cloruro de calcio 102 mM, se mide la generación de trombina cada 20 s durante un período de 120 min. La medición se lleva a cabo utilizando un fluorómetro (Fluoroskan Ascent) de Thermo Electron equipado con un par de filtros de 390/460 nm y un dispensador. Utilizando el software Thrombinoscope, el trombograma se calcula y se presenta gráficamente. Lo que se calcula son los siguientes parámetros: tiempo de retraso, tiempo hasta el pico, pico, ETP (potencial de trombina endógena) y cola de inicio.

a.7) Determinación de la actividad anticoagulante

La actividad anticoagulante de las sustancias de prueba se determina *in vitro* en plasma humano, plasma de conejo y plasma de rata. Para ello, se extrae sangre en una proporción de mezcla de citrato de sodio/sangre de 1/9 utilizando como receptor una solución de citrato de sodio 0,11 molar. Inmediatamente después de extraer la sangre, se mezcla bien y se centrifuga a unos 4000 g durante 15 minutos. Se pipetea el sobrenadante.

El tiempo de protrombina (PT, sinónimos: tiempo de tromboplastina, prueba rápida) se determina

en presencia de concentraciones variables de la sustancia de prueba o del solvente correspondiente utilizando un kit de prueba comercial (Neoplastin® de Boehringer Mannheim o Hemoliance® RecombiPlastin de Instrumentation Laboratory). Los compuestos de prueba se incuban con el plasma a 37°C durante 3 minutos. A continuación, se inicia la coagulación mediante la adición de tromboplastina y se determina el momento en que se produce la coagulación. Se determina la concentración de sustancia de prueba que efectuó una duplicación del tiempo de protrombina.

El tiempo de trombina (TT) se determina en presencia de concentraciones variables de la sustancia de prueba o del solvente correspondiente utilizando un kit de prueba comercial (reactivo de trombina de Roche). Los compuestos de prueba se incuban con el plasma a 37°C durante 3 minutos. A continuación, se inicia la coagulación mediante la adición del reactivo de trombina y se determina el momento en que se produce la coagulación. Se determina la concentración de la sustancia de prueba que provoca una duplicación del tiempo de trombina.

El tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) se determina en presencia de concentraciones variables de la sustancia de prueba o el solvente correspondiente utilizando un kit de prueba comercial (reactivo PTT de Roche). Los compuestos de prueba se incuban con el plasma y el reactivo PTT (cefalina, caolín) a 37°C durante 3 minutos. A continuación, se inicia la coagulación mediante la adición de cloruro cálcico 25 mM y se determina el momento en que se produce la coagulación. Se determina la concentración de sustancia de prueba que provoca una duplicación del APTT.

20 **a.8) Tromboelastografía (tromboelastograma)**

La tromboelastografía se realiza con la ayuda del tromboelastógrafo ROTEM de Pentapharm y sus accesorios copa y pin. La medición se lleva a cabo en sangre completa extraída previamente en monovettes de citrato de sodio de Sarstedt. La sangre en las monovettes se mantiene en movimiento utilizando un agitador y se preincuba a 37°C durante 30 min. Se prepara una solución madre 2 molar de cloruro de calcio en agua. Éste se diluye 1:10 con una solución acuosa de cloruro de sodio al 0,9% de fuerza. Para la medición, se cargan inicialmente en las copas 20 µl de esta solución de cloruro de calcio 200 mM (concentración final de cloruro de calcio 12,5 mM). Se agregan 3,2 µl de sustancia o solvente. La medición se inicia con la adición de 300 µl de sangre completa. Después de la adición, utilizando la punta de la pipeta, la mezcla se introduce brevemente en la pipeta y se vuelve a liberar sin generar burbujas de aire. La medición se lleva a cabo durante un período de 2,5 horas o se detiene cuando se establece la fibrinólisis. Para la evaluación, se determinan los siguientes parámetros: CT (tiempo de coagulación / [seg.]), CFT (tiempo de formación de la coagulación / [seg.]), MCF (firmeza máxima del coágulo / [mm]) y el ángulo alfa [°]. Los puntos de medición se determinan cada 3 segundos y se representan gráficamente, con el eje y para MCF [mm] y el eje x para el tiempo [seg.].

a.9) Inhibición de la coagulación en curso

Los compuestos de prueba se disuelven como solución madre 10 mM en DMSO y se prepara una dilución en serie entre 0,018 y 600 μ M con DMSO.

En una placa blanca de 384 pocillos (Lumitrac 200, Greiner) 20 μ l de Octaplas (Octapharm), 10 μ l de agua destilada, 10 μ l de Pefabloc FG (DSM, 24 mM) y 10 μ l de sustrato de trombina fluorogénica (BACHEM, I-1560, 300 μ M) se agregan. Para iniciar la coagulación se agregan 10 μ l de mezcla del Factor Tisular (Instrumentation Laboratory, Recombiplastina 2G, 0,06%) y CaCl_2 (40 mM). La señal de fluorescencia generada por la escisión del sustrato se mide con el Tecan infinite M1000 Pro cada 30 s durante 20 min a 37 °C y una excitación de 340 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Después de duplicar la señal de fluorescencia, se agrega 1 μ l de la solución del compuesto en DMSO a cada pocillo y se continúa con la medición. La pendiente de la señal de fluorescencia después de la adición del compuesto determina si un compuesto de prueba puede inhibir la coagulación en curso.

a.10) Inhibición de la agregación plaquetaria iniciada por el factor tisular

La sangre completa se recoge por venopunción de seres humanos sanos de sexo masculino y femenino. Las muestras se colocan en tubos vacutainer que contienen 1/10 de volumen de citrato trisódico al 3,12 % y se obtiene plasma rico en plaquetas (PRP) mediante centrifugación inmediata de la sangre a 140 g durante 20 minutos a 20°C.

Para ajustar el recuento de plaquetas, el PRP se diluye con plasma pobre en plaquetas a 300000–350000 plaquetas/ μ l. El plasma pobre en plaquetas se obtiene por centrifugación de PRP a 1000 g durante 20 minutos a 20°C. Pefabloc FG (Pentapharm, Basilea, Suiza) se disuelve en agua desmineralizada (2 mg/ml; concentración final) y se agrega para evitar la polimerización de la fibrina. Después de la adición de CaCl_2 (7 mmol/l, concentración final), se colocan inmediatamente alícuotas (178 μ l) en el agregómetro (Apact 4, DiaSys Greiner, Flachet, Alemania). Las muestras se enriquecen con 2 μ l de concentraciones crecientes del compuesto de ensayo (concentraciones en plasma de 0,3–10 μ mol/l) o vehículo y se incuban durante 3 minutos a 37°C. La agregación plaquetaria se induce mediante la adición de 20 μ l de factor tisular (RecombiPlasTin 2G; Instrumentation Laboratory), disueltos en una solución acuosa de 10 mmol/l de CaCl_2 (de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Las concentraciones de factor tisular individual (dilución 1:10–1:2500 con 10 mmol/l de solución de CaCl_2) se utilizan para lograr la concentración mínima de factor tisular para cada experimento, lo que da como resultado una agregación máxima. La agregación se mide turbidimétricamente y se registra durante 10 minutos y la respuesta de agregación se evalúa como el área bajo la curva de concentración–tiempo. Los valores de IC_{50} se calculan utilizando la prueba de Boltzmann (GraphPad Prism).

a.11) Inhibición de la coagulación inducida por LPS o Staphylococcus aureus inactivado por calor en sangre completa

Se disuelven 10^{10} células de Staphylococcus aureus eliminadas por calor (InvivoGen) en 1 ml de agua y se preparan soluciones que contienen de 10^9 a 10^6 células por dilución en solución acuosa de NaCl al 0,9%. Se disuelve lipopolisacárido (LPS, Sigma) en solución acuosa de NaCl al 0,9 % para producir una solución de 0,005 mg/ml.

Se recoge sangre completa fresca mediante venopunción de seres humanos sanos, de sexo masculino y femenino, en tubos vacutainer que contienen 1/10 de volumen de citrato trisódico al 3,12 %. Se agregan 10 µl de una solución del compuesto de prueba (0–20 µM, concentración final) en DMSO y 10 µl de las soluciones activantes que contienen Staphylococcus aureus eliminados por calor o LPS a 980 µl de sangre completa citratada, se mezcla suavemente y se incuba durante 4 horas a 37°C.

Se agregan 150 µl de la mezcla y 20 µl de una solución 0,1 M de cloruro de calcio en cubetas para iniciar la medición del tiempo de coagulación (Apact 4, DiaSys Greiner, Flacht, Alemania). Los tiempos de coagulación de las muestras de control y las muestras de compuesto en varias concentraciones se comparan para calcular la concentración necesaria para duplicar el tiempo de coagulación utilizando GraphPad Prism.

a.12) Impacto en la integridad de una capa endotelial en presencia de trombina

50 µl de medio basal de células endoteliales 2 (EBM–2) suplementado con factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (hEGF), factor de crecimiento de fibroblastos humano básico con heparina (hFGF–B), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), ácido ascórbico, hidrocortisona, factor de crecimiento similar a la insulina humana recombinante (R3–IGF–1 largo), heparina, GA–1000 y suero fetal bovino (FBS) al 2% se introducen en cada pocillo de una placa E 96 (OLS Omni Life, Alemania), que luego se coloca en un instrumento ACEA – Xcelligence RTCA (Agilent, EE. UU.) para medir la impedancia de fondo de los medios.

Las células endoteliales de vena umbilical humana agrupadas criopreservadas (HUVEC; Lonza, Alemania; C2519a) se propagan y mantienen en medio basal de células endoteliales 2 (EBM–2) suplementado con factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (hEGF), factor de crecimiento de fibroblastos humano básico con heparina (hFGF–B), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), ácido ascórbico, hidrocortisona, factor de crecimiento similar a la insulina humana recombinante (R3–IGF–1 largo), heparina, GA–1000 y suero bovino fetal al 2% (FBS). Las células se cultivan a 37°C en aire humidificado que contiene 5% de CO₂.

Se agregan a cada pocillo 50 µl de medio que contiene 20000 células en el paso 3. La placa se mantiene a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 h en la incubadora del instrumento Xcelligence RTCA. A continuación, se agregan a cada pocillo 10 µl de una solución del compuesto de ensayo en

DMSO o DMSO solo y se mide la impedancia cada 5 min durante 30 min. Posteriormente se agregan 40 µl de una solución de trombina (concentración final 0,1 U/ml) y se vuelve a medir la impedancia cada 5 min durante 190 min.

La fuerza de la adhesión celular está representada por el software RTCA como el índice celular y se compara entre las diferentes concentraciones de compuestos con los experimentos en blanco utilizando Graphpad Prism.

b) Determinación de la actividad antitrombótica (*in vivo*)

b.1) Modelo de shunt arteriovenoso y sangrado (modelo combinado de conejo)

Se anestesian conejos macho (Conejo Blanco de Nueva Zelanda; Crl:KBL(NZW) con un peso de 2700–3500 g con Xylazin al 2% (Rompun, Bayer Vital) y 100 mg/ml de Ketamina (Ketaset, Zoetis). Se inicia la formación de trombos en un shunt arteriovenoso de acuerdo con el método descrito por Christopher N. Berry *et al.*, Br. J. Pharmacol. (1994), 113, 1209 – 1214. A tal efecto, se disecciona la Vena facialis izquierda y la Arteria carotis derecha. Para conectar ambos vasos se utiliza un shunt extracorpóreo de tubo de polietileno de 10 cm. Este tubo se coloca en otro tubo de polietileno (PE 240) de 4 cm de longitud, que contiene un hilo de nylon de 6 cm (0,14 mm de diámetro), que se ha puesto rugoso con lija y se ha doblado para formar un bucle de 3 cm. Este hilo proporciona una superficie trombogénica necesaria para inducir la coagulación. La circulación extracorpórea se mantiene durante 15 minutos antes de retirar el shunt y se pesa el hilo de nailon junto con el trombo. El peso de tara del hilo de nailon se determina antes del experimento. Para determinar el tiempo de sangrado se realiza un corte de 0,5 cm junto a la vena periférica de la oreja con un bisturí estéril. Cada 30 s, se limpia la sangre con un papel de filtro hasta que cesa el sangrado. Los compuestos de prueba se administran como infusión intravenosa continua 30 minutos antes de abrir el shunt arteriovenoso a través de la vena femoral.

b.2) Determinación de la eficacia en modelos de endotoxemia (*in vivo*)

b.2.1) Modelo de conejo con endotoxemia inducida por LPS

El experimento se realiza en conejos machos anestesiados (conejos blancos de Nueva Zelanda). La anestesia se induce mediante una inyección intramuscular de 5 mg/kg de xilazina al 2% (Rompun, Bayer Vital) y 40 mg/kg de ketamina a 100 mg/ml (Ketavet, Pfizer), seguida de una infusión continua de xilazina al 2% (Rompun, Bayer Vital) y Ketamina 100 mg/ml (Ketavet, Pfizer).

Para inducir la endotoxemia, se infunden continuamente 100 µg/kg/h de lipopolisacárido de *E. coli* (LPS 055:B5; Sigma–Aldrich; LOT 025M4040V) a través de la vena femoral izquierda durante 8 h. Los compuestos de prueba se infunden continuamente a través de la vena femoralis derecha. Para la medición continua de parámetros hemodinámicos, tales como la frecuencia cardíaca y la presión arterial, se implanta un catéter de presión con micropunta (SPR–595; Millar

Instruments) en la Arteria femoralis izquierda. Se recogen muestras de sangre arterial una vez por hora a través de la Arteria femoralis derecha durante 8 h. Los parámetros de lectura obtenidos de las muestras de sangre completa incluyen recuentos de células sanguíneas (trombocitos, leucocitos, eritrocitos), parámetros de coagulación (PT, aPTT) y tromboelastografía rotacional (ROTEM). El plasma se produce a partir de una parte de la sangre completa para determinar marcadores de inflamación (IL-6, TNF-alfa), niveles de fibrinógeno y biomarcadores de daño en órganos diana, como la creatinina sérica o enzimas hepáticas tales como ALT y AST.

b.2.2) Modelo de babuino de sepsis inducida por infusión de *Staph. Aureus* inactivado por calor

Los animales se mantienen en ayunas durante 12 h antes del procedimiento y se les da agua *ad libitum*. Cada animal se identifica por su número de tatuaje único. Los animales se pesan antes del experimento para calcular la dosis apropiada de anestésico y exposición a bacteriemia.

Los animales se sedaron primero con clorhidrato de ketamina (14–20 mg/kg/IM) y luego se anestesiaron con pentobarbital sódico (25 mg/kg/IV) cada 30 min o según se considere necesario para mantener la anestesia, controlando los reflejos de pellizco del párpado y de los dedos de los pies. Los animales anestesiados son monitoreados continuamente y los niveles apropiados de anestesia y soporte vital están disponibles durante la duración del procedimiento. Durante la anestesia, los animales se giran de lado a lado a la mitad de las 8–10 horas de anestesia para evitar la congestión hipostática pulmonar. Se coloca un catéter intravenoso para proporcionar acceso para fluidos y medicamentos. Se infunde solución salina a una velocidad de ~5ml/kg/hr durante las 8–10 h de anestesia para minimizar los efectos de la anestesia sobre la hidratación y para reemplazar la pérdida de volumen de sangre debido a las muestras de sangre. La intubación oral se realiza bajo anestesia utilizando un videolaringoscopio King Vision para prevenir la neumonía por aspiración y permitir la respiración asistida si es necesario. Guiado por ultrasonido, se implanta un *venocath* de calibre 18–20 (catéter de línea corta) en la vena braquial para la infusión bacteriana y un *intracath* de calibre 18–20 (catéter de línea larga) se implanta en la vena safena para la infusión de los compuestos de prueba.

Para evitar la hipotermia, los animales se colocan sobre una almohadilla calentada con agua recirculante (37°C) y todas las extremidades se cubren con mangas/medias para mantener al animal caliente.

S. aureus inactivados por calor, (cepa B17266 Rosenbach; ATCC 49496) se infunden a 3×10^{10} bacterias/kg en 1,5 ml/kg de solución salina estéril por vía intravenosa como una infusión continua lenta durante 2 horas. Se realizan extracciones de sangre. Mientras se encuentra bajo anestesia, se recogen muestras de sangre a las T0, 2, 4, 6 y 8 horas después de la exposición bacteriana. Para todos los experimentos, también se extrae sangre después de 24 y 48 horas antes de la eutanasia. Se

toman muestras de sangre de 5–10 ml de un catéter de vena safena permanente o mediante venopunción. Las muestras de sangre se analizan para detectar la presencia de marcadores inflamatorios y de coagulación sanguínea.

c) Determinación de las propiedades farmacocinéticas de los compuestos de prueba

5 c.1) Estudios farmacocinéticos/farmacodinámicos en minicerdos

Se anestesian minicerdos Göttingen machos o hembras (Ellegard) mediante una inyección intramuscular de 20 mg/kg de ketamina (Ketaset, Zoetis), Azaperon 8 mg/kg (Stresnil, Elanco) y 0,03 mg/kg de Atropinsulfato (Atropin, B. Braun). La anestesia se mantiene mediante una inyección en bolo de 3 mg/kg de ketamina y 0,5 mg/kg de Midazolam (Dormicum, Cheplapharm) en la vena periférica de la oreja seguida de una infusión continua de 22 mg/kg/h de ketamina y 3,4 mg/kg/h de Midazolam. Se implanta un tubo traqueal (Super Safety Clear, D.I. 4 mm; Rüsch) para permitir la ventilación mecánica (Avance CS²; GE Healthcare). Antes de la intubación, se administra una inyección en bolo de 0,03 mg/kg de Pancuronio (Inresa) a través de la vena periférica de la oreja para inducir la relajación muscular. Para mantener la relajación muscular, se administra una perfusión intravenosa continua de 0,3 mg/kg/h de Pancuronio. La solución Ringer–Lactato se administra por vía intravenosa para mantener la hidratación de los animales.

Los compuestos de prueba se infunden continuamente a través de la vena femoral derecha durante un máximo de 180 min. Se recolecta sangre arterial para determinar la coagulación de la sangre completa (PT, aPTT) y para el análisis farmacocinético después de la precipitación con 3 partes de acetonitrilo. Después de detener la infusión del compuesto de prueba, se realizan extracciones de sangre adicionales para monitorear las vidas medias farmacológicas y farmacocinéticas de los compuestos de prueba.

c.2) Estudios farmacocinéticos/farmacodinámicos en conejos

Se anestesian conejos macho (blanco de Nueva Zelanda) con una inyección intramuscular de 5 mg/kg de Xilazina (Rompun, Bayer Vital) y 40 mg/kg de Ketamina (Ketavet, Zoetis). La anestesia se mantiene con una infusión intravenosa continua de Xilazina y Ketamina a través de la vena periférica derecha de la oreja. Los compuestos de prueba se infunden continuamente a través de la vena femoralis derecha durante un máximo de 120 min. La sangre arterial se recoge a través de la Arteria carotis para determinar los parámetros de coagulación (PT, aPTT) y para el análisis farmacocinético después de la precipitación con 3 partes de acetonitrilo. Después de detener la infusión del compuesto de prueba, se realizan extracciones de sangre adicionales para monitorear las vidas medias farmacológicas y farmacocinéticas de los compuestos de prueba.

d) Estabilidad

d.1) Estabilidad hidrolítica

Se disuelven 0,15 mg del compuesto de prueba en 0,1 ml de DMSO y 0,4 ml de acetonitrilo. Para la disolución completa, el vial de HPLC con la solución de muestra se agita y se somete a sonicación. Luego, se agrega 1,0 ml de la solución buffer respectiva (por ejemplo, buffer citrato pH 4, buffer citrato pH 5, solución salina amortiguada con fosfato pH 6,5, solución salina amortiguada con fosfato 7,4) y la muestra se agita en vórtex. La solución de muestra se analiza por HPLC para determinar la cantidad del compuesto de prueba y hasta dos subproductos en un momento determinado durante un período de 24 horas a 37 °C. Los valores t(0) resultan de una muestra tomada inmediatamente después de agitar en vórtex con un buffer a temperatura ambiente. Las áreas de los picos (en porcentaje) se utilizan para la cuantificación. HPLC, análisis LC/MS: El material de partida se analiza en cuanto a pureza por HPLC. La muestra de 24 h se analiza adicionalmente por LC/MS.

Condiciones de HPLC: Columna: Nucleodur 100 C18ec 3 µm 50 x 2 mm; temperatura: 37°C; Diferentes sistemas de gradientes con 1 ml de TFA/l de agua y 1 ml de TFA/l de acetonitrilo.

Los datos representativos de estabilidad hidrolítica de esta prueba en buffer de citrato pH 4 se enumeran en las Tablas 4a y 4b a continuación.:

Tabla 4a:

No. de Referencia	Recuperación [%] 1 h	Recuperación [%] 2 h	Recuperación [%] 4 h	Recuperación [%] 24 h
Referencia 1	100	100	100	100
Referencia 4	100	100	100	100
Referencia 14	100	100	99	97
Referencia 15	100	100	100	100

Tabla 4b:

No. de Ejemplo	Recuperación [%] 1 h	Recuperación [%] 2 h	Recuperación [%] 4 h	Recuperación [%] 24 h
Ejemplo 1	101	100	100	98
Ejemplo 2	100	100	99	97

Los datos de estabilidad hidrolítica representativos de esta prueba en buffer PBS pH 7,4 se enumeran en las Tablas 5a y 5b a continuación:

Tabla 5a:

No. de Referencia	Recuperación [%] 1 h	Recuperación [%] 2 h	Recuperación [%] 4 h	Recuperación [%] 24 h
Referencia 1	97	98	99	99
Referencia 4	99	98	96	82

Tabla 5b:

No. de Ejemplo	Recuperación [%] 1 h	Recuperación [%] 2 h	Recuperación [%] 4 h	Recuperación [%] 24 h
Ejemplo 1	93	83	69	9
Ejemplo 2	90	84	69	10

d.2) Estabilidad hidrolítica

- 5 Distintas soluciones acuosas (agua, HCl 0,1 M, buffer pH 10 y buffer pH 7) de la sustancia farmacológica (0,25 mg/ml de la sustancia farmacológica en solución acuosa al 50% y tetrahidrofurano al 50 %, acetonitrilo, metanol o buffer citrato pH 4 para mejorar la solubilidad) se almacenan durante 24 h a 70 °C y una semana a temperatura ambiente. Además, se preparan soluciones blanco para cada solución de estrés, para identificar sin ambigüedades los picos de degradación por comparación de los cromatogramas respectivos. Las soluciones antes y después del almacenamiento se inyectan directamente en la HPLC sin trabajo adicional. Para la evaluación de datos, los respectivos cromatogramas se integran y comparan entre sí. Dependiendo de la cantidad formada de impurezas orgánicas (<2%, 2–5% o >5%), la estabilidad se describe con los descriptores "estable", "ligeramente inestable" o "inestable".

d.3) Estabilidad plasmática

La preparación de la muestra de estabilidad del plasma se realiza manualmente o mediante un sistema de robot Hamilton

Descripción del ensayo con preparación manual de muestras:

- Se disuelve 1 mg del compuesto de prueba en 0,5 ml de acetonitrilo/DMSO (diferentes proporciones posibles). Para la disolución completa, el vial de HPLC se agita y se somete a sonicación. Se agregan 20 µl de esta solución que contiene el compuesto de prueba a 1 ml de plasma que se mantiene a una temperatura de 37°C y la mezcla se agita directamente en vórtex. Después de 0,17, 0,5, 1, 1,5, 2 y 4 horas, la reacción enzimática se detiene agregando 100 µl de la solución de plasma del compuesto a un vial que contiene 300 µl de buffer de acetonitrilo/citrato pH 3 (80:20) o acetonitrilo a ta o a 10°C. La mezcla se centrifuga a 5000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se analiza por HPLC para determinar la cantidad del compuesto de prueba y hasta dos

subproductos. Los valores $t(0)$ resultan de una muestra procesada tomada inmediatamente después de agitar con plasma a temperatura ambiente. Las áreas de los picos (en porcentaje) se utilizan para la cuantificación. HPLC, análisis LC/MS: El material de partida se analiza en cuanto a pureza mediante HPLC. La muestra de 4 h se analiza adicionalmente mediante LC/MS.

5 Descripción del ensayo con preparación de muestras automatizada (Hamilton Starlet y H-Motion-System):

1 mg del compuesto de prueba se disuelve manualmente en 0,5 ml de acetonitrilo/DMSO (diferentes proporciones posibles). Para la disolución completa, el vial de HPLC se agita manualmente y se somete a sonicación. Luego, los pasos de pipeteo automático se realizan a través de un robot de la siguiente manera: se agregan 20 μ l de esta solución que contiene el compuesto de prueba a 1 ml de plasma que se mantiene a una temperatura de 37°C y se mezcla con una pipeta. Después de 0,17, 0,5, 1, 1,5, 2 y 4 horas, la reacción enzimática se detiene agregando 100 μ l de la solución de plasma del compuesto a un vial que contiene 300 μ l de buffer de acetonitrilo/citrato pH 3 (80:20) o acetonitrilo a 10° C. La mezcla se centrifuga a 5000 rpm durante 10 minutos a 10°C. El sobrenadante se analiza por HPLC para determinar la cantidad del compuesto de prueba y hasta dos subproductos. Los valores $t(0)$ resultan de una muestra procesada tomada inmediatamente después de agitar con plasma a temperatura ambiente. Las áreas de los picos (en porcentaje) se utilizan para la cuantificación. HPLC, análisis LC/MS: El material de partida se analiza en cuanto a pureza mediante HPLC. La muestra de 4 h se analiza adicionalmente mediante LC/MS.

20 Condiciones de HPLC: Columna: Nucleodur 100 C18ec 3 μ m 50 x 2 mm; temperatura: 37°C; Diferentes sistemas de gradientes con 1 ml de TFA/l de agua y 1 ml de TFA/l de acetonitrilo.

Los datos representativos de estabilidad del plasma humano de esta prueba se enumeran en las Tablas 6a y 6b a continuación:

Tabla 6a:

No. de Referencia	Recuperación [%] 0,17 h	Recuperación [%] 0,50 h	Recuperación [%] 1,0 h	Recuperación [%] 1,5 h	Recuperación [%] 2,0 h	Recuperación [%] 4,0 h
Referencia 1	99	100	98	99	98	99
Referencia 4	100	98	96	93	90	79
Referencia 9	100	98	91	88	84	68
Referencia 10	98	91	82	72	62	39
Referencia 14	97	90	82	73	66	43
Referencia	100	99	95	94	90	78

No. de Referencia	Recuperación [%] 0,17 h	Recuperación [%] 0,50 h	Recuperación [%] 1,0 h	Recuperación [%] 1,5 h	Recuperación [%] 2,0 h	Recuperación [%] 4,0 h
15						

Tabla 6b:

No. de Ejemplo	Recuperación [%] 0,17 h	Recuperación [%] 0,50 h	Recuperación [%] 1,0 h	Recuperación [%] 1,5 h	Recuperación [%] 2,0 h	Recuperación [%] 4,0 h
Ejemplo 1	95	88	76	65	55	27
Ejemplo 2	97	90	79	68	59	32

d.4) Estabilidad del plasma y la sangre

La estabilidad del plasma y de la sangre se investiga en ratones, ratas, perros, conejos, minicerdos, monos y seres humanos utilizando 1 ml de plasma heparinizado con litio o sangre con una concentración de prueba nominal de 1000 µg/l a 37 °C durante 5 h. En los puntos de tiempo 0 h, 0,083 h, 0,25 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h y 5 h, se precipita una alícuota de 50 µl con 150 µl de acetonitrilo + ácido fórmico al 1%, que se suplementa con dos estándares internos. Después de agitar y centrifugar durante 10 min a 1300 g se diluye una alícuota de 50 µl de sobrenadante 1/10 con buffer de acetato de amonio 10 mM a pH 3 y se mide por LC-MS/MS. Se describe un perfil de concentración-tiempo en Excel y se realiza el cálculo de la vida media respectivo utilizando $t_{1/2} = \ln 2/k$.

d.5) Estabilidad per-oxidativa

El la sustancia de fármaco se almacena en condiciones per-oxidativas (0,25 mg/ml de la sustancia de fármaco en buffer citrato al 50 % pH 4 que contiene 3% de H₂O₂ y tetrahydrofurano al 50 %, acetonitrilo, metanol o buffer citrato pH 4 para mejorar la solubilidad) a temperatura ambiente durante 24 horas. Además se preparan las mismas soluciones sin H₂O₂ y se almacenan a temperatura ambiente durante 24 h. Además, se preparan soluciones blanco para cada solución de estrés, para identificar sin ambigüedades los picos de degradación por comparación de los cromatogramas respectivos. Después del almacenamiento, las soluciones de H₂O₂ se inactivan con platino para detener el H₂O₂ de reacciones adicionales. Las soluciones antes y después del almacenamiento (incluida la inactivación) se inyectan directamente en la HPLC sin procesamiento adicional. Para la evaluación de datos, los respectivos cromatogramas se integran y comparan entre sí. Dependiendo de la cantidad formada de impurezas orgánicas (<2%, 2-5% o >5%), la estabilidad se describe con los descriptores "estable", "ligeramente inestable" o "inestable".

d.6) Estabilidad del formaldehído

La sustancia de fármaco se almacena en condiciones per-oxidativas (0,25 mg/ml de la sustancia de

fármaco en buffer de citrato al 50%, pH 4, que contiene 3% de CH₂O y tetrahidrofurano al 50%, acetonitrilo, metanol o buffer de citrato, pH 4 para mejorar la solubilidad) a temperatura ambiente durante 24 horas. Además se preparan las mismas soluciones sin CH₂O y se almacenan a temperatura ambiente durante 24 h. Además, se preparan soluciones blanco para cada solución de

5 estrés, para identificar sin ambigüedades los picos de degradación mediante comparación de los cromatogramas respectivos. Las soluciones antes y después del almacenamiento se inyectan directamente en la HPLC sin trabajo adicional. Para la evaluación de datos, los respectivos cromatogramas se integran y comparan entre sí. Dependiendo de la cantidad formada de impurezas orgánicas (<2%, 2–5% o >5%), la estabilidad se describe con los descriptores "estable",

10 "ligeramente inestable" o "inestable".

d.7.) Estabilidad térmica

La sustancia de fármaco se almacena como un sólido a 90°C durante un día y una semana y a 60°C durante una semana. Después del almacenamiento, las muestras se disuelven en tetrahidrofurano con una concentración de 0,25 mg/ml. Estas soluciones se inyectan en la HPLC. Para la evaluación

15 de datos, los respectivos cromatogramas se integran y comparan entre sí. Dependiendo de la cantidad formada de impurezas orgánicas (<2%, 2–5% o >5%), la estabilidad se describe con los descriptores "estable", "ligeramente inestable" o "inestable".

e.1.) Solubilidad

Las suspensiones de la sustancia del fármaco hasta 12,5 mg/ml se agitan en agua, HCl 0,1 M,

20 tampón pH 2, buffer pH 3, buffer pH 4, buffer pH 4,5, buffer pH 5, buffer pH 6, buffer pH 7, buffer pH 8, Solución de acetonitrilo y NaCl al 0,9% a 25°C durante 24 h ± 4 h previa filtración y análisis mediante HPLC, excepto las muestras totalmente disueltas, que se indican con una solubilidad de “>12500 µg/ml”.

Para el análisis HPLC, las muestras se diluyen 1:10 y 1:100 en el solvente, para ajustarse a la

25 calibración. Además, se preparan tres soluciones estándar para la curva de calibración, que tienen una concentración de 500 µg/ml (5 mg/10 ml), 50 µg/ml (1 mg/20 ml) y 1 µg/ml (0,4 ml de la 50 µg/ml estándar/20 ml). Todas las soluciones estándar y de muestra se inyectan en la HPLC en un orden específico. La solubilidad se determina comparando el área total del pico de la sustancia en la muestra con una curva de calibración (estándar externo).

30 También se realiza una SST (prueba de idoneidad del sistema) con las soluciones estándar, que debe cumplir los siguientes requisitos:

Mín. 6 inyecciones del mismo estándar deben tener un coeficiente de variación ≤2,0%.

Mín. 4 inyecciones de los estándares de calibración deben tener una precisión de ≤5,0%.

La intersección de la curva de calibración no lineal debe ser ≤3,0%.

La curva de calibración para el cálculo debe pasar por cero.

Los cálculos de la solubilidad se realizan utilizando la muestra menos diluida que se encuentra dentro de los puntos de calibración.

Se utilizan los siguientes buffers:

Buffer	Conc.	Composition
pH 2,0	30 mM	Fluka 31045 (6,43 g de ácido cítrico + 3,58 g de NaCl + 0,30 g de HCl (Citrato) en 1 l de agua)
pH 3,0	40 mM	Fluka 31046 (8,47 g de ácido cítrico + 3,49 g de NaCl + 0,82 g de NaOH (Citrato) en 1 l de agua)
pH 4,0	50 mM	9,61 g de ácido cítrico + 6,00 g de NaCl + 62,5 ml 1N de NaOH (Citrato) en 1 l de agua
pH 4,5	50 mM	2,9 g de NaCH ₃ COO x 3 H ₂ O + 1,66 ml de ácido acético glacial (Acetato) en 1 l de agua
pH 5,0	50 mM	9,61 g de ácido cítrico + 6,00 g de NaCl + 105 ml 1N de NaOH (Citrato) en 1 l de agua
pH 6,0	50 mM	9,61 g de ácido cítrico + 6,00 g de NaCl + 140 ml 1N de NaOH (Citrato) en 1 l de agua
pH 7,0	67 mM	3,52 g de KH ₂ PO ₄ + 7,26 g de Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (Fosfato) en 1 l de agua
pH 8,0	67 mM	0,34 g de KH ₂ PO ₄ + 11,43 g de Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (Fosfato) en 1 l de agua
0,9% NaCl	0.9% (NaCl)	9,0 g de NaCl en 1 l de agua

5 Solubilidad/estabilidad en buffer de citrato pH 4

La solubilidad de la sustancia farmacológica se determina visualmente disolviendo 4 mg de sustancia en 50 µl de buffer de citrato pH 4. Luego, la sustancia farmacológica se agrega posteriormente hasta que se alcanza una concentración de 400 mg/ml o se crea una suspensión. La solución se observa durante siete días para detectar precipitación potencial. Después de los siete días, la solución se diluye a 10 mg/ml y se investiga la estabilidad.

La estabilidad de la sustancia farmacológica se analiza mediante HPLC y LC/MS. El ensayo y la degradación se investigan con un estándar externo. Para la prueba, la muestra se diluye a 0,1 mg/ml y se preparan dos soluciones estándar (120 µg/ml y 50 µg/ml). Todas las soluciones estándar y de muestra se inyectan en la HPLC en un orden específico. El ensayo se determina mediante comparación del área total del pico de la sustancia con una curva de calibración (estándar externo).

La cantidad de degradación se informa como % de área del cromatograma completo de la muestra. Además, la muestra se mide mediante LC/MS para determinar los productos de degradación.

e.2.) Solubilidad

Se colocan 25 mg de compuesto en 2 ml de disolvente. Dependiendo de la solubilidad del compuesto en el disolvente (superior o inferior a 12,5 mg/ml), se forma una solución o suspensión. Esta solución o suspensión se agita a 25°C durante 24 h $\pm$ 4 h. Posteriormente, la solución o suspensión se filtra y la solución restante se analiza mediante HPLC. La solubilidad se determina comparando el área total del pico de la sustancia con una curva de calibración (estándar externo). La cantidad de degradación se informa como % de área del cromatograma completo de la muestra y se utiliza como descriptor para la hidrólisis de éster. Los solventes probados en la evaluación de la solubilidad son buffers acuosos (rango de pH de 1 a 8), solución salina isotónica y acetonitrilo.

Ejemplo 2: Se colocaron 440 mg del compuesto del ejemplo 2 en 0,5 ml de buffer de citrato. La solución resultante tenía un volumen de aproximadamente 0,9 ml y se agitó a 25°C durante 24 h $\pm$ 4 h. Posteriormente, la solución se centrifugó y analizó mediante HPLC. La solubilidad se determinó mediante comparación del área total del pico de la sustancia con una curva de calibración (estándar externo). Las mediciones se realizaron por triplicado. La solubilidad del compuesto del ejemplo 2 en Buffer Citrato pH 4 es >500 mg/ml.

f) Inhibición de CYP

El potencial de los compuestos de prueba para inhibir CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 y CYP3A4 humanos se investigará con microsomas hepáticos humanos agrupados como fuente de enzimas y sustratos estándar respectivos. Los efectos inhibidores se determinan a 6 concentraciones (0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 μ M) del compuesto de prueba y se comparan con el grado de formación de metabolitos en ausencia de un inhibidor potencial. Finalmente, se calculan los valores de IC₅₀. Siempre se incluye un inhibidor estándar, que inhibe específicamente una sola isoforma de CYP, para garantizar que los resultados sean comparables entre series de experimentos. Procedimiento de ensayo: Incubación de fenacetina, amodiaquina, diclofenac, dextrometorfan y midazolam con microsomas hepáticos humanos en presencia de seis concentraciones del inhibidor potencial. Las mezclas de incubación estándar contenían NADP 1 mM, EDTA 1 mM, glucosa 6–fosfato 5 mM, glucosa 6–fosfato deshidrogenasa 1,5 U/ml y buffer de fosfato 50 mM (pH 7,4) en un volumen total de 200 μ l. Los compuestos de prueba se disuelven en acetonitrilo. Las placas de 96 pocillos se incuban durante un período de tiempo adecuado a 37°C y las reacciones se detienen mediante la adición de 100 μ l de acetonitrilo que contiene el patrón interno respectivo. Las proteínas precipitadas se eliminan por centrifugación de la placa de pocillos (3000 rpm, 10 min). Los sobrenadantes se combinan y los análisis se realizan mediante LC–MS/MS o RapidFire–MS/MS.

Los datos de inhibición de CYP representativos de esta prueba se enumeran en las Tablas 7a y 7b a

continuación:

Tabla 7a:

No. de Referencia	CYP3A4 IC50 [μM]	CYP1A2 IC50 [μM]	CYP2C8 IC50 [μM]	CYP2C9 IC50 [μM]	CYP2D6 IC50 [μM]
Referencia 9	0,37	>20	0,34	2,32	1,66
Referencia 10	4,07	>20	>20	>20	>20
Referencia 11	6,90	>20	>20	>20	>20
Referencia 14	>20	>20	>20	>20	>20
Referencia 15	>20	>20	>20	>20	>20

Tabla 7b:

5

No. de Ejemplo	CYP3A4 IC50 [μM]	CYP1A2 IC50 [μM]	CYP2C8 IC50 [μM]	CYP2C9 IC50 [μM]	CYP2D6 IC50 [μM]
Ejemplo 1	14,93	>20	>20	>20	>20
Ejemplo 2	18,49	>20	>20	>20	>20

g) Inducción CYP

Se siembran hepatocitos humanos a una densidad de ~ 10 000 células/384 pocillos en 3D y se cultivan durante un día antes del tratamiento con el compuesto. Las células se tratan con una dilución en serie 1:3 de 8 concentraciones durante dos días consecutivos con cambio de medio todos los días. Después de 48 h de tratamiento con el compuesto, las células se lisan y el ARNm se prepara mediante la técnica de perlas magnéticas de tecnología avanzada. Después del aislamiento del ARNm, el ADNc se transcribe directamente de las perlas recubiertas de ARNm y se procesa adicionalmente para qPCR. Los niveles de expresión relativa de CYP se determinan mediante sondas TaqMan mediante la multiplexación de CYP3A4, CYP1A2, actina y tubulina. La inducción de CYP se calcula en base al método $\Delta\Delta Ct$ y se expresa como veces de inducción sobre el control tratado con vehículo.

h) Estabilidad metabólica en hepatocitos.

Las estabildades metabólicas en los hepatocitos se determinan incubando los compuestos a 1 μM y con un bajo número de células de 1×10^6 células/ml para garantizar una cinética lineal. Para minimizar la influencia de los solventes orgánicos en la mezcla de incubación, su contenido se limita a un máx. 1% para acetonitrilo o máx. 0,2% para DMSO. Se extraen siete puntos de tiempo de la mezcla de incubación para análisis para definir la vida media del compuesto a partir del valor

de pendiente $t_{1/2} = -0,693/k$. La conversión del $t_{1/2}$ *in vitro* (en min.) en aclaramiento intrínseco ($CL'_{\text{intr,hep}}$, en L/h/kg) se calcula con la siguiente ecuación:

$$CL'_{\text{intr,hep}} = kV/N \times \text{factor de escala}$$

5 $CL'_{\text{intr,hep}}$: Aclaramiento intrínseco del hígado para eliminar el fármaco en ausencia de limitaciones de flujo y unión a células o proteínas en la sangre

V = volumen de incubación (0,25 ml)

N = número de hepatocitos por pocillo ($0,25 \times 10^6$ células)

El aclaramiento intrínseco se convierte en el aclaramiento hepático previsto. ($CL'_{\text{sangre,hep,ws}}$, en L/h/kg) con la siguiente ecuación de acuerdo con el modelo bien agitado:

10 $CL'_{\text{sangre,hep,ws}} = Q_H * CL'_{\text{intr,hep}} / (Q_H + CL'_{\text{intr,hep}})$

Q_H = flujo sanguíneo hepático

15 $CL'_{\text{sangre,hep,ws}}$: Cálculo del aclaramiento hepático basado en el modelo bien agitado. El modelo "bien agitado" asume que el hígado es un compartimento único bien agitado y que la concentración de fármaco libre en la sangre emergente se encuentra en equilibrio con el fármaco libre dentro del hígado.

El valor $F_{\text{máx}}$ ((máxima biodisponibilidad posible) se calcula utilizando la ecuación:

$$F_{\text{máx}} \text{ bien agitado } [\%] = (1 - (CL_{\text{sangre}} \text{ bien agitado} / Q_H)) * 100$$

Los factores de escala para la predicción del aclaramiento intrínseco *in vivo* utilizando diferentes especies de hepatocitos se enumeran a continuación:

Especies	Peso del Hígado (g de hígado/kg de peso corporal)	Concentración de Hepatocitos (10^6 células/g de hígado)	Flujo sanguíneo hepático (Q_H , L/(h·kg))	Factor de Escala
Ser humano	21	110	1,32	2310,0
Minicerdo	24,4	124	2,6	3025,6
Perro	39	110	2,1	4290,0
Rata	32	110	4,2	3520,0
Conejo	26	110	2,9	2860,0

20

i) Unión proteica

Para la determinación de la unión proteica con ultrafiltración, se utiliza el sistema de micropartición Centrifree® que contiene membranas de filtro con un tamaño de poro de 30 kDa para separar el plasma y el ultrafiltrado libre de proteínas. La fuerza motriz para la filtración se aplica mediante centrifugación. Antes de los estudios de unión proteica, se comprueba la adsorción

25

(recuperación) del compuesto de prueba en el dispositivo de ultrafiltración y la capacidad del compuesto de prueba para atravesar la membrana del filtro mediante la filtración del compuesto de prueba disuelto en plasma y buffer a una concentración. La cantidad de solvente orgánico agregado al plasma no podrá superar el 1% del volumen total de incubación. Después de incubar el compuesto en plasma con EDTA potásico a 2000 µg/l durante 15 min, 37°C y CO₂ al 7%, el sistema de micropartición Centrifree® se centrifuga durante 12 min a 1800 g. Los filtrados obtenidos se precipitan con acetonitrilo y se diluyen para la medición por LC-MS/MS. La fracción no unida se calcula de la siguiente manera:

$$f_u = \frac{C_u}{C} \cdot 100 [\%]$$

- 10 donde C = concentración total en plasma (o buffer)
 C_u = concentración libre (concentración en el ultrafiltrado)

j) Evaluación de la farmacocinética (*in vivo*)

Para evaluar la farmacocinética de las sustancias de prueba *in vivo*, las sustancias se disuelven en vehículos de formulación apropiados (plasma, mezclas de etanol, dimetilsulfóxido, PEG400; formulación de base fisiológica). A continuación, las sustancias de prueba se infunden continuamente durante 10 min a ratas y perros a dosis bajas de 0,1 – 2 mg/kg/h. Se extraen 50 µl de sangre en puntos de tiempo apropiados hasta 24 h a través de un catéter (rata) o vena safena de la pierna derecha o izquierda (perro) y se recogen en tubos que contienen anticoagulante K3-EDTA y 150 µl de acetonitrilo, que se complementa con un estándar interno, para precipitar directamente la muestra de sangre. Después de la centrifugación durante 10 min. a 1300 g se diluye una alícuota de 50 µl de sobrenadante 1/10 con buffer de acetato de amonio 10 mM a pH 3 y se mide por LC-MS/MS. La evaluación de los perfiles de concentración plasmática – tiempo se evalúa con un programa de evaluación de farmacocinética validado. Además, también es posible recuperar muestras de órganos, tejidos y orina.

C) Ejemplos de trabajo de composiciones farmacéuticas.

Las sustancias de acuerdo con la invención se pueden convertir en preparaciones farmacéuticas de la siguiente manera:

Solución i.v.:

El compuesto de acuerdo con la invención se disuelve a una concentración por debajo de la solubilidad de saturación en un solvente fisiológicamente aceptable (por ejemplo solución isotónica de cloruro de sodio, solución de glucosa al 5% y/o solución de PEG 400 al 30%). La solución se esteriliza mediante filtración y se rellena en recipientes de inyección estériles y libres de pirógenos.