



19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 N.º de publicación: **ES 2 084 639**

51 Int. Cl.⁶: C07D 487/04

A61K 31/505

//(C07D 487/04

C07D 239:00

C07D 209:00)

12

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **90123671.1**

86 Fecha de presentación : **10.12.90**

87 Número de publicación de la solicitud: **0 432 677**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.06.91**

54 Título: **Derivados de ácido N-(pirrolo(2,3-d)pirimidín-3-ilacetil)-glutámico.**

30 Prioridad: **11.12.89 US 448742**
08.02.90 US 479655
24.05.90 US 528805
24.05.90 US 528155

73 Titular/es:
The Trustees of Princeton University
Nassau Street
Princeton New Jersey 08544, US
Eli Lilly and Company

45 Fecha de la publicación de la mención BOPI:
16.05.96

72 Inventor/es: **Taylor, Edward C.;**
Kuhnt, Dietmar G.;
Shih, Chuan y
Grindey, Gerald B.

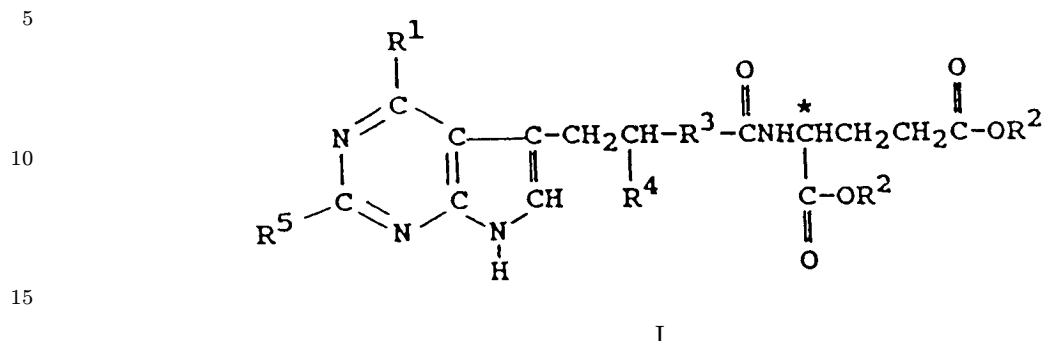
45 Fecha de la publicación del folleto de patente:
16.05.96

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

El presente invento se refiere a derivados de ácido glutámico que tienen la fórmula



en donde:

20 R¹ es - OH o - NH₂;

R² es hidrógeno o un catión farmacéuticamente aceptable;

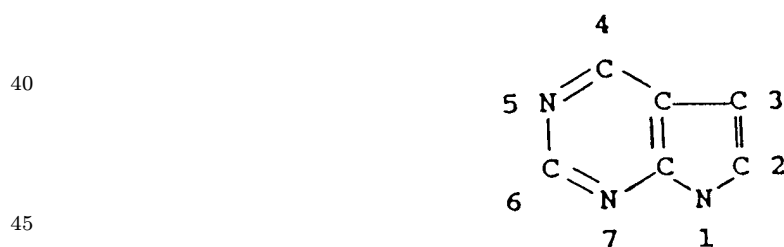
25 R³ es 1,4 - fenileno o 1,3 - fenileno insustituído o sustituido por cloro, fluoro, metilo, metoxilo, o trifluorometilo; tienedilo insustituído o sustituido por cloro, fluoro, metilo, metoxilo, o trifluorometilo; ciclohexandiilo; o un grupo alifático divalente lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de carbono;

R⁴ es hidrógeno;

30 R⁵ es hidrógeno, alquilo con 1 a 6 átomos de carbono, o amino;

y la configuración sobre el átomo de carbono designado * es S.

35 Los compuestos de este invento se describen aquí como incorporando el sistema de anillo heterocíclico pirrolo[2,3 - d]pirimidina cuyo sistema de anillo es numerado como sigue:



50 Se apreciará que las pirrolo[2,3 - d]pirimidinas como se expone en la fórmula I son el equivalente tautomérico de las estructuras 5 - H - 6 - oxo o 5 - H - 6 - amino correspondientes. A menos que se indique de otro modo, con el fin de simplificar los compuestos se exponen aquí y nombran utilizando la convención 6 - hidroxí y 6 - amino, entendiéndose que las estructuras 5 - H - 6 - oxo y 5 - H - 6 - imino son totalmente equivalentes.

55 Los compuestos de fórmula I tienen un efecto inhibitor sobre una o mas enzimas que utilizan ácido fólico y en particular derivados metabólicos de ácido fólico como un substrato. Los compuestos resultan particularmente activos como inhibidores de timidilato sintetasa, que cataliza la metilación del ácido deoxiuridílico a ácido deoxitimidílico utilizando N⁵,N¹⁰ - metiliden - tetrahidrofolato como una coenzima. Los compuestos pueden utilizarse por tanto, solos o en combinación, para inhibir el crecimiento de aquellos neoplasmas que de otro modo dependen de la enzima inhibida.

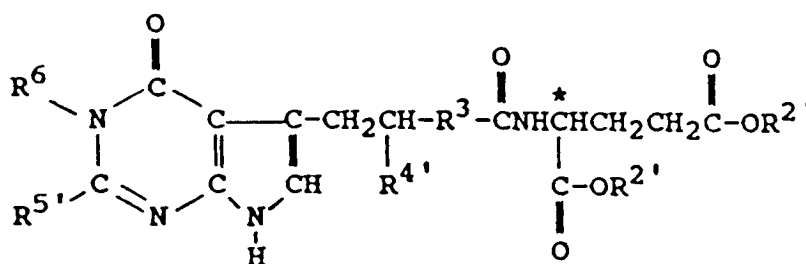
60

Los compuestos de la fórmula I tienen un efecto inhibitor sobre una o mas enzimas que utilizan ácido fólico, y en particular derivados metabólicos de ácido fólico, como un substrato. Los compuestos resultan

particularmente activos como inhibidores de timidilato sintetasa, que cataliza la metilación de ácido deoxiuridílico a ácido deoxitimidílico utilizando N⁵,N¹⁰ - metiliden - tetrahidrolato como una coenzima. Los compuestos por tanto pueden utilizarse, solos o en combinación, para inhibir el desarrollo de aquellos neoplasmas que de otro modo dependen de la enzima inhibida.

El invento se refiere también a las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I, a procedimientos para la preparación de estos compuestos y sus sales, a intermedios químicos útiles en la preparación de estos compuestos, a un método para combatir desarrollo neoplástico en un mamífero, y a composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos o sus sales.

Un primer grupo de intermedios químicos útiles, que pueden convertirse directamente en los compuestos finales deseados de fórmula I mediante la separación de grupos protectores, son compuestos de la fórmula:



II

en donde

R³ tiene el significado antes indicado;

R^{2'} es hidrógeno o un grupo protector carboxi;

R^{4'} es hidrógeno;

R^{5'} es hidrógeno, alquilo, amino, o amino que comporta un grupo protector, y

R⁶ es hidrógeno o alcanoiloxilo;

siendo por lo menos uno de R^{2'} y R^{5'} un grupo protector carboxilo, un grupo protector hidroxilo, o un grupo protector amino, respectivamente.

Los compuestos de la fórmula I pueden utilizarse en forma del ácido dicarboxílico libre, en cuyo caso ambos grupos R² son hidrógeno. Alternativamente los compuestos pueden utilizarse con frecuencia ventajosamente en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, en cuyo caso uno o ambos grupos R² son un catión farmacéuticamente aceptable. Estas formas de sal, incluyendo sus hidratos, son con frecuencia cristalinas y ventajosas para formar soluciones o formular composiciones farmacéuticas. Sales farmacéuticamente aceptables con bases incluyen las formadas a partir de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, metales atóxicos, aminas amónicas, y mono-, di- y trisustituidas, tal como, por ejemplo, las sales sódica, potásica, lítica, calcica, de magnesio, aluminio, zinc, amonio, trimetilamonio, trietanolamonio, piridinio y piridinio sustituidas. Son ventajosas las sales mono y disódicas, particularmente la sal disódica.

El grupo R³ es un grupo divalente que tiene por lo menos dos átomos de carbono entre los átomos de carbono que comportan enlaces de valencia libre. R³ puede ser, por ejemplo, un anillo 1,4 - fenileno o 1,3 - fenileno que está insustituido o sustituido opcionalmente por cloro, fluoro, metilo, metoxilo o trifluorometilo.

Alternativamente, R³ puede ser un grupo de tienediilo, que es, un anillo de tiofeno del que se han separado dos átomos de hidrógeno de dos átomos de carbono de anillo, como por ejemplo los sistemas de anillo de tieno - 2,5 - diilo, tieno - 3,5 - diilo, tieno - 2,4 - diilo, y tieno - 3,4 - diilo, cuyos sistemas de anillo pueden estar insustituidos o sustituidos por cloro, fluoro, metilo, metoxilo o trifluorometilo. Se apreciará que mientras en el extracto el sistema tieno - 3,5 - diilo es el equivalente del sistema tieno - 2,4 - diilo,

los dos términos se utilizan aquí para denotar las dos formas isoméricas resultantes de la orientación del anillo tiofénico dentro del resto de la molécula: *o sea* la estructura en donde el grupo carboxilo expuesto adyacente a R^3 se encuentra en la posición 2 del anillo tiofeno y en donde el grupo carboxi expuesto adyacente a R^3 está en la posición 3 del anillo de tiofeno.

5 Alternativamente, R^3 puede ser un grupo de ciclohexandiilo, o sea un grupo de cicloalcano divalente de 6 átomos de carbono tal como ciclohexano - 1,3 - diilo y ciclohexano - 1,4 - diilo.

10 Alternativamente, R^3 puede ser un alcandiilo, o sea un grupo alifático divalente lineal o ramificado de 2 a 4 átomos de carbono tal como etano, trimetileno, tetrametileno, propan - 1,2 - diilo, propan - 2,3 - diilo, butan - 2,3 - diilo, butan - 1,3 - diilo, y butan - 2,4 - diilo. De nuevo se apreciará que mientras en el extracto propan - 1,2 - diilo es el equivalente de propan - 2,3 - diilo, y butan - 1,3 - diilo el equivalente de butan - 2,4 - diilo, los dos términos se utilizan aquí para denotar las dos formas isoméricas resultantes de la orientación de una cadena de alcandiilo simétrica con respecto al resto de la molécula.

15 Los grupos protectores designados por $R^{2'}$ y $R^{5'}$ y aquí utilizados denotan grupos que generalmente no se encuentran en los compuestos terapéuticos finales pero que se introducen intencionalmente en una etapa de la síntesis con el fin de proteger grupos que de otro modo podrían reaccionar en el curso de manipulaciones químicas, separándose luego en una etapa posterior de la síntesis.

20 Debido a que los compuestos que comportan estos grupos protectores son or tanto de importancia principalmente como intermedios químicos (si bien algunos derivados exhiben también actividad biológica), su estructura precisa no es crítica. Numerosas reacciones para la formación y separación de estos grupos protectores se describen en una serie de trabajos corrientes incluyendo, por ejemplo, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, London y New York, 1973; Greene, Th. W. "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley, New Yoerk, 1981; "The Peptides", Vol. I, Schröder and Lubke, Academic Press, London y New York, 1965; "Methoden der organischen Chemie", Houben - Weyl, 4^a edición, Vol. 15/I, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, cuya descripción se incorpora aquí como referencia.

30 Con respecto a $R^{2'}$, puede protegerse un grupo carboxilo como un grupo éster que es separable de modo selectivo bajo condiciones suficientemente suaves para no interrumpir la estructura deseada de la molécula, especialmente, un ester de alquilo inferior con 1 a 12 átomos de carbono tal como metilo o etilo y particularmente uno que está ramificado en la posición 1 tal como t - butilo; y este ester de alquilo inferior sustituido en la posición 1 o 2 por (i) alcoxilo inferior, tal como por ejemplo, metoximetilo, 1 - metoxietilo, y etoximetilo, (ii) alquiltio inferior, tal como, por ejemplo metiltiommetilo y 1 - etiltioetilo; (iii) halógeno, tal como 2,2,2 - tricloroetilo, 2 - bromoetilo, y 2 - yodoetoxicarbonilo; (iv) uno o dos grupos fenilo cada uno de los cuales puede estar insustituido o mono - , di - o tri - sustituido por, por ejemplo alquilo inferior tal como ter - butilo, alcoxilo inferior tal como metoxilo, hidroxilo, halo tal como cloro, y nitro, tal como, por ejemplo, bencilo, 4 - nitrobencilo, difenilmetilo, di - (4 - metoxifenil)metilo; o (v) aroilo, tal como fenacilo. Un grupo carboxilo puede estar también protegido en forma de un grupo de sililo orgánico tal como trimetilsililetilo o tri - alquilsililo inferior, como, por ejemplo, trimetilsiloxicarbonilo.

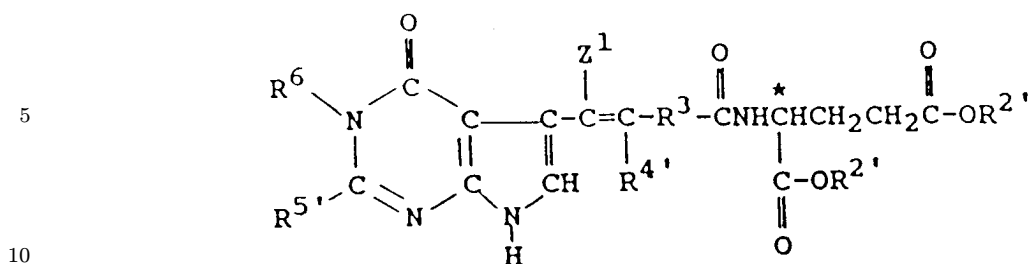
45 Con respecto a $R^{5'}$, un grupo amino puede protegerse como una amida utilizando un grupo acilo que es separable de modo selectivo bajo condiciones suaves, especialmente formilo, un grupo alcanilo inferior que está alfa ramificado frente al grupo carbonilo, particularmente alcanilo terciario tal como pivaloilo, o un grupo alcanilo inferior que está sustituido en la posición alfa frente al grupo carbonilo, como, por ejemplo, trifluoroacetilo.

50 Los compuestos preferidos de la fórmula I son aquellos en donde R^5 es amino o hidrógeno. Dentro de esta clase R^1 es, de preferencia, hidroxilo y R^3 es 1,4 - fenileno. Se prefieren asimismo dentro de esta clase los compuestos en donde R^1 es hidroxilo y R^3 es tienediilo.

Los compuestos de este invento pueden prepararse de conformidad con un primer procedimiento mediante hidrogenación catalítica de un compuesto de la fórmula:

55

60



III

en donde

15

Z^1 es hidrógeno, o Z^1 tomado junto con $R^{4'}$ es un enlace carbono - carbono;

$R^{2'}$ es hidrógeno o un grupo protector carboxilo;

20

R^3 y R^6 tienen el significado antes indicado;

$R^{4'}$, cuando se toman independientemente de Z^1 , es hidrógeno;

25

$R^{5'}$ es hidrógeno, alquilo con 1 a 6 átomos de carbono, amino, o un grupo protector amínico.

Los catalizadores de hidrogenación apropiados incluyen metales nobles y óxidos de metal noble tal como óxido de paladio o platino, óxido de rodio, y el precedente sobre un soporte tal como óxido de carbono o calcio.

30

Cuando en la fórmula III, Z^1 tomados junto con $R^{4'}$ es un enlace carbono - carbono, o sea, cuando está presente un enlace triple entre los dos átomos de carbono al que Z^1 y $R^{4'}$ están enlazados, $R^{4'}$ en el producto de hidrogenación será hidrógeno. En ausencia de cualquier quiralidad en R^3 (o cualquier grupo protector abarcado por $R^{2'}$ y/o $R^{5'}$), el producto de hidrogenación será un enantiómero simple que tiene

35

la configuración S sobre el átomo de carbono designado. Esto es también cierto cuando Z^1 y $R^{4'}$ son cada uno hidrógeno, o sea, cuando está presente un doble enlace entre los dos átomos de carbono a los que están enlazados Z^1 y $R^{4'}$.

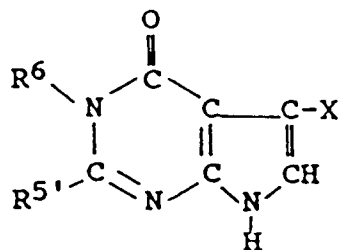
40

Los grupos protectores abarcados por $R^{2'}$, $R^{5'}$ y/o R^6 pueden separarse siguiendo hidrogenación mediante hidrólisis ácida o básica, como, por ejemplo, con hidróxido sódico para disociar grupos protectores $R^{2'}$ o $R^{5'}$, dando así los compuestos de fórmula I. En las referencias corrientes antes indicadas y que se incorporan aquí como referencia se describen métodos de separar los diversos grupos protectores.

45

Pueden prepararse compuestos de fórmula III utilizando procedimientos análogos a los descritos en la patente USA n° 4.818.819, utilizando no obstante la pirrolo[2,3 - d]pirimidina halogenada correspondiente. Así pues una pirrolo[2,3 - d]pirimidina de la fórmula:

50



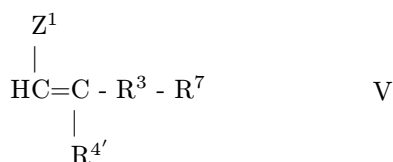
55

IV

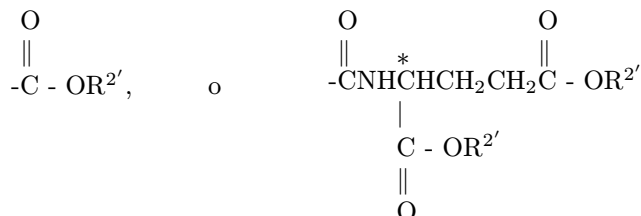
60

en donde X es bromo o yodo y $R^{5'}$ y $R^{6'}$ tienen el significado antes indicado, se deja que reaccione con un compuesto insaturado de la fórmula

ES 2 084 639 T3



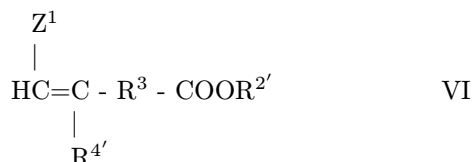
5 en donde Z^1 , R^3 , y R^4 tienen el significado aquí expuesto y R^7 es



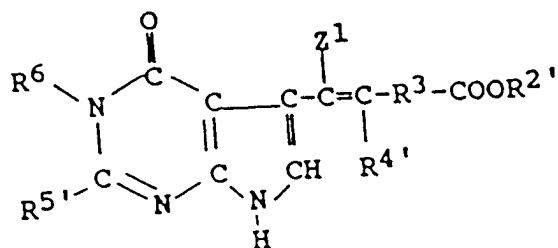
10 en donde $R^{2'}$ tiene el significado aquí definido, en presencia de un catalizador de paladio/fosfina trisustituída del tipo descrito en la patente estadounidense n° 4.818.819, cuya descripción se incorpora aquí como referencia.

15 Cuando R^7 es $-CONHCH(COOR^{2'})CH_2CH_2COOR^{2'}$ el producto de esta reacción de copulación se hidrogena y se separa cualquier grupo protector como se ha descrito antes.

20 Alternativamente se deja que reaccione un compuesto de la fórmula IV con un compuesto de la fórmula:



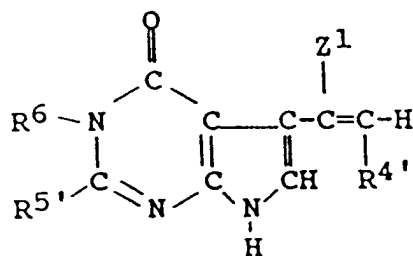
25 en donde Z^1 , $R^{2'}$, R^3 , y $R^{4'}$ tienen el significado aquí indicado en presencia de un catalizador de paladio/fosfina trisustituída del tipo descrito en la patente estadounidense n° 4.818.819, para dar un intermedio de la fórmula:



VII

30 El producto de la fórmula VII puede luego hidrogenarse, hidrolizarse para separar los grupos protectores $R^{2'}$ y R^6 y, opcionalmente, con protección intermedia de cualquier grupo amino abarcado por $R^{5'}$, asociado con un derivado de ácido glutámico protegido en la forma descrita en la patente estadounidense n° 4.684.653 utilizando técnicas de condensación convencionales para formar enlaces peptídicos tal como DCC o difenilclorofosfonato, después de lo cual se separan los grupos protectores.

35 En otra variante pueden prepararse compuestos de fórmula III utilizando los procedimientos descritos en la patente estadounidense n° 4.818.819. De este modo un compuesto de la fórmula:



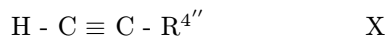
VIII

15 en donde Z¹, R^{4'}, R^{5'} y R⁶ tienen el significado aquí indicado, se deja que reaccione con un compuesto de la fórmula:



20 en donde X, R³, y R⁷ tienen el significado aquí definido, en presencia de un catalizador de paladio/fosfina trisustituida del tipo descrito en la patente estadounidense n° 4.818.819.

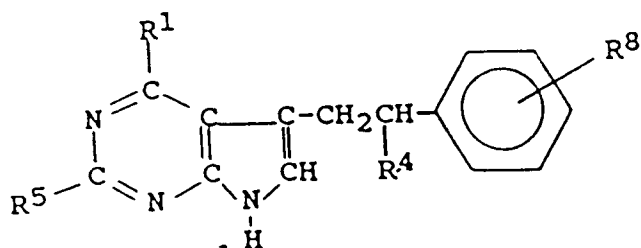
Los compuestos de la fórmula VIII pueden obtenerse también con los métodos de la patente estadounidense n° 4.818.819 tratando un compuesto de la fórmula IV con un compuesto insaturado de la fórmula:



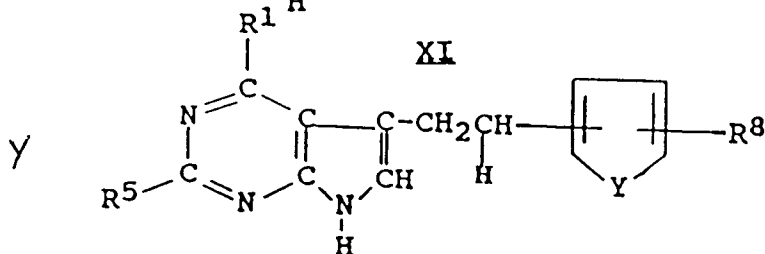
en donde R^{4''} es un grupo sililo trisustituido en presencia de un catalizador de paladio/fosfina trisustituida del tipo antes indicado.

30 Si bien no siempre es el caso los compuestos de la fórmula IV en donde R⁶ es hidrógeno pueden tender a volverse algo insolubles en disolventes apropiados para la reacción descrita en la patente estadounidense n° 4.818.819. En estos casos los compuestos de fórmula IV en donde R⁶ es hidrógeno pueden tratarse en primer lugar con hidruro sódico y un alcanolato de alquilo apropiado (tal como clorometil pivalato) para introducir un grupo de alcanoiloxilo en la posición 5 y aumentar la solubilidad.

Una subclase útil de compuestos útiles tanto como intermedios como por su efecto sobre enzimas son derivados de la fórmula XI y XII carentes de la cadena lateral de ácido glutámico:



XI



XII

en donde:

R¹ es - OH o - NH₂;

5 R⁴ es hidrógeno;

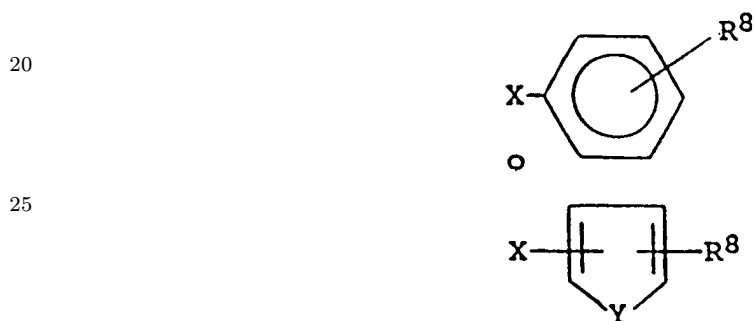
R⁵ es hidrógeno, alquilo con 1 a 6 átomos de carbono, o amino,

R⁸ es hidrógeno, cloro, fluoro, metilo, metoxilo, trifluoro - metilo o carboxilo;

10 Y es - S - u - O - ; y

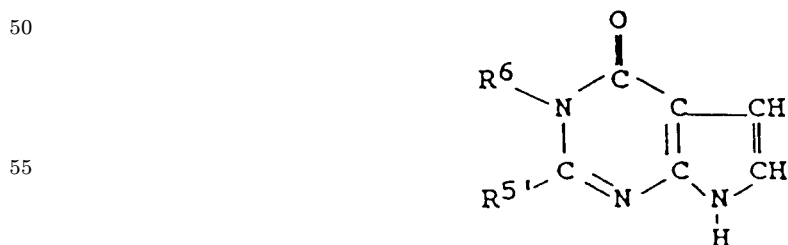
sus sales farmacéuticamente aceptables.

15 Los compuestos de fórmulas XI y XII se obtienen dejando que un compuesto de fórmula VII reaccione con un compuesto de la fórmula:



en donde X, Y y R⁸ tienen el significado aquí expuesto con los métodos de la patente estadounidense n° 4.818.819, o sea en presencia de un catalizador de paladio/fosfina trisubstituida, hidrogenándose el producto acoplado resultante e hidrolizándose para separar el grupo protector R^{2'}. Compuestos típicos de las fórmula XI y XII son 3 - (2 - fenil - 3 - hidroxipropil) - 4 - hidroxil - 6 - amino - pirrolo[2,3 - d]pirimidina, 3 - [2 - (tien - 2 - il)etil] - 4 - hidroxil - 6 - aminopirrolo[2,3 - d]pirimidina, 3 - [2 - (tien - 2 - il)etil] - 4 - hidroxipirrolo[2,3 - d]pirimidina, 3 - [2 - (tien - 2 - il)etil] - 4 - hidroxil - 6 - metilpirrolo[2,3 - d]pirimidina, 3 - [2 - (tien - 3 - il)etil] - 4 - hidroxil - 6 - aminopirrolo[2,3 - d]pirimidina, 3 - [2 - (tien - 3 - il)etil] - 4 - hidroxipirrolo[2,3 - d]pirimidina, y 3 - [2 - (tien - 3 - il) - etil] - 4 - hidroxil - 6 - metilpirrolo[2,3 - d]pirimidina.

Como se ha expuesto antes los compuestos de este invento pueden prepararse utilizando la copulación catalizada de varios compuestos insaturados descritos en la patente estadounidense n° 4.818.819 y las reacciones de copulación de ácido glutámico descritas en la patente estadounidense n° 4.684.653, sustituyendo la pirrolo[2,3 - d]pirimidina apropiada por la pirido[2,3 - d]pirimidina aquí descrita. Los intermedios de pirrolo[2,3 - d]pirimidina de la fórmula IV anteriores pueden obtenerse tratando un compuesto de la fórmula:



XIII

60 en donde R^{5'} y R⁶ tienen el significado aquí definido con N - yodosuccinimida para dar la 2,3 - diyodopirrolo[2,3 - d]pirimidina correspondiente que se trata luego con zinc y ácido acético para separar de modo

ES 2 084 639 T3

selectivo el átomo de yodo en la posición 2, dando la 3 - yodopirrolo[2,3 - d]pirimidina correspondiente de la fórmula IV.

De conformidad con los procedimientos precedentes, se obtienen los compuestos de la fórmula II en donde R¹ es - OH. Cuando se desea un compuesto de la fórmula I en donde R¹ es - NH₂, puede tratarse un compuesto en donde R¹ es - OH con 1,2,4 - triazol y (4 - clorofenil)diclorofosfato y el producto de esta reacción se trata luego con amoniaco concentrado.

Como se ha indicado los compuestos de este invento tienen un efecto sobre una o mas enzimas que utilizan ácido fólico, y en particular derivados metabólicos de ácido fólico, como un sustrato. Por ejemplo el ácido N - {4 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - aminopirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - L - glutámico demuestra potentes efectos inhibidores frente al desarrollo de células T humanas derivadas de células de leucemia linfoblásticas (CCRF - CEM), exhibiendo una CI₅₀ de 0,004 u/ml. La citotoxicidad no se invierte con la adición de purinas tal como hipoxantina y con la adición de aminoimidazolcarboxamida pero se invierte con la adición de timidina, indicando inhibición específica en el ciclo de timidilato y no en la síntesis de novo purina. Los compuestos pueden utilizarse, bajo la supervisión de profesionales cualificados, para inhibir el desarrollo de neoplasmas incluyendo cloriocarcinoma, leucemia, adenocarcinoma del pecho femenino, cánceres epidérmicos de la cabeza y cuello, cancer escamoso o de pulmón de pequeñas células, y diversos linfosarcomas. Los compuestos pueden utilizarse también para tratar micosis fungoides y psoriasis.

Los compuestos pueden administrarse por vía oral, pero se administran, de preferencia, parenteralmente, solos o en combinación con otros agentes terapéuticos incluyendo otros agentes anti - neoplásicos, esteroides, etc., a un mamífero que sufra de neoplasma y precise tratamiento. Las vías parenterales de administración incluyen intramuscular, intratraqueal, intravenosa e intra - arterial. Los regímenes de dosificación deben titularse al neoplasma particular, la condición del paciente, y la respuesta, pero en general las dosis estarán comprendidas entre alrededor de 10 y alrededor de 100 mg/día durante 5 - 10 días o administración diaria única de 250 - 500 mg, repetidas periódicamente; por ejemplo cada 14 días. Si bien tienen una baja toxicidad en comparación con otros antimetabolitos ahora en uso, puede eliminarse una respuesta tóxica con frecuencia reduciendo la dosis diaria y/o administrando el compuesto en días alternos o a intervalos mas prolongados tal como cada tres días. Las formas de dosificación oral incluyen comprimidos y cápsulas conteniendo de 1 a 10 mg de farmaco por dosis unitaria. Para administración parenteral pueden utilizarse soluciones salinas isotónicas conteniendo 20 - 100 mg/ml.

Los ejemplos que siguen servirán para ampliar la ilustración del invento. En los datos de RMN "s" denota singlete, "D" denota doblete, "T" denota triplete, "q" denota cuartete, "m" denota multiplete, y "br" denota un pico ancho.

Ejemplo 1

3 - yodo - 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrolo[2,3 - d]pirimidina.

Una mezcla de 3,0 g (0,02 mol) de 4 - hidroxil - 6 - aminopirrolo[2,3 - d]pirimidina y 8,4 g (0,07 mol) de cloruro de pivaloilo en 40 ml de piridina se agita durante 30 minutos entre 80 y 90°C, luego se evapora la mezcla hasta sequedad y se disuelve el residuo en 30 ml de metanol. La adición de amoniaco acuoso al 10% proporciona 4,2 g (89%) de 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrolo[2,3 - d]pirimidina que puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía a través de gel de sílice, eluyéndose con metanol al 8% en cloruro de metileno. Punto de fusión 295°C. ¹RMN (d₆ - DMSO) delta 1,20 (s, 9H), 6,37 (d, J = 3,4 Hz, 1H), 6,92 (d, J = 3,4 Hz, 1H), 10,78 (s, 1H), 11,56 (s, 1H), 11,82 (s, 1H). Analisis, calculado para C₁₁H₁₄N₄O₂: C, 56,40; H, 6,02; N, 23,92. Hallado: C, 56,16; H, 6,01; N, 23,67.

A una mezcla de 4,7 g (20 mmol) de 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrolo - [2,3 - d]pirimidina en 200 ml de dimetil - formamida se adicionan 9,9 g (44 mmol) de N - yodosuccinamida. Se agita la mezcla a temperatura ambiente en la oscuridad durante 18 horas. La mayor parte de la dimetilformamida se separa mediante evaporación y la suspensión residual se vierte en 300 ml de agua. El sólido resultante se recoge por filtración y se seca bajo vacío sobre pentóxido de fósforo para dar 2,3 - diyodo - 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrolo[2,3 - d]pirimidina que puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía sobre sílice eluyéndose con metanol al 2,5% en cloruro de metileno. Punto de fusión >290°C. ¹RMN (d₆ - DMSO) delta 1,18 (s, 9H), 10,85 (s, 1H), 11,85 (s, 1H), 12,42 (s, 1H). Analisis: Calculado para C₁₁H₁₂N₄O₂I₂: C, 27,18; H, 2,49; N, 11,53; I, 52,22. Hallado: C, 27,51; H, 2,51; N, 11,27; I, 52,02.

De modo similar pero a partir de 4 - hidroxil - 6 - metilpirrolo[2,3 - d]pirimidina y 4 - hidroxipirrolo[2,3

ES 2 084 639 T3

- d]piri - midina (7 - desazahipoxantina) se obtiene, respectivamente, 2,3 - diyodo - 4 - hidrox - 6 - metilpirrolo[2,3 - d]pirimidina y 2,3 - diyodo - 4 - hidroxipirrolo[2,3 - d]pirimidina, punto de fusión >205°C (el compuesto pierde yodo). ¹RMN (d₆ - DMSO) delta 7,79 (s, 1H), 11,93 (s, 1H), 12,74 (s, 1H).

5 A una mezcla de 4,86 g de 2,3 - diyodo - 4 - hidrox - 6 - pivaloilaminopirrolo - [2,3 - d]pirimidina en 100 ml de ácido acético glacial y 25 ml de agua se adiciona 1,3 g (20 mmol) de polvo de zinc. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas, se diluyó con 500 ml de agua, y se enfrió. Se recogió el sólido mediante filtración y se secó bajo vacío sobre pentóxido de fósforo para dar 3 - yodo - 4 - hidrox - 6 - pivaloilaminopirrolo[2,3 - d]pirimidina que puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía sobre sílice eluyéndose con metanol al 2,5% en cloruro de metileno. Punto de fusión >240°C. ¹RMN (d₆ - DMSO) delta 1,20 (s, 9H), 7,12 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 10,82 (s, 1H), 11,79 (s, 1H), 11,89 (s, 1H). Análisis: Calculado para C₁₁H₁₃N₄O₂I: C, 36,69; H, 3,64; N, 15,56; I, 35,24. Hallado: C, 36,91; H, 3,58; N, 15,65; I, 35,56.

15 De modo similar a partir de 2,3 - diyodo - 4 - hidrox - 6 - metilpirrolo[2,3 - d] - pirimidin y 2,3 - diyodo - 4 - hidroxipirrolo[2,3 - d]pirimidina, se obtiene, respectivamente, 3 - yodo - 4 - hidrox - 6 - metilpirrolo[2,3 - d]pirimidina y 3 - yodo - 4 - hidroxipirrolo[2,3 - d]pirimidina, punto de fusión >245°C (compuesto pierde yodo). RMN¹ (d₆ - DMSO) delta 7,20 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,82 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 11,85 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 12,17 (s, 1H).

20 Ejemplo 2

N - [4 - (4 - hidrox - 6 - pivaloilamino - pirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - iletinil)benzoil] - L - glutamato de dimetilo.

25 A una mezcla de 3,6 g (20 mmol) de 3 - yodo - 4 - hidrox - 6 - pivaloilaminopirrolo - [2,3 - d]pirimidina bien seca en 40 ml de dimetilformamida se adicionan 4,0 g (13,19 mmol) de N - (4 - etinilbenzoil) - L - glutamato de dimetilo, 0,38 g de yoduro de cobre (I), 3 ml de trietilamina, y 1,0 g de tetrakis - (trifenilfosfina)paladio. Esta mezcla se agita a temperatura ambiente durante dos horas y luego se vierte en 500 ml de agua. Se recoge el sólido por filtración, se seca al aire, y luego se somete a reflujo en 200 ml de metanol. Se enfría la mezcla y se recoge el sólido por filtración, se disuelve en dos litros de metanol al 10% en cloruro de metileno, y se somografía sobre sílice. Se recromatografían bandas negras iniciales y las bandas incoloras combinadas de la primera y segunda pruebas se evaporan, lo que da 3,5 g de N - [4 - (4 - hidrox - 6 - piva - loilaminopirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - iletinil)benzoil] - L - glutamato de dimetilo que puede purificarse adicionalmente mediante recristalización a partir de metanol al 50% en cloruro de metileno. Punto de fusión 280 - 285°C. RMN¹ (d₆ - DMSO) delta 1,21 (s, 9H), 1,96 - 2,15 (m, 2H), 2,44 (t, J=7,5 Hz, 2H) 3,56 (s, 3H), 3,62 (s, 3H), 4,40 - 4,45 (m, 1H), 7,43 (s, 1H), 7,53 (d, J= 8,4 Hz, 2H), 7,87 (d, J=8,4 Hz, 2H), 8,82 (d, J = 7,4 Hz, 1H, 1 H), 10,95 (s, 1H), 11,95 (s, 1H). Análisis: Calculado para C₂₇H₂₉N₅O₇: C, 60,56; H, 5,46; N, 13,08. Hallado: C, 60,55; H, 5,46; N, 12,89.

40 De modo similar, sustituyendo una cantidad equivalente de N - (pent - 4 - inoil) - L - glutamato de dimetilo, N - (hep - 6 - enoil) - L - glutamato de dimetilo y N - (hex - 5 - inoil) - L - glutamato de dimetilo por N - (4 - etinilbenzoil)glutamato de dimetilo en el procedimiento precedente, se obtiene N - [5 - (4 - hidrox - 6 - pivaloilamino - pirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)pent - 4 - inoil] - L - glutamato de dime - tilo, N - [7 - (4 - hidrox - 6 - pivaloilaminopirrolo[2,3 - d] - pirimidin - 3 - il)hept - 6 - enoil] - L - glutamato de dimetilo y N - [6 - (4 - hidrox - 6 - pivaloilaminopirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)hex - 5 - inoil] - L - gluta - mato de dimetilo.

50 En la forma descrita de modo general en la patente estadounidense n° 4.882.334 expedida el 21 de noviembre de 1989 puede obtenerse N - (hex - 5 - inoil) - L - glutamato de dimetilo, cuya descripción se incorpora aquí como referencia, dejando que el cloruro de ácido hex - 5 - inoico (obtenido tratando ácido hex - 5 - inoico con cloruro de tionilo) reaccione con L - glutamato de dimetilo en presencia de un aceptor de ácido tal como trietilamina. A su vez puede prepararse ácido hex - 5 - inoico, por ejemplo, mediante hidrolisis alcalina de 5 - cianopent - 1 - ina.

55 Ejemplo 3

N - [5 - (4 - hidrox - 6 - pivaloilamino - pirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etinil)tien - 2 - ilcarbonil] - L - glutamato de dimetilo.

60 Una mezcla de 2,0 g de 3 - yodo - 4 - hidrox - 6 - piva - loilaminopirrolo[2,3 - d] - pirimidina, 1,2 g de triemetilsil - lilacetileno, 0,1 g de cloruro de paladio, 0,23 g de trifenilfosfina, 0,06 g de yoduro cuproso

ES 2 084 639 T3

y 2,6 g de trietilamina en 100 ml de acetonitrilo se calienta en un tubo sellado durante 1 hora y media a 50°C y luego en reflujo durante 3 horas. Se separa el disolvente bajo presión reducida y se tritura el residuo con acetato de etilo:hexano 1:1 y se filtra. El sólido así recogido se disuelve en cloruro de metileno y esta solución se pasa a través de una almohadilla de gel de sílice eluyéndose con metanol al 1% sobre cloruro de metileno. Se concentra el eluato, lo que da 3 - trimetilsililetinil - 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidina.

A una solución de 1,5 g de 3 - trimetilsililetinil - 4 - hidroxil - 6 - pivalilaminopirrol[2,3 - d]pirimidina en 100 ml de tetrahidrofurano anhidro enfriada hasta 0°C se adiciona bajo nitrógeno 4,76 ml de fluoruro de tetrabutilamonio 1M en tetrahidrofurano anhidro. Después de 5 minutos se deja que la mezcla reaccional obtenga la temperatura ambiente y luego se agita durante 2 horas. Se separa el disolvente bajo presión reducida y se purifica el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice, lo que da 3 - etinil - 4 - hidroxil - 6 - pivaloil - laminopirrol - [2,3 - d]pirimidina.

Una mezcla de 1,70 g de 3 - etinil - 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d] - pirimidina, 2,30 g de N - (5 - bromotien - 2 - ilcarbonil) - L - glutamato de dimetilo (preparado como se ha descrito en la patente estadounidense n° 4.882.334 expedida el 23 de noviembre de 1989, cuya descripción se incorpora aquí como referencia), 44 mg de cloruro de paladio, 130 mg de trifenilfosfina, 25 mg de yoduro cuproso y 1,13 ml de trietilamina en 30 ml de acetonitrilo se calienta en reflujo durante 3 horas y luego se enfría hasta la temperatura ambiente. Se separa el disolvente bajo presión reducida y el residuo se somete a cromatografía de columna (Waters 500) eluyéndose con metanol:cloruro de metileno 1:19, lo que da N - [5 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etinil)tien - 2 - ilcar - bonil] - L - glutamato de dimetilo.

Con la sustitución de cantidades equivalentes de N - (4 - bromotien - 2 - ilcarbonil) - L - glutamato de dietilo y N - (5 - bromo - etien - 3 - ilcarbonil) - L - glutamato de dietilo en el procedimiento precedente, se obtiene, respectivamente, N - [4 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - iletinil)tien - 2 - ilcarbo - nil] - L - glutamato de dietilo y N - [5 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloil - aminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - iletinil)tien - 3 - ilcarbonil] - L - glutamato de dietilo.

De modo análogo, a partir de N - (2 - fluoro - 4 - yodobenzoil) - L - glutamato de dimetilo y N - (3 - fluoro - 4 - yodobenzoil) - L - glutamato de dimetilo (preparado como se ha descrito en la patente estadounidense n° 4.882.334 expedida el 32 de noviembre de 1989, cuya descripción se incorpora aquí como referencia), se obtiene, respectivamente, N - [2 - fluoro - 4 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilamino - pirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il - etinil)benzoil] - L - glutamato de di - metilo y N - [3 - fluoro - 4 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - iletinil)benzoil] - L - glutamato de dimetilo.

Ejemplo 4

N - [4 - (4 - hidroxipirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il - etinil)benzoil] - L - glutamato de dimetilo.

Dejando que reaccione 3 - yodo - 4 - hidroxipirrol[2,3 - d]pirimidina con N - (4 - etinilbenzoil) - L - glutamato de dimetilo en la forma descrita en el ejemplo 2, se obtiene, respectivamente, N - [4 - (4 - hidroxipirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - iletinil)benzoil] - L - glutamato de dimetilo que se purifica mediante cromatografía sobre sílice, punto de fusión 160°C (desc.). RMN₁ (d₆ - DMSO) delta 1,98 - 215 (m, 2H), 2,45 (6, J = 7,5 Hz, 2H) 3,57 (s, 3H), 3,64 (s, 3H), 4,40 - 4,45 (m, 1H), 7,51 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,55 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,87 (s, 1H), 7,90 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 11,97 ((d, J = 3,7 Hz, 1H), 12,31 (s, 1H).

De modo alternativo, sustituyendo cantidades equivalentes de metil 4 - etinilbenzoato, 4 - etiniltolueno, 4 - etinilbenceno, 4 - etinilclorobenceno, 4 - etinilfluorobenceno, 3 - etinilfluorobenceno, y 1 - metoxi - 4 - etinilbenceno en el procedimiento del ejemplo 2 se obtiene metil 4 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - iletinil)benzoato, 3 - (4 - metilfenil)etinil - 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidina, 3 - feniletinil - 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidina, 3 - (4 - clorofenil)etinil - 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidina, 3 - (4 - fluorofenil)etinil - 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidina, 3 - (3 - fluorofenil)etinil - 4 - hidroxil - 6 - pivaloil - aminopirrol[2,3 - d]pirimidina, y 3 - (4 - metoxi - fenil)etinil - 4 - hidroxil - 6 - pivaloil - aminopirrol[2,3 - d]pirimidina.

El empleo de 3 - yodo - 4 - hidroxipirrol[2,3 - d]pirimidina en lugar de 3 - yodo - 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidina con metil 4 - etinilbenzoato, 4 - etiniltolueno, 4 - etinilclorobenceno, 4 - etinilfluorobenceno, 3 - etinilfluorobenceno y 1 - metoxi - 4 - etinilbenceno proporciona, respectivamente, metil 4 - (4 - hidroxipirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - iletinil)benzoato, 3 - (4 - metilfenil)etinil - 4 - hidroxil -

ES 2 084 639 T3

pirrolo[2,3 - d]pirimidina, 3 - fenil - etinil - 4 - hidroxipirrolo[2,3 - d]pirimidina, 3 - (4 - clorofenil) - etinil - 4 - hidroxipirrolo[2,3 - d]pirimidina, 3 - (4 - fluorofenil)eti - nil - 4 - hidroxipirrolo[2,3 - d]pirimidina, 3 - (4 - metoxifenil)etinil - 4 - hidroxipirrolo[2,3 - d]pirimidina.

5 Se deja que reaccionen diez gramos de 3 - yodo - 4 - hidroxil - 6 - metilpirrolo[2,3 - d]pirimidina con 2,19 g de dispersión oleosa de hidruro sódico al 80% y 75 ml de dimetilformamida con la exclusión de humedad. Después de 30 minutos se adicionan 6,02 g de clorometil pivalato. Se agita esta mezcla durante tres horas, se vierte en agua, y se neutraliza con ácido acético. Se cromatografía el sólido sobre gel de sílice con acetona - diclorometano, lo que da 3 - yodo - 4 - hidroxil - 1,5 - bis(pivaloiloxi - 6 - metilpirrolo[2,3 - d]pirimidina, punto de fusión 155°C ini - cialmente, seguido de 3 - yodo - 4 - hidroxil - 5 - pivaloiloxi - 6 - metil - pirrolo[2,3 - d]pirimidina, punto de fusión 236°C.

15 El empleo de 3 - yodo - 4 - hidroxil - 5 - pivaloiloxi - 6 - metilpi - rrolo[2,3 - d] - pirimidina en el procedimiento del ejemplo 2 da luego N - [4 - (4 - hidroxil - 5 - pivaloiloxi - 6 - metilpirrolo[2,3 - d]piri - midin - 3 - iletinil)benzoil] - L - glutamato de dimetilo, punto de fusión 196°C. Análisis: Calculado para C₂₉H₃₂N₄O₈: C, 61,70; H, 5,71; N, 9,92. Hallado: C, 61,90; H, 5,71; N, 9,95.

20 El empleo de 3 - yodo - 4 - hidroxil - 5 - pivaloiloxi - 6 - metil - pirrolo[2,3 - d]pirimidina en lugar de 3 - yodo - 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrolo[2,3 - d]pirimidina con metil - 4 - etinilben - zoato, 4 - etiniltolueno, 4 - etinilbenceno, 3 - etinilfluorobenceno y 1 - metoxi - 4 - etinilbenceno da metil 4 - (4 - hidroxil - 5 - pivaloiloxi - 6 - metilpirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - iletinil)benzoato, 3 - (4 - metil - fenil)etinil - 4 - hidroxil - 5 - pivaloiloxi - 6 - metil - pirrolo[2,3 - d]piri - midina, 3 - feniletinil - 4 - hidroxil - 5 - pivaloiloxi - 6 - metilpiro - lo[2,3 - d]pirimidina, 3 - (4 - clorofenil)etinil - 4 - hidroxil - 5 - piva - loiloxi - 6 - metilpirrolo - [2,3 - d]pirimidina, 3 - (4 - fluorofenil) - etinil - 4 - hidroxil - 5 - pivaloiloxi - 6 - metilpirrolo[2,3 - d]pirimidina, y 3 - (4 - metoxifenil) - etinil - 4 - hidroxil - 5 - pivaloiloxi - 6 - metilpirrolo - [2,3 - d]pirimidina.

Ejemplo 5

30 N - {4 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilamino - pirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il) - etil]benzoil} - L - glutamato.

35 Una mezcla de 1,0 g de dimetil N - [4 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrolo - [2,3 - d]pirimidin - 3 - iletinil)benzoil] - L - glutamato en 250 ml de metanol al 50% en cloruro de metileno y 0,8 g de paladio sobre carbón al 3% se hidrogena a 50 p.s.i. durante tres horas, se filtra, y se concentra bajo presión reducida. Se recoge el sólido mediante filtración y se seca, lo que da 0,72 g de dimetil N - {4 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - pivalo - ilaminopirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - L - glutamato. Punto de fusión 247°C. RMN¹ (d₆ - DMSO) delta 1,21 (s, 9H), 1,90 - 2,12 (, 2H), 2,42 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 2,92 (t, J=4 Hz, 2H), 2,97 (t, J = 4 Hz, 2H), 3,55 (s, 3H), 3,61 (s, 3H), 4,38 - 4,45 (m, 1H), 6,61 (s, 1H), 7,27 (d, J=8,2 Hz, 2H), 7,75 (d, J = 8,2 Hz, 2 H), 8,64 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 10,75 (s, 1H), 11,22 (s, 1H). Análisis: Calculado para C₂₇H₃₃N₅O₇: C, 60,10; H 6,17; N, 12,98. Hallado: C, 59,94; H, 6,15; N, 12,72.

Ejemplo 6

45 N - {5 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]tien - 2 - ilcarbonil} - L - glutamato de dimetilo.

50 Sometiendo dimetil N - [5 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilamino - pirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etinil]tien - 2 - ilcarbonil] - L - gluta - mato al proceso de hidrogenación del ejemplo 5 se obtiene dimetil N - {5 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrolo - [2,3 - d]pirimi - din - 3 - il)etil]tien - 2 - ilcarbonil} - L - glutamato.

De modo análogo los compuestos que siguen se someten a la hidrogenación del ejemplo 5:

- 55 (a) N - [2 - fluoro - 4 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilamino - pirrolo[2,3 - d] - pirimidin - 3 - iletinil)benzoil] - L - glutamato de dimetilo;
- (b) N - [3 - fluoro - 4 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilamino - pirrolo[2,3 - d] - pirimidin - 3 - iletinil)benzoil] - L - glutamato de dimetilo;
- 60 (c) N - [4 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - iletinil)tien - 2 - ilcarbonil] - L - glutamato de dietilo;

ES 2 084 639 T3

- (d) N - [5 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - iletinil)tien - 3 - ilcarbonil] - L - glutamato de dietilo;
- (e) N - [5 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)pent - 4 - inoil] - L - glutamato;
- 5 (f) hept - 6 - enoil] - L - glutamato de dimetilo;
- (g) N - [6 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)hex - 5 - inoil] - L - glutamato de dimetilo;
- 10 (h) 4 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d] - pirimidin - 3 - iletinil)benzoato de metilo;
- (i) 3 - (4 - metilfenil)etinil - 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol - [2,3 - d]pirimidina;
- (j) 3 - feniletinil - 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d] - pirimidina;
- 15 (k) 3 - (4 - clorofenil)etinil - 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol - [2,3 - d]pirimidina;
- (l) etinil - 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol - [2,3 - d]pirimidina;
- (m) etinil - 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol - [2,3 - d]pirimidina;
- 20 (n) etinil - 4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol - [2,3 - d]pirimidina;
- (o) benzoato de metilo;
- (p) 3 - (4 - metilfenil)etinil - 4 - hidroxil - 5 - pivaloiloxil - 6 - metilpirrol[2,3 - d]pirimidina;
- 25 (q) 3 - feniletinil - 4 - hidroxil - 5 - pivaloiloxil - 6 - metilpirrol - [2,3 - d]pirimidina;
- (r) etinil - 4 - hidroxil - 5 - pivaloiloxil - 6 - metilpirrol[2,3 - d]pirimidina;
- (s) etinil - 4 - hidroxil - 5 - pivaloiloxil - 6 - metilpirrol[2,3 - d]pirimidina;
- 30 (t) etinil - 4 - hidroxil - 5 - pivaloiloxil - 6 - metilpirrol[2,3 - d]pirimidina;
- (u) benzoato de metilo,
- (v) 3 - (4 - metilfenil)etinil - 4 - hidroxipirrol[2,3 - d]pirimidina;
- 35 (w) 3 - feniletinil - 4 - hidroxipirrol[2,3 - d]pirimidina;
- (x) 3 - (4 - clorofenil)etinil - 4 - hidroxipirrol[2,3 - d]pirimidina;
- 40 (y) 3 - (4 - fluorofenil)etinil - 4 - hidroxipirrol[2,3 - d]pirimidina; y
- (z) 3 - (4 - metoxifenil)etinil - 4 - hidroxipirrol[2,3 - d]pirimidina.

Se obtiene, respectivamente:

- 45 (a) N - [2 - fluoro - 4 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d] - pirimidin - 3 - iletil)benzoil] - L - glutamato de dimetilo;
- (b) N - [3 - fluoro - 4 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d] - pirimidin - 3 - iletil)benzoil] - L - glutamato de dimetilo;
- 50 (c) N - [4 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - iletil)tien - 2 - ilcarbonil] - L - glutamato de dietilo;
- (d) N - [5 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - iletil)tien - 3 - ilcarbonil] - L - glutamato de dietilo;
- 55 (e) N - [5 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)pentil] - L - glutamato de dimetilo;
- (f) N - [7 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)heptil] - L - glutamato de dimetilo;
- 60 (g) N - [6 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il - hexil] - L - glutamato de dimetilo,

ES 2 084 639 T3

- (h) 4 - [2 - (4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoato de metilo;
- (i) 3 - [2 - (4 - metilfenil)etil] - 4 - hidroxilaminopirrol - [2,3 - d]pirimidina;
- 5 (j) 3 - (2 - feniletil) - 4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d] - pirimidina;
- (k) 3 - [2 - (4 - clorofenil)etil] - 4 - hidroxilaminopirrol - [2,3 - d]pirimidina;
- (l) 3 - [2 - (4 - fluorofenil)etil] - 4 - hidroxilaminopirrol - [2,3 - d]pirimidina;
- 10 (m) 3 - [2 - (3 - fluorofenil)etil] - 4 - hidroxilaminopirrol - [2,3 - d]pirimidina;
- (n) 3 - [2 - (4 - metoxifenil)etil] - 4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d]pirimidina;
- (o) 4 - [2 - (4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil] benzoato de metilo;
- 15 (p) 3 - [2 - (4 - metilfenil)etil] - 4 - hidroxilaminopirrol - 5 - pivaloiloxi - 6 - metilpirrol[2,3 - d]pirimidina;
- (q) 3 - [2 - (4 - clorofenil)etil] - 4 - hidroxilaminopirrol - 5 - pivaloiloxi - 6 - metilpirrol[2,3 - d]pirimidina;
- (r) 3 - [2 - (4 - fluorofenil)etil] - 4 - hidroxilaminopirrol - 5 - pivaloiloxi - 6 - metilpirrol[2,3 - d]pirimidina;
- 20 (s) 3 - [2 - (4 - metoxifenil)etil] - 4 - hidroxilaminopirrol - 5 - pivaloiloxi - 6 - metilpirrol[2,3 - d]pirimidina;
- (t) 4 - [2 - (4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoato de metilo;
- (u) 3 - [2 - (4 - metilfenil)etil] - 4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d]pirimidina;
- 25 (v) 3 - (2 - feniletil) - 4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d]pirimidina;
- (w) 3 - [2 - (4 - clorofenil)etil] - 4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d]pirimidina;
- (x) 3 - [2 - (4 - fluorofenil)etil] - 4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d]pirimidina; e
- 30 (y) 3 - [2 - (4 - metoxifenil)etil] - 4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d]pirimidina.
- (z) 3 - [2 - (4 - metoxifenil)etil] - 4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d]pirimidina.

Ejemplo 7

35

N - {4 - [2 - (4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - *L* - glutamato de dimetilo.

Una mezcla de 1,1 g de dimetil *N* - [4 - (4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - *L* - glutamato en 100 ml de metanol al 50% en cloruro de metileno y 0,8 g de paladio sobre carbón al 3% se hidrogenó a 50 p.s.i. durante 24 horas, se filtró, y se concentró bajo presión reducida. Se adicionó éter al residuo se recogió el sólido mediante filtración y se secó, lo que dió 0,67 g de dimetil *N* - {4 - [2 - (4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - *L* - glutamato. Punto de fusión 170 - 172°C. RMN¹ (d₆ - DMSO) delta 1,94 - 2,14 (m, 2GH); 2,44 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 2,93 - 3,02 (m, 2H), 3,57 (s, 3H), 3,63 (s, 3H), 4,40 - 4,70 (m, 1H), 6,71 (s, 1H), 7,29 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,77 (m, 3H), 8,66 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 11,52 (s, 1H), 11,71 (s, 1H).

45

De modo similar a partir de *N* - [4 - (4 - hidroxilaminopirrol - 5 - pivaloiloxi - 6 - metilpirrol - [2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - *L* - glutamato de dimetilo se obtiene, de conformidad con este procedimiento *N* - {4 - [2 - (4 - hidroxilaminopirrol - 5 - pivaloiloxi - 6 - metilpirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - *L* - glutamato de dimetilo.

50

Ejemplo 8

55 *Acido N* - {4 - [2 - (4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d] - pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - *L* - glutámico.

Una mezcla de 1,5 g de *N* - {4 - [2 - (4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - *L* - glutamato de dimetilo en 10 ml de hidróxido sódico 1N se agita a temperatura ambiente durante tres días para formar la sal sódica de ácido *N* - {4 - [2 - (4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - *L* - glutámico. Se neutraliza con ácido acético glacial. El sólido que se forma se recoge mediante filtración y recristaliza en metanol al 50% en cloruro de metileno, lo que dá 0,8 g (67%) de ácido *N* - {4 - [2 - (4 - hidroxilaminopirrol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - *L*

60

ES 2 084 639 T3

- glutámico. RMN¹ (d₆ - DMSO) del - ta 1,80 - 2,00 (m, 2H), 2,10 - 2,30 (m, 2H), 2,77 - 2,820 (m, 2H), 2,89 - 2,93 (m, 2H), 4,13 - 4,19 (m, 2H), 6,25 (d, J = 1,3 Hz, 1H), 7,23 (d, J=8,1 Hz, 2H), 7,69 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 8,13 (d, J = 6,7 Hz, 1H), 10,55 (s, 1H).

5 Ejemplo 9

Acido N - [4 - {1 - hidroxil - 3 - (4 - hidroxil - 6 - aminopirrolol[2,3 - d] - pirimidin - 3 - il)prop - 2 - il}benzoil]glutámico.

10 Una solución de 0,3 g de dietil N - [4 - {1 - hidroxil - 3 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrolol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)prop - 2 - il} - benzoil]glutamato en 9 ml de hidróxido sódico acuoso 1N se agita bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 72 horas. La reacción se vuelve ligeramente ácida (pH = 4) con ácido clorhídrico 1N y se filtra. El sólido así recogido se lava con agua (5 ml) y etanol frío (5 ml) y se seca, lo que da N - [4 - {1 - hidroxil - 3 - (4 - hidroxil - 6 - aminopirrolol[2,3 - d] - pirimidin - 3 - il)prop
15 - 2 - il}benzoil]glutámico.

De modo análogo, a partir de N - {2 - fluoro - 4 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrolol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il) - etil]ben - zoil} - L - glutamato y dimetil N - {3 - fluoro - 4 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrolol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - L - glutamato se obtiene, respectivamente, de
20 conformidad con el procedimiento precedente, ácido N - {2 - fluoro - 4 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - aminopirrolol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - L - glutámico, punto de fusión 230°C (espumación), >300°C (desc.) y ácido N - {3 - fluoro - 4 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - aminopirrolol[2,3 - d] - pirimidin - 3 - il) - etil]benzoil} - L - glutámico, punto de fusión >300°C. (desc.).

De modo análogo al procedimiento precedente se obtiene, respectivamente, a partir de dietil N - {4 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrolol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]tien - 2 - ilcarbonil} - L - glutamato, dietil N - {5 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrolol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]tien - 3 - ilcarbonil} - L - glutamato y dimetil N - {5 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrolol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il) - etil]tien - 2 - ilcarbonil} - L - glutamato, los compuestos ácido N - {4 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - aminopirrolol - [2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]tien - 2 - ilcarbonil} - L - glutámico,
25
30

ácido N - {5 - [4 - hidroxil - 6 - aminopirrolol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil] - tien - 3 - ilcarbonil} - L - glutámico y ácido N - {5 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - aminopirrolol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]tien - 2 - ilcarbonil} - L - glutámico, punto de fusión 241 - 243°C.

35

De modo análogo se obtiene a partir de dimetil N - [5 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrolol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)pentanoil] - L - glutamato, dimetil N - [7 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilamino - pirrolo - [2,3 - d]pirimidin - 3 - il)heptanoil] - L - glutamato y dimetil N - [6 - (4 - hidroxil - 6 - pivaloilaminopirrolol - [2,3 - d]pirimidin - 3 - il) - hexanoil] - L - glutamato, respectivamente, el ácido N - [5 - (4 - hidroxil - 6 - aminopirrolol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)pentanoil] - L - glutámico, el ácido N - [7 - (4 - hidroxil - 6 - aminopirrolol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)hepta - noil] - L - glutámico y el ácido N - [6 - (4 - hidroxil - 6 - aminopirrolol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)hexanoil] - L - glutámico.
40

Ejemplo 10

45

Acido N - {4 - [2 - (4 - hidroxipirrolol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil] - ben - zoil} - L - glutámico.

Una mezcla de 0,5 g de dimetil N - {4 - [2 - (4 - hidroxil - pirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - L - glutamato en 3 ml de hidróxido sódico 1N se agita a temperatura ambiente durante tres días para formar la sal sódica de ácido N - {4 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - aminopirrolol[2,3 - d] - pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - L - glutámico. Se neutraliza con ácido clorhídrico. El sólido que se forma se recoge mediante filtración y se recristaliza en metanol con la adición de agua para dar 0,35 g (75%) de ácido N - {4 - [2 - (4 - hidroxipirrolol[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - L - glutámico. RMN¹ (d₆ - DMSO) delta 1,88 - 2,12 (m, 2H), 2,33 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 2,97 (m, 4H), 4,33 - 4,40 (m, 1H), 6,70 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 7,28 (d, J=7,0 Hz, 2H), 7,76 (m, 3H), 8,50 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 11,48 (s, 1H), 11,67 (s, 1H), 12,40 (ancho, 1H).
50
55

De modo similar a partir de dimetil N - {4 - [2 - (4 - hidroxil - 5 - pivaloiloxil - 6 - metilpirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - L - glutamato, se obtiene, de conformidad con el procedimiento precedente, primero la sal sódica de ácido N - {4 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - metilpirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoil} - L - glutámico que después de neutralización con ácido acético glacial proporciona ácido N - {4 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - metilpirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il) - etil]benzoil} - L - glutámico.
60

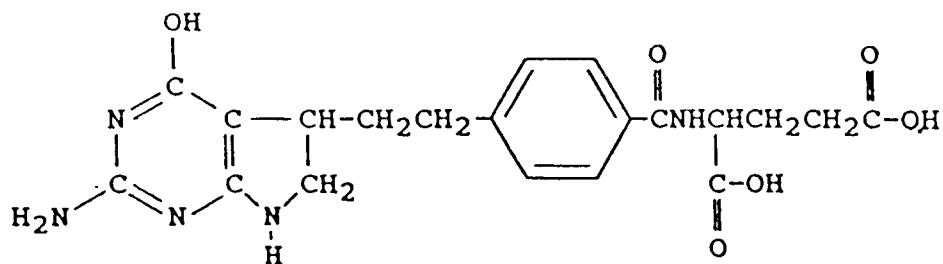
Sometiendo 4 - [2 - (4 - hidroxí - 5 - pivaloiloxi - 6 - metilami - nopirroló[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil] - benzoato de metilo; 3 - [2 - (4 - metilfenil)etil] - 4 - hidroxí - 6 - pivaloilamino - pirroló[2,3 - d]pi - rimidina; 3 - (2 - feniletíl) - 4 - hidroxí - 6 - pivaloilaminopirroló[2,3 - d]pirimidina; 3 - [2 - (4 - clorofenil)etil] - 4 - hidroxí - 6 - pivaloil - aminopirroló[2,3 - d]pirimidina; 3 - [2 - (4 - fluorofenil)etil] - 4 - hidroxí - 6 - pivaloilaminopirroló[2,3 - d]pirimidina; 3 - [2 - (3 - fluoro - fenil)etil] - 4 - hidroxí - 6 - pivaloilaminopirroló[2,3 - d]pirimidina; 3 - [2 - (4 - metoxifenil) - etíl] - 4 - hidroxí - 6 - pivaloilaminopirroló[2,3 - d]pirimidina; y 4 - [2 - (4 - hidroxí - 6 - pivaloilmetilpirroló[2,3 - d]pi - rimidin - 3 - il)etil]benzoato de metilo al procedimiento precedente se obtiene, respectivamente, ácido 4 - [2 - (4 - hidroxí - 6 - metilpirroló[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil] - benzoico; 3 - [2 - (4 - metilfe - nil)etil] - 4 - hidroxí - 6 - aminopirroló[2,3 - d]pirimidina; 3 - (2 - fenil - etíl) - 4 - clorofenil)etil] - 4 - hidroxí - 6 - aminopirroló[2,3 - d] - pirimi - dina; 3 - [2 - (4 - fluorofenil)etil] - 4 - hidroxí - 6 - aminopirroló[2,3 - d]pirimidina; 3 - [2 - (3 - fluorofenil) - etíl] - 4 - hidroxí - 6 - aminopirroló[2,3 - d]pirimidina, punto de fusión 295 - 298°C; 3 - [2 - (4 - metoxifenil)etil] - 4 - hdiroxi - 6 - aminopirroló[2,3 - d]pirimidina, punto de fusión 280 - 294°C; y ácido 4 - [2 - (4 - hidroxí - 6 - ami - nopirroló[2,3 - d]pirimidin - 3 - il) - etíl]benzoico, punto de fusión >300°C.

Ejemplo 11

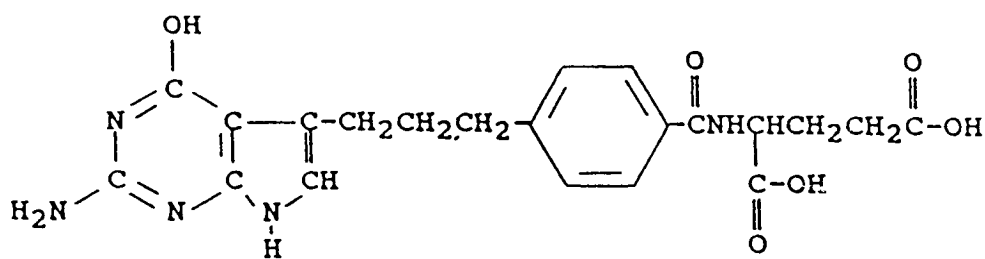
Estudio comparativo de actividad antimetabólica.

Se llevaron a cabo estudios antimetabólicos utilizando los compuestos siguientes:

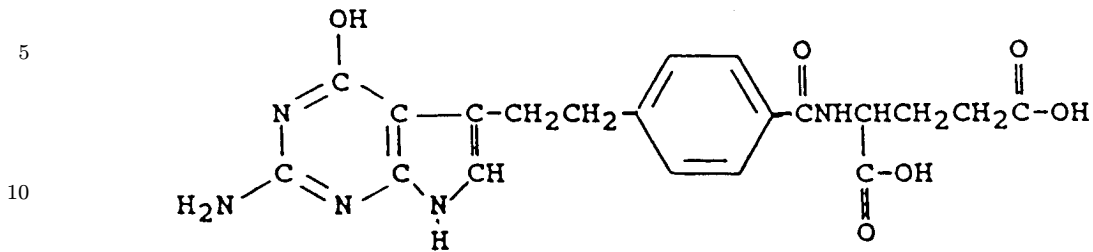
Compuesto A



Compuesto B



Compuesto C



Cada uno de los compuestos se disolvió en sulfóxido de dimetilo al 100%. Se prepararon diluciones de cada compuesto para dar una gama de concentraciones de prueba como se ha indica a continuación.

La actividad inhibitora de los compuestos se probaron siguiendo los procedimientos siguientes:

20 *Preparación de células de stock.*

Se desarrollaron células de leucemia linfoblásticas humanas Cem en medio RPMI 1640 (MABio), suplementado con suero bovino fetal dializado al 10% (Gibco) a 37°C en condiciones atmosféricas humidificadas de aire al 95% y CO₂ al 5%. Las células se desarrollaron en suspensión estatica (Matraz & Corning) mantenido en fase log a una concentración de 3 - 7 x 10⁵ células·ml.

Procedimiento.

- 30 (i) se dispone 10 µl de un compuesto de prueba en un pocillo (grupos de 24 pocillos Costar). Esta etapa se repite para cada concentración de prueba de los compuestos.
- (ii) se adiciona a cada pocillo 500 µl de medio exento de suero.
- 35 (iii) Se dispone en un agitador magnético una botella esteril conteniendo medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal dializado al 10%, hepes 16 mM y tampones mops 8 mM y 3 x 10⁴ células / ml. Se utiliza una bomba peristáltica Wheaton para suministrar 1,5 ml de esta suspensión de células a cada pocillo. El volumen final resultante suministrado a cada pocillo es de 2,0 ml a una concentración celular de 4,8 x 10⁴ células/pocillo.
- 40 (iv) Los pocillos agrupados se incuban a 37°C en un incubador humidificado (aire al 95%, CO₂ al 5%) durante 72 horas.
- (v) Después del período de incubación se toman mediciones de cada pocillo utilizando el contador de partículas ZB1 Coulter Counter y se determina la CI₅₀ (concentración que inhibe el 50% del crecimiento celular).
- 45 (vi) Los resultados de esta prueba fueron como sigue:

TABLA I

50

| Concentración (ug/ml) | Desarrollo celular (%) | | |
|--------------------------|------------------------|------|----|
| | A | B | C |
| 100,0 | 13,1 | - | 14 |
| 33,3 | 15,5 | 10,8 | 12 |
| 11,1 | 16,2 | 9,6 | 12 |
| 3,7 | 15,3 | 10,4 | 13 |

55

60

TABLA I (Cont.)

| Concentración (ug/ml) | Desarrollo celular (%) | | |
|--------------------------|------------------------|------|----|
| | A | B | C |
| 1,23 | 16,1 | 11,3 | 14 |
| 0,411 | 21,5 | 13,0 | 13 |
| 0,137 | 63,9 | 17,7 | 14 |
| 0,045 | 100,0 | 33,5 | 14 |
| 0,015 | - | 76,9 | 25 |
| 0,005 | - | - | 96 |

Cada uno de los compuestos A, B y C exhibió in vitro actividad inhibitora frente a células de leucemia linfobástica humanas. La concentración inhibitora in vitro global relativa (CI₅₀) de estos compuestos es como sigue:

Compuesto A: 0,2 ug/ml
 Compuesto B: 0,03 ug/ml
 Compuesto C: 0,007 ug/ml

Todos los compuestos demostraron actividad inhibitora. El compuesto C, cuando se comparó in vitro, fue el más activo de los tres.

Estudios inversos.

Se determinó el mecanismo de actividad de cada compuesto a través de pruebas posteriores utilizando los estudios llamados de "inversión". Estos estudios suministraron compuestos o precursores que, solos o juntos, identificaron el punto específico de inhibición enzimática.

- (a) *Hipoxantina* - La hipoxantina invertirá los efectos inhibitoros de un compuesto si el compuesto funciona como un inhibidor de purina de novo síntesis. La disponibilidad de hipoxantina permite así que las células soslayen purina de novo síntesis.
- (b) *Timidina* - La timidina sola invertirá los efectos inhibitoros de un compuesto si el compuesto funciona como un inhibidor específico de timidilato sintetasa.
- (c) *Hipoxantina y timidina* - Si se determina un compuesto en (a) como no inhibidor de purina de novo síntesis, y en (b) como no inhibidor de timidilato sintetasa, un estudio de inversión utilizando hipoxantina y timidina, en combinación, determinará si el compuesto puede producir inhibición de ambas trayectorias. Así pues, si esta combinación invierte los efectos inhibitoros de un compuesto, el compuesto muy probablemente funcionará como un inhibidor de dihidrofolato reductasa (implicado en la biosíntesis de purina y pirimidina).

Procedimiento.

En cada caso se siguió el procedimiento básico antes reseñado, modificado en que se adicionó a los pocillos de prueba 250 μ l del compuesto de inversión [o de cada compuesto de inversión en (b)] y se disminuyó la cantidad de medio sin suero adicionado a cada pocillo [o se eliminó por completo en (b)] en la misma cantidad. Los compuestos de inversión se prepararon como soluciones de stock 8X en solución salina tamponada de fosfato (esteril filtrada a través de un filtro acrodisco de 0,2 μ - Gelman) de modo que 250 μ l de la solución de stock diera una concentración final de 100 μ M de hipoxantina y/o 5 μ M de timidina.

Los resultados de las pruebas de inversión son los siguientes:

ES 2 084 639 T3

(a) *Hipoxantina* (100 μ M).

TABLA II

| | Concentración | Desarrollo celular (%) | | | | |
|----|---------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------|--------|
| | (μ g/ml) | Compuesto + A* Hipoxantina | Compuesto + B* Hipoxantina | Compuesto + C* Hipoxantina | | |
| 5 | | | | | | |
| 10 | 100.0 | 13.1 | 15.3 | - | - | 14 13 |
| | 33.3 | 15.5 | 16.7 | 10.8 | 16.2 | 12 14 |
| 15 | 11.1 | 16.2 | 17.6 | 9.6 | 15.9 | 12 13 |
| | 3.7 | 15.3 | 16.4 | 10.4 | 14.4 | 13 13 |
| | 1.23 | 16.1 | 15.5 | 11.3 | 15.6 | 14 13 |
| | 0.411 | 21.5 | 19.0 | 13.0 | 20.4 | 13 12 |
| 20 | 0.137 | 63.9 | 73.8 | 17.7 | 43.2 | 14 15 |
| | 0.045 | 100.0 | 100.0 | 33.5 | 83.9 | 14 12 |
| | 0.015 | - | - | 76.9 | 99.5 | 25 24 |
| | 0.005 | - | - | - | - | 96 100 |

25 *Datos reproducidos a partir de la Tabla I

(b) *Hipoxantina* (100 μ M) y *timidina* (5 μ M).

30 El compuesto B se probó adicionalmente para determinar el sitio secundario de actividad inhibidora.

TABLA III

| | Concentración | Desarrollo celular (%) | |
|----|---------------|------------------------|--------------------------|
| | (μ g/ml) | Control B | + hipoxantina y timidina |
| 35 | | | |
| 40 | 33,3 | 10,8 | 69,9 |
| | 11,1 | 9,6 | 74,7 |
| | 3,7 | 10,4 | 79,4 |
| | 1,23 | 11,3 | 89,4 |
| | 0,411 | 13,0 | 92,7 |
| 45 | 0,137 | 17,7 | 92,7 |
| | 0,045 | 33,5 | 92,8 |

50 * Datos reproducidos a partir de la Tabla I.

55

60

60

(c) *timidina* (5 μ M).

TABLA IV

| Concentración (μ g/ml) | Desarrollo celular (%) | | | | | |
|--------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|
| | Compuesto A* | Compuesto + Timidina | Compuesto + B* | Compuesto + Timidina | Compuesto + C* | Compuesto + Timidina |
| 100.0 | 13.1 | 48.8 | - | - | 14 | 44 |
| 33.3 | 15.5 | 49.4 | 10.8 | 11.6 | 12 | 57 |
| 11.1 | 16.2 | 49.4 | 9.6 | 11.6 | 12 | 52 |
| 3.7 | 15.3 | 52.6 | 10.4 | 12.1 | 13 | 56 |
| 1.23 | 16.1 | 62.1 | 11.3 | 12.3 | 14 | 58 |
| 0.411 | 21.5 | 73.9 | 13.0 | 14.9 | 13 | 55 |
| 0.137 | 63.9 | 98.1 | 17.7 | 18.8 | 14 | 64 |
| 0.045 | 100.0 | 100.0 | 33.5 | 32.5 | 14 | 81 |
| 0.015 | - | - | 76.9 | 81.1 | 25 | 100 |
| 0.005 | - | - | - | - | 96 | 100 |

* Datos reproducidos de la Tabla I

Análisis de actividad In Vivo.

Se probaron adicionalmente los compuestos A y C para comparar su actividad antitumoral in vivo.

Se inocularon con células tumorales ratones hembras, raza DBA/2. El tratamiento con los compuestos de prueba empezaron al día siguiente de la inoculación. El tratamiento consistió en ocho dosis diarias i.p. (intraperitoneales) de los compuestos A y C durante ocho días consecutivos. Se midió el tamaño del tumor al día siguiente del último día del tratamiento para determinar el efecto inhibitor de los compuestos de prueba sobre el desarrollo de tumores.

Los resultados fueron los siguientes:

TABLA V

| Compuesto A Dosis (mg/kg) | Número de animales | Peso del tumor (mg) ¹ | % de inhibición |
|---------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|--------------------|
| 0 (Control)* | 8 | 2050 \pm 774 | - |
| 0 (Control)* | 8 | 2753 \pm 790 | - |
| 200 | 8 | 2525 \pm 694 | 0 |
| 100 | 8 | 3447 \pm 747 | 0 |
| 50 | 8 | 1935 \pm 498 | 19 |
| 25 | 8 | 2121 \pm 410 | 12 |
| 12.5 | 8 | 3360 \pm 703 | 0 |
| 6.25 | 8 | 2719 \pm 413 | 0 |
| 3.125 | 8 | 2825 \pm 822 | 0 |

* Peso tumoral medio (mg) para todos los grupos de control sobre los datos de evaluación = 2402 839.

1. Desviación corriente media \pm .

TABLA VI

| | Compuesto C Dosis (mg/kg) | Número de animales | Peso del tumor (mg) ¹ | % de inhibición |
|----|---------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|--------------------|
| 5 | | | | |
| 10 | <u>Prueba 1</u> | | | |
| | 0.0 (Control) | 6 | 3606±2099 | 0 |
| | 0.0 (Control) | 6 | 5533±1234 | 0 |
| | 200.00 | 7 | 0±0 | 100 |
| | 100.00 | 7 | 0±0 | 100 |
| 15 | 50.00 | 6 | 0±0 | 100 |
| | 25.00 | 7 | 0±0 | 100 |
| | 12.50 | 7 | 102±166 | 98 |
| 20 | <u>Prueba 2</u> | | | |
| | 0 (Control)* | 9 | 6776±1328 | - |
| | 0 (Control)* | 10 | 5533±2645 | - |
| | 40 | 10 | 0±0 | 100 |
| 25 | 20 | 10 | 18±57 | 100 |
| | 10 | 10 | 196±152 | 97 |
| | 5 | 10 | 1034±657 | 83 |
| | 2.5 | 10 | 2908±1948 | 53 |
| | 1.25 | 10 | 6682±2300 | 0 |
| 30 | 0.6256 | 10 | 7381±2397 | 0 |

* Peso del tumor (mg) para todos los grupos de control en esta fecha =
6155 ± 2134.

1 - Desviación corriente media ±.

El compuesto A no tuvo esencialmente efecto inhibitor sobre el desarrollo del tumor in vivo. Si bien el peso del tumor observado fue ligeramente inferior a dosis de 25 a 50 mg/kg, esto no se considera
40 significativo puesto que no existió reducción en el peso del tumor a dosis de 100 o 200 mg/kg.

El compuesto C exhibe un marcado efecto inhibitor in vivo sobre el crecimiento del tumor, con una
inhibición del 100% a dosis tan bajas como 20 mg/kg, y mas del 50% de inhibición con dosis de por lo
45 menos 2,5 mg/kg.

El compuesto B actúa mediante un mecanismo diferente que los compuestos A o C, o sea inhibe
DHFR en lugar de TS. Mientras que in vitro, los compuestos A y C parecen inhibir TS; el compuesto C
es mas activo in vitro que el compuesto A según un factor de por lo menos 25 veces. El compuesto A
in vivo es inactivo como agente antineoplástico. El compuesto C es altamente activo in vivo en combatir
50 neoplasmas.

A continuación se exponen valores de inhibición representativos frente a cultivos de células CCRF -
CEM para compuestos típicos:

55

60

ES 2 084 639 T3

| Compuesto | CI ₅₀ (μ/ml) |
|-----------|---|
| 5 | Acido 4 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - amino - pirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil]benzoico >20,00 |
| | Acido N - {4 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - amino - pirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il) - etil]benzoil} - L - glutámico 0,004 |
| | 3 - [2 - (4 - metoxifenil)etil] - 4 - hidroxil - 6 - aminopirrolo - [2,3 - d]pirimidina >20,00 |
| 10 | Acido N - {2 - fluoro - 4 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - aminopirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il) - etil]benzoil} - L - glutámico 0,008 |
| | Acido N - {3 - fluoro - 4 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - aminopirrolo[2,3 - d] pirimidin - 3 - il) - etil]benzoil} - L - glutámico 0,019 |
| 15 | 3 - [2 - (3 - fluorofenil)etil] - 4 - hidroxil - 6 - aminopirrolo - [2,3 - d]pirimidina >20,00 |
| | Acido N - {5 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - amino - pirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il)etil] - tien - 2 - ilcarbonil} - L - glutámico 0,025 |
| 20 | Acido N - {4 - [2 - (4 - hidroxil - 6 - metil - pirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il) - etil]benzoil} - L - glutámico 0,0084 |
| | Acido N - {4 - [2 - (4 - hidroxipirrolo[2,3 - d]pirimidin - 3 - il) - etil]benzoil} - L - glutámico 1,20 |

La citotoxicidad de estos compuestos no se invierte con la adición de hipoxantina o AICA, sugiriendo que no inhiben la trayectoria de biosíntesis purina de novo, pero que se invierte mediante timidina, indicando que la timidilato sintetasa es el objetivo principal. La citotoxicidad se invierte también con la adición de leucovorin, indicando que la citotoxicidad se debe al antagonismo de un mecanismo relacionado con folato.

30

35

40

45

50

55

60

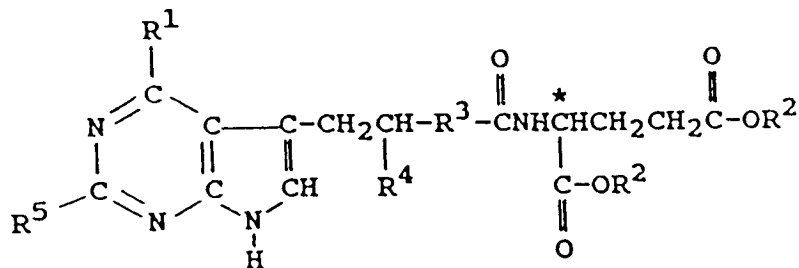
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de compuestos de la fórmula

5

10

15



en donde:

20 R¹ es - OH o - NH₂;

R² es hidrógeno o un catión farmacéuticamente aceptable;

25 R³ es 1,4 - fenileno o 1,3 - fenileno insustituido o sustituido por cloro, fluoro, metilo, metoxilo, o trifluorometilo; tienedilo insustituido o sustituido por cloro, fluoro, metilo, metoxilo, o trifluorometilo; ciclohexandiilo; o un grupo alifático divalente lineal o ramificado con 2 a 4 átomos de carbono;

R⁴ es hidrógeno;

30 R⁵ es hidrógeno, alquilo con 1 a 6 átomos de carbono, o amino;

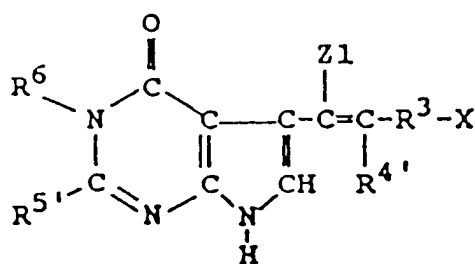
y la configuración sobre el átomo de carbono designado * es S;

que comprende hidrogenar catalíticamente un compuesto de la fórmula

35

40

45



en donde

50

X es COOR²; o $\text{CONHCH}(\text{COOR}^{2'})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOR}^{2'}$;

55 Z¹ es hidrógeno, o Z¹ tomado junto con R^{4'} es un enlace carbono - carbono;

R^{2'} es hidrógeno o un grupo protector carboxi;

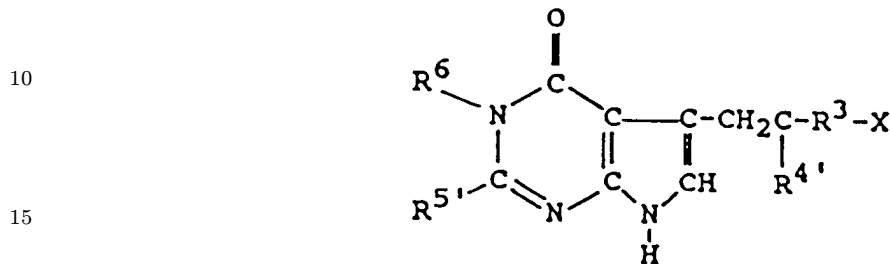
60 R³ es como se ha definido antes;

R^{4'}, cuando se toma independientemente de Z¹, es hidrógeno;

R^{5'} es hidrógeno, alquilo con 1 a 6 átomos de carbono, amino, o un grupo protector amínico; y

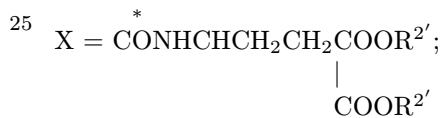
R⁶ es hidrógeno o alcanoiloxilo;

5 para producir un compuesto de la fórmula



20 en donde X, R^{2'}, R³, R^{4'}, R^{5'} y R⁶ tienen el significado antes indicado;

y cuando X = COOR^{2'}, acoplamiento con un ácido glutámico protegido para formar un compuesto en donde



30 y separando cualquier grupo protector.

2. El procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, para la preparación de ácido N - [4 - [2 - (4 - hidroxí - 6 - aminopirroló[2, 3 - d]pirimidín - 3 - il)etil]benzoil} - L - glutámico y sus sales farmacéuticamente aceptables.

35

40

45

50

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

55

60

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.
