

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 223**

51 Int. Cl.:
C07D 209/22 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08001265 .1**
96 Fecha de presentación: **31.03.1995**
97 Número de publicación de la solicitud: **1950200**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

54 Título: **Éster metílico de ácido [[3-(2-amino-1,2-dioxoetil)-2-etil-1-(fenilmetil)-11H-indol-4-IL]oxi]acético como inhibidor de sPLA2**

30 Prioridad:
01.04.1994 US 221916

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.03.2012

73 Titular/es:
**ELI LILLY AND COMPANY
LILLY CORPORATE CENTER
INDIANAPOLIS IN 46285, US**

72 Inventor/es:
**Bach, Nicholas James;
Draheim, Susan Elizabeth y
Dillard, Robert Delane**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 377 223 T3

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 (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Éster metílico de ácido [[3-(2-amino-1,2-dioxoetil)-2-etil-1-(fenilmetil)-11H-indol-4-il]oxi]acético como inhibidor de sPLA₂

5 Esta invención se refiere a una 1H-indol-3-glioxilamida novedosa útil para la inhibición de la liberación mediada por ácidos grasos de sPLA₂ para afecciones tales como el choque séptico.

10 La estructura y las propiedades físicas de la fosfolipasa secretora no pancreática humana A₂ (referida más adelante, "sPLA₂") han sido descritas a fondo en dos artículos, a saber, "Cloning and Recombinant Expression of Phospholipase A2 Present in Rheumatoid Arthritic Synovial Fluid" de Seilhamer, Jeffrey J.; Pruzanski, Waldemar; Vadas Peter; Plant, Shelley; Miller, Judy A.; Klors, Jean; y Johnson, Lorin K.; The Journal of Biological Chemistry, Vol. 264, Núm. 10, Expedido el 5 de Abril, págs. 5335-5338, 1989; y Structure and Properties of a Human Non-pancreatic Phospholipase A2" de Kramer, Ruth M.; Hession, Katherine; Johansen, Hermit; Hayes, Gretchen; McGray, Paula; Chow, E. Pingchang; Tizard, Richard; y Pepinsky, R. Blake; The Journal of Biological Chemistry, Vol. 264, Núm. 10, Expedido el 5 de Abril, págs. 5768-5775, 1989; cuyas descripciones se incorporan a la presente memoria como referencia.

15 Se cree que la sPLA₂ es una enzima limitante de la velocidad en la cascada del ácido araquidónico que hidroliza los fosfolípidos de la membrana. De este modo, es importante desarrollar compuestos que inhiban la liberación de ácidos grasos (p. ej., el ácido araquidónico) mediada por sPLA₂. Tales compuestos serían valiosos en el tratamiento general de afecciones inducidas y/o mantenidas por la producción en exceso de sPLA₂; tales como el choque séptico, el síndrome de dificultad respiratoria del adulto, la pancreatitis, los traumatismos, el asma bronquial, la rinitis alérgica, la artritis reumatoide, etc.

20 El artículo, "Recherches en serie indolique. VI sur tryptamines substituees", de Marc Julia, Jean Igolen y Hanne Igolen, Bull. Soc. Chim. France, 1962, págs. 1060-1068, describe ciertas indol-3-glioxilamidas y su conversión en derivados de triptamina.

25 El artículo, "12-Aril-3-Indoleglioxilamides (FGIN-1): A New Class of Potent and Specific Ligands for the Mitochondrial DBI Receptor (MDR)" de E. Romeo, et al., The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol. 262, Núm. 3, (págs. 971-978) describe ciertas 2-aril-3-indoleglioxilamidas que tienen aplicaciones para la investigación en sistemas nerviosos centrales de mamíferos.

30 El resumen, "Fragmentation of N-benzyl indols in Mass Spectrometry"; Chemical Abstracts, Vol. 67, 1917, 73028h, informa sobre varios fenoles sustituidos con bencilo incluyendo aquellos que tienen grupos glioxilamida en la posición 3 del núcleo de los indoles.

La Patente Europea 490263 describe derivados oxoacetamida de indoles que tienen actividad receptora de serotonina.

35 La Patente de los Estados Unidos Núm. 3.449.363 describe trifluorometilindoles que tienen grupos glioxilamida en la posición 3 del núcleo del indol. Se ha establecido que estos compuestos son analgésicos al suscitar antagonismo del "síndrome de torsión" por fenil-p-quinona.

La Patente de los Estados Unidos Núm. 3.351.630 describe compuestos de ácido 3-indolilacético sustituido en alfa y su preparación incluyendo los intermedios de glioxilamida.

40 La Patente de los Estados Unidos Núm. 2.825.734 describe la preparación de 3-(2-amino-1-hidroxietil) indoles utilizando intermedios de 3-indoleglioxilamida tales como 1-fenil-2-etil-6-carboxi-N-propil-3-indoleglioxilamida (véase el Ejemplo 30).

La Patente de los Estados Unidos Núm. 4.397.850 prepara isoxazolil-indolaminas utilizando glioxilamidoindoles como intermedios.

La Patente de los Estados Unidos Núm. 3.801.594 describe analgésicos preparados utilizando intermedios de 3-indol glioxilamida.

45 El artículo, "Núm. 565. - Inhibiteurs d'enzymes. XII. - Preparation de (propargy-amino-2 ethyl)-3 indoles" de A. Alemanhy, E. Fernandez Alvarez. O. Nieto Lopey y M. E. Rubio Herraes; Bulletin De La Societe Chimique De France, 1974, Núm. 12, págs. 2883-2888 describe varias indolil-3-glioxamidas que están sustituidas con hidrógeno en el anillo de 6 miembros del núcleo de indol.

50 El artículo "Indol-Umlagerung von 1-Diphenylamino-2,3-dihydro-2,3-pyrroldionen" de Gert Kollenz y Christa Labes; Liebigs Ann. Chem., 1975, págs. 1979-1983 describe 3-glioxilamidas sustituidas con fenilo.

Es deseable desarrollar nuevos compuestos y tratamientos para las enfermedades inducidas por sPLA₂.

Esta invención representa un uso novedoso de una 1H-indol-3-glioxilamida para inhibir la liberación mediada por ácidos grasos de sPLA₂ en mamíferos.

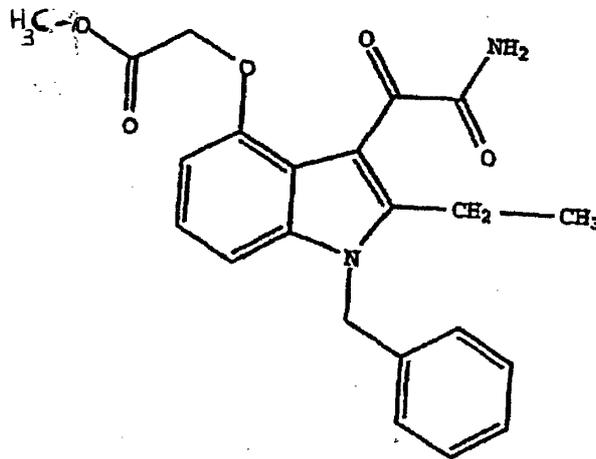
Esta invención también representa una 1H-indol-3-glioxilamida que tiene una efectividad potente y selectiva como inhibidor de la sPLA₂ de mamífero.

5 Esta invención también representa una composición farmacéutica que contiene la 1H-indol-3-glioxilamida de la invención.

10 Esta invención también representa un método para prevenir y tratar el choque séptico, el síndrome de dificultad respiratoria del adulto, la pancreatitis, los traumatismos, el asma bronquial, la rinitis alérgica, la artritis reumatoide, y las enfermedades relacionadas en mamíferos por medio del contacto con una cantidad terapéuticamente eficaz de la 1H-indol-3-glioxilamida de la invención.

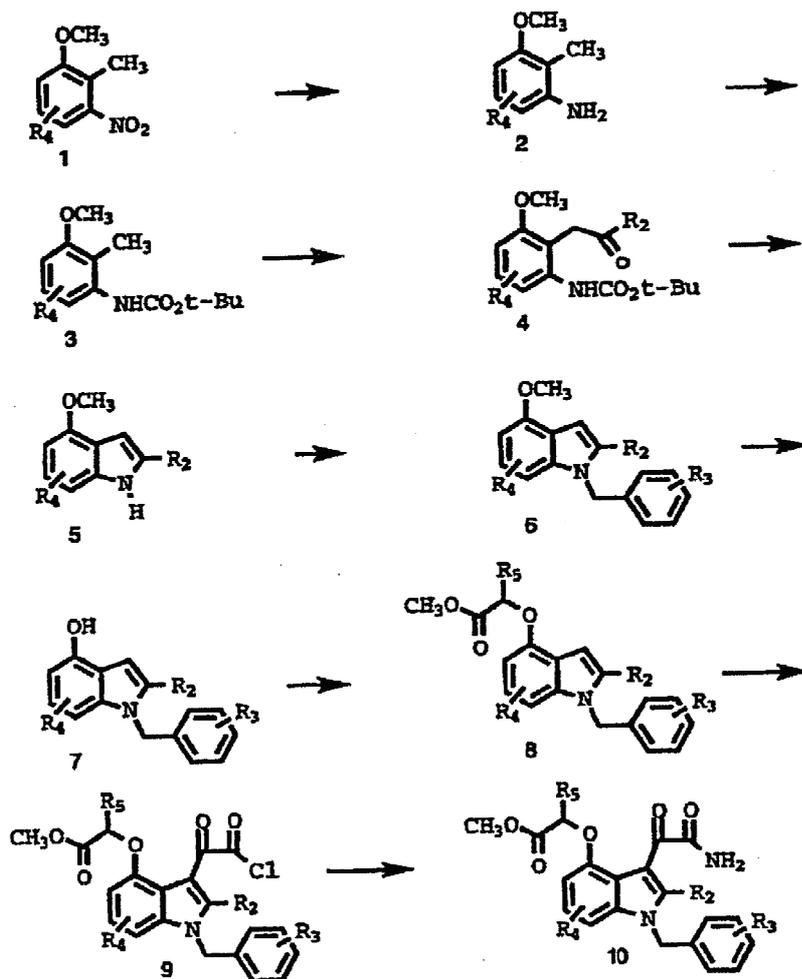
Definiciones:

La 1H-indol-3-glioxilamida de la invención tiene la siguiente fórmula:



15 La síntesis de la 1H-indol-3-glioxilamida de la invención se puede completar mediante métodos bien conocidos registrados en las publicaciones químicas. Aquellos procedimientos útiles para las síntesis del compuesto de la invención se ilustran en la presente memoria y se esbozan en el siguiente esquema de reacción 1.

Esquema 1



Para obtener las glioxilamidas sustituidas en la posición 4 con una función ácida a través de un átomo de oxígeno, se utilizan las reacciones esbozadas en el esquema 1 (para las conversiones 1 a 5, véase la ref. Robin D. Clark, Joseph M. Muchowski, Lawrence E. Fisher, Lee A. Flippin, David B. Repke, Michel Souchet, *Synthesis*, 1991., 871-878. El orto-nitrotolueno, 1, es fácilmente reducido a la 2-metilaniлина, 2, utilizando Pd/C como catalizador. La reducción se puede llevar a cabo en metanol o tetrahidrofurano (THF) o en una combinación de ambos, utilizando una baja presión de hidrógeno. La anilina, 2, al calentarse con dicarbonato de di-t-butilo en THF a temperatura de reflujo se convierte en el derivado de N-t-butilcarbonilo, 3, con un buen rendimiento. La sal de dilitio del dianión de 3 se genera de -40 a -20°C en THF utilizando sec-butil-litio y se hace reaccionar con la N-metoxi-N-metilalcanamida apropiadamente sustituida. Este producto, 4, se puede purificar mediante cristalización en hexano, o, se hace reaccionar directamente con ácido trifluoroacético en cloruro de metileno para producir el indol no sustituido en las posiciones 1,3 5. El indol no sustituido en las posiciones 1,3 5 se hace reaccionar con hidruro de sodio en dimetilformamida a la temperatura ambiente (20-25°C) durante 0,5-1,0 horas. La sal de sodio resultante de 5 se trata con un equivalente de haluro de arilmetilo y la mezcla se agita a un intervalo de temperatura de 0-100°C, normalmente a la temperatura ambiente, durante un período de 4 a 36 horas para producir el 1-arilmetilindol, 6. El O de este indol, 6, se desmetila mediante agitación con tribromuro de boro en cloruro de metileno durante aproximadamente 5 horas (véase la ref. Tsung-Ying Shem y Charles A Winter, *Adv. Drug Res.*, 1977, 12, 176, cuya descripción se incorpora a la presente memoria como referencia). El 4-hidroxiindol, 7, es alquilado con un éster de ácido alfa-bromoalcanoico en dimetilformamida (DMF) utilizando hidruro de sodio como base, con condiciones de reacción similares a las descritas para la conversión de 5 en 6. El éster de ácido α -[(indol-4-il)oxi]alcanoico, 8, se hace reaccionar con cloruro de oxalilo en cloruro de metileno para producir 9, que no está purificado pero que reacciona directamente con amoníaco para producir la glioxamida 10.

Se cree que la 1H-indol-3-glioxilamida descrita en la presente memoria logra su acción terapéutica beneficiosa principalmente mediante inhibición directa de sBLA₂ de mamífero (incluyendo ser humano) y no mediante su acción como antagonista para el ácido araquidónico, ni otros agentes activos por debajo del ácido araquidónico en la cascada del ácido araquidónico, tales como 5-lipooxigenasas, ciclooxigenasas, etc.

El método de la invención para la inhibición de la liberación de ácidos grasos mediada por sPLA₂ comprende poner en contacto la sPLA de mamífero con una cantidad terapéuticamente eficaz de la 1H-indol-3-glioxilamida.

5 Un método preferido de la invención comprende poner en contacto sPLA₂ con una cantidad terapéuticamente eficaz de 1H-indol-3-glioxilamida representada por el compuesto (I). Otro aspecto de esta invención es el uso del compuesto I para tratar el choque séptico, el síndrome de dificultad respiratoria del adulto, la pancreatitis, los traumatismos, el asma bronquial, la rinitis alérgica, la artritis reumatoide, y las enfermedades relacionadas que comprende administrar a un mamífero (incluyendo un ser humano) una dosis terapéuticamente eficaz de la 1H-indol-3-glioxilamida de la invención (véase, compuesto I). Como se ha observado previamente el compuesto de esta invención es útil para la inhibición de la liberación de ácidos grasos mediada por sPLA₂ tal como el ácido araquidónico. Por el término, "inhibir" se quiere significar la prevención o la reducción terapéuticamente significativa en la liberación de ácidos grasos iniciada por sPLA₂ por parte del compuesto de la invención. Por "farmacéuticamente aceptable" se quiere significar que el portador, diluyente o excipiente debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el receptor de la misma.

15 La dosis específica de un compuesto administrado de acuerdo con esta invención para obtener efectos terapéuticos o profilácticos estará determinada, por supuesto, por las circunstancias concretas que rodeen el caso, incluyendo, por ejemplo, el compuesto administrado, la ruta de administración y la afección que se esté tratando. Las dosis diarias típicas contendrán un nivel de dosificación no tóxico de alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg de peso corporal de un compuesto activo de esta invención.

20 Preferiblemente la formulación farmacéutica está en una forma de dosificación unitaria. La forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula o un comprimido tal cual, o el número apropiado de cualquiera de estos. La cantidad de ingrediente activo en una dosis unitaria de composición se puede variar o ajustar desde alrededor de 0,1 a alrededor de 1000 miligramos o más de acuerdo con el tratamiento concreto implicado. Se puede apreciar que puede ser necesario realizar variaciones rutinarias de la dosificación dependiendo de la edad y la afección del paciente. La dosificación también dependerá de la ruta de administración.

25 El compuesto se puede administrar mediante una variedad de rutas incluyendo oral, en aerosol, rectal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, e intranasal.

Las formulaciones farmacéuticas de la invención se preparan combinando (p. ej., mezclando) una cantidad terapéuticamente eficaz de la 1H-indol-3-glioxilamida de la invención junto con un portador o diluyente para el mismo farmacéuticamente aceptable. Las presentes formulaciones farmacéuticas se preparan mediante procedimientos bien conocidos e ingredientes fácilmente asequibles.

30 Al elaborar las composiciones de la presente invención, el ingrediente activo se mezclará normalmente con un portador, o se diluirá por medio de un portador, o se incluirá en un portador que puede estar en forma de una cápsula, un sobrecito, un papel u otro contenedor. Cuando el portador sirve como diluyente, éste puede ser un material sólido, semi-sólido o líquido que actúa como un vehículo, o puede estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, grageas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (en forma de un sólido o en un medio líquido), o pomadas, que contienen, por ejemplo, hasta un 10% en peso del compuesto activo. Los compuestos de la presente invención se formulan preferiblemente antes de su administración.

35 Para las formulaciones farmacéuticas se puede utilizar cualquier portador adecuado conocido en la técnica. En dicha formulación, el portador puede ser un sólido, un líquido, o una mezcla de un sólido y un líquido. Por ejemplo, para la inyección intravenosa se pueden disolver los compuestos de la invención a una concentración de 2 mg/ml en una solución acuosa de dextrosa al 4%/citrato de Na al 0,5%. Las formulaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos y cápsulas. Los portadores sólidos pueden ser una o más sustancias que también pueden actuar como agentes aromatizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes suspensores, aglutinantes, agentes disgregantes de comprimidos y material encapsulante.

45 Los comprimidos para la administración oral pueden contener excipientes adecuados tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio, junto con agentes disgregantes, tales como, almidón, o ácido algínico, y/o agentes aglutinantes, por ejemplo, gelatina o acacia, y agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, o talco.

50 En los polvos el portador es un sólido finamente dividido que se mezcla con el ingrediente activo finamente dividido. En los comprimidos el ingrediente activo se mezcla con un portador que tiene las propiedades de unión necesarias en las proporciones adecuadas y se compacta en la forma y el tamaño deseados. Los polvos y comprimidos contienen preferiblemente de alrededor de 1 a alrededor de 99 por ciento en peso del ingrediente activo que es el compuesto novedoso de esta invención. Los portadores sólidos adecuados son carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, galactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metil celulosa, sal de sodio de carboximetil celulosa, ceras de bajo punto de fusión, y manteca de cacao.

55 Las formulaciones en forma líquida estéril incluyen suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires.

5 El ingrediente activo se puede disolver o suspender en un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril, disolvente orgánico estéril o una mezcla de ambos. El ingrediente activo se puede disolver a menudo en un disolvente orgánico adecuado, por ejemplo propilenglicol acuoso. Otras composiciones se pueden elaborar dispersando el ingrediente activo finamente dividido en almidón acuoso o en una solución de sal de sodio de carboximetilcelulosa o en un aceite adecuado.

Las siguientes formulaciones farmacéuticas 1 a 8 son solamente ilustrativas y no se pretende que limiten el alcance de la invención en modo alguno. "Ingrediente activo", hace referencia a un compuesto de acuerdo con la Formula (I) o a una sal, solvato, o profármaco del mismo farmacéuticamente aceptable.

Formulación 1

10 Se preparan cápsulas de gelatina dura utilizando los siguientes ingredientes:

| | Cantidad (mg/cápsula) |
|-----------------------|-----------------------|
| Ingrediente activo | 250 |
| Almidón, seco | 200 |
| Estearato de magnesio | <u>10</u> |
| Total | 460 mg |

Formulación 2

Se prepara un comprimido utilizando los ingredientes de más abajo:

| | Cantidad (mg/comprimido) |
|-----------------------------|--------------------------|
| Ingrediente activo | 250 |
| Celulosa, microcristalina | 400 |
| Dióxido de silicio, ahumado | 10 |
| Ácido esteárico | <u>5</u> |
| Total | 665 mg |

Los componentes se combinan y se comprimen para formar comprimidos que pesan cada uno 665 mg

Formulación 3

15 Se prepara una solución para aerosol que contiene los siguientes componentes:

| | Peso |
|-------------------------------------|--------------|
| Ingrediente activo | 0,25 |
| Etanol | 25,75 |
| Propelente 22 (Clorodifluorometano) | <u>74,00</u> |
| Total | 100,00 |

El Compuesto activo se mezcla con etanol y la mezcla se añade a una porción de propelente 22, se enfría a -30°C y se transfiere a un dispositivo de llenado. Después se introduce la cantidad requerida en un recipiente de acero inoxidable y se diluye con el resto del propelente. Después se equipa el recipiente con las unidades de válvula.

Formulación 4

5 Se elaboran como sigue comprimidos, que contienen cada uno 60 mg de ingrediente activo:

| | |
|--|-------------|
| Ingrediente activo | 60 mg |
| Almidón | 45 mg |
| Celulosa microcristalina | 35 mg |
| Polivinilpirrolidona (en forma de una solución en agua al 10%) | 4 mg |
| Sal de sodio de carboximetil-almidón | 4,5 mg |
| Estearato de magnesio | 0,5 mg |
| Talco | <u>1 mg</u> |
| Total | 150 mg |

10 El ingrediente activo, el almidón y la celulosa se hacen pasar a través de un tamiz U.S. con malla Núm. 45 y se mezcla cuidadosamente. La solución acuosa que contiene polivinilpirrolidona se mezcla con el polvo resultante, y después se hace pasar la mezcla a través de un tamiz U.S. con malla Núm. 14. Los gránulos producidos de ese modo se secan a 50°C y se hacen pasar a través de un tamiz U.S. con malla Núm. 18. La sal de sodio de carboximetil-almidón, el estearato de magnesio y el talco, previamente pasados a través de un tamiz U.S. con malla Núm. 60, se añaden después a los gránulos que, después de mezclarlos, se comprimen en una máquina para comprimidos para dar comprimidos que pesan cada uno 150 mg.

Formulación 5

Se elaboran como sigue cápsulas, que contienen cada una 80 mg de ingrediente activo:

| | |
|--------------------------|-------------|
| Ingrediente activo | 80 mg |
| Almidón | 59 mg |
| Celulosa microcristalina | 59 mg |
| Estearato de magnesio | <u>2 mg</u> |
| Total | 200 mg |

15 El ingrediente activo, la celulosa, el almidón, y el estearato de magnesio se combinan, se hacen pasar a través de un tamiz U.S. con malla Núm. 45, y se cargan en cápsulas de gelatina duras en cantidades de 200 mg.

Formulación 6

Se elaboran como sigue supositorios, que contienen cada uno 225 mg de ingrediente activo:

| | |
|---------------------------------------|-----------------|
| Ingrediente activo | 225 mg |
| Glicéridos de ácidos grasos saturados | <u>2.000 mg</u> |
| Total | 2.225 mg |

El ingrediente activo se hace pasar a través de un tamiz U.S. con malla Núm. 60 y se suspende en los glicéridos de ácidos grasos saturados previamente fundidos utilizando el mínimo calor necesario. La mezcla se vierte después en un molde para supositorios de una capacidad nominal de 2 g y se permite que se enfríe.

Formulación 7

- 5 Se elabora una suspensión, que contiene cada una 50 mg de ingrediente activo por dosis de 5 ml:

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Ingrediente activo | 50 mg |
| Sal de sodio de carboximetilcelulosa | 50 mg |
| Jarabe | 1,25 ml |
| Solución de ácido benzoico | 0,10 ml |
| Aroma | q.v. |
| Colorante | q.v. |
| Agua purificada hasta el total | 5 ml |

Se hace pasar el ingrediente activo a través de un tamiz U.S. con malla Núm. 45 y se mezcla con la sal de sodio de carboximetil-celulosa y el jarabe para formar una pasta suave. Se diluyen la solución de ácido benzoico, el aroma y el colorante con una porción de agua y se añaden, con agitación. Después se añade agua suficiente para producir el volumen requerido.

10 **Formulación 8**

Se puede preparar una formulación intravenosa como sigue:

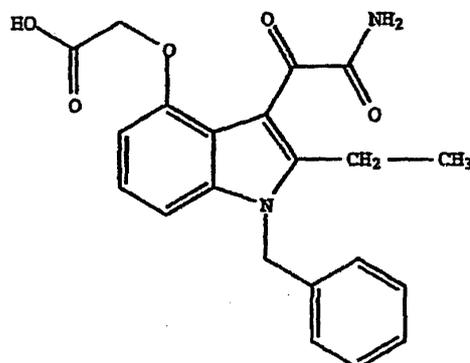
| | |
|---------------------------|----------|
| Ingrediente activo | 100 mg |
| Solución salina isotónica | 1.000 ml |

La solución de los ingredientes anteriores se administra intravenosamente a un sujeto a una velocidad de 1 ml por minuto.

- 15 Todos los productos del Ejemplo descrito más abajo así como los intermedios utilizados en los siguientes procedimientos mostraron espectros de RMN e IR satisfactorios. También tuvieron valores del espectro de masas correctos.

Ejemplo Comparativo 1

Preparación de Ácido [[3-(2-amino-1,2-dioxoetil)-2-etil-1-(fenilmetil)-1H-indol-4-il]oxi]acético, un compuesto representado por la fórmula:



Parte A. Preparación de 2-Etil-4-metoxi-1H-indol.

Una solución de 140 mL (0,18 moles) de sec-butil litio en ciclohexano 1,3 M se añadió lentamente a N-t-butoxicarbonil-3-metoxi-2-metilanilina (21,3 g, 0,09 mol) en 250 mL de THF manteniendo la temperatura por debajo de -40°C con un baño de hielo seco-etanol. El baño se separó y se dejó que la temperatura alcanzara los 0°C y después se volvió a colocar el baño. Una vez que la temperatura se hubo enfriado a -60°C, se añadieron gota a gota 18,5 g (0,18 moles) de N-metoxi-N-metilpropanamida en un volumen igual de THF. La mezcla de reacción se agitó 5 minutos, se separó el baño refrigerante y se agitó 18 horas más. Después se vertió en una mezcla de 300 mL de éter y 400 mL de HCl 0,5 N. La capa orgánica se separó, se lavó con agua, salmuera, se secó sobre MgSO₄, y se concentró a presión reducida para producir 25,5 g de una 1-[2-(t-butoxicarbonilamino)-6-metoxifenil]-2-butanona bruta. Este material se disolvió en 250 mL de cloruro de metileno y 50 mL de ácido trifluoroacético y se agitó durante un total de 17 horas. La mezcla se concentró a presión reducida y se añadieron acetato de etilo y agua al aceite restante. El acetato de etilo se separó, se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄) y se concentró. El residuo se sometió a cromatografía tres veces sobre sílice eluyendo con EtOAc/hexano al 20% para producir 13,9 g de 2-etil-4-metoxi-1H-indol.

15 Análisis para C₁₁H₁₃NO:

| | | | |
|-------------|-----------|----------|----------|
| Calculado: | C, 75,40; | H, 7,48; | N, 7,99 |
| Encontrado: | C, 74,41; | H, 7,64; | N, 7,97. |

Parte B. Preparación de 2-Etil-4-metoxi-1-(fenilmetil)-1H-indol.

Se disolvió 2-etil-4-metoxi-1H-indol (4,2 g, 24 mmoles) en 30 mL de DMF y se añadieron 960 mg (24 mmoles) de NaH/aceite mineral al 60%. Después de 1,5 horas, se añadieron 2,9 mL (24 mmoles) de bromuro de bencilo. Después de 4 horas, la mezcla se diluyó con agua y se extrajo dos veces con acetato de etilo. El acetato de etilo combinado se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄) y se concentró a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía sobre sílice gel y se hizo eluir con EtOAc/hexano al 20% para producir 3,1 g (rendimiento 49%) de 2-etil-4-metoxi-1-(fenilmetil)-1H-indol.

Parte C. Preparación de 2-Etil-4-hidroxi-1-(fenilmetil)-1H-indol.

Mediante el método utilizado en el Ejemplo 1, Parte D, se desmetilaron 3,1 g (11,7 mmoles) de oxígeno de 2-etil-4-metoxi-1-(fenilmetil)-1H-indol tratándolo con 48,6 mL de BBr₃/CH₂Cl₂ 1 M para producir un material que se sometió a cromatografía sobre gel de sílice (eluyendo con EtOAc/hexano al 20%) para producir 1,58 g (rendimiento 54%) de 2-etil-4-hidroxi-1-(fenilmetil)-1H-3-indol, p.f. 86-90°C. Análisis para C₁₇H₁₇NO:

| | | | |
|-------------|-----------|----------|----------|
| Calculado: | C, 81,24; | H, 6,82; | N, 5,57 |
| Encontrado: | C, 81,08; | H, 6,92; | N, 5,41. |

Parte D. Preparación de Éster metílico de ácido [[2-etil-1-(fenilmetil)-1H-indol-4-il]oxi]acético.

Utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, Parte E, se trató 2-etil-4-hidroxi-1-(fenilmetil)-1H-indol mg, 6,2 mmoles) con 248 mg (6,2 mmoles) de NaH/aceite mineral al 60% y después con 0,6 mL (6,2 mmoles) de bromoacetato de metilo. El producto se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc/hexano al 20%, para producir 1,37 g (rendimiento 69%) de éster metílico de ácido [[2-metil-1-(fenilmetil)-1H-indol-4-il]oxi]acético, 89-92°C.

Análisis para C₂₀H₂₁NO₃:

| | | | |
|-------------|-----------|----------|----------|
| Calculado: | C, 74,28; | H, 6,55; | N, 4,33 |
| Encontrado: | C, 74,03; | H, 6,49; | N, 4,60. |

35 **Parte E. Preparación de Éster metílico de ácido [[3-(2-amino-1,2-dioxoetil)-2-etil-1-(fenilmetil)-1H-indol-4-il]oxi]acético.**

Utilizando el procedimiento del Ejemplo 1, Parte F, se hicieron reaccionar primero 1,36 g (4,2 mmoles) de éster metílico de ácido [[2-etil-1-(fenilmetil)-1H-indol-4-il]oxi]acético con 0,4 mL (4,2 mmoles) de cloruro de oxalilo y después con amoníaco en exceso para producir un sólido de color blanco. Éste se agitó con acetato de etilo y el

material insoluble se separó y se secó para producir 1,37 g de una mezcla de éster metílico de ácido [[3-(2-amino-1,2-dioxoetil)-2-etil-1-(fenilmetil)-1H-indol-4-il]oxi]acético y cloruro de amonio. Esta mezcla fundía a 172-187°C.

Parte F. Preparación de Ácido [[3-(2-amino-1,2-dioxoetil)-2-etil-1-(fenilmetil)-1H-indol-4-il]oxi]acético.

5 Una mezcla de 788 mg (2 mmoles) de éster metílico de ácido [3-(2-amino-1,2-dioxoetil)-2-etil-1-(fenilmetil)-1H-indol-4-il]oxi]acético, 10 mL de NaOH 1 N y 30 mL de MeOH se calentó para mantener el reflujo durante 0,5 horas, se agitó a la temperatura ambiente durante 0,5 horas y se concentró a presión reducida. El residuo se recogió en acetato de etilo y agua, la capa acuosa se separó y se volvió ácida a pH 2-3 con HCl 1 N. El producto precipitado se filtró y se lavó con acetato de etilo para producir 559 mg (rendimiento 74%) de ácido [[3-(2-amino-1,2-dioxoetil)-2-etil-1-(fenilmetil)-1H-indol-4-il]oxi]acético, p.f. 230-234°C.

10 Análisis para $C_{21}H_{20}N_2O_5$:

| | | | |
|-------------|-----------|----------|----------|
| Calculado: | C, 65,96; | H, 5,80; | N, 7,33 |
| Encontrado: | C, 66,95; | H, 5,55; | N, 6,99. |

Ejemplo de Análisis Comparativo 1

15 Se utilizó el siguiente análisis cromogénico para identificar y evaluar los inhibidores de la fosfolipasa A_2 secretada humana recombinante. El análisis descrito en la presente memoria ha sido adaptado para un escrutinio de un volumen elevado utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos. Una descripción general de este método de análisis se encuentra en el artículo, "Analysis of Human Synovial Fluid Phospholipase A2 on Short Chain Phosphatidilcholine-Mixed Micelles: Development of a Spectrophotometric Assay Suitable for a Microtiterplate Reader", de Laure J. Reynolds, Lori L. Hughes, y Edward A Dennis, Analytical Biochemistry, 204, págs. 190-197, 1992.

Reactivos:

20 **TAMPÓN DE REACCIÓN -**

| | |
|--|-------------|
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | (1,47 g/L) |
| KCl | (7,455 g/L) |
| Albúmina de Suero Bovino (sin ácido graso) (1 g/L) (Sigma A-7030, producto de Sigma Chemical Co. St. Louis MO, EEUU) | |
| TRIS HCl | (3,94 g/L) |

pH 7,5 (ajustar con NaOH)

TAMPÓN PARA ENZIMA -

0,05 NaOAc·3H₂O, pH 4,5

0,2 NaCl

25 Ajustar el pH a 4,5 con ácido acético

DTNB – ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

DIHEPTANOIL TIO – PC RACÉMICA

1,2-bis(heptanoiltio)-1,2-didesoxi-sn-glicero-3-fosforilcolina racémica

TRITON X-100™ preparar a 6,249 mg/ml en tampón de reacción para igualar 10 µM.

30 **MEZCLA DE REACCIÓN -**

Un volumen medido de diheptanoil tio PC racémica suministrada en cloroformo a una concentración de 100 mg/ml se lleva a sequedad y se redisuelve en una solución acuosa de detergente no iónico TRITON X-100™ 10 milimolar. Se añade tampón de reacción a la solución, después DTNB para producir la Mezcla de Reacción.

La mezcla de reacción obtenida de este modo contiene sustrato diheptanoil tio-PC 1 mM, detergente Triton X-100™ 0,29 mM, y DTMB 0,12 mM en una solución acuosa tamponada a pH 7,5.

Procedimiento de Análisis:

1. Añadir 0,2 ml de la mezcla de reacción a todos los pocillos;
- 5 2. Añadir 10 µl de compuesto de ensayo (o blanco disolvente) a los pocillos apropiados, mezclar 20 segundos;
3. Añadir 50 nanogramos de sPLA₂ (10 microlitros) a los pocillos apropiados;
4. Incubar la placa a 40°C durante 30 minutos;
5. Leer la absorbancia de los pocillos a 405 nanómetros con un lector de placa automático.

10 Todos los compuestos se sometieron a ensayo por triplicado. Por lo general, los compuestos fueron sometidos a ensayo a una concentración final de 5 µg/ml. Los compuestos se consideraron activos cuando mostraban una inhibición del 40% o superior en comparación con las reacciones de control no inhibidas cuando se midió a 405 nanómetros. La carencia de desarrollo de color a 405 nanómetros evidenció inhibición. Los compuestos que se encontró inicialmente que eran activos se volvieron a analizar para confirmar su actividad, y si eran suficientemente activos, se determinaron sus valores de CI₅₀. Por lo general, se determinaron los valores de CI₅₀ (véase la Tabla I, más abajo) diluyendo seriadamente el compuesto de ensayo dos veces de manera que la concentración final de la reacción oscilara de 45 µg/mL a 0,35 µg/ml. Los inhibidores más potentes requerían una dilución significativamente mayor. En todos los casos, se determinó el % de inhibición medido a 405 nanómetros generado por reacciones de enzima que contenían inhibidores con respecto a las reacciones de control no inhibidas. Cada muestra fue titulada por triplicado y los valores resultantes fueron promediados para el trazado de los datos y el cálculo de los valores de CI₅₀. Las CI₅₀ se determinaron trazando la concentración log frente a los valores de inhibición en el intervalo de 10-90% de inhibición.

Resultados de los Ensayos de Inhibición de la Fosfolipasa A2 Secretada Humana para 1H-indol-3-glioxilamida

Tabla I

| Compuesto del Ejemplo Núm. | Inhibición de PLA ₂ secretada humana CI ₅₀ ± desviación media (3-4 ensayos) |
|----------------------------|--|
| 1 | 9,00 ± 1,73 nM |

25 El compuesto de Ejemplo 1 es altamente activo en la inhibición de sPLA₂.

Ejemplo de Análisis Comparativo 2

Método:

30 Se sacrificaron cobayas de la cepa Hartley macho (500-700 g) mediante dislocación cervical y se retiraron intactos su corazón y sus pulmones y se colocaron en tampón Krebs aireado (95% de O₂:5% de CO₂). Se diseccionaron tiras pleurales dorsales (4 x 1 x 25 mm) de los segmentos parenquimales intactos (8x4x25mm) cortados paralelamente hasta el borde externo de los lóbulos pulmonares inferiores. Dos tiras pleurales adyacentes, obtenidas de un único lóbulo y que representaban una única muestra de tejido, se ataron en cualquier extremo y se anclaron independientemente a una varilla de soporte metálica. Una varilla se ancló a un transductor de fuerza - desplazamiento Grass (Modelo FTO3C, producto de Grass Medical Instruments Co., Quincy, MA, EEUU). Los cambios en la tensión isométrica se presentaron en un monitor y un aparato de registro térmico (producto de Modular Instruments, Malvern, PA). Todos los tejidos se colocaron en baños para tejidos con camisa de 10 ml mantenidos a 37°C. Los baños para tejidos estaban continuamente aireados y contenían una solución de Krebs modificada con la siguiente composición (milimolar) NaCl, 118,2; KCl, 4,6; CaCl₂·2H₂O, 2,5; MgSO₄·7H₂O, 1,2; NaHCO₃, 24,8; KH₂PO₄, 1,0; y dextrosa, 10,0. Se utilizaron tiras pleurales de los lóbulos opuestos del pulmón para los experimentos emparejados. Los datos preliminares generados a partir de las curvas tensión/respuesta demostraron que una tensión en reposo de 800 mg resultaba óptima. Se dejó que los tejidos se equilibraran durante 45 minutos ya que el fluido del baño se cambió periódicamente.

Curvas de concentración-respuesta acumulativa:

45 Inicialmente los tejidos se sensibilizaron 3 veces con KCl (40 mM) para someter a ensayo la viabilidad del tejido y para obtener una respuesta consistente. Después de registrar la máxima respuesta a KCl, los tejidos se lavaron y se dejó que volvieran a la línea base antes de la siguiente sensibilización. Las curvas de concentración-respuesta

5 acumulativa se obtuvieron a partir de tiras pleurales incrementando la concentración de agonista (sPLA₂) en el baño de tejidos por medio de incrementos semi-log₁₀ mientras la concentración previa permanecía en contacto con los tejidos (Ref.1, más arriba). La concentración de agonista se incrementó después de alcanzar la meseta de la contracción lograda por la concentración precedente. Se obtuvo una curva de concentración-respuesta de cada tejido. Para minimizar la variabilidad entre tejidos obtenidos de diferentes animales, se expresaron las respuestas contráctiles como un porcentaje de la máxima respuesta obtenida con la sensibilización por KCl final. Cuando se estudian los efectos de diferentes fármacos sobre los efectos contráctiles de sPLA₂, se añaden los compuestos y sus respectivos vehículos a los tejidos 30 min. antes de empezar las curvas de concentración-respuesta de sPLA₂.

Análisis estadístico:

10 Se reunieron los datos de diferentes experimentos y se presentaron como un porcentaje de las respuestas a KCl máximas (media ± E.T.). Para estimar los desplazamientos hacia la derecha inducidos por el fármaco en las curvas de concentración respuesta, se analizaron las curvas simultáneamente utilizando métodos de modelado estadístico no lineal similares a los descritos por Waud (1976), Ecuación 26, pág. 163, (Ref. 2). El modelo incluye cuatro parámetros: la respuesta del tejido máxima que se suponía igual para cada curva, la DE₅₀ para la curva de control, la inclinación de las curvas, y la pA₂, la concentración de antagonista que requiere un incremento al doble en el agonista para lograr una respuesta equivalente. Se determinó que la pendiente de Schild era 1, utilizando métodos de modelado estadístico no lineal similares a los descritos por Waud (1976), Ecuación 27, pág. 164 (Ref. 2). Una pendiente de Schild igual a 1 indica que el modelo es coherente con las suposiciones de un antagonista competitivo; por lo tanto, el pA₂ se puede interpretar como la K_B aparente, la constante de disociación del inhibidor.

20 Para estimar la supresión inducida por fármaco de las respuestas máximas, se determinaron las respuestas de sPLA₂ (10 µg/ml) en ausencia y en presencia de fármaco, y se calculó el porcentaje de supresión para cada par de tejidos. Los ejemplos representativos de las actividades inhibitoras se presentan en la Tabla 2, más abajo.

Ref. 1 - van, J.M.: Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making de dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 143: 299-330, 1963.

25 Ref. 2 - Waud, D.: Analysis of dose-response relationships. in Advances in General and Cellular Pharmacology eds Narahashi, Bianchi 1:145-178, 1976.

Resultados de los Ensayos de Inhibición de la Fosfolipasa A2 Secretada Humana sobre tejido pulmonar de cobaya

Tabla II

| Compuesto del Ejemplo Núm. | K _B Aparente de PLA ₂ secretada en el ensayo de tejidos nM |
|----------------------------|--|
| 1 | 88,7 ± 18,2 |

REIVINDICACIONES

1. El compuesto éster metílico de ácido [[3-(2-amino-1,2-dioxoetil)-2-etil-1-(fenilmetil)-1H-indol-4-il]oxi]acético.
2. Una formulación farmacéutica que comprende como ingrediente activo el compuesto de la reivindicación 1 junto con uno o más portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables para el mismo.
- 5 3. El compuesto de la reivindicación 1 para su uso como fármaco.
4. El compuesto de la reivindicación 1 para su uso como fármaco para la inhibición de la liberación mediada por ácidos grasos de sPLA2.
- 10 5. El compuesto de la reivindicación 1 para su uso como fármaco para el tratamiento de un mamífero, incluyendo un ser humano, para aliviar los efectos patológicos del choque séptico, el síndrome de dificultad respiratoria del adulto, la pancreatitis, los traumatismos, el asma bronquial, la rinitis alérgica o la artritis reumatoide.
6. El uso del compuesto de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para la inhibición de la liberación mediada por ácidos grasos de sPLA2.
- 15 7. El uso del compuesto de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero, incluyendo un ser humano, para aliviar los efectos patológicos del choque séptico, el síndrome de dificultad respiratoria del adulto, la pancreatitis, los traumatismos, el asma bronquial, la rinitis alérgica o la artritis reumatoide.