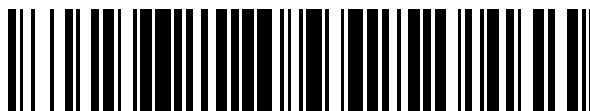


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 954**

51 Int. Cl.:  
**C07D 401/14** (2006.01)  
**C07D 403/12** (2006.01)  
**C07D 239/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10163200 .8**  
96 Fecha de presentación: **05.08.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2233483**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.2010**

54 Título: **Derivados de indol o de bencimidazol para modular la IkB quinasa, y productos intermedios para su preparación**

30 Prioridad:  
**17.08.2002 DE 10237722**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.10.2012**

73 Titular/es:  
**SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH  
BRÜNINGSTRASSE 50  
65926 FRANKFURT AM MAIN, DE**

72 Inventor/es:  
**Ritzeler, Olaf y  
Jaehne, Gerhard**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 387 954 T3

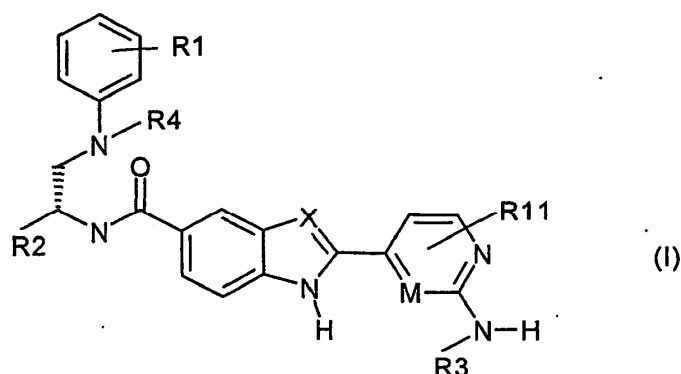
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Derivados de indol o de bencimidazol para modular la I $\kappa$ B quinasa, y productos intermedios para su preparación.

- 5 La invención se refiere a derivados de indol o de bencimidazol que inhiben I $\kappa$ B quinasa, a procedimientos para prepararlos y a su uso como medicamentos. En esta memoria se reivindican productos intermedios para la preparación de estos compuestos, los cuales representan igualmente una parte de la invención. Aquellas partes de la memoria que no afecten a los productos intermedios reivindicados sirven para la explicación de la invención en su conjunto.
- 10 En la solicitud de patente WO 94/12478 se describen, entre otros, derivados de indol que inhiben la agregación de las plaquetas de la sangre. En las solicitudes de patente WO 01/00610 y WO 01/30774 se describen derivados de indol y derivados de bencimidazol que son capaces de modular NF $\kappa$ B. NF $\kappa$ B es un factor de transcripción heterodímero, que es capaz de activar un gran número de genes que codifican, entre otros, citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, IL-2, TNF $\alpha$  o IL-6. NF $\kappa$ B está presente en el citosol de las células en donde está complejado con su inhibidor I $\kappa$ B que se produce en la naturaleza. La estimulación de las células, por ejemplo por parte de citoquinas, conduce a que el I $\kappa$ B sea fosforilado y disgregado subsiguientemente de forma proteolítica. Esta disgregación proteolítica conduce a la activación de NF $\kappa$ B que luego migra al núcleo de la célula en donde activa a un gran número de genes proinflamatorios.
- 15 En enfermedades tales como artritis reumatoide (en relación con la inflamación), osteoartritis, asma, infarto de corazón, enfermedades de Alzheimer, diabetes tipo II, "enfermedad del intestino inflamatorio" o aterosclerosis, NF $\kappa$ B es activado más allá de su grado normal. La inhibición de NF $\kappa$ B es también valiosa en el tratamiento del cáncer, ya que se utiliza en un tratamiento de este tipo por sí misma o para aumentar la terapia citostática. Pudo demostrarse que medicamentos tales como glucocorticoides, salicilatos o sales de oro, que se utilizan en la terapia del reumatismo, inhiben la cadena de la señal de activación de NF $\kappa$ B en diversos puntos o interfieren directamente en la transcripción de los genes.
- 20 La primera etapa en la cascada de señales antes mencionada es la disgregación de I $\kappa$ B. Esta fosforilación es regulada por la I $\kappa$ B quinasa específica. Hasta la fecha, no se conocen inhibidores que inhiban específicamente la I $\kappa$ B quinasa.
- El inconveniente de los inhibidores conocidos de la I $\kappa$ B quinasa es la carente especificidad para inhibir únicamente una clase de quinasas. Por ejemplo, la mayoría de los inhibidores de la I $\kappa$ B quinasa inhiben varias quinasas diferentes al mismo tiempo, ya que las estructuras de los dominios catalíticos de estas quinasas son similares. Por consiguiente, los inhibidores actúan, de una manera indeseable, sobre muchas enzimas, incluidas las que poseen la función vital.
- 30 En la solicitud de patente WO 01/30774 ya se han descrito derivados de indol que son capaces de modular NF $\kappa$ B y que exhiben un fuerte efecto inhibidor sobre la I $\kappa$ B quinasa. Sin embargo, los compuestos dados a conocer en el documento WO 01/30774, y que se describen en los ejemplos, muestran también un potente efecto inhibidor sobre otras quinasas tales como la proteína quinasa dependiente de cAMP, la proteína quinasa C o la caseína quinasa II. Sin embargo, cuando se mejora su especificidad, algunos de estos derivados de indol muestran una disminución en su capacidad de inhibir la I $\kappa$ B quinasa. Además, el nivel de plasma sanguíneo que se puede conseguir con los compuestos descritos en el documento WO 01/30774 es insuficiente para administrar estos derivados por vía oral.
- 40 En un esfuerzo por obtener compuestos eficaces para tratar artritis reumatoide (asociada con la inflamación), osteoartritis, asma, infarto de corazón, enfermedades de Alzheimer, enfermedades cancerígenas (potenciación de las terapias con agentes citotóxicos) o aterosclerosis, se ha encontrado ahora que los derivados de indol y los derivados de bencimidazol de acuerdo con la invención no adolecen de los inconvenientes antes mencionados. Los derivados de indol y derivados de bencimidazol de acuerdo con la invención son potentes inhibidores de la I $\kappa$ B quinasa, inhibiendo a este respecto las quinasas de modo muy selectivo, y presentan un alto nivel en el plasma sanguíneo después de la administración oral.
- 45

Por lo tanto, la invención se refiere al compuesto de fórmula I



y/o una forma estereoisómera del compuesto de la fórmula I y/o una sal fisiológicamente tolerada del compuesto de la fórmula I, en que

X y M son idénticos o diferentes y representan, independientemente uno de otro, un átomo de N o CH,

R1 y R11 son idénticos o diferentes, y representan, independientemente uno de otro,

1. un átomo de hidrógeno,
2. F, Cl, I o Br,
3. -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
4. -CN,
5. -CF<sub>3</sub>,
6. -OR<sup>5</sup>, en que R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
7. -N(R<sup>5</sup>)-R<sup>6</sup>, en que R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> representan, independientemente uno de otro, un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
8. -C(O)-R<sup>5</sup>, en que R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), o
9. -S(O)<sub>x</sub>-R<sup>5</sup>, en que x significa el número entero cero, 1 ó 2, y R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),

R2 representa 1. un radical heteroarilo del grupo 3-hidroxipirro-2,4-diona, imidazol, imidazolidina, imidazolina, indazol, isotiazol, isotiazolidina, isoxazol, 2-isoxazolidina, isoxazolidina, isoxazolona, morfolina, oxazol, 1,3,4-oxadiazol, oxadiazolidindiona, oxadiazolona, 1,2,3,5-oxatiadiazol-2-óxido, 5-oxo-4,5-dihidro-[1,3,4]-oxadiazol, 5-oxo-1,2,4-tiadiazol, piperazina, pirazina, pirazol, pirazolina, pirazolidina, piridazina, pirimidina, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiomorfolina, triazol o triazolona, y el radical heteroarilo está no sustituido o está sustituido una vez, dos veces o tres veces, independientemente una de otra, con

- 1.1 -C(O)-R<sup>5</sup>, en que R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
- 1.2 -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
- 1.3 -O-R<sup>5</sup>, en que R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
- 1.4 -N(R<sup>5</sup>)-R<sup>6</sup>, en que R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> representan, independientemente uno de otro, un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
- 1.5 halógeno, o
- 1.6 un radical ceto,
2. -C(O)-OR<sup>5</sup>, en que R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o -(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
3. -C(O)-OR<sup>5</sup>, en que R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o -(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), o
4. -C(O)-N(R<sup>7</sup>)-R<sup>8</sup>, en que R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> representan, independientemente uno de otro, un átomo de hidrógeno, -alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-OH, -O-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o -(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),

R3 representa un átomo de hidrógeno o -(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),

R4 representa 1. un radical heteroarilo del grupo pirrol, furano, tiofeno, imidazol, pirazol, oxazol, isoxazol, tiazol, isotiazol, tetrazol, 1,2,3,5-oxatiadiazol-2-óxidos, triazolonas, oxadiazolona, isoxazolona, oxadiazolidinadiona, triazol, 3-hidroxipirro-2,4-dionas, 5-oxo-1,2,4-tiadiazoles, piridina, pirazina, pirimidina, indol, isoindol, indazol, ftalazina, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, quinazolona, cinolina, β-carbolina y derivados de ciclohexa o derivados de ciclohexa, condensados con benzo, de estos radicales heteroarilo, en que el radical heteroarilo está no sustituido o está sustituido una vez, dos veces o tres veces, independientemente una de otra, con -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), -alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), halógeno, nitro, amino, trifluorometilo, hidroxilo, hidroxil-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), metilendioxi, etilendioxi, formilo, acetilo, ciano, hidroxicarbonilo, aminocarbonilo o -alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-carbonilo, o

2. un radical arilo del grupo fenilo, naftilo, 1-naftilo, 2-naftilo, bifenililo, 2-bifenililo, 3-bifenililo y 4-bifenililo, antrilo o fluorenilo, y el radical arilo está no sustituido o está sustituido una vez,

dos veces o tres veces, independientemente una de otra, con -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), -alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), halógeno, nitro, amino, trifluorometilo, hidroxilo, hidroxil-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), metilendioxi, etilendioxi, formilo, acetilo, ciano, hidroxicarbonilo, aminocarbonilo o -alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-carbonilo.

- 5 La invención se refiere, además, a compuestos de la fórmula I, en que  
 X y M son idénticos o diferentes y representan, independientemente uno de otro, un átomo de N o CH,  
 R1 y R11 son como se definen antes en los apartados 1. a 9.,  
 R2 representa 1. un radical heteroarilo del grupo imidazol, isotiazol, isoxazol, 2-isoxazolidina, isoxazolidina, isoxazolona,  
 1,3,4-oxadiazol, oxadiazolidinadiona, 1,2,3,5-oxadiazolona, oxazol, 5-oxo-4,5-dihidro-[1,3,4]oxadiazol,  
 10 tetrazol, tiadiazol, tiazol, triazol o triazolona, y el radical heteroarilo está no sustituido o está sustituido  
 una vez, dos veces o tres veces, independientemente una de otra, con  
 1.1 un radical ceto,  
 1.2 halógeno, o  
 1.3 -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), o  
 15 2. -C(O)-N(R<sup>7</sup>)-R<sup>8</sup>, en que R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> representan, independientemente uno de otro, un átomo de  
 hidrógeno, -alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-OH, -O-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),  
 R3 representa un átomo de hidrógeno, metilo o etilo,  
 R4 representa 1. un radical heteroarilo del grupo de los anillos insaturados, parcialmente saturados o completamente  
 20 saturados, que se derivan de piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, pirrol, furano, tiofeno, imidazol,  
 pirazol, oxazol, isoxazol, tiazol, triazol o isotiazol,  
 en que el radical heteroarilo está no sustituido o está sustituido una vez, dos veces o tres veces,  
 independientemente una de otra, con -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), -alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), F, Cl, I, Br, nitro, amino, tri-  
 fluorometilo, hidroxilo, hidroxil-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), metilendioxi, etilendioxi, formilo, acetilo, ciano,  
 hidroxicarbonilo, aminocarbonilo o -alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-carbonilo, o  
 25 2. fenilo, y fenilo está no sustituido o está sustituido, una vez, dos veces o tres veces, indepen-  
 dientemente una de otra, con F, Cl, I, Br, CF<sub>3</sub>, -OH, -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o -alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>).

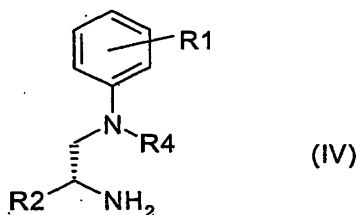
- La invención se refiere, además, al compuesto  
 30 [(S)-2-difenilamino-1-(5-oxo-4,5-dihidro[1,3,4]oxadiazol-2-il)-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-  
 carboxílico,  
 {1-carbamoil-2-[(4-fluoro-fenil)-piridin-2-il-amino]-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico,  
 [(S)-1-(5-oxo-4,5-dihidro-1,3,4-oxadiazol-2-il)-2-(fenil-piridin-2-il-amino)-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-  
 1H-indol-5-carboxílico,  
 35 {1-carbamoil-2-[(4-fluoro-fenil)-piridin-2-il-amino]-etil]-amida del ácido 2-(2-amino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico, [2-  
 [(4-fluoro-fenil)-piridin-2-il-amino]-1-(4H-[1,2,4]triazol-3-il)-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-  
 carboxílico,  
 [1-carbamoil-2-(fenil-tiazol-2-il-amino)-etil]-amida del ácido (S)-2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico,  
 [1-metoxicarbamoil-2-(fenil-piridin-2-il-amino)-etil]-amida del ácido (S)-2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico,  
 40 {1-carbamoil-2-[(fenil)-piridin-2-il-amino]-etil]-amida del ácido 2-(2-amino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico,  
 {1-carbamoil-2-[(fenil)-pirimidin-2-il-amino]-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico,  
 [1-(2-hidroxi-etilcarbamoil)-2-(fenil-pirimidin-2-il-amino)-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-  
 carboxílico,  
 45 ácido (S)-2-[[2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carbonil]-amino]-3-[(fenil)-(4-trifluorometil-pirimidin-2-il)-amino]-  
 propiónico,  
 1-carbamoil-2-[(4-fluoro-fenil)-(5-metil-pirimidin-2-il)-amino]-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-  
 carboxílico,  
 ((S)-1-carbamoil-2-difenilamino-etil)-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-bencimidazol-5-carboxílico,  
 {1-carbamoil-2-[(fenil)-pirimidin-2-il-amino]-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-bencimidazol-5-  
 50 carboxílico, o  
 {1-carbamoil-2-[(fenil)-piridin-2-il-amino]-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-bencimidazol-5-carboxílico.

- Por el término "halógeno" se entiende flúor, cloro, bromo o yodo. Por el término "-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)" o "-alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)" se  
 55 entienden radicales hidrocarbonados, cuya cadena de carbonos es lineal o ramificada y contiene de 1 a 5 átomos de  
 carbono tales como metilo, etilo, propilo, n-butilo, pentilo o butilo terciario. Por la expresión "radical heteroarilo del grupo de  
 los anillos insaturados, parcialmente saturados o completamente saturados que se derivan de piridina, pirazina, pirimidina,  
 piridazina, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, pirazol, oxazol, isoxazol, tiazol e isotiazol" han de entenderse, por ejemplo,  
 compuestos tales como piperazina, pirazolona, imidazolona, pirazolidina, imidazolidina, tetrahidropiridina, isoxazolona,  
 isoxazolidina, morfolina, isotiazolina, isotiazolidina, tetrahidro-1,4-tiazina o piperidina.

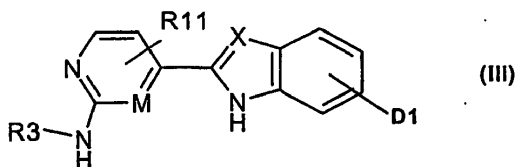
La preparación de los compuestos de la fórmula I tiene lugar, por ejemplo, según se describe en las solicitudes de patente WO 01/00610 y WO 01/30774. Las sustancias de partida para las reacciones químicas son conocidas o se pueden preparar fácilmente utilizando métodos conocidos de la bibliografía.

La invención se refiere, además, a un procedimiento para preparar el compuesto de la fórmula I y/o una forma estereoisómera del compuesto de la fórmula I y/o una sal fisiológicamente tolerada del compuesto de la fórmula I, caracterizado porque

a) se hace reaccionar un compuesto de la fórmula IV



en que R1, R2 y R4 son como se definen en la fórmula I, con un cloruro de ácido o un éster activado del compuesto de la fórmula III,



en que D1 significa -COOH y R11, X, M y R3 son como se definen en la fórmula I, en presencia de una base o, eventualmente, de un agente deshidratante en solución, y se convierte en un compuesto de la fórmula I,

b) se separa un compuesto de la fórmula I, que ha sido preparado por el procedimiento a) y que, en virtud de su estructura química, aparece en formas enantiómeras, en los enantiómeros puros por medio de la formación de sales con ácidos o bases puros en cuanto a los enantiómeros, cromatografía en fases estacionarias quirales o derivatización utilizando compuestos quirales puros en cuanto a los enantiómeros tales como aminoácidos, separando los diastereoisómeros resultantes y eliminando los grupos auxiliares quirales, o

c) se aísla el compuesto de la fórmula I que ha sido preparado por los procedimientos a) o b) en forma libre o, en caso de estar presentes grupos de carácter ácido o básico, se convierte en sales fisiológicamente toleradas.

La preparación de los derivados del ácido indol-carboxílico o del ácido bencimidazol-carboxílico tiene lugar según un método como el descrito en Houben-Weyl "Methoden der Org. Chemie", volumen E6-2A o E6-2B. Así, con el fin de preparar los derivados del ácido indol-carboxílico o del ácido bencimidazol-carboxílico de la fórmula III, preferiblemente ácidos hidrazinobenzoicos y aril-cetonas o heteroaril-cetonas se hacen reaccionar a 145°C en presencia de ácido polifosfórico en calidad de disolvente. La preparación de los ácidos hidrazinobenzoicos necesarios tiene lugar según métodos que son familiares para una persona experta, por ejemplo a partir de las correspondientes anilinas de ácido benzoico; aril-cetonas o heteroaril-cetonas se preparan también utilizando métodos que resultan familiares a la persona experta, por ejemplo a partir de los correspondientes cloruros de ácido o nitrilos, mediante reacción, por ejemplo, con compuestos organometálicos.

Métodos de acoplamiento de la Química de los Péptidos, que son bien conocidos per se por la persona experta en la materia (véase, por ejemplo, Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, volúmenes 15/1 y 15/2, editorial Georg Thieme, Stuttgart, 1974), se utilizan ventajosamente para condensar los compuestos de la fórmula IV con los de la fórmula III. En calidad de agentes de condensación o reactivos de acoplamiento entran en consideración compuestos tales como carbonildiimidazol, carbodiimida, tal como dicitlohexilcarbodiimida o diisopropilcarbodiimida (DIC), el tetrafluoroborato de O-((ciano(etoxicarbonil)-metileno)-amino)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TOTU) o anhídrido propilfosfónico (PPA).

Las condensaciones se pueden llevar a cabo en condiciones convencionales. En la condensación es necesario, por norma general, que los grupos amino no reactivos, que estén presentes, sean protegidos con grupos protectores reversibles. Esto mismo se aplica a los grupos carboxilo que no participan en la reacción, estando presentes

preferiblemente estos grupos, durante la condensación, en forma de ésteres alquílicos (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), ésteres bencilicos o ésteres terc.-butílicos. No es necesaria una protección de los grupos amino si los grupos amino están todavía presentes en forma de precursores tales como grupos nitro o grupos ciano, y sólo se forman por hidrogenación después de la condensación. Después de la condensación, los grupos protectores que están presentes se eliminan de una manera adecuada. Por ejemplo, se pueden eliminar por hidrogenación grupos NO<sub>2</sub> (protección guanidino en aminoácidos), grupos benciloxicarbonilo y grupos bencilo en ésteres bencilicos. Los grupos protectores del tipo terc.-butilo se eliminan en condiciones ácidas, mientras que el radical 9-fluorenilmetiloxicarbonilo se separa utilizando aminas secundarias.

La invención se refiere también a agentes farmacéuticos que se caracterizan por una cantidad eficaz de al menos un compuesto de la fórmula I y/o una sal fisiológicamente tolerada del compuesto de la fórmula I y/o una forma eventualmente estereoisómera del compuesto de la fórmula I, junto con una sustancia vehículo, aditivo y/u otros compuestos activos y sustancias auxiliares farmacéuticamente adecuados y fisiológicamente tolerados.

Debido a sus propiedades farmacológicas, los compuestos de acuerdo con la invención son adecuados para la profilaxia y terapia de todas las enfermedades cuyo curso implica una actividad incrementada de la I $\kappa$ B quinasa. A ellas pertenecen, por ejemplo, enfermedades crónicas del aparato locomotor tales como artritis inflamatorias, inmunológicamente agudas o agudas mediadas por el metabolismo y crónicas, artropatías, artritis reumatoide, o enfermedades degenerativas de las articulaciones tales como osteoartritis, espondilosis, diabetes tipo II, enfermedad del intestino inflamatorio, pérdida de cartílago tras un trauma de la articulación o un período relativamente largo de inmovilización de la articulación después de lesiones de menisco o rótula o roturas de ligamento, o enfermedades del tejido conjuntivo tales como colagenosis y enfermedades periodontales, migrañas y perturbaciones del metabolismo de los huesos, o enfermedades que son debidas a una sobre-expresión del factor de necrosis de tumores alfa (TNF $\alpha$ ) o a una concentración incrementada del TNF $\alpha$  tales como caquexia, esclerosis múltiple, trauma craneocerebral, enfermedad de Crohn y úlceras intestinales, o enfermedades tales como aterosclerosis, estenosis, ulceración, enfermedades de Alzheimer, abatimiento muscular, enfermedades cancerígenas (potenciación del tratamiento con agentes citotóxicos), infarto cardíaco, gota, sepsis, choque séptico, choque endotóxico, infecciones víricas tales como gripe, hepatitis, infecciones por VIH, SIDA o enfermedades provocadas por adenovirus o virus herpes, infecciones parasitarias tales como malaria o lepra, infecciones por hongos o levaduras, meningitis, enfermedades crónicas de los pulmones inflamatorias tales como bronquitis crónica o asma, síndrome del dolor respiratorio agudo, sinovitis aguda, tuberculosis, psoriasis, diabetes, tratamiento de reacciones de rechazo agudas o crónicas de parte del receptor de órganos contra el órgano trasplantado, enfermedades crónicas de injerto frente a huésped y enfermedades vasculares inflamatorias. Las enfermedades mencionadas pueden tratarse mucho más específicamente y con un espectro menor de efectos secundarios con los compuestos que se utilizan de acuerdo con la invención, ya que es esencialmente sólo la I $\kappa$ B quinasa la que es inhibida.

La aplicación de los agentes farmacéuticos de acuerdo con la invención puede tener lugar por medio de administración oral, por inhalación, rectal o transdermal, o por medio de inyección subcutánea, intra-articular, intraperitoneal o intravenosa. Se prefiere la administración oral.

La invención se refiere también a un procedimiento para producir un agente farmacéutico, caracterizado porque se reúne al menos un compuesto de la fórmula I con un excipiente farmacéuticamente adecuado y fisiológicamente tolerado y, eventualmente, otros compuestos activos, aditivos o sustancias auxiliares adecuados, a una forma adecuada para la administración.

Formas de preparados sólidas o galénicas adecuadas son, por ejemplo, gránulos, polvos, grageas, tabletas, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, zumos, suspensiones, emulsiones, gotas o soluciones inyectables, así como preparados con una liberación retrasada del compuesto activo, en cuya preparación se utilizan sustancias auxiliares habituales tales como sustancias de vehículo, desintegrantes, aglutinantes, agentes de revestimiento, agentes de expansión, deslizantes o lubricantes, saboreantes, edulcorantes y solubilizantes. Sustancias auxiliares frecuentemente empleadas que se pueden mencionar son carbonato de magnesio, dióxido de titanio, lactosa, manitol y otros azúcares, talco, proteínas de la leche, gelatina, almidón, celulosa y sus derivados, aceites animales y vegetales tales como aceite de hígado de bacalao, aceite de girasol, aceite de nuez molida o aceite de sésamo, polietilenglicol, y disolventes tales como agua estéril y alcoholes monovalentes o polivalentes tales como glicerol. Los preparados farmacéuticos se producen y administran preferiblemente en unidades de dosificación, conteniendo cada unidad, en calidad de constituyente activo, una dosis determinada del compuesto de la fórmula I de acuerdo con la invención. En el caso de unidades de dosificación sólidas tales como tabletas, cápsulas, grageas o supositorios, esta dosis puede ser de hasta aproximadamente 1000 mg, preferiblemente de aproximadamente 50 mg a 300 mg y, en el caso de soluciones de inyección en forma de ampolla, de hasta aproximadamente 300 mg, preferiblemente de aproximadamente 10 mg a 100 mg. Dependiendo de la actividad del compuesto de acuerdo con la fórmula I, para tratar un paciente adulto de aproximadamente 70 kg de peso están indicadas dosis diarias de aproximadamente 20 mg a 1000 mg de compuesto activo, preferiblemente de 100 mg a 500 mg. Bajo

determinadas circunstancias, también pueden ser apropiadas dosis diarias mayores o menores. La administración de la dosis diaria puede tener lugar tanto por medio de una sola administración en forma de una unidad de dosificación sencilla o de varias unidades de dosificación menores, o por medio de la administración múltiple de dosis subdivididas a intervalos predeterminados.

5

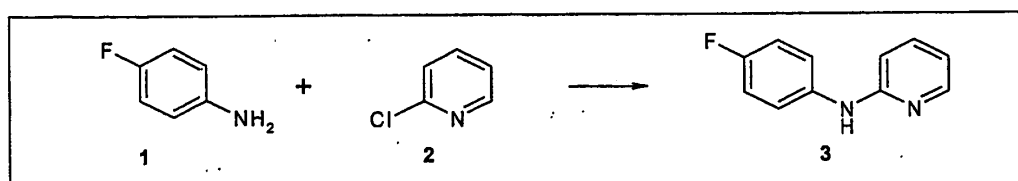
Como norma general, los productos finales se determinan por métodos de espectroscopía de masas (FAB-MS, ESI-MS). Los datos de temperatura se dan en grados centígrados; RT significa temperatura ambiente (de 22°C a 26°C). Las abreviaturas que se utilizan se explican o corresponden a los convenios habituales. La invención se explica con mayor detalle a continuación con ayuda de ejemplos.

10

### Ejemplos de preparación

#### A) Preparación de anilina

##### 15 A.1.) 2-(p-fluoroanilino)piridina (3)



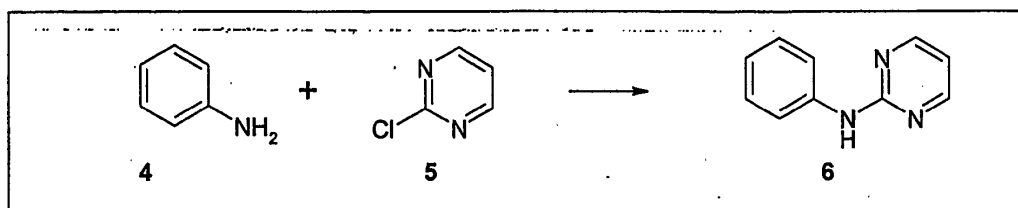
20

Una mezcla de 29,34 g (0,264 mol) de 4-fluoroanilina (1) y 29,98 g (0,264 mol) de 2-cloropiridina (2) se calentó a 150°C durante 2 h. Después de haber sido enfriada hasta RT, se distribuyó entre 500 ml de NaOH 1 N y 500 ml de acetato de etilo. La fase acuosa se extrajo 2 veces en cada caso con 300 ml de acetato de etilo y las fases orgánicas reunidas se secaron con sulfato de magnesio. Después de haber evaporado el disolvente, el residuo se recogió en 500 ml de acetato de etilo y se añadieron aproximadamente 40 g de carbón vegetal activo. Se agitó a RT durante 10 minutos y se filtró a través de tierra de infusorios. El carbón vegetal activo se volvió a lavar 4 veces, en cada caso con 1 l de acetato de etilo. El disolvente se separó en vacío (i.v.), y el residuo se precipitó a partir de 120 ml de acetato de etilo. El sólido se separó por filtración con succión y se secó a 50°C i.v.. Se obtuvieron 41 g de 2-(p-fluoroanilino)piridina (3); rendimiento 83%  
Fórmula empírica C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>; P.M. = 188,21; MS (M+H) 189,1.

25

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) 6,68-6,75 (m, 2H), 6,88 (s, 1H), 7,05 (t, 2H), 7,24-7,32 (m, 2H), 7,43-7,49 (m, 1H), 8,18 (d, 1H).

##### 30 A.2.) 2-(anilino)pirimidina (6)

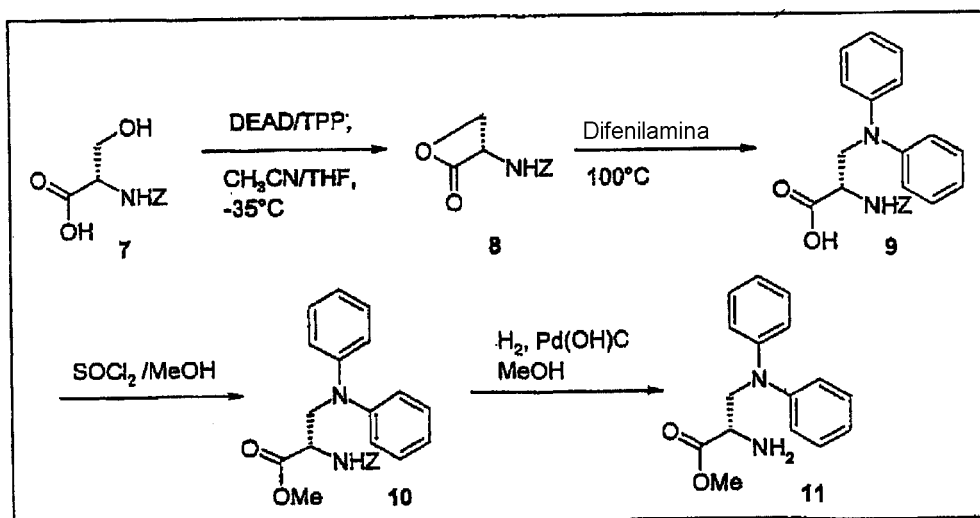


35

9,15 g (31%) de la anilinoimidazina 6 se obtuvieron a partir de 16,2 g de anilina (4) por reacción con 2-cloropirimidina (5) de una manera análoga a la descrita en el apartado A.1.).  
Fórmula empírica C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>; P.M. = 171,08; MS (M+H) 172,2.

#### B.) Síntesis de aminoácidos mediante la Z-serina-lactona 8

##### 40 B.1.) (S)-2-amino-3-difenilaminopropionato de metilo (11)

B.1.1.) N-benciloxi-carbonil-L-serina- $\beta$ -lactona (**8**)

- 5 54,8 g (0,209 mol) de trifenilfosfina se suspendieron en 600 ml de acetonitrilo, y la suspensión se enfrió desde  $-35^{\circ}\text{C}$  hasta  $-45^{\circ}\text{C}$  al tiempo que se excluía la humedad. A esta temperatura y en el espacio de 50 minutos se añadieron gota a gota 36,4 g (0,209 mol) de éster dietílico del ácido azodicarboxílico. Se agitó luego a  $-35^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Después se añadió lentamente gota a gota a esta mezcla una solución que consistía en 50 g (0,209 mol) de N-benciloxicarbonil-L-serina (**7**) en 500 ml de acetonitrilo, de modo que la temperatura no se elevara por encima de
- 10  $-35^{\circ}\text{C}$ . Después, la mezcla resultante se agitó a  $5^{\circ}\text{C}$  durante 12 h. Con el fin de terminar la reacción, la solución de reacción se liberó del disolvente a presión reducida, y el producto bruto se purificó mediante cromatografía a presión media sobre gel de sílice. (DCM/AcCN: 25/1). 20,8 g de N-benciloxi-carbonil-L-serina- $\beta$ -lactona (**8**) se obtuvieron después de haber separado el disolvente; rendimiento 45%; (véase también Org. Synth. 1991 (70) 1 y siguientes) en agujas finas. Fórmula empírica  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_4$ ; P.M. = 221,2; MS (M+H) 222,1.
- 15  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 4,30 (m, 1H), 4,45 (m, 1H), 5,10 (s, 2H), 5,22 (m, 2H), 7,45 (m, 5H), 8,20 (d, J = 9,8 Hz, 1H).

B.1.2.) Ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-3-difenilamino-propiónico (**9**)

- 20 5,0 g (22,6 mmol) de serina-lactona (**5**) se agitaron junto con 20 g (118,2 mmol) de difenilamina y la mezcla se agitó a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 2 h. El producto bruto se purificó por medio de cromatografía a presión media sobre gel de sílice. (DCM/metanol: 9/1, luego acetato de etilo/n-heptano: 4/1). Después de haber separado el disolvente, se obtuvieron 3,65 g (rendimiento 42%) de ácido 2-benciloxicarbonilamino-3-difenilamino-propiónico (**9**) puro. Fórmula empírica  $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$ ; P.M. = 390,44; MS (M+H) 391,2.
- 25  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 3,85 (m, 1H), 4,18 (m, 1H), 4,3 (m, 1H), 4,9 (m, 2H), 6,9 (m, 5H), 7,25 (m, 10H).

B.1.3.) Éster metílico del ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-3-difenilamino-propiónico (**10**)

- 30 6,5 ml (89,1 mmol) de cloruro de tionilo se añadieron gota a gota, a  $-5^{\circ}\text{C}$ , a 75 ml de metanol, y la mezcla se agitó durante 15 min. Después se añadieron 3,6 g (9,22 mmol) de ácido 2-benciloxicarbonilamino-3-difenilamino-propiónico (**9**), disueltos en 75 ml de metanol, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas (h) adicionales. Después de haber evaporado los disolventes, el residuo se recogió en acetato de etilo y el conjunto se extrajo con solución de carbonato de sodio. La purificación por medio de cromatografía de resolución rápida (n-heptano/acetato de etilo 7:3) proporcionó 2,76 g (rendimiento del 50%) de éster metílico del ácido 2-benciloxicarbonilamino-3-difenilamino-propiónico (**10**).
- 35 Fórmula empírica  $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ ; P.M. = 404,47; MSD (M+H) 405,2.
- $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 3,58 (s, 3H), 3,95 (m, 1H), 4,18 (m, 1H), 4,4 (m, 1H), 4,95 (m, 2H), 6,9 (m, 6H), 7,3 (m, 9H), 7,85 (d, J = 9,8 Hz, 1H).

B.1.4.) Éster metílico del ácido (S)-2-amino-3-difenilamino-propiónico (**11**)

- 40 Con el fin de eliminar el grupo protector Z, 2,7 g (6,68 mmol) del derivado Z-protegido (**10**) se disolvieron en 500 ml de metanol, y 100 mg de catalizador ( $\text{Pd}(\text{OH})_2$  al 10%-C) se suministraron bajo una atmósfera protectora de nitrógeno. A continuación, el gas inerte se desplazó con un gran exceso de hidrógeno, y la mezcla se sacudió durante 2 h en la



atmósfera de hidrógeno. Con el fin de terminar la reacción, el catalizador se separó por filtración y el filtrado se concentró. Se obtuvieron 1,65 g (rendimiento: 91%) de éster metílico del ácido (S)-2-amino-3-difenilamino-propiónico (**11**).  
Fórmula empírica  $C_{16}H_{18}N_2O_2$ ; P.M. = 270,32; MS (M+H) 271,2.

$^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 3,45 (s, 3H), 3,58 (m, 1H), 3,8 (m, 1H), 3,95 (m, 1H), 6,9 (m, 6H), 7,3 (m, 4H).

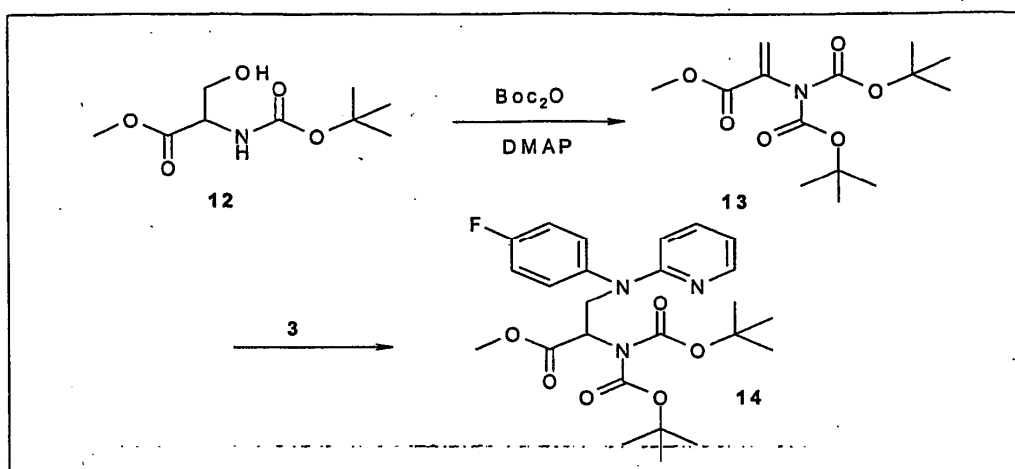
5

B.2.) Síntesis de aminoácidos por medio del ácido acrílico **13**.

B.2.1.) Separación de los enantiómeros

10 Los aminoácidos racémicos que se prepararon por medio del ácido acrílico se separaron en los enantiómeros por medio de HPLC preparativa utilizando fases quirales tales como Chiralpak AD (Daicel) 100 x 380, RT, caudal 300 ml/min. La pureza de los enantiómeros pudo determinarse por medio de HPLC analítica tal como Chiralpak-AD-H (Daicel) 4,6 x 250, 30°C, caudal 1 ml/min, temperatura ambiente).

15 B.2.2. Éster metílico del ácido (3-(N-4-fluorofenil-N-2-piridil)-amino)-2-(di-terc.-butiloxicarbonil)-aminopropiónico (**14**)



B.2.2.1) Éster metílico del ácido 2-(di-terc.-butiloxicarbonil)-amino-acrílico (**13**)

20

50 g (0,228 mol) de Boc-serina (**12**) se disolvieron en 300 ml de acetonitrilo. Se añadieron 107 g (0,493 mol) de anhídrido Boc y 2,64 g (22 mmol) de DMAP. La mezcla se agitó a RT durante una noche, después de lo cual el disolvente se separó i.v. y el residuo se recogió en 500 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con 500 ml de HCl 1 N y se secó utilizando sulfato de magnesio. Se obtuvieron 23 g del ácido acrílico **13** mediante cristalización en 200 ml de heptano a -30°C y después de filtración con succión. Las aguas madre se concentraron y el residuo se disolvió en 140 ml de acetonitrilo. Se añadieron 31 g (0,142 mol) de anhídrido Boc y 1,26 g (10 mmol) de DMAP. Después de calentar a 50°C durante 8 h, el disolvente se separó i.v., y el residuo se recogió en 500 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con 400 ml de HCl 1 N y se secó sobre sulfato de magnesio. Después de haber separado el disolvente i.v., se obtuvieron 31,5 g adicionales del acrilato **13** mediante cristalización en heptano. Rendimiento 54,5 g (0,181 mol) 79%.

25

30 Fórmula empírica  $C_{14}H_{23}NO_6$ ; P.M. = 301,34; MS ((M\*2)+Na<sup>+</sup>) 625,7.

$^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 1,40 (s, 18H), 3,74 (s, 3H), 5,85 (s, 1H), 6,28 (s, 1H).

B.2.2.2.) Éster metílico del ácido (3-(N-4-fluorofenil-N-2-piridil)-amino)-2-(di-terc.-butiloxicarbonil)-amino-propiónico (**14**)

35

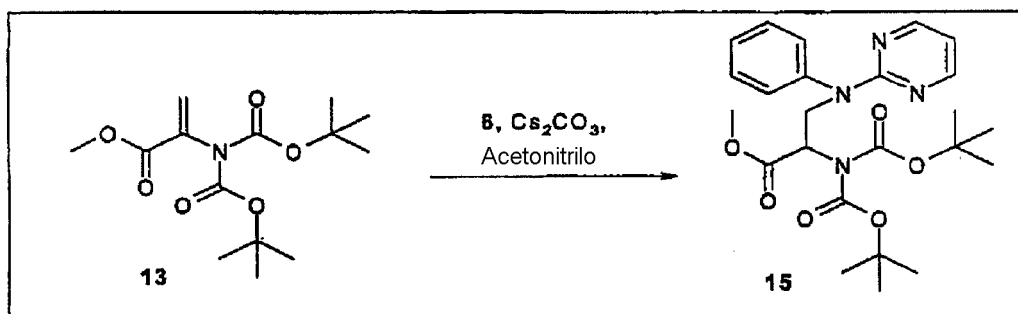
11,5 g (38,2 mmol) de acrilato **13** se mezclaron con 7,2 g (38,2 mmol) de anilina **3** y 37,3 g (114 mmol) de carbonato de cesio. Se añadieron 100 ml de acetonitrilo, y se agitó a 55°C durante 2 días. Después de ello, se agitó a RT durante 2 días adicionales. Los sólidos se separaron por filtración con succión a través de infusorios y se lavaron 3 veces, en cada caso con 100 ml de acetonitrilo. El disolvente se separó de las fases orgánicas reunidas i.v., el residuo se cromatografió sobre gel de sílice utilizando heptano/acetato de etilo 4:1. Rendimiento: 14 g (75%) de **14**.

40

Fórmula empírica  $C_{25}H_{32}FN_3O_6$ ; P.M. = 489,55; MS (M+H) 490,6.

$^1H$  RMN ( $CDCl_3$ ) 1,28 (s, 18H), 3,72 (s, 3H), 4,25 (dd, 1H), 4,75 (dd, 1H), 5,83 (dd, 1H), 6,22 (d, 1H), 6,56-6,61 (m, 1H), 7,05-7,12 (m, 2H), 7,19-7,26 (m, 3H), 8,18 (d, 1H).

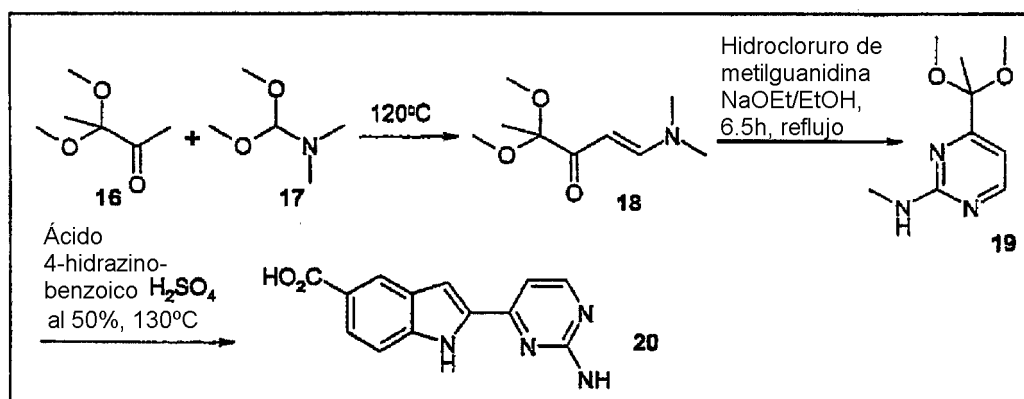
B.2.3.) Éster metílico del ácido (3-(N-fenil-N-2-pirimidil)-amino)-2-(di-terc.-butiloxicarbonil)-amino-propiónico (**15**)



3 g (7%) del aminoácido **15** se obtuvieron a partir de 35 g de **6** llevando a cabo la reacción de una manera análoga a la descrita en el apartado B.2.2.2.).

5 Fórmula empírica  $C_{24}H_{32}N_4O_6$ ; P.M. = 472,23; MS (M+H) 473,1.

C.) Síntesis de los cuerpos básicos heterocíclicos



10

C.1.) Síntesis del cuerpo básico indol:

Ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**20**)

15 C.1.1.) 1-dimetilamino-4,4-dimetoxipent-1-en-3-ona (**18**)

100 g (0,76 mol) de 3,3-dimetoxi-2-butanona (**16**) se agitaron junto con 90,2 g de N,N-dimetilformamida-dimetil-acetal (**17**) (0,76 mol) a 120°C durante 48 h. El metanol que se formó en la reacción se separó continuamente de la solución de reacción por medio de destilación. La cristalización se produjo espontáneamente cuando se enfrió la solución, completándose la cristalización al añadir un poco de heptano. Esto dio como resultado 128,24 g de producto bruto **18** (rendimiento 90%) que se hicieron reaccionar sin purificación adicional.

20

Fórmula empírica  $C_9H_{17}NO_3$ ; P.M. = 187,24; MS (M+H) 188,2.

$^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 1,22 (s, 3H), 2,80 (s, 3H), 3,10 (s, 9H), 5,39 (d, J = 15 Hz, 1H), 7,59 (d, J = 15 Hz, 1H).

25 C.1.2.) [4-(1,1-dimetoxi-etil)-pirimidin-2-il]-metil-amina (**19**)

1,22 g (53 mmol) de sodio se disolvieron en 100 ml de etanol absoluto. A esta solución se añadieron, con agitación, 5,8 g (53 mmol) de hidrocloreto de metilguanidina y 10 g (53 mmol) de 1-dimetilamino-4,4-dimetoxipent-1-en-3-ona (**18**) y el conjunto se calentó a la temperatura de ebullición durante 4 h. Con el fin de terminar la reacción, el etanol se evaporó. El producto así resultante **19** se utilizó para la subsiguiente reacción sin purificación adicional. Rendimiento 11,5 g (58 mmol, cuantitativo)

30

Fórmula empírica  $C_9H_{15}N_3O_2$ ; P.M. = 197,24; MS (M+H) 198,2.

$^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 1,45 (s, 3H), 2,78 (s, 3H), 3,10 (s, 6H), 6,75 (d, J = 3 Hz, 1H), 7,0-7,1 (s(b), 1H), 8,30 (d, J = 3 Hz, 1H).

35

C.1.3.) Ácido 2-(2-metilaminopirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**20**)

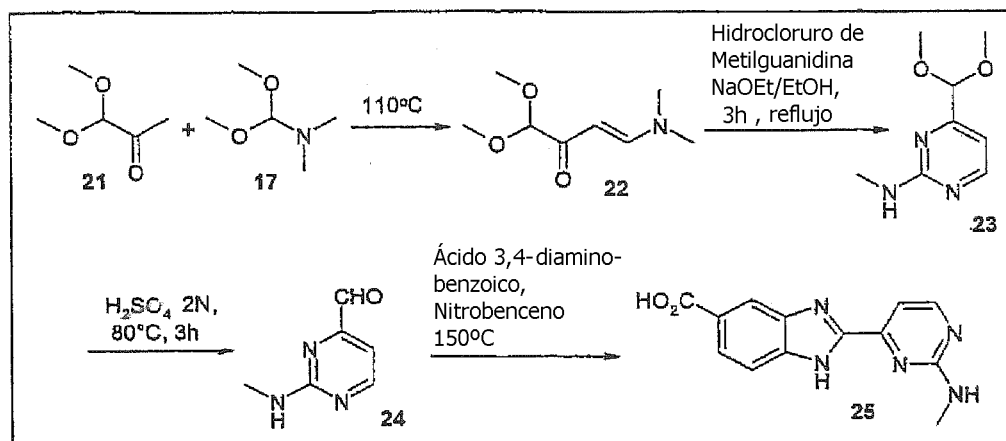
5 g (25 mmol) de [4-(1,1-dimetoxi-etil)-pirimidin-2-il]-metil-amina (**19**) y 3,85 g ácido 4-hidrazinobenzoico, se añadieron, a la temperatura ambiente y al tiempo que se agitaba, a 150 ml de ácido sulfúrico al 50%, y la mezcla se calentó a 130°C durante 4 h. El metanol que se formó en la reacción se separó continuamente de la solución de reacción por medio de destilación. Después de haber sido enfriado hasta 10°C, la mezcla de reacción se vertió sobre 200 ml de hielo y se ajustó a un pH de aproximadamente 5,5 con lejía de sosa concentrada. El precipitado de sulfato de sodio y la mezcla de producto que se formó en este caso se separó por filtración y el residuo del filtro se extrajo varias veces con metanol. Los extractos en metanol reunidos se concentraron y el producto **20** se purificó por medio de cromatografía de resolución rápida (DCM/metanol 9:1). Rendimiento: 0,76 g (11%).

Fórmula empírica C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>; P.M. = 268,28; MS (M+H) 269,1.

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) 2,95 (s, 3H), 6,90-7,10 (s(b), 1H), 7,18 (d, J = 3 Hz, 1H), 7,4 (s, 1H), 7,58 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 7,80 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 8,30 (s, 1H), 7,80 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 8,38 (d, J = 3 Hz, 1H), 11,85 (s, 1H), 12,40-12,60 (s(b), 1H).

C.2.) Síntesis del cuerpo básico bencimidazol:

Ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (**25**)



C.2.1.) 4-dimetilamino-1,1-dimetoxibut-but-3-en-2-ona (**22**)

300 g (307 ml, 2,54 mol) de metilglioxal-dimetil-acetal (**21**) se agitaron, a 110°C durante 4 horas (h), junto con 303 g (337 ml, 2,54 mol) de N,N-dimetilformamida-dimetil-acetal (**17**). El metanol que se formó durante la reacción se separó continuamente de la solución de reacción por destilación. Después de enfriar la solución de reacción, ésta se extrajo con heptano, y los disolventes se evaporaron. Esto dio como resultado 303 g de producto **22** bruto (rendimiento 70%), que se hizo reaccionar sin purificación adicional.

Fórmula empírica C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>; P.M. = 173,21; MS (M+H) 174,1.

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) 2,10 (s, 1H), 2,80 (s, 3H), 3,10 (s, 3H), 3,25 (s, 3H), 3,3 (s, 3H), 4,42 (s, 1H), 5,19 (d(b), J = 12,8 Hz, 1H), 7,60 (d, J = 15 Hz, 1H).

C.2.2.) (4-dimetoximetil-pirimidin-2-il)-metil-amina (**23**)

0,33 g (14,4 mmol) de sodio se disolvieron en 50 ml de etanol absoluto. 1,57 g (14,4 mmol) de hidrocloreto de metilguanidina y 2,48 g (14,4 mmol) de 4-dimetilamino-1,1-dimetoxi-but-3-en-2-ona (**22**) se añadieron a esta solución al tiempo que se agitaba, y el conjunto se calentó a la temperatura de ebullición durante 3 h. La reacción se terminó evaporando el etanol. El producto **23** así obtenido se utilizó sin purificación adicional. Rendimiento 2,6 g (cuantitativo).

Fórmula empírica C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>; P.M. = 183,21; MS (M+H) 184,1.

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) 2,78 (s, 6H), 3,10 (s, 3H), 5,02 (s, 1H), 6,62 (d, J = 3 Hz, 1H), 8,30 (d, J = 3 Hz, 1H).

C.2.3.) 2-metilaminopirimidina-4-carbaldehído (**24**)

10 g (54 mmol) de (4-dimetoximetil-pirimidin-2-il)metil-amina (**23**) se disolvieron en 54 ml de ácido sulfúrico 2N, y la solución se calentó a 80°C durante 3 h al tiempo que se agitaba. Después de haber enfriado la reacción, la solución de reacción se llevó cuidadosamente a un pH de aproximadamente 9 utilizando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sólido y se extrajo 3 veces con

etanol. Los extractos secados reunidos proporcionaron el aldehído **24** del título en un rendimiento del 60% (4,47 g) después de haber evaporado el disolvente.

Fórmula empírica  $C_6H_7N_3O$ ; P.M. = 137,12; MS (M+H) 138,2.

$^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 2,60-2,80 (s(b), 3H), 6,95 (d, J = 3 Hz, 1H), 7,40 - 7,60 (s(b), 1H), 8,55 (d, J = 3 Hz, 1H).

5

C.2.4.) Ácido 2-(2-metilaminopirimidin-4-il)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (**25**)

4,3 g (31,3 mmol) de metilaminopirimidina-4-carbaldehído (**24**) y 4,8 g (31,1 mmol) de ácido 3,4-diaminobenzoico se calentaron a 150°C durante 2 h en 300 ml de nitrobenzenceno. Después de haber enfriado la mezcla hasta 0°C, el precipitado del bencimidazol se separó del nitrobenzenceno por filtración, y el producto **25** se purificó por medio de cromatografía de resolución rápida (DCM/metanol 4:1). Rendimiento: 2,66 g (32%),

Fórmula empírica  $C_{13}H_{11}N_5O_2$ ; P.M. = 269,28; MS (M+H) 270,2.

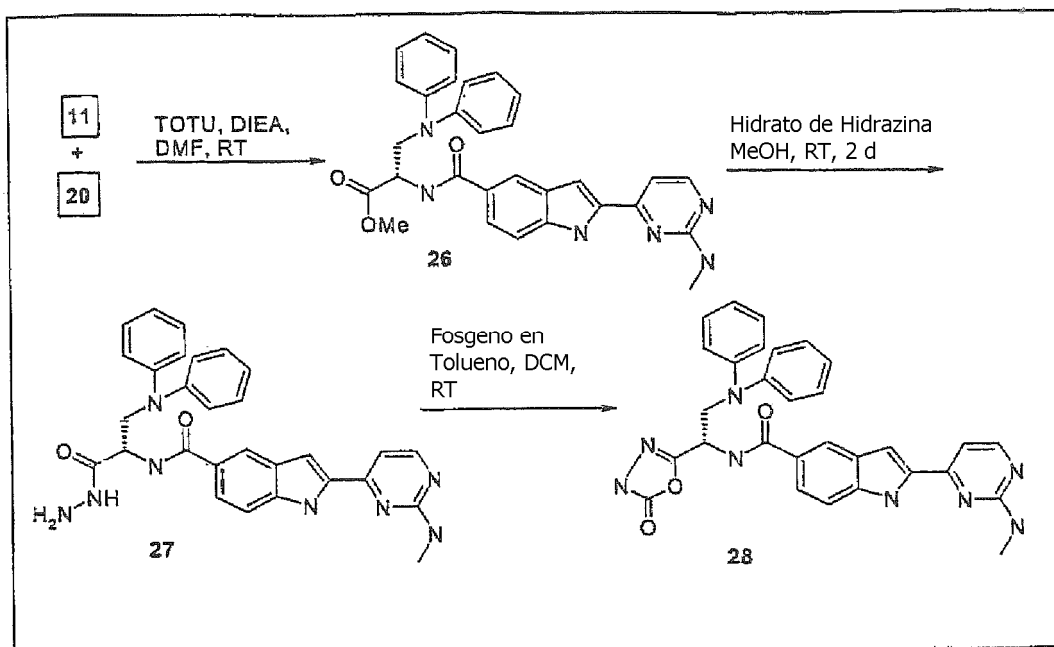
$^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 2,95 (s, 3H), 7,50 (d, J = 3 Hz, 1H), 7,75 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 7,90 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,55 (d, J = 3 Hz, 1H), 8,70-9,05 (s(b), 1H).

15

D.) Productos finales de indol

D.1.) [(S)-2-difenilamino-1-(5-oxo-4,5-dihidro[1,3,4]oxadiazol-2-il)-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**28**)

20



D.1.1.) Éster metílico del ácido 3-difenilamino-2-[[2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carbonil]-(S)-amino]- propiónico (**26**)

25

5,0 g (18,64 mmol) de ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**20**) se disolvieron en 1,2 l de DMF y luego se mezclaron consecutivamente con 7,9 g (24,08 mmol) de TOTU y 7,9 ml (46,45 mmol) de etilidipropilamina. Se agitó a 5°C durante 20 min, y a la solución se añadieron 0,73 g (3,28 mmol) de éster metílico del ácido (S)-2-amino-3-difenilamino-propiónico (**11**). Después de haber agitado durante 15 h, se concentró a presión reducida, el residuo se recogió en n-butanol y la fase orgánica se extrajo con una solución saturada de hidrógeno-carbonato de sodio con el fin de separar los subproductos. Después de haber secado con  $MgSO_4$  y de haber concentrado la fase orgánica, el éster metílico del compuesto del título **26** se aisló mediante cromatografía de resolución rápida sobre gel de sílice (DCM:MeOH = 19:1). Rendimiento: 4,3 g (98%).

30

Fórmula empírica  $C_{30}H_{28}N_6O_3$ ; P.M. = 520,22; MS (M+H) 521,3.

$^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 2,95 (s(b), 3H), 3,60 (s, 3H), 4,19-4,58 (m, 2H), 4,85 (q, 1H), 6,90-7,10 (m, 7H), 7,18 (d, J = 3 Hz, 1H), 7,25-7,40 (m, 5H), 7,50 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 7,65 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 8,05 (s, 1H), 8,35 (d, J = 3 Hz, 1H), 8,70 (d, J = 3,75 Hz, 1H), 11,85 (s, 1H).

35

D.1.2.) ((S)-2-difenilamino-1-hidrazino-carbonil-etil)-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**27**)

1,0 g (1,92 mmol) de éster metílico del ácido 3-difenilamino-2-[[2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carbonil]- (S)-amino]-propiónico (**26**) se disolvió en 10 ml de metanol, se mezclaron con 0,48 g (9,95 mmol) de hidrato de hidrazina, y se agitó a RT durante 15 h. El precipitado del producto (0,3 g) se separó de las aguas madre mediante filtración. Hidrazida **27** adicional (0,1 g) se aisló de las aguas madre concentradas por medio de cromatografía de resolución rápida sobre gel de sílice (DCM:MeOH = 19:1). Rendimiento: 0,4 g (40%).

Fórmula empírica  $C_{29}H_{28}N_8O_2$ ; P.M. = 520,6; MS (M+H) 521,4.

$^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 2,95 (s(b), 3H), 4,02-4,58 (m, 2H), 4,4 (s, 2H), 4,85 (q, 1H), 6,90-7,10 (m, 7H), 7,18 (d, J = 3 Hz, 1H), 7,20-7,45 (m, 5H), 7,50 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 7,62 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 7,99 (s, 1H), 8,25 (d, J = 3 Hz, 1H), 8,35 (s(b), 1H), 9,30 (s, 1H), 11,70 (s, 1H).

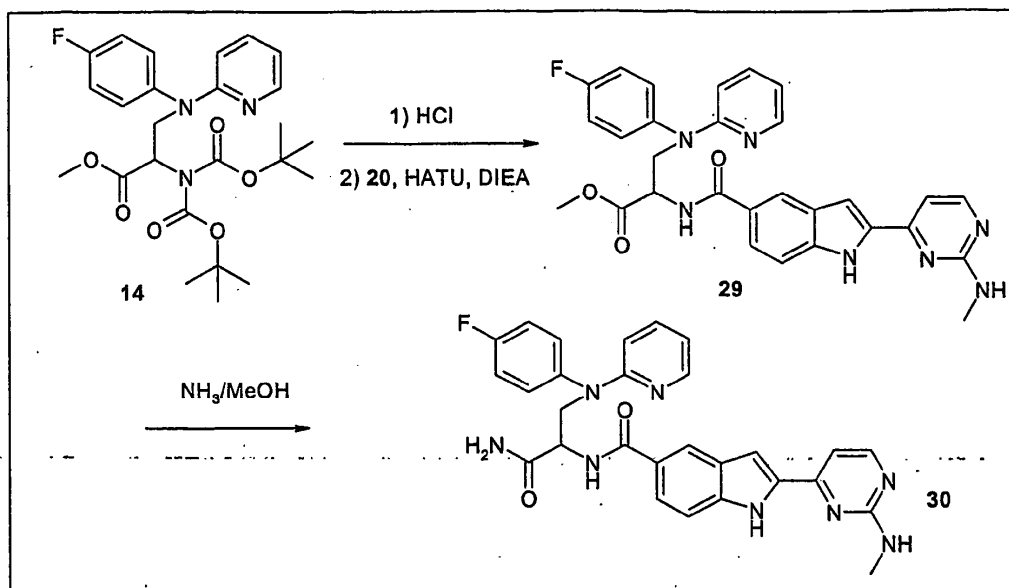
D.1.3.) [(S)-2-difenilamino-1-(5-oxo-4,5-dihidro[1,3,4]-oxadiazol-2-il)-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**28**)

200 mg (0,384 mmol) de ((S)-2-difenilamino-1-hidrazinocarbonil-etil)-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**27**) se suspendieron en 20 ml de cloruro de metileno y se añadió gota a gota a 0°C, mientras se agitaba, una solución al 20% de fosgeno en tolueno (0,398 mmol). Se agitó a la temperatura ambiente durante 15 h adicionales y el disolvente se evaporó. A continuación, la oxadiazolona **28** se aisló mediante cromatografía de resolución rápida sobre gel de sílice (DCM:MeOH = 19:1). Rendimiento: 160 mg (76%).

Fórmula empírica  $C_{30}H_{26}N_8O_3$ ; P.M. = 546,6; MS (M+H) 547,3.

$^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 2,95 (s(b), 3H), 4,02-4,58 (m, 2H), 4,85 (q, 1H), 6,90-7,10 (m, 7H), 7,15 (d, J = 3 Hz, 1H), 7,20-7,40 (m, 6H), 7,52 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 7,68 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,92 (d, J = 3 Hz, 1H), 11,78 (s, 1H), 12,15-12,40 (s(b), 1H).

D.2.) {1-carbamoil-2-[(4-fluorofenil)-piridin-2-il-amino]-etil}-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**30**)



D.2.1.) Éster metílico del ácido 3-[(4-fluoro-fenil)-piridin-2-il-amino]-2-[[2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carbonil]-amino]-propiónico (**29**)

0,75 g (1,53 mmol) de **14** se disolvieron en 10 ml de dioxano, y se enfrió hasta 0°C. Se añadieron 10 ml de HCl 4 N en dioxano y se dejó llegar a RT en el espacio de 2 h y se agitó subsiguientemente durante 12 h. El disolvente se separó i.v.. El residuo se recogió en 10 ml de DMF (**solución A**). 617 mg del ácido **20** se disolvieron en 20 ml de DMF, y se enfrió hasta 0°C. Se añadieron 1,05 g de HATU y 1,6 ml de DIEA. Después de haber agitado a 0°C durante 40 minutos, se añadió la **solución A**. Se dejó llegar a RT y luego se agitó subsiguientemente durante 4 h. El disolvente se separó i.v. y el residuo se repartió entre 100 ml de una solución saturada (sat.) de  $NaHCO_3$  y 100 ml de acetato de etilo. La fase acuosa

se extrajo 3 veces con en cada caso 50 ml de acetato de etilo, y las fases orgánicas reunidas se lavaron con 100 ml de una solución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó con sulfato de magnesio. Los disolventes se separaron i.v. y el residuo se cromatografió sobre gel de sílice con heptano/acetato de etilo 1:3. Se obtuvieron 560 mg (68%) del éster **29**.  
Formula empírica  $C_{29}H_{26}FN_7O_3$ ; P.M. = 539,57; MS (M+H) 540,2.

5

D.2.2.) {1-carbamoil-2-[(4-fluoro-fenil)piridin-2-il-amino]-etil}-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**30**)

320 mg (0,593 mmol) del éster **29** se disolvieron, a 0°C, en 50 ml de metanol saturado con amoniaco. Se agitó durante 24 h y luego se dejó llegar a RT. Los disolventes se separaron i.v. y el residuo se precipitó en 5 ml de acetato de etilo. El sólido se separó por filtración con succión y se secó a 50°C i.v.. Se obtuvieron 270 mg (87%) de la amida **30**.

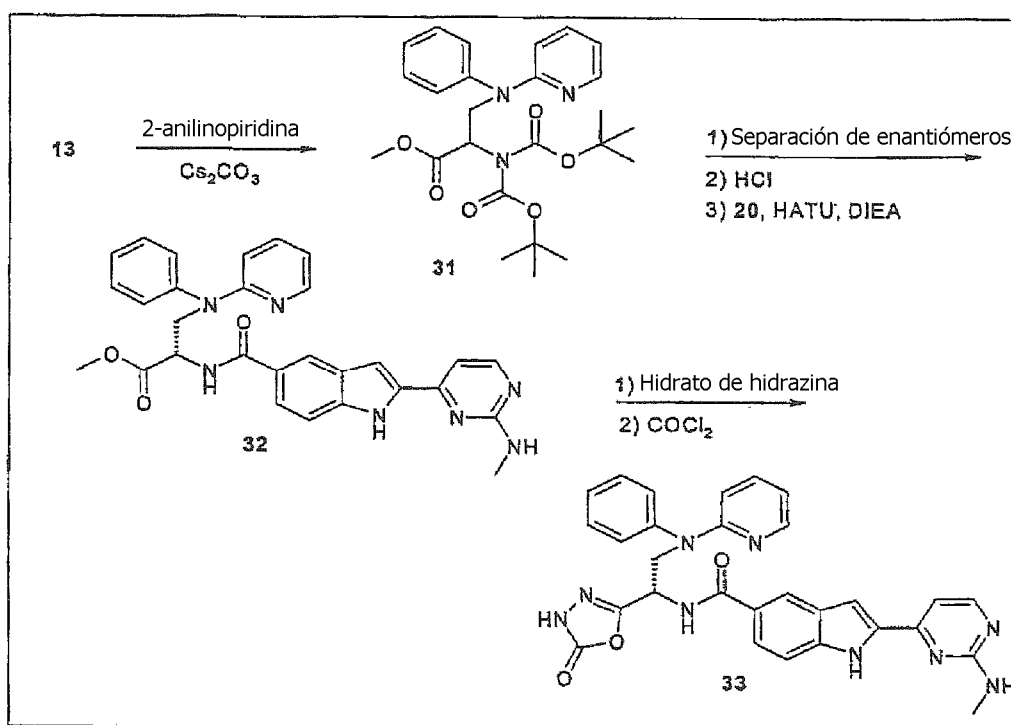
10

Formula empírica  $C_{28}H_{25}FN_8O_2$ ; P.M. = 524,56; MS (M+H) 525,2.

$^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 2,45 (s, 3H), 4,10 (d, 1H), 4,52-4,66 (m, 2H), 6,26 (d, 1H), 6,77 (t, 1H), 7,02 (bs, 1H), 7,09-7,17 (m, 2H), 7,22-7,32 (m, 5H), 7,38-7,46 (m, 1H), 7,47-7,58 (m, 3H), 7,92 (s, 1H), 8,27-8,36 (m, 2H), 8,59 (d, 1H), 11,70 (s, 1H).

15

D.3.) [(S)-1-(5-oxo-4,5-dihidro-1,2,3-oxadiazol-2-il)-2-(fenil-piridin-2-il-amino)-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**33**)



20

D.3.1.) Éster metílico del ácido (3-(N-fenil-N-2-piridil)-amino)-2-(di-terc.-butiloxycarbonil)-amino-propiónico (**31**)

4,96 g (16,5 mmol) de acrilato **13** se mezclaron con 5,6 g (32,9 mmol) de 2-anilino-piridina y 32,16 g (98,7 mmol) de carbonato de cesio. Se añadieron 50 ml de acetonitrilo, y se agitó a 45°C durante 2 días. El sólido se separó por filtración con succión a través de tierra de infusorios y se lavó 3 veces con en cada caso 100 ml de acetonitrilo. Las fases orgánicas reunidas se evaporaron y el residuo se cromatografió sobre gel de sílice utilizando heptano/dietiléter 1:1. Se obtuvieron 5,66 g (73%) del éster **31**.

25

Fórmula empírica  $C_{25}H_{33}N_3O_6$ ; P.M. = 471,56; MS (M+H) 472,2.

D.3.2.) Los enantiómeros se separaron según se describe en el apartado B.2.1).

30

D.3.3.) Éster metílico del ácido 2-[[2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carbonil]-amino]-3-(fenil-piridin-2-il-amino)-propiónico de metilo (**32**)

2,9 g del enantiómero S de **31** se disolvieron en 30 ml de dioxano, y se enfrió a 0°C. Se añadieron 30 ml de HCl 4 N en

35

dioxano, después de lo cual se dejó llegar a RT y luego se agitó durante 12 h. El disolvente se separó i.v.. El residuo se recogió en 30 ml de DMF (**solución A**). 2,47 g (9,2 mmol) del ácido **20** se disolvieron en 50 ml de DMF y se enfriaron hasta 0°C. Se añadieron 4,21 g de HATU y 6,4 ml de DIEA. Después de haber agitado a 0°C durante 45 minutos, se dejó llegar a RT y se añadió **solución A**. Se agitó a RT durante 12 h. El disolvente se separó i.v. y el residuo se repartió entre 300 ml de una solución sat. de NaHCO<sub>3</sub> y 300 ml de acetato de etilo. La fase acuosa se extrajo 3 veces con en cada caso 100 ml de acetato de etilo, y las fases orgánicas reunidas se lavaron con 400 ml de una solución sat. de NaCl. La fase orgánica se secó con sulfato de magnesio. Los disolventes se separaron i.v. y el residuo se cromatógrafió sobre gel de sílice utilizando heptano/acetato de etilo 1:3. Se obtuvieron 1,78 g (55%) del éster **32**.

Formula empírica C<sub>29</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>; P.M. = 521,58; MS (M+H) 522,2.

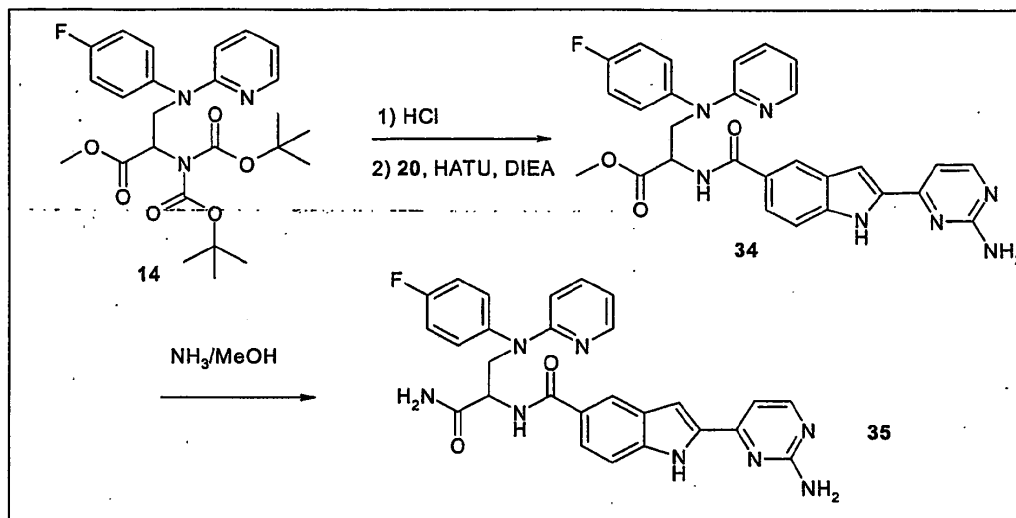
D.3.4.) [(S)-1-(5-oxo-4,5-dihidro-1,2,3-oxadiazol-2-il)-2-(fenil-piridin-2-il-amino)-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**33**)

1,78 g (3,4 mmol) del éster **32** se disolvieron en 30 ml de MeOH. Se añadieron 0,83 ml de hidrato de hidrazina, y se agitó a 40°C durante 5 h. Después de ello, se añadieron 1,6 ml adicionales de hidrato de hidrazina, y se agitó a RT durante 15 h. Los disolventes se separaron i.v. y el residuo se recogió en 80 ml de diclorometano. Se añadieron 3,2 ml de una solución al 20% de fosgeno en tolueno y se agitó durante 3 días. Después de ello, el disolvente se separó i.v. y el residuo se repartió entre 80 ml de agua y 80 ml de acetato de etilo. Con ello, precipitó un sólido y se separó por filtración con succión. La fase orgánica se concentró y el residuo se combinó con el sólido y se cromatógrafió sobre gel de sílice utilizando heptano/acetato de etilo 1:5. Se obtuvieron 390 mg (21%) de la oxadiazolona **33**.

Formula empírica C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>N<sub>9</sub>O<sub>3</sub>; P.M. = 547,58; MS (M+H) 548,2.

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) 2,96 (s, 3H), 4,30 (dd, 1H), 4,67 (dd, 1H), 5,40 (dd, 1H), 6,32 (d, 1H), 6,70-6,75 (m, 1H), 6,98 (bs, 1H), 7,16 (d, 1H), 7,22-7,33 (m, 4H), 7,38-7,46 (m, 3H), 7,52 (d, 1H), 7,63 (d, 1H), 8,08 (s, 1H), 8,21 (d, 1H), 8,31-8,35 (m, 1H), 9,00 (d, 1H), 11,72 (s, 1H), 12,15 (s, 1H).

D.4.) {1-carbamoil-2-[(4-fluoro-fenil)piridin-2-il-amino]-etil}-amida del ácido 2-(2-amino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**35**)



D.4.1.) Éster metílico del ácido 3-[(4-fluoro-fenil)-piridin-2-il-amino]-2-[[2-(2-amino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxil]-amino]-propiónico (**34**)

370 mg (46%) del éster metílico **34** se obtuvieron a partir de 750 mg de **14** cuando se llevó a cabo la reacción de una manera análoga a la descrita en el apartado D.2.1.).

Fórmula empírica C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>; P.M. = 525,55; MS (M+H) 526,2.

D.4.2.) {1-carbamoil-2-[(4-fluoro-fenil)piridin-2-il-amino]-etil}-amida del ácido 2-(2-amino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**35**)

95 mg (65%) de la amida **35** se obtuvieron a partir de 150 mg de **34** cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en el apartado D.2.2.).

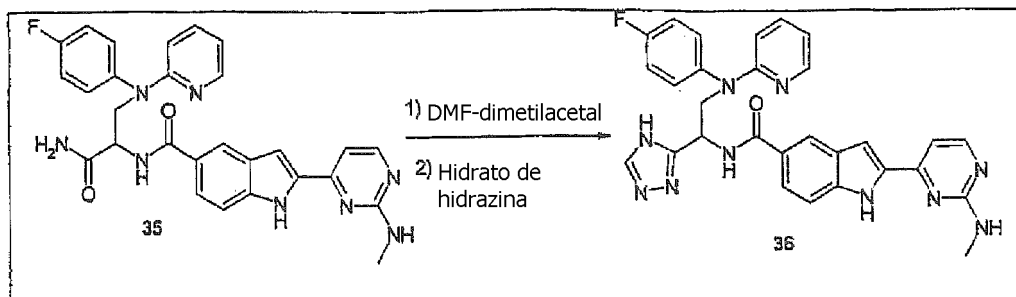
Fórmula empírica C<sub>27</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>8</sub>O<sub>2</sub>; P.M. = 510,54; MS (M+H) 511,2.

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) 4,08-4,17 (m, 1H), 4,54-4,65 (m, 2H), 6,29 (d, 1H), 6,54 (s, 2H), 6,74-6,80 (m, 1H), 7,10 (s, 1H), 7,18

(d, 1H), 7,22-7,31 (m, 4H), 7,38-7,56 (m, 6H), 7,92 (s, 1H), 8,29-8,35 (m, 2H), 8,74 (d, 1H), 11,80 (s, 1H).

D.5.) [2-[(4-fluoro-fenil)-piridin-2-il-amino]-1-(4H-[1,2,4]triazol-3-il)-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**36**)

5



30 mg (0,25 mmol) de la amida **35** se disolvieron en 10 ml de DMF. Se añadieron 40  $\mu$ l de DMF-dimetilacetal, y se calentó a 90°C durante 4 h. El disolvente se separó i.v. y el residuo se recogió en 3,5 ml de ácido acético. Después de haber añadido 27  $\mu$ l de hidrato de hidrazina, la mezcla se agitó durante 18 h. El disolvente se separó i.v. y el residuo se purificó por medio de HPLC preparativa. Se obtuvieron 84 mg (50%) del triazol **36**.

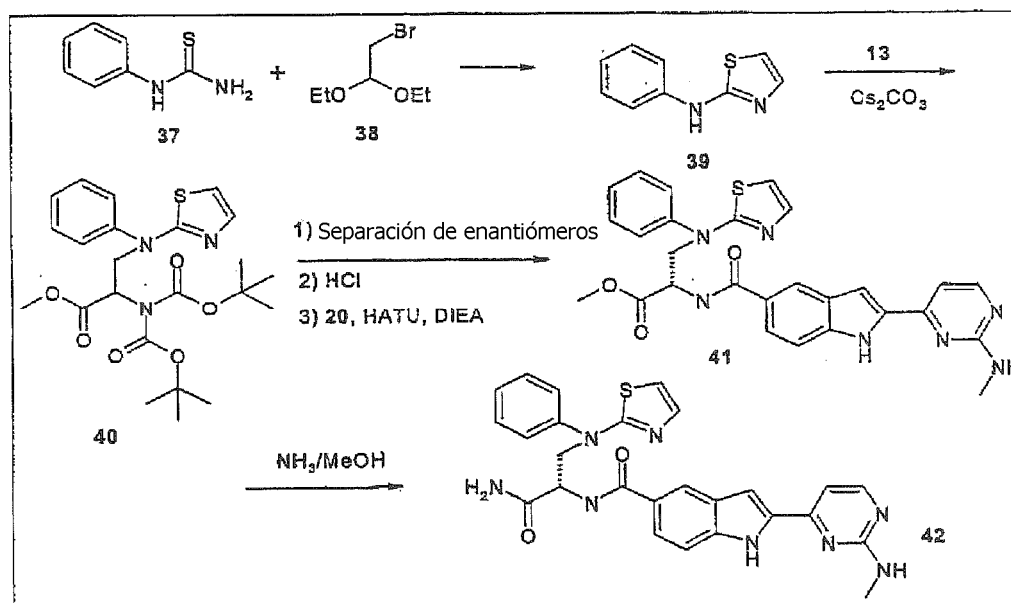
10

Fórmula empírica  $C_{29}H_{25}FN_{10}O$ ; P.M. = 548,59; MS (M+H) 549,2.

$^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 3,04 (s, 3H), 4,36-4,43 (m, 1H), 4,49-4,59 (m, 1H), 5,60-5,67 (m, 1H), 6,50 (d, 1H), 6,78 (t, 1H), 7,17-7,37 (m, 7H), 7,45-7,65 (m, 4H), 8,02 (s, 1H), 8,19 (d, 1H), 8,35 (d, 1H), 8,39 (d, 1H), 11,85 (s, 1H).

15

D.6.) [1-carbamoil-2-(fenil-tiazol-2-il-amino)etil]-amida del ácido S-2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**42**)



20 D.6.1.) feniltiazol-2-ilamina (**39**)

10 g (65,7 mmol) de feniltiourea **37** se disolvieron en 100 ml de ácido acético. Se añadieron 9,9 ml del acetal **38**, y la mezcla se calentó a 100°C durante 2 h. El disolvente se separó i.v. y el residuo se repartió entre 300 ml de NaOH 1 N y 300 ml de acetato de etilo. La fase acuosa se extrajo 2 veces con en cada caso 100 ml de acetato de etilo y las fases orgánicas reunidas se secaron con sulfato de magnesio. El disolvente se separó y el residuo se precipitó en 50 ml de diisopropil-éter. El sólido se separó por filtración con succión y se secó a 50°C i.v.. Se obtuvieron 2,5 g de anilina **39**. Las aguas madre de diisopropil-éter se concentraron y el residuo se cromatografió sobre gel de sílice utilizando heptano/acetato de etilo 2:1. Con ello se obtuvieron 3,5 g adicionales de **39**. Rendimiento: 6,0 g (52%).

25

Fórmula empírica  $C_9H_8N_2S$ ; P.M. = 176,24; MS (M+H) 177,1.



D.6.2.) Éster metílico del ácido (3-(N-fenil-N-2-tiazolil)-amino)-2-(di-terc.-butiloxycarbonil)-amino-propiónico (**40**)

4,5 g (75%) del éster **40** se obtuvieron a partir de 3,8 g (12,5 mmol) del acrilato **13**, 2,2 g (12,5 mmol) de la anilina **39** y 20 g de carbonato de cesio cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en el apartado D.3.1.)  
Fórmula empírica  $C_{23}H_{31}N_3O_6S$ ; P.M. = 477,58; MS (M+H) 478,2.

D.6.3.) Los enantiómeros se separaron según se describe en el apartado B.2.1.).

D.6.4.) Éster metílico del ácido S-2-[[2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carbonil]-amino]-3-(fenil-tiazol-2-il-amino)-propiónico (**41**)

640 mg (55%) de **41** se obtuvieron a partir de 1,07 g (2,2 mmol) del éster **40** y 901 mg (3,3 mmol) del ácido **20** cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en el apartado D.3.3.).

Fórmula empírica  $C_{27}H_{25}N_7O_3S$ ; P.M. = 527,61; MS (M+H) 528,1.

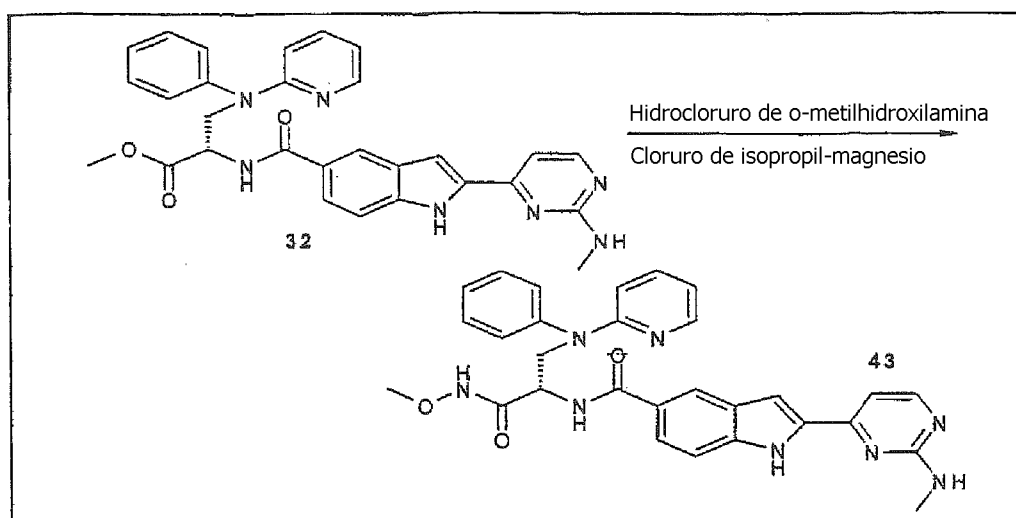
D.6.4.) [1-carbamoil-2-(fenil-tiazol-2-il-amino)-etil]-amida del ácido S-2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**42**)

340 mg (70%) de la amida **42** se obtuvieron a partir de 500 mg (0,95 mmol) de **41** cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en el apartado D.2.2.).

Fórmula empírica  $C_{26}H_{24}N_8O_2S$ ; P.M. = 512,60; MS (M+H) 513,3.

$^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 2,97 (s, 3H), 4,23-4,30 (m, 1H), 4,39-4,48 (m, 1H), 4,71-4,78 (m, 1H), 6,78 (d, 1H), 7,16 (d, 1H), 7,28-7,35 (m, 3H), 7,37-7,60 (m, 7H), 7,98 (s, 1H), 8,33 (d, 1H), 8,62 (d, 1H), 11,70 (s, 1H).

D.7.) [1-metoxicarbamoil-2-(fenil-piridin-2-il-amino)-etil]-amida del ácido S-2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**43**)

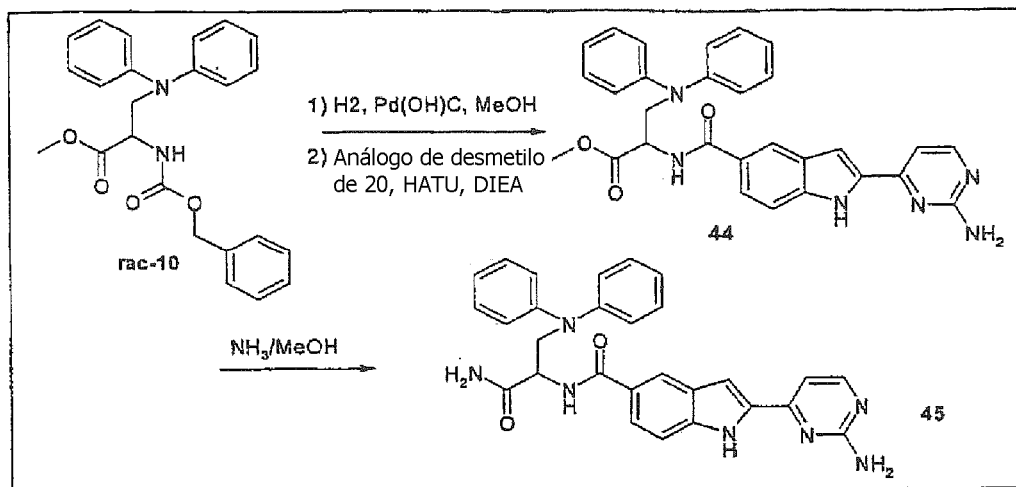


800 mg (0,95 mmol) de hidrocloreto de O-metilhidroxilamina se disolvieron en 10 ml de THF y se enfriaron hasta  $-40^{\circ}C$ . Se añadieron gota a gota 0,95 ml (1,9 mmol) de una solución 2 M de cloruro de isopropil-magnesio en THF. Se dejó llegar a  $-20^{\circ}C$  en el espacio de 1 h. Después se añadió gota a gota una solución de 100 mg (0,19 mmol) del éster **32** en 3 ml de THF. Se dejó llegar a RT en el espacio de 4 h, y la reacción se finalizó añadiendo 5 ml de agua. El THF se separó i.v. y el residuo se repartió entre 20 ml de una solución saturada de cloruro de amonio y 20 ml de acetato de etilo. La fase acuosa se extrajo 3 veces con en cada caso 20 ml de acetato de etilo y las fases orgánicas reunidas se secaron utilizando sulfato de magnesio. El disolvente se separó i.v. y el residuo se purificó por medio de HPLC preparativa. Se obtuvieron 60 mg (61%) del hidroxamato de metilo **43**.

Fórmula empírica  $C_{29}H_{28}N_8O_3$ ; P.M. = 536,60; MS (M+H) 537,2.

$^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 2,95 (s, 3H), 3,52 (s, 3H), 4,09-4,18 (m, 1H), 5,51-4,62 (m, 2H), 6,33 (d, 1H), 6,78 (t, 1H), 7,00 (bs, 1H), 7,18 (d, 1H), 7,25-7,33 (m, 4H), 7,49-7,61 (m, 5H), 7,98 (s, 1H), 8,29-8,36 (m, 2H), 8,79 (d, 1H), 11,31 (s, 1H), 11,75 (s, 1H).

D.8.) [1-carbamoil-2-[(fenil)-piridin-2-il-amino]-etil]-amida del ácido 2-(2-amino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (45)



5

D.8.1.) Éster metílico del ácido 3-[(fenil)-piridin-2-il-amino]-2-[[2-(2-amino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carbonil]-amino]-propiónico (**44**)

816 mg (80%) del éster metílico **44** se obtuvieron a partir de 540 mg de **rac-10** cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en los apartados B.1.4.) y D.1.1.).  
 Fórmula empírica  $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_3$ ; P.M. = 506,56; MS (M+H) 507,37.

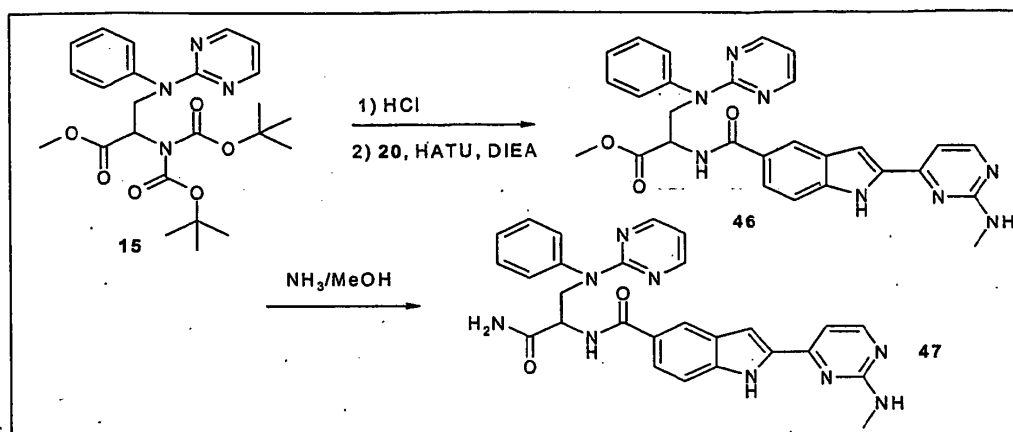
10

D.8.2.) [1-carbamoil-2-[(fenil)-piridin-2-il-amino]-etil]-amida del ácido 2-(2-amino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**45**)

162 mg (67%) de la amida **45** se obtuvieron a partir de 150 mg de **44** cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en el apartado D.2.2.).  
 Fórmula empírica  $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{N}_7\text{O}_2$ ; P.M. = 491,56; MS (M+H) 492,32.  
 $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 3,18 (s(b), 3H), 4,05-4,13 (m, 2H), 4,85 (q, 1H), 6,58 (s(b), 2H), 6,88-7,59 (m, 19H), 7,98 (s, 1H), 8,25 (d,  $J = 3$  Hz, 1H), 8,35 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 11,78 (s, 1H).

20

D.9.) {1-carbamoil-2-[(fenil)-pirimidin-2-il-amino]-etil}-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (47)



25

D.9.1.) Éster metílico del ácido 3-[(fenil)-pirimidin-2-il-amino]-2-[[2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carbonil]-amino]-propiónico (**46**)

1,75 mg (67%) del éster metílico **46** se obtuvieron a partir de 2,36 g de **15** cuando la reacción se llevó a cabo de una

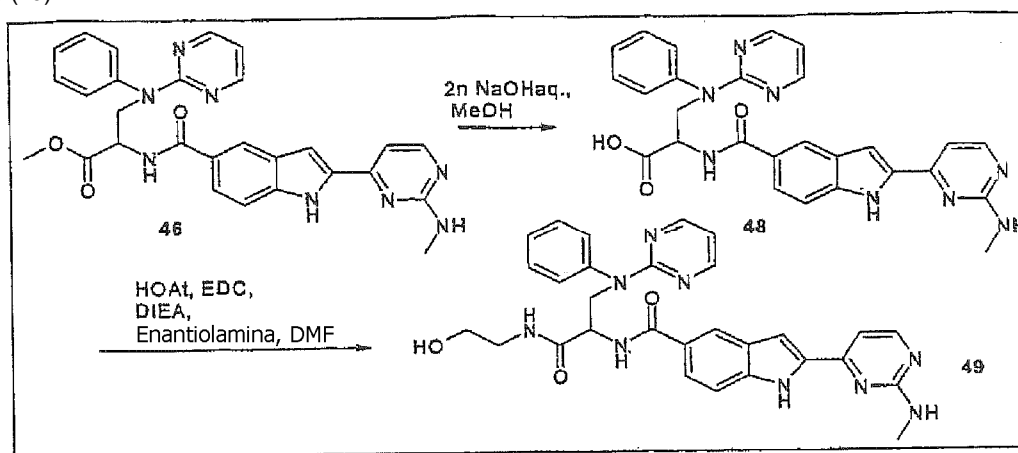
manera análoga a la descrita en el apartado D.2.1.).  
 Fórmula empírica  $C_{28}H_{26}N_8O_3$ ; P.M. = 522,57; MS (M+H) 523,3.

5 D.9.2.) {1-carbamoil-2-[(fenil)-pirimidin-2-il-amino]-etil}-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**47**)

440 mg (65%) de la amida **47** se obtuvieron a partir de 700 mg de **46** cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en el apartado D.2.2.).

10 Fórmula empírica  $C_{27}H_{25}N_9O_2$ ; P.M. = 507,21; MS (M+H) 508,4.  
 $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 3,0 (s(b), 3H), 4,20-4,32 (m, 1H), 4,45-4,59 (m, 2H), 4,75-4,90 (m, 1H), 6,75 (m, 1H), 7,10-7,60 (m, 12H), 7,95 (s, 1H), 8,35-8,45 (m, 4H), 11,85 (s(b), 1H).

D.10) [1-(2-hidroxiethylcarbamoil)-2-(fenil-pirimidin-2-il-amino)-etil]-amida del ácido 2-(metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**49**)



15 D.10.1.) Ácido 2-[[2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carbonil]-amino]-3-(fenil-pirimidin-2-il-amino)-propiónico (**48**)

20 4,0 g del éster metílico **46** se disolvieron en 400 ml de metanol. A ello se añadieron 40 ml de una solución acuosa 2 N de NaOH, y se agitó a la temperatura ambiente durante 12 h. Después de haber evaporado los disolventes, el residuo se disolvió con agua y el pH se ajustó a ~ 5 utilizando una solución saturada de  $NaH_2PO_4$ . El precipitado resultante se separó por filtración y se lavó con agua. Así se obtuvieron 1,3 g (rendimiento 93%) del ácido **48**.

Fórmula empírica  $C_{29}H_{26}N_8O_3$ ; P.M. = 506,21; MS (M+H) 507,3.

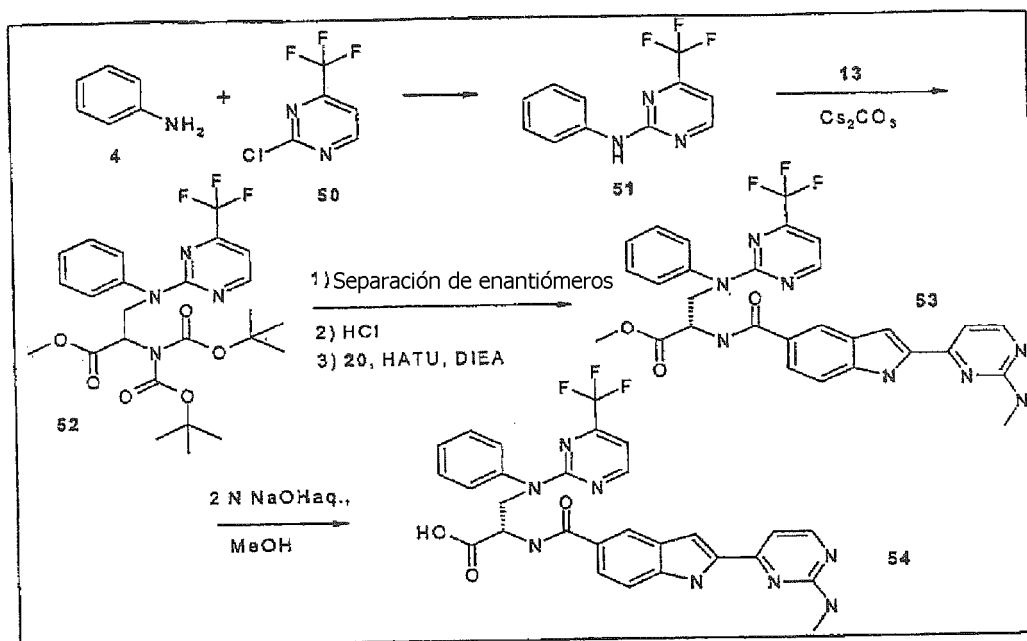
25 D.10.2.) [1-(2-hidroxiethylcarbamoil)-2-(fenil-pirimidin-2-il-amino)-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**49**)

30 200 mg del ácido **48** se disolvieron en 2 ml de DMF absoluta. Se añadieron 94 mg de HOAt y 158  $\mu$ l de DIEA. Luego se añadieron gota a gota 56  $\mu$ l de etanolamina y se enfrió hasta 0°C y se añadieron 195 mg de EDC. Después de agitar durante 2 días a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó y el producto bruto se purificó por medio de MPLC (eluyente: DCM:MeOH = 9:1). Rendimiento: 108 mg (50%) de la amida **49** del título.

Fórmula empírica  $C_{31}H_{31}N_9O_2$ ; P.M. = 549,64; MS (M+H) 550,4.

35  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 1,2 (t, 2H), 3,0 (s(b), 3H), 3,35 (t, 1H), 4,00-4,32 (m, 2H), 4,80-4,99 (m, 1H), 6,95 (m, 1H), 7,00-7,65 (m, 7H), 7,90 (m, 1H), 8,35-8,40 (m, 1H), 11,90 (s(b), 1H).

D.11.) Ácido (S)-2-[[2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carbonil]-amino]-3-[fenil-(4-trifluorometil-pirimidin-2-il)-amino]-propiónico (**54**)



D.11.1.) Fenil-(4-trifluorometil-pirimidin-2-il)-amina (**51**)

- 5 5,1 g (78%) de la anilina **51** se obtuvieron a partir de 5,1 g de la anilina (**4**) y 5 g de cloropirimidina **50** cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en el apartado A.1.).  
Fórmula empírica  $C_{11}H_8F_3N_3$ ; P.M. = 239,20; MS (M+H) 240,1.

D.11.2.) Éster metílico del ácido (3-(N-fenil-N-4-trifluorometilpirimidin-2-il)-amino)-2-di-terc.-butiloxycarbonil)-amino-propiónico (**52**)

- 10 3,9 g (86%) del éster **52** se obtuvieron a partir de 2,5 g (8,4 mmol) del acrilato **13**, 3 g (12,5 mmol) de la anilina **51** y 16 g (50 mmol) de carbonato de cesio cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en el apartado D.3.1.).  
15 Fórmula empírica  $C_{25}H_{31}F_3N_4O_6$ ; P.M. = 540,54; MS (M+H) 541,2.

D.11.3.) Los enantiómeros se separaron según se describe en el apartado B.2.1.).

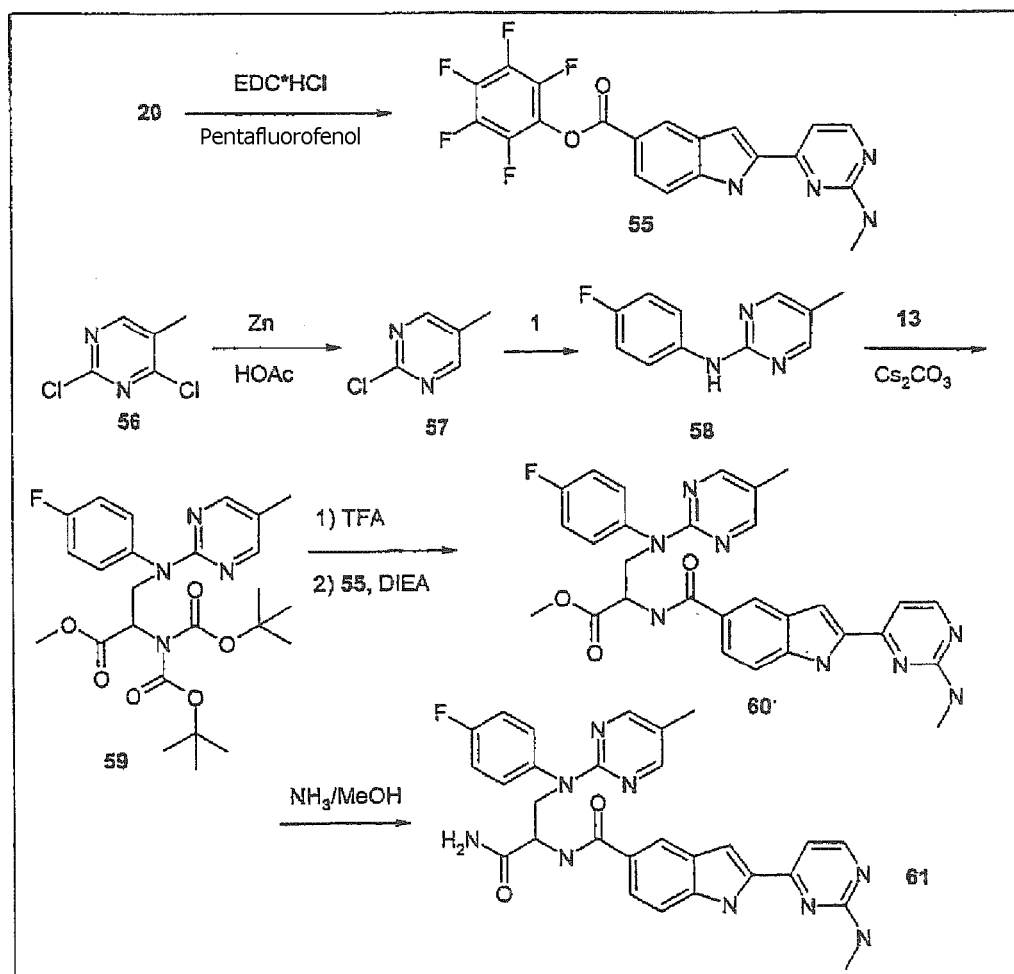
D.11.4.) Éster metílico del ácido S-2-[[2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carbonil]-amino]-3-[fenil-(4-trifluorometil-pirimidin-2-il)-amino]-propiónico (**53**)

- 20 467 mg (58%) de **53** se obtuvieron a partir de 743 mg (1,375 mmol) del enantiómero S del éster **52** y 550 mg (1,436 mmol) del ácido **20** cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en el apartado D.3.3.).  
25 Fórmula empírica  $C_{29}H_{25}F_3N_8O_3$ ; P.M. = 590,57; MS (M+H) 591,7.

D.11.5.) Ácido (S)-2-[[2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carbonil]-amino]-3-[fenil-(4-trifluorometil-pirimidin-2-il)-amino]-propiónico (**54**)

- 30 38 mg (40%) del ácido **54** se obtuvieron a partir de 97 mg (0,164 mmol) del éster **53** cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en el apartado D.10.1.).  
Fórmula empírica  $C_{28}H_{23}F_3N_8O_3$ ; P.M. = 576,54; MS (M+H) 577,7.  
 $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 2,95 (s, 3H), 4,27-4,34 (m, 1H), 4,54-4,63 (m, 1H), 4,83-4,92 (m, 1H), 6,90 (bs, 1H), 7,15 (d, 2H), 7,19-7,23 (m, 1H), 7,27-7,36 (m, 5H), 7,45-7,55 (m, 2H), 7,96 (s, 1H), 8,32 (s, 1H), 8,41 (bs, 1H), 8,66 (d, 1H), 11,70 (s, 1H).

- 35 D.12.) {1-carbamoi-2-[(4-fluorofenil)-(5-metil-pirimidin-2-il)-amino]-etil}-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**61**)

D.12.1.) Éster pentafluorofenílico del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**55**)

5 6,38 g (23,78 mmol) del ácido **20** se suspendieron en 100 ml de THF. A ello se añadieron 5,25 g (28,54 mmol) de pentafluorofenol y 5,47 g (28,54 mmol) de hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC\*HCl). Se agitó a RT durante 15 h, después de lo cual el disolvente se separó i.v. y el residuo se repartió entre 300 ml de una solución sat. de NaHCO<sub>3</sub> y 300 ml de acetato de etilo. Los sólidos se separaron por filtración a través de tierra de infusorios, y el residuo se lavó 2 veces con en cada caso 100 ml de acetato de etilo. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo 2 veces con en cada caso 100 ml de acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con 200 ml de una solución sat. de NaCl y luego se secaron con MgSO<sub>4</sub>. Después de haber separado los disolventes i.v., el residuo se cromatografió sobre gel de sílice utilizando heptano/acetato de etilo 1:1. Se obtuvieron 4,7 g (46%) del éster pentafluorofenílico **55**.  
 10 Fórmula empírica C<sub>20</sub>H<sub>11</sub>F<sub>5</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>; P.M. = 434,33; MS (M+H) 435,4.

D.12.2.) 2-cloro-5-metil-pirimidina (**57**)

15 10,0 g (61,35 mmol) de 2,4-dicloro-5-metilpirimidina (**56**) se disolvieron en 50 ml de THF. Se añadieron 12,93 g (184 mmol) de zinc y se calentó a reflujo. Después se añadió lentamente, gota a gota, una solución de 3,51 ml (61,35 mmol) de ácido acético en 10 ml de THF. Después de haber concluido la adición, se calentó a reflujo durante 1 h adicional. Se añadieron gota a gota 1,5 ml adicionales de ácido acético en 5 ml de THF y se calentó a reflujo durante 1 h. Luego se dejó enfriar hasta RT, después de lo cual se filtró a través de tierra de infusorios; a ello le siguieron 2 lavados con en cada caso 20 ml de THF. Los disolventes se separaron i.v. y el residuo se cromatografió sobre gel de sílice. Se obtuvieron 4,7 g (60%) de la cloropirimidina **57**.  
 20 Fórmula empírica C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>ClN<sub>2</sub>; P.M. = 128,56; MS (M+H) 129,2.

D.12.3.) (4-fluoro-fenil)-(5-metil-pirimidin-2-il)-amina (**58**)

1,8 g (45%) de la anilina **58** se obtuvieron a partir de 2,5 g (19,45 mmol) de 2-cloro-5-metilpirimidina (**57**) y 2,7 g (24,31 mmol) de 4-fluoroanilina (**1**) cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en el apartado A.1.). Fórmula empírica  $C_{11}H_{10}FN_3$ ; P.M. = 203,22; MS (M+H) 204,2.

5 D.12.4.) Éster metílico del ácido (3-N-4-fluoro-fenil-N-5-metil-pirimidin-2-il)-amino)-2-di-terc.-butiloxicarbonil)-amino-propiónico (**59**)

2,88 g (64%) del éster **59** se obtuvieron a partir de 2,67 g (8,86 mmol) del acrilato **10**, 1,8 g (8,86 mmol) de la anilina **58** y 8,66 g (26,58 mmol) de carbonato de cesio cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en el apartado D.3.1.).

Fórmula empírica  $C_{25}H_{33}FN_4O_6$ ; P.M. = 504,56; MS (M+H) 505,6.

15 D.12.5.) Éster metílico del ácido 3-[(4-fluoro-fenil)-(5-metil-pirimidin-2-il)-amino]-2-[[2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carbonil]-amino]-propiónico (**60**)

500 mg (0,991 mmol) del éster **59** se disolvieron en 10 ml de diclorometano y se enfrió hasta 0°C. Se añadieron 5 ml de TFA, se dejó llegar a RT y se agitó durante 1 h. Los disolventes se separaron i.v.. El residuo se recogió en 10 ml de DMF, y se añadieron 430 mg (0,991 mmol) de **55** y 1,38 ml (7,93 mmol) de DIEA. Se dejó agitar a RT durante 15 h, los disolventes se separaron i.v. y el residuo se cromatógrafió sobre gel de sílice utilizando heptano/acetato de etilo 1:3. Se obtuvieron 423 mg (77%) de **60**.

Fórmula empírica  $C_{29}H_{27}FN_8O_3$ ; P.M. = 554,59; MS (M+H) 555,2.

25 D.12.6.) {1-carbamoil-2-[(4-fluoro-fenil)-(5-metil-pirimidin-2-il)-amino]-etil)-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (**61**)

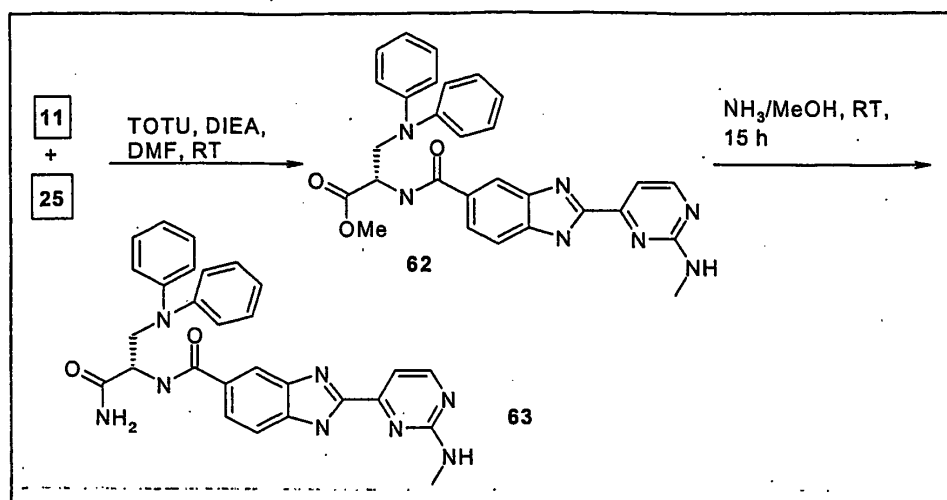
250 mg (99%) de la amida **61** se obtuvieron a partir de 260 mg (0,469 mmol) del éster **60** cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en el apartado D.2.2.).

Fórmula empírica  $C_{28}H_{26}FN_9O_2$ ; P.M. = 539,58; MS (M+H) 540,2.

30  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 2,11 (s, 3H), 2,95 (s, 3H), 4,21 (dd, 1H), 4,48 (dd, 1H), 4,75-4,80 (m, 1H), 7,01 (bs, 1H), 7,10-7,16 (m, 4H), 7,22-7,30 (m, 3H), 7,43 (s, 1H), 7,47-7,53 (m, 2H), 7,91 (s, 1H), 8,26 (s, 2H), 8,29-8,34 (m, 2H), 11,70 (s, 1H).

F.) Productos finales de bencimidazol

F.1.) ((S)-1-carbamoil-2-difenilamino-etil)-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (**63**)



35 F.1.1.) Éster metílico del ácido 3-difenilamino-2-[[2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-bencimidazol-5-carbonil]-(*S*)-amino]-propiónico (**62**)

40 2,6 g (9,6 mmol) de ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (**25**) se disolvieron en 300 ml de DMF y se añadieron consecutivamente 3,17 g (9,6 mmol) de TOTU y 1,6 ml (11,6 mmol) de etilidisopropilamina. Se agitó a 5°C durante 20 min y se añadieron a la solución 2,6 g (9,6 mmol) de éster metílico del ácido (*S*)-2-amino-3-difenilamino-

propiónico (**11**). Después de haber agitado durante 16 h, se concentró a presión reducida, a continuación el éster metílico **62** se aisló por medio de cromatografía de resolución rápida sobre gel de sílice (DCM:MeOH = 9:1). Rendimiento: 1,61 g (32%).

Fórmula empírica  $C_{29}H_{27}N_7O_3$ ; P.M. = 521,58; MS (M+H) 522,3.

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>) 2,95 (s(b), 3H), 3,60 (s, 3H), 4,19-4,40 (m, 2H), 4,90 (q, 1H), 6,90-7,10 (m, 6H), 7,25-7,35 (m, 6H), 7,40 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 7,60-7,80 (d(b), 1H), 8,05-8,25 (d(b), 1H), 8,45 (d, J = 3 Hz, 1H), 8,90 (s(b), 1H), 11,85 (s(b), 1H).

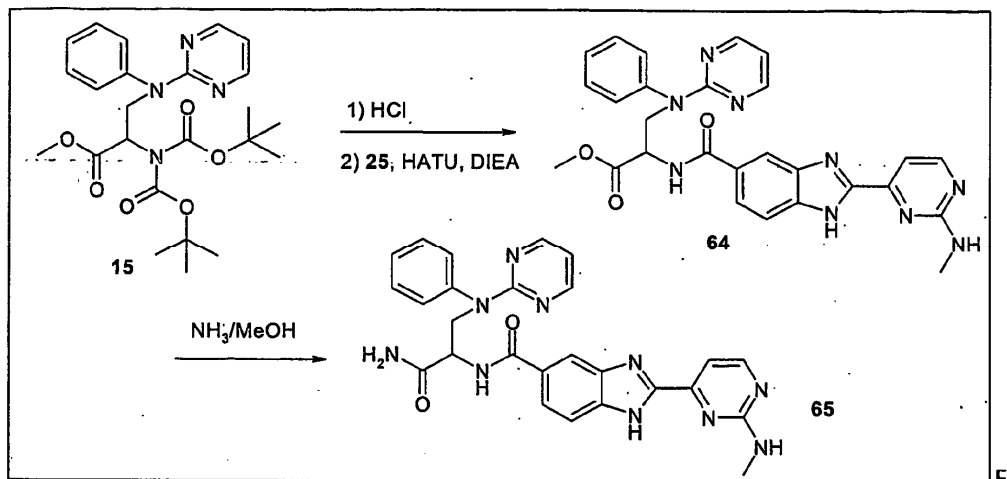
F.1.2.) ((S)-1-carbamoil-2-difenilamino-etil)-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (**63**)

50 ml de metanol (absoluto) se saturaron con amoníaco a 0°C. A ello se añadieron 0,5 g (0,959 mmol) de éster metílico del ácido 3-difenilamino-2-[[2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-bencimidazol-5-carbonil]-(S)-amino]-propiónico (**62**), y se agitó a la temperatura ambiente durante 24 h. Después de haber evaporado el disolvente y el amoníaco en exceso, la amida **63** se aisló por medio de cromatografía de resolución rápida sobre gel de sílice (DMC:MeOH = 19:1). Rendimiento: 0,43 g (89%).

Fórmula empírica  $C_{29}H_{28}N_8O_2$ ; P.M. = 506,57; MS (M+H) 507,2.

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>) 2,95 (s(b), 3H), 4,02-4,35 (m, 2H), 4,85 (q, 1H), 6,80-7,10 (m, 6H), 7,15-7,25 (m, 5H), 7,40 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 7,58 (d(b), 1H), 7,68 (s(b), 1H), 8,06-8,19 (d(b), 1H), 8,40-8,58 (m, 2H), 13,10 (s, 1H).

F.2.) {1-carbamoil-2-[(fenil)-pirimidin-2-il-amino]-etil}-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (**65**)



F.2.1.) Éster metílico del ácido 3-[(fenil)-pirimidin-2-il-amino]-2-[[2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-bencimidazol-5-carbonil]-amino]-propiónico (**64**)

210 mg (29%) del éster metílico **64** se obtuvieron a partir de 657 mg de **15** cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en el apartado D.2.1.).

Fórmula empírica  $C_{27}H_{25}N_9O_3$ ; P.M. = 523,56; MS (M+H) 524,2.

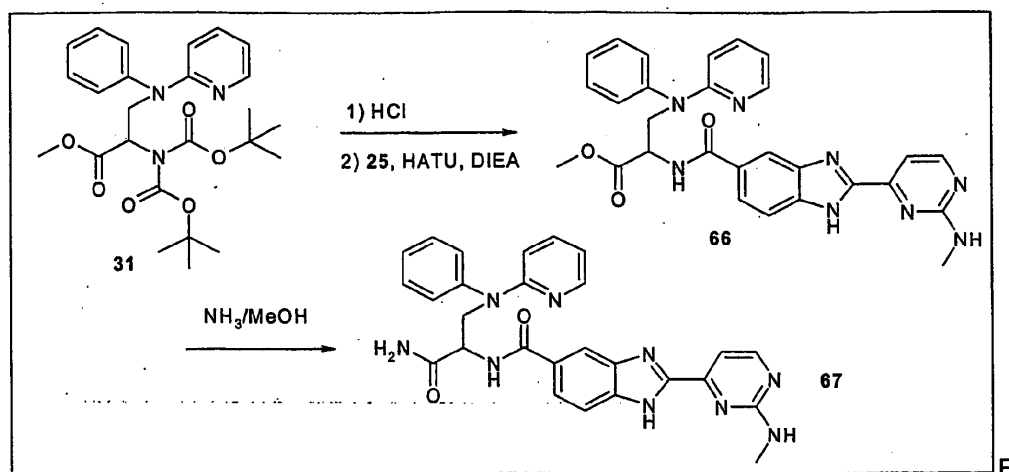
F.2.2.) {1-carbamoil-2-[(fenil)-pirimidin-2-il-amino]-etil}-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (**65**)

110 mg (65%) de la amida **65** se obtuvieron a partir de 200 mg de **64** cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en el apartado D.2.2.).

Fórmula empírica  $C_{26}H_{24}FN_{10}O_2$ ; P.M. = 508,55; MS (M+H) 509,3.

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>) 3,0 (s(b), 3H), 4,20-4,32 (m, 1H), 4,41-4,55 (m, 2H), 4,80-4,90 (m, 1H), 6,75 (m, 1H), 7,10-7,50 (m, 10H), 7,65 (q, 2H), 8,10 (s, 1H), 8,45 (d, 2H), 8,50 (d, 1H), 8,58 (d, 1H), 12,95 (s(b), 1H).

F.3.) {1-carbamoil-2-[(fenil)-piridin-2-il-amino]-etil}-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (**67**)



F.3.1.) Éster metílico del ácido 3-[(fenil)-piridin-2-il-amino]-2-[[2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-bencimidazol-5-carbonil]-amino]-propiónico (**66**)

5

0,85 g (22%) del éster metílico **66** se obtuvieron a partir de 3,44 g de **31** cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en el apartado D.2.1.).

Fórmula empírica  $C_{28}H_{26}N_8O_3$ ; P.M. = 522,57; MS (M+H) 523,3.

F.3.2.) {1-carbamoil-2-[(fenil)-piridin-2-il-amino]-etil}-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-bencimidazol-5-carboxílico (**67**)

160 mg (98%) de la amida **67** se obtuvieron a partir de 200 mg de **66** cuando la reacción se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita en el apartado D.2.2.).

Fórmula empírica  $C_{27}H_{25}N_9O_2$ ; P.M. = 507,56; MS (M+HCOO<sup>-</sup>) 552,3.

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) 3,0 (s(b), 3H), 4,20-4,32 (m, 1H), 4,41-4,55 (m, 2H), 4,70-4,80 (m, 1H), 6,63 (m, 1H), 6,85 (m, 1H), 7,20-7,75 (m, 14H), 8,10 (s, 1H), 8,20 (d, 2H), 8,50 (d, 1H), 8,88 (d, 1H).

### Ejemplos farmacológicos

20

ELISA de IκB quinasa:

La actividad de la IκB quinasa se determinó utilizando un ELISA que consistía en un péptido sustrato biotinilado que contenía la secuencia de aminoácidos de la proteína de IκB desde la serina 32 a la serina 36 y un anticuerpo policlonal o monoclonal específico (por ejemplo, obtenido de New England Biolabs, Beverly, MA, EE.UU., cat: 9240) que solamente se unía a la forma fosforilada del péptido IκB. Este complejo se inmovilizó sobre una placa de unión de anticuerpos (revestida con proteína A) y se detectó utilizando un conjugado compuesto de una proteína de unión a biotina y HRP (por ejemplo estreptavidina-HRP). La actividad se cuantificó con ayuda de una curva estándar que se construyó utilizando el sustrato fosfopéptido.

30

Implementación:

Con el fin de obtener el complejo de quinasa, 10 ml de extracto S100 de células HeLa S3 se diluyeron con 40 ml de HEPES 50 mM, pH 7,5, llevado al 40% con respecto al sulfato de amonio y se incubaron sobre hielo durante 30 minutos. El sedimento precipitado se disolvió en 5 ml de tampón SEC (HEPES 50 mM, pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 0,5 mM, 2-glicerofosfato 10 mM), se centrifugó a 20.000 x g durante 15 minutos y se filtró a través de un filtro de 0,22 μm. La muestra se cargó sobre una columna Superose-6 FPLC de 320 ml (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) que había sido equilibrada con tampón SEC y que se hizo funcionar a 4°C con un caudal de 2 ml/min. Las fracciones que se localizaron en el tiempo de migración del patrón de peso molecular de 670 kDa se combinaron para la activación. La activación se consiguió por medio de una incubación durante 45 minutos con 100 nM de MEKK1Δ, 250 μM de MgATP, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotretitol (DTT) 5 mM, 2-glicerofosfato 10 mM y 2,5 μM de microcistina-LR a 37°C. La enzima activada se almacenó a -80°C.

40

Las sustancias de ensayo (2 μl), disueltas en DMSO, se preincubaron, a 25°C durante 30 minutos, con 43 μl de enzima



5 activada (diluida en la relación 1:25 en tampón de reacción HEPES 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 5 mM, β-glicerofosfato 10 mM, 2,5 μM de microcistina-LR). Luego se añadieron 5 μl de sustrato péptido (biotina-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-DRHDSGLDSMKD-CONH<sub>2</sub>) (200 μM), se incubó durante una hora y la reacción se detuvo con 150 μl de HEPES 50 mM, pH 7,5, BSA al 0,1%, EDTA 50 mM, anticuerpo [1:200]. 100 μl de la mezcla de reacción detenida o de una serie de dilución de fosfopéptidos estándar (biotina-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-DRHDS[PO<sub>3</sub>]GLDSMKD-CONH<sub>2</sub>) se transfirieron a una placa de proteína A (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, EE.UU.), y se incubó durante 2 horas al tiempo que se sacudía. Después de 10 3 etapas de lavado con PBS, se añadieron durante 30 minutos 100 μl de 0,5 μg/ml de estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano picante) (diluida en HEPES 50 mM/BSA al 0,1%). Después de 5 etapas de lavado con PBS, se añadieron 100 μl de sustrato TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, EE.UU.) y el desarrollo de color se detuvo añadiendo 100 μl de ácido sulfúrico 0,18 M. La absorción se midió a 450 nm. La curva estándar se produjo mediante regresión lineal correspondiente a una relación de dosis-efecto de 4 parámetros. La curva estándar se utilizó para cuantificar la actividad enzimática o su inhibición por parte de las sustancias de ensayo.

15 La CI<sub>50</sub> para [(S)-2-difenilamino-1-(5-oxo-4,5-dihidro[1,3,4]oxadiazol-2-il)-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico era 0,050 μM.

Nivel en plasma sanguíneo de [(S)-2-difenilamino-1-(5-oxo-4,5-dihidro[1,3,4]oxadiazol-2-il)-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico

20 El compuesto [(S)-2-difenilamino-1-(5-oxo-4,5-dihidro[1,3,4]oxadiazol-2-il)-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico, denominado compuesto 28 en lo que sigue, se administró a ratones C57/BL6 machos. Para ello, en cada caso se administraron aproximadamente 25 mg de compuesto 28 por kg de peso corporal de los ratones, molidos en húmedo en hidroxietil-celulosa (HEC) al 0,5%, por vía oral en forma de una suspensión (por medio de una sonda esofágica). Se tomaron muestras de sangre después de 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6 y 8 horas (la sangre del sacrificio se retiró de 25 en cada caso 2 animales en cada uno de los instantes mencionados). Las muestras de sangre se convirtieron en plasma heparínico. Las muestras de plasma se almacenaron a -20°C hasta que se analizaron.

#### Análisis:

30 Las muestras de plasma se descongelaron. Las proteínas del plasma que interferían con el análisis se precipitaron luego con acetonitrilo.

Tratamiento: 50 μl de plasma + 20 μl de patrón interno (5 μg/ml) + 50 μl de tampón (2 mmol de solución de formiato de amonio, pH 2,6/acetonitrilo, 40:60, v/v) se mezclaron durante aproximadamente 10 s en un Whirlmixer. Después se añadieron 150 μl de acetonitrilo y el conjunto se mezcló una vez de nuevo durante aproximadamente 10 s. Después, las muestras se centrifugaron (Hettich, EBA 12, aproximadamente 12000 revoluciones por minuto). El material sobrenadante (aproximadamente 200 μl) se transfirió a recipientes de vidrio. Se inyectaron 70 μl del material sobrenadante.

35 El respectivo material sobrenadante se utilizó para determinar el contenido en nivel de plasma del compuesto 13 por medio de LC-MS/MS de acuerdo con el siguiente método:

Sistema HPLC: Agilent 1100

Software: Analyst

40 Columna: 125 x 4 mm Nucleosil 120 5 C18 (Machery & Nagel)

Longitud de la columna: 125 mm

Detección: LC-MS/MS

Instrumento MS: PE-Sciex API 365 (espectrómetro de masas Triple Quadrupole)

Software : software MacQuan (PE-Sciex)

45 Tipo de detección: MS/MS (MRM)

Caudal: 0,5 mL/min

Volumen de inyección: 70 μl

Patrón interno: SK-7 en acetonitrilo

Fase móvil: acetonitrilo/2 mmol de solución de formiato de amonio, pH 2,6 (70:30, v/v)

50 Tiempos de retención (Rt):

Patrón interno: 4,4 min

Compuesto 28: 3,9 min

El límite de detección inferior del método es 0,01 μg/ml.

55 Resultados:

El nivel en plasma del compuesto 28 era a lo sumo de 4,3 μg/ml. La exposición, medida como ADC = área debajo de la curva, era 5,4 μg/ml x h.

Proteína tirosina quinasa

Como ejemplos de la especificidad de los inhibidores de I $\kappa$ B quinasa que habían sido descubiertos, se determinaron sus valores CI<sub>50</sub> en el caso de la enzima quinasa proteína tirosina quinasa.

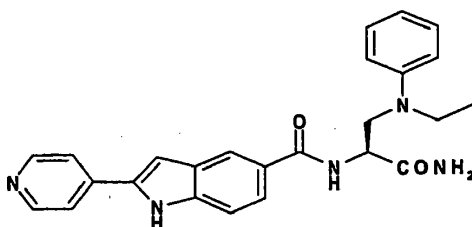
5 La actividad de la proteína tirosina quinasa se determinó utilizando el kit de ensayo apropiado procedente de Upstate Biotechnologie de acuerdo con las instrucciones del fabricante y a una concentración de ATP de 50  $\mu$ M. A diferencia del método del fabricante, se utilizaron placas Multi-Screen (Millipore; fosfoceulosa MS-PH, cat. MAPHNOB10, o Durapore PVDF, cat. MADVNOB 50), junto con el sistema de agotamiento apropiado, en lugar de filtros de fosfoceulosa. Como sustrato del kit de ensayo se utilizó Poly (Glu, Tyr 4:1) (Sigma cat. P0275) a una concentración de ensayo de 1 mg/ml. A  
10 continuación, las placas se midieron en un contador de centelleo Wallac MicroBeta. En cada caso se utilizaron 100  $\mu$ M de la sustancia de ensayo.

La sustancia de ensayo se sometió a ensayo en una determinación por duplicado. Los cálculos de CI<sub>50</sub> se efectuaron utilizando el paquete de software GraFit 3,0.

15 La CI<sub>50</sub> para [(S)-2-difenilamino-1-(5-oxo-4,5-dihidro[1,3,4]oxadiazol-2-il)-etil]-amida del ácido 2-(2-metilamino-pirimidin-4-il)-1H-indol-5-carboxílico (compuesto 28) en el análisis de la proteína tirosina quinasa era 82,5  $\mu$ M.

Experimento comparativo:

20 El compuesto



se preparó según se describe en el documento WO 01/30774 y se denomina en lo que sigue el compuesto comparativo. El compuesto comparativo se administró a ratones NMRI machos. Para ello, en cada caso aproximadamente 50 mg del  
25 compuesto comparativo por kg de peso corporal de los ratones se administraron por vía oral en forma de una suspensión en HEC al 0,5% (por medio de una sonda esofágica). Se tomaron muestras de sangre después de 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6 y 8 horas (la sangre del sacrificio se retiró en caso de 2 animales en cada uno de los instantes mencionados). Las muestras de sangre se convirtieron en plasma heparínico. Las muestras de plasma se almacenaron a -20°C hasta que se analizaron.

30 Análisis: El análisis se llevó a cabo utilizando HPLC/UV.

Tratamiento: 50  $\mu$ l de plasma + 20  $\mu$ l de patrón interno (5  $\mu$ g/ml) + 50  $\mu$ l de tampón (ácido fórmico al 1%/acetonitrilo, 40:60, v/v) se mezclaron durante aproximadamente 10 s en un Whirlmixer. Después se añadieron 150  $\mu$ l de acetonitrilo, y se  
35 mezcló de nuevo durante aproximadamente 10 s. Después, las muestras se centrifugaron (Hettich, EBA 12, aproximadamente 12000 revoluciones por min). El material sobrenadante (aproximadamente 200  $\mu$ l) se transfirió a recipientes de vidrio. Se inyectaron 100  $\mu$ l del material sobrenadante.

El material sobrenadante respectivo se utilizó para determinar el contenido en nivel de plasma de compuesto comparativo por medio de HPLC/UV de acuerdo con el siguiente método:

40 Sistema HPLC: Bomba Gynkoteck P580 HPG + automuestreador Gilson Abimed XL-231

Software: Mass-chrom

Columna: 125 x 4 mm Protosil 120 3 ODS AQ 3 (de Bischoff)

Longitud de la columna: 125 mm

Detección: LC-MS/MS

45 Instrumento MS: PE-Sciex API 365 (espectrómetro de masas Triple Quadrupole)

Software: software MacQuan (PE-Sciex)

Tipo de detección: MS/MS (MRM)

Caudal: 0,5 mL/min

Volumen de inyección: 100  $\mu$ l

50 Patrón interno: SK-7 (compuesto de Aventis) en acetonitrilo

Fase móvil: acetonitrilo/2 mmol de solución de formiato de amonio, pH 2,6 (70:30, v/v)

Tiempos de retención (Rt):

Patrón interno: 4 min

Compuesto comparativo: 1,5 min

A 0,01 µg/mL, el límite de detección inferior era idéntico al obtenido cuando se empleaba LC-MS/MS utilizando el compuesto 28.

5

Resultados: el nivel en plasma del compuesto comparativo era a lo sumo de 1,5 µg/ml. La exposición, medida como el ADC = área bajo la curva, era 1,7 µg/ml x h.

10

En comparación con el ejemplo utilizando el compuesto 28, el nivel en plasma sanguíneo máximo era aproximadamente 60% inferior en el experimento comparativo, a pesar de que, a 50 mg/kg, el compuesto comparativo se administró a una dosis que era el doble de alta que en el caso del compuesto 28. Los valores de ADC que se determinaron para el compuesto comparativo proporcionan también el mismo resultado.

15

En el análisis de la proteína tirosina quinasa antes descrito, la  $CI_{50}$  para el compuesto comparativo era 46,35 µM. Por lo tanto, la  $CI_{50}$  es acusadamente mejor que en el caso del compuesto 28.

La mejora en la especificidad con respecto a la IκB quinasa se vuelve incluso más evidente cuando se comparan las relaciones de los valores  $CI_{50}$  para la proteína tirosina quinasa con relación a la IκB quinasa. En el caso del compuesto 28, esta relación es 1650 (82,5/0,05), mientras que en el caso del compuesto comparativo es de 46,35 (46,35/1,0; de acuerdo con los datos procedentes del documento WO 01/30774).

20

Las relaciones de especificidad y/o los niveles en plasma y la exposición de los otros ejemplos se determinaron de una manera análoga.

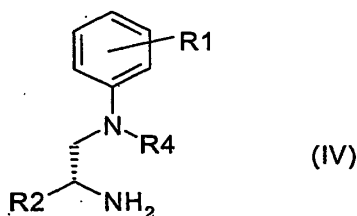
Ejemplo nº	Fórmula molecular compuesto neutro	Peso molecular	IKK $CI_{50}$ 50 µM	Relación de especificidad
28	C30 H26 N8 O3	546,59	0,05	1650
30	C28 H25 FN8 O2	524,56	0,05	> 200
33	C29 H25 N9 O3	547,58	0,012	> 833
35	C27 H23 FN8 O2	510,54	0,01	> 1000
36	C29 H25 FN10 O	548,59	0,005	> 2000
42	C26 H24 N8O2S	512,60	0,009	> 1110
43	C29 H28 N8O3	536,60	0,0008	> 12500
45	C28 H25 N7O2	491,55	0,015	> 665
47	C27 H25 N9O2	507,56	0,006	> 1665
49	C31 H31 N7O3	549,63	0,035	> 285
54	C28 H23 F3N8 O3	576,54	0,003	> 3330
61	C28 H26 FN9 O2	539,58	0,006	> 1650
63	C28 H26 N8 O2	506,57	0,003	> 1000
65	C26 H24 N10 O2	508,55	0,004	> 2500
67	C27 H25 N9 O2	507,56	0,002	> 5000

> significa mejor que

25

## REIVINDICACIONES

1.- Compuesto de la fórmula IV



5

en que

R1 representa

1. un átomo de hidrógeno,
2. F, Cl, I o Br,
3. -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
4. -CN,
5. -CF<sub>3</sub>,
6. -OR<sup>5</sup>, en que R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
7. -N(R<sup>5</sup>)-R<sup>6</sup>, en que R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> representan, independientemente uno de otro, un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
8. -C(O)-R<sup>5</sup>, en que R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), o
9. -S(O)<sub>x</sub>-R<sup>5</sup>, en que x significa el número entero cero, 1 ó 2, y R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),

10

15

R2 representa

1. un radical heteroarilo del grupo 3-hidroxi-pirro-2,4-diona, imidazol, imidazolidina, imidazolina, indazol, isotiazol, isotiazolidina, isoxazol, 2-isoxazolidina, isoxazolidina, isoxazolona, morfolina, oxazol, 1,3,4-oxadiazol, oxadiazolidindiona, oxadiazolona, 1,2,3,5-oxatiadiazol-2-óxido, 5-oxo-4,5-dihidro-[1,3,4]-oxadiazol, 5-oxo-1,2,4-tiadiazol, piperazina, pirazina, pirazol, pirazolona, pirazolidina, piridazina, pirimidina, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiomorfolina, triazol o triazolona, y el radical heteroarilo está no sustituido o está sustituido una vez, dos veces o tres veces, independientemente una de otra, con
  - 1.1 -C(O)-R<sup>5</sup>, en que R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
  - 1.2 -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
  - 1.3 -O-R<sup>5</sup>, en que R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
  - 1.4 -N(R<sup>5</sup>)-R<sup>6</sup>, en que R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> representan, independientemente uno de otro, un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
  - 1.5 halógeno, o
  - 1.6 un radical ceto,
2. -C(O)-OR<sup>5</sup>, en que R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o -(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
3. -C(O)-OR<sup>5</sup>, en que R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o -(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), o
4. -C(O)-N(R<sup>7</sup>)-R<sup>8</sup>, en que R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> representan, independientemente uno de otro, un átomo de hidrógeno, -alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-OH, -O-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o -(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),

20

25

30

35

R4 representa

1. un radical heteroarilo del grupo pirrol, furano, tiofeno, imidazol, pirazol, oxazol, isoxazol, tiazol, isotiazol, tetrazol, 1,2,3,5-oxatiadiazol-2-óxido, triazolona, oxadiazolona, isoxazolona, oxadiazolidinadiona, triazol, 3-hidroxi-pirro-2,4-diona, 5-oxo-1,2,4-tiadiazol, piridina, pirazina, pirimidina, indol, isoindol, indazol, ftalazina, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, quinazolona, cinolina, β-carbolina y derivados de ciclo-penta o derivados de ciclohexa, condensados con benzo, de estos radicales heteroarilo, en que el radical heteroarilo está no sustituido o está sustituido una vez, dos veces o tres veces, independientemente una de otra, con -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), -alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), halógeno, nitro, amino, trifluorometilo, hidroxilo, hidroxil-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), metilendioxi, etilendioxi, formilo, acetilo, ciano, hidroxicarbonilo, aminocarbonilo o -alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-carbonilo, o
2. un radical arilo del grupo fenilo, naftilo, 1-naftilo, 2-naftilo, bifenililo, 2-bifenililo, 3-bifenililo y 4-bifenililo, antrilo o fluorenilo, y el radical arilo está no sustituido o está sustituido una vez, dos veces o tres veces, independientemente una de otra, con -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), -alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), halógeno, nitro, amino, trifluorometilo, hidroxilo, hidroxil-

40

45

50

alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), metilendioxi, etilendioxi, formilo, acetilo, ciano, hidroxicarbonilo, aminocarbonilo o -alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-carbonilo.

2.- Compuesto de la fórmula IV según la reivindicación 1, en el que

5 R1 representa

1. un átomo de hidrógeno,
2. F, Cl, I o Br,
3. -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
4. -CN,
- 10 5. -CF<sub>3</sub>,
6. -OR<sup>5</sup>, en que R<sup>5</sup> representa un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
7. -N(R<sup>5</sup>)-R<sup>6</sup>, en que R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> representan, independientemente uno de otro, un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),
8. -C(O)-R<sup>5</sup>, en que R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), o
- 15 9. -S(O)<sub>x</sub>-R<sup>5</sup>, en que x es el número entero cero, 1 ó 2, y R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),

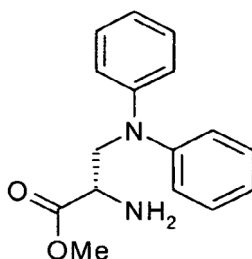
R2 representa

1. un radical heteroarilo del grupo imidazol, isotiazol, isoxazol, 2-isoxazolidina, isoxazolidina, isoxazolona, 1,3,4-oxadiazol, oxadiazolidinadiona, 1,2,3,5-oxadiazolona, oxazol, 5-oxo-4,5-dihidro[1,3,4]oxadiazol, tetrazol, tiadiazol, tiazol, triazol o triazolona, y  
 20 el radical heteroarilo está no sustituido o está sustituido una vez, dos veces o tres veces, independientemente una de otra, con
  - 1.1 un radical ceto,
  - 1.2 F, Cl, I o Br, o
  - 1.3 -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), o
- 25 2. -C(O)-N(R<sup>7</sup>)-R<sup>8</sup>, en que R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> representan, independientemente uno de otro, un átomo de hidrógeno, -alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-OH, -O-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>),

R4 representa

1. un radical heteroarilo del grupo de los anillos insaturados, parcialmente saturados o completamente saturados, que se derivan de piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, pirazol, oxazol, isoxazol, tiazol, triazol o isotiazol, en que el radical heteroarilo está no sustituido o está sustituido una vez, dos veces o tres veces, independientemente una de otra, con -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), -alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), F, Cl, I, Br, nitro, amino, trifluorometilo, hidroxilo, hidroxil-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), metilendioxi, etilendioxi, formilo, acetilo, ciano, hidroxicarbonilo, aminocarbonilo o -alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-carbonilo, o  
 30 2. fenilo, y fenilo está no sustituido o está sustituido, una vez, dos veces o tres veces, independientemente una de otra, con F, Cl, I, Br, CF<sub>3</sub>, -OH, -alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o -alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>).

3.- Compuesto de la fórmula IV según la reivindicación 1, en el que el compuesto de la fórmula IV es



40 en donde Me representa metilo.

4.- Compuesto de la fórmula

