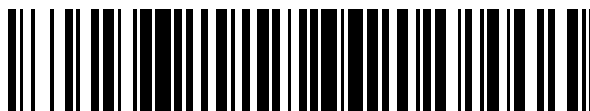


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 892**

51 Int. Cl.:

C07D 213/73 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2009 E 09713855 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 2245012**

54 Título: **Inhibidores de MAP quinasa p38**

30 Prioridad:

29.02.2008 GB 0803748

27.08.2008 GB 0815544

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.11.2013

73 Titular/es:

CHROMA THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)

93 Milton Park

Abingdon Oxon OX14 4RY, GB

72 Inventor/es:

MOFFAT, DAVID FESTUS CHARLES;

DAVIES, STEPHEN JOHN y

PINTAT, STÉPHANE

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 427 892 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

Inhibidores de MAP quinasa p38

Esta invención se refiere a una serie de ésteres de aminoácidos, a las composiciones que los contienen, a los procedimientos para su preparación y a su uso en medicina como inhibidores de MAP quinasa p38 para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, incluyendo artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, esclerosis múltiple, diabetes, dermatitis atópica, enfermedad de injerto frente a anfitrión, lupus eritematoso generalizado y otras.

Antecedentes de la invención

La activación inapropiada de leucocitos incluyendo monocitos, macrófagos y neutrófilos que conduce a la producción de niveles elevados de citoquinas tales como TNF- α , IL1- β e IL-8, es un rasgo de la patogénesis de numerosas enfermedades inflamatorias incluyendo artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma y psoriasis. La producción de citoquinas por las células inflamatorias es el resultado de la respuesta a una variedad de estímulos externos, que conducen a la activación de numerosos mecanismos de señalización intracelular. Entre estos destacan la superfamilia de proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPK) que consiste en quinasas de señalización altamente conservadas que regulan el crecimiento, la diferenciación y las respuestas al estrés de las células. Las células de mamíferos contienen al menos tres familias de MAPK: las MAPK quinasa reguladas por señales extracelulares p42/44 (ERK), las quinasas NH2 terminales c-Jun (JNK) y la MAPK p38 (también denominada p38 α /Mpk2/RK/SAPK2 α /CSBP1/2). La MAPK p38 fue clonada por primera vez después de su identificación como una quinasa que es fosforilada en tirosina después de la estimulación de los monocitos por lipopolisacáridos (LPS) [Han et al, Science 1994,265,808]. Se han descrito homólogos adicionales de p38 de mamífero e incluyen p38 β [Jiang et al, J. Biol. Chem. 1996, 271, 17920], p38 γ [Li et al, Biochem. Biophys. Res. Commun.1996, 228, 334] y p38 δ [Jiang et al, J. Biol. Chem. 1997, 272, 30122]. Si bien p38 α y p38 β son expresadas ubicuamente, p38 γ está restringida principalmente al músculo esquelético y p38 δ es expresada predominantemente en pulmón y riñón.

La liberación de citoquinas por las células de defensa del anfitrión y la respuesta de los leucocitos a las citoquinas y otros estreses pro-inflamatorios están regulados en un grado variable por la MAPK p38 [Cuenda et al, FEBS Lett, 1995, 364, 229-233]. En otros tipos de células, MAPK p38 controla las respuestas al estrés tales como la producción de IL-8 por las células epiteliales bronquiales estimuladas por TNF- α , y la regulación al alza de la molécula de adherencia celular ICAM-1 en células endoteliales estimuladas por LPS. Tras la activación, por medio de la fosforilación dual de un motivo TGY por las quinasas de especificidad dual MKK3 y MKK6, la MAPK p38 ejerce sus efectos a través de la fosforilación de factores de transcripción y otras quinasas. La proteína quinasa-2 activada por quinasa MAP (MAPKAPK-2) ha sido identificada como una diana para la fosforilación de p38. Se ha demostrado que los ratones [Kotlyarov et al, Nat. Cell Biol. 1999, 1, 94-97] que carecen de MAPKAPK-2 liberan niveles reducidos de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IFN- γ en respuesta al choque endotóxico mediado por LPS/galactosamina. La regulación de los niveles de estas citoquinas así como de COX-2 está en el nivel de ARNm. Los niveles de TNF- α están regulados por medio del control traduccional a través de elementos ricos en AU de la UTR-3' del ARNm de TNF- α , incrementando la señalización con MAPKAPK-2 la traducción del ARNm de TNF- α . La señalización con MAPKAPK-2 conduce a un incremento de la estabilidad del ARNm para COX-2, IL-6 y proteína inflamatoria de macrófagos. MAPKAPK-2 determina la localización celular de la MAPK p38 así como la transducción de la señalización de MAPK p38, que posee una señal de localización nuclear en su extremo carboxilo y una señal de exportación nuclear como parte de su dominio autoinhibidor [Engel et al, EMBO J. 1998, 17, 3363-3371]. En células con estrés, MAPKAPK-2 y p38 MAPK migran al citoplasma desde el núcleo, esta migración solo se produce cuando la MAPK p38 es catalíticamente activa. Se cree que este evento está dirigido por la exposición de la señal de exportación nuclear MAPKAPK-2, como resultado de la fosforilación por MAPK p38 [Meng et al, J. Biol. Chem. 2002, 277, 37401-37405]. Adicionalmente la MAPK p38 conduce directamente o indirectamente a la fosforilación de diversos factores de transcripción que se cree que median la inflamación, incluyendo ATF1/2 (activando los factores de transcripción 1/2), CHOP-10/GADD-153 (gen 153 inducible por detención del crecimiento y daño al ADN), SAP-1 (proteína-1 accesoria del factor de respuesta de suero) y MEF2C (factor-2 potenciador de miocitos) [Foster et al, Drug News Perspect. 2000, 13, 488-497].

Se ha demostrado en varios casos que la inhibición de la actividad de la MAPK p38 por moléculas pequeñas, es útil para el tratamiento de diversos estados de enfermedad mediados por una producción inapropiada de citoquinas incluyendo artritis reumatoide, EPOC, asma e isquemia cerebral. Esta modalidad ha sido sujeto de numerosas revisiones [Salituro et al, Current Medicinal Chemistry, 1999, 6, 807-823 y Kumar et al, Nature Reviews Drug Discovery 2003, 2, 717-726].

Se ha demostrado que los inhibidores de MAPK p38 son eficaces en modelos animales de artritis reumatoide, tales como artritis inducida por colágeno en ratas [Revesz et al, Biorg. Med. Chem. Lett., 2000, 10, 1261-1364] y artritis

inducida por coadyuvante en ratas [Wadsworth et al, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1999, 291, 1685-1691]. En modelos murinos de lesión pulmonar inducida por pancreatitis, el pretratamiento con un inhibidor de MAPK p38 redujo la liberación de TNF- α en las vías respiratorias y el edema pulmonar [Denham et al, Crit. Care Med., 2000, 29, 628 y Yang et al, Surgery, 1999, 126, 216]. La inhibición de MAPK p38 antes de la exposición a ovoalbúmina (OVA) en ratones sensibilizados a OVA disminuyó la acumulación de citoquina y células inflamatorias en las vías respiratorias en un modelo de inflamación alérgica de las vías respiratorias, [Underwood et al, J. Pharmacol. Exp. Ther., 2000, 293, 281]. Se ha observado un aumento de actividad de la MAP quinasa p38 MAP en pacientes que padecen enfermedad inflamatoria intestinal [Waetzig et al, J. Immunol, 2002, 168, 5432-5351]. Se ha demostrado que los inhibidores de MAPK p38 son eficaces en modelos de rata de hipertrofia cardíaca [Behr et al, Circulation, 2001, 104, 1292-1298] e isquemia cerebral focal [Barone et al, J. Pharmacol. Exp. Ther., 2001, 296, 312-321].

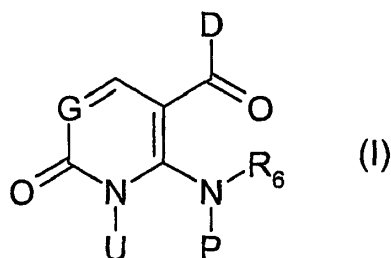
Los autores de la presente invención han descubierto ahora un grupo de compuestos que son inhibidores potentes y selectivos de MAPK p38 (p38 α , β , γ y δ) y de las isoformas y variantes de empalme de las mismas, especialmente p38 α , p38 β y p38 δ . Los compuestos tienen por lo tanto uso en medicina, por ejemplo en el tratamiento y la profilaxis de trastornos inmunitarios e inflamatorios descritos en la presente memoria. Los compuestos se caracterizan por la presencia en la molécula de un motivo de glicina α,α -disustituido o un motivo éster de glicina α,α -disustituido que es hidrolizable por cualquier carboxilesterasa intracelular. Los compuestos de la invención que tienen el motivo de éster de glicina α,α -disustituido lipofílico cruzan la membrana celular, y son hidrolizados a ácido por las carboxilesterasas intracelulares. El producto de la hidrólisis polar se acumula en la célula puesto que no cruza fácilmente la membrana celular. Por lo tanto la actividad de la MAP quinasa p38 del compuesto es prolongada intensificada en el interior de la célula. Los compuestos de la invención están relacionados con los inhibidores de MAP quinasa p38 incluidos en las descripciones de la Solicitud de Patente Internacional WO 03076405, pero difieren en que los presentes compuestos tienen el motivo éster de aminoácido referido anteriormente.

Los compuestos de la invención también están relacionados con los descritos en la Solicitud de Patente Internacional copendiente Núm. WO 2007/129040. Los últimos compuestos tienen un motivo éster de glicina α -monosustituido que también permite a los compuestos atravesar la membrana celular hacia el interior de la célula donde son hidrolizados al correspondiente ácido por las carboxilesterasas intracelulares. Sin embargo, esa publicación no sugiere que los productos conjugados de éster de glicina α,α -disustituidos puedan ser hidrolizados por las carboxilesterasas intracelulares. De hecho, parece que la capacidad de las carboxilesterasas intracelulares, principalmente hCE-1, hCE-2 y hCE-3, para hidrolizar ésteres de glicina α,α -disustituidos no se ha investigado anteriormente.

El concepto general de conjugación de un motivo éster de glicina α -mono-sustituido con un modulador de una enzima o receptor intracelular, para obtener los beneficios de la acumulación intracelular del producto de la hidrólisis del ácido carboxílico se describe en la Solicitud de Patente Internacional de los autores de la presente invención WO 2006/117567. No obstante, esta publicación no sugiere que los productos conjugados de éster de glicina α,α -disustituidos puedan ser hidrolizados por las carboxilesterasas intracelulares. Como se ha mencionado anteriormente, parece que la capacidad de las carboxilesterasas intracelulares, principalmente hCE-1, hCE-2 y hCE-3, para hidrolizar los ésteres de glicina α,α -disustituidos no se ha investigado previamente.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la invención se proporciona un compuesto de fórmula (I):



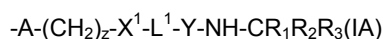
en donde:

G es -N= o -CH=

D es un radical fenilo sustituido opcionalmente o piridinilo sustituido opcionalmente

R₆ es hidrógeno o alquilo C₁-C₃ sustituido opcionalmente;

P representa hidrógeno y U representa un radical de fórmula (IA);



en donde

A representa un radical 1,4-fenileno sustituido opcionalmente;

z es 0 o 1;

Y es un enlace, $-C(=O)-$, $-S(=O)_2-$, $-C(=O)NR_7-$, $-C(=S)-NR_7-$, $-C(=NH)NR_7-$ o $-S(=O)_2NR_7-$ en donde R_7 es hidrógeno o alquilo C_1-C_6 sustituido opcionalmente;

5 **L¹** es un radical divalente de fórmula $-(Alk^1)_m(Q)_n(Alk^2)_p-$ en donde

m , n y p son independientemente 0 o 1,

Q es (i) un radical carbocíclico o heterocíclico mono- o bicíclico divalente sustituido opcionalmente que tiene 5 - 13 miembros anulares, o (ii), en el caso en el que tanto m como p son 0, un radical divalente de fórmula $-X^2-Q^1-$ o $-Q^1-X^2-$ en donde X^2 es $-O-$, $S-$ o NR^A- en donde R^A es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 sustituido opcionalmente, y Q^1 es un radical carbocíclico o heterocíclico mono- o bicíclico divalente sustituido opcionalmente que tiene 5 - 13 miembros anulares,

10 **Alk¹** y **Alk²** representan independientemente radicales cicloalquilo C_3-C_7 divalentes sustituidos opcionalmente, o radicales alquilenilo C_1-C_6 , alquenileno C_2-C_6 , o alquinileno C_2-C_6 lineales o ramificados sustituidos opcionalmente que pueden contener opcionalmente o terminar en un enlace éter ($-O-$), tioéter ($-S-$) o amino ($-NR^A-$) en donde R^A es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 sustituido opcionalmente; y

15 **X¹** representa un enlace; $-C(=O)-$; o $-S(=O)_2-$; $-NR_4C(=O)-$, $-C(=O)NR_4-$, $-NR_4C(=O)NR_5-$, $-NR_4S(=O)_2-$, o $-S(=O)_2NR_4-$ en donde R_4 y R_5 son independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_6 sustituido opcionalmente.

R_1 es un grupo éster que es hidrolizable por medio de una o más enzimas esterasas intracelulares a un grupo ácido carboxílico en donde el grupo éster tiene la fórmula $-C(=O)OR_{14}$ en donde R_{14} es $R_8R_9R_{10}C-$ en donde

20 (i) R_8 es hidrógeno o alquil(C_1-C_3)- $(Z^1)_a$ -[alquil(C_1-C_3)] $_b-$ o alquenil(C_2-C_3)- $(Z^1)_a$ -[alquil(C_1-C_3)] $_b-$ sustituidos opcionalmente en donde a y b son independientemente 0 o 1 y Z^1 es $-O-$, $-S-$, o $-NR_{11}-$ en donde R_{11} es hidrógeno o alquil(C_1-C_3); y R_9 y R_{10} son independientemente hidrógeno o alquil(C_1-C_3);

(ii) R_8 es hidrógeno o $R_{12}R_{13}N$ -alquil(C_1-C_3)- sustituido opcionalmente en donde R_{12} es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 y R_{13} es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 ; o R_{12} y R_{13} junto con el nitrógeno al que están anclados forman un anillo heterocíclico monocíclico sustituido opcionalmente de 5 o 6 átomos anulares o un sistema anular heterocíclico bicíclico de 8 a 10 átomos anulares, y R_9 y R_{10} son independientemente hidrógeno o alquil(C_1-C_3); o

25 (iii) R_8 y R_9 tomados junto con el carbono al que están anclados forman un anillo carbocíclico monocíclico de 3 a 7 átomos anulares o un sistema anular carbocíclico bicíclico de 8 a 10 átomos anulares sustituidos opcionalmente, o un sistema anular carbocíclico monocíclico puenteado de 7 a 10 átomos anulares, y R_{10} es hidrógeno;

30 y en donde en los casos (i), (ii) y (iii) anteriores, el término "alquilo" incluye fluoroalquilo.; y

uno de R_2 y R_3 es metilo, y el otro es metilo, etilo, o n - o iso-propilo; o R_2 y R_3 tomados junto con el carbono al que están anclados forman un anillo de ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo;

y en donde el término "sustituido" aplicado a cualquier fracción significa sustituido con hasta cuatro sustituyentes compatibles, cada uno de los cuales se selecciona independientemente entre, alquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , hidroxilo, hidroxialquilo C_1-C_6 , mercapto, mercaptoalquilo C_1-C_6 , alquil(C_1-C_6)tio, fenilo, halo (incluyendo fluoro, bromo y cloro), trifluorometilo, trifluorometoxi, nitro, nitrilo

35 $(-CN)$, oxo, $-COOH$, $-COOR^A$, $-COR^A$, $-SO_2R^A$, $-CONH_2$, $-SO_2NH_2$, $-CONHR^A$, $-SO_2NHR^A$, $-CONR^AR^B$, $-SO_2NR^AR^B$, $-NH_2$, $-NHR^A$,

40 $-NR^AR^B$, $-OCONH_2$, $-OCONHR^A$, $-OCONR^AR^B$, $-NHCOR^A$, $-NHCOOR^A$, $-NR^BCOOR^A$, $-NHOSO_2OR^A$, $-NR^BSO_2OH$, $-NR^BSO_2OR^A$,

$-NHCONH_2$, $-NR^ACONH_2$, $-NHCONHR^B$, $-NR^ACONHR^B$, $-NHCONR^AR^B$, y $NR^ACONR^AR^B$ en donde R^A y R^B son independientemente un alquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , fenilo o heteroarilo monocíclico que tiene 5 o 6 átomos anulares, o R^A y R^B cuando se anclan al mismo átomo de nitrógeno forman un grupo amino cíclico (por ejemplo morfolino, piperidinilo, piperazinilo, o tetrahidropirrolilo). Un "sustituyente opcional" puede ser uno de los grupos sustituyentes anteriores.

Los compuestos de fórmula (I) anteriores se pueden preparar en forma de sales, especialmente sus sales, N-óxidos, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables. Cualquier reivindicación de un compuesto de la presente memoria, o referencia de la presente memoria a "compuestos de la invención", "compuestos con los que tiene que ver la invención", "compuestos de fórmula (I)" y similares, incluye sales, N-óxidos, hidratos, y solvatos de tales compuestos.

Aunque la definición potencialmente incluye moléculas de alto peso molecular, es preferible, en línea con los principios generales de la práctica química médica, que los compuestos con los que tiene que ver esta invención tengan pesos moleculares de no más de 600,

Un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, o un N-óxido, sal, hidrato o solvato del mismo se puede utilizar en la preparación de una composición para inhibir la actividad de una enzima MAP quinasa P38,

Los compuestos con los que tiene que ver la invención se pueden utilizar para la inhibición de actividad de la enzima MAP quinasa P38 *in vitro* o *in vivo*.

En un aspecto de la invención, los compuestos de la invención son para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, concretamente aquellas mencionadas anteriormente en las que la actividad de la MAP quinasa P38 juega un papel.

- 5 Un método para el tratamiento de los tipos de enfermedades anteriores puede comprender la administración a un sujeto que padezca tal enfermedad una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente.

Terminología

- 10 El término "éster" o "grupo carboxilo esterificado" significa un grupo $R^xO(C=O)-$ en el que R^x es el grupo que caracteriza el éster, teóricamente derivado del alcohol R^xOH .

- 15 Según se utiliza en la presente memoria, el término "alquilo C_a-C_b " en donde a y b son números enteros hace referencia a un radical alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene de a a b átomos de carbono. De este modo cuando a es 1 y b es 6, por ejemplo, el término incluye metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, n-pentilo y n-hexilo.

- 20 Según se utiliza en la presente memoria el término "radical alquilenos C_a-C_b divalente" en donde a y b son números enteros hace referencia a una cadena hidrocarbonada saturada que tiene de a a b átomos de carbono y dos valencias no satisfechas.

- 25 Según se utiliza en la presente memoria el término "alqueno C_a-C_b " en donde a y b son números enteros hace referencia a una fracción de alqueno de cadena lineal o ramificada que tiene de a a b átomos de carbono que tiene al menos un enlace doble de cualquier estereoquímica E o Z cuando sea aplicable. El término incluye, por ejemplo, vinilo, alilo, 1- y 2-butenilo y 2-metil-2-propenilo.

- 30 Según se utiliza en la presente memoria el término "radical alquilenos C_a-C_b divalente" significa una cadena hidrocarbonada que tiene de a a b átomos de carbono, al menos un enlace doble, y dos valencias no satisfechas.

- 35 Según se utiliza en la presente memoria el término "alquino C_a-C_b " en donde a y b son números enteros hace referencia a grupos hidrocarbonados de cadena lineal o cadena ramificada que tienen de a a b átomos de carbono y que tienen además un enlace triple. Este término incluiría por ejemplo, etinilo, 1-propinilo, 1- y 2-butinilo, 2-metil-2-propinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, 4-pentinilo, 2-hexinilo, 3-hexinilo, 4-hexinilo y 5-hexinilo.

- Según se utiliza en la presente memoria el término "radical alquilenos C_a-C_b divalente" en donde a y b son números enteros hace referencia a una cadena hidrocarbonada divalente que tiene de a a b átomos de carbono, y al menos un enlace triple.

- 40 Según se utiliza en la presente memoria el término "carbocíclico" hace referencia a un radical mono-, bi- o tricíclico o un radical monocíclico puenteado (por ejemplo biciclo[2,2,1]hept-2-ilo), que tienen hasta 16 átomos anulares todos los cuales son carbono, e incluyen arilo y cicloalquilo.

- 45 Según se utiliza en la presente memoria el término "cicloalquilo" hace referencia a un radical carbocíclico saturado monocíclico que tiene 3-8 átomos de carbono e incluye, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

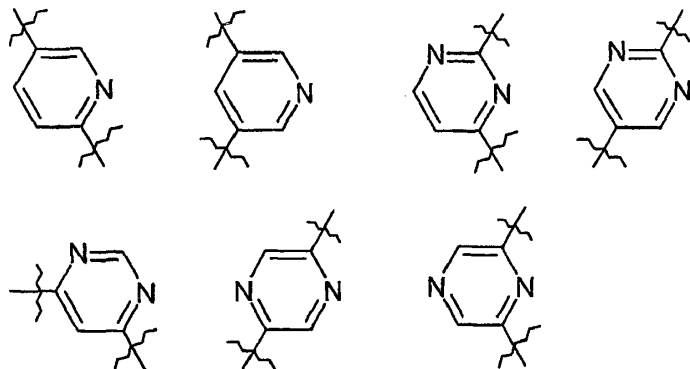
- 50 Según se utiliza en la presente memoria el término exclusivo "arilo" hace referencia a un radical aromático carbocíclico mono-, bi- o tri-cíclico, e incluye radicales que tienen dos anillos aromáticos carbocíclicos monocíclicos que se conectan directamente por medio de un enlace covalente. Son ilustrativos de tales radicales fenilo, bifenilo y naftilo.

- 55 Según se utiliza en la presente memoria el término exclusivo "heteroarilo" hace referencia a un radical aromático mono-, bi- o tri-cíclico que contiene uno o más heteroátomos seleccionados entre S, N y O, e incluye radicales que tienen dos de tales anillos monocíclicos, o uno de tales anillos monocíclico y un anillo de arilo monocíclico, que se conectan directamente por medio de un enlace covalente. Son ilustrativos de tales radicales tienilo, benzotienilo, furilo, benzofurilo, pirrolilo, imidazolilo, benzimidazolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, isotiazolilo, benzisotiazolilo, pirazolilo, oxazolilo, benzoxazolilo, isoxazolilo, benzisoxazolilo, isotiazolilo, triazolilo, benzotriazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, indolilo y indazolilo.

- 60 Según se utiliza en la presente memoria el término exclusivo "heterocíclico" o "heterocíclico" incluye "heteroarilo" como se ha definido anteriormente, y en su significado no aromático se refiere a un radical no aromático mono-, bi- o tri-cíclico o un radical no aromático monocíclico puenteado, que contiene uno o más heteroátomos seleccionados entre S, N y O, y a grupos que consisten en un radical no aromático monocíclico que contiene uno o más de tales

heteroátomos que está unido covalentemente a otro de tales radicales o a un radical carbocíclico monocíclico. Son ilustrativos de tales radicales los grupos pirrolilo, furanilo, tienilo, piperidinilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, pirazolilo, piridinilo, pirrolidinilo, pirimidinilo, piperazinilo, indolilo, morfolinilo, benzofuranilo, piranilo, isoxazolilo, benzimidazolilo, metilendioxfenilo, etilendioxfenilo, maleimido y succinimido.

Un "radical fenileno, piridinileno, pirimidinileno, o pirazinileno divalente" es un anillo de benceno, piridina, pirimidina o pirazina, con dos valencias no satisfechas, e incluye 1,3-fenileno, 1,4-fenileno, y los siguientes:



A no ser que se especifique lo contrario en el contexto en el que ocurre, el término "sustituido" aplicado a cualquier fracción de la presente memoria significa sustituido con hasta cuatro sustituyentes compatibles, cada uno de los cuales puede ser independientemente, por ejemplo, alquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , hidroxilo, hidroxialquilo C_1-C_6 , mercapto, mercaptoalquilo C_1-C_6 , alquil(C_1-C_6)tio, fenilo, halo (incluyendo fluoro, bromo y cloro), trifluorometilo, trifluorometoxi, nitro, nitrilo ($-CN$), oxo, $-COOH$, $-COOR^A$, $-COR^A$, $-SO_2R^A$, $-CONH_2$, $-SO_2NH_2$, $-CONHR^A$, $-SO_2NHR^A$, $-CONR^AR^B$, $-SO_2NR^AR^B$, $-NH_2$, $-NHR^A$, $-NR^AR^B$, $-OCONH_2$, $-OCONHR^A$, $-OCONR^AR^B$, $-NHCOR^A$, $-NHCOOR^A$, $-NR^BCOOR^A$, $-NHOSO_2OR^A$, $-NR^BSO_2OH$, $-NR^BSO_2OR^A$, $-NHCONH_2$, $-NR^ACONH_2$, $-NHCONHR^B$, $-NR^ACONHR^B$, $-NHCONR^AR^B$, o $-NR^ACONR^AR^B$ en donde R^A y R^B son independientemente un alquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , fenilo o heteroarilo monocíclico que tiene 5 o 6 átomos anulares, o R^A y R^B cuando se anclan al mismo átomo de nitrógeno forman un grupo amino cíclico (por ejemplo morfolino, piperidinilo, piperazinilo, o tetrahidropirrolilo). Un "sustituyente opcional" puede ser uno de los grupos sustituyentes anteriores.

El término "cadena lateral de un alfa-aminoácido natural o no natural" hace referencia al grupo R^Y en un aminoácido natural o no natural de fórmula $NH_2-CH(R^Y)-COOH$.

Los ejemplos de cadenas laterales de alfa-aminoácidos naturales incluyen aquellos de alanina, arginina, asparragina, ácido aspártico, cisteína, cistina, ácido glutámico, histidina, 5-hidroxilisina, 4-hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, ácido α -aminoadípico, ácido α -amino-n-butírico, 3,4-dihidroxifenilalanina, homoserina, α -metilserina, ornitina, ácido pipécólico, y tiroxina.

Los alfa-aminoácidos naturales que contienen sustituyentes funcionales, por ejemplo grupos amino, carboxilo, hidroxilo, mercapto, guanidilo, imidazolilo, o indolilo en sus cadenas laterales características incluyen arginina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico, triptófano, histidina, serina, treonina, tirosina, y cisteína. Cuando R_2 o R_3 en los compuestos de la invención es una de esas cadenas laterales, el sustituyente funcional se puede proteger opcionalmente.

El término "protegido" cuando se utiliza en relación con un sustituyente funcional en una cadena laterales de un alfa-aminoácido natural significa un derivado de tal sustituyente que es sustancialmente no funcional. Por ejemplo, los grupos carboxilo se pueden esterificar (por ejemplo en forma de un éster alquílico C_1-C_6), los grupos amino se pueden convertir en amidas (por ejemplo en forma de una $NHCO$ -alquil(C_1-C_6)amida) o los carbamatos (por ejemplo en forma de un carbamato de $NHC(=O)O$ -alquilo C_1-C_6 o $NHC(=O)OCH_2Ph$), los grupos hidroxilo se pueden convertir en éteres (por ejemplo un O -alquilo C_1-C_6 o un O -alquil(C_1-C_6)feniléter) o ésteres (por ejemplo un éster de $OC(=O)$ -alquilo C_1-C_6) y los grupos tiol se pueden convertir en tioéteres (por ejemplo un terc-butil- o bencil- tioéter) o tioésteres (por ejemplo un tioéster de $SC(=O)$ -alquilo C_1-C_6).

Los ejemplos de las cadenas laterales de los alfa-aminoácidos no naturales incluyen aquellos referidos más abajo en la discusión de los grupos R_2 y R_3 adecuados para su uso en los compuestos de la presente invención.

Según se utiliza en la presente memoria el término "sal" incluye sales de adición de base, de adición de ácido y cuaternarias. Los compuestos de la invención que son ácidos pueden formar sales, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables, con bases tales como hidróxidos de metales alcalinos, p. ej. hidróxidos de sodio y potasio; hidróxidos de metales alcalinotérreos p. ej. hidróxidos de calcio, bario y magnesio; con bases orgánicas p. ej. N-metil-D-glucamina, colina, tris(hidroximetil)amino-metano, L-arginina, L-lisina, N-etilpiperidina, dibencilamina y similares. Esos compuestos (I) que son alcalinos pueden formar sales, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables con ácidos inorgánicos, p. ej. con ácidos hidrohalegenados tales como ácidos clorhídrico o bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico o ácido fosfórico y similares, y con ácidos orgánicos p. ej. con los ácidos acético, tartárico, succínico, fumárico, maleico, málico, salicílico, cítrico, metanosulfónico, p-toluenosulfónico, benzoico, bencenosulfónico, glutámico, láctico, y mandélico y similares. Para una revisión de las sales adecuadas, véase Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

El término 'solvato' se utiliza en la presente memoria para describir un complejo molecular que comprende el compuesto de la invención y una cantidad estequiométrica de una o más moléculas disolventes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, etanol. El término 'hidrato' se emplea cuando dicho disolvente es el agua.

Los compuestos de la invención que contienen uno o más centros quirales reales o potenciales, debido a la presencia de átomos de carbono asimétricos, pueden existir en forma de enantiómeros o en forma de varios de diastereoisómeros con estereoquímica R o S en cada centro quiral. La invención incluye todos estos enantiómeros y diastereoisómeros y mezclas de los mismos.

Como se ha mencionado, los ésteres de la invención son convertidos por las esterasas intracelulares en los ácidos carboxílicos. Tanto los ésteres como los ácidos carboxílicos pueden tener actividad inhibidora de la MAP quinasa P38 por sí mismos. Los compuestos de la invención incluyen por lo tanto no solo el éster, sino también los correspondientes productos de la hidrólisis de los ácidos carboxílicos.

En los compuestos con los que tiene que ver la invención, en cualquier combinación compatible, pueden estar presentes las siguientes características estructurales:

El grupo D

D es fenilo sustituido opcionalmente o piridinilo sustituido opcionalmente. Los sustituyentes opcionales se han referido anteriormente, pero los sustituyentes opcionales preferidos en D incluyen fluoro y cloro, por ejemplo cuando D es 2,4-difluorofenilo.

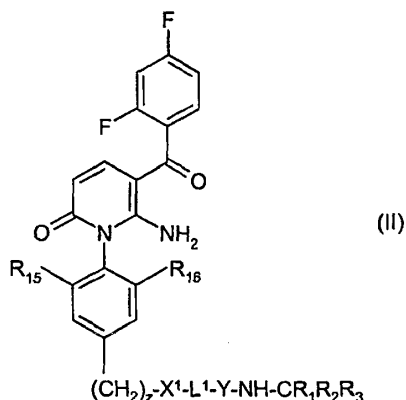
Regioisómeros P/U

P es hidrógeno y U es un radical de fórmula (IA) como se ha definido anteriormente.

El radical A

En el radical de fórmula (IA), A es 1,4-fenileno sustituido opcionalmente. Los sustituyentes opcionales han sido referidos anteriormente, pero los sustituyentes opcionales preferidos incluyen fluoro y cloro.

Un sub-grupo de compuestos de la invención concretamente preferido consiste en aquellos de fórmula (II):



en donde R_{15} y R_{16} son independientemente hidrógeno o flúor, y en donde z , X^1 , L^1 , Y , R^1 , R^2 y R^3 son los que se han definido anteriormente con referencia a la fórmula (I), y como se comenta adicionalmente más abajo.

El radical $-Y-L^1-X^1-[CH_2]_z-$

Este radical (o enlace) surge de la estrategia química concreta elegida para conectar el motivo éster $R_1R_2R_3CNH-$ al sistema anular A. Claramente la estrategia química para ese acoplamiento puede variar ampliamente, y por tanto son posibles muchas combinaciones de las variables Y , L^1 , X^1 y z . La combinación de variables precisa que constituye la química de conexión entre el motivo éster del aminoácido y el sistema anular A a menudo será irrelevante para el modo de unión primaria del compuesto en general. Por otro lado, esa química de conexión en algunos casos recogerá interacciones de unión adicionales con la enzima. Se debe observar también que los beneficios del motivo éster de aminoácido (fácil entrada en la célula, hidrólisis de esterasa en el interior de la célula, y acumulación en el interior de la célula del producto activo de la hidrólisis de los ácidos carboxílicos) se logran mejor cuando la conexión entre el motivo éster de aminoácido y el sistema anular A no es un sustrato para la actividad peptidasa en el interior de la célula, lo que podría dar como resultado la escisión del aminoácido de la molécula. Por supuesto, la estabilidad de las peptidasas intracelulares se somete a ensayo fácilmente incubando el compuesto con los contenidos celulares desorganizados, y analizando cualquiera de tales escisiones.

Con las observaciones generales anteriores en mente, tomando las variables que constituyen el radical $-Y-L^1-X^1-[CH_2]_z-$ sucesivamente:

z puede ser 0 o 1, de manera que el radical metileno conectado al sistema anular A es opcional;

los ejemplos preferidos específicos de Y cuando no se requiere selectividad del macrófago incluyen $-(C=O)-$, $-(C=O)NH-$, y $-(C=O)O-$; Cuando se requiere selectividad del macrófago son apropiadas cualquiera de las otras opciones para Y ,

incluyendo el caso en el que Y es un enlace.

En el radical L^1 , los ejemplos de los radicales Alk^1 y Alk^2 , cuando están presentes, incluyen $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$,

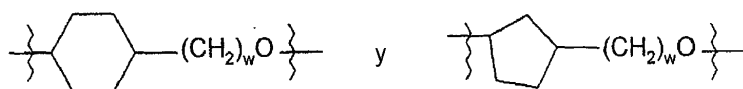
$-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH=CH-$, $-CH=CHCH_2-$, $-CH_2CH=CH-$, $CH_2CH=CHCH_2-C\equiv C-$, $-C\equiv CCH_2-$, $-CH_2C\equiv C-$, y $CH_2C\equiv CCH_2$. Los ejemplos adicionales de Alk^1 y Alk^2 incluyen $-CH_2W-$, $-CH_2CH_2W-$, $-CH_2CH_2WCH_2-$, $-CH_2CH_2WCH(CH_3)-$, $-CH_2WCH_2CH_2-$,

$-CH_2WCH_2CH_2CH_2-$ y $-WCH_2CH_2-$ donde W es $-O-$, $-S-$, $-NH-$, $-N(CH_3)-$, o $-CH_2CH_2N(CH_2CH_2OH)CH_2-$. Los ejemplos adicionales de Alk^1 y Alk^2 incluyen los radicales ciclopropilo, ciclopentilo y ciclohexilo divalentes.

En L^1 , cuando n es 0, el radical es una cadena hidrocarbonada (sustituida opcionalmente y que tiene quizás una conexión éter, tioéter o amino). Por el momento se prefiere que no haya sustituyentes opcionales en L^1 . Cuando m y p son 0, L^1 es un radical carbocíclico o heterocíclico mono- o bicíclico divalente con 5 - 13 átomos anulares (sustituido opcionalmente). Cuando n es 1 y al menos uno de m y p es 1, L^1 es un radical divalente que incluye una o varias cadenas hidrocarbonadas y un radical carbocíclico o heterocíclico mono- o bicíclico con 5 - 13 átomos anulares (sustituido opcionalmente). Cuando está presente, Q puede ser, por ejemplo, un radical fenilo, naftilo, ciclopropilo, ciclopentilo, o ciclohexilo divalente, o un radical heterocíclico mono-, o bi-cíclico que tiene 5 a 13 miembros anulares, tal como un radical piperidinilo, piperazinilo, indolilo, piridilo, tienilo, o pirrolilo, pero por el momento se prefiere 1,4-fenileno.

Específicamente, en algunas realizaciones de la invención, L^1 , m y p pueden ser 0 siendo n 1. En otras realizaciones, n y p pueden ser 0 siendo m 1. En realizaciones adicionales w , m , n y p pueden ser todos 0. En otras realizaciones adicionales m puede ser 0, n puede ser 1 siendo Q un radical heterocíclico monocíclico, y p puede ser 0 o 1, Alk^1 y Alk^2 , cuando están presentes, se pueden seleccionar entre $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2O-$, $-CH_2CH_2O-$, $-CH_2OCH_2-$, $-CH_2CH_2OCH_2-$, y Q puede ser 1,4-fenileno.

Los ejemplos específicos del radical $-Y-L^1-X^1-[CH_2]_z-$ incluyen $-C(=O)-$ y $-C(=O)NH-$ así como $-(CH_2)_v-$, $-(CH_2)_vO-$, $-C(=O)-(CH_2)_v-$, $-C(=O)-(CH_2)_vO-$, $-C(=O)-NH-(CH_2)_w-$, $-C(=O)-NH-(CH_2)_wO-$



en donde v es 1, 2, 3 o 4 y w es 1, 2 o 3, tal como $Y-L^1-X^1-[CH_2]_z-$, es $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2O-$, $-CH_2CH_2O-$, $-CH_2CH_2CH_2O-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2O-$, $-C(=O)-CH_2-$, $-C(=O)-CH_2O-$, $-C(=O)-NH-CH_2-$, o $-C(=O)-NH-CH_2O-$.

El grupo R_1

El grupo éster R_1 debe ser uno que en el compuesto de la invención sea hidrolizable por una o más enzimas carboxilesterasas intracelulares a un grupo ácido carboxílico. Las enzimas carboxilesterasas intracelulares capaces de hidrolizar el grupo éster de un compuesto de la invención al ácido correspondiente incluyen los tres isotipos

enzimáticos humanos conocidos hCE-1, hCE-2 y hCE-3. Si bien se considera que estas son las enzimas principales, otras enzimas tales como la bifenilhidrolasa (BPH) pueden tener también un papel en la hidrólisis del éster. En general, si la carboxilesterasa hidroliza el éster de aminoácido al ácido parental también hidrolizará el motivo éster cuando se conjugue covalentemente con el inhibidor. Por tanto, análisis con células rotas y/o el análisis con carboxilesterasa aislada descrito en la presente memoria proporciona un primer escrutinio directo, rápido y sencillo para ésteres que tienen el perfil de hidrólisis requerido. Los motivos éster seleccionados de ese modo se pueden volver analizar en el mismo análisis de carboxilesterasa cuando se conjuguen al inhibidor a través de la química de conjugación elegida, para confirmar que todavía es un sustrato de carboxilesterasa en ese contexto.

Sujeto al requerimiento de que sean hidrolizables por medio de enzimas carboxilesterasas intracelulares, R_1 es un grupo éster de fórmula $-(C=O)OR_{14}$ en donde R_{14} es $R_8R_9R_{10}C-$ en donde

(i) R_8 es hidrógeno o alquil(C_1-C_3)-(Z^1) $_a$ -[alquil(C_1-C_3)] $_b-$ o alquenil(C_2-C_3)-(Z^1) $_a$ -[alquil(C_1-C_3)] $_b-$ sustituidos opcionalmente en donde a y b son independientemente 0 o 1 y Z^1 es $-O-$, $-S-$, o $-NR_{11}-$ en donde R_{11} es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 ; y R_9 y R_{10} son independientemente hidrógeno o alquil(C_1-C_3)-;

(ii) R_8 es hidrógeno o $R_{12}R_{13}N$ -alquil(C_1-C_3)- sustituido opcionalmente en donde R_{12} es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 y R_{13} es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 ; o R_{12} y R_{13} junto con el nitrógeno al que están anclados forman un anillo heterocíclico monocíclico sustituido opcionalmente de 5 o 6 átomos anulares o un sistema anular heterocíclico bicíclico de 8 a 10 átomos anulares, y R_9 y R_{10} son independientemente hidrógeno o alquil(C_1-C_3)-; o

(iii) R_8 y R_9 tomados junto con el carbono al que están anclados forman un anillo carbocíclico monocíclico sustituido opcionalmente de 3 a 7 átomos anulares o un sistema anular carbocíclico bicíclico de 8 a 10 átomos anulares, o un sistema anular carbocíclico monocíclico puenteado de 7 a 10 átomos anulares, y R_{10} es hidrógeno.

En los casos (i), (ii) y (iii) anteriores, "alquilo" incluye fluoroalquilo.

En estas clases (i), (ii) y (iii), R_{10} es a menudo hidrógeno. Los ejemplos específicos de R_{14} incluyen metilo, trifluorometilo, etilo, n - o iso-propilo, n -, sec - o $terc$ -butilo, ciclohexilo, alilo, biciclo[2.2.1]hept-2-il, 2,3-dihidro-1*H*-inden-2-ilo, fenilo, bencilo, 2-, 3- o 4-piridilmetilo, N -metilpiperidin-4-ilo, tetrahydrofuran-3-ilo o metoxietilo.

Actualmente se prefiere que R_{14} sea ciclopentilo.

Se sabe que los macrófagos juegan un papel clave en los trastornos inflamatorios a través de la liberación de citoquinas, en particular TNF α e IL-1 (van Roon et al, Arthritis and Rheumatism, 2003, 1229-1238). En la artritis reumatoide, son los principales contribuyentes al mantenimiento de la inflamación en la articulación y en la destrucción de la articulación. Los macrófagos también están implicados en el crecimiento y el desarrollo tumoral (Naldini y Carraro, Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005, 3-8). Por consiguiente, los agentes que se dirigen selectivamente a la proliferación de macrófagos podrían tener valor en el tratamiento del cáncer y las enfermedades autoinmunitarias. Cabría esperar que el redireccionamiento a tipos de células específicos condujera a una reducción de los efectos secundarios. Los autores de la presente invención han descubierto un método de redireccionamiento de los inhibidores de la quinasa p38 a los macrófagos que se basa en la observación de que la manera en la que el motivo esterasa se une al inhibidor de la quinasa p38 determina si éste es hidrolizado, y por consiguiente si se acumula o no en diferentes tipos de células. Se ha descubierto específicamente que los macrófagos contienen la carboxilesterasa humana hCE-1, mientras otros tipos de células no. En la fórmula general (I), cuando el nitrógeno del motivo $R_1C(R_2)(R_3)NH-$ de la esterasa no está unido directamente a un carbonilo ($-C(=O)-$), esto es, cuando Y no es un radical $-C(=O)$, $-C(=O)O-$ o $-C(=O)NR_3-$, el éster solamente será hidrolizado por hCE-1 y por lo tanto los inhibidores solamente se acumularán en los macrófagos. En la presente memoria, a menos que se especifique "monocito" o "monocitos", se utilizará el término macrófago o macrófagos para indicar macrófagos (incluyendo macrófagos asociados a tumores) y/o monocitos.

Sustituyentes R_2 y R_3

Los sustituyentes R_2 y R_3 pueden ser considerados como α -sustituyentes de una glicina α,α -disustituida o un éster de glicina α,α -disustituido.

En la presente invención uno de R_2 y R_3 es metilo, y el otro es metilo, etilo, o n - o iso-propilo; o R_2 y R_3 se toman junto con el átomo de carbono al cual están anclados forman un anillo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo. En un caso concreto, los sustituyentes R_2 y R_3 son cada uno metilo.

Para los compuestos de la invención que se van a administrar sistémicamente, se prefieren los ésteres con una baja velocidad de escisión por carboxilesterasa, puesto que son menos susceptibles al metabolismo pre-sistémico. Su capacidad para alcanzar su tejido diana intactos por lo tanto se incrementa, y el éster se puede convertir en el interior de las células del tejido diana en el producto ácido. Sin embargo, para la administración local, en la que el éster o bien se aplica directamente al tejido diana o bien se redirige allí por ejemplo, mediante inhalación, a menudo será deseable que el éster tenga una rápida velocidad de escisión por la esterasa, para minimizar la exposición

sistémica y los consiguientes efectos secundarios no deseados. En los compuestos de esta invención, si el carbono adyacente al carbono alfa del éster de alfa aminoácido está monosustituido, es decir, R_2 es CH_2R^z (siendo R^z el mono-sustituyente) en ese caso los ésteres tienden a ser escindidos más rápidamente que si el carbono está di- o tri-sustituido, como en el caso en el que R_2 es, por ejemplo, fenilo o ciclohexilo.

Como se ha mencionado anteriormente, los compuestos con los cuales tiene que ver la invención son inhibidores de la actividad MAP quinasa p38, y por lo tanto tienen uso en el tratamiento de enfermedades tales como psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, esclerosis múltiple, diabetes, dermatitis atópica, enfermedad de injerto frente a anfitrión, o lupus eritematoso generalizado y artritis reumatoide, en las que la actividad MAP quinasa p38 juega un papel.

Se entenderá que el nivel de dosificación específico para cualquier paciente concreto dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la ruta de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad concreta que está experimentando tratamiento. Los niveles de dosificación y la frecuencia de dosificación óptimos serán determinados por medio de pruebas clínicas.

Los compuestos con los cuales está relacionada la invención se pueden preparar para su administración por medio de cualquier ruta coherente con sus propiedades farmacocinéticas. Las composiciones administrables oralmente pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, grageas, preparaciones líquidas o en gel, tales como soluciones o suspensiones orales, tópicas, o parenterales estériles. Los comprimidos y las cápsulas para la administración oral pueden estar en una forma de presentación de dosis unitaria, y pueden contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, por ejemplo jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes para formar comprimidos, por ejemplo estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; disgregantes, por ejemplo almidón de patata, o agentes humectantes aceptables tales como laurilsulfato de sodio. Los comprimidos se puede recubrir de acuerdo con los métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal. Las preparaciones líquidas orales pueden estar, por ejemplo, en forma de suspensiones, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires acuosos u oleosos, o se pueden presentar en forma de un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo sorbitol, jarabe, metilcelulosa, glucosa, gelatina, grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes, por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitán, o acacia; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo aceite de almendra, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos tales como glicerina, propilenglicol, o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico, y si se desea agentes aromatizantes o colorantes convencionales.

Para la aplicación tópica a la piel, el fármaco se puede formar en una crema, loción o pomada. Las formulaciones para crema o pomada que se pueden utilizar para el fármaco son formulaciones convencionales bien conocidas en la técnica, por ejemplo como se describe en los libros de texto de farmacia convencionales tales como la British Pharmacopoeia.

Para la aplicación tópica mediante inhalación, el fármaco se puede formular para su liberación en aerosol, por ejemplo, mediante atomizadores de chorro impulsado por presión o atomizadores ultrasónicos, o preferiblemente mediante aerosoles medidos accionados con propelentes o administración sin propelente de polvos micronizados, por ejemplo, cápsulas de inhalación u otros sistemas de liberación de "polvo seco". En tales formulaciones inhaladas pueden estar presentes excipientes, tales como, por ejemplo, propelentes (p. ej. Frigen en el caso de aerosoles medidos), sustancias tensioactivas, emulsionantes, estabilizadores, conservantes, aromas, y cargas (p. ej. lactosa en el caso de inhaladores de polvo). Para la inhalación, se encuentra disponible un gran número de aparatos con los cuales se pueden generar y administrar aerosoles con un tamaño de partícula óptimo, utilizando un mecanismo de inhalación que sea apropiado para el paciente. Además, del uso de adaptadores (espaciadores, expansores) y recipientes con forma de pera (p. ej. Nebulator®, Volumatic®), y dispositivos automáticos que emiten una pulverización desde un soplador (Autohaler®), para los aerosoles medidos, en particular en el caso de los inhaladores de polvo, se encuentran disponibles numerosas soluciones técnicas (p. ej. Diskhaler®, Rotadisk®, Turbohaler® o inhaladores por ejemplo como se describe en la Solicitud de Patente Europea EP 0 505 321).

Para la aplicación tópica en el ojo, el fármaco se puede elaborar en una disolución o suspensión en un vehículo acuoso o no acuoso estéril adecuado. También se pueden incluir aditivos, por ejemplo tampones tales como metabisulfito de sodio o edetato de sodio; conservantes que incluyen agentes bactericidas y fungicidas tales como acetato o nitrato fenilmercurio, cloruro de benzalconio o clorhexidina, y agentes espesantes tales como hipromelosa.

El ingrediente activo también se puede administrar parenteralmente en un medio estéril. Dependiendo del vehículo y de la concentración utilizados, el fármaco se puede suspender o disolver en el vehículo. Ventajosamente, se pueden

disolver en el vehículo coadyuvantes tales como un anestésico local, un conservante y un agente tamponador.

Síntesis

5 Existen múltiples estrategias sintéticas para la síntesis de los compuestos (I) con los cuales está relacionada la presente invención, pero todas ellas se basan en la química conocida por los químicos orgánicos sintéticos. De este modo, los compuestos de acuerdo con la fórmula (I) se pueden sintetizar de acuerdo con los procedimientos descritos en la bibliografía convencional y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las fuentes de bibliografía típica son "Advanced organic chemistry", 4ª Edición (Wiley), J March, "Comprehensive Organic Transformation", 2ª Edición (Wiley), R.C. Larock, "Handbook of Heterocyclic Chemistry", 2ª Edición (Pergamon), A.R. Katritzky), artículos revisados tales como los encontrados en "Synthesis", "Acc. Chem. Res.", "Chem. Rev.", o fuentes de bibliografía primaria identificadas por fuentes de bibliografía convencional en línea o de fuentes secundarias tales como "Chemical Abstracts" o "Beilstein".

15 Los compuestos de la invención se pueden preparar mediante numerosos procedimientos descritos generalmente más abajo y más específicamente en los Ejemplos a continuación. En las reacciones descritas más adelante, puede ser necesario proteger grupos funcionales reactivos, por ejemplo grupos hidroxilo, amino y carboxi, cuando estos se desean en el producto final, para evitar su participación no deseada en las reacciones [véase, por ejemplo Greene, T.W., "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, 1999]. Los grupos protectores convencionales se pueden utilizar junto con la práctica convencional. En algunos casos la desprotección puede ser la etapa final de la síntesis de un compuesto de fórmula general (I) y se entiende que los procedimientos de acuerdo con la invención descritos más adelante se extienden a tal eliminación de los grupos protectores.

25 Los compuestos de la invención se pueden preparar de acuerdo con los siguientes Ejemplos. Todas las temperaturas están en °C. Se utilizan las siguientes abreviaturas:

EtOAc = acetato de etilo
 Boc = terc-butoxicarbonilo
 CDI = 1,1'-carbonildiimidazol
 DCM = diclorometano
 30 DMAP = dimetilaminopiridina
 DMF = dimetilformamida
 DMSO = dimetilsulfóxido
 NMP = 1-metil-2-pirrolidinona
 THF = tetrahidrofurano
 35 HCl = ácido clorhídrico
 NaHCO₃ = hidrogenocarbonato de sodio
 Pd/C = paladio sobre carbono
 MgSO₄ = sulfato de magnesio
 EDCI = hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
 40 Et₂O = éter diétilico
 HOBt = 1-hidroxibenzotriazol
 TFA = ácido trifluoroacético
 TLC = cromatografía en capa fina
 ml = mililitros
 45 g = gramos
 mg = miligramos
 mol = moles
 mmol = milimoles
 LCMS = cromatografía de líquidos de alta resolución/espectrometría de masas
 50 RMN = resonancia magnética nuclear
 RT = temperatura ambiente

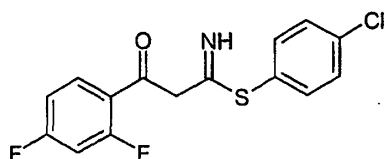
Se llevó a cabo la irradiación con microondas utilizando un reactor de microondas enfocado CEM Discover. Los disolventes se eliminaron utilizando GeneVac Serie I sin calentamiento o Genevac Serie II con VacRamp a 30°C o un evaporador giratorio Buchi. La purificación de los compuestos mediante una columna de cromatografía instantánea se llevó a cabo utilizando gel de sílice, tamaño de partícula 40-63 µm (malla 230-400) obtenido de Silicycle. La purificación de los compuestos mediante HPLC preparativa se llevó a cabo en un sistema Gilson utilizando columnas C18 ThermoHypersil-Keystone Hyperprep HS de fase inversa (12 µm, 100 x 21,2 mm), gradiente 20-100% B (A= agua/TFA al 0,1%, B= acetonitrilo/TFA al 0,1%) a lo largo de 9,5 min, flujo = 30 ml/min, disolvente de inyección DMSO:acetonitrilo 2:1 (1,6 ml), detección UV a 215 nm.

Los espectros de RMN H¹ se registraron en un espectrómetro Bruker 400 MHz AV o Bruker 300 MHz AV en disolventes deuterados. Los desplazamientos químicos (δ) son en partes por millón. El análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) se llevó a cabo con placas Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) y se visualizó utilizando luz

UV.

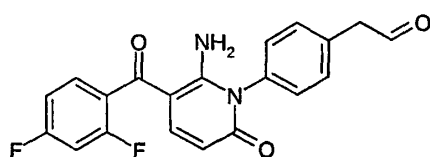
El análisis LCMS se llevó a cabo en sistemas de LC Agilent HP1100, Waters 600 o Waters 1525 utilizando columnas C18 Hypersil BDS de fase inversa (5 μ m, 2,1 x 50 mm), gradiente 0-95% B (A= agua/TFA al 0,1%, B= acetonitrilo/TFA al 0,1%) a lo largo de 2,10 min, flujo = 1,0 ml/min. Los espectros de UV se registraron a 215 nm utilizando un Gilson G1315A Diode Array Detector, un detector de UV de una longitud de onda G1214A, un detector de UV de longitud de onda dual Waters 2487, un detector de UV de longitud de onda dual Waters 2488, o un detector de UV de matriz de diodos Waters 2996. Los espectros de masas se obtuvieron a lo largo del intervalo m/z 150 a 850 a una velocidad de muestreo de 2 barridos por segundo o 1 barrido por 1,2 segundos utilizando Micromass LCT con una interfaz de pulverización Z o Micromass LCT con una interfaz de pulverización Z o MUX. Los datos fueron integrados y referidos utilizando el programa OpenLynx y OpenLynx Browser.

Intermedio 1: 3-(2,4-difluorofenil)-3-oxopropanimidotioato de 4-clorofenilo

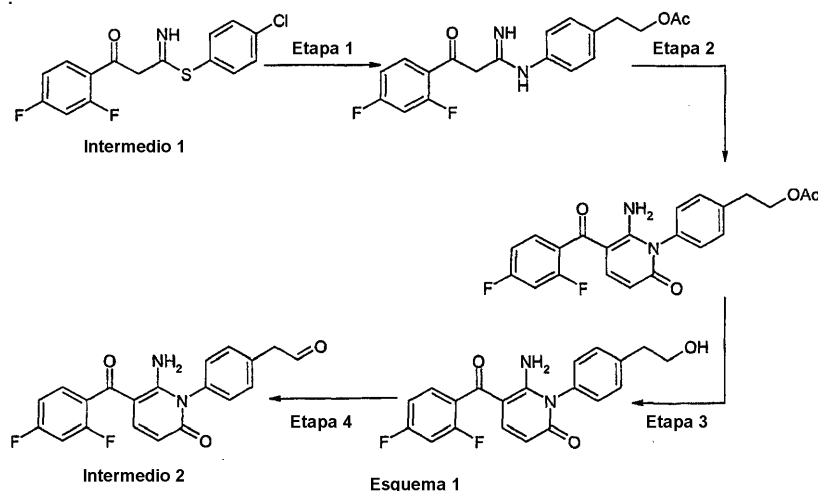


Intermedio 1 se puede preparar utilizando los procedimientos experimentales descritos en el documento WO 2003076405,

Intermedio 2: {4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)il]-fenil}acetaldehído



{4-[6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)il]-fenil}acetaldehído se sintetizó utilizando la ruta mostrada en el Esquema 1 de más abajo.



Etapa 1- acetato de 2-(4-[[3-(2,4-difluorofenil)-3-oxopropanimidoil]amino}fenil)etilo

Se suspendió 3-(2,4-difluorofenil)-3-oxopropanimidotioato de 4-clorofenilo (Intermedio 1) (69,7 g, 192 mmoles) en ácido acético glacial (700 ml) y se añadió 2-(4-aminofenil)etanol (27,71 g, 202 mmoles, 1,05 eq). La mezcla se calentó a 80°C durante 2,5 horas antes de dejar enfriar a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El residuo se trituroó con Et₂O (500 ml) y se lavó con Et₂O (2 x 250 ml) para producir un sólido de color blanco, que se suspendió en NaHCO₃ saturado (700 ml) y se agitó vigorosamente durante 30 minutos. La filtración y el lavado con agua proporcionó un sólido de color beige que se secó a presión reducida para producir el compuesto del título (64,12 g, rendimiento 92%).

CL/EM: m/z 361 [M+H]⁺. RMN H¹ (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 7,79-7,71 (1H, m), 7,45-7,07 (6H, m), 5,26 (1H, s), 4,21 (2H, t, J = 6,8 Hz), 2,89 (2H, t, J = 6,5 Hz), 2,00 (3H, s).

Etapla 2- acetato de 2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoi)-2-oxopiridin-1(2H)-il]fenil}etilo

Se disolvió CDI (43,26 g, 267 mmoles, 1,5 eq) en THF anhidro (1 l) en una atmósfera de nitrógeno y se enfrió a 0°C. Se añadió gota a gota ácido propiónico (16,43 ml, 267 mmoles, 1,5 eq) y se dejó que la mezcla se templara a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. Se añadió una suspensión de acetato de 2-{4-[3-(2,4-difluorofenil)-3-oxopropanimidol]-amino}fenil}etilo (64,12 g, 178 mmoles) en THF anhidro (500 ml) y la mezcla se calentó a 80°C durante 6 horas antes de dejar agitando a temperatura ambiente durante la noche. El precipitado resultante se recogió mediante filtración, se lavó con Et₂O y se secó a presión reducida para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (39,56 g). El producto filtrado se concentró a presión reducida para producir un aceite de color pardo que se trituró con EtOAc (500 ml), proporcionando un segundo lote de producto mediante filtración (7,21 g). Los dos lotes se combinaron para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (46,77 g, rendimiento 64 %).

CL/EM: m/z 413 [M+H]⁺. RMN H¹ (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 7,55- 7,37 (4H, m), 7,3-7,20 (4H, m), 5,72 (1H, d, J = 9,6 Hz), 4,30 (2H, t, J = 6,9 Hz), 3,01 (2H, t, J = 6,9 Hz), 2,04 (3H, s).

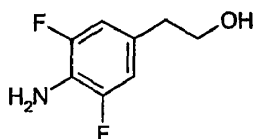
Etapla 3- 6-amino-5-(2,4-difluorobenzoi)-1-[4-(2-hidroxietil)fenil]piridin-2(1H)-ona

Se suspendió acetato de 2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoi)-2-oxopiridin-1(2H)-il]fenil}etilo (46,77 g, 113 mmoles) en HCl acuoso 6 N (500 ml) y se calentó a reflujo durante 2 horas. Un precipitado formado después de enfriar a temperatura ambiente que se recogió mediante filtración, se suspendió en NaHCO₃ acuoso saturado (1000 ml) y se agitó vigorosamente durante 30 minutos. La filtración, el lavado con agua (2 x 500 ml) y el secado a presión reducida proporcionaron el compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino (40,11 g, rendimiento 96 %). CL/EM: m/z 371 [M+H]⁺. RMN H¹ (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 7,55-7,37 (4H, m), 7,31-7,20 (4H, m), 5,71 (1 H, d, J = 9,9 Hz), 4,69 (1 H, t, J = 5,3 Hz), 3,71 (2H, m), 2,84 (2H, d, J = 6,9 Hz).

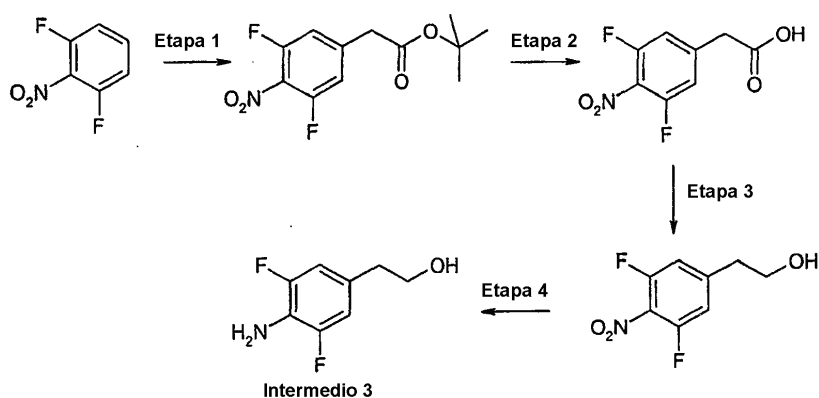
Etapla 4- {4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoi)-2-oxopiridin-1 (2H)-il]fenil}-acetaldehído

A una suspensión de 6-amino-5-(2,4-difluorobenzoi)-1-[4-(2-hidroxietil)fenil]-piridin-2(1H)-ona (15,00 g, 40,5 mmoles) en DCM anhidro (750 ml) a 0°C se le añadió Peryodinano Dess-Martin (20,62 g, 48,6 mmoles, 1,2 eq) en porciones. Se dejó que la mezcla se templara a temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas, antes de verterla en NaHCO₃ acuoso saturado (400 ml) y Na₂S₂O₃ acuoso saturado (400 ml) y se agitó vigorosamente durante 30 minutos. La capa acuosa se separó y se extrajo con DCM (2 x 500 ml), y los extractos orgánicos se combinaron y se secaron sobre MgSO₄. La filtración y concentración a presión reducida proporcionaron el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido que se utilizó sin purificación adicional (15,13 g). CL/EM: m/z 369 [M+H]⁺.

Intermedio 3: 2-(4-Amino-3,5-difluoro-fenil)-etanol



El 2-(4-amino-3,5-difluoro-fenil)-etanol se sintetizó utilizando la ruta mostrada en el Esquema 2 de más abajo.



Esquema 2

Etapa 1- (3,5-difluoro-4-nitrofenil)acetato de terc-butilo

- 5 Una mezcla de terc-butoxido de potasio (12,3 g, 111,0 mmoles) en NMP (100 ml) se enfrió a -20°C en N₂. Se añadió lentamente una mezcla de 2,6-difluoronitrobenzoceno (5,0 g, 31,43 mmoles) y cloroacetato de *terc*-butilo (7,6 ml, 53,11 mmoles) en NMP (100 ml) de -10°C a -20°C a lo largo de 1,5 horas. Al cabo de 1,5 horas la reacción se sofocó vertiéndola en HCl 2M (120 ml) y hielo, a continuación se añadió heptano (300 ml). La mezcla se agitó durante 10 minutos, se separó y la capa acuosa se extrajo con heptano (2 x 400 ml). La capa orgánica se lavó con salmuera (x2), se secó (MgSO₄), se filtró y se lavó con heptano. La solución se concentró a vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc/Heptano al 3-4%) para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite de color naranja (4,34 g, rendimiento 53%).
- 10 RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,06 (2H, d, J = 8,7Hz), 3,59 (2H, s), 1,48 (9H, s).

15 Etapa 2- ácido (3 5-difluoro-4-nitrofenil)acético

- A una solución de (3,5-difluoro-4-nitrofenil)acetato de terc-butilo (4,34 g, 15,88 mmoles) en DCM (10 ml), a 0°C, se le añadió TFA (10 ml). La reacción se templó a temperatura ambiente y se agitó durante 1,5 horas. La reacción se concentró a vacío, se suspendió en heptano (10 ml), se filtró y se secó para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color naranja (2,95 g, 86 % rendimiento).
- 20 RMN ¹H (300 MHz, d₆ DMSO) δ: 7,45 (2H, d, J = 9,6Hz), 3,79 (2H, s).

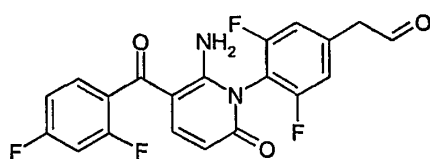
Etapa 3- 2-(3,5-difluoro-4-nitrofenil)etanol

- 25 Una solución de ácido (3,5-difluoro-4-nitrofenil)acético (2,95 g, 13,59 mmoles) en THF (30 ml), en N₂, se enfrió a 0°C y se añadió gota a gota una solución de BH₃Me₂S en THF (10,2 ml, 20,38 mmoles) a lo largo de 5 minutos. La mezcla se templó a temperatura ambiente y se agitó durante 4,5 horas. La reacción se enfrió a 0°C y se sofocó con MeOH (10 ml). La mezcla se concentró a vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc/Heptano al 30-60%) para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite (2,45 g, 89 % rendimiento).
- 30 RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,03 (2H, d, J = 9,3 Hz), 3,97-3,91 (2H, c, J = 5,4, 5,7 Hz), 2,93 (2H, t, J = 6,2 Hz), 1,52 (1H, t, J = 5,0 Hz).

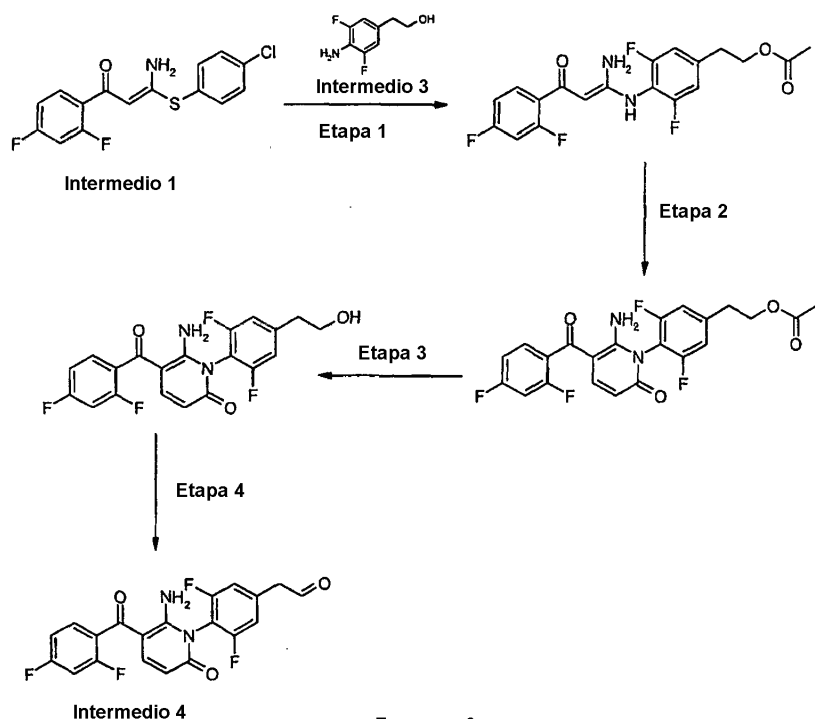
35 Etapa 4- 2-(4-amino-3,5-difluorofenil)etanol

- A una solución de 2-(3,5-difluoro-4-nitrofenil)etanol (2,45 g, 12,06 mmoles) en EtOAc (50 ml) se le añadió Pd/C (0,8 g). La mezcla se agitó en una atmósfera de H₂ durante 19 horas, se filtró y se concentró a vacío para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color pardo pálido (2,15 g, rendimiento 100%).
- 40 RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 6,70-6,67 (2H, m), 3,82 (2H, t, J = 6,5 Hz), 2,76 (2H, t, J = 6,5 Hz).

Intermedio 4: {4-[6-amino-5-(2,4-difluoro-benzoil)-2-oxo-2H-piridin-1-il]-3,5-difluoro-fenil]-acetaldehído



El {4-[6-Amino-5-(2,4-difluoro-benzoil)-2-oxo-2H-piridin-1-il]-3,5-difluoro-fenil}-acetaldehído se sintetizó utilizando la ruta mostrada en el Esquema 3 de más abajo.



Esquema 3

5

Etapa 1- acetato de 2-(4-[[1-amino-3-(2,4-difluorofenil)-3-oxoprop-1-en-1-il]amino]-3,5-difluorofenil)etilo

A una mezcla de hidrocloreto de 3-amino-3-[(4-clorofenil)tio]-1-(2,4-difluorofenil)prop-2-en-1-ona (3,99 g, 11,1 mmoles) (Intermedio 1) en ácido acético (20 ml) se le añadió 2-(4-amino-3,5-difluorofenil)etanol (Intermedio 3) (2,00 g, 11,6 mmoles) y la mezcla se calentó a 80°C durante 20 horas. La mezcla se enfrió, se concentró a vacío y el residuo se trituró en éter dietílico para proporcionar un sólido. El sólido se repartió entre EtOAc y NaHCO₃ sat., se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄) y se concentró a vacío para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido (2,91 g, rendimiento 67%).
CL/EM: m/z 397 [M+H]⁺.

15

Etapa 2- acetato de 2-[4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil]etilo

A una solución de CDI (1,78 g, 10,98 mmoles) en THF (36 ml), en N₂ a 0°C, se añadió gota a gota ácido propiónico (675 µl, 10,98 mmoles). La mezcla se templó a temperatura ambiente y se agitó durante 1,5 horas. Se añadió gota a gota una solución de acetato de 2-(4-[[1-amino-3-(2,4-difluorofenil)-3-oxoprop-1-en-1-il]amino]-3,5-difluorofenil)etilo (2,9 g, 7,32 mmoles) en THF (18 ml) y la mezcla se calentó a 80°C durante 5 horas. La mezcla se enfrió, se concentró a vacío y el residuo se purificó dos veces mediante cromatografía en columna (0,7-1% MeOH/DCM) para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido (1,20 g, rendimiento 37%).
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,49-7,39 (2H, m), 7,09-6,90 (4H, m), 5,93 (1 H, d, J = 9,9 Hz), 4,37 (2H, t, J = 6,4 Hz), 3,06 (2H, t, J = 6,6 Hz), 2,10 (3H, s).

25

Etapa 3- 6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-1-[2,6-difluoro-4-(2-hidroxietil)fenil]piridin-2(1 H)-ona

Una mezcla de acetato de 2-[4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil]etilo (1,1 g, 2,45 mmoles) en HCl ac. 6 N (50 ml) se calentó a reflujo durante 24 horas. La mezcla se enfrió, se filtró y se lavó con agua. El precipitado se repartió entre EtOAc y NaHCO₃ ac. sat., la capa orgánica se lavó adicionalmente con salmuera, se secó (MgSO₄) y se concentró a vacío para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido (993 mg, rendimiento 100%).
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,49-7,39 (2H, m), 7,15-6,90 (4H, m), 5,92 (1 H, d, J = 9,6 Hz), 4,00-3,85 (2H, m), 2,95 (2H, t, J = 6,0 Hz).

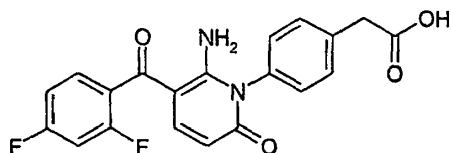
35

Etapa 4- {4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1 (2H)-il]-3,5-difluorofenil}acetaldehído

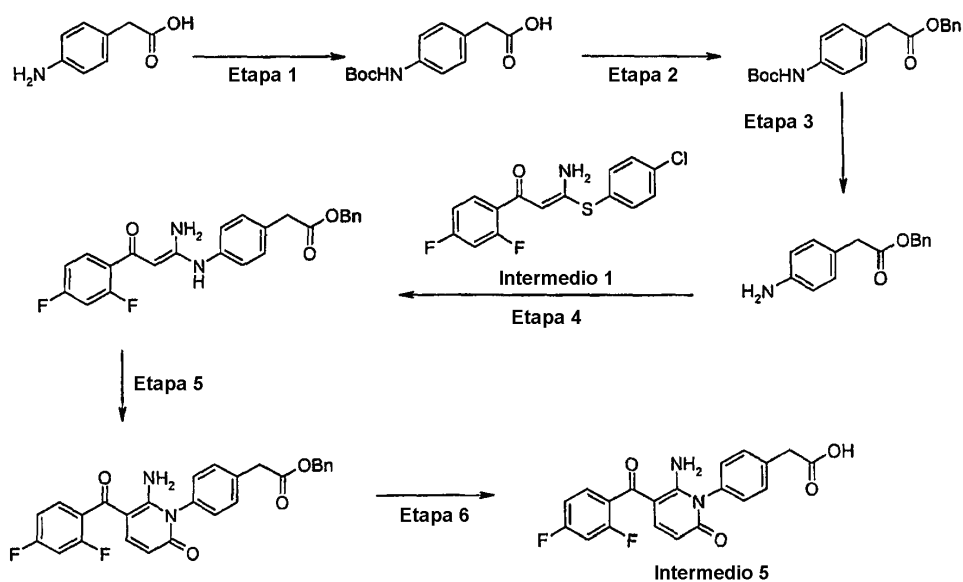
A una mezcla de 6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-1-[2,6-difluoro-4-(2-hidroxietil)fenil]piridin-2(1H)-ona (500 mg, 1,23 mmoles) en DCM (20 ml) se le añadió peryodinano Dess-Martin (783 mg, 1,85 mmoles). La mezcla se agitó durante 3,5 horas, se añadieron $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ac. sat. (20 ml) y NaHCO_3 sat. (20 ml) y la mezcla se agitó vigorosamente durante 30 minutos. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con DCM. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó (MgSO_4) y se concentró para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido (497 mg, rendimiento 100%).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 9,88 (1H, s), 7,49-7,40 (2H, m), 7,12-6,91 (4H, m), 5,93 (1 H, d, $J = 9,9$ Hz), 3,89 (2H, s).

Intermedio 5: ácido {4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]fenil}acético



El Intermedio 5 se sintetizó utilizando la ruta mostrada en el Esquema 4 de más abajo.



Etapa 1- Ácido {4-[(terc-Butoxicarbonil)amino]fenil}acético

A una solución de ácido 3-(4-aminofenil)acético (5,00 g, 33 mmoles) en hidróxido de sodio acuoso 0,2 N (40 ml) se le añadió dicarbonato de di-terc-butilo (7,22 g, 33 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó at RT durante la noche. La reacción se aciduló a pH 2 con HCl 1 M y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron a presión reducida para dejar un sólido de color beige. La recristalización en etanol/heptano proporcionó el compuesto del título (5,70 g, rendimiento 68%).

CL/EM: m/z 274 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Etapa 2- {4-[(terc-Butoxicarbonil)amino]fenil}acetato de bencilo

A una solución de ácido {4-[(terc-butoxicarbonil)amino]fenil}acético (5,70 g, 22,7 mmoles) en DCM (60 ml) se le añadieron EDCI (4,78 g, 25 mmoles), DMAP (277 mg, 2,3 mmoles) y alcohol bencilico (4,7 ml, 45,4 mmoles). La mezcla de reacción se agitó at RT durante la noche a continuación se lavó con HCl 1 M (50 ml), Na_2CO_3 sat. (50 ml). La capa orgánica se separó de la acuosa y se secó (MgSO_4) se filtró y se concentró a presión reducida para dejar un aceite de color pardo pálido. La purificación mediante cromatografía en columna (30% EtOAc en heptano) proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido (7,75 g, rendimiento 100%).

CL/EM: m/z 364 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Etapa 3-(4-Aminofenil)acetato de bencilo

A una solución de {4-[(terc-butoxicarbonil)amino]fenil}acetato de bencilo (8,15 g, 23,8 mmoles) en DCM (50 ml) se le añadió TFA (25 ml). La mezcla de reacción se agitó a RT durante la noche a continuación se concentró a presión reducida para dejar un aceite de color amarillo. La tritución con Et₂O proporcionó un sólido de color amarillo pálido. Éste se repartió entre EtOAc (100 ml) y Na₂CO₃ sat. (100 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera (30 ml, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró a presión reducida para dejar un aceite de color amarillo (3,78 g, rendimiento 69%)
CL/EM: m/z 242 [M+H]⁺.

Etapas 4- (4-[[[(1E)-1-Amino-3-(2,4-difluorofenil)-3-oxoprop-1-en-1-il]amino]fenil]acetato de bencilo

Se disolvieron (4-aminofenil)acetato de bencilo (3,78 g, 12,1 mmoles) y 3-(2,4-difluorofenil)-3-oxopropanimidato de 4-clorofenilo (Intermedio 1) (4,4 g, 12,1 mmoles) en ácido acético (45 ml) y la mezcla se agitó a 80°C durante 1 hora, a continuación se concentró a presión reducida. El aceite de color amarillo resultante se trituró en Et₂O para proporcionar un sólido de color amarillo pálido. Este sólido se suspendió en NaHCO₃ sat. (200 ml) y se agitó vigorosamente a RT durante 30 minutos. Un sólido de color amarillo se recogió mediante filtración, se lavó con agua y se secó a presión reducida para producir un sólido de color amarillo (5,13 g, 100%).
CL/EM: m/z 423 [M+H]⁺.

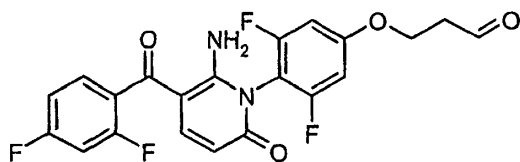
Etapas 5- {4-[6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]fenil}acetato de bencilo

A una solución de CDI (2,95 g, 18,2 mmoles) en THF (100 ml), en N₂ a 0°C, se le añadió gota a gota ácido propiónico (1,12 ml, 18,2 mmoles). La mezcla se templó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. Una solución de (4-[[[(1E)-1-amino-3-(2,4-difluorofenil)-3-oxoprop-1-en-1-il]amino]fenil]acetato de bencilo (5,13 g, 12,1 mmoles) en THF (50 ml) se añadió gota a gota y la mezcla se calentó a 80°C durante la noche. La mezcla se enfrió a RT. Se recogió un sólido de color beige mediante filtración y se descartó (subproducto no deseado). El producto filtrado se concentró a presión reducida para dejar un aceite de color pardo. La tritución con EtOAc proporcionó un sólido pegajoso de color pardo que también se descartó ya que solo contenía una pequeña cantidad de producto deseado. El producto filtrado de la tritución se concentró a vacío para proporcionar un sólido de color pardo. La tritución con una pequeña cantidad de MeOH y Et₂O proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido de color beige (1,05 g, rendimiento 18%).
CL/EM: m/z 475 [M+H]⁺.

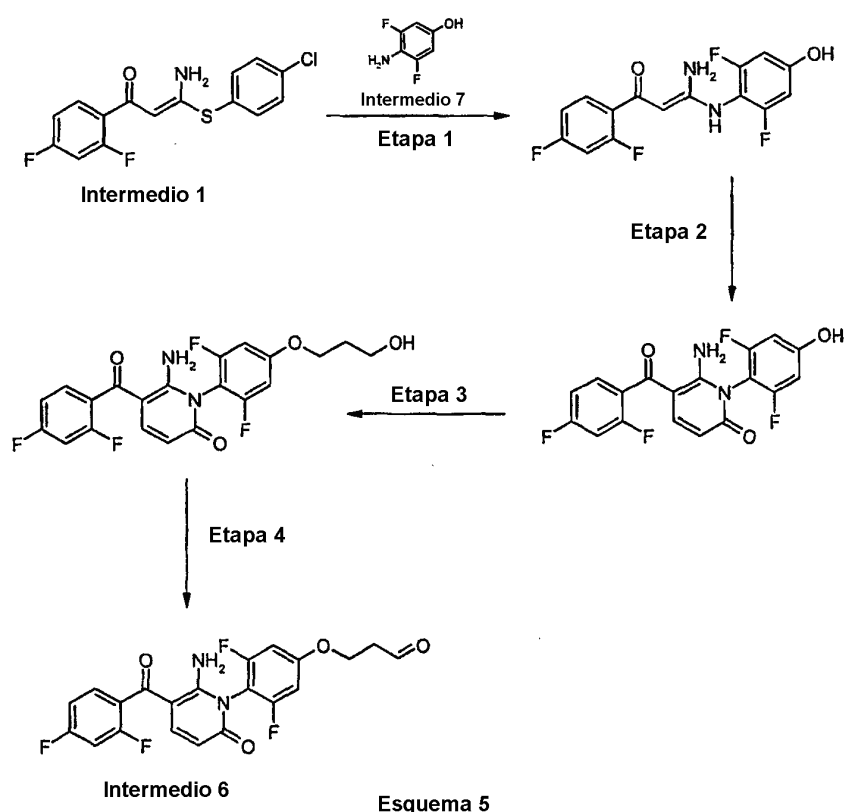
Etapas 6- ácido {4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1 (2H)-il]fenil}acético

Se disolvió {4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1 (2H)-il]fenil}acetato de bencilo (1,05 g, 2,21 mmoles) en EtOAc (50 ml). La solución se desgasificó y se lavó con un chorro de nitrógeno antes de añadir Pd/C (200 mg). La suspensión resultante se lavó con un chorro de nitrógeno (x3), con hidrógeno y a continuación se agitó a RT durante 2 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de celite, que a continuación se lavó cuidadosamente con EtOAc. Los productos filtrados combinados se concentraron a presión reducida para dejar un sólido de color naranja pálido (0,65 g, 77%)
CL/EM: m/z 385 [M+H]⁺. RMN H¹ (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 7,56-7,48 (3H, m), 7,41 (1H, td, J = 2,5, 9,8 Hz), 7,32-7,20 (4H, m), 5,72 (1H, d, J = 9,8 Hz), 3,70 (2H, s).

Intermedio 6: 3-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenoxi}propanal



El Intermedio 6 se sintetizó utilizando la ruta mostrada en el Esquema 5 de más abajo



Etapa 1- (2E)-3-amino-3-[(2,6-difluoro-4-hidroxifenil)amino]-1-(2,4 difluorofenil)prop-2-en-1-ona

- 5 El producto de la Etapa 1 se preparó de una manera similar al producto de la Etapa 1 del Intermedio 4 (Esquema 3)
CL/EM: m/z 327 [M+H]⁺.

Etapa 2-6-amino-5-(2,4-difluorobenzoil)-1-(2,6-difluoro-4-hidroxifenil)piridin-2(1H)-ona

- 10 El producto de la Etapa 2 se preparó de una manera similar al producto de la Etapa 2 del Intermedio 4 (Esquema 3)
CL/EM: m/z 379 [M+H]⁺.

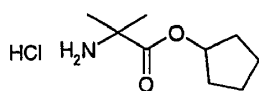
Etapa 3- 6-amino-5-(2,4-difluorobenzoil)-1-[2,6-difluoro-4-(3 hidroxipropoxi)fenil]piridin-2(1H)-ona

- 15 A una solución de 6-amino-5-(2,4-difluorobenzoil)-1-(2,6-difluoro-4-hidroxifenil)piridin-2(1H)-ona (1 g, 2,6 mmoles) en acetona (25 ml) se le añadió 3-bromopropan-1-ol (0,26ml, 2,9 mmoles) seguido de yoduro de sodio (0,8 g, 5,3 mmoles) y carbonato de potasio (1,46 g, 10,6 mmoles). La mezcla de reacción se agitó at 70°C en una atmósfera de nitrógeno durante 8 horas y a continuación se concentró a presión reducida. El residuo se trituró con agua y Et₂O. El sólido resultante se filtró a vacío para dejar un sólido de color blanquecino (0,7 g, 61%).
20 CL/EM: m/z 437 [M+H]⁺.

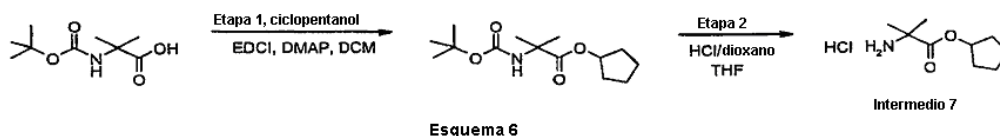
Etapa 4- 3-[4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoil)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenoxi]propanal

- 25 A una solución de 6-amino-5-(2,4-difluorobenzoil)-1-[2,6-difluoro-4-(3 hidroxipropoxi)fenil]piridin-2(1H)-ona (0,25 g, 0,57 mmoles) en DCM (10 ml) se le añadió peryodinano Dess Martin (0,29 g, 0,69 mmoles) y la mezcla se agitó at RT durante la noche. La reacción se sofocó con una mezcla 1:1 de NaHCO₃ sat. (5 ml) y tiosulfato de sodio (5 ml). la mezcla bifásica se filtró para proporcionar un sólido de color amarillo pálido. Este se lavó con agua y Et₂O para dejar un sólido de color blanquecino (0,2 g, 82%)
30 CL/EM: m/z 435 [M+H]⁺.

Intermedio 7: Hidrocloruro de 2-metilalaninato de Ciclopentilo



El Intermedio 7 se sintetizó utilizando la ruta mostrada en el Esquema 6 de más abajo.



5

Etapa 1 - N-(terc-Butoxicarbonil)-2-metilalaninato de ciclopentilo

A una solución de N-(terc-butoxicarbonil)-2-metilalanina (1,00 g, 4,92 mmoles) en DCM (10 ml) a 0°C se le añadieron ciclopentanol (0,83 ml, 9,84 mmoles), EDCI (1,06 g, 5,42 mmoles) y finalmente DMAP (60 mg, 0,49 mmoles). La mezcla de reacción se templó a RT y se agitó durante 18 horas. El DCM se eliminó a vacío para producir un aceite transparente. El residuo bruto se disolvió en EtOAc (100 ml) y se lavó con agua, NaHCO₃ 1 M y salmuera. La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró a vacío. El extracto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc al 10% en heptano) para proporcionar el producto deseado en forma de un aceite transparente (0,254 g, rendimiento 20%).

10

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 5,25-5,17 (1H, m), 5,04 (1H, s ancho), 1,93-1,54 (8H, m), 1,49 (6H, s), 1,45 (9H, s).

15

Etapa Hidrocloruro de 2-metilalaninato 2-ciclopentilo

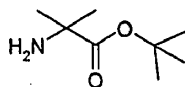
Se disolvió N-(terc-butoxicarbonil)-2-metilalaninato de ciclopentilo (0,254 g, 0,93 mmoles) en THF (5 ml) y se trató con HCl/dioxano 4M (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó a RT durante 24 horas. La mezcla bruta se concentró a presión reducida y se trituró con Et₂O para producir un precipitado de color blanco. Éste se lavó adicionalmente con Et₂O para producir el producto deseado en forma de un polvo de color blanco (0,16 g, rendimiento 82 %).

20

RMN ¹H (300MHz, DMSO-d₆) δ: 8,58 (3H, s ancho), 5,21-5,14 (1 H, m), 1,93-1,78 (2H, m), 1,74-1,53 (6H, m), 1,45 (6H, s).

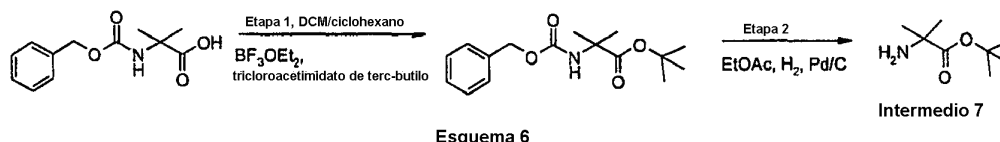
25

Intermedio 8: 2-Metilalaninato de terc-butilo



30

El Intermedio 8 se sintetizó utilizando la ruta mostrada en el Esquema 7 de más abajo.



35

Etapa 1 - N-[(Benciloxi)carbonil]-2-metilalaninato de terc-butilo

A una solución de N-[(benciloxi)carbonil]-2-metilalanina (1 g, 4,21 mmoles) en DCM (10 ml anhidro), ciclohexano (10 ml) a 0°C en nitrógeno se le añadió dietileterato de trifluoruro de boro (7,7 µl, catalítico). A continuación se añadió lentamente 2,2,2-tricloroacetimidato de terc-butilo (1,51 ml, 8,43 mmoles) en ciclohexano (10 ml) a lo largo de 30 minutos antes de permitir que se templara a RT. La reacción se dejó agitando RT durante 16 horas. A la mezcla de reacción bruta se le añadió 190 mg de NaHCO₃ y la reacción se filtró. Las aguas madre se concentraron a vacío. El extracto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc al 10% en heptano) para proporcionar el producto deseado (0,863 g, rendimiento 70%).

40

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,39-7,31 (5H, m), 5,46 (1 H, s ancho), 5,10 (2H, s), 1,54 (6H, s), 1,45 (9H, s).

45

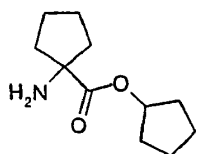
Etapa 2 - 2-Metilalaninato de terc-butilo

A una solución de N-[(benciloxi)carbonil]-2-metilalaninato de terc-butilo (0,863 mg, 2,90 mmoles) en EtOAc (20 ml) se le añadieron 100 mg de catalizador de Pd/C. La mezcla se evacuó y se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 18 horas, se filtró (Celite), se lavó con EtOAc y se concentró a vacío. El producto se aisló en forma de un aceite de color amarillo (0,45 mg, rendimiento 96%) que contenía trazas de EtOAc. Se cree que el producto es volátil de manera que se necesita precaución durante la evaporación a vacío.

50

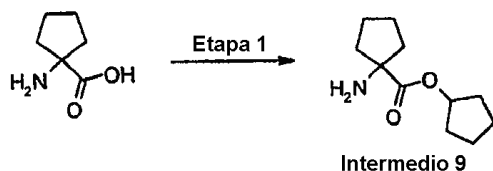
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1,48 (9H, s), 1,32 (6H, s).

Intermedio 9: 1-Aminociclopentanecarboxilato de ciclopentilo



El Intermedio 9 se sintetizó utilizando la ruta mostrada en el Esquema 8 de más abajo.

5



Esquema 8

Etapa 1 - 1-Aminociclopentanocarboxilato de ciclopentilo

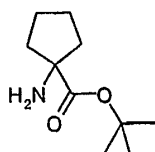
10

A una solución de ácido 1-aminociclopentanocarboxílico (2,58 g, 19,97 mmoles) en ciclopentanol (20 ml), se le añadió ácido sulfúrico concentrado (2,15 g, 21,97 mmoles) y la mezcla se agitó durante la noche a 70°C. Se dejó que la reacción se enfriara a RT y el ciclopentanol se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en EtOAc (30 ml) y se lavó con NaHCO₃ sat. (30 ml) y agua (3 x 20 ml), a continuación se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró a vacío para dejar un aceite de color amarillo oscuro. La purificación mediante cromatografía en columna (15% NH₃/MeOH 1,2M en EtOAc) proporcionó el producto deseado (1,97 g, 50% rendimiento). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 5,21-5,17 (1H, m), 2,15-1,90 (2H, m), 1,85-1,57 (14H, m).

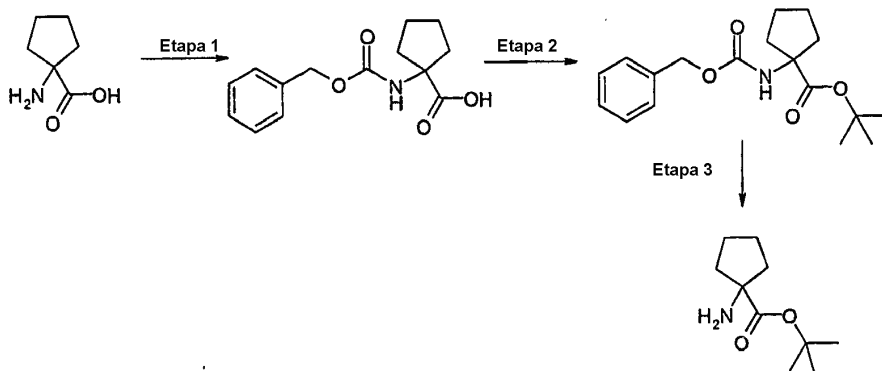
15

Intermedio 10: 1-Aminociclopentanocarboxilato de terc-butilo

20



El Intermedio 10 se sintetizó utilizando la ruta mostrada en el Esquema 9 de más abajo.



Esquema 9

Intermedio 10

25

Etapa 1 - Ácido 1-[(benciloxi)carbonil]amino]ciclopentanocarboxílico

A una solución de ácido 1-aminociclopentanocarboxílico (3,0 g, 23,2 mmoles) en dioxano/agua 1:1 (60 ml), se le añadió lentamente Na₂CO₃ (12,3 g, 116 mmoles) seguido de cloroformiato de bencilo (3,6 ml, 25,5 mmoles) y la mezcla se agitó durante la noche a RT. La mezcla de reacción se aciduló cuidadosamente a pH 2 con HCl 1 M, a continuación se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron a vacío para dejar un aceite de color amarillo pálido. La CLEM y el RMN mostraron que el producto bruto era una mezcla del producto deseado y el éster bencílico correspondiente. El producto bruto se disolvió en THF/agua 1:1 (60 ml) y se trató con hidróxido de litio (2,67 g, 116 mmoles). La

35

mezcla se agitó a RT durante la noche, a continuación se lavó con Et₂O (3 x 30 ml), se aciduló a pH 2 y se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (4,76 g, 78%). LCMS: m/z 264 [M+H]⁺.

Etapa 2 - 1-[(Benciloxi)carbonil]amino)ciclopentanocarboxilato de *tert*-butilo

El 1-[(benciloxi)carbonil]amino)ciclopentanocarboxilato de *tert*-butilo se preparó de una manera similar a la Etapa 1 (Esquema 7) del Intermedio 8.

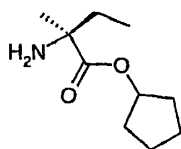
CL/EM: m/z 320 [M+H]⁺.

Etapa 3 - 1-Aminociclopentanocarboxilato de *tert*-butilo

El 1-aminociclopentanocarboxilato de *tert*-butilo se preparó de una manera similar a la Etapa 2 (Esquema 7) del Intermedio 8.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 2,08-2,02 (2H, m), 1,87-1,72 (4H, m), 1,64-1,58 (2H, m), 1,47 (9H, s).

Intermedio 11: L-Isovalinato de ciclopentilo

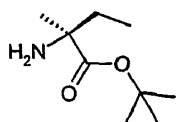


El Intermedio 11 se sintetizó el siguiente procedimiento de una etapa mostrado más abajo.

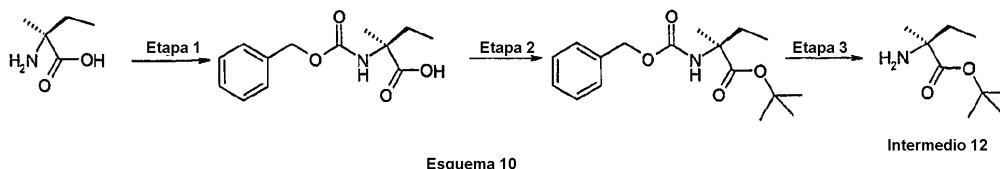
A una solución de hidrocloreto de L-isovalina (2 g, 13 mmoles) en ciclopentanol (20 ml) se le añadió ácido sulfúrico conc. (0,76 ml, 14 mmoles). La reacción se calentó a 70°C y se agitó durante la noche. La reacción se enfrió y se evaporó a presión reducida para producir a un aceite de color amarillo que se disolvió en HCl 2 M (25 ml) y se lavó con Et₂O (2 x 20 ml). La capa acuosa se ajustó a continuación a pH 12 con NaOH 2 M y se extrajo con EtOAc (3 x 20 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron a presión reducida. La purificación mediante cromatografía en columna (MeOH al 5% en DCM) proporcionó el compuesto del título en forma de un aceite incoloro (0,4 g, 16%).

CL/EM: m/z 186 [M+H]⁺.

Intermedio 12: L-Isovalinato de *tert*-butilo



El Intermedio 12 se sintetizó utilizando la ruta mostrada en el Esquema 10 de más abajo.



Esquema 10

Intermedio 12

Etapa 1 - N-[(benciloxi)carbonil]-L-isovalina

A una solución de hidrocloreto de L-isovalina (2 g, 13 mmoles) en una mezcla 1:1 de dioxano y agua (40 ml) se le añadió lentamente Na₂CO₃ (6,9 g, 26 mmoles) seguido de cloroformato de benzoilo (3,7 ml, 65 mmoles). La mezcla se agitó a RT durante la noche. La reacción se aciduló cuidadosamente a pH 2 con HCl conc. y se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (30 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron a presión reducida para dejar un aceite de color amarillo pálido (2 g, 61%). CL/EM: m/z 252 [M+H]⁺.

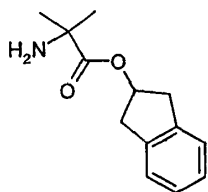
Etapa 2 - N-[(Benciloxi)carbonil]-L-isovalinato de *tert*-butilo

A una solución de *N*-[(benciloxi)carbonil]-L-isovalina (2 g, 8 mmoles) en DCM (20 ml) y ciclohexano (20 ml) a 0°C se le añadió dietileterato de trifluoruro de boro (0,02 ml, 0,16 mmoles). Se añadió gota a gota una solución de 2,2,2-tricloroacetimidato de *tert*-butilo (2,85 ml, 16 mmoles) en ciclohexano (10 ml) a lo largo de 15 minutos y la mezcla se agitó a 0°C durante 15 mins. Se dejó que la reacción se templara a RT y se agitó durante 2,5 horas. Se añadió NaHCO₃ sólido y la mezcla de reacción se filtró. El producto filtrado se concentró a presión reducida para dejar el producto bruto. La purificación mediante cromatografía en columna (EtOAc al 10% en heptano) proporcionó el compuesto del título en forma de un aceite incoloro (1,39 g, 57%). CL/EM: m/z 330 [M+Na]⁺.

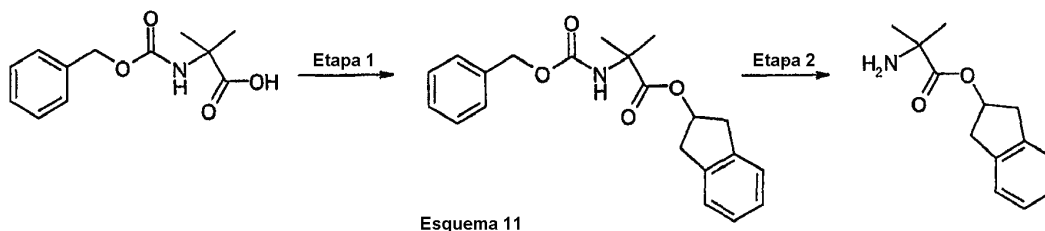
Etapa 3 - L-isovalinato de *tert*-butilo

A una solución de *N*-[(benciloxi)carbonil]-L-isovalinato de *tert*-butilo (1,39 g, 4,52 mmoles) disuelta en EtOAc (25 ml) en una atmósfera de nitrógeno se le añadió Pd/C (0,15 g). La suspensión se lavó con un chorro de nitrógeno (x3), a continuación con hidrógeno y se agitó a 1 atm de hidrógeno a RT durante 2 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de celite y el producto filtrado se concentró a presión reducida para dejar un aceite incoloro (0,8 g, 100%). CL/EM: m/z 174 [M+H]⁺.

Intermedio 13: 2-Metilalaninato de 2,3-dihidro-1H-inden-2-ilo



El Intermedio 13 se sintetizó utilizando la ruta mostrada en el Esquema 11 de más abajo.



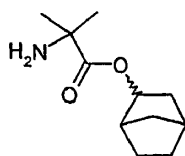
Etapa 1- *N*-[(Benciloxi)carbonil]-2-metilalaninato de 2,3-dihidro-1H-inden-2-ilo

A una solución de *N*-[(benciloxi)carbonil]-2-metilalanina (2,00 g, 8,4 mmoles) en DCM (10 ml) a 0°C se le añadieron indanol (2,26 g, 16,9 mmoles), EDCI (1,78 g, 9,3 mmoles) y finalmente DMAP (103 mg, 0,8 mmoles). La mezcla de reacción se templó a RT y se agitó durante 18 horas. La mezcla de reacción se lavó con HCl 1 M (10 ml), Na₂CO₃ sat. (20 ml), se secó (MgSO₄) se filtró y se concentró a vacío para dejar un aceite de color pardo. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (20% EtOAc en heptano) para proporcionar el producto deseado en forma de un sólido de color blanco (2,26 g, 76%). CL/EM: m/z 354 [M+H]⁺.

Etapa 2- 2-Metilalaninato de 2,3-dihidro-1H-inden-2-ilo

A una solución de *N*-[(benciloxi)carbonil]-2-metilalaninato de 2,3-dihidro-1H-inden-2-ilo (2,26 g, 6,39 mmoles) disuelta en EtOAc (30 ml) en una atmósfera de nitrógeno se le añadió Pd/C (0,2 g). La suspensión se lavó con un chorro de nitrógeno (x3) a continuación con hidrógeno y se agitó a 1 atm de hidrógeno a RT durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de celite y el producto filtrado se concentró a presión reducida para dejar un aceite de color amarillo pálido (1,35 g, 96%). CL/EM: m/z 220 [M+H]⁺.

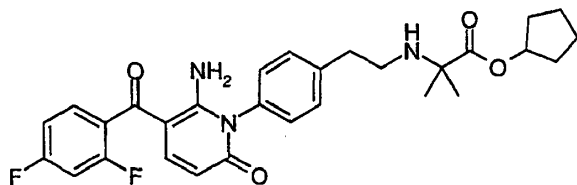
Intermedio 14: 2-Metilalaninato de biciclo[2,2,1]hept-2-ilo



El Intermedio 14 se sintetizó siguiendo un método similar utilizado en la preparación del Intermedio 13 utilizando norbomeol en la Etapa 1 del Esquema 11, CL/EM: m/z 198 [M+H]⁺.

5 Ejemplos

Ejemplo 1: N-(2-{4-[6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]fenil}etil)-2-metilalaninato de ciclopentilo



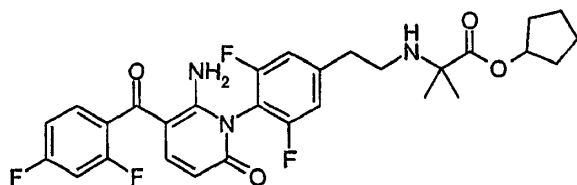
El Ejemplo 1 se sintetizó utilizando el Intermedio 2 y el Intermedio 7 como se describe más abajo.

A una solución del Intermedio 2 (189 mg, 0,514 mmoles) en THF anhidro (4 ml) se le añadieron hidrocloreto de 2-metilalaninato de ciclopentilo (Intermedio 7) (160 mg, 0,77 mmoles, 1,5 eq) y NaBH(OAc)₃ (326 mg, 1,54 mmoles, 3 eq). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, y a continuación se sofocó con agua (20 ml). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 20 ml), y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (40 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida.

El residuo se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar el compuesto del título (130 mg, rendimiento 48 %).

CL/EM: m/z 524 [M+H]⁺. RMN H¹ (300 MHz, CDCl₃) δ: 10,43 (1 H, s ancho), 7,51-7,34 (4H, m), 7,28-7,26 (2H, m), 7,04-6,90 (2H, m), 5,93 (1 H, d, J = 9,6 Hz), 5,20-5,10 (1H, m), 2,93-2,75 (4H, m), 1,95-1,55 (8H, m), 1,31 (6H, s).

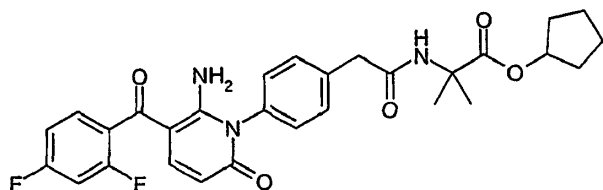
Ejemplo 2: N-(2-{4-[6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}etil)-2-metilalaninato de ciclopentilo



El Ejemplo 2 se sintetizó utilizando el Intermedio 4 y el Intermedio 7 de una manera similar al Ejemplo 1.

CL/EM: m/z 560 [M+H]⁺. RMN H¹ (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,48-7,39 (2H, m), 7,09-6,92 (4H, m), 5,92 (1 H, d, J = 9,6 Hz), 5,13 (1 H, s ancho), 2,87-2,81 (4H, m), 2,05-1,89 (2H, m), 1,76-1,62 (6H, m), 1,30 (6H, s).

Ejemplo 3: N-(2-{4-[6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]fenil}acetil)-2-metilalaninato de ciclopentilo

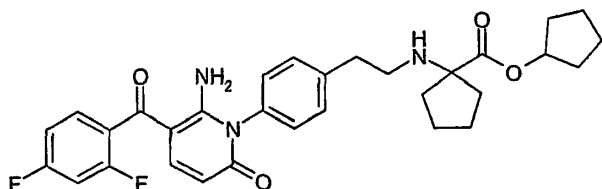


A una solución de ácido {4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]fenil}acético (Intermedio 5) (0,1 g, 0,26 mmoles) en DCM/DMF (1:1, 6 ml) se le añadieron EDCI (0,055 g, 0,29 mmoles), DMAP (0,003 g, 0,03 mmoles) y trietilamina (40 µl, 0,29 mmoles) seguido de la adición de hidrocloreto de 2-metilalaninato de ciclopentilo (Intermedio 7) (0,059 g, 0,29 mmoles). La mezcla se agitó a RT durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (20 ml), se lavó con agua (2 x 20 ml), salmuera (20 ml) a continuación se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró a presión reducida para dejar un aceite de color amarillo. La purificación mediante cromatografía en columna (EtOAc 100%) proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (68 mg, 48%).

CL/EM: m/z 538 [M+H]⁺. RMN H¹ (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 8,48 (1 H, s), 7,55-7,37 (4H, m), 7,29-7,20 (4H, m), 5,72 (1H, d, J = 9,6 Hz), 5,03-4,99 (1H, m), 3,54 (2, s), 1,78-1,69 (2H, m), 1,63-1,47 (6H, m), 1,36 (6H, s).

Los Ejemplos 4-10 se sintetizaron de una manera similar al Ejemplo 1.

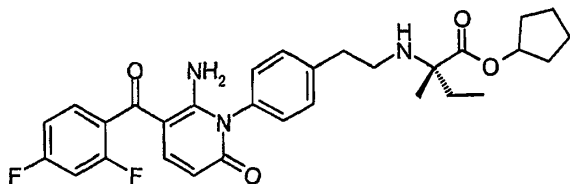
Ejemplo 4: 1-[(2-{4-(6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2*H*)-il]fenil}etil)amino]ciclopentanocarboxilato de ciclopentilo



A partir del Intermedio 2 y el Intermedio 9.

CL/EM: m/z 550 $[M+H]^+$. RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 7,55-7,34 (6H, m), 7,29-7,21 (2H, m), 5,72 (1 H, d, $J = 9,8$ Hz), 5,27-5,21 (1H, m), 3,31-3,20 (2H, m), 3,10-3,00 (2H, m), 2,22-2,12 (2H, m), 2,08-1,98 (2H, m), 1,90-1,58 (12H, m)

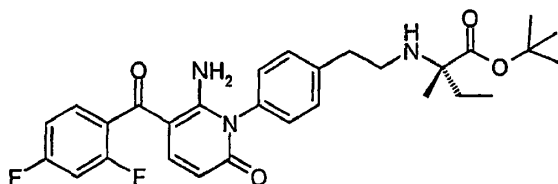
Ejemplo 5: *N*-(2-{4-[6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2*H*)-il]fenil}etil)-*L*-isovalinato de ciclopentilo



A partir del intermedio 2 y el Intermedio 11.

CL/EM: m/z 538 $[M+H]^+$. RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 10,09 (1H, s ancho), 7,55-7,38 (4H, m), 7,27-7,21 (4H, m), 6,88 (1 H, s ancho), 5,71 (1 H, d, $J = 9,8$ Hz), 5,09 (1 H, s ancho), 2,77-2,63 (4H, m), 1,97 (1H, s ancho), 1,83-1,76 (2H, m), 1,68-1,55 (8H, m), 1,16 (3H, s), 0,79 (3H, t, $J = 7,3$ Hz).

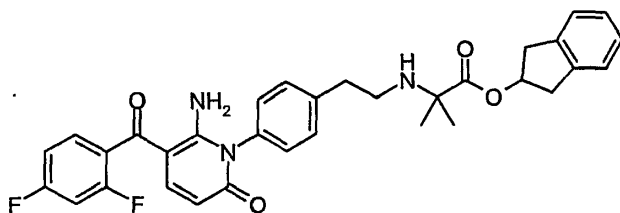
Ejemplo 6: *N*-(2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2*H*)-il]fenil}etil)-*L*-isovalinato de terc-butilo



A partir del intermedio 2 y el Intermedio 12.

CL/EM m/z 526 $[M+H]^+$. RMN 1H (300 MHz, CD_3OD) δ : 7,54-7,42 (4H, m), 7,30-7,26 (2H, m), 7,15-7,08 (2H, m), 5,82 (1H, d, $J = 9,8$ Hz), 2,95-2,84 (3H, m), 2,79-2,68 (1H, m), 1,71-1,59 (2H, m), 1,48 (9H, s), 1,26 (3H, s), 0,90-0,83 (3H, m).

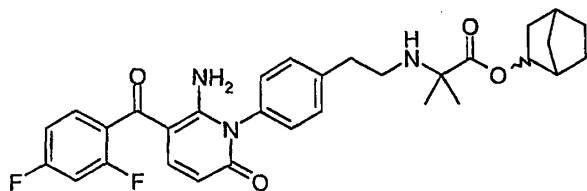
Ejemplo 7: *N*-(2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2*H*)-il]fenil}etil)-2-metilalaninato de 2,3-dihidro-1*H*-inden-2-ilo



A partir del intermedio 2 y el Intermedio 13.

CL/EM: m/z 572 [M+H]⁺ RMN H¹ (300 MHz, CDCl₃) 7,48-7,35 (4H, m), 7,27-7,20 (6H, m), 7,02 (1H, td, J = 2,3, 7,9 Hz), 6,94 (1H, td, J = 2,3, 9,1 Hz), 5,94 (1H, d, J = 9,6 Hz), 5,56-5,50 (1H, m), 3,38 (2H, dd, J = 6,4, 17,0 Hz), 3,01 (2H, dd, J = 2,8, 17,0 Hz), 2,82-2,78 (2H, m), 1,30 (6H, s).

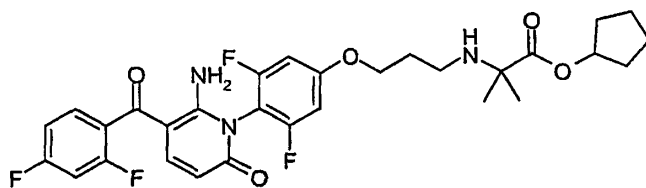
Ejemplo 8: N-(2-{4-[6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H-il)]fenil}etil)-2-metilalaninato de biciclo[2,2,1]hept-2-ilo



A partir del intermedio 2 y el Intermedio 14.

CL/EM: m/z 499 [M+H]⁺ RMN H¹ (300 MHz, CDCl₃) 11,12 (1H, s), 7,52 (1H, s), 7,37-7,43 (1H, m), 7,28-7,32 (1H, m), 7,18-7,24 (1H, m), 7,07 (1H, s), 5,44 (2H, s), 4,64-4,70 (1H, m), 3,77-3,86 (1H, m), 3,60-3,67 (1H, m), 3,27 (1H, t, J = 7,2 Hz), 2,31 (2H, d, J = 3,8 Hz), 1,69-1,90 (2H, m), 1,37-1,58 (4H, m), 1,08-1,23 (2H, m), 0,84-0,97 (6H, m).

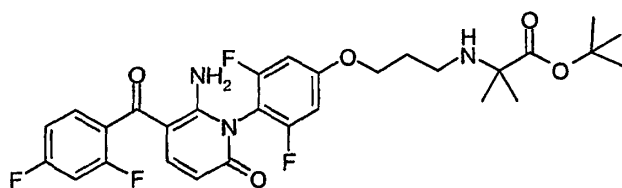
Ejemplo 9: N-(3-{4-[6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H-il)]-3,5-difluorofenoxi}propil)-2-metilalaninato de ciclopentilo



A partir del intermedio 6 y el Intermedio 7.

CL/EM m/z 590 [M+H]⁺ RMN H¹ (300 MHz, CDCl₃) 7,48-7,38 (2H, m), 7,02 (1H, td, J = 2,1, 8,1 Hz), 6,94 (1H, td, J = 2,5, 9,4 Hz), 6,74 (2H, d, J = 9,4 Hz), 5,92 (2H, d, J = 9,8 Hz), 5,23-5,19 (1H, m), 4,12 (2H, t, J = 6,0 Hz), 2,69 (2H, t, J = 6,8 Hz), 2,03-1,95 (2H, m), 1,92-1,84 (2H, m), 1,75-1,60 (6H, m), 1,31 (6H, s).

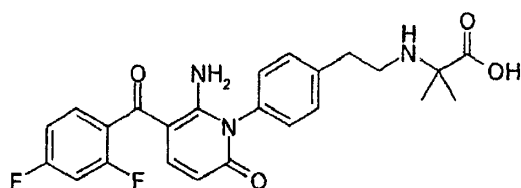
Ejemplo 10: N-(3-{4-[6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H-il)]-3,5-difluorofenoxi}propil)-2-metilalaninato de terc-butilo



A partir del intermedio 6 y el Intermedio 8.

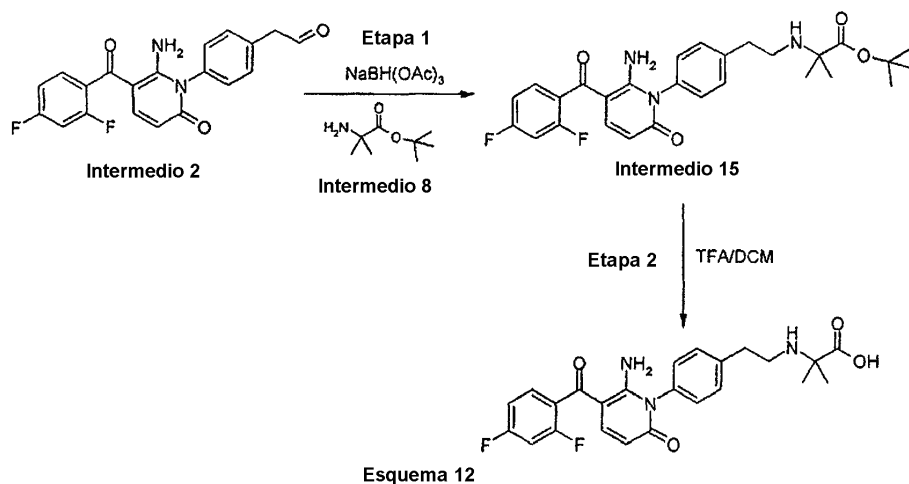
CL/EM: m/z 578 [M+H]⁺ RMN H¹ (300 MHz, CDCl₃) 7,36-7,26 (2H, m), 6,93 (1H, td, J = 2,1, 7,7 Hz), 6,86 (1H, td, J = 2,3, 9,4 Hz), 6,64 (2H, d, J = 9,2 Hz), 5,83 (1H, d, J = 9,8 Hz), 4,03 (2H, t, J = 6,0 Hz), 2,61 (2H, t, J = 6,9 Hz), 1,95-1,86 (2H, m), 1,40 (9H, s), 1,20 (6H, s).

Ejemplo de Referencia 11: N-(2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H-il)]fenil}etil)-2-metilalanina



El Ejemplo de Referencia 11 se sintetizó utilizando el Intermedio 2 y el Intermedio 8 como se describe en el Esquema 12 de más abajo.

5



Esquema 12

Etapa 1 - *N*-(2-{4-[6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1 (2H)-il]fenil}etil)-2-metilalaninato de terc-butilo

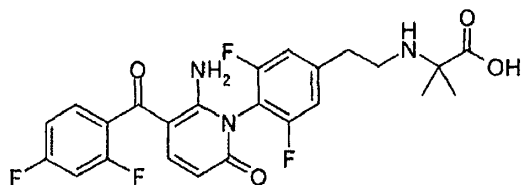
- 10 A una solución de Intermedio 2 (180 mg, 0,489 mmoles) en THF (3 ml) se le añadió 2-metilalaninato de de terc-butilo (Intermedio 8) (117 mg, 0,73 mmoles), se agitó durante 30 minutos, y a continuación $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (310 mg, 1,467 mmoles). La reacción se agitó durante 24 horas, se diluyó con EtOAc y la capa orgánica se lavó con NaHCO_3 sat., salmuera, se secó (MgSO_4) y se concentró a vacío. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar el compuesto del título (Intermedio 15) (120 mg, rendimiento 48%).
- 15 CL/EM: m/z 512 $[\text{M}+\text{H}]^+$. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 10,41 (1H, s ancho), 7,51-7,34 (4H, m), 7,28-7,26 (2H, m), 7,05-6,90 (2H, m), 5,93 (1H, d, $J = 9,9\text{Hz}$), 5,15 (1H, s ancho), 2,93-2,78 (4H, m), 1,46 (9H, s), 1,29 (6H, s).

Etapa 2 - *N*-(2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]fenil}etil)-2-metilalanina

- 20 A una solución de Intermedio 15 (100 mg, 0,19 mmoles) en DCM (3 ml) se le añadió ácido trifluoroacético (3 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y se concentró a presión reducida. El residuo se trituró con Et_2O , se recogió mediante filtración y se secó a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino (50 mg, rendimiento 56 %).
- 25 CL/EM: m/z 456 $[\text{M}+\text{H}]^+$. RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10,05 (1H, s ancho), 7,60-7,15 (9H, m), 6,95 (1H, s ancho), 5,72 (1H, d, $J = 9,6\text{Hz}$), 3,15-2,95 (4H, m), 1,33 (6H, s ancho).

Ejemplo de Referencia 12: *N*-(2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}etil)-2-metilalanina

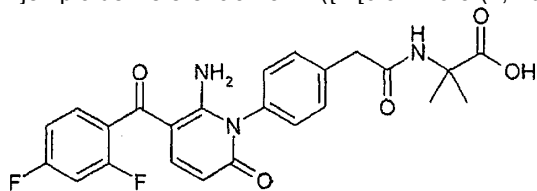
30



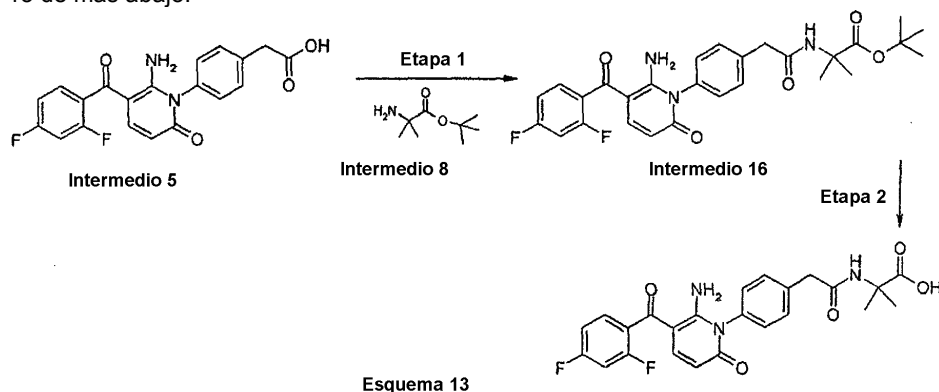
El Ejemplo de Referencia 12 se sintetizó utilizando el Intermedio 4 y el Intermedio 8 siguiendo la misma ruta sintética que en Ejemplo de Referencia 11 (Esquema 12).

- 35 CL/EM: m/z 492 $[\text{M}+\text{H}]^+$. RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7,62-7,54 (1H, m), 7,47-7,35 (4H, m), 7,27-7,21 (1H, m), 5,75 (1H, d, $J = 9,8\text{Hz}$), 3,44-3,07 (4H, m), 1,52 (6H, s).

Ejemplo de Referencia 13: *N*-({4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2*H*)-il]fenil}acetil)-2-metilalanina



- 5 El Ejemplo de Referencia 13 se sintetizó utilizando el Intermedio 5 y el Intermedio 8 como se describe en Esquema 13 de más abajo.



- 10 Etapa 1- *N*-({4-[6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2*H*)-il]fenil}acetil)-2-metilalaninato de *terc*-butilo (Intermedio 16)

A una solución de ácido {4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2*H*)-il]fenil}acético (Intermedio 5) (0,13 g, 0,34 mmoles) en DCM/DMF {1:1, 6 ml) se le añadieron EDCI (0,07 g, 0,36 mmoles), DMAP (0,004 g, 0,03 mmoles) seguido de la adición de 2-metilalaninato de *terc*-butilo (Intermedio 8) (0,057 g, 0,36 mmoles). La mezcla se agitó a RT durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (20 ml), se lavó con agua (2 x 20 ml), salmuera (20 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró a presión reducida para dejar un aceite de color amarillo. La purificación mediante cromatografía en columna (EtOAc al 100%) proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino (78 mg, rendimiento 44%).

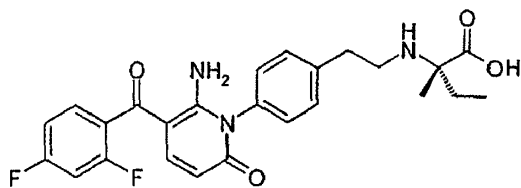
LCMS: *m/z* 526 [M+H]⁺. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,57 (2H, d, J = 8,4 Hz), 7,47-7,32 (4H, m), 7,02 (1H, t, J = 8,3 Hz), 6,94 (1 H, td, J = 2,4, 9,3 Hz), 6,37 (1 H, s ancho), 5,93 (1 H, d, J = 9,9 Hz), 3,64 (2H, s), 1,58 (6H, s), 1,47 (9H, s).

Etapa 2- *N*-({4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2*H*)-il]fenil}acetil)-2-metilalanina

A una solución de Intermedio 16 (0,05 g, 0,095 mmoles) en DCM (2 ml) se le añadió TFA (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 5 horas y a continuación se concentró a presión reducida para dejar un aceite de color amarillo. La trituración con Et₂O proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino (42 mg, 94%).

LCMS: *m/z* 470 [M+H]⁺. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12,19 (1H, s), 8,38 (1H, s), 7,55-7,37 (4H, m), 7,29-7,21 (4H, m), 5,71 (1H, d, J = 9,6 Hz), 3,55 (2H, s), 1,38 (6H, s).

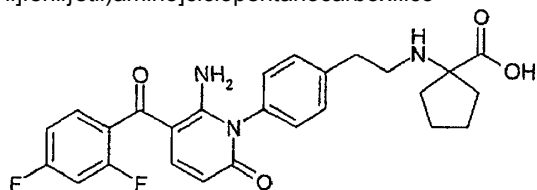
Ejemplo de Referencia 14: *N*-(2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2*H*)-il]fenil}etil)-L-isovalina



- 35 El Ejemplo de Referencia 14 se sintetizó a partir del Ejemplo 6 siguiendo una ruta sintética similar a la descrita en el Esquema 12.

Ejemplo de Referencia 15: Ácido 1-[(2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2*H*)-

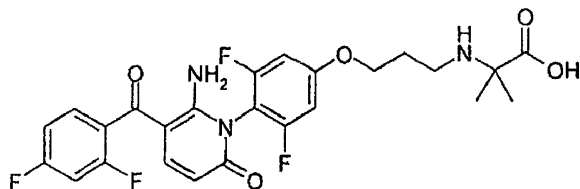
il]fenil}etil)amino]ciclopentanocarboxílico



El Ejemplo de Referencia 15 se sintetizó utilizando el Intermedio 2 y el Intermedio 10 siguiendo una ruta sintética similar a la descrita en el Esquema 12.

LCMS: m/z 482 $[M+H]^+$. RMN H^1 (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 7,52-7,37 (4H, m), 7,31-7,20 (4H, m), 5,71 (1H, d, $J = 10,0$ Hz), 3,08-2,93 (4H, m), 2,10-1,99 (2H, m), 1,78-1,68 (6H, m).

Ejemplo de Referencia 16: *N*-(3-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenoxi}propil)-2-metilalanina



El Ejemplo de Referencia 16 se sintetizó a partir del Ejemplo 10 siguiendo una ruta sintética similar a la descrita en el Esquema 12.

CL/EM: m/z 522 $[M+H]^+$. RMN H^1 (300 MHz, CD_3OD) 7,56-7,49 (2H, m), 7,17-7,11 (2H, m), 6,95 (2H, d, $J = 10,1$ Hz), 5,82 (1H, d, $J = 9,8$ Hz), 4,25 (2H, t, $J = 5,7$ Hz), 3,26-3,21 (2H, m), 2,30-2,21 (2H, m), 1,58 (6H, s).

Medición de actividades biológicas

Actividad MAP Quinasa p38

Se midió la actividad de los compuestos para inhibir la actividad la actividad MAP Quinasa p38 en un análisis realizado por Upstate (Dundee UK). En un volumen de reacción final de 25 μ L, se incubaba MAP Quinasa p38 (5-10 mU) con Tris 25 mM pH 7,5, EGTA 0,002 mM, 0,33 mg/mL de proteína básica de mielina, Acetato de Mg 10 mM y [g-33p-ATP] (actividad específica aproximadamente 500 cpm/pmol, concentración según se requiera). La reacción se inicia por medio de la adición de la mezcla de MgATP. Después de incubación durante 40 minutos a la temperatura ambiente, la reacción se detiene mediante la adición de 5 μ L de una solución de ácido fosfórico al 3%. Después se aplican 10 μ L de la reacción sobre una estera de filtración P30 y se lava tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secar y someter a recuento de centelleo.

Se generan puntos de datos por duplicado a partir de una serie de dilución 1/3 log de una solución de partida en DMSO. Se llevan a cabo nueve etapas de dilución a partir de una concentración máxima de 10 μ M y se incluye un blanco "sin compuesto". El análisis de unión al filtro radiométrico convencional se lleva a cabo a una concentración de ATP en, o próxima a, la K_m . Los datos de los recuentos de centelleo se recogen y se someten a análisis de ajuste libre por medio del programa Prism. A partir de la curva generada, se determina y se comunica la concentración que proporciona 50% de inhibición.

Análisis celular de MAP Quinasa p38: Inhibición de la fosforilación de MAPKAP-2

Se cultivaron en placa células U937 o HUT78 en RPMI 1640, y se incubaron a 37°C, con CO_2 al 5% durante 18 horas. Se diluyeron soluciones de partida 10mM con medio/DMSO al 0,1% para dar una serie de dilución log o semi-log. Los pocillos "sin tratamiento" y con "anisomicina" se trataron solamente con DMSO al 0,1%. Las células se incubaron a 37°C, CO_2 al 5% durante 4 horas más. Se añadió Anisomicina a todos los pocillos excepto al "sin tratamiento" a una concentración final de 10 μ M. Las células se incubaron a 37°C, CO_2 5% durante 30 minutos antes de la cosecha. Las placas se mantuvieron sobre hielo mientras se cosechaban, y todas las etapas siguientes se llevaron a cabo a 4°C. Las células se sedimentaron a 1000 rpm durante 10 minutos a 4°C, el medio se aspiró, y el sedimento se lavó con PBS frío. El sedimento se lisó en 120 μ L de tampón de lisis de SDS (Tris 62,5 mM, pH 6,8, SDS al 2%, glicerol al 10%, DTT 50 mM, añadiendo inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa de acuerdo

con las recomendaciones del fabricante). Después de 30 minutos sobre hielo, las muestras se sometieron a sonicación durante 5 segundos antes de centrifugar a 13.000 rpm a 4°C durante 10 minutos para eliminar los desechos celulares. Se cargaron 10 µl de las muestras de gel resultante por calle sobre geles MOPS de Bis-Tris al 4-12% NOVEX. Las membranas de la transferencia western de los geles se transfirieron con anti-fosfo MAPKAP2, anti-fosfo HSP27 y anti GAPDH de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La señal se visualizó utilizando anticuerpos anti-conejo o anti-ratón unidos a HRP, reactivo ECL y película ECL. Se visualizaron los valores de CI50 para los diferentes compuestos a partir de las imágenes fotográficas resultantes, utilizando tanto el desplazamiento de banda como la intensidad de la señal.

10 Estimulación con LPS de células THP-1

Se cultivaron en placa células THP-1 en 100 µl a una densidad de 4×10^4 células/pocillo en placas tratadas para el cultivo de tejidos de 96 pocillos con fondo en V y se incubaron a 37°C en CO₂ al 5% durante 16 horas. Dos horas después de la adición del inhibidor en 100 µl de medio de cultivo de tejidos, las células se estimularon con LPS (*E coli* cepa 005:B5, Sigma) a una concentración final de 1 µg/ml y se incubaron a 37°C en CO₂ al 5% durante 6 horas. Los niveles de TNF-α se midieron a partir de los sobrenadantes libres de células mediante un ELISA sándwich (R&D Systems Núm. QTA00B).

20 Estimulación con LPS de sangre completa humana

Se tomó sangre completa mediante punción venosa utilizando Vacutainers heparinizados (Becton Dickinson) y se diluyó en un volumen igual de medio para cultivo de tejidos RPMI 1640 (Sigma). Se cultivaron en placa 100 µl en placas tratadas para el cultivo de tejidos de 96 pocillos con fondo en V. Dos horas después de la adición del inhibidor en 100 µl de medio RPMI 1640, la sangre se estimuló con LPS (*E coli* cepa 005:B5, Sigma) a una concentración final de 100 ng/ml y se incubó a 37°C en CO₂ al 5% durante 6 horas. Se midieron los niveles de TNF-α de los sobrenadantes libres de células mediante ELISA sándwich (R&D Systems Núm. QTA00B).

Los valores de CI50 se asignaron a uno de tres intervalos como sigue:

Intervalo A: CI50 < 100 nM

Intervalo B: 100 nM < CI50 < 1000 nM

Intervalo C: CI50 > 1000 nM

Tabla de Resultados

Ejemplo	Actividad de Inhibidor frente a MAPKa p38	Actividad de Inhibidor frente a la liberación de TNFα THP-1	Actividad de inhibidor frente a la liberación de TNFα en sangre completa humana
1	A	A	B
2	A	A	A
3	A	B	C
4	A	A	C
5	B	A	C
6	B	B	NT
7	B	A	C
8	A	A	C
9	A	A	B
10	A	A	C
11 *	A	NR	NR
12 *	A	NR	NR
13 *	B	NR	NR
14 *	A	NR	NR
15 *	B	NR	NR
16 *	A	NR	NR
* indica Ejemplo de Referencia			

Ejemplo	Actividad de Inhibidor frente a MAPKa p38	Actividad de Inhibidor frente a la liberación de TNF α THP-1	Actividad de inhibidor frente a la liberación de TNF α en sangre completa humana
"NT" indica que el compuesto todavía no ha sido sometido a ensayo en el análisis en cuestión. "NR" indica "No Relevante". Los Ejemplos de Referencia 11-16 son los análogos de ácido carboxílico resultantes de los ésteres de aminoácido que son escindidos en el interior de las células. Cuando estos ácidos carboxílicos están en contacto con las células, no penetran en las células y por consiguiente no inhiben el TNF-α en este análisis.			

Análisis de Carboxilesterasa en Células Rotas

- 5 Cualquier compuesto dado de la presente invención en el que R₁ es un éster puede ser sometido a ensayo para determinar si satisface el requerimiento de ser hidrolizado por las esterasas intracelulares, sometiéndolo a ensayo en el siguiente análisis.

Preparación de extracto celular

- 10 Se lavaron células tumorales U937 o Hut78 (~ 10⁹) en 4 volúmenes de PBS de Dulbecco (~1 litro) y se sedimentaron a 525 g durante 10 min a 4°C. Esto se repitió dos veces y el sedimento celular final se resuspendió en 35 ml de tampón de homogeneización frío (Trizma 10 mM, NaCl 130 mM, CaCl₂ 0,5 mM pH 7,0 a 25°C). Los productos homogeneizados se prepararon mediante cavitación con nitrógeno (47,63 atm (700 psi) durante 50 min a 4°C). El producto homogeneizado se mantuvo sobre hielo y le añadió un suplemento de cóctel de inhibidores a
- 15 concentraciones finales de:
 Leupeptina 1 μ M
 Aprotinina 0,1 μ M
 E64 8 μ M
 Pepstatina 1.5 μ M
- 20 Bestatina 162 μ M
 Quimostatina 33 μ M

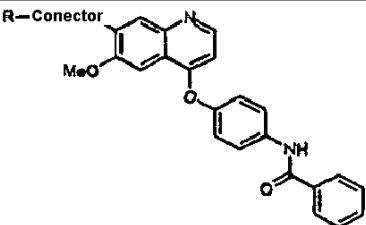
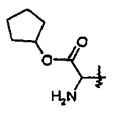
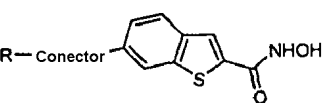
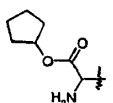
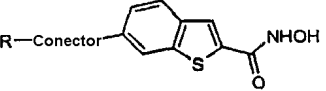
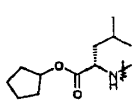
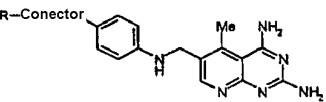
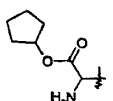
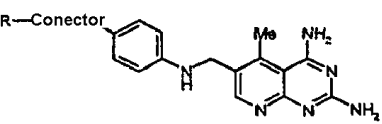
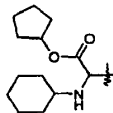
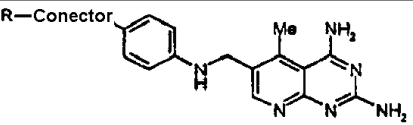
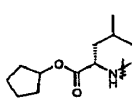
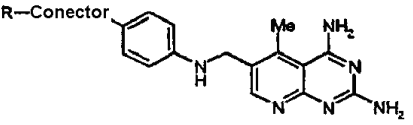
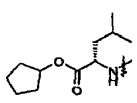
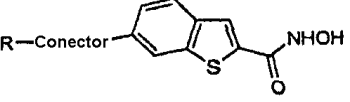
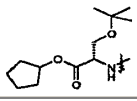
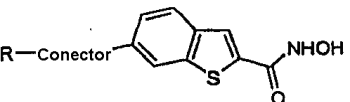
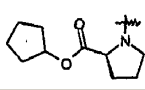
- Después de la clarificación del producto homogeneizado celular por centrifugación a 525 g durante 10 min, el sobrenadante se utilizó como fuente de actividad esterasa y se almacenó a -80°C hasta que fue necesario.

Medición de la escisión del éster

- La hidrólisis de los ésteres a los correspondientes ácidos carboxílicos se puede medir utilizando el extracto celular, preparada como antes. Con ese fin, se incubó el extracto celular (~30 μ g/volumen de análisis total de 0,5 ml) a 37°C
- 30 en un tampón Tris-HCl 25 mM, NaCl 125 mM, pH 7,5 a 25°C. A tiempo cero el éster (sustrato) fue añadido a continuación a una concentración final de 2,5 μ M y las muestras se incubaron a 37°C durante el tiempo apropiado (normalmente 0 u 80 mins). Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 3 x volúmenes de acetonitrilo. Para las muestras a tiempo cero, el acetonitrilo se añadió antes que el compuesto éster. Después de la centrifugación a 12000 g durante 5 mins, las muestras se analizaron para determinar el éster y su correspondiente ácido carboxílico
- 35 a la temperatura ambiente mediante LCMS (Sciex API 3000, bomba binaria HP1100, CTC PAL). La cromatografía se basó en una columna MeCN (75 x 2,1 mm) y una fase móvil de acetonitrilo en agua al 5-95%/ácido fórmico al 0,1%. Las velocidades de hidrólisis se expresan en pg/mL/min.

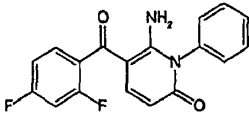
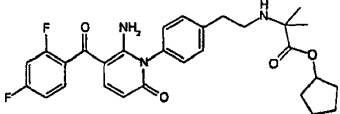
- La Tabla 1 presenta los datos que demuestran que diferentes motivos de éster de aminoácido, conjugados con diferentes inhibidores de enzimas intracelulares por varias químicas de conectores diferentes son todos hidrolizados por las carboxilesterasas intracelulares a los correspondientes ácidos.

Tabla 1

Estructura del producto conjugado de éster de aminoácido	R	Conector	Intervalo de la Velocidad de Hidrólisis Células U937 (pg/mL/min)	Preparación de producto conjugado de éster de aminoácido
		-CH ₂ CH ₂ O-	100-1000	WO 2006117552
		~(CH ₂) ₃ O~C ₆ H ₄ ~CH ₂ NHCH ₂ ~	1000-50000	WO 2006117548
		~CH ₂ ~C ₆ H ₄ ~CH ₂ NHCH ₂ ~	>50000	WO 2006117549
		-CH ₂ CH ₂ O-	>50000	WO 2006117567
		-CH ₂ CH ₂ O-	1000-50000	WO 2006117567
		-CH ₂ -	1000-50000	WO 2006117567
		-CO-	>50000	WO 2006117567
		~CH ₂ ~C ₆ H ₄ ~CH ₂ NHCH ₂ ~	>50000	WO 2006117549
		~CH ₂ ~C ₆ H ₄ ~CH ₂ NHCH ₂ ~	>50000	WO 2006117549

La Tabla 2 demuestra que el ejemplo 1 con el motivo esterasa unido es 30 veces más potente en las células que el compuesto parental que carece del motivo esterasa aunque las actividades contra la enzima aislada sean las mismas. El ácido formado por escisión del éster en el ejemplo 1 se acumula en las células U937.

Tabla 2

Compuesto	Inhibición de P38 (CI50, nM)		Inhibición de la fosforilación de MAPKAP-2 en células U937 (CI50, nM)	Razón de CI50 celular con respecto a CI50 enzima	Acumulación celular del ácido en las células U937 a las 6 horas (ng/ml)
	50		300	6	NA
Compuesto I (parental)					
	Éster 50	Ácido 50	10	0,2	987
Ejemplo 1					

- 5 La Tabla 3 demuestra que el compuesto I, parental, es equipotente en líneas celulares monocíticas y no-monocíticas mientras el ejemplo 1, es 100 veces más potente en la línea celular monocítica. El ejemplo 1 solamente se acumula en la línea celular monocítica demostrando que la selectividad celular se logra por medio del anclaje de un motivo esterasa que solamente es escindido en la línea celular monocítica. También demuestra que el incremento de potencia en las células se corresponde con la acumulación del ácido en las células.

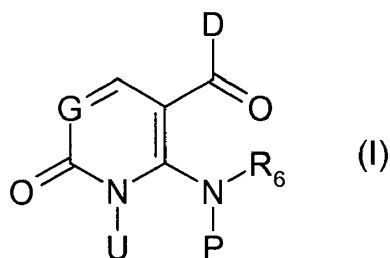
10

Tabla 3

Compuesto	Inhibición de la fosforilación de MAPKAP-2 en células U937 (CI50, nM) (línea celular monocítica)	Inhibición de la fosforilación de MAPKAP-2 en células HUT 78 (CI50, nM) (línea celular no monocítica)	Razón de las CI50 en células HUT 78 con respecto a U937	Acumulación del ácido en células U937 (ng/ml)	Acumulación del ácido en células HUT 78 (ng/ml)
Compuesto I Parental	300	450	1,5	NA	NA
Ejemplo 1	10	1000	100	987	3

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



en donde:

G es -N= o -CH=

D es un radical fenilo sustituido opcionalmente o piridinilo sustituido opcionalmente;

R₆ es hidrógeno o alquilo C₁-C₃ sustituido opcionalmente;

P representa hidrógeno y **U** representa un radical de fórmula (IA);



en donde

A representa un radical 1,4-fenileno sustituido opcionalmente;

z es 0 o 1;

Y es un enlace, -C(=O)-, -S(=O)₂-, -C(=O)NR₇-, -C(=S)-NR₇-, -C(=NH)NR₇ o -S(=O)₂NR₇- en donde R₇ es hidrógeno o alquilo C₁-C₆ sustituido opcionalmente;

L¹ es un radical divalente de fórmula -(Alk¹)_m(Q)_n(Alk²)_p- en donde

m, **n** y **p** son independientemente 0 o 1,

Q es (i) un radical carbocíclico o heterocíclico mono- o bicíclico divalente sustituido opcionalmente que tiene 5 - 13 miembros anulares, o (ii), en el caso en el que tanto m como p son 0, un radical divalente de fórmula -X²-Q¹- o -Q¹-X²- en donde X² es -O-, -S- o -NR^A- en donde R^A es hidrógeno o alquilo C₁-C₃ sustituido opcionalmente, y Q¹ es un radical carbocíclico o heterocíclico mono- o bicíclico divalente sustituido opcionalmente que tiene 5 - 13 miembros anulares,

Alk¹ y **Alk²** representan independientemente radicales cicloalquilo C₃-C₇ divalentes sustituidos opcionalmente, o radicales alquilenos C₁-C₆, alquilenos C₂-C₆, o alquilenos C₂-C₆ lineales o ramificados sustituidos opcionalmente que pueden contener opcionalmente o terminar en una conexión éter (-O-), tioéter (-S-) o amino (-NR^A-) en donde R^A es hidrógeno o alquilo C₁-C₃ sustituido opcionalmente; y

X¹ representa un enlace; -C(=O); o -S(=O)₂-, -NR₄C(=O)-, -C(=O)NR₄-, -NR₄C(=O)NR₅-, -NR₄S(=O)₂-, o

-S(=O)₂NR₄- en donde R₄ y R₅ son independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆ sustituido opcionalmente;

R₁ es un grupo éster que es hidrolizable por medio de una o más enzimas esterasas intracelulares a un grupo ácido carboxílico en donde el grupo éster tiene la fórmula - (C=O)OR₁₄ en donde R₁₄ es R₈R₉R₁₀C- en donde

(i) R₈ es hidrógeno o sustituido opcionalmente alquil(C₁-C₃)-(Z¹)_a-[alquil(C₁-C₃)]_b- o alquilenil(C₂-C₃)-(Z¹)_a-[alquil(C₁-C₃)]_b- en donde a y b son independientemente 0 o 1 y Z¹ es -O-, -S-, o -NR₁₁- en donde R₁₁ es hidrógeno o alquilo C₁-C₃; y R₉ y R₁₀ son independientemente hidrógeno o alquil(C₁-C₃)-;

(ii) R₈ es hidrógeno o R₁₂R₁₃N-alquil(C₁-C₃)- sustituido opcionalmente en donde R₁₂ es hidrógeno o alquilo C₁-C₃ y R₁₃ es hidrógeno o alquilo C₁-C₃; o R₁₂ y R₁₃ junto con el nitrógeno al que están anclados forman un anillo heterocíclico monocíclico sustituido opcionalmente de 5 o 6 átomos anulares o un sistema anular heterocíclico bicíclico de 8 a 10 átomos anulares, y R₉ y R₁₀ son independientemente hidrógeno o alquil(C₁-C₃)-; o

(iii) R₈ y R₉ tomados junto con el carbono al que están anclados forman un anillo carbocíclico monocíclico de 3 a 7 átomos anulares o un sistema anular carbocíclico bicíclico de 8 a 10 átomos anulares sustituidos opcionalmente, o un sistema anular carbocíclico monocíclico puenteado de 7 a 10 átomos anulares, y R₁₀ es hidrógeno;

y en donde en los casos (i), (ii) y (iii) anteriores, el término "alquilo" incluye fluoroalquilo; y

uno de **R₂** y **R₃** es metilo, y el otro es metilo, etilo, o n- o iso-propilo; o R₂ y R₃ tomados junto con el carbono al que están anclados forman un anillo de ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo;

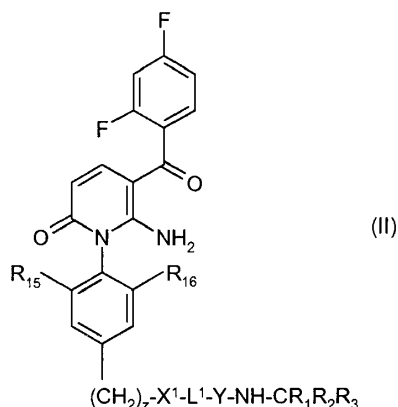
y en donde el término "sustituido" aplicado a cualquier fracción significa sustituido con hasta cuatro sustituyentes compatibles, cada uno de los cuales se selecciona independientemente entre alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, hidroxilo, hidroxialquilo C₁-C₆, mercapto, mercaptoalquilo C₁-C₆, alquil(C₁-C₆)tio, fenilo, halo, trifluorometilo, trifluorometoxi, nitro, nitrilo (-CN), oxo, -COOH, -COOR^A, -COR^A, -SO₂R^A, -CONH₂, -SO₂NH₂, -CONHR^A, -SO₂NHR^A, -CONR^AR^B, -SO₂NR^AR^B, -NH₂, -NHR^A, -NR^AR^B, -OCONH₂, -OCONHR^A, -OCONR^AR^B, -NHCOR^A, -NHCOOR^A, -NR^BCOOR^A, -NHSO₂OR^A, -NR^BSO₂OH, -NR^BSO₂OR^A, -NHCONH₂, -NR^ACONH₂, -NHCONHR^B,

$-NR^A CONHR^B$, $-NHCONR^A R^B$, y $-NR^A CONR^A R^B$ en donde R^A y R^B son independientemente alquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , fenilo o heteroarilo monocíclico que tiene 5 o 6 átomos anulares, o R^A y R^B cuando se anclan al mismo átomo de nitrógeno forman un grupo amino cíclico.

5 2. Un compuesto como se ha reivindicado en la reivindicación 1 en donde R_6 es hidrógeno o metilo.

3. Un compuesto como se ha reivindicado en la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde los sustituyentes opcionales en D y/o A se seleccionan entre flúor y cloro.

10 4. Un compuesto como se ha reivindicado en la reivindicación 1 que tiene la fórmula (II):



15 en donde R_{15} y R_{16} son independientemente hidrógeno o fluoro, y en donde z , X^1 , L^1 , Y , R_1 , R_2 y R_3 se definen como en la reivindicación 1.

20 5. Un compuesto como se ha reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el radical $-Y-L^1-X^1-(CH_2)_z-$, es $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2O-$, $-CH_2CH_2O-$, $-CH_2CH_2CH_2O-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2O-$, $-C(=O)-CH_2-$, $-C(=O)-CH_2O-$, $-C(=O)-NH-CH_2-$, o $-C(=O)-NH-CH_2O-$.

6. Un compuesto como se ha reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde R_{14} es metilo, trifluorometilo, etilo, *n*- o iso-propilo, *n*-, sec- o terc-butilo, ciclohexilo, alilo, biciclo[2,2,1]hept-2-ilo, 2,3-dihidro-1*H*-inden-2-ilo, fenilo, 2-, 3- o 4-piridilmetilo, N-metilpiperidin-4-ilo, tetrahydrofuran-3-ilo o metoxietilo.

25 7. Un compuesto como se ha reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde R_{14} es ciclopentilo.

30 8. Un compuesto como se ha reivindicado en la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en:
N-(2-{4-[6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2*H*)-il]fenil}etil)-2-metilalaninato de ciclopentilo,
N-(2-{4-[6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2*H*)-il]-3,5-difluorofenil}etil)-2-metilalaninato de ciclopentilo,
N-(3-{4-[6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2*H*)-il]-3,5-difluorofenoxi}propil)-2-metilalaninato de ciclopentilo,
 y sus sales farmacéuticamente aceptables.

35 9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

40 10. Un compuesto como se ha reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria.