

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 165**

51 Int. Cl.:

C07D 403/04 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2005 E 05743218 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 1747216**

54 Título: **Pirrol-2,5-dionas sustituidas como inhibidores de proteína cinasa C**

30 Prioridad:

13.05.2004 GB 0410713

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

26.03.2014

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse, 35
4056 Basel , CH**

72 Inventor/es:

**VAN EIS, MAURICE;
WAGNER, JÜRGEN y
VON MATT, PETER**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 451 165 T3

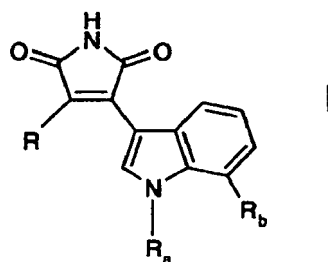
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar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

Pirrol-2,5-dionas sustituidas como inhibidores de proteína cinasa C.

La presente invención se refiere a derivados de indolilmaleimida, a un procedimiento para su producción y a composiciones farmacéuticas que los contienen.

5 La presente descripción proporciona un compuesto de fórmula I

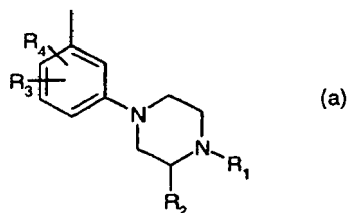


en la que

R_a es H; alquilo C₁₋₄; o alquilo C₁₋₄ sustituido con OH, NH₂, NH-alquilo C₁₋₄ o N(alquilo C₁₋₄)₂;

R_b es H; halógeno; alquilo C₁₋₈; o alcoxilo C₁₋₈, y

10 R es un radical de fórmula (a)



en la que cada uno de R₁ y R₂, independientemente, es H o metilo;

R₃ es F, Cl, acetamida, nitro o amino;

R₄ es H, CH₃, CF₃, F o Cl; siendo R₄ distinto de H, CH₃ o CF₃ cuando R₃ es Cl.

15 Los documentos WO 03/082859 y WO 02/38561 describen compuestos de indolilmaleimida de estructura comparable con una cierta carencia de especificidad por la isoenzima proteína cinasa C.

De los compuestos que se encuentran bajo esta descripción, un compuesto con las siguientes características es un compuesto según la presente invención: Un compuesto de fórmula I tal como se mostró anteriormente,

en la que R_a es H o metilo; R_b es H, metilo o etilo; y

20 R es un radical de fórmula (a) mostrada anteriormente,

en la que R₁ es metilo y R₂, independientemente, es H o metilo;

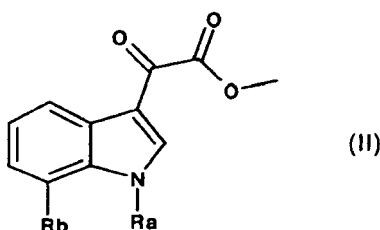
R₃ es F o nitro, y R₃ está unido en posición 2; y R₄ es H o F y está unido en posición 4; o una sal del mismo.

En los compuestos de fórmula I de la invención, se prefiere individualmente la siguiente significación o en cualquier subcombinación: R₂ es H.

25 Los compuestos de fórmula I pueden existir en forma libre o en forma de sal, por ejemplo sales de adición con por ejemplo ácidos orgánicos o inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido acético o ácido trifluoroacético.

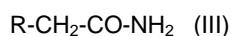
Se apreciará que los compuestos de fórmula I pueden existir en forma de isómeros ópticos, racematos o diaestereoisómeros. Por ejemplo, un átomo de carbono de anillo que lleva un sustituyente en la posición 3 del residuo de piperazinilo es asimétrico y puede tener la configuración D o L. Debe entenderse que la presente invención abarca todos los enantiómeros y sus mezclas. Se aplican consideraciones similares en relación con materiales de partida que presentan átomos de carbono asimétricos tal como se mencionó.

La presente invención también incluye un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula I según la invención, procedimiento que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula II



en la que R_a y R_b son tal como se definieron anteriormente,

10 con un compuesto de fórmula III



en la que R es tal como se definió anteriormente,

y, cuando se requiera, convertir el compuesto de fórmula I resultante obtenido en forma libre en una forma de sal o viceversa, según sea apropiado.

15 El procedimiento puede efectuarse convenientemente en presencia de una base fuerte, por ejemplo t-BuOK, por ejemplo tal como se da a conocer en el documento WO 02/38561.

Los compuestos de fórmulas II y III pueden prepararse según métodos conocidos, por ejemplo tal como se da a conocer en los documentos WO 02/38561 y WO 03/082859.

20 En tanto que la producción de los materiales de partida no se describe particularmente, los compuestos se conocen o pueden prepararse de manera análoga a métodos conocidos en la técnica o tal como se describe a continuación en el presente documento.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención.

TA = temperatura ambiente

DMF = dimetilformamida

THF = tetrahidrofurano

CCU = cromatografía en columna ultrarrápida

CCF = cromatografía en capa fina

TBAF = fluoruro de tetrabutilamonio

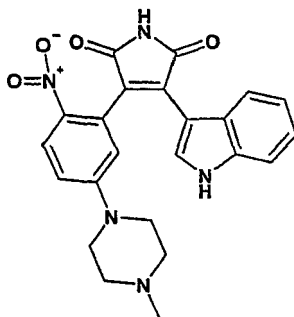
DBU = 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

EtOAc = acetato de etilo

MTBE = metil *t*-butil éter

Ejemplo 1:

3-(1H-Indol-3-il)-4-[5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitro-fenil]-pirrol-2,5-diona



5 A una disolución de 2-[5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitro-fenil]-acetamida (278 mg, 1,00 mmol) y éster metílico del ácido (1H-indol-3-il)-oxo-acético (366 mg, 1,80 mmol) en THF seco (8,0 ml) se le añade una disolución de t-BuOK 1,0 M en THF (4,0 ml, 4,0 mmol) a 0°C bajo argón. Tras agitar durante 30 min. a 0°C y 1 h a TA, la CCF indica el consumo completo de la acetamida. Se reparte la mezcla de reacción de color púrpura entre EtOAc (50 ml) y salmuera (50 ml), se separan las fases y se extrae la fase acuosa con EtOAc (50 ml). Se secan las fases orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ y se concentran a presión reducida. Se purifica el producto bruto mediante CCU (EtOAc/AcOH/H₂O 7:1:1) para proporcionar el compuesto del título como su sal de acetato soluble en agua. Sólido de color naranja. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 1,84 (s, 6H, CH₃COO⁻), 1,97-2,15 (m, 4 H), 2,03 (s, 3H), 2,95-3,21 (m, 4H), 6,51 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 6,54 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,73 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,01-7,07 (m, 2H), 7,41 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 8,00 (s, 1H), 8,13 (d, J = 9,4 Hz, 1H), 10,8-11,4 (a, 1H), 11,95 (s a, 1H). ES⁺-EM: 431 [M + H]⁺.

10

Preparación de 2-[5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitro-fenil]-acetamida

15 Se suspende éster etílico del ácido [5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitro-fenil]-acético (1,54 g, 5,01 mmol) en una disolución acuosa de NH₄OH al 33% (400 ml) y se agita durante 3 días a TA. Se reduce cuidadosamente el volumen a vacío hasta que queda el compuesto del título como un sólido de color amarillo, que se seca adicionalmente a alto vacío. ES⁺-EM: 279 [M+H]⁺.

Preparación de éster etílico del ácido [5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitro-fenil]-acético

20 Bajo argón, se calienta una mezcla de éster etílico del ácido (5-bromo-2-nitro-fenil)-acético (2,02 g, 7,00 mmol) y 1-metilpiperazina (1,40 g, 14,0 mmol) a 65°C durante 24 h. Se reparte la mezcla de reacción entre CH₂Cl₂ (25 ml) y H₂O (25 ml), y se extrae la fase acuosa con CH₂Cl₂ (2 x 25 ml). Se lavan las fases orgánicas combinadas con salmuera (25 ml), se secan sobre Na₂SO₄ y se concentran a presión reducida. Se purifica el producto bruto mediante CCU (CH₂Cl₂/MeOH 97,5:2,5) para proporcionar el compuesto del título como un aceite de color amarillo. ES⁺-EM: 308 [M+H]⁺.

25

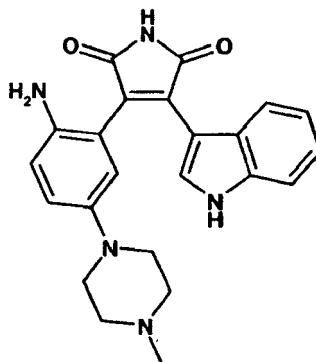
Preparación de éster etílico del ácido 5-bromo-2-nitro-fenil)-acético

30 A una disolución 1,0 M de t-BuOK en THF (60 ml, 60 mmol) se le añade lentamente durante 15 min. una disolución de 4-bromonitrobenceno (5,05 g, 25,0 mmol) y éster etílico del ácido cloro-acético (3,68 g, 30,0 mmol) en THF (30 ml) a -40°C bajo argón. Se agita la mezcla de reacción de color azul intenso durante 1 h a -40°C. El análisis de CCF indica la presencia de algo de material de partida en este punto de tiempo. Sin embargo, no se observa conversión adicional de material de partida tras agitación prolongada. Se extingue cuidadosamente la mezcla de reacción con una disolución acuosa de HCl 2 M (40 ml) y se extrae con MTBE (2 x 100 ml). Se lavan las fases orgánicas combinadas con H₂O (100 ml), se secan sobre Na₂SO₄ y se concentran a presión reducida. Se purifica el producto bruto mediante CCU (ciclohexano/EtOAc 97:3) para producir el compuesto del título como un aceite incoloro. ES⁺-EM: 289 [M+H]⁺.

35

Ejemplo 2 de referencia:

3-[2-Amino-5-(4-metil-piperazin-1-il)-fenil]-4-(1H-indol-3-il)-pirrol-2,5-diona



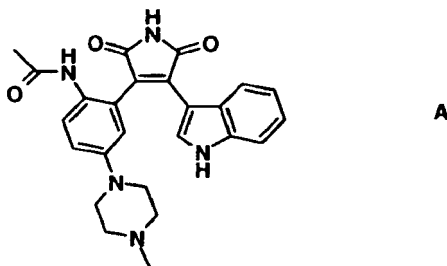
5 A una disolución de 2-[2-amino-5-(4-metil-piperazin-1-il)-fenil]-acetamida (124 mg, 0,50 mmol) y éster metílico del ácido (1H-indol-3-il)-oxo-acético (183 mg, 0,90 mmol) en THF seco (4,0 ml) se le añade una disolución de t-BuOK 1,0 M en THF (2,0 ml, 2,0 mmol) a 0°C bajo argón. Tras agitar durante 30 min. a 0°C y 30 min. a TA, la CCF indica el consumo completo de la acetamida. Se reparte la mezcla de reacción de color rojo oscuro entre EtOAc (25 ml) y salmuera (25 ml), y se separan las fases. Se ajusta el pH de la fase acuosa a 6 con una disolución acuosa sat. de NH₄Cl. Se extrae la fase acuosa con EtOAc (2 x 25 ml) y se lavan las fases orgánicas combinadas con salmuera (25 ml), se secan sobre Na₂SO₄ y se concentran a presión reducida. Se purifica el producto bruto mediante CCU (EtOAc/AcOH/H₂O 5,5:1:1) para proporcionar el compuesto del título como su sal de acetato soluble en agua. Sólido de color rojo. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 1,70 (s, 9H, CH₃COO⁻), 2,25 (s, 3H), 2,22-2,38 (m, 4H), 2,78-2,84 (m, 4H), 6,51 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 6,63 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 6,64-6,68 (m, 2H), 6,77 (dd, J = 8,7 Hz, J = 2,8 Hz, 1H), 6,97-7,02 (m, 1H), 7,35 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,90 (s, 1H), 11,91 (s a, 1H). ES⁺-EM: 402 [M + H]⁺.

15 Preparación de 2-[2-amino-5-(4-metil-piperazin-1-il)-fenil]-acetamida

A una disolución de 2-[5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitro-fenil]-acetamida (468 mg, 1,68 mmol) en MeOH (8,0 ml) se le añade Pd al 10% sobre carbón (59 mg). Se agita la mezcla de reacción durante 18 h bajo una atmósfera de hidrógeno (1 atm.), se filtra a través de un microfiltro (0,45 μM) y se concentra el filtrado a presión reducida. Se disuelve el aceite de color marrón restante en MeOH (1 ml), se añade MTBE (5 ml) y se elimina cuidadosamente el disolvente a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un polvo de color beis. ES⁺-EM: 249 [M+H]⁺.

Ejemplo 3 de referencia:

N-[2-[4-(1H-Indol-3-il)-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il]-4-(4-metil-piperazin-1-il)-fenil]-acetamida



25 A una suspensión de 2-[2-acetilamino-5-(4-metil-piperazin-1-il)-fenil]-acetamida (145 mg, 0,50 mmol) y éster metílico del ácido (1H-indol-3-il)-oxo-acético (183 mg, 0,90 mmol) en THF seco (6,0 ml) se le añade una disolución de t-BuOK 1,0 M en THF (2,0 ml, 2,0 mmol) a 0°C bajo argón. Se agita la suspensión de color amarillo resultante durante 18 h a TA. Se reparte la mezcla de reacción ahora de color rojo oscuro entre EtOAc (25 ml) y salmuera (25 ml), y se separan las fases. Se ajusta el pH de la fase acuosa a 6 con una disolución acuosa sat. de NH₄Cl. Se extrae la fase acuosa con EtOAc (2 x 25 ml) y se lavan las fases orgánicas combinadas con salmuera (25 ml), se secan sobre Na₂SO₄ y se concentran a presión reducida. Se purifica el producto bruto mediante CCU (EtOAc/AcOH/H₂O 5,5:1:1) para proporcionar el compuesto del título como su sal de acetato soluble en agua. Sólido de color naranja. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 1,75 (s, 12H, CH₃COO⁻), 2,16 (s, 3H), 2,31-2,38 (m, 4H), 2,92-2,99 (m, 4H), 6,61 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 6,66 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 6,75 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 6,92 (dd, J = 9,0 Hz, J = 2,7 Hz, 1H), 6,99 (t, J = 7,5 Hz,

1H), 7,32 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,47 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 7,75 (s, 1H), 8,69 (s, 1H), 11,86 (s a, 1H). ES⁺-EM: 444 [M + H]⁺.

Preparación de 2-[2-acetilamino-5-(4-metil-piperazin-1-il)-fenil]-acetamida

- 5 Se suspende éster etílico del ácido [2-acetilamino-5-(4-metil-piperazin-1-il)-fenil]-acético (450 mg, 1,41 mmol) en una disolución acuosa de NH₄OH al 33% (200 ml) y se agita durante 16 h a TA. Se reduce cuidadosamente el volumen a vacío hasta que queda el compuesto del título como un sólido de color marrón, que se seca adicionalmente a alto vacío. ES⁺-EM: 291 [M + H]⁺.

Preparación de éster etílico del ácido [2-acetilamino-5-(4-metil-piperazin-1-il)-fenil]-acético

- 10 A una disolución de éster etílico del ácido [2-amino-5-(4-metil-piperazin-1-il)-fenil]-acético (438 mg, 1,58 mmol) en CHCl₃ (8,0 ml) se le añade anhídrido del ácido acético (322 mg, 3,16 mmol) y trietilamina (240 mg, 2,37 mmol) bajo argón. Se agita la mezcla de reacción resultante durante 1 h a TA y 1 h a reflujo. Se reparte la mezcla de reacción entre CH₂Cl₂ (25 ml) y agua (20 ml) y se separan las fases. Se extrae la fase acuosa con CH₂Cl₂ (2 x 25 ml) y se lavan las fases orgánicas combinadas con agua (2 x 25 ml), salmuera (25 ml), se secan sobre Na₂SO₄ y se concentran a presión reducida para proporcionar un sólido de color rojo pálido. ES⁺-EM: 320 [M+H]⁺.

- 15 Preparación de éster etílico del ácido [2-amino-5-(4-metil-piperazin-1-il)-fenil]-acético

A una disolución de éster etílico del ácido [5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitro-fenil]-acético (1,10 g, 3,58 mmol) en MeOH (25,0 ml) se le añade Pd al 10% sobre carbón (114 mg). Se agita la mezcla de reacción durante 4 h bajo una atmósfera de hidrógeno (1 atm.), se filtra a través de un microfiltro (0,45 μM) y se concentra el filtrado a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un aceite de color rojo. ES⁺.EM: 278 [M+H]⁺.

- 20 Siguiendo los procedimientos de los ejemplos 1, 2 y 3 o tal como se describen en el documento WO 02/38561, pero usando los materiales de partida apropiados, pueden obtenerse los compuestos de fórmula A en la que R_a, R_b, R₃ y R₄ son tal como se indica en la tabla 1 a continuación.

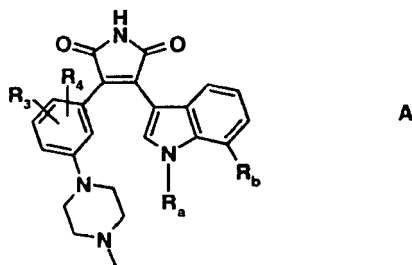


Tabla 1

Ejemplo	R ₃	R ₄	R _a	R _b	Datos de E.M.
4.	2-nitro	H	H	CH ₃	MH ⁺ 446
5.*	2-amino	H	H	CH ₃	MH ⁺ 416
6.*	2-acetamida	H	H	CH ₃	MH ⁺ 458
7.	2-F	H	H	H	MH ⁺ 405
8.	2-F	H	CH ₃	H	MH ⁺ 419
9.	2-F	H	H	CH ₃	MH ⁺ 419
10.	2-F	4-F	H	H	MH ⁺ 423
11.	2-F	4-F	CH ₃	H	MH ⁺ 437
12.	2-F	4-F	H	CH ₃	MH ⁺ 437
13.*	2-Cl	4-F	H	H	MH ⁺ 439

(continuación)

Ejemplo	R ₃	R ₄	R _a	R _b	Datos de E.M.
14.*	2-Cl	4-F	H	CH ₃	MH ⁺ 453
*) marca un ejemplo de referencia, respectivamente.					

- 5 Los compuestos de fórmula I en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable presentan propiedades farmacológicas valiosas, por ejemplo inhibición de la actividad proteínica cinasa C (PKC), por ejemplo isoformas de PKC como α , β , δ , ϵ , η o θ , inhibición de la activación y proliferación de células T, por ejemplo inhibiendo la producción por células T o citocinas, por ejemplo IL-2, inhibiendo la respuesta proliferativa de células T a citocinas, por ejemplo IL-2, por ejemplo tal como se indica en pruebas *in vitro* e *in vivo* y por tanto están indicados para terapia.

A. *In vitro*

10 1. Ensayo de proteína cinasa C

Se someten a prueba los compuestos de la invención para determinar su actividad sobre diferentes isoformas de PKC según el siguiente método. Se realiza el ensayo en una placa de microtitulación de 384 pocillos de color blanco con fondo transparente con superficie no adhesiva. La mezcla de reacción (25 μ l) contiene 1,5 μ M de un sustrato de aceptor de tridecapéptido que imita la secuencia de pseudosustrato de PKC a con la sustitución Ala \rightarrow Ser, ³³P-ATP 10 μ M, Mg(NO₃)₂ 10 mM, CaCl₂ 0,2 mM, PKC a una concentración de proteína que varía desde 25 hasta 400 ng/ml (dependiendo del isotipo usado), vesículas lipídicas (que contienen fosfatidilserina al 30% en moles, DAG al 5% en moles y fosfatidilcolina al 65% en moles) a una concentración de lípidos final de 0,5 mM, en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,4 + BSA al 0,1%. Se realiza la incubación durante 60 min. a temperatura ambiente. Se detiene la reacción añadiendo 50 μ l de mezcla de detención (EDTA 100 mM, ATP 200 μ M, Triton X-100 al 0,1%, perlas SPA recubiertas con estreptavidina 0,375 mg/pocillo en solución salina tamponada con fosfato sin Ca, Mg). Tras 10 min. de incubación a temperatura ambiente, se centrifuga la suspensión durante 10 min. a 300 g. Se mide la radiactividad incorporada en un contador Trilux durante 1 min. Se realiza la medición de Cl₅₀ de manera rutinaria incubando una dilución en serie de inhibidor a concentraciones que oscilan entre 1-1000 μ M. Se calculan los valores de Cl₅₀ a partir de la gráfica mediante ajuste de la curva con el software XL fit[®].

25 2. Ensayo de proteína cinasa C θ

Se usa PKC θ recombinante humana en las condiciones de ensayo descritas anteriormente. En este ensayo, los compuestos de fórmula I inhiben PKC θ con una Cl₅₀ < 1 μ M. Por ejemplo, el compuesto del ejemplo 1 inhibe PKC θ con una Cl₅₀ de 8,9 nM y el compuesto del ejemplo 4 inhibe PKC θ con una Cl₅₀ de 10,2 nM.

3. Ensayo de proteína cinasa C α

30 Se obtuvo PKC α recombinante humana de Oxford Biomedical Research y se usa en las condiciones de ensayo descritas en la sección A.1 anteriormente. En este ensayo, los compuestos de fórmula I inhiben PKC α con una Cl₅₀ \leq 1 μ M. Por ejemplo, el compuesto del ejemplo 1 inhibe PKC α con una Cl₅₀ de 2,6 nM y el compuesto del ejemplo 4 inhibe PKC α con una Cl₅₀ de 2,9 nM.

4. Ensayo de proteína cinasa C β 1

35 Se obtuvo PKC β 1 recombinante humana de Oxford Biomedical Research y se usa en las condiciones de ensayo descritas en la sección A.1 anteriormente. En este ensayo, los compuestos de fórmula I inhiben PKC β 1 con una Cl₅₀ \leq 1 μ M.

5. Ensayo de proteína cinasa C δ

40 Se obtuvo PKC δ recombinante humana de Oxford Biomedical Research y se usa en las condiciones de ensayo descritas en la sección A.1 anteriormente. En este ensayo, los compuestos de fórmula I inhiben PKC δ con una Cl₅₀ \leq 1 μ M.

6. Ensayo de proteína cinasa C ϵ

Se obtuvo PKC ϵ recombinante humana de Oxford Biomedical Research y se usa en las condiciones de ensayo descritas en la sección A.1 anteriormente. En este ensayo, los compuestos de fórmula I inhiben PKC ϵ con una CI₅₀ \leq 1 μ M.

5 7. Ensayo de proteína cinasa C η

Se obtuvo PKC η recombinante humana de PanVera y se usa en las condiciones de ensayo descritas en la sección A.1 anteriormente. En este ensayo, los compuestos de fórmula I inhiben PKC η con una CI₅₀ \leq 1 μ M.

8. Ensayo de coestimulación de CD28

10 Se realiza el ensayo con células Jurkat transfectadas con un constructo de gen indicador/promotor de interleucina-2 humana tal como se describe por Baumann G *et al.* en Transplant. Proc. 1992; 24:43-8, sustituyéndose el gen indicador de β -galactosidasa por el gen de luciferasa (de Wet J., *et al.*, Mol. Cell Biol. 1987, 7(2), 725-737). Se estimulan las células mediante anticuerpos acoplados a fase sólida o miristato-acetato de forbol (PMA) y el ionóforo de Ca⁺⁺ ionomicina tal como sigue. Para la estimulación mediada por anticuerpos se recubren placas de microtitulación Microlite TM1 (Dynatech) con anticuerpos de cabra anti-Fc de IgG de ratón 3 μ g/ml (Jackson) en 55 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS) por pocillo durante tres horas a TA. Se bloquean las placas tras eliminar los anticuerpos mediante incubación con albúmina sérica bovina al 2% (BSA) en PBS (300 μ l por pocillo) durante 2 horas a TA. Tras lavar tres veces con 300 μ l de PBS por pocillo, se añaden anticuerpos anti-receptor de células T 10 ng/ml (WT31, Becton & Dickinson) y anticuerpos anti-CD28 300 ng/ml (15E8) en 50 μ l de BSA al 2%/PBS como anticuerpos de estimulación y se incuban durante la noche a 4°C. Finalmente se lavan las placas tres veces con 300 μ l de PBS por pocillo. Se preparan siete diluciones en serie de tres veces de los compuestos de prueba por duplicado en medio de ensayo (RPMI 1640/suero de ternero fetal (FCS) al 10% que contiene 2-mercaptoetanol 50 μ M, penicilina 100 unidades/ml y estreptomina 100 μ g/ml) en placas separadas, se mezclan con células Jurkat transfectadas (clon K22 290_H23) y se incuban durante 30 minutos a 37°C en un 5% de CO₂. Entonces se transfieren 100 μ l de esta mezcla que contiene 1x10⁵ células a las placas de ensayo recubiertas con anticuerpo. En paralelo se incuban 100 μ l con PMA 40 ng/ml y ionomicina 2 μ M. Tras la incubación durante 5,5 horas a 37°C en un 5% de CO₂, se determina el nivel de luciferasa mediante medición de la bioluminiscencia. Se centrifugan las placas durante 10 min. a 500 g y se elimina el sobrenadante sacudiendo. Se añade tampón de lisis que contiene Tris-fosfato 25 mM, pH 7,8, DTT 2 mM, ácido 1,2-diaminociclohexano-N,N',N'-tetraacético 2 mM, glicerol al 10% (v/v) y Triton X-100 al 1% (v/v) (20 μ l por pocillo). Se incuban las placas a TA durante 10 minutos con agitación constante. Se evalúa la actividad luciferasa con un lector de bioluminiscencia (Labsystem, Helsinki, Finlandia) tras la adición automática de 50 μ l por pocillo de tampón de reacción de luciferasa que contiene Tricine 20 mM, (MgCO₃)₄Mg(OH)₂x5H₂O 1,07 mM, MgSO₄ 2,67 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 33,3 mM, coenzima A 270 μ M, luciferina 470 μ M (Chemie Brunschwig AG), ATP 530 μ M, pH 7,8. El tiempo de demora es de 0,5 segundos, el tiempo de medición total es de 1 ó 2 segundos. Los valores de control bajo son unidades de luz de células estimuladas con PMA o anticuerpo anti-receptor de células T, los controles altos son de células estimuladas con PMA/ionomicina o anticuerpo anti-receptor de células T/anti-CD28 o sin ninguna muestra de prueba. Se restan los controles bajos de todos los valores. Se calcula la inhibición obtenida en presencia de un compuesto de prueba como porcentaje de inhibición del control alto. Se determina la concentración de compuestos de pruebas que da como resultado el 50% de inhibición (CI₅₀) a partir de curvas de dosis-respuesta. En este ensayo, los compuestos de fórmula I inhiben células Jurkat estimuladas con PMA/ionomicina y anticuerpo anti-receptor de células T/anti-CD28 con una CI₅₀ \leq 1 μ M.

Por ejemplo, el compuesto del ejemplo 1 tiene una CI₅₀ de 25,5 nM y el compuesto del ejemplo 4 tiene una CI₅₀ de 17,0 nM.

9. Reacción mixta de linfocitos (MLR) alogénica

45 Se realiza la MLR de dos vías según procedimientos habituales (J. Immunol. Methods, 1973, 2, 279 y Meo T. *et al.*, Immunological Methods, Nueva York, Academic Press, 1979, 227-39). En resumen, se incuban esplenocitos de ratones CBA y BALB/c (1,6 x 10⁵ células de cada cepa por pocillo en placas de microtitulación de cultivo tisular de fondo plano, 3,2 x 10⁵ en total) en medio RPMI que contiene FCS al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 μ g/ml (Gibco BRL, Basilea, Suiza), 2-mercaptoetanol 50 μ M (Fluka, Buchs, Suiza) y compuestos diluidos en serie. Se realizan siete etapas de dilución de tres veces por duplicado por compuesto de prueba. Tras cuatro días de incubación, se añade ³H-timidina 1 μ Ci. Se recogen células tras un periodo de incubación de cinco horas adicionales, y se determina la ³H-timidina incorporada según procedimientos convencionales. Los valores de fondo (control bajo) de la MLR son la proliferación de células BALB/c solas. Se restan los controles bajos de todos los valores. Se toman controles altos sin ninguna muestra como el 100% de proliferación. Se calcula el porcentaje de inhibición mediante las muestras y se determinan las concentraciones requeridas para el 50% de inhibición (valores

de Cl_{50}). Por ejemplo, el compuesto del ejemplo 1 tiene una Cl_{50} de 17,5 nM y el compuesto del ejemplo 4 tiene una Cl_{50} de 24,0 nM.

B. In vivo

Trasplante de corazón de rata

5 La combinación de cepas usada: Lewis (haplotipo RT^1) y BN (haplotipo RT^1) macho. Se anestesian los animales usando isofluorano inhalado. Tras la heparinización de la rata donante a través de la vena cava inferior abdominal con desangrado simultáneo a través de la aorta, se abre el pecho y se enfría el corazón rápidamente. Se liga la aorta y se divide de manera distal a la primera rama y se divide el tronco braquiocefálico en la primera bifurcación. Se liga la arteria pulmonar izquierda y se divide y se divide el lado derecho pero se deja abierto. Todos los demás
10 vasos se liberan mediante disección, se ligan y se dividen y se extrae el corazón del donante en solución salina con hielo.

Se prepara el receptor mediante disección y pinzamiento transversal de la vena cava y aorta abdominal infrarrenal. Se implanta el injerto con anastomosis terminolateral, usando sutura de monofilamento 10/0, entre el tronco braquiocefálico del donante y la aorta del receptor y la arteria pulmonar derecha del donante con la vena cava del receptor. Se retiran las pinzas, se ata el injerto de manera retroabdominal, se lava el contenido abdominal con solución salina caliente y se cierra al animal y se permite que se recupere bajo una lámpara de calentamiento. Se monitoriza la supervivencia del injerto mediante palpación diaria del corazón latiente del donante a través de la pared abdominal. Se considera que el rechazo es completo cuando se detienen los latidos del corazón. Se obtienen aumentos de la supervivencia del injerto en animales tratados con un compuesto de fórmula I administrado por vía oral a una dosis diaria de 1 a 30 mg/kg dos veces al día.
15
20

Modelo de injerto frente a huésped

Se inyectan esplenocitos (2×10^7) de ratas Wistar/F por vía subcutánea en la almohadilla plantar trasera derecha de ratas híbridas (Wistar/F x Fischer 344) F_1 . La almohadilla plantar izquierda se deja sin tratar. Se tratan los animales con los compuestos de prueba en 4 días consecutivos (0-3). Se extraen los ganglios linfáticos poplíteos en el día 7, y se determinan las diferencias de peso entre dos ganglios linfáticos correspondientes. Se expresan los resultados como la inhibición del agrandamiento de ganglios linfáticos (facilitada en porcentaje) comparando las diferencias de peso de los ganglios linfáticos en los grupos experimentales con la diferencia de peso entre los ganglios linfáticos correspondientes de un grupo de animales que se dejan sin tratar con un compuesto de prueba.
25

Por tanto, los compuestos de fórmula I son útiles en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o trastornos mediados por linfocitos T y/o PKC, por ejemplo rechazo agudo o crónico de alo o xenoinjertos de órganos o tejidos, enfermedades de injerto frente a huésped, aterosclerosis, oclusión vascular debida a lesión vascular tal como angioplastia, reestenosis, obesidad, síndrome X, tolerancia a la glucosa alterada, síndrome de ovario poliquístico, hipertensión, insuficiencia cardíaca, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades del SNC tales como enfermedad de Alzheimer o una esclerosis lateral amiotrófica, cáncer, enfermedades infecciosas tales como SIDA, choque septicémico o síndrome de dificultad respiratoria del adulto, lesión por isquemia/reperfusión por ejemplo infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, isquemia intestinal, insuficiencia renal o choque hemorrágico, o choque traumático, por ejemplo lesión cerebral traumática. Los compuestos de fórmula I también son útiles en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o trastornos inflamatorios agudos o crónicos mediados por células T o enfermedades autoinmunitarias por ejemplo artritis reumatoide, osteoartritis, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis de Hashimoto, esclerosis múltiple, miastenia grave, diabetes tipo I o II y los trastornos asociados con la misma, enfermedades respiratorias tales como asma o enfermedad pulmonar inflamatoria, lesión hepática inflamatoria, lesión glomerular inflamatoria, manifestaciones cutáneas de trastornos o enfermedades mediados inmunológicamente, enfermedades de la piel inflamatorias e hiperproliferativas (tales como psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis por contacto alérgica, dermatitis por contacto irritante y además dermatitis eccematosas, dermatitis seborreica), enfermedades oculares inflamatorias, por ejemplo síndrome de Sjogren, queratoconjuntivitis o uveítis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. Para los usos anteriores la dosificación requerida por supuesto variará dependiendo del modo de administración, el estado particular que va a tratarse y el efecto deseado. En general, se indica que van a obtenerse resultados satisfactorios sistémicamente a dosificaciones diarias de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Una dosificación diaria indicada en mamíferos más grandes, por ejemplo seres humanos, está en el intervalo de desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 2000 mg, administrada convenientemente, por ejemplo, en dosis divididas hasta cuatro veces al día o en forma retardada.
30
35
40
45
50

Los compuestos de fórmula I pueden administrarse mediante cualquier vía convencional, en particular por vía entérica, por ejemplo por vía oral, por ejemplo en forma de comprimidos o cápsulas, o por vía parenteral, por ejemplo en forma de disoluciones o suspensiones inyectables, por vía tópica, por ejemplo en forma de lociones, geles, pomadas o cremas, o en forma nasal o de supositorio. Pueden fabricarse composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula I en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable en asociación
55

con al menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable de manera convencional mediante mezclado con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las formas farmacéuticas unitarias para la administración oral contienen, por ejemplo, desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 500 mg de sustancia activa.

La administración tópica es por ejemplo a la piel. Una forma adicional de administración tópica es a los ojos.

- 5 Los compuestos de fórmula I pueden administrarse en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable por ejemplo tal como se indicó anteriormente. Tales sales pueden prepararse de manera convencional y presentan el mismo orden de actividad que los compuestos libres.

Según lo anterior la presente invención proporciona además:

- 10 1.1 Compuestos para su uso en un método para prevenir o tratar trastornos o enfermedades mediados por linfocitos T y/o PKC o GSK-3 β , por ejemplo tal como se indicó anteriormente, en un sujeto que necesita tal tratamiento, método que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

- 15 1.2 Compuestos para su uso en un método para prevenir o tratar rechazo de trasplante agudo o crónico o enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias mediadas por células T, por ejemplo tal como se indicó anteriormente, en un sujeto que necesita tal tratamiento, método que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

2. Un compuesto de fórmula I, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable para su uso como producto farmacéutico, por ejemplo en cualquiera de los métodos indicados en 1.1 y 1.2 anteriormente.

- 20 3. Una composición farmacéutica, por ejemplo para su uso en cualquiera de los métodos como en 1.1 y 1.2 anteriores que comprende un compuesto de fórmula I en forma libre o forma de sal farmacéuticamente aceptable en asociación con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable para el mismo.

4. Un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la preparación de una composición farmacéutica para su uso en cualquiera de los métodos como en 1.1 y 1.2 anteriores.

- 25 Los compuestos de fórmula I pueden administrarse como el único principio activo o junto con otros fármacos en regímenes de inmunomodulación u otros agentes antiinflamatorios por ejemplo para el tratamiento o la prevención de rechazo agudo o crónico de alo o xenoinjerto o trastornos inflamatorios o autoinmunitarios. Por ejemplo, pueden usarse en combinación con ciclosporinas o ascomicinas o sus análogos o derivados inmunosupresores, por ejemplo ciclosporina A, ISA Tx247, FK-506, ABT-281, ASM 981; un inhibidor de mTOR, por ejemplo rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, CCI779, ABT578 o un análogo de rapamicina ("*rapalog*"), por ejemplo AP23573, etc.; corticosteroides; ciclofosfamida; azatiopreno; metotrexato; un agonista del receptor de S1P por ejemplo FTY720 o un análogo del mismo; leflunomida o análogos de la misma; mizoribina; ácido micofenólico o una sal del mismo, por ejemplo sal de sodio; micofenolato de mofetilo; 15-desoxiespergualina o análogos de la misma; anticuerpos monoclonales inmunosupresores, por ejemplo, anticuerpos monoclonales frente a receptores de leucocitos, por ejemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD11a/CD18, CD7, CD25, CD27, B7, CD40, CD45, CD58, CD 137, ICOS, CD150 (SLAM), OX40, 4-1BB o sus ligandos, por ejemplo CD154; u otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo una molécula de unión recombinante que tiene al menos una parte del dominio extracelular de CTLA4 o un mutante del mismo, por ejemplo al menos una parte extracelular de CTLA4 o un mutante del mismo unida a una secuencia de proteína distinta de CTLA4, por ejemplo CTLA4Ig (por ejemplo designada ATCC 68629) o un mutante del mismo, por ejemplo LEA29Y, u otros inhibidores de moléculas de adhesión, por ejemplo AcM o inhibidores de bajo peso molecular incluyendo antagonistas de LFA-1, antagonistas de selectina y antagonistas de VLA-4. Los compuestos de fórmula I también pueden administrarse junto con un fármaco antiproliferativo, por ejemplo un fármaco quimioterápico, por ejemplo en tratamiento contra el cáncer, o con un fármaco antidiabético, un secretagogo de insulina, potenciador de la secreción de insulina o un sensibilizador a la insulina, en terapia de diabetes.
- 30
35
40

Según lo anterior la presente invención proporciona en un aspecto aún adicional:

- 45 5. Compuestos para su uso en un método tal como se definió anteriormente que comprende la administración conjunta, por ejemplo de manera concomitante o en secuencia, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de GSK-3 β , PKC o de la activación y proliferación de células T, por ejemplo un compuesto de fórmula I en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, y una segunda sustancia farmacológica, siendo dicha segunda sustancia farmacológica un fármaco inmunosupresor, inmunomodulador, antiinflamatorio, antiproliferativo o antidiabético, por ejemplo tal como se indicó anteriormente.
- 50

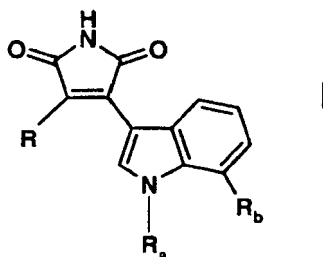
6. Una combinación terapéutica, por ejemplo un kit, que comprende a) un inhibidor de GSK-3 β , PKC o de la activación y proliferación de células T, por ejemplo un compuesto de fórmula I en forma libre o en forma de sal

farmacéuticamente aceptable, y b) al menos un segundo agente seleccionado de un fármaco inmunosupresor, inmunomodulador, antiinflamatorio, antiproliferativo y antidiabético. El componente a) y el componente b) pueden usarse de manera concomitante o en secuencia. El kit puede comprender instrucciones para su administración.

- 5 Cuando un inhibidor de GSK-3 β , PKC o de la activación y proliferación de células T, por ejemplo un compuesto de fórmula I, se administra conjuntamente con otra terapia inmunosupresora/inmunomoduladora, antiinflamatoria, antiproliferativa o antidiabética, por ejemplo para prevenir o tratar rechazo de injerto agudo o crónico o trastornos inflamatorios o autoinmunitarios tal como se especificó anteriormente en el presente documento, la dosificaciones del compuesto inmunosupresor, inmunomodulador, antiinflamatorio, antiproliferativo o antidiabético administrado conjuntamente variarán por supuesto dependiendo del tipo de cofármaco empleado, por ejemplo si es un esteroide o
- 10 una ciclosporina, del fármaco específico empleado, del estado que está tratándose, etc.

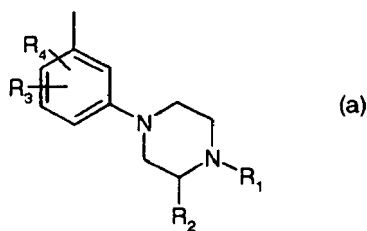
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula I



en la que

- 5 Ra es H o metilo;
 Rb es H, metilo o etilo; y
 R es un radical de fórmula (a)



en la que R1 es metilo y R2, independientemente, es H o metilo;

- 10 R3 es F o nitro, y R3 está unido en posición 2; y
 R4 es H o F y está unido en posición 4;
 o una sal del mismo.

2. Compuesto según la reivindicación 1 que se selecciona de

- 3-(1H-indol-3-il)-4-[5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitro-fenil]-pirrol-2,5-diona;
 15 3-(7-metil-1H-indol-3-il)-4-[5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitro-fenil]-pirrol-2,5-diona;
 3-[2-fluoro-5-(4-metil-piperazin-1-il)-fenil]-4-(1H-indol-3-il)-pirrol-2,5-diona;
 3-[2-fluoro-5-(4-metil-piperazin-1-il)-fenil]-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-pirrol-2,5-diona;
 3-[2-fluoro-5-(4-metil-piperazin-1-il)-fenil]-4-(7-metil-1H-indol-3-il)-pirrol-2,5-diona;
 3-[2,4-difluoro-5-(4-metil-piperazin-1-il)-fenil]-4-(1H-indol-3-il)-pirrol-2,5-diona; y
 20 3-[2,4-difluoro-5-(4-metil-piperazin-1-il)-fenil]-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-pirrol-2,5-diona.

3. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, para su uso como producto farmacéutico.

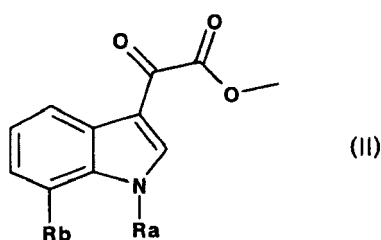
4. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, en asociación con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable para el mismo.
 25

5. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, o una composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la fabricación de un medicamento para tratar y prevenir enfermedades o trastornos mediados por linfocitos T y/o PKC.

5 6. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, o una composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o trastornos inflamatorios agudos o crónicos mediados por células T, enfermedades autoinmunitarias, rechazo de injerto, cáncer o enfermedades infecciosas.

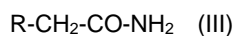
10 7. Combinación farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, y un agente adicional seleccionado de agentes inmunosupresores, inmunomoduladores, antiinflamatorios, quimioterápicos, antiproliferativos y antidiabéticos.

8. Procedimiento para la producción del compuesto de fórmula I según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, procedimiento que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula II



en la que R_a y R_b son tal como se definieron en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2,

15 con un compuesto de fórmula III



en la que R es tal como se definió en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2;

y, cuando se requiera, convertir el compuesto de fórmula I resultante obtenido en forma libre en una forma de sal o viceversa, según sea apropiado.