

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 279**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2015 PCT/IB2015/051895**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15140684**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2015 E 15714030 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 3119779**

54 Título: **Derivados del ácido acético azaindol y su uso como moduladores de receptor de prostaglandina D₂**

30 Prioridad:

17.03.2014 WO PCT/IB2014/059883

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

24.10.2018

73 Titular/es:

**IDORSIA PHARMACEUTICALS LTD (100.0%)
Hegenheimermattweg 91
4123 Allschwil, CH**

72 Inventor/es:

**AISSAOUI, HAMED;
BOSS, CHRISTOPH;
BOUIS, PATRICK;
HAZEMANN, JULIEN y
SIEGRIST, ROMAIN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 687 279 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados del ácido acético azaindol y su uso como moduladores de receptor de prostaglandina D₂.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a derivados del ácido acético azaindol de la fórmula (I) y su uso como moduladores del receptor de prostaglandina, más particularmente como moduladores del receptor de prostaglandina D₂ ("receptor DP"), en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos mediados por la prostaglandina, a composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos y a procedimientos para su preparación. En particular, dichos derivados pueden usarse solos o en composiciones farmacéuticas para el tratamiento tanto de, enfermedades/trastornos alérgicos/inmunitarios agudos tales como asma, asma alérgica, asma eosinofílica, asma grave, rinitis, rinitis alérgica, angioedema, alergia al veneno de insectos, alergias a medicamentos, sinusitis alérgica, nefritis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial, alergia a los alimentos, trastornos de mastocitos sistémicos, choque anafiláctico, urticaria, eczema, colitis ulcerosa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad inflamatoria del intestino y la artritis reumatoide; enfermedades relacionadas con eosinófilos que comprenden vasculitis de vasos pequeños, como el síndrome de Churg-Strauss, la granulomatosis de Wegener, poliangeítis microscópica (y subconjuntos de órganos específicos de este último), síndromes hipereosinofílicos como la neumonía eosinofílica, la esofagitis eosinofílica, esofagitis por reflujo, endocarditis eosinofílica (endocarditis de Loeffler), síndrome eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, foliculitis pustulosa eosinofílica (enfermedad de Ofuji), úlceras eosinofílicas, hiperplasia angiolífoide con eosinofilia (ALHE), celulitis eosinofílica (síndrome de Wells), leucemia eosinofílica crónica y el síndrome DRESS (erupción cutánea con eosinofilia y síntomas sistémicos); y las enfermedades relacionadas con los basófilos, que comprende la leucemia basófila y leucocitosis basófila.

Antecedentes de la invención

25 En respuesta a la exposición a alérgenos en las afecciones alérgicas, los mastocitos se activan y liberan mediadores como la histamina, tromboxano A₂ (TxA₂), cisteinil leucotrienos (CysLTs) y prostaglandina D₂ (PGD₂). Estos mediadores interactúan con sus respectivos receptores y provocan efectos fisiológicos tales como aumento de la permeabilidad vascular, edema, prurito, congestión nasal y pulmonar, broncoconstricción y la secreción de moco pulmonar. Una permeabilidad vascular incrementada por ejemplo, permite una infiltración excesiva de leucocitos eosinófilos y basófilos en el tejido y de ese modo aumenta la respuesta alérgica.

30 Los tratamientos actuales de las enfermedades alérgicas comprenden agentes que pueden bloquear o de otro modo interrumpir dichas interacciones, por ejemplo antihistaminas (antagonistas del receptor de histamina H₁), antagonistas del receptor de leucotrienos, agonistas del receptor beta-adrenérgico y corticosteroides. Por lo general, los tratamientos con antihistamínicos y antagonistas de leucotrieno son de eficacia limitada y el uso a largo plazo de corticosteroides está generalmente asociado con efectos secundarios no deseados.

35 La PGD₂ es un agonista conocido por su acción sobre los receptores acoplados a la proteína G, el receptor DP1 de PGD₂ y el recientemente identificado receptor CRTH2 (molécula quimioatrayente homóloga del receptor expresada en las células Th2) (también denominado receptor "DP2").

40 Se considera que los niveles elevados de PGD₂ provocan inflamación tal como se observa en las enfermedades alérgicas tales como rinitis alérgica, asma alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica y similares. Por lo tanto, el bloqueo de la interacción de PGD₂ con sus receptores se considera una estrategia terapéutica útil para el tratamiento de dichas enfermedades.

45 El documento GB 2388540 divulga el uso de ramatroban (ácido (3R)-3-(4-fluorobenceno-sulfonamido)-1,2,3,4-tetrahydrocarbazol-9-propiónico), un antagonista del receptor TxA₂ (también denominado "receptor TP") con actividad antagonista adicional sobre CRTH2, para la profilaxis y tratamiento de las enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica o conjuntivitis alérgica. En T. Ishizuka et al., *Cardiovascular Drug Rev.* **2004**, *22(2)*, 71-90 se describen los efectos del ramatroban sobre la inflamación de fase tardía. Asimismo, se ha descrito la biodisponibilidad oral del ramatroban y su capacidad para inhibir la migración de eosinófilos inducida por las prostaglandinas D₂ *in vitro* (*Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **305(1)**, p.347-352 (2003)).

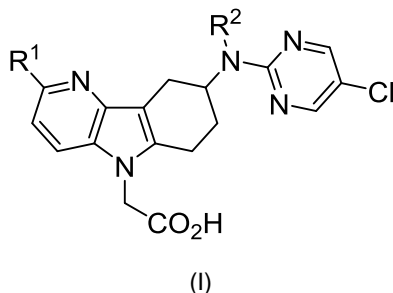
Se han divulgado los derivados del ácido acético azaindol con actividad antagónica CRTH2 en los documentos WO 2010/054113, WO 2010/054114 y B.A. Stearns et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 4647-4651.

50 Los documentos WO 2011/117798 y WO 2012/140612 divulgan ácido (3-heteroarilamino-1,2,3,4-tetrahydro-9H-carbazol-9-il)-acético y derivados de ácido (7-heteroarilamino-6,7,8,9-tetrahidropirido[1,2-a]indol-10-il)acético, respectivamente, cuyos derivados poseen actividad antagónica CRTH2.

55 Se ha descubierto de manera sorprendente que derivados particulares del ácido acético azaindol substituidos con un grupo 5-cloro-pirimidin-2-ilamino tienen propiedades mejoradas de manera significativa en un ensayo de citotoxicidad *in-vitro* en hepatocitos de rata en cultivo primario. Por lo tanto se espera que los presentes compuestos tengan un perfil de toxicidad mejorado *in-vivo*.

Descripción de la invención

1) La presente invención se refiere a derivados del ácido acético azaindol de la fórmula (I),



5 en donde

R¹ representa hidrógeno, alquilo (C1-4), fluoroalquilo (C1-2), alcoxi (C1-4), o halógeno; y

R² representa hidrógeno o metilo;

y a las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

10 Las definiciones que se proporcionan en la presente invención pretenden aplicarse de manera uniforme a los compuestos de fórmula (I) tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1) a 19), y mutatis mutandis, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones al menos que otra definición expresamente ofrezca una definición más amplia o más estrecha. Cabe entender que una definición o definición preferida de un término define y puede reemplazar el término respectivo independientemente de (y en combinación con) cualquier definición o definición preferida de cualquiera o de todos los demás términos tal como se define en

15 la presente.

Los compuestos de la fórmula (I) tal como se definen en cualquiera de las modalidades 1) a 19), puede contener uno o más centros estereogénicos o asimétricos, tales como uno o más átomos de carbono asimétricos. Los compuestos de la fórmula (I) pueden estar por lo tanto presentes como mezclas de estereoisómeros o en forma estereoisoméricamente enriquecida, preferentemente como estereoisómeros puros. Las mezclas de estereoisómeros se pueden separar de manera conocida por un experto en la técnica.

20 El término "enriquecido", por ejemplo cuando se utiliza en el contexto de enantiómeros, significa especialmente en el contexto de la presente invención que el enantiómero respectivo está presente en una relación (mutatis mutandis: pureza) de la menos 70:30 y particularmente de al menos 90:10 (mutatis mutandis: pureza de 70% / 90%) con respecto al otro enantiómero respectivo. Preferentemente el término se refiere al enantiómero esencialmente puro respectivo. El término "esencialmente", por ejemplo cuando se utiliza en un término tal como "esencialmente puro" significa en el contexto de la presente invención especialmente que el estereoisómero / composición / compuesto puro etc. consiste en una cantidad de al menos 90, especialmente de al menos 95 y particularmente de al menos 99 por ciento en peso del estereoisómero / composición / compuesto puro respectivo etc.

30 El término "alquilo", utilizado solo o en combinación, se refiere a un grupo alquilo de cadena recta o ramificada que contiene de uno a cuatro átomos de carbono. El término "alquilo (C_{x-y})" (x e y siendo cada uno un número entero), se refiere a un grupo alquilo tal como se define anteriormente que contiene átomos de carbono de x a y. Por ejemplo un grupo alquilo (C1-4) contiene de uno a cuatro átomos de carbono. Ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *iso*-butilo, *sec*-butilo y *ter*-butilo; metilo siendo el preferido.

35 El término "alcoxi", utilizado solo o en combinación, se refiere a un grupo alquilo-O- en donde el grupo alquilo es tal como se definió anteriormente. El término "alcoxi (C_{x-y})" (siendo cada uno un número entero) se refiere a un grupo alcoxi tal como se define anteriormente que contiene átomos de carbono de x a y. Por ejemplo un grupo alcoxi (C1-4) contiene de uno a cuatro átomos de carbono. Ejemplos de grupos alcoxi incluyen metoxi, etoxi, *n*-propoxi, *iso*-propoxi, *n*-butoxi, *iso*-butoxi, *sec*-butoxi y *ter*-butoxi; siendo metoxi el preferido.

40 El término "fluoroalquilo(C_{x-y})" (siendo x y cada uno un número entero) se refiere a un grupo alquilo tal como se define anteriormente que contiene átomos de carbono de x a y y en los cuales uno o más (y posiblemente todos) átomos de hidrógeno han sido reemplazados con flúor. Por ejemplo un grupo fluoroalquilo (C1-2) contiene uno o dos átomos de carbono en los cuales de uno a cinco átomos de hidrógeno han sido reemplazados con flúor. Ejemplos representativos de dichos grupos son difluorometilo, trifluorometilo, 2,2-difluoroetilo y 2,2,2-trifluoroetilo; trifluorometilo siendo el preferido.

45 El término halógeno se refiere a fluoro, cloro, bromo o yodo; fluoro siendo el preferido.

2) Una modalidad adicional de la invención se refiere a compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la modalidad 1), en donde

50 R¹ representa hidrógeno, metilo, trifluorometilo, metoxi, o fluoro;

y a las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

3) Una modalidad adicional de la invención se refiere a compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la modalidad

1), en donde

R¹ representa hidrógeno, alquilo (C1-4), o alcoxi (C1-4);

y a las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

5 4) Una modalidad adicional de la invención se refiere a compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la modalidad

1), en donde

R¹ representa hidrógeno, metilo, o metoxi;

y a las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

5) Una modalidad adicional de la invención se refiere a compuestos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1) a 4), en donde

10 R² representa metilo;

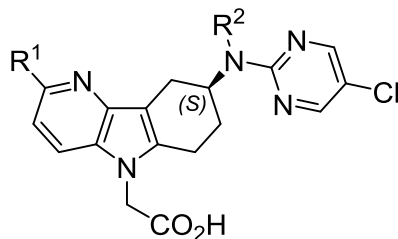
y a las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

6) Una modalidad adicional de la invención se refiere a compuestos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1) a 4), en donde

15 R² representa hidrógeno;

y a las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

7) Una modalidad adicional de la invención se refiere a compuestos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1) a 6), en donde la configuración absoluta del centro estereogénico es tal como se representa en la fórmula (I_{St1})

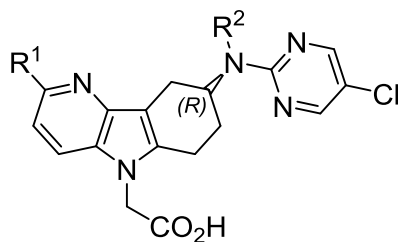


(I_{St1})

20

y a las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

8) Una modalidad adicional de la invención se refiere a compuestos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1) a 6), en donde la configuración absoluta del centro estereogénico es tal como se representa en la fórmula (I_{St2})



(I_{St2})

25

y a las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

9) Una modalidad adicional de la invención se refiere a compuestos de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1) o 5) a 8), en donde

30 R¹ representa fluoro;

y a las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

10) Ejemplos de compuestos de fórmula (I) tal como se define en la modalidad 1) se seleccionan del grupo que consiste en:

- 35 ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;
 ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético ;
 ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;
 ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-

il)acético;

ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético; y

5 ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-(trifluorometil)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;

o sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos;

Cabe entender que para cualquiera de los compuestos que se enumeran anteriormente, que un centro estereogénico, que no está asignado específicamente, puede estar en configuración absoluta (*R*)- o absoluta (*S*)-; por ejemplo un compuesto enumerado como ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético puede ser (*R*)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético, (*S*)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético o cualquier mezcla de los mismos.

11) Ejemplos preferidos de compuestos de fórmula (I) tal como se define en la modalidad 1) se seleccionan del grupo que consiste en:

(*S*)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;

(*S*)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético ;

20 (*S*)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;

(*S*)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-i)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;

(*S*)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético ; y

25 (*S*)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-(trifluorometil)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;

o sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos;

12) En una modalidad preferida el compuesto de fórmula (I) tal como se define en la modalidad 1) es:

30 ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético (y particularmente (*S*)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético);

o una sal (en particular una sal farmacéuticamente aceptable) del compuesto;

13) En una modalidad preferida el compuesto de fórmula (I) tal como se define en la modalidad 1) es:

35 ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético (y particularmente (*S*)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético);

o una sal (en particular una sal farmacéuticamente aceptable) del compuesto;

14) En otra modalidad preferida el compuesto de fórmula (I) tal como se define en la modalidad 1) es:

40 ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético (y particularmente (*S*)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético);

o una sal (en particular una sal farmacéuticamente aceptable) del compuesto;

15) En otra modalidad preferida el compuesto de fórmula (I) tal como se define en la modalidad 1) es:

45 ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-i)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético (y particularmente (*S*)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-i)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético);

o una sal (en particular una sal farmacéuticamente aceptable) del compuesto;

16) En otra modalidad preferida el compuesto de fórmula (I) tal como se define en la modalidad 1) es:

50 ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético (y particularmente (*S*)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético);

o una sal (en particular una sal farmacéuticamente aceptable) del compuesto;

17) En otra modalidad preferida el compuesto de fórmula (I) tal como se define en la modalidad 1) es:

ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-(trifluorometil)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético (y particularmente ácido (*S*)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-(trifluorometil)-6,7,8,9-

tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético);
o una sal (en particular una sal farmacéuticamente aceptable) del compuesto;

18) En otra modalidad preferida el compuesto de fórmula (I) tal como se define en la modalidad 1) es:

5 ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético (y particularmente ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético);
o una sal (en particular una sal farmacéuticamente aceptable) del compuesto;

10 19) La invención, por lo tanto, se refiere a compuestos de la fórmula (I) tal como se define en la modalidad 1) y a dichos compuestos aún más limitados por las características de cualquiera de las modalidades 2) a 18), todo ello bajo la consideración de sus respectivas dependencias; a sales farmacéuticamente aceptables de las mismas; y al uso de dichos compuestos como medicamentos especialmente en el tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en enfermedades/trastornos alérgicos/inmunes crónicos y agudos, que comprenden asma, asma alérgica, asma eosinofílica, asma grave, rinitis, rinitis alérgica, angioedema, alergia al veneno de insectos, alergias a medicamentos, sinusitis alérgica, nefritis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial, alergia a los alimentos, trastornos de mastocitos sistémicos, choque anafiláctico, urticaria, eczema, colitis ulcerosa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad inflamatoria del intestino y la artritis reumatoide; enfermedades relacionadas con eosinófilos que comprenden vasculitis de vasos pequeños, como el síndrome de Churg-Strauss, la granulomatosis de Wegener, poliangeítis microscópica (y subconjuntos de órganos específicos de este último), síndromes hipereosinofílicos como la neumonía eosinofílica, la esofagitis eosinofílica, esofagitis por reflujo, endocarditis eosinofílica (endocarditis de Loeffler), síndrome eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, foliculitis pustulosa eosinofílica (Enfermedad de Ofuji), úlceras eosinofílicas, hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia (ALHE), celulitis eosinofílica (síndrome de Wells), leucemia eosinofílica crónica y el síndrome DRESS (erupción cutánea con eosinofilia y síntomas sistémicos); y las enfermedades relacionadas con los basófilos, que comprenden la leucemia basófila y leucocitosis basófila. Por lo tanto las siguientes modalidades relacionadas con los compuestos de la fórmula (I) son especialmente posibles y en la presente invención y están específicamente divulgados en forma individualizada 1, 2+1, 3+1, 4+1, 5+1, 5+2+1, 5+3+1, 5+4+1, 6+1, 6+2+1, 6+3+1, 6+4+1, 7+1, 7+2+1, 7+3+1, 7+4+1, 7+5+1, 7+5+2+1, 7+5+3+1, 7+5+4+1, 7+6+1, 7+6+2+1, 7+6+3+1, 7+6+4+1, 8+1, 8+2+1, 8+3+1, 8+4+1, 8+5+1, 8+5+2+1, 8+5+3+1, 8+5+4+1, 8+6+1, 8+6+2+1, 8+6+3+1, 8+6+4+1, 9+1, 9+5+1, 9+6+1, 9+7+1, 9+7+5+1, 9+7+6+1, 9+8+1, 9+8+5+1, 9+8+6+1, 10+1, 11+1, 12+1, 13+1, 14+1, 15+1, 16+1, 17+1 y 18+1; en la lista anterior los números se refieren a las modalidades de acuerdo con su numeración proporcionada en la presente anteriormente mientras "+" indica la dependencia de otra forma de modalidad. Las diferentes modalidades individualizadas están separadas mediante comas. En otras palabras, "5+2+1" por ejemplo se refiere a una modalidad 5) que depende de la modalidad 2), que depende de la modalidad 1), es decir modalidad "5+2+1" corresponde a los compuestos de la modalidad 1) limitada adicionalmente por las características de las modalidades 2) y 5).

Cuando se utiliza la forma plural para los compuestos, sales, composiciones farmacéuticas, enfermedades o similares, esto pretende significar asimismo un único compuesto, sal, composición farmacéutica, enfermedad o similar.

40 Cualquier referencia a un compuesto de la fórmula (I) tal como se define en cualquiera de las modalidades 1) a 19) se refiere asimismo a las sales (y especialmente a sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos, como adecuadas y convenientes.

45 El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto sujeto y exhiben efectos toxicológicos mínimos no deseados. Tales sales incluyen ácido inorgánico u orgánico y/o sales de adición base dependiendo de la presencia de grupos ácidos y/o básicos en el compuesto sujeto. Como referencia véase por ejemplo 'Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use.', P. Heinrich Stahl, Camille G. Wermuth (Eds.), Wiley-VCH, 2008 y 'Pharmaceutical Salts and Co-crystals', Johan Wouters and Luc Quééré (Eds.), RSC Publishing, 2012.

50 La presente invención asimismo incluye compuestos isotópicamente etiquetados, especialmente compuestos 2H (deuterio) etiquetados de fórmula (I), cuyos compuestos son idénticos a los compuestos de la fórmula (I) excepto que uno o más átomos cada han cada uno sido reemplazados por un átomo que tiene el mismo número atómico pero una masa atómica diferente de la masa atómica generalmente hallada en la naturaleza. Los compuestos isotópicamente etiquetados, especialmente compuestos etiquetados 2H (deuterio) de fórmula (I) y sus sales están dentro del alcance de la presente invención. La sustitución de hidrógeno con el isótopo más pesado 2H (deuterio) puede conducir a una mayor estabilidad metabólica, dando lugar por ejemplo en una media vida in-vivo mayor o requerimientos de dosificación reducidos, o pueden llevar a una inhibición reducida de enzimas del citocromo P450, dando lugar por ejemplo a un perfil de seguridad mejorado. En una modalidad de la invención, los compuestos de la fórmula (I) no están isotópicamente etiquetados, o están etiquetados únicamente con uno o más átomos de deuterio. En una sub-modalidad, los compuestos de la fórmula (I) no están isotópicamente etiquetados. Los compuestos de fórmula (I) isotópicamente etiquetados se pueden preparar en analogía a los métodos que se describen en la presente a continuación, pero utilizando la variación isotópica adecuada de reactivos adecuados o materiales de partida.

Siempre que la palabra "entre" se utilice para describir un rango numérico, cabe entender que los puntos extremos del rango indicado se incluyen explícitamente en el rango. Por ejemplo: si un rango de temperatura está entre 40 °C y 80 °C, esto significa que los puntos extremos 40 °C y 80 °C están incluidos en el rango; o si se define una variable como un número entero entre 1 y 4, esto significa que la variable es el número entero 1, 2, 3, o 4.

- 5 Al menos que se utilice con referencia a las temperaturas, el término "aproximadamente" (o alternativamente "alrededor de") colocado antes de un valor numérico "X" se refiere en la presente solicitud a un intervalo que se extiende desde X menos 10% de X a X más 10% de X y preferentemente a un intervalo que se extiende desde X menos 5% de X a X más 5% de X. En el caso particular de temperaturas, el término "aproximadamente" (o alternativamente "alrededor de") ubicado antes de una temperatura "Y" se refiere en la presente solicitud a un
10 intervalo que se extiende desde la temperatura Y menos 10°C a Y más 10°C y preferentemente a un intervalo que se extiende desde Y menos 5°C a Y más 5°C. Además, el término "temperatura ambiente" tal como se utiliza en la presente se refiere a temperatura de alrededor de 25°C.

- Los compuestos de la fórmula (I) tal como se define en cualquiera de las modalidades 1) a 19) y sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden utilizar como medicamentos, por ejemplo en la forma de composiciones farmacéuticas para administración enteral (tal como especialmente oral) o administración parenteral (incluyendo aplicación tópica o inhalación).
15

- La producción de las composiciones farmacéuticas se puede efectuar de una manera que será familiar para cualquier persona experta en la técnica (véase por ejemplo Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 21a edición (2005), Parte 5, "Pharmaceutical Manufacturing" [publicado por Lippincott Williams & Wilkins]) al combinar
20 los compuestos de fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables, opcionalmente con otras sustancias terapéuticamente valiosas, en una forma de administración galénica junto con materiales portadores líquidos o sólidos terapéuticamente compatibles, adecuados, no-tóxicos, inertes y si se lo desea, adyuvantes farmacéuticamente usuales.

- La presente invención asimismo se refiere a un método para la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno mencionados en la presente que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto de fórmula (I) tal como se define en cualquiera de las modalidades 1) a 19).
25

- En una modalidad preferida de la invención, la cantidad administrada está comprendida entre 1 mg y 1000 mg por día, particularmente entre 5 mg y 500 mg por día, más particularmente entre 25 mg y 400 mg por día, especialmente entre 50 mg y 200 mg por día.
30

- Para evitar cualquier duda, si los compuestos se describen como útiles para la prevención o tratamiento de ciertas enfermedades, tales compuestos son igualmente adecuados para su uso en la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de dichas enfermedades.

- Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la prevención o el tratamiento tal como se describe a continuación en un paciente que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto de fórmula (I) tal como se define en cualquiera de las modalidades 1) a 19) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
35

- Los compuestos de la fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1) a 19), o sus sales farmacéuticamente aceptables, se pueden utilizar para la preparación de un medicamento y son adecuados para la prevención y/o tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en trastornos/enfermedades alérgicas/inmunes crónicas y agudas, que comprende asma, asma alérgica, asma eosinofílica, asma grave, rinitis, rinitis alérgica, angioedema, alergia al veneno de insectos, alergias a medicamentos, sinusitis alérgica, nefritis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial, alergia a los alimentos, trastornos de mastocitos sistémicos, choque anafiláctico, urticaria, eccema, colitis ulcerosa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad inflamatoria del intestino y la artritis reumatoide; enfermedades relacionadas con eosinófilos que comprenden vasculitis de vasos pequeños, como el síndrome de Churg-Strauss, la granulomatosis de Wegener, poliangeítis microscópica (y subconjuntos de órganos específicos de este último), síndromes hipereosinofílicos como la neumonía eosinofílica, la esofagitis eosinofílica, esofagitis por reflujo, endocarditis eosinofílica (endocarditis de Loeffler), síndrome eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, foliculitis pustulosa eosinofílica (enfermedad de Ofuji), úlceras eosinofílicas, hiperplasia angioliñoide con eosinofilia (ALHE), celulitis eosinofílica (síndrome de Wells), leucemia eosinofílica crónica y el síndrome DRESS (erupción cutánea con eosinofilia y síntomas sistémicos); y las enfermedades relacionadas con los basófilos, que comprende la leucemia basófila y leucocitosis basófila.
40
45
50

- En otra modalidad, los compuestos de la fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1) a 19), o sus sales farmacéuticamente aceptables, se pueden utilizar para la preparación de un medicamento y son adecuados para la prevención y/o tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en poliposis nasal, enfermedad de Still (artritis juvenil idiopática sistémica) y fibrosis quística.
55

- En una modalidad preferida, los compuestos de la fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1) a 19), o sus sales farmacéuticamente aceptables, se pueden utilizar para la preparación de un medicamento y son adecuados para la prevención y/o tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en asma, asma alérgica, asma eosinofílica, asma grave, rinitis alérgica, angioedema, alergia al veneno de insectos, alergias a medicamentos, sinusitis alérgica, nefritis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, alergia a los alimentos, trastornos de mastocitos sistémicos, choque anafiláctico, urticaria y eccema.
60

En otra modalidad preferida, los compuestos de la fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1) a 19), o sus sales farmacéuticamente aceptables, se pueden utilizar para la preparación de un medicamento y son

adecuados para la prevención y/o tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en enfermedades relacionadas con los eosinófilos que comprenden vasculitis de vasos pequeños, como el síndrome de Churg-Strauss, la granulomatosis de Wegener, poliangeítis microscópica (y subconjuntos de órganos específicos de este último), síndromes hipereosinofílicos como la neumonía eosinofílica, la esofagitis eosinofílica, esofagitis por reflujo, endocarditis eosinofílica (endocarditis de Loeffler), síndrome eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, foliculitis pustulosa eosinofílica (enfermedad de Ofuji), úlceras eosinofílicas, hiperplasia angioloide con eosinofilia (ALHE), celulitis eosinofílica (síndrome de Wells), leucemia eosinofílica crónica y síndrome DRESS (erupción cutánea con eosinofilia y síntomas sistémicos).

En aún otra modalidad preferida, los compuestos de la fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1) a 19), o sus sales farmacéuticamente aceptable, se pueden utilizar para la preparación de un medicamento y son adecuados para la prevención y / o tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en enfermedades relacionadas con los basófilos, que comprende la leucemia basófila y leucocitosis basófila.

En una modalidad más preferida, los compuestos de la fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1) a 19), o sus sales farmacéuticamente aceptables, se pueden utilizar para la preparación de un medicamento y son adecuados para la prevención y / o tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en asma, asma eosinofílica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, poliposis nasal, alergia alimentaria (alergia a los alimentos en particular mediada por IgE), urticaria (urticaria crónica en particular), la esofagitis eosinofílica, síndrome de Churg Strauss, síndrome hipereosinofílico, neumonía eosinofílica (neumonía eosinofílica crónica sobre todo), síndrome DRESS, enfermedad de Still, la EPOC y la fibrosis quística (y especialmente asma, asma eosinofílica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, alergia alimentaria mediada por IgE, urticaria crónica, esofagitis eosinofílica y el síndrome de Churg Strauss).

La invención asimismo se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1) a 19) para la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento y/o profilaxis de las enfermedades antes mencionadas.

La presente invención asimismo se refiere a sales farmacéuticamente aceptables y a composiciones farmacéuticas y formulaciones de compuestos de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1) a 19).

Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención contiene al menos un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1) a 19) (o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma) como el ingrediente activo y opcionalmente portadores y/o diluyentes y/o adyuvantes.

Cabe entender que cualquier referencia a un compuesto de fórmula (I), (I_{ST1}) o (I_{ST2}) en el presente texto se refiere asimismo a las sales (y especialmente las sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos, como siendo adecuadas y convenientes. Las preferencias indicadas para los compuestos de la fórmula (I) naturalmente aplican *mutatis mutandis* a los compuestos de la fórmula (I_{ST1}) y a los compuestos de la fórmula (I_{ST2}) así como también a las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la fórmula (I), de fórmula (I_{ST1}) o de fórmula (I_{ST2}). Lo mismo se aplica a estos compuestos como medicamentos, a las composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos como principios activos o a los usos de estos compuestos para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades de acuerdo con la presente invención.

Tal como se mencionó anteriormente, los compuestos de fórmula (I) modulan como antagonistas de la activación PGD2 del receptor CRTH2. El efecto biológico de dichos compuestos se puede someter a ensayo en una variedad de ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. La capacidad de los compuestos de la fórmula (I) para ligarse al receptor de CRTH2 puede medirse mediante métodos similares a los descritos en la literatura (Arimura A. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, 298(2), 411–419; y Sawyer N. *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* 2002, 137, 1163–1172, respectivamente) y por los ensayos descritos a continuación en la parte experimental.

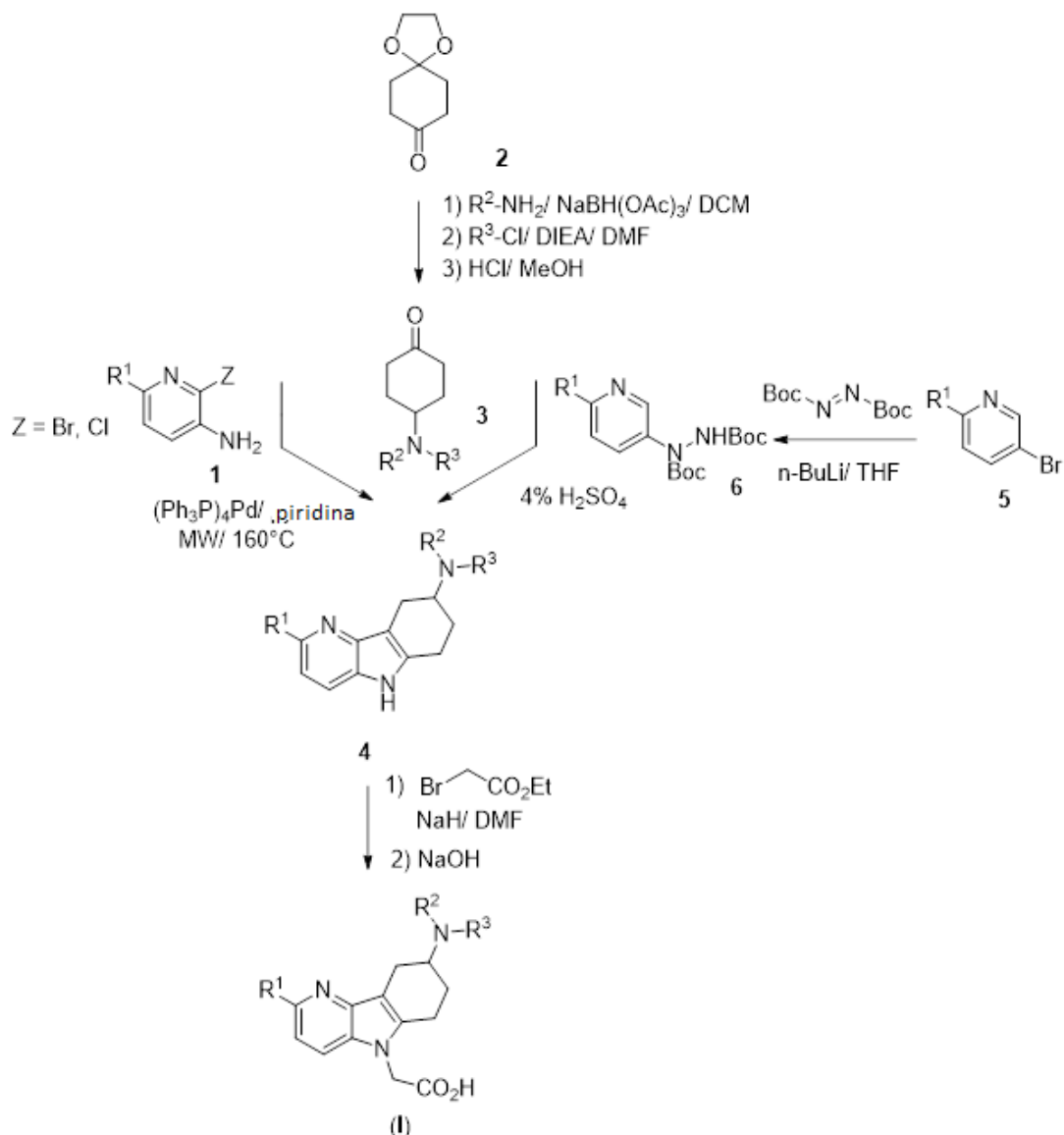
Un aspecto adicional de la invención es un proceso para la preparación de compuestos de fórmula (I). Los compuestos de acuerdo con la fórmula (I) de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con la secuencia de reacciones descritas en los esquemas a continuación en donde R1 y R2 son como se definen para la fórmula (I). Otras abreviaturas usadas se definen en la sección experimental.

En general, todas las transformaciones químicas se pueden llevar a cabo de acuerdo con metodologías estándar bien conocidas tal como se describe en la literatura, o tal como se describe en los siguientes procedimientos. Los compuestos obtenidos también se pueden convertir en sales farmacéuticamente aceptables de los mismos de una manera conocida *per se*.

Los compuestos de la fórmula (I) se pueden preparar a partir del derivado azaindol (4) que a su vez se puede sintetizar mediante irradiación MW del derivado 3-amino-2-bromo-piridina o 3-amino-2-cloro-piridina respectivo (1) con un derivado 4-(5-cloro-pirimidin-2-il)amino-ciclohexanona (3) en la presencia de un catalizador tal como Pd(Ph₃P)₄ en piridina o mediante reacción del derivado de hidrazina protegido con Boc (6) con un derivado 4-(5-cloro-pirimidin-2-il)amino-ciclohexanona (3) en la presencia de un ácido tal como ácido sulfúrico. El derivado de hidrazina protegido con Boc (6) se puede preparar mediante la reacción del derivado bromo-piridina respectivo (5) con di-ter-butil-aza-dicarboxilato en la presencia de una base tal como butil-litio en un disolvente aprótico tal como THF.

El derivado 4-(5-cloro-pirimidin-2-il)amino-ciclohexanona (3) se puede preparar mediante una aminación reductora disponible comercialmente 1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-ona (2) con la amina deseada R²-NH₂ en la presencia de un agente reductor tal como NaBH(OAc)₃ en un disolvente aprótico tal como DCM, seguido de una reacción con 2,5-dicloropirimidina (R³-Cl) en la presencia de una base tal como DIEA en un disolvente aprótico tal

como DMF y desprotección acetal bajo condiciones ácidas tal como HCl en metanol. La alquilación del derivado de azaindol (**4**) con bromoacetato de etilo en presencia de una base tal como NaH en un disolvente aprótico tal como DMF seguido por saponificación con una base tal como NaOH para suministrar los compuestos de la fórmula (I).



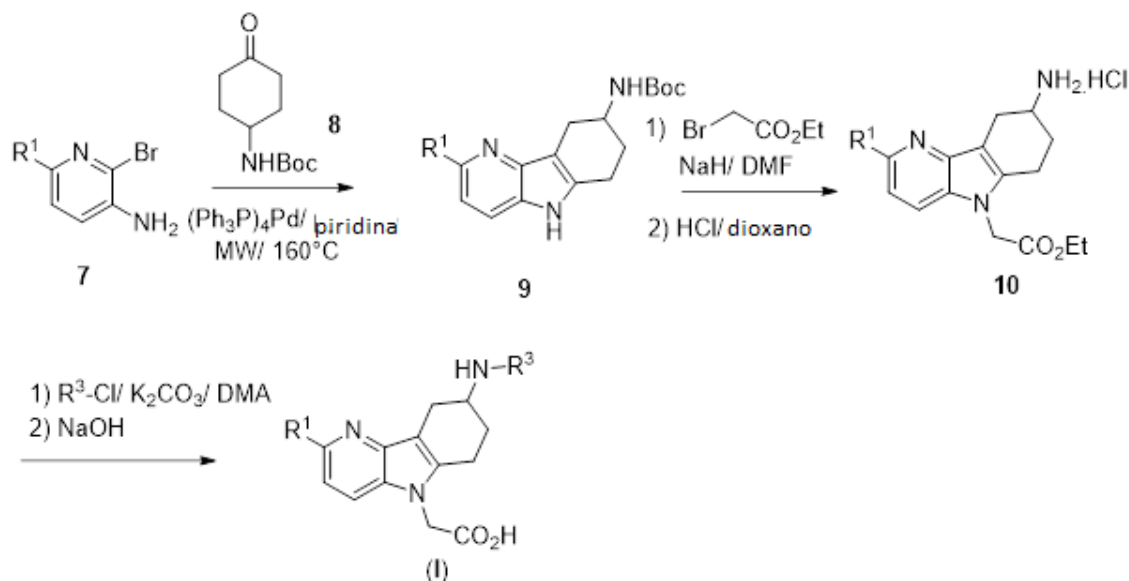
5 *Esquema 1:* Ruta sintética general para la preparación de compuestos de fórmula (I)

(R^3 representa 5-cloro-pirimidin-2-ilo)

De manera alternativa, los compuestos de fórmula (I) en donde R^2 representa hidrógeno se pueden preparar a partir de derivado azaindol respectivo (**9**) que a su vez se puede sintetizar mediante irradiación MW de la 3-amino-2-bromo-piridina (**7**) respectiva con *ter*-butil (4-oxociclohexil)carbamato disponible comercialmente (**8**) en la presencia de un catalizador tal como $(Ph_3P)_4$ en piridina.

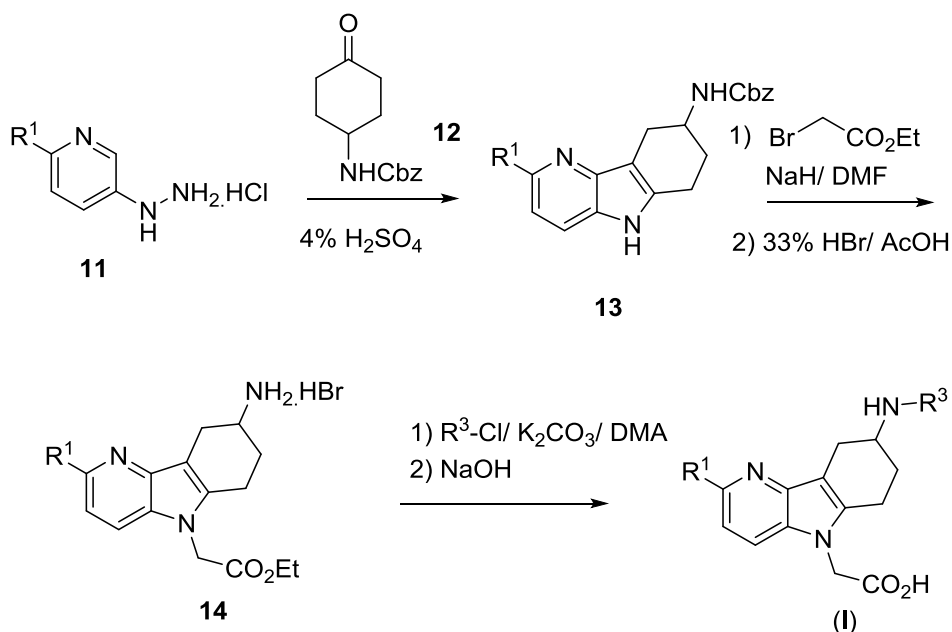
10 La alquilación del derivado de azaindol (**9**) con etil bromoacetato en la presencia de una base tal como NaH en un disolvente aprótico tal como DMF seguido de desprotección de Boc con un ácido tal como HCl en dioxano proporciona el etil éster del ácido acético azaindol deseado (**10**). La reacción de amina (**10**) con 2,5-dicloropirimidina (R^3-Cl) en la presencia de una base tal como K_2CO_3 en un disolvente aprótico tal como DMA seguido de saponificación con una base tal como NaOH proporcionó los compuestos de la fórmula (I).

15



Esquema 2: Ruta sintética general para la preparación de compuestos de fórmula (I) en donde R^2 representa hidrógeno (R^3 representa 5-cloro-pirimidin-2-ilo)

Compuestos de fórmula (I) en donde R^2 representa hidrógeno también se pueden preparar a partir del derivado de azaindol respectivo (**13**) que a su vez se puede sintetizar por reacción del correspondiente derivado de hidrocloreuro de hidrazina piridina disponible comercialmente (**11**) con el bencil (4-oxociclohexil) carbamato comercialmente disponible (**12**) en presencia de un ácido tal como ácido sulfúrico. La alquilación del derivado de azaindol (**13**) con etil bromoacetato en la presencia de una base tal como NaH en un disolvente aprótico tal como DMF seguido de desprotección de Cbz con un ácido tal como HBr en ácido acético proporciona el éster etílico del ácido acético azaindol deseado (**14**). Reacción de amina (**14**) con 2,5-dicloropirimidina (R^3-Cl) en la presencia de una base tal como K_2CO_3 en un disolvente aprótico tal como DMA seguido de saponificación con una base tal como NaOH proporcionó los compuestos de la fórmula (I).



Esquema 3: Ruta sintética general para la preparación de compuestos de fórmula (I) en donde R^2 representa hidrógeno (R^3 representa 5-cloro-pirimidin-2-ilo)

Siempre que se obtienen los compuestos de la fórmula (I) o un compuesto intermedio de estructuras **4**, **9** y **13** en la forma de mezclas de enantiómeros, los enantiómeros se pueden separar utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica: por ejemplo mediante la formación y separación de sales diastereoméricas o mediante HPLC

sobre una fase estacionaria quiral tal como una columna Regis Whelk-O1(R,R) (10 µm), una columna Daicel ChiralCel OD-H (5–10 µm), o una columna Daicel ChiralPak IA (10 µm) o AD-H (5 µm). La condición típica de HPLC quiral es una mezcla isocrática del eluyente A (EtOH, en presencia o ausencia de una amina tal como TEA y/o DEA) y eluyente B (hexano), a un caudal de 0.8 a 150 mL/min.

5 Sección experimental:

Abreviaturas (tal como se utilizan en la presente):

	Ac	Acetilo
	aq.	Acuoso
	APC	Alofococianina
10	Boc	ter-butoxicarbonilo
	BSA	Albúmina de suero bovino
	Cbz	Benciloxicarbonilo
	d	Doblete
	DCM	Diclorometano
15	DEA	Dietilamina
	DIEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
	DMF	Dimetilformamida
	DMA	Dimetilacetamida
	DMSO	Dimetilsulfóxido
20	dpm	Desintegraciones por minuto
	EA	Acetato de etilo
	EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
	eq	Equivalente
	Et	Etilo
25	FC	Cromatografía instantánea
	h	Hora(s)
	HEPES	ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetanosulfónico
	HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
	HSA	Albúmina de suero humano
30	L	Litro(s)
	LC-MS	Cromatografía líquida-espectroscopía de masas
	m	Multiplete
	MeCN	Acetonitrilo
	MeOH	Metanol
35	min	Minuto(s)
	Me	Metilo
	MS	Espectroscopía de masas
	MW	Microondas
	N	Normalidad de solución
40	PBS	Salina amortiguada con fosfato
	PEI	Polietilenimina
	PGD ₂	Prostaglandina D ₂
	Ph	Fenilo
	RT	Temperatura ambiente
45	s	Segundo(s)
	sat	Saturado
	tBu	ter-butilo
	TEA	Trietilamina
	TFA	Ácido trifluoroacético
50	THF	Tetrahidrofurano
	t _R	Tiempo de retención
	Tris	Amortiguador Tris-(hidroximetil)aminometano

Química

Observaciones generales

55 Todos los disolventes y todos los reactivos se utilizan tal como se obtienen de fuentes comerciales al menos que se indique lo contrario.

Las temperaturas se indican en grados centígrados (°C). Al menos que se especifique de otro modo, las reacciones se llevan a cabo a temperatura ambiente (RT).

En la mezclas, las relaciones de partes de solvente o eluyente en forma líquida se proporcionan como relaciones de

volumen (v / v), a menos que se indique lo contrario.

Condiciones de HPLC analítica tal como se utiliza en los siguientes ejemplos:

Los análisis HPLC/MS se llevan a cabo en un sistema Agilent 1100, equipado con una bomba binaria Dionex P580, un detector de matriz de fotodiodos Dionex PDA-100 y un espectrómetro de masas Finnigan AQA.

5 Los tiempos de retención LC se obtuvieron utilizando la siguiente condición de elución:

- HPLC analítica en una columna Zorbax® SB-AQ (4.6x50 mm, 3.5 µm, Agilent); Gradiente lineal de agua/ 0.04% TFA (A) y MeCN (B) de 5% a 95% B durante 1.5 min; caudal 4.5 ml/min, detección a 210 nm.

10 Las purificaciones de HPLC/MS preparativas (condiciones ácidas) se llevan a cabo en un sistema de bomba de gradiente de alta presión binario Gilson 333/334 con un inyector automático Gilson 215 y colector de fracciones, un detector Dionex UVD340U DAD, un detector polymerlabs PL-ELS 1000 ELS y un detector Thermo MSQ Plus MS, utilizando una columna Waters Atlantis T3 (10 µm, 30 x 75 mm), con un gradiente lineal de agua/ 0.5% de ácido fórmico (B) y MeCN (A) comenzando con 80/20 a 5/95 (B)/(A) durante 5 min.; caudal 75 ml/min.

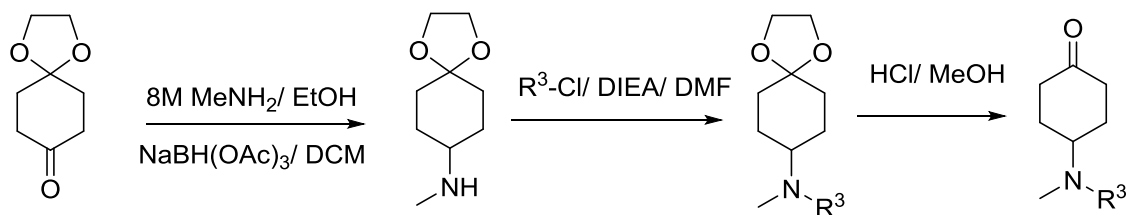
15 Se llevan a cabo purificaciones preparativas HPLC/MS (condiciones básicas) en un sistema de bomba de gradiente de alta presión binario Gilson 333/334 con un automuestrador Gilson 215 y un colector de fracciones, un detector Dionex UVD340U DAD, un detector polymerlabs PL-ELS 1000 ELS y un detector Thermo MSQ Plus MS, utilizando una columna Waters XBridge C18 (10 µm, 30 x 75 mm), con un gradiente lineal de agua / 0,5% 25% NH₄OH (B) y MeCN (A) comenzando desde 80/20 hasta 5/95 (B)/(A) durante 5 min.; caudal 75 ml/min.

20 Se lleva a cabo HPLC analítica sobre una fase estacionaria quiral en una columna Daicel ChiralPak AD-H (4.6 X 250 mm, 5 µm) o una columna Chiralpak AY-H (4.6 X 250 mm, 5 µm). Las condiciones típicas de HPLC quiral son una mezcla isocrática de 30% de heptano + 0.05% de DEA y 70% de EtOH + 0.05% de DEA, a un caudal de 0.8 mL/min., detección en 210 nm (HPLC-1 quiral) o una mezcla isocrática de 40% de heptano y 60% de EtOH + 0.1% de TFA, a un caudal de 1.0 mL/min., detección en 210 nm (HPLC-2 quiral) o una mezcla isocrática de 50% de heptano + 0.05% DEA y 50% de EtOH + 0.05% de DEA, a un caudal de 0.8 mL/min., detección en 210 nm (HPLC-3 quiral), o una mezcla isocrática de 20% de heptano y 80% de EtOH + 0.1% de TFA, a un caudal de 0.8 mL/min., detección en 210 nm (HPLC-4 quiral).

30 Se llevan a cabo HPLC preparativas sobre una fase estacionaria quiral en una columna Daicel ChiralPak AD-H (20 X 250 mm, 5 µm). Las condiciones típicas de HPLC quiral son una mezcla isocrática de 50% de EtOH y 50% de heptano, a un caudal de 16 mL/min., detección en 210 nm (HPLC quiral-5) o una mezcla isocrática de 50% EtOH + 0.05% de DEA y 50% de heptano, a un caudal de 34 mL/min, detección en 210 nm (HPLC quiral-6) o una mezcla isocrática de 50% EtOH + 0.1% DEA y 50% de heptano, a un caudal de 16 mL/min, detección en 210 nm (HPLC quiral-7).

A.1 Síntesis de derivados de ácido de 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético

A.1.1. Síntesis de 4-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)ciclohexanona



35

(R³ representa 5-cloro-pirimidin-2-ilo)

40 A una solución de 1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-ona (1eq) comercialmente disponible en DCM (20 ml/ 10 mmol), se agregaron de manera sucesiva a 0°C metil amina (8M en EtOH, 1eq) y NaBH(OAc)₃ (1.5 eq). La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta RT y se agitó durante 2h. La mezcla de reacción se vertió en una solución saturada de NaHCO₃, la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se evaporó al vacío para proporcionar N-metil-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-amina que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional. A una solución de N-metil-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-8-amina (1 eq) en DMF (10.5 ml/ 6 mmol) se agregaron DIEA (2 eq) y 2,5-dicloropirimidina (1.05 eq). La mezcla de reacción se agitó a 90°C durante toda la noche. Luego de enfriar hasta RT, se agregó acetato de isopropilo. La mezcla se lavó con agua y 10% ácido cítrico ac. La capa orgánica se lavó con salmuera se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío. El producto bruto se purificó por FC (0 a 15% EA en heptano) para proporcionar el compuesto intermedio deseado como un sólido.

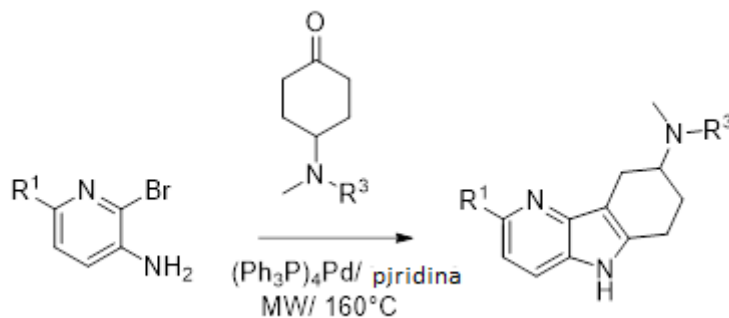
45

Se agitó una solución de este compuesto intermedio (1eq) en una mezcla de 2N HCl (2.7 ml/ 5 mmol) y MeOH (2.7 ml/ 5 mmol) a temperatura ambiente durante toda la noche. La capa acuosa se extrajo con DCM. La capa orgánica

se lavó con salmuera se secó (MgSO_4) y se concentró al vacío. El residuo bruto se purificó por FC (0 a 17% EA en heptano) para proporcionar el título del compuesto como un sólido.

LC-MS: $t_R = 0,78$ min; $[\text{M}+\text{H}]^+ = 240,2$

5 **A.1.2. Síntesis de derivados de *N*-(5-cloropirimidin-2-il)-*N*-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-pirido[3,2-*b*]indol-8-amina (método A)**



(R^3 representa 5-cloro-pirimidin-2-ilo)

Procedimiento general:

10 A una solución del derivado 3-amino-2-bromo-piridina respectivo (1eq), se mezclaron en un frasco 4-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)ciclohexanona (1.2eq), $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$ (0.05eq) y piridina (8.17 eq). El frasco se irradió mediante MW a 160°C durante 1h. Se agregó nuevamente $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$ (0.025eq) y la mezcla de reacción se irradió nuevamente mediante MW a 160°C durante 30min. Luego de enfriar hasta RT, la mezcla de reacción se combinó con agua y se extrajo dos veces con DCM. Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO_4), filtraron y se concentraron in-vacuo.

15 El residuo se purificó mediante HPLC prep. (condiciones básicas) para proporcionar el producto deseado.

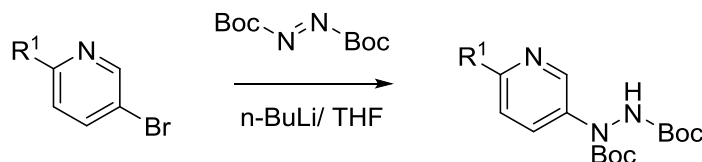
Los siguientes derivados *N*-(5-cloropirimidin-2-il)-*N*-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-pirido[3,2-*b*]indol-8-amina se sintetizaron de acuerdo con el procedimiento general anterior.

Tabla 1

R^1	Nombre	$[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z	t_R [min] LC-MS
Me	<i>N</i> -(5-cloropirimidin-2-il)- <i>N</i> ,2-dimetil-6,7,8,9-tetrahidro-5 <i>H</i> -pirido[3,2- <i>b</i>]indol-8-amina	328.11	0.66
F	<i>N</i> -(5-cloropirimidin-2-il)-2-fluoro- <i>N</i> -metil-6,7,8,9-tetrahidro-5 <i>H</i> -pirido[3,2- <i>b</i>]indol-8-amina	332.09	0.87
CF_3	<i>N</i> -(5-cloropirimidin-2-il)- <i>N</i> -metil-2-(trifluorometil)-6,7,8,9-tetrahidro-5 <i>H</i> -pirido[3,2- <i>b</i>]indol-8-amina	381.99	0.94

20 **A.1.3. Síntesis de derivados de *N*-(5-cloropirimidin-2-il)-*N*-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-pirido[3,2-*b*]indol-8-amina (método B)**

A.1.3.1 Síntesis de di-ter-butil 1-(piridin-3-il)hidrazina-1,2-dicarboxilato



Procedimiento general:

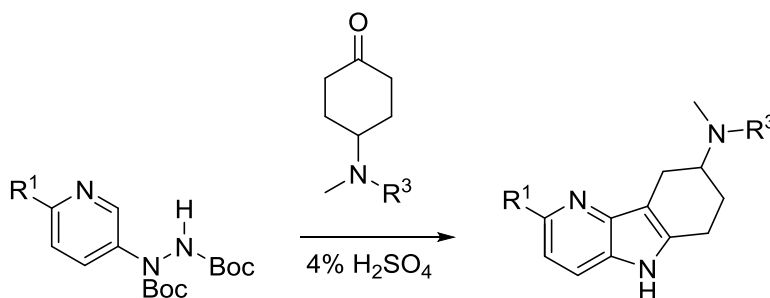
25 Se agregó por goteo una solución de butillitio 1.6M en hexano (1,1 eq) a -40°C a una solución del derivado de 3-bromo-piridina respectivo (1 eq) en éter dietílico (14.5 eq) bajo atmósfera de N_2 . La mezcla de reacción se agitó durante 20min a -40°C y luego se agregó por goteo una solución de di-ter-butil-azodicarboxilato (1.1 eq) en THF (18.5 eq). La mezcla de reacción se agitó a -40°C durante 30min y se dejó enfriar hasta RT durante 30min. Se agregó agua seguido de DCM. La fase orgánica se separó y se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró al vacío.

El residuo se purificó mediante FC (EA/n-heptano: 2/8) para proporcionar el producto deseado.

Los siguientes derivados de di-ter-butil 1-(piridin-3-il)hidrazina-1,2-dicarboxilato se sintetizaron de acuerdo con el procedimiento general anterior

R ¹	Nombre	[M+H] ⁺ m/z	t _R [min] LC-MS
OMe	di-ter-butil 1-(6-metoxipiridin-3-il)hidrazina-1,2-dicarboxilato	340,16	0.88
F	di-ter-butil 1-(6-fluoropiridin-3-il)hidrazina-1,2-dicarboxilato	328,12	0.88

5 A.1.3.2 Síntesis de derivados de *N*-(5-cloropirimidin-2-il)-*N*-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-pirido[3,2-*b*]indol-8-amina



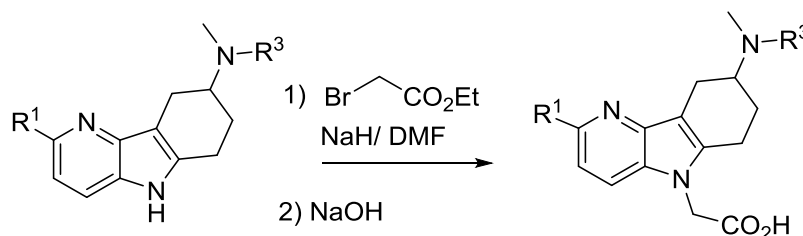
(R³ representa 5-cloro-pirimidin-2-il)

Procedimiento general:

- 10 Se agitó una solución del derivado di-ter-butil 1-(piridin-3-il)hidrazina-1,2-dicarboxilato respectivo (1eq), 4-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)ciclohexanona (1eq) en 4% H₂SO₄ acuoso (10 mL/0.04 mol) hasta 100°C durante 2h30. Luego de enfriar hasta RT, la mezcla de reacción se combinó con NaHCO₃ sat. y se extrajo con EA. Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO₄), filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante HPLC prep. (condiciones básicas) para proporcionar el producto deseado.
- 15 Los siguientes derivados de *N*-(5-cloropirimidin-2-il)-*N*-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-pirido[3,2-*b*]indol-8-amina se sintetizaron de acuerdo con el procedimiento general anterior.

R ¹	Nombre	[M+H] ⁺ m/z	t _R [min] LC-MS
OMe	<i>N</i> -(5-cloropirimidin-2-il)-2-metoxi- <i>N</i> -metil-6,7,8,9-tetrahidro-5 <i>H</i> -pirido[3,2- <i>b</i>]indol-8-amina	344,12	0,67
F	<i>N</i> -(5-cloropirimidin-2-il)-2-fluoro- <i>N</i> -metil-6,7,8,9-tetrahidro-5 <i>H</i> -pirido[3,2- <i>b</i>]indol-8-amina	332,03	0,87

A.1.3. Síntesis de derivados de ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-pirido[3,2-*b*]indol-5-il)acético



20

(R³ representa 5-cloro-pirimidin-2-ilo)

Procedimiento general:

- 25 A una solución fría (0°C) del derivado adecuado de *N*-(5-cloropirimidin-2-il)-*N*-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-pirido[3,2-*b*]indol-8-amina (1eq) en DMF seco (0.2 mL/0.08 mmol), se agregó NaH (1.1eq, dispersión al 60% en aceite mineral). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 10 min, se agregó bromoacetato de etilo (1.1eq) y la mezcla de reacción se dejó enfriar hasta RT y se agitó durante toda la noche. Se agregó a la mezcla de reacción

agua (0.07 mL) y 30% NaOH aq. (0.07 ml). La mezcla de reacción se agitó a 50°C durante 2h y luego se agregó 37% de HCl aq. (0.07 mL). Los productos se purificaron inmediatamente por HPLC prep. (condiciones básicas) para proporcionar el compuesto final.

Preparación de ejemplos

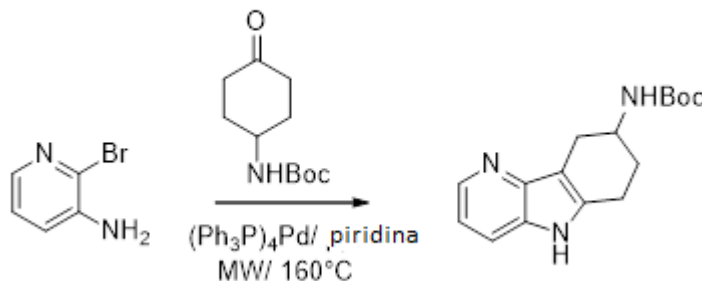
- 5 Se sintetizaron los siguientes derivados de ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético de acuerdo con el procedimiento general anterior.

Tabla 2

Ejemplo	Nombre	[M+H] ⁺ m/z	t _R [min.] LC-MS
1	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	386.01	0.64
2	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	390.02	0.83
3	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	402.05	0.66
4	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-(trifluorometil)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	440.0	0.89

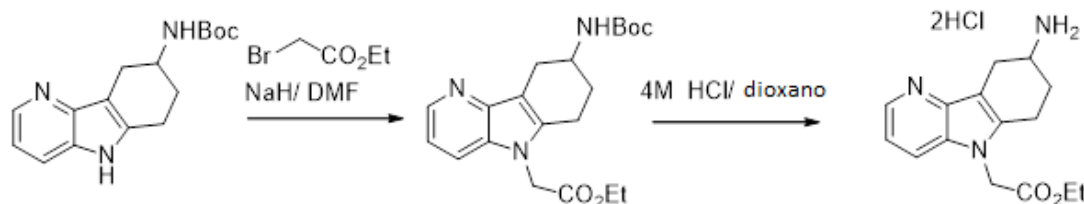
10 A.2 Síntesis de derivados de ácido 2-(8-(5-cloropirimidin-2-ilamino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético

A.2.1 Síntesis de *ter*-butil (6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-8-il)carbamato



15 Se mezcló una solución de 3-amino-2-bromopiridina (1.0 g, 5.78 mmol, 1.0 eq), *ter*-butil (4-oxociclohexil)carbamato (1.48 g, 6.94 mmol, 1.2 eq), (Ph₃P)₄Pd (334 mg, 0.289 mmol, 0.05 eq) y piridina (3.8 ml, 47.2 mmol, 8.17 eq) en un frasco. El frasco se calentó mediante MW hasta 160°C durante 2h30. La mezcla de reacción se unió con una solución NaHCO₃ sat y se extrajo con EA. La capa orgánica se lavó con agua, salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se trituroó con éter dietílico y se recogió por filtración para proporcionar el producto del título como un sólido de color beige.
LC-MS: t_R = 0.59 min; [M+H]⁺ = 288.27.

20 A.2.2 Síntesis de etil 2-(8-amino-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato (sal clorhidrato)



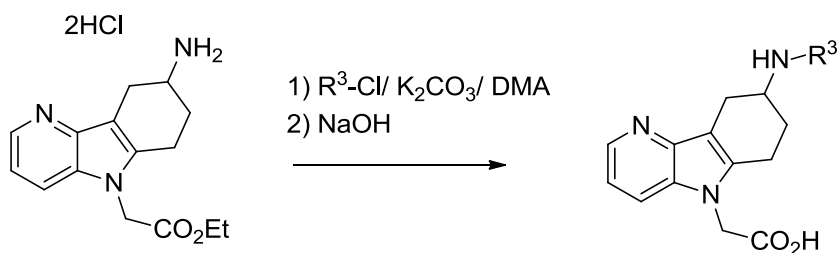
A una solución fría (0°C) de *ter*-butil (6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-pirido[3,2-*b*]indol-8-il)carbamato (403 mg, 1.4 mmol, 1.0eq) en DMF seco (3.8 mL) se agregó NaH (37 mg, 1.54 mmol, 1.1eq, dispersión al 60% en aceite mineral). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 10 min, se agregó bromoacetato de etilo (0.16 mL, 1.4 mmol, 1.0eq) y la mezcla de reacción se dejó enfriar hasta RT y se agitó durante toda la noche. Se agregó agua y la mezcla de reacción se extrajo dos veces con EA. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua, salmuera, se secaron (MgSO₄), filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante prep-HPLC (condiciones ácidas) para proporcionar el producto deseado.

LC-MS: $t_R = 0.67$ min; $[M+H]^+ = 373.96$.

Al etilo 2-(8-((*ter*-butoxicarbonil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-pirido[3,2-*b*]indol-5-il)acetato (23 mg, 0.06 mmol, 1.0 eq) se agregó HCl en dioxano (4M, 0.21 ml, 0.85 mmol, 14 eq) y la mezcla de reacción se agitó hasta RT durante 1h. La mezcla de reacción luego se concentró al vacío para proporcionar el producto del título que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

LC-MS: $t_R = 0.37$ min; $[M+H]^+ = 273.91$

15 A.2.3 Síntesis de derivados de ácido 2-(8-(5-cloropirimidin-2-ilamino)-6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-pirido[3,2-*b*]indol-5-il)acético



(R³ representa 5-cloro-pirimidin-2-il)

Procedimiento general:

Se agitó una mezcla de etil 2-(8-amino-6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-pirido[3,2-*b*]indol-5-il)acetato (sal clorhidrato) (0.06 mmol), 2,5-dicloropirimidina (0.06 mmol) y K₂CO₃ (0.25 mmol) en DMA (0,4 mL) hasta 80°C durante 12h. Luego de enfriar hasta RT, se agregó (0.06 mL) y 30% NaOH aq. (0.06 mL) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó a 50°C durante 2h y luego se agregó 37% de HCl aq. (0.06 mL). Los productos se purificaron inmediatamente por HPLC HPLC prep. (condiciones básicas) para proporcionar el compuesto final como un sólido blanco.

25 Preparación de ejemplos

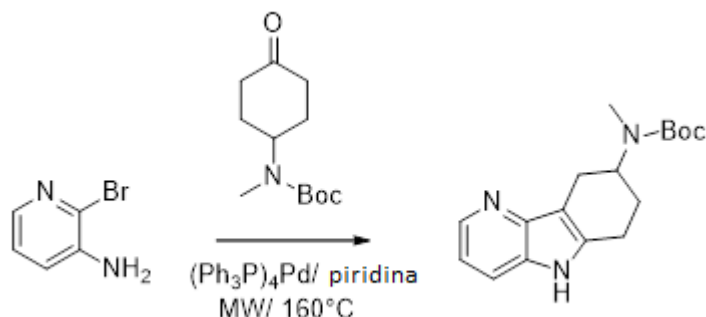
Los siguientes derivados de ácido 2-(8-(5-cloropirimidin-2-ilamino)-6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-pirido[3,2-*b*]indol-5-il)acético se sintetizaron de acuerdo con el procedimiento general anterior.

Tabla 3

Ejemplo	Nombre	$[M+H]^+$ m/z	t_R [min.] LC-MS
5	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5 <i>H</i> -pirido[3,2- <i>b</i>]indol-5-il)acético	358.1	0.56

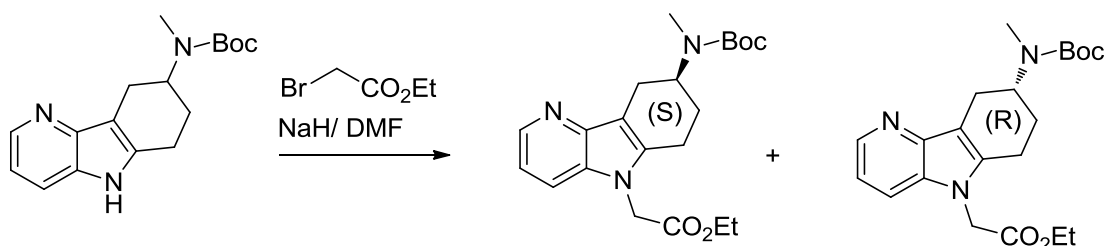
A.3 Síntesis de (S)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético

A.3.1 Síntesis de *ter*-butil metil(6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-8-il)carbamato



- 5 En un frasco, se disolvieron 3-amino-2-bromopiridina (2.0 g, 11.6 mmol, 1.0 eq), 4-(N-Boc-N-metilamino)ciclohexanona (3.15 g, 13.9 mmol, 1.2 eq) y $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$ (668 mg, 0.58 mmol, 0.05 eq) en piridina (7.6 ml). El frasco se calentó mediante irradiación MW a 160°C durante 60 min. La mezcla de reacción se vertió en agua (9.5 mL) y el sólido resultante se recogió por filtración, se secó, trituró en dietil éter y se recogió de nuevo por filtración para dar el título del compuesto.
- 10 LC-MS: $t_R = 0,63$ min; $[\text{M}+\text{H}]^+ = 302,15$.

A.3.2 Síntesis de (S)-etil 2-(8-((*ter*-butoxicarbonil)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato y (R)-etil 2-(8-((*ter*-butoxicarbonil)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato

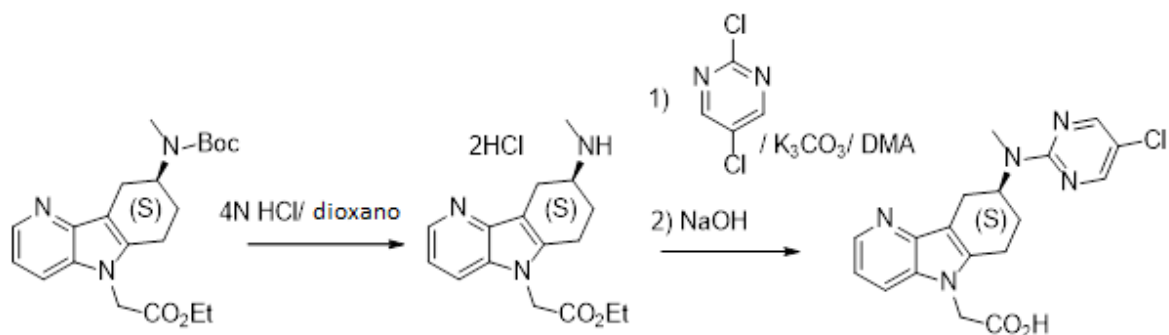


- 15 A una solución (0°C) de *ter*-butil metil(6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-8-il)carbamato (1.37 g, 4.56 mmol) en DMF seco (12.5 mL), se agregó NaH (120 mg, 5.02 mmol, dispersión del 60% en aceite mineral). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 10 min, se agregó bromoacetato de etilo (0.52 mL, 4.56 mmol) y la mezcla de reacción se dejó enfriar hasta RT y se agitó durante toda la noche. Se agregó agua y el precipitado se recogió por filtración y se lavó con agua. El sólido bruto se purificó mediante FC (8% MeOH en DCM) seguido de trituración con dietil éter para proporcionar el producto deseado como un racemato.
- 20 LC-MS: $t_R = 0,7$ min./ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 388,50$

Los dos enantiómeros del producto obtenido se separaron mediante HPLC preparativa quiral (HPLC quiral-5):

- (R)-etil 2-(8-((*ter*-butoxicarbonil)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato (487 mg, 28%): HPLC (HPLC quiral-1): $t_R = 6.03$ min;
- 25 (S)-etil 2-(8-((*ter*-butoxicarbonil)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato (491 mg, 28%): HPLC (HPLC quiral-1): $t_R = 7.36$ min.

A.3.3. Síntesis de (S)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético (ejemplo 6)



A (S)-etil 2-(8-((*ter*-butoxicarbonil)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-*b*]indol-5-il)acetato (100 mg, 0.258 mmol) se agregó 4N HCl en dioxano (0.895 mL). La mezcla de reacción se agitó hasta RT durante 1h y se concentró para proporcionar el producto deseado como una sal clorhidrato que se utilizó en el siguiente paso sin purificación adicional.

LC-MS: t_R : 0.38 min./ [M+H]⁺: 288.25.

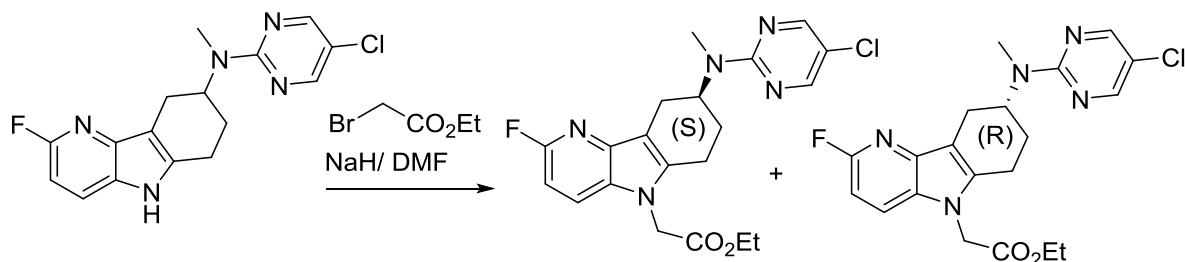
A una solución de este compuesto intermedio (93 mg, 0.26 mmol) en DMA (1.8 mL) se agregaron 2,5-dicloropirimidinea (38.5 mg, 0.26 mmol) y K₂CO₃ (143 mg, 1.03 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 20h. Luego de enfriar hasta RT, se agregó agua (0.26 mL) y 30% de NaOH aq. (0.26 mL) y la mezcla de reacción se agitó a 50°C durante 2h. Luego se agregó 37% de HCl aq. (0.26 mL) y el precipitado resultante se filtró y purificó mediante HPLC prep (condiciones básicas) para proporcionar el título del compuesto como un sólido blanco.

LC-MS: t_R : 0.61 min./ [M+H]⁺: 372.18.

HPLC (HPLC-2 quiral): t_R : 7.87 min.

A.4 Síntesis de (S)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-*b*]indol-5-il)acético

A.4.1 Síntesis de (S)-etil 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-*b*]indol-5-il)acetato y (R)-etil 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-*b*]indol-5-il)acetato



Se agregó cuidadosamente NaH 95% (56.1 mg, 2.22 mmol, 1.2 eq) a una solución fría (0°C) de N-(5-cloropirimidin-2-il)-2-fluoro-N-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-*b*]indol-8-amina (614 mg, 1.85 mmol, 1 eq) en DMF (6.36 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 20 min. Se agregó bromoacetato de etilo (0.233 mL, 2.04 mmol, 1.1 eq) en forma lenta y la mezcla de reacción se dejó enfriar hasta RT y se agitó durante 2h. La mezcla de reacción se disolvió en EA y se lavó con una solución saturada de NaHCO₃. El extracto orgánico se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró vacuo. El residuo se purificó mediante FC (n-heptano a n-heptano/EA: 7/3) para proporcionar el producto deseado como un racemato.

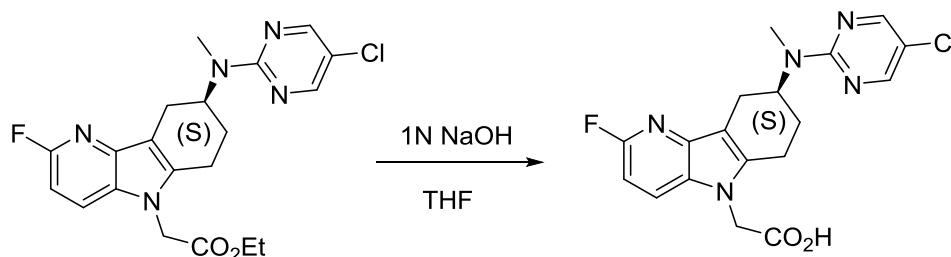
LC-MS: t_R : 0.96 min./ [M+H]⁺: 418.01

Los dos enantiómeros del producto obtenido se separaron mediante HPLC preparativa quiral (HPLC quiral-6):

(S)-etil 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-*b*]indol-5-il)acetato (271 mg, 35%): HPLC (HPLC-3 quiral): t_R : 6.22 min;

(R)-etil 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-*b*]indol-5-il)acetato (273 mg, 35%): HPLC (HPLC-3 quiral): t_R : 7.66 min.

A.4.2 Síntesis de (S)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético (ejemplo 7)



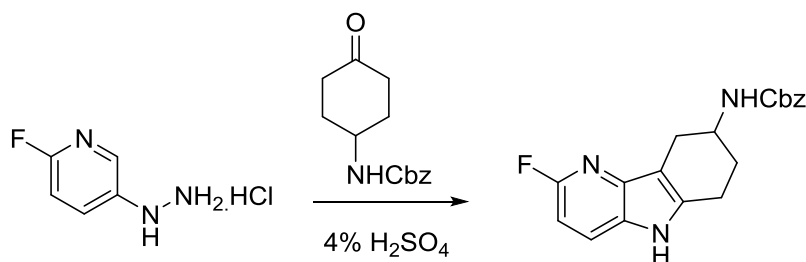
A una solución de (S)-etil 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato (271 mg, 0.649 mmol, 1 eq) en THF (10 mL) se agregó NaOH 1N (10 mL, 10 mmol, 15.42 eq) a RT. La mezcla de reacción se agitó hasta RT durante 1h. La mezcla de reacción se concentró al vacío únicamente para eliminar THF. Luego se acidificó con HCl conc. a pH=5-6 y se agitó hasta RT. La suspensión se extrajo con EtOAc (4x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar el compuesto del título como un sólido beige (255 mg, 100%).

LC-MS: t_R: 0.82 min./ [M+H]⁺: 390.12

HPLC (HPLC-2 quiral): t_R: 4.96 min.

A.5 Síntesis de ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético

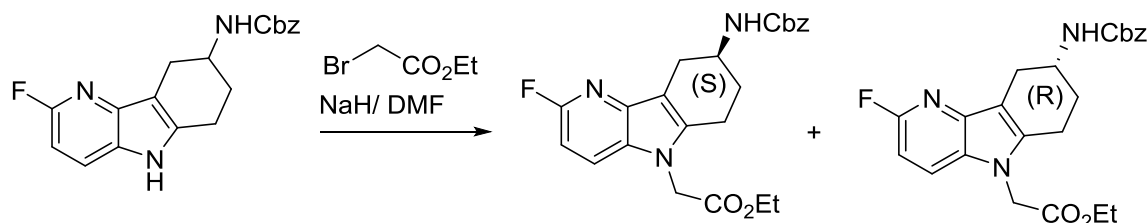
A.5.1 Síntesis de bencil (2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-8-il)carbamato



Se agitó una solución de 2-fluoro-5-clorhidrato de hidrazinilpiridina (200 mg, 1 eq), bencil (4-oxociclohexil)carbamato (296 mg, 1eq) H₂SO₄ acuosa al 4% (3.3 mL) se agitó a 80°C durante 16h. Luego de enfriar hasta RT, la mezcla de reacción se combinó con NaHCO₃ sat. y se extrajo con EA. Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO₄), filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar el producto deseado (305 mg, 77%) que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

LC-MS: t_R: 0.82 min./ [M+H]⁺: 340.13.

A.5.2 Síntesis de (S)-etil-2-(8-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato y (R)-etil-2-(8-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato



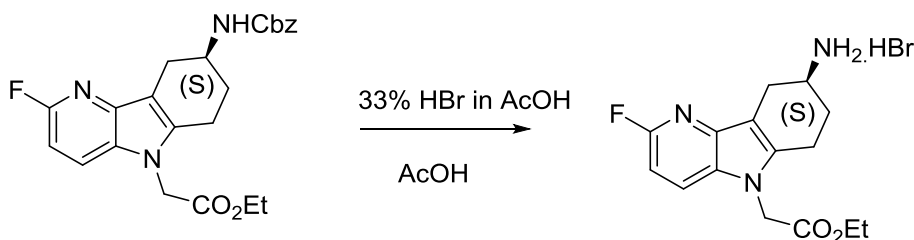
Se agregó NaH 95% (20.8 mg, 2.22 mmol, 1.2 eq) cuidadosamente a una solución fría (0°C) de bencil (2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-8-il)carbamato (295 mg, 1.85 mmol, 1 eq) en DMF (6.36 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 10 min. Se agregó bromoacetato de etilo (0.086 mL, 1.1 eq) lentamente y la mezcla de reacción se dejó enfriar hasta RT y se agitó durante 4h30. Se agregó NaH 95% adicional (3.5 mg, 0.2 eq) seguido de bromoacetato de etilo (0.016 mL, 0.2 eq). La reacción se agitó hasta RT durante 16h. La mezcla de reacción luego se disolvió en EA y se lavó con una solución saturada de NaHCO₃. El extracto orgánico se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante FC (n-heptano a n-heptano/EA: 1/1) para proporcionar el producto deseado como un racemato (150mg, 50%).

LC-MS: t_R: 0.9 min./ [M+H]⁺: 426.15

Los dos enantiómeros del producto obtenido se separaron mediante HPLC preparativa quiral (HPLC quiral-7):

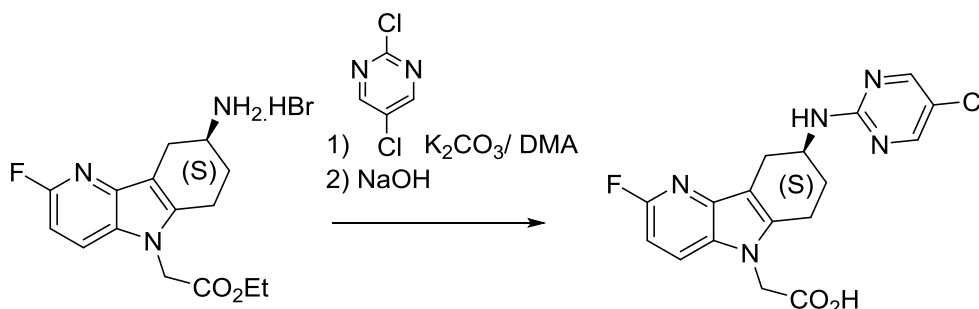
(R)-etil-2-(8-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato
(67 mg, 23%): HPLC (HPLC-3 quiral): t_R : 5.96 min;
(S)-etil-2-(8-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato
5 (86 mg, 29%): HPLC (HPLC-3 quiral): t_R : 7.27 min.

A.5.3 Síntesis de (S)-etil-2-(8-amino-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato (sal de hidrobromuro)



10 A una solución de (S)-etil-2-(8-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato (42 mg, 1eq) en ácido acético (1 mL) se agregó HBr 33% en ácido acético (0.22 mL). La mezcla de reacción se agitó hasta RT durante 1h y se concentró al vacío para proporcionar el producto del título (94 mg, 100%) que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional
LC-MS: t_R : 0.55 min./ $[M+H]^+$: 292.12

15 A.5.4 Síntesis de (S)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético (ejemplo 8)

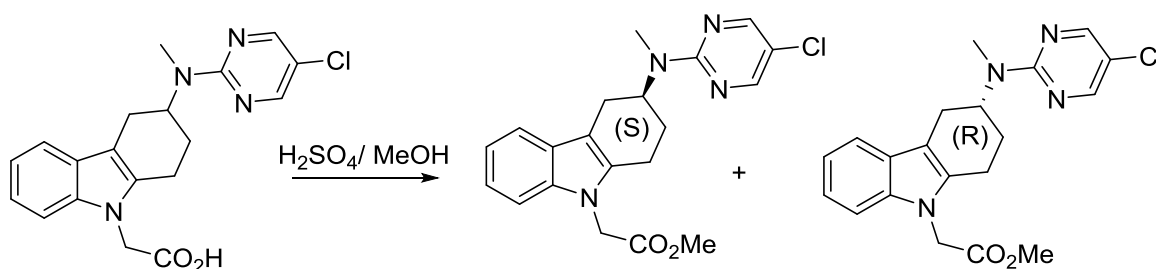


20 A una solución de (S)-etil-2-(8-amino-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato (sal de hidrobromuro) (48 mg, 1eq) en DMA (1 mL) se agregaron de manera sucesiva 2,5-dicloropirimidina (15.6 mg, 1.4 eq) y K_2CO_3 anhidro (41.5 mg, 4 eq). La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 16h. Luego de enfriar hasta RT, la reacción se vertió en agua y se extrajo con EA. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre $MgSO_4$, filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante HPLC prep (condiciones ácidas) para proporcionar el compuesto intermedio etil éster (9 mg, 30%).
LC-MS: t_R : 0.88 min./ $[M+H]^+$: 404,05

25 Se agregó a una solución del compuesto intermedio etil éster (9 mg, 1 eq) en THF (0.5 mL) 1N NaOH (0.5 mL). La mezcla de reacción se agitó hasta RT durante 1h, se acidificó hasta pH 1-2 con 1N HCl y se extrajo con EA. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre $MgSO_4$, filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar el compuesto del título como un sólido beige (6 mg, 24%).
LC-MS: t_R : 0.75 min./ $[M+H]^+$: 376.18
HPLC (HPLC-4 quiral): t_R : 6.6 min.

30 A.6 Síntesis de ácido (S)-2-(3-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-3,4-dihidro-1H-carbazol-9(2H)-il)acético (ejemplo de referencia 1)

A.6.1 Síntesis de (S)-metil 2-(3-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-1,2,3,4-tetrahidro-9H-carbazol-9-il)acetato y (R)-metil 2-(3-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-1,2,3,4-tetrahidro-9H-carbazol-9-il)acetato

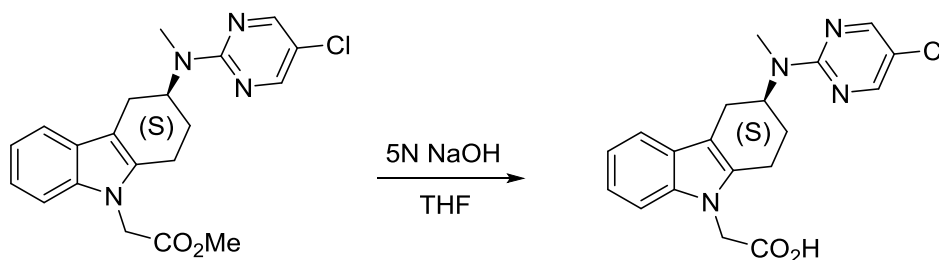


A una solución de ácido 2-(3-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-3,4-dihidro-1H-carbazol-9(2H)-il)acético (que se describe como ejemplo 53 en el documento WO 2011/117798) (100 mg, 0.27 mmol) en MeOH (1 ml), se agregó H₂SO₄ concentrado (0.2 eq). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 2h. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se combinó con una solución saturada NaHCO₃ y se extrajo con EA. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto deseado como un racemato (86 mg, 83%).
 LC-MS: t_R: 1.01 min./ [M+H]⁺: 385.10

Los dos enantiómeros del producto obtenido se separaron mediante HPLC preparativa quiral (HPLC quiral-5):

- (S)-metil 2-(3-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-1,2,3,4-tetrahidro-9H-carbazol-9-il)acetato (22 mg, 21%): HPLC (HPLC quiral-1): t_R: 7.21 min; y
 (R)-metil 2-(3-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-1,2,3,4-tetrahidro-9H-carbazol-9-il)acetato (21 mg, 20%): HPLC (HPLC quiral-1): t_R: 9.06 min.

A.6.2 Síntesis de ácido (S)-2-(3-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-3,4-dihidro-1H-carbazol-9(2H)-il)acético (ejemplo de referencia 1)



A una solución de (S)-metil 2-(3-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-1,2,3,4-tetrahidro-9H-carbazol-9-il)acetato (22 mg) en THF (1 ml) se agregó 5N NaOH (10 eq). La mezcla de reacción se agitó hasta RT durante 2h, se acidificó con HCl concentrado y se agitó hasta RT. El precipitado resultante se filtró y se secó para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco.
 LC-MS: t_R: 0.93 min./ [M+H]⁺: 371.13.
 HPLC (HPLC-2 quiral): t_R: 4.59 min.

Ensayos biológicos:

Preparación de membranas del receptor hCRTH2 y ensayo de desplazamiento del radioligando:

- En primer lugar, las células recombinantes HEK293-hCRTH₂ se desprenden de las placas de cultivo en 5 ml de solución amortiguadora A/placa (amortiguador A: 5 mM Tris, 1 mM MgCl₂-6H₂O pH=7.4) utilizando una espátula de goma. Las células luego se transfirieron en tubos de centrifugación y se centrifugaron durante 5min a 400 g. El precipitado celular se resuspendió en la misma solución amortiguadora y los tubos se congelaron a -80°C. Las células se descongelaron y los fragmentos de membrana se generaron mediante homogeneización utilizando un homogeneizador polytron (30 segundos). Los fragmentos de membrana luego se centrifugaron a 3000 g durante 20 minutos y se resuspendieron en la solución amortiguadora C (Amortiguador C: 75 mM Tris, 25 mM MgCl₂, 250 mM sacarosa pH 7,4). Las alícuotas de los fragmentos de membrana se almacenaron a -20°C.

- El ensayo de unión se realizó en un volumen final de ensayo de 250 µl. En primer lugar, se colocó en cada pocillo 25 µl del compuesto de ensayo, previamente diluido en solución amortiguadora de unión (Amortiguador de unión: 50 mM Base- Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% de BSA (proteasa libre), NaN₃ al 0.01 %, 10mM MnCl₂ pH 7.0). Luego de agregar 75 µl de solución amortiguadora de unión, se agregó a cada pocillo 50 µl del radioligando ³H-PGD₂ (a 2.5 nM (220,000 dpm/pocillo) de ANAWA ART0662). El ensayo de unión comenzó agregando 100 µl de fragmentos de membrana CRTH₂, alcanzando una concentración final de 20µg/pocillo. Para la unión no específica, se agregó PGD₂ a la mezcla de reacción a la concentración final de 10 mM. Esta mezcla de ensayo se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente y luego se filtró a través de una placa de filtro GF/C de 96 pocillos que

fue remojada previamente durante 3 horas en 0.5% de polietilenimina (PEI). Los pocillos de filtro se lavaron tres veces con solución amortiguadora de unión helada. Luego, se agregó 40 µl de Microscint-40 (Packard) a cada pocillo y la radioactividad se cuantificó en un contador de centelleo Topcount (Packard).

Las actividades antagonistas de los compuestos ejemplificados se muestran en la tabla 4.

Ejemplo	Nombre	IC ₅₀ [nM]
1	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	1.9
2	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-i)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	3.1
3	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	13
4	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-(trifluorometil)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	10
5	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	19
6	(S)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	2.3
7	(S)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-i)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	5.6
8	ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	19

5

Ensayo de albúmina sérica humana por desplazamiento del radioligando (HAS):

El ensayo de desplazamiento del radioligando en presencia de albúmina de suero humano (HAS, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo tal como se describió anteriormente, con las siguientes modificaciones. Solución amortiguadora de unión-HSA: solución amortiguadora de unión + 0.5% albúmina Sigma de suero humano A1887 (en lugar de 0.1% BSA). Se colocó un volumen de 25 µl del título del compuesto, previamente diluido en solución amortiguadora de unión-HSA en cada pocillo. Después de agregar 75 µl de solución amortiguadora de unión-HSA, se agregaron 50 µl de ³H-PGD₂ (a 2.5 nM (220,000 dpm/pocillo) de ANAWA ART0662) a cada pocillo. El protocolo restante fue exactamente el mismo que el que se describió anteriormente.

10

Las actividades antagonistas de los compuestos ejemplificados se muestran en la tabla 5.

Ejemplo	Nombre	IC ₅₀ [nM]
1	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	3.9
2	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-i)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	2.3
3	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	13
4	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-(trifluorometil)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	16
5	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	22
6	(S)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	2.1
7	(S)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-i)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	5.0
8	ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	22

15

Ensayo de cambio de forma de eosinófilos con plasma humano

Después de obtener el consentimiento informado, las muestras de sangre fueron extraídas por venopunción de acuerdo con el protocolo aprobado por el comité de ética de Basilea, Suiza. Los leucocitos polimorfonucleares (que contienen eosinófilos, basófilos y neutrófilos) se aislaron utilizando el método Polymorphprep™ (Axis-Shield). En resumen, la sangre total anticoagulada se estratificó sobre un gradiente de Polymorphprep (densidad 1.113 g / ml) y se centrifugó a 500 g durante 30 min. La fracción de células polimorfonucleares se cosechó y disminuyó los eritrocitos lisis salina hipotónica.

20

Las células polimorfonucleares se resuspendieron en una solución amortiguadora de ensayo (1x PBS con Ca²⁺/Mg²⁺

suplementado con 0.1 % BSA, 10 mM HEPES y 10 mM de Glucosa, pH 7.4) a 5×10^6 células/ml y se tiñeron con anti-CD49d-APC ((APC=Alofocianina) durante 1 hora a RT. Los compuestos de ensayo, en diversas concentraciones, se preincubaron durante 10min en plasma humano (anticoagulado con un inhibidor de trombina). Luego, se agregó el plasma humano a las células polimorfonucleares a 50% del volumen de ensayo final con células polimorfonucleares a 4×10^6 células/ml. Después de la incubación durante 10 minutos a 37°C, las células polimorfonucleares se activaron durante 5 min a 37°C con el agregado de PGD₂ a una concentración final de 100 nM. Se detuvo la activación agregando 0.5 ml de paraformaldehído (1%).

Inmediatamente después de la fijación con paraformaldehído, se analizaron las muestras mediante un citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences) y las células objetivo se identificaron por sus características de dispersión frontal (FSC, por sus siglas en inglés) y dispersión lateral (SSC, por sus siglas en inglés). Se identificaron los eosinófilos mediante la señal anti-CD49d-APC y su perfil de dispersión lateral característico (SSC). Las respuestas al cambio de forma, indicativas de la activación de eosinófilos, se cuantificaron como el porcentaje de células con un aumento de la dispersión frontal.

Las actividades antagonistas de los compuestos ejemplificados se muestran en la tabla 6.

Ejemplo	Nombre	IC ₅₀ [nM]
1	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	71
2	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-i)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	4.2
3	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	148
4	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-(trifluorometil)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	417
5	ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	88
6	(S)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	5.8
7	(S)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-i)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	3.1
8	ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	32

Ensayo de movilización de calcio intracelular (FLIPR, por sus siglas en inglés):

Las células (HEK-293), que expresan de forma estable el receptor hCRTH2 receptor bajo el control del promotor de citomegalovirus a partir de una única inserción del vector de expresión pcDNA5 (Invitrogen), se cultivan hasta la confluencia en un medio DMEM (baja glucosa, Gibco) suplementado con 10% de suero de ternera fetal (Bioconcept, Suiza) bajo condiciones de cultivo de células de mamíferos estándar (37 ° C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂). Las células se desprenden de placas de cultivo utilizando un amortiguador de disociación (0.02% EDTA en PBS, Gibco) durante 1 min y se recogen por centrifugación a 200 g a rt durante 5 min en solución amortiguadora de ensayo (partes iguales de Hank's BSS (HBSS, Bioconcept) y DMEM (bajo nivel de glucosa, sin rojo fenol, Gibco)). Después de la incubación durante 45 min (37°C y 5% CO₂) en la presencia de 1 μM Fluo-4 y 0.04% Pluronic F-127 (ambas sondas moleculares) y 20 mM HEPES (Gibco) en amortiguador de ensayo, las células se lavan y se resuspenden en solución de amortiguador luego sembradas en placas de ensayo FLIPR de 384 pocillos (Greiner) a 50,000 células en 66 μl por pocillo y sedimentadas por centrifugación.

Las soluciones madre de los compuestos de ensayo se preparan a una concentración de 10 mM en DMSO y se diluyen en serie en solución amortiguadora a las concentraciones requeridas para las curvas de inhibición dosis respuesta. Se utiliza Prostaglandina D₂ (Biomol, Plymouth Meeting, PA) como un agonista.

Se maneja un instrumento FLIPR Tetra (Dispositivos Moleculares) de acuerdo con las instrucciones estándar del fabricante, agregando 4 μl del compuesto de ensayo disuelto a 10 mM en DMSO y diluido antes del experimento en solución amortiguadora de ensayo a fin de obtener la concentración final deseada. Luego se agrega 10 μl de prostaglandina 80 nM D₂ (Biomol, Plymouth Meeting, PA) en solución amortiguadora de ensayo, suplementada con 0.8% de albúmina de suero bovino (contenido de ácidos grasos <0.02%, Sigma), a fin de obtener una concentración final de 10 nM y 0.1%, respectivamente. Los cambios de fluorescencia se monitorean antes y después de la adición de compuestos de ensayo a $\lambda_{ex}=488$ nm y $\lambda_{em}=540$ nm. Los valores máximos de emisión sobre el nivel de base después de la adición de prostaglandina D₂ se exportan después de restar la línea base. Los valores se normalizaron a control de alto nivel (sin compuesto de ensayo añadido) después de restar el valor de la línea de base (no se agrega prostaglandina D₂). El programa XLfit 3.0 (IDBS) se utiliza para ajustar los datos a una curva de respuesta a la dosis de sitio único de la ecuación $(A+((B-A)/(1+((C/x)^D))))$ y para calcular los valores de IC₅₀.

Citotoxicidad in vitro en cultivos primarios de hepatocitos de rata

1. Métodos

1.1 Aislamiento y cultivo de hepatocitos de rata

Se narcotizaron ratas Wistar macho adultas con pentobarbital de sodio y los hepatocitos se aislaron de acuerdo con un procedimiento estándar, es decir, por perfusión in situ del hígado con una solución de colagenasa. La viabilidad de los hepatocitos purificados, comprobada mediante el método de exclusión del colorante azul de tripano fue mayor al 85%. Los hepatocitos aislados se resuspendieron en Medio E estándar Williams, sin rojo fenol, suplementado (WME sup.) con transferrina (100 µg/ml), triyodotironina (10 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml), hemisuccinato de hidrocortisona (13,36 µg/ml), glucagona (5 µg/ml), HEPES (10 mM), inosina (10 µg/ml), insulina (10 µg/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y penicilina (100 U/ml) y 10% suero bovino fetal (FBS). Las células se sembraron en placas de 24 pocillos recubiertas con colágeno a una densidad inicial de 2x10⁵ células / pocillo. Después de 4 h para la unión a las placas de cultivo, el medio se aspiró y reemplazó con WME sup fresco sin FBS que contiene los compuestos de ensayo y se incubaron durante 24 h a 37°C en una atmósfera de 95% de O₂ y 5% de CO₂. Para cada experimento, es decir, con cada lote de hepatocitos, se realizaron tratamientos con los compuestos de ensayo en cuadruplicado. Los cuatro controles (tratamiento con el vehículo solamente) también estuvieron presentes en cada placa de cultivo.

1.2 Exposición *In vitro* de los compuestos de ensayo

Las soluciones madre de los compuestos de ensayo se prepararon en DMSO unas pocas horas antes del inicio del tratamiento. Se agregaron diluciones adecuadas de estas soluciones madre al medio de cultivo justo antes del tratamiento a fin de proporcionar las concentraciones finales de 0, 3, 10, 30, 100 y 300 µM. La concentración final del vehículo DMSO fue del 1% (v/v).

1.3 Viabilidad de los cultivos celulares

1.3.1 Monitoreo de la morfología monocapa

La morfología de las monocapas de hepatocitos se controló por microscopía de luz después de 24 horas de exposición a los compuestos de ensayo. Los efectos relacionados con el tratamiento se describen de acuerdo a la siguiente clasificación:

0 No se observan alteraciones morfológicas luego del tratamiento cuando se compara con los cultivos de control

1–3 El tratamiento da lugar a cualquier cambio morfológico, por ejemplo granulación intracelular, vacuolización o muerte celular. Dependiendo de la severidad, se consideran estos cambios como leves (1), moderados (2) o fuertes (3).

K El tratamiento da lugar a células muertas al 100% y/o al desprendimiento completo de la monocapa produciendo un plato libre de células claras.

1.3.2 Fuga de lactato deshidrogenasa

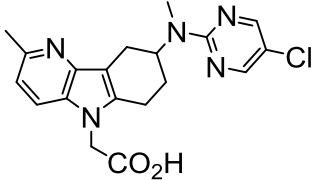
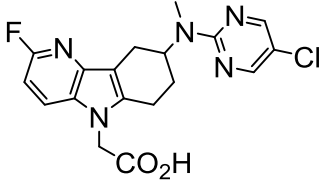
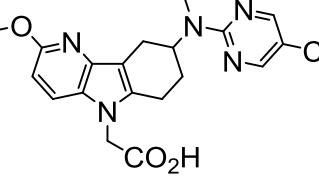
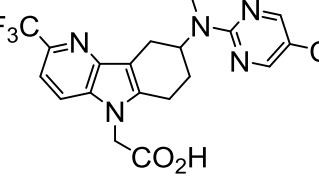
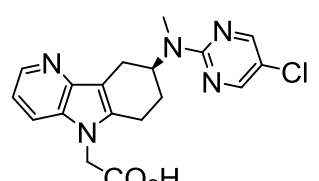
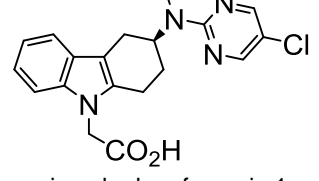
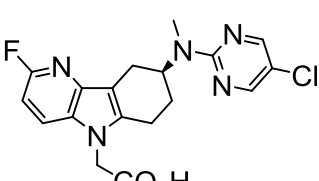
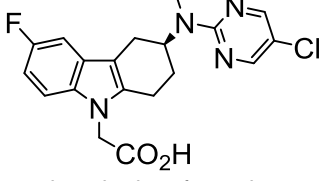
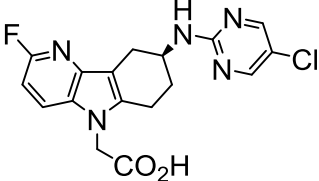
Después de un tratamiento de 24 h de los cultivos de hepatocito, las alícuotas del medio de cultivo se recogieron cuidadosamente y se utilizaron para el análisis de la actividad del lactato deshidrogenasa (LDH) mediante espectrofotometría utilizando el kit de detección de citotoxicidad LDH de Clontech (cat núm. 630117, Mountain View, CA, USA). Para cada experimento, se utilizaron cultivos adicionales para la determinación de la actividad LDH intracelular total en el inicio de tratamiento. Para este propósito, se lavaron 4 pocillos de cultivo celular por experimento con salina fría antes del inicio del tratamiento, se sonificó en medio fresco y el homogeneizado se analizó para la actividad total de LDH. Las actividades de las enzimas en el medio de cultivo se evaluaron y expresaron como porcentaje de la actividad total presente en los hepatocitos cultivados al inicio de los tratamientos.

2. Análisis de datos

Para cada compuesto se proporciona la concentración citotóxica más baja (LCC) y la concentración sin efecto (NoEC), sobre la base de la morfología celular y fuga de LDH después de 24 h de tratamiento. La LCC se define como la concentración más baja del compuesto de ensayo dando lugar a un efecto claro en los hepatocitos de rata en cultivo (clasificación morfología ≥ 2 o ≥ 2 aumento de 2 veces en la fuga de LDH). Un valor LCC de >300 µM indica la ausencia del efecto en ambos extremos en la concentración más alta de 300 µM. Los compuestos que presentaron solamente una leve citotoxicidad (morfología de clasificación aumento de 1 o < 2 veces en la fuga de LDH) a la concentración más alta del ensayo fueron marcados como "300s". NoEC se define como la concentración de ensayo más alta del compuesto que no tuvo efecto en los hepatocitos de rata de cultivo (morfología y fuga LDH).

3. Resultados

Tabla 7. Valores LCC de los compuestos del ejemplo

Ejemplo	LCC [μM]	NoEC [μM]	Ejemplo	LCC [μM]	NoEC [μM]
 ejemplo 1	>300	>300	 ejemplo 2	>300	>300
 ejemplo 3	300s	100	 ejemplo 4	300s	100
 ejemplo 6	>300	>300	 ejemplo de referencia 1 (S)-enantiómero del ejemplo 53 de WO 2011/117798)	300	30
 ejemplo 7	>300	>300	 ejemplo de referencia 2 (ejemplo 9 de WO 2011/117798)	300	30
 ejemplo 8	>300	>300			

Toxicidad hepática In-vivo:

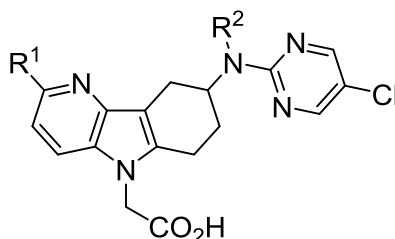
5 La toxicidad hepática de un compuesto de fórmula (I) se puede analizar mediante tratamiento oral en ratas y especies no roedoras de hasta 4 semanas utilizando tres diferentes dosis del compuesto. Se puede investigar la posible toxicidad en un período libre de tratamiento posterior (período de recuperación). Los niveles de dosis se seleccionan en base a los estudios de búsqueda de rango de dosis en las especies respectivas. Se espera que la dosis alta identifique la toxicidad orgánica cercana a la dosis tolerada máxima. La dosis media y baja se selecciona en base a las exposiciones humanas terapéuticas estimadas. La exposición del compuesto se mide en cada nivel de

10 dosis. Al final del tratamiento y al final de la recuperación se miden los biomarcadores hepáticos (tal como por ejemplo enzimas hepáticas, proteínas, triglicéridos o colesterol) en la sangre. Además, se examinan microscópicamente cortes de hígado teñido Hematoxilina-Eosina para evaluar directamente el daño al órgano posible. Las tinciones de cortes de hígado especializadas se pueden requerir a fin de caracterizar mejor los posibles hallazgos hepáticos.

15

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto of fórmula (I):



(I)

5 en la que

R¹ representa hidrógeno, alquilo (C1-4), fluoroalquilo (C1-2), alcoxi (C1-4), o halógeno; y
R² representa hidrógeno o metilo;
o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho un compuesto.

10 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que
R¹ representa hidrógeno, metilo, trifluorometilo, metoxi, o fluoro;
o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho un compuesto.

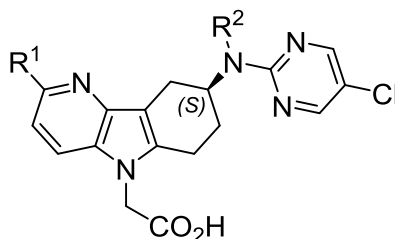
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que
R¹ representa hidrógeno, alquilo (C1-4), o alcoxi (C1-4);
o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho un compuesto.

15 4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que
R¹ representa hidrógeno, metilo, o metoxi;
o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho un compuesto.

20 5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que
R¹ representa fluoro;
o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho un compuesto.

6. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que
R² representa metilo;
o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho un compuesto.

25 7. Un compuesto of fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la configuración
absoluta del centro estereogénico es como se representa en la fórmula (I_{St1})

(I_{St1})

o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho un compuesto.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que se selecciona del grupo que consiste de:

30 ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;
ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético ;
ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;
ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;
35 ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético ;
y
ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-(trifluorometil)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;

o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho un compuesto.

9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que se selecciona del grupo que consiste en:

(S)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;

(S)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético ;

5 (S)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;

(S)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-i)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;

10 (S)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético; y

(S)-ácido 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-(trifluorometil)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;

o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho un compuesto.

15 10. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un portador farmacéuticamente aceptable.

11. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como un medicamento.

20 12. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en trastornos/enfermedades alérgicas/inmunes crónicas y agudas, que comprende asma, asma alérgica, asma eosinofílica, asma grave, rinitis, rinitis alérgica, angioedema, alergia al veneno de insectos, alergias a medicamentos, sinusitis alérgica, nefritis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial, alergia a los alimentos, trastornos de mastocitos sistémicos, choque anafiláctico, urticaria, eczema, colitis ulcerosa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad inflamatoria del intestino y la artritis reumatoide; enfermedades relacionadas con eosinófilos que comprenden vasculitis de vasos pequeños, como el síndrome de Churg-Strauss, la granulomatosis de Wegener, poliangeítis microscópica (y subconjuntos de órganos específicos de este último), síndromes hipereosinofílicos como la neumonía eosinofílica, la esofagitis eosinofílica, esofagitis por reflujo, endocarditis eosinofílica (endocarditis de Loeffler), síndrome eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, foliculitis pustulosa eosinofílica (enfermedad de Ofuji), úlceras eosinofílicas, hiperplasia angioliñoide con eosinofilia (ALHE), celulitis eosinofílica (síndrome de Wells), leucemia eosinofílica crónica y el síndrome DRESS (erupción cutánea con eosinofilia y síntomas sistémicos); y las enfermedades relacionadas con los basófilos, que comprende la leucemia basófila y leucocitosis basófila.

35 13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para utilizar en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en trastornos/enfermedades alérgicas/inmunes crónicas y agudas, que comprende asma, asma alérgica, asma eosinofílica, asma grave, rinitis, rinitis alérgica, angioedema, alergia al veneno de insectos, alergias a medicamentos, sinusitis alérgica, nefritis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial, alergia a los alimentos, trastornos de mastocitos sistémicos, choque anafiláctico, urticaria, eczema, colitis ulcerosa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad inflamatoria del intestino y la artritis reumatoide; enfermedades relacionadas con eosinófilos que comprenden vasculitis de vasos pequeños, como el síndrome de Churg-Strauss, la granulomatosis de Wegener, poliangeítis microscópica (y subconjuntos de órganos específicos de este último), síndromes hipereosinofílicos como la neumonía eosinofílica, la esofagitis eosinofílica, esofagitis por reflujo, endocarditis eosinofílica (endocarditis de Loeffler), síndrome eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, foliculitis pustulosa eosinofílica (enfermedad de Ofuji), úlceras eosinofílicas, hiperplasia angioliñoide con eosinofilia (ALHE), celulitis eosinofílica (síndrome de Wells), leucemia eosinofílica crónica y el síndrome DRESS (erupción cutánea con eosinofilia y síntomas sistémicos); y las enfermedades relacionadas con los basófilos, que comprende la leucemia basófila y leucocitosis basófila.

50 14. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de poliposis nasal.