



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 039**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99967417 .9**

86 Fecha de presentación : **16.12.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1146788**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.10.2001**

54 Título: **Derivados de amidas de indometacina destinadas a un uso antiangiogénico y/o antioncogénico.**

30 Prioridad: **07.01.1999 US 226693**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

73 Titular/es: **Vanderbilt University
Office of Technology Transfer, Suite 210
1207 17th Avenue South
Nashville, Tennessee 37212, US**

72 Inventor/es: **Kalgutkar, Amit, S. y
Marnett, Lawrence, J.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 288 039 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de amidas de indometacina destinadas a un uso antiangiogénico y/o antioncogénico.

5 Interés del gobierno

Esta investigación ha sido financiada por una beca de investigación de los National Institutes of Health (Beca de investigación n.º CA47479). Por lo tanto, el gobierno de Estados Unidos tiene ciertos derechos en la invención.

10 Campo técnico

La presente invención se refiere a derivados de amidas secundarias de indometacina (un AINE) según la reivindicación 1 que muestra inhibición de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) que supera de lejos la inhibición de la ciclooxigenasa 1 (COX-1) y, también, que sigue mostrando el efecto analgésico, antiinflamatorio y/o antipirético del compuesto, es decir, del AINE, y además también muestra inhibición del cáncer, es decir, un efecto antiangiogénico y/o antioncogénico en animales vertebrados de sangre caliente, incluidos los humanos.

Tabla de abreviaturas

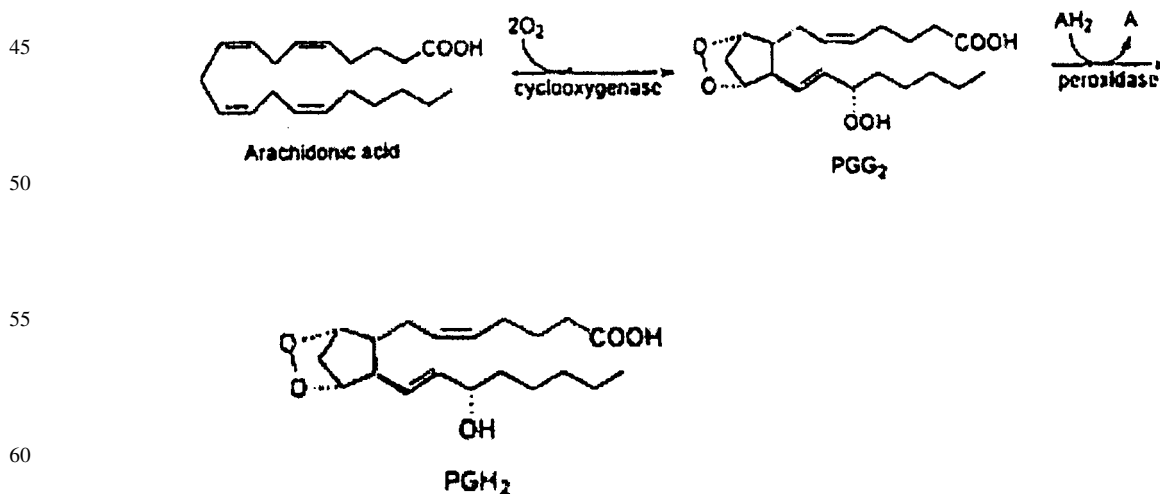
<u>Abreviaturas</u>	<u>Definiciones</u>
AINE	fármaco antiinflamatorio no esteroideo
COOH	parte del ácido carboxílico
COX	ciclooxigenasa
PGH ₂	prostaglandina H ₂
PGD ₂	prostaglandina D ₂
PGHS	
PER	peroxidasa
SAR	relación estructura-actividad
GI	gastrointestinal
IC ₅₀	concentración en macromoléculas de indometacina (o de un derivado de la indometacina) a la que se produce un 50% de inhibición de la actividad de la COX, cuanto más baja sea la IC ₅₀ , más potente es el fármaco
DMSO	dimetilsulfóxido
¹⁴ C-AA	[1- ¹⁴ C]-ácido araquidónico
HPLC	cromatografía líquida de rendimiento elevado
TLC	cromatografía de capa fina
mg	miligramos
kg	quilogramos
ml	mililitros
μm	micromol/litro
μl	microlitro
N	normal (cuando se utiliza junto con concentraciones ácidas)
RMN	Resonancia magnética nuclear
Et ₂ O	dietiléter
EtOAc	etilacetato
Et ₃ N	trietilamina

	AcOH	ácido acético
	CDCl ₃	cloroformo deuterado
5	ta	temperatura ambiente (aproximadamente 22°C)
	BOP-Cl	Cloruro bis(2-oxo-3-oxazolidinil) fosfónico (comercializado por Aldrich en Wisconsin), y véase también el artículo de la revista de Diago-Meseguer, Palomo-Coll, Fernandez- Lizarbe y Zugaza-Bilbao, "New Reagent for Activating Carboxyl Groups; Preparation and Reactions of N,N-Bis[2-oxo-3-oxazolidinyl]phosphorodiamidic Chloride", <i>Synthesis</i> (1980) págs. 547-551
10	pf	punto de fusión
	SBF	suero fetal bovino
15	DMEM	medio básico de Dulbecco modificado
	LPS	lipopolisacárido
20	PBS	solución salina tamponada con fosfato
	IFN-g	interferón gama

25 **Antecedentes de la invención**

Tal como se expone con más detalle a continuación, la enzima COX es en realidad dos enzimas, la COX 1 y la COX 2, que tienen distintas funciones fisiológicas y fisiopatológicas. Como es bien sabido, a dosis antiinflamatorias y/o analgésicas, la indometacina causa gran inhibición de la COX-1, que protege la membrana interna del estómago del ácido, además de una inhibición relativamente mínima de la COX-2, lo que provoca inflamación en respuesta a la lesión articular o a una enfermedad parecida a la artrosis. Por lo tanto, durante varios años el objetivo de los fabricantes de fármacos ha sido reducir a cero la inhibición de sólo la COX-2 para reducir o eliminar la irritación GI causada por la inhibición de la COX-1.

Más específicamente, tal como se comenta en Smith, Garavito y DeWitt, "D.L. prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 y -2", *J. Biol. Chem.*, (1996) Vol. 271, págs. 33.157-33.160, la etapa pertinente en la biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos implica la conversión del ácido araquidónico a PGG₂, que es catalizado por la acción secuencial de las actividades COX y PER de la PGHS, tal como se establece en el siguiente esquema de reacciones:



65 En DeWitt y Smith, "Primary Structure of Prostaglandin G/H Synthase from Sheep Vesicular Gland Determined from the Complementary DNA Sequence", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) Vol. 85, págs. 1.412-1.416; Yokoyama y Tanabe, "Cloning of Human Gene Encoding Prostaglandin Endoperoxide Synthase and Primary Structure of the Enzyme", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1989) Vol. 165, págs. 888-894; y Hla y Neilson, "Human Cyclooxyge-

nase-2-cDNA”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) Vol. 89, págs. 7.384-7.388, se describe que la actividad de la COX se origina a partir de dos enzimas distintas y reguladas independientemente, denominadas COX-1 y COX-2.

La COX-1 es la isoforma constitutiva y es principalmente responsable de la síntesis de prostaglandinas citoprotectoras en el tracto GI y de la síntesis de tromboxano, que desencadena la agregación plaquetaria en plaquetas sanguíneas. Véase, Allison, Howatson, Torrence, Lee y Russell, “Gastrointestinal Damage Associated with the use of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs”, *N. Engl. J. Med.* (1992) Vol. 327, págs. 749-754.

Por otro lado, la COX-2 es inducible y de vida corta. Su expresión viene estimulada por la respuesta a endotoxinas, citoquinas y mitógenos. Véase Kujubu, Fletcher, Varnum, Lim y Herschman, “TIS10, A Phorbol Ester Tumor Promoter Inducible mRNA from Swiss 3T3 Cells, Encodes a Novel Prostaglandin Synthase/Cyclooxygenase Homologue”, *J. Biol. Chem.* (1991) Vol. 266, págs. 12.866-12.872; Lee, Soyoola, Chanmugam, Hart, Sun, Zhong, Liou, Simmons y Hwang, “Selective Expression of Mitogen-Inducible Cyclooxygenase in Macrophages Stimulated with Lipopolysaccharide”, *J. Biol. Chem.* (1992) Vol. 267, págs. 25.934-25.938; y O’ Sullivan, Huggins, Jr., y Mccall, “Lipopolysaccharide-Induced Expression of Prostaglandin H Synthase-2 in Alveolar Macrophages is inhibited by Dexamethasone but not by Aspirin”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1993) Vol. 191, págs. 1.294-1.300.

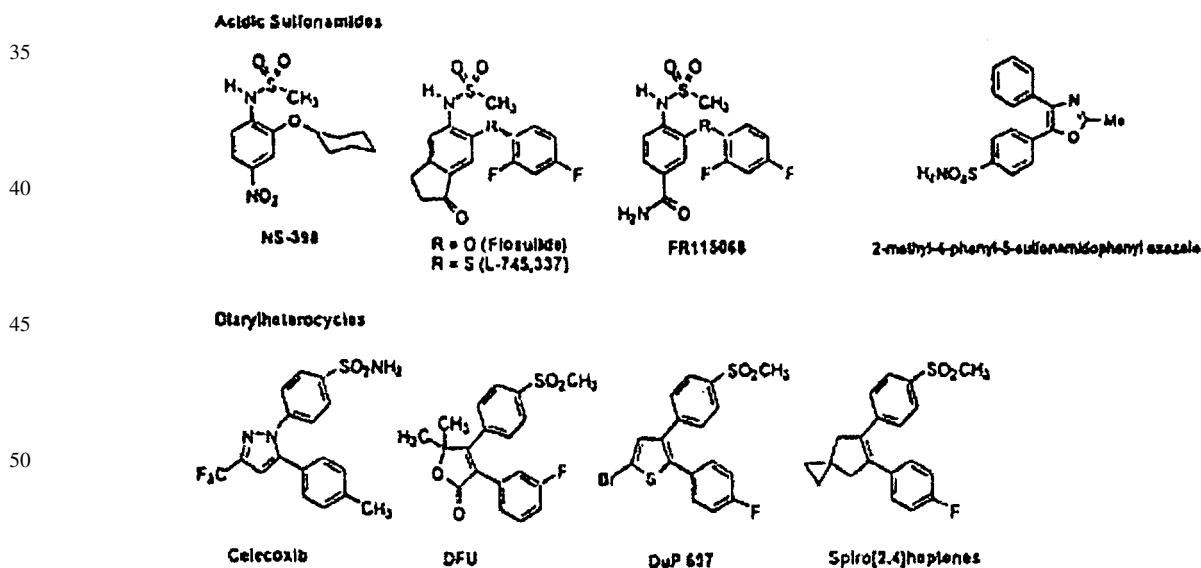
La COX-2 desempeña un papel importante en la biosíntesis de prostaglandinas en células inflamatorias (monocitos/macrófagos) y en el sistema nervioso central. Véase Masferrer, Zweifel, Manning, Hauser, Leahy, Smith, Isakson y Seibert, “Selective Inhibition of Inducible Cyclooxygenase-2 *in vivo* is Antiinflammatory and Nonulcerogenic”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) Vol. 91, págs. 3.228-3.232; Vane, Mitchell, Appleton, Tomlinson, Bishop-Bailey, Croxtall Y Willoughby, “Inducible Isoforms of Cyclooxygenase and Nitric Oxide Synthase in Inflammation”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) Vol. 91, págs. 2.046-2.050; Harada, Hatanaka, Saito, Majima, Ogino, Kawamura, Ohno, Yang, Katori y Yamamoto, “Detection of Inducible Prostaglandin H Synthase-2 in Cells in the Exudate of Rat Carrageenin-Induced Pleurisy”, *Biomed. Res.* (1994) Vol. 15, págs. 127-130; Katori, Harada, Hatanaka, Kawamura, Ohno, Aizawa y Yamamoto, “Induction of Prostaglandin H Synthase-2 in Rat Carrageenin-Induced Pleurisy and Effect of a Selective COX-2 Inhibitor”, *Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research* (1995) Vol. 23, págs. 345-347; y Kennedy, Chan, Culp y Cromlish, “Cloning and Expression of Rat Prostaglandin Endoperoxide Synthase (Cyclooxygenase-2) cDNA”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1994) Vol. 197, págs. 494-500.

Por lo tanto, la distribución tisular diferencial de la COX-1 y la COX-2 proporciona una base para el desarrollo de fármacos que son inhibidores selectivos de la COX-2 (es decir, la especificidad de inhibición de la COX-2 excede de lejos la inhibición de la COX-1) como los agentes antiinflamatorios, analgésicos y/o antipiréticos con minimización o ausencia de los riesgos GI y hematológicos de la inhibición de la COX-1 que afectan a la mayor parte de todos los AINE actualmente comercializados, la mayor parte de los cuales inhiben tanto la COX-1 como la COX-2, con especificidad para la inhibición de la COX-1 que excede enormemente la inhibición de la COX-2, aunque algunos tienen básicamente una actividad inhibitoria similar de la COX-1 y la COX-2. Véase, por ejemplo, Meade, Smith y DeWitt, “Differential Inhibition of Prostaglandin Endoperoxide Synthase (Cyclooxygenase) Isozymes by Aspirin and Other Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs”, *J. Biol. Chem.*, (1993) Vol. 268, págs. 6.610-6.614.

Los estudios SAR detallados han notificado dos clases estructurales generales de inhibidores selectivos de la COX-2 (la especificidad para la inhibición de la COX-2 excede de lejos la inhibición de la COX-1) que incluyen ciertas sulfonamidas ácidas y diarilheterocíclicos. Las actividades *in vivo* de estos inhibidores selectivos de la COX-2 validan el concepto de que la inhibición selectiva de la COX-2 es antiinflamatoria y no ulcerogénica, tal como se discute en los siguientes artículos de revistas. Gans, Galbraith, Roman, Haber, Kerr, Schmidt, Hewes y Ackerman, “Antiinflammatory and Safety Profile of DuP 697, a Novel Orally Effective Prostaglandin Synthesis Inhibitor”, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1990) Vol. 254, págs. 180-187; Penning, Talley, Bertenshaw, Carter, Collins, Docter, Graneto, Lee, Malecha, Miyashiro, Rogers, Rogier, Yu, Anderson, Burton, Cogburn, Gregory, Koboldt, Perkins, Seibert, Veenhuizen, Zhang e Isakson, “Synthesis and Biological Evaluation of the 1,5-Diarylpyrazole Class of Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Identification of 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, Celecoxib)”, *J. Med. Chem.* (1997) Vol. 40, págs. 1.347-1.365; Khanna, Weier, Yu, Xu, Koszyk, Collins, Koboldt, Veenhuizen, Perkins, Casler, Masferrer, Zhang, Gregory, Seibert e Isakson, “1,2-Diarylimidazoles as Potent Cyclooxygenase-2 Selective, and Orally Active Antiinflammatory Agents”, *J. Med. Chem.* (1997) Vol. 40, págs. 1.634-1.647; Khanna, Weier, Yu, Collins, Miyashiro, Koboldt, Veenhuizen, Curie, Siebert e Isakson, “1,2-Diarylpyrroles as Potent and Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2”, *J. Med. Chem.* (1997) Vol. 40, págs. 1.619-1.633; Tsuji, Nakamura, Konishi, Tojo, Ochi, Senoh y Matsuo, “Synthesis and Pharmacological Properties of 1,5-Diarylpyrazoles and Related Derivatives”, *Chem. Pharm. Bull.* (1997) Vol. 45, págs. 987-995; Riendeau, Percival, Boyce, Brideau, Charleson, Cromlish, Ethier, Evans, Falgoutyret, Ford-Hutchinson, Gordon, Greig, Gresser, Guay, Kargman, Léger, Mancini, O’Neill, Quellet, Rodger, Thérien, Wang, Webb, Wong, Xu, Young, Zamboni, Prasit y Chan, “Biochemical and Pharmacological Profile of a Tetrasubstituted Furanone as a Highly Selective COX-2 Inhibitor”, *Br. J. Pharmacol.* (1997) Vol. 121, págs. 105-117; Roy, Leblanc, Ball, Brideau, Chan, Chauret, Cromlish, Ethier, Gauthier, Gordon, Greig, Guay, Kargman, Lau, O’Neill, Silva, Thérien, Van Staden, Wong, Xu y Prasit, “A New Series of Selective COX-2 Inhibitors: 5,6-Diarylthiazolo[3,2-b][1,2,4]-triazoles”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (1997) Vol. 7, págs. 57-62; Thérien, Brideau, Chan, Cromlish, Gauthier, Gordon, Greig, Kargman, Lau, Leblanc, Li, O’Neill, Riendeau, Roy, Wang, Xu y Prasit, “Synthesis and Biological Evaluation of 5,6-Diarylimidazol[2.1-b]thiazoles as Selective COX-2 Inhibitors”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (1997) Vol. 7, págs. 47-52; Li, Norton, Reinhard, Anderson, Gregory, Isakson, Koboldt, Masferrer, Perkins, Seibert, Zhang, Zweifel y Reitz, “Novel Terphenyls as Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors and Orally Active Anti-Inflammatory Agents”, *J. Med. Chem.* (1996) Vol. 39, págs. 1.846-1.856; Li, Anderson, Burton, Cog-

burn, Collins, Garland, Gregory, Huang, Isakson, Koboldt, Logusch, Norton, Perkins, Reinhard, Seibert, Veenhuizen, Zhang y Reitz, "1,2-Diaryl cyclopentenes as Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors and Orally Active Anti-Inflammatory Agents", *J. Med. Chem.* (1995) Vol. 38, págs. 4.570-4.578; Reitz, Li, Norton, Reinhard, Huang, Penick, Collins y Garland, "Novel Diarylcyclopentenes are Selective Potent and Orally Active Cyclooxygenase Inhibitors", *Med. Chem. Res.* (1995) Vol. 5, págs. 351-363; Futaki, Yoshikawa, Hamasaka, Arai, Higuchi, Iizuka y Otomo, "NS-398, A Novel Nonsteroidal Antiinflammatory Drug with Potent Analgesic and Antipyretic Effects, which Causes Minimal Stomach Lesions", *Gen. Pharmacol.* (1993) Vol. 24, págs. 105-110; Wiesenberg-Boetcher, Schweizer, Green, Muller, Maerki y Pfeilschifter, "The Pharmacological Profile of CGP 28238, A Novel Highly Potent Anti-Inflammatory Compound", *Drugs Exptl Clin Res.* (1989) Vol. XV, págs. 501-509; Futaki, Takahashi, Yokoyama, Arai, Higuchi y Otomo, "NS-398, A New Anti-Inflammatory Agent, Selectively Inhibits Prostaglandin G/H Synthase/Cyclooxygenase (COX-2) Activity *in vitro*", *Prostaglandins* (1994) Vol. 47, págs. 55-59; Klein, Nusing, Pfeilschifter y Ullrich, "Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2", *Biochem. Pharmacol.* (1994) Vol. 48, págs. 1.605-1.610; Li, Black, Chan, Ford-Hutchinson, Gauthier, Gordon, Guay, Kargman, Lau, Mancini, Quimet, Roy, Vickers, Wong, Young, Zamboni y Prasit, "Cyclooxygenase-2 Inhibitors. Synthesis and Pharmacological Activities of 5-Methanesulfonamido-1-Indanone Derivatives", *J. Med. Chem.* (1995) Vol. 38, págs. 4.897-8.905; Prasit, Black, Chan, Ford-Hutchinson, Gauthier, Gordon, Guay, Kargman, Lau, Li, Mancini, Quimet, Roy, Tagari, Vickers, Wong, Young y Zamboni, "L-745.337: A Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor", *Med. Chem. Res.* (1995) Vol. 5, págs 364-374; Tanaka, Shimotori, Makino, Aikawa, Inaba, Yoshida y Takano, "Pharmacological Studies of the New Antiinflammatory Agent 3-Formylamino-7-methylsulfonylamino-6-phenoxy-4H-1-benzopyran-4-one. 1st Communication: Antiinflammatory, Analgesic and Other Related Properties", *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* (1992) Vol. 42, págs. 935-944; Nakamura, Tsuji, Nonishi, Okumura y Matsuo, "Studies on Antiinflammatory Agents. I. Synthesis and Pharmacological Properties of 2'-(phenylthio) methanesulfonamides and Related Derivatives", *Chem. Pharm. Bull.* (1993) Vol. 41, págs. 894-906; Chan, Boyce, Brideau, Ford-Hutchinson, Gordon, Guay, Hill, Li, Mancini, Penneton, Prasit, Rasori, Riendeau, Roy, Tagari, Vickers, Wong y Rodger, "Pharmacology of a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, L-745.337: A novel Nonsteroidal Anti-Inflammatory Agent with an Ulcerogenic Sparing Effect in Rat and Nonhuman Primate Stomach", *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1995) Vol. 274, págs. 1.531-1.537; y Graedon y Graedon, "Pills Promise Relief without Ulcers", *The Raleigh, North Carolina News and Observer*, pág. 8D (13 de septiembre de 1998), que trata, en términos generales, del desarrollo de celecoxib, meloxicam y viox x como inhibidores selectivos de la COX-2.

Las sulfonamidas ácidas y los diarilheterocíclicos representativos a los que se ha hecho referencia como inhibidores selectivos de la COX-2 en los artículos de las revistas mencionados en el párrafo anterior son:



Aunque las sulfonamidas ácidas y los diarilheterocíclicos han sido ampliamente estudiados como inhibidores selectivos de la COX-2, hay muy pocas observaciones sobre cómo convertir los AINE que son inhibidores selectivos de la COX-1 en inhibidores selectivos de la COX-2. Véase Black, Bayly, Belley, Chan, Charleson, Denis, Gauthier, Gordon, Guay, Kargman, Lau, Leblanc, Mancini, Quellet, Percival, Roy, Skorey, Tagari, Vickers, Wong, Xu y Prasit, "From Indomethacin to a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (1996) Vol. 6, págs. 725-730; Luong, Miller, Barnett, Chow, Ramesha y Browner, "Flexibility of the NSAID Binding Site in the Structure of Human Cyclooxygenase-2", *Nature Structural Biol.* (1996) Vol. 3, págs. 927-933; y Kalgutkar, Crews, Rowlinson, Garner, Seibert y Marnett, "Aspirin-Like Molecules that Covalently Inactivate Cyclooxygenase-2", *Science* (1998) Vol. 289, págs., 1.268-1.270. La patente de EE.UU. US 5.360.925 enseña cómo preparar derivados α -aminoácidos de indometacina y que estos compuestos pueden proporcionar un tratamiento eficaz del cáncer.

Asimismo, es interesante la patente de Ashton y cols. de EE.UU. US 5.681.964 (publicada en 1997), cedida a la University of Kentucky Research Foundation, que muestra la conversión de indometacina (un AINE) a determinados derivados de ésteres con reducción concomitante de la irritación GI (véase figura 1 de la patente de EE.UU. US 5.681.964 para la estructura de los derivados de ésteres). Además, las patentes de EE.UU. US 5.607.966 (original) 5 (publicada en 1997) y 5.811.438 (CIP) (publicada en 1998), ambas de Hellberg y otros, cedidas a Alcon Laboratories, muestran la conversión de varios AINE (tales como la indometacina) a determinados derivados de ésteres y derivados de amidas (que son útiles como antioxidantes y como inhibidores de la 5-lipooxigenasa) pero no estudian la inhibición selectiva de la COX-2.

Además, aunque las patentes de EE.UU. US 3.285.908 (publicada en 1966) y 3.336.194 (publicada en 1997), 10 ambas de Shen, cedidas a Merck & Co., Inc., describen varios derivados de amidas secundarias y terciarias de indometacina, las patentes no estudian la inhibición de la COX, probablemente porque la inhibición de la COX (ambas COX-1 y COX-2) no había sido descubierta en la década de 1960 y por lo tanto no fue posible identificar que los derivados de amidas terciarias no inhiben ni la COX-1 ni la COX-2. (Asimismo, véase compuestos de comparación 9 15 y 10 en los siguientes ejemplos.) No obstante, las patentes de EE.UU. US 5.436.265 (publicada en 1995) de Black y otros y 5.510.368 (publicada en 1996) de Lau y otros, ambas patentes cedidas a Merck Frosst Canada Inc., describen, respectivamente, ácidos 1-aróil-3-indolil alcanóicos y ácidos N-bencil-3-indolacéticos como inhibidores selectivos de la COX-2.

En la presente investigación, la posibilidad ha sido investigada para el diseño de inhibidores selectivos de la COX- 2 que utilizan como modelo varios compuestos, tales como AINE, (1) que son inhibidores selectivos de la COX-1 o (2) que tienen esencialmente la misma actividad inhibidora para ambas COX-1 y COX-2. Se hace referencia conjunta a estos dos tipos de compuestos como compuestos que no son inhibidores selectivos de la COX-2.

Más particularmente, el análisis de la estructura cristalina de la COX-2 humana que forma complejos con inhi- bidores selectivos de la COX-2 derivados del zomepirac indica que la base estructural para la selectividad mediante 25 compuestos derivados del zomepirac es distinta de la de los diarilheterocíclicos. Véase, Luong y otros, mencionado anteriormente. A diferencia de los diarilheterocíclicos, los análogos del zomepirac no utilizan bolsillo lateral; en lugar de ello interrumpen la constricción en la abertura del sitio activo de la COX ocupado por Arg106 y Tyr341 y se pro- yectan hacia la región que presiona. La proyección a esta región descongestionada estéricamente en el sitio activo de 30 la COX-2 abre la posibilidad de crear una amplia serie de análogos de AINE que contengan COOH, cada uno con un grupo funcional secundario distinto que sustituye el OH del COOH, cumpliría varios propósitos relacionados con el descubrimiento o el desarrollo de fármacos. Por ejemplo, algunos grupos secundarios podrían mejorar la solubilidad en agua, la biodisponibilidad o la farmacocinética. Otra posibilidad sería unir un farmacóforo secundario para dirigirlo 35 contra una proteína completamente distinta que lleva a compuestos con funciones farmacológicas dobles.

Abbot Laboratories y Park-Davis han intentado la estrategia del farmacóforo. Véase, respectivamente, Kolasa, Brooks, Rodrigues, Summers, Dellaria, Hulkower, Bouska, Bell y Carter, "Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs 40 as Scaffolds for the Design of 5-Lipoxygenase Inhibitors", *J. Med. Chem.* (1997) Vol. 40, págs. 819-824; y Flynn, Capiris, Cetenko, Connor, Dyer, Kostlan, Niese, Schrier y Sircar, "Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Hydroxamic Acids. Dual Inhibitors of Both Cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase", *J. Med. Chem.* (1990) Vol. 33, págs. 2.070- 2.072. Tanto Kosola y otros como Flynn y otros observaron que la sustitución del grupo ácido carboxílico de los AINE por una parte de ácido hidroxámico o una parte de hidroxiamida proporcionaba inhibidores que actuaban tanto sobre la COX como la 5-lipooxigenasa. Sin embargo, ninguno de los análogos mostró inhibición selectiva considerable de la 45 COX-2 y además los hidroxamatos sufrieron hidrólisis fácil.

No obstante, no hay nada en la literatura comentada anteriormente que sugiera que la conversión de indometacina, un AINE que contiene COOH, que es no selectivo para la inhibición de la COX-2, a un derivado que es selectivo para la inhibición de la COX-2 también daría lugar a dicho derivado que es inhibidor del cáncer.

50 **Resumen y objetivos de la invención**

Sorprendentemente, junto con la presente invención, se ha descubierto que la derivación de la parte de ácido 55 carboxílico de la indometacina en análogos de una amida secundaria según la reivindicación 1 crea especificidad isoenzima para la COX-2. Además, el derivado de amida secundaria resultante no es sólo un inhibidor selectivo de la COX-2, sino también un inhibidor del cáncer, es decir, presenta actividad antiangiogénica y/o antitumorigénica, y preferiblemente también conserva la actividad analgésica, antiinflamatoria y/o antipirética del compuesto.

Por lo tanto, la presente invención proporciona el uso de un derivado de amida secundaria de indometacina según 60 la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para inhibir cáncer en un animal vertebrado de sangre i caliente. El uso comprende administrar al animal una cantidad eficaz de tratamiento suficiente para inhibir el cáncer del derivado de amida secundaria del ácido carboxílico de la indometacina. El derivado es selectivo para la inhibición de ciclooxigenasa 2.

Por lo tanto, es objeto de la invención proporcionar un tratamiento del cáncer que minimice o evite la irritación 65 GI.

Además, es una ventaja de la presente invención que el tratamiento del cáncer también sea analgésico, antiinflamatorio y/o antipirético, sin la administración concomitante de un fármaco analgésico, antiinflamatorio y/o antipirético, tal como un AINE o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención implica el uso según la reivindicación 1 en un animal que es un vertebrado de sangre caliente. Por lo tanto, la invención hace referencia a mamíferos y aves.

Se contempla el tratamiento de mamíferos tales como humanos, así como de aquellos mamíferos importantes debido a que se hallan en peligro de extinción (tales como los tigres de Siberia), de importancia económica (animales criados en granjas para el consumo humano) y/o de importancia social para los humanos (animales de compañía o de zoológicos), por ejemplo, carnívoros no humanos (tales como gatos y perros), Suidos (cerdos y jabalíes), rumiantes (como vacas, bueyes, ovejas, jirafas, ciervos, cabras, bisontes y camellos) y caballos. También se contempla el tratamiento de aves, incluido el tratamiento de aquel tipo de aves que se hallan en peligro de extinción, que permanecen en zoológicos, así como averío, y más particularmente averío doméstico, es decir, aves de corral, tales como pavos, pollos, patos, ocas, gallinas de Guinea y similares, ya que también son de importancia económica para los humanos.

De este modo, se contempla el tratamiento de ganado, incluidos pero no exclusivamente Suidos domésticos (cerdos), rumiantes, caballos, aves de corral y similares.

Más particularmente, se administra una cantidad terapéutica eficaz de un derivado de amida secundaria de indometacina a un animal vertebrado de sangre caliente según la reivindicación 1. De este modo, la invención comprende la administración de este derivado de amida secundaria a concentraciones calculadas para proporcionar al animal en tratamiento el medio apropiado para proporcionar prevención, control o supresión del cáncer. Además, este derivado de amida secundaria posee propiedades analgésicas, antiinflamatorias y/o antipiréticas como las posee el compuesto que contiene ácido carboxílico antes de la derivación y, de este modo, el tratamiento del cáncer proporciona un efecto analgésico, antiinflamatorio y/o antipirético en el animal y no se requiere la administración concomitante de otro fármaco para conseguir dicho efecto.

Tal como se utiliza en la presente en relación con la presente invención, se pretende incluir sales de ácidos farmacéuticamente aceptables de indometacina. De este modo, por ejemplo, la parte COOH incluye COOM, donde M es Na y similares.

Entre los derivados de amidas secundarias de indometacina se incluyen indometacin-*N*-metilamida, indometacin-*N*-etan-2-ol-amida, indometacin-*N*-octilamida, indometacin-*N*-nonilamida, indometacin-*N*-(2-metilbencil)amida, indometacin-*N*-(4-metilbencil)amida, indometacin-*N*-((*R*)-,4-dimetilbencil)amida, indometacin-*N*-((*S*)-,4-dimetilbencil)amida, indometacin-*N*-(2-fenetfil)amida, indometacin-*N*-(4-fluorofenil)amida, indometacin-*N*-(4-clorofenil)amida, indometacin-*N*-(4-acetamidofenil)amida, indometacin-*N*-(4-metilmercapto)fenilamida, indometacin-*N*-(3-metilmercaptofenil)amida, indometacin-*N*-(4-metoxifenil)amida, indometacin-*N*-(3-etoxifenil)amida, indometacin-*N*-(3,4,5-trimetoxifenil)amida, indometacin-*N*-(3-piridil)amida, indometacin-*N*-((2-cloro)piridil)amida, indometacin-*N*-5-((1-etil)pirazolo)amida, indometacin-*N*-(3-cloropropil)amida, indometacin-*N*-metoxicarbonil-metilamida, indometacin-*N*-2-(2-*L*-metoxicarboniletil)amida, indometacin-*N*-2(2-*D*-metoxicarboniletil)amida, indometacin-*N*-(4-metoxicarbonilbencil)amida, indometacin-*N*-(4-metoxicarbonilmetilfenil)amida, indometacin-*N*-(2-pirazinil)amida, indometacin-*N*-2-(4-metiliazolil)amida, indometacin-*N*-(4-bifenil)amida y combinaciones de las mismas.

Este derivado de amida secundaria puede administrarse a animales como supositorio o como complemento a líquidos que se administran internamente o por vía parenteral, por ejemplo líquidos nutritivos tales como soluciones de sacarosa intervenosa. Además, también se contempla la administración intraoral (tal como bucal o sublingual) o la administración transdérmica (tal como un parche dérmico). Para una buena discusión sobre la administración intraoral se remite a la patente de EE.UU. US 4.229.447 de Porter publicada el 21 de octubre de 1980 y a la patente de EE.UU. US 5.504.086 de Ellinwood y Gupta publicada el 2 de abril de 1996. Para una buena discusión sobre la administración transdérmica se remite a la patente de EE.UU. US 5.016.652 de Rose y Jarvik publicada el 21 de mayo de 1991.

Además, la administración puede realizarse por medio de diversos procedimientos orales, por ejemplo, como comprimido, cápsula o en polvos (forma cristalina), que se tragan. Asimismo, la administración oral puede incluir que el derivado de amida secundaria se mezcle en un líquido excipiente apropiado por lo que se administre como un líquido (solución o suspensión) que se bebe.

Cuando el derivado de amida secundaria de indometacina se mezcla en un líquido excipiente, entre los líquidos apropiados se incluyen, pero no exclusivamente, agua, disoluciones de rehidratación (es decir, agua con electrolitos tales como citrato de potasio y cloruro de sodio, por ejemplo la solución disponible con el nombre comercial RESOL^o de Wyeth Laboratories), líquidos nutricionales (es decir, leche, zumo de fruta) y combinaciones de los mismos. De este modo, la administración oral puede ser como un componente de la dieta, tal como un alimento para humanos, para animales o combinaciones de los mismos.

Además de la administración oral tal como por vía bucal, también se contempla la administración de una solución o suspensión al esófago, estómago y/o duodeno, tal como mediante cebadura, es decir mediante un tubo de alimentación.

El tipo de administración mediante cebadura es útil para cuando el cáncer ha avanzado y el animal ya no puede tragar comida, medicamentos, etc. por la boca.

Por lo tanto, también se contempla que alimentos adicionales, tales como varios excipientes, portadores, surfactantes, sustancias nutritivas y similares, así como varios medicamentos distintos de un derivado de amida secundaria, o combinaciones de los mismos, puedan estar presentes junto con el derivado de amida secundaria según la reivindicación 1, independientemente de la forma en que esté el derivado. Entre los medicamentos distintos de un derivado de amida secundaria pueden incluirse, pero no exclusivamente, polioles osmolíticos y aminoácidos osmolíticos (es decir, mioinositol, sorbitol, glicina, alanina, glutamina, glutamato, aspartato, prolina y taurina), cardiotónicos (es decir, glucociamina), analgésicos, antibióticos, electrolitos (es decir, electrolitos orgánicos o minerales tales como sales) y combinaciones de los mismos.

La cantidad apropiada del derivado de amida secundaria que se administra al animal debería hallarse entre aproximadamente 0,5 mg y aproximadamente 7,0 mg diarios por kilo de peso corporal del animal, más preferiblemente entre aproximadamente 1,5 mg y aproximadamente 6,0 mg diarios por kilo de peso corporal del animal, e incluso más preferiblemente entre aproximadamente 2,0 mg y aproximadamente 5,0 mg diarios por kilo de peso corporal del animal. La administración puede llevarse a cabo una o más veces al día para conseguir la dosis total diaria deseada. Evidentemente, la cantidad puede variar dependiendo de la gravedad del cáncer y/o de la edad del animal.

La presente invención debería ser útil para el tratamiento del cáncer en animales en los que el cáncer ha sido causado por organismos patógenos (es decir, parásitos, bacterias, protozoos y virus, incluidos agentes tóxicos presentes en los alimentos), por factores nutricionales (es decir, exceso de sales minerales, exceso de proteínas, agentes alérgicos presentes en los alimentos, componentes no digeribles de los alimentos o ingredientes de mala calidad en la comida), por factores ambientales que actúan como factores de estrés o contaminantes (es decir, calor, frío, transporte de animales o toxinas tales como las del aire y/o la contaminación del agua) y/o por trastornos fisiológicos tales como los del tracto digestivo, el sistema pulmonar/circulatorio, el hígado, los riñones, el colon y/o el páncreas.

La presente invención indica que el fármaco que contiene COOH que no es un inhibidor selectivo de la COX-2, indometacina, cuando es convertido en amidas secundarias según la reivindicación 1 produce especificidad isoenzima para la COX-2 y de este modo presenta una estrategia eficaz para la generación de inhibidores de la COX-2 potentes y selectivos. El extenso estudio SAR discutido anteriormente realizado con indometacina sugiere que una variedad de sustituyentes de amidas secundarias son tolerados para sustituir el OH en la parte COOH de la indometacina, y estos derivados resultantes son inhibidores de la COX-2 potentes y selectivos.

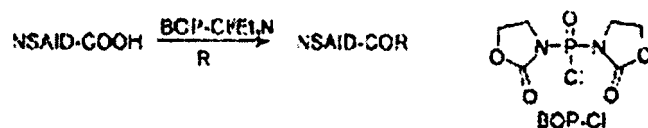
35 Ejemplos de laboratorio

Lo siguiente se señala en relación con los materiales 5y procedimientos que aparecen a continuación.

Las amidas elaboradas y sus propiedades selectivas de inhibición de la COX-2 se enumeran en la tabla que aparece a continuación. Se prepararon un total de 31 análogos de la indometacina (31 derivados de amidas). Varios sustituyentes que contienen nitrógeno (es decir, aminos) que sustitúan el OH del COOH, para crear una amida, incluidas partes aminoalquil, aminoaril, aminoarilalquil, aminoéteres o aminopiridinil como parte del sustituyente que contiene nitrógeno. Los análogos amida más potentes en la serie de derivados de indometacina mostraban valores IC₅₀ para la inhibición de la COX-2 humana purificada en la parte inferior del intervalo nanomolar con proporciones de selectividad de la COX-2 que iban de >1.000 a 4.000.

Se utilizó una metodología bien establecida en la síntesis de derivados de amidas de indometacina mediante tratamiento de la indometacina con una amina apropiada (designada como R) que utiliza BOP-Cl como el activador del ácido carboxílico para remplazar el OH del COOH por R y crear una amida. Si R era una amina primaria, el derivado resultante era una amida secundaria, y si R era una amina secundaria, el derivado resultante era una amida terciaria.

Más específicamente, una mezcla de reacción que contenía indometacina (300 mg, 0,84 mmol) y BOP-Cl (218 mg, 0,84 mmol) en 5 ml de CH₂Cl₂ anhidro fue tratada con Et₃N (167 mg, 0,84 mmol) y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación la mezcla fue tratada con la amina apropiada (0,94 mmol) designada como R y se dejó en agitación a temperatura ambiente toda la noche. Tras la dilución con CH₂Cl₂ (30 ml), se lavó con agua la solución resultante (2 x 25 ml), NaOH 3 N (2 x 25 ml), agua (2 x 30 ml), se secó (en presencia de MgSO₄), se filtró y el disolvente se concentró al vacío. La amida sin ajustar fue purificada mediante cromatografía sobre gel de sílice o por recristalización en el disolvente adecuado. El esquema de reacción fue tal como sigue:



Los valores de IC₅₀ para la inhibición de la COX-2 humana o la COX-1 ovina purificadas mediante compuestos de prueba se determinaron mediante el análisis TLC discutido a continuación. Se utilizó la COX-1 ovina porque

es muy fácil aislar y purificar la enzima de las vesículas seminales de la oveja, mientras que la COX-1 humana normalmente se obtiene mediante sobreexpresión en un sistema celular de insecto y es muy difícil de manejar y en especial de purificar. La COX-1 de oveja es >90% similar a la COX-1 de los humanos. Por último, en la literatura publicada se ha informado de la inhibición de la COX-1 de estas dos fuentes mediante AINE y los valores de IC₅₀ son similares, lo que sugiere la ausencia de diferencias radicales en el sitio activo. La COX-1 se purificó de las vesículas seminales de carnero obtenidas de Oxford Biomedical Research, Inc. (Oxford, Michigan). La actividad específica de la proteína fue 20 (μMO₂/minuto)/mg y el porcentaje de holoproteína fue 13,5%. Las muestras de COX-2 humana (1,62 μg/μl) se obtuvieron mediante expresión de COX-2 humana clonada en células de insecto vehiculadas en vectores de baculovirus, seguido de purificación.

Las enzimas obtenidas tras la purificación eran apo (es decir, carecían del grupo hemoprostético). Fueron reconstituidas con hematina comprada en Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri) en los análisis para devolverles su estado natural que es holo (es decir, la COX-1 natural y la COX-2 natural contienen el grupo hemoprostético) de modo que la inhibición mediante compuestos de prueba tenía relevancia fisiológica.

La holoCOX-2 (66 nM), o la holoCOX-1 (44 nM), en 100 mM de Tris-HCl, pH 8,0 que contenía 500 μM fenol fue tratada con varias concentraciones de indometacina o de un derivado de amida de indometacina a 25°C durante 20 minutos. Puesto que la COX-2 recombinante tenía una menor actividad específica que la COX-1 ovina, las concentraciones de proteína se ajustaron de tal manera que los porcentajes de productos totales obtenidos tras la catálisis de ácido araquidónico (comprado en Nu Chek Prep, Elysian, Minnesota) mediante las dos isoformas eran comparables.

Más específicamente, la inhibición, dependiente del tiempo y de la concentración, de la actividad de la ciclooxigenasa para la COX-1 ovina (44 nM) y la COX-2 humana (66 nM) utilizando el análisis TLC se determinó tal como sigue. Las mezclas de reacción de 200 μl contenían proteína reconstituida con hematina en 100 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 500 μM fenol y [1-¹⁴C]-ácido araquidónico (50 μM, ~55-57 mCi/mmol). Para el análisis de inhibición dependiente del tiempo, la COX-1 (44 nM), o la COX-2 (66 nM), reconstituida con hematina fue preincubada a temperatura ambiente durante 20 minutos a distintas concentraciones de inhibidor en DMSO seguido de la adición de [1-¹⁴C]-ácido araquidónico (50 μM) durante 30 segundos a 37°C. El [1-¹⁴C]-ácido araquidónico (~55-57 mCi/mmol) se compró a New England Nuclear, Dupont, o a American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, Missouri).

Las reacciones se finalizaron mediante extracción de disolvente en Et₂O/CH₃OH/citrato 1 M, pH 4,0 (30:4:1). Las fases se separaron mediante centrifugación a 2.000 g- fuerza durante 2 minutos y la fase orgánica fue identificada en una placa de TLC (obtenida de J. T. Baker, Phillipsburg, Nueva Jersey). La placa se elaboró en EtOAc/CH₂Cl₂/glacial AcOH (75:25:1) a 4°C. Los productos prostanoideos radiomarcados se determinaron cuantitativamente con un escáner de radioactividad (obtenido de Bioscan, Inc., Washington, D.C.). El porcentaje de productos totales observados a distintas concentraciones de inhibidor se dividió por el porcentaje de productos observados para las muestras de proteínas preincubadas durante el mismo tiempo con DMSO.

Los experimentos control en ausencia de indometacina indicaban ~25-30% de conversión del sustrato de ácidos grasos a productos, que era suficiente para evaluar las propiedades inhibitoras de todos los compuestos de prueba. Bajo estas condiciones, la indometacina mostró inhibición selectiva, dependiente del tiempo y de la concentración, de la COX-1 (es decir, IC₅₀(COX-1) ~0,050 μM; IC₅₀(COX-2) ~0,75 μM), mientras que los derivados de amidas secundarias mostraron inhibición selectiva de la COX-2 y los derivados de amidas terciarias no inhibieron ni la COX-1 ni la COX-2 (es decir, la determinación de la COX-2 se detuvo a un valor de IC₅₀ extremadamente elevado y todavía se mantuvo >80% de actividad de la COX-2). Asimismo, lo siguiente se señala para el NS-393 y el 2-metil-4-fenil-5-sulfoamidofenil oxazol, que son dos de las sulfonamidas ácidas mencionadas anteriormente: es decir, NS-398: IC₅₀ (COX-2) ~0,12 μM; IC₅₀ (COX-1) >66 μM; y 2-metil-4-fenil-5-sulfoamidofenil oxazol: IC₅₀ (COX-2) ~0,06 μM; IC₅₀ (COX-1) >66 μM.

Para algunas pruebas de comparación, la inhibición de la COX-2 de células murinas RAW264,7 activadas se determinó tal como sigue. Se cultivó un número reducido de células murinas RAW264,7 en DMEM que contenía un 10% de SFB inactivado por calor. Las células (6,2 x 10⁶ células/matraz T25) fueron activadas con 500 ng/ml de LPS y 10 unidades/ml de IFN-γ en DMEM libre de suero durante 7 horas. Se añadió el vehículo (DMSO) o inhibidor en DMSO (de 0 a 1 μM) durante 30 minutos a 37°C. La inhibición del metabolismo exógeno del ácido araquidónico o la inhibición de la síntesis de PGD₂ se determinó mediante la incubación de las células respectivas con ¹⁴C-AA 20 μM durante 15 minutos a 25°C. Se separaron muestras de una misma cantidad (200 μl) en una solución de finalización y los productos totales se determinaron cuantitativamente mediante el ensayo TLC tal como se ha descrito anteriormente.

Los puntos de fusión se determinaron utilizando un aparato de punto de fusión Gallenkamp y no se corrigieron. Los productos químicos eran ejemplos específicos sin optimizar de una preparación. Los AINE (es decir, indometacina) se compraron a Sigma (St. Louis, Missouri). Todos los otros productos químicos se compraron a Aldrich (Milwaukee, Wisconsin). El cloruro de metileno se compró como anhídrido a Aldrich y se utilizó tal como se recibió. Todos los demás disolventes eran de grado HPLC. Se utilizó TLC analítico (Analtech uniplates™) para seguir la evolución de las reacciones. El gel de sílice (Fisher, 60-100 mallas) se utilizó para la cromatografía de columna. Los espectros ¹H NMR y ¹³C NMR en CDCl₃ se registraron en un espectrómetro Bruker WP-360 o en un espectrómetro AM-400. Los desplazamientos químicos se expresaron en partes por millón (ppm) relativas al tetrametilsilano como estándar interno. Se observaron multiplicidades de espín como s (singlete), d (doblete), dd (doblete de dobletes), t (tripleto), q (cuarteto) y m (multiplete). Las constantes de acoplamiento (*J*) se dieron en hertz (Hz).

ES 2 288 039 T3

Ejemplo I

Se sintetizaron los siguientes derivados de amidas de ácido carboxílico de indometacina, designados como compuestos 1 a 31. (Nota: los compuestos 1, 2 y 9 a 31 también se describen en las patentes de EE.UU. mencionadas anteriormente US 3.285.908 y US 3.336.194, ambas de Shen, cedidas a Merck & Co., Inc.)

La indometacin-*N*-metilamida (compuesto 1) se obtuvo 1 mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 10:90 a continuación 50:50) como sólido amarillo brillante (271 mg, 79%). pf =187-189°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,64-7,67 (dd, 2 H, *J* =6,6 Hz y 1,9 Hz, ArH), 7,47-7,50 (dd, 2 H, *J* =6,7 Hz y 1,9 Hz, ArH), 6,88-6,89 (dd, 1 H, *J* =9,1 Hz y 2,5 Hz, ArH), 6,84-6,87 (d, 1 H, *J* =9,0 Hz, ArH), 6,68-6,72 (dd, 1 H, *J* =9,1 Hz y 2,5 Hz, ArH), 5,22 (bs, 1 H, NH), 3,83 (s, 3 H, CH₃), 3,65 (s, 2 H, CH₂), 2,75-2,76 (d, 3 H, *J* =4,8 Hz, CH₃), 2,39 (s, 3 H, CH₃).

La indometacin-*N*-etan-2-ol-amida (compuesto 2) se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc) como sólido amarillo pálido (143 mg, 39%). pf =162-164°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,66-7,68 (dd, 2 H, *J* =6,7 Hz y 1,7 Hz, ArH), 7,47-7,50 (dd, 2 H, *J* =6,9 Hz y 1,9 Hz, ArH), 6,85- 6,89 (d y s, 2 H, *J* =9,2 Hz ArH), 6,68-6,72 (dd, 1 H, *J* =9,0 Hz y 2,5 Hz, ArH), 6,03 (bs, 1 H, NH), 3,82 (s, 3 H, CH₃), 3, 67 (bs, 4 H, 2CH₂), 3,35-3,40 (q, 2 H, *J* =4,8 Hz, CH₂), 2,44 (bs, 1 H, OH), 2,39 (s, 3 H, CH₃).

La indometacin-*N*-octilamida (compuesto 3) se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 30:70) como sólido amarillo (164 mg, 42%). pf =109-111°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,62-7,65 (d, 2H, *J* =8,2 Hz, ArH), 7,46-7,49 (d, 2H, *J* =8,2 Hz, ArH), 6,85-6,89 (m, 2H, ArH), 6,68-6,71 (d, 1 H, *J* =8,9 Hz, ArH), 5,67 (s, 1H, NH), 3,82 (s, 3H, CH₃), 3,64 (s, 2H, CH₂), 3,16-3,22 (m, 2H, CH₂), 0,83-0,88 (t, *J* =6,2, CH₃).

La indometacin-*N*-nonilamida (compuesto 4) se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 30:70) como sólido amarillo (191 mg, 47%). pf =128-130°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,64-7,67 (d, 2H, *J* =8,4 Hz, ArH), 7,47-7,50 (d, 2H, *J* =8,4 Hz, ArH), 6,89 (s, 1H, ArH), 6,85-6,88 (d, *J* =8,9 Hz, ArH), 6,68-6,72 (dd, 1H, *J* =9,0 Hz y 2,4 Hz, ArH), 5,60-5,63 (bt, *J* =5,3 Hz, NH), 3,82 (s, 3H, CH₃), 3,64 (s, 2H, CH₂), 3,16-3,22 (m, 2H, CH₂), 2,38 (s, 3H, CH₃), 1,36-1,41 (m, 2H, CH₂), 1,19-1,28 (m, 12H, 6CH₂), 0,84-0,89 (t, *J* =6,5 Hz, CH₃).

La indometacin-*N*-(2-metilbencil)amida (compuesto 5) se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 50:50) como sólido amarillo (218 mg, 56%). pf =177-179°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,60-7,61 (d, 2H, *J* =8,1 Hz, ArH), 7,44-7,46 (d, 2H, *J* =8,1 Hz, ArH), 7,06-7,15 (m, 4H, ArH), 6,83-6,89 (m, 2H, ArH), 6,67-6,70 (d, 1H, *J* =8,1 Hz, ArH), 5,84 (s, 1H, NH), 4,40-4,41 (d, 2H, *J* =5,3 Hz, CH₂), 3,79 (s, 3H, CH₃), 3,70 (s, 2H, CH₂), 2,37 (s, 3H, CH₃), 2,19 (s, 3H, CH₃).

La indometacin-*N*-(4-metilbencil)amida (compuesto 6) se obtuvo mediante recristalización a partir de metanol como sólido amarillo (142 mg, 37%). pf =191-192°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,63-7,60 (d, 2H, *J* =8,5 Hz, ArH), 7,46-7,44 (d, 2H, *J* =8,4 Hz, ArH), 7,08-7,01 (m, 4H, ArH), 6,88 (s, 1H, ArH), 6,87-6,85 (d, 1H, *J* =6,3 Hz, ArH), 6,71-6,67 (dd, 1H, *J* =9,0 Hz y 2,4 Hz, ArH), 5,89 (bt, 1H, NH), 4,38-4,36 (d, 2H, *J* =5,9 Hz, CH₂), 3,78 (s, 3H, CH₃), 3,69 (s, 2H, CH₂), 2,35 (s, 3H, CH₃), 2,30 (s, 3H, CH₃).

La indometacin-*N*-((*R*)-4-dimetilbencil)amida (compuesto 7) se obtuvo mediante recristalización a partir de metanol para producir un sólido amarillo pálido (124 mg, 31%). pf =201-202°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,62-7,64 (d, 2H, *J* =8,4 Hz, ArH), 7,45-7,48 (d, 2H, *J* =8,6 Hz, ArH), 7,01-7,08 (m, 4H, ArH), 6,87-6,90 (d, 1H, *J* =9,0 Hz, ArH), 6,83-6,84 (d, 1H, *J* =2,3 Hz, ArH), 6,68-6,72 (dd, 1H, *J* =9,0 Hz y 2,4 Hz, ArH), 5,76-5,78 (bd, 1H, *J* =8,0 Hz, NH), 5,09-5,14 (m, 1H, CH), 3,76 (s, 3H, CH₃), 3,63-3,64 (d, 2H, *J* =2,8 Hz, CH₂), 2,34 (s, 3H, CH₃), 2,30 (s, 3H, CH₃), 1,35-1,38 (d, 3H, *J* =6,8 Hz, CH₃).

La indometacin-*N*-((*S*)-4-dimetilbencil)amida (compuesto 8) se obtuvo mediante recristalización a partir de metanol como sólido amarillo pálido (163 mg, 41%). pf =200-201°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,53-7,55 (d, 2H, *J* =8,3 Hz, ArH), 7,37-7,40 (d, 2H, *J* =8,4 Hz, ArH), 6,94-7,01 (m, 4H, ArH), 6,76-6,82 (m, 2H, ArH), 6,61-6,64 (dd, 1H, *J* =9,0 Hz y 2,5 Hz, ArH), 5,77-5,79 (bd, 1H, *J* =7,8 Hz, NH), 5,02-5,07 (m, 1H, CH), 3,69 (s, 3H, CH₃), 3,58-3,59 (d, 2H, *J* =2,9 Hz, CH₂), 2,27 (s, 3H, CH₃), 2,23 (s, 3H, CH₃), 1,28-1,30 (d, 3H, *J* =6,9 Hz, CH₃).

Comparación. La indometacin-*N*-metilfenetilamida (compuesto 9) se obtuvo mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc:hexanos; 50:50) como sólido amarillo (288 mg, 72%). pf =61-63°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,64-7,67 (d, 2H, *J* =8,4 Hz, ArH), 7,45-7,48 (d, 2H, *J* =8,5 Hz, ArH), 7,02 (d, 1H, *J* =2,4 Hz, ArH), 6,81-6,84 (d, 1H, *J* =9,0 Hz, ArH), 6,63-6,66 (dd, 1H, *J* =9,0 Hz y 2,5 Hz, ArH), 3,82 (s, 3H, CH₃), 3,71 (s, 2H, CH₂), 3,57-3,60 (t, 2H, *J* =5,4 Hz, CH₂), 3,43-3,46 (t, 2H, *J* =5,3 Hz, CH₂), 2,38 (s, 3H, CH₃), 1,59-1,61 (m, 2H, CH₂), 1,52-1,53 (m, 2H, CH₂), 1,42-1,43 (m, 2H, CH₂).

Comparación. La indometacin-*N*-piperidinilamida (compuesto 10) se obtuvo mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc:hexanos; 40:60) como sólido amarillo pálido (146 mg, 41%). pf =161-163°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,64-7,67 (d, 2H, *J* =8,4 Hz, ArH), 7,45-7,48 (d, 2H, *J* =8,5 Hz, ArH), 7,02 (d, 1H, *J* =2,4 Hz, ArH), 6,81-6,84 (d, 1H, *J* =9,0 Hz, ArH), 6,63-6,66 (dd, 1H, *J* =9,0 Hz y 2,5 Hz, ArH), 3,82 (s, 3H, CH₃), 3,71 (s, 2H, CH₂), 3,57-3,60 (t, 2H, *J* =5,4 Hz, CH₂), 3,43-3,46 (t, 2H, *J* =5,3 Hz, CH₂), 2,38 (s, 3H, CH₃), 1,59-1,61 (m, 2H, CH₂), 1,52-1,53 (m, 2H, CH₂), 1,42-1,43 (m, 2H, CH₂).

ES 2 288 039 T3

5 *La indometacin-N-(2-fenetil)amida (compuesto 11)* se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 30:70) como sólido amarillo brillante (169 mg, 44%). pf =148-150°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,58-7,60 (d, J=8,4 Hz, ArH), 7,46-7,48 (d, 2H, J=8,5 Hz, ArH), 7,12-7,14 (m, 3H, ArH), 6,85-6,95 (m, 4H, ArH), 6,69-6,73 (dd, 1H, J=8,9 Hz y 2m5 Hz, ArH), 5,61 (s, 1H, NH), 3,81 (s, 3H, CH₃), 3,59 (s, 2H, CH₂), 3,43-3,49 (m, 2H, CH₂), 2,68-2,72 (t, 2H, J=6,7 Hz, CH₂), 2,04 (s, 3H, CH₃).

10 *La indometacin-N-(4-fluorofenil)amida (compuesto 12)* se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 5:95 a 20:80) como sólido naranja (217 mg, 57%). pf =200-202°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,65-7,67 (d, 2H, J=8,3 Hz, ArH), 7,47-7,50 (d, 2H, J=8,3 Hz, ArH), 7,32-7,35 (m, 3H, ArH), 6,94-6,99 (m, 3H, ArH, NH), 6,85-6,88 (d, 1H, J=9,0 Hz, ArH), 6,70-6,73 (dd, 1H, J=9,0 Hz y 2,0 Hz, ArH), 3,81 (s, 3H, CH₃), 3,79 (s, 2H, CH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃).

15 *La indometacin-N-(4-clorofenil)amida (compuesto 13)* se obtuvo mediante recristalización a partir de metanol como sólido amarillo pálido (234 mg, 56%). pf =209-210°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,58-7,61 (d, 2H, J=8,2 Hz, ArH), 7,40-7,42 (d, 2H, J=8,2 Hz, ArH), 7,13-7,27 (m, 5H, ArH), 6,84 (s, 1H, NH), 6,77-6,80 (d, 1H, J=9,0 Hz, ArH), 6,62-6,65 (d, 1H, J=9,0 Hz, ArH), 3,72 (s, 2H, CH₂), 3,72 (s, 3H, CH₃), 2,37 (s, 3H, CH₃).

20 *La indometacin-N-(4-acetamidofenil)amida (compuesto 14)* se obtuvo mediante recristalización a partir de metanol como sólido amarillo pálido (221 mg, 54%). pf =256-257°C; ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10,14 (s, 1H, NH), 9,86 (s, 1H, NH), 7,62-7,70 (m, 4H, ArH), 7,48 (s, 4H, ArH), 7,18 (d, 1H, J=2,3 Hz, ArH), 6,90-6,93 (d, 1H, J=9,0 Hz, ArH), 6,68-6,72 (dd, 1H, J=9,1 Hz y 2,5 Hz, ArH), 3,73 (s, 3H, CH₃), 3,71 (s, 3H, CH₃), 1,99 (s, 3H, CH₃).

25 *La indometacin-N-(4-metilmercapto)fenilamida (compuesto 15)* se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 50:50) como sólido amarillo brillante (162 mg, 40%). pf =195-196°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,67-7,70 (d, 2H, J=8,4 Hz, ArH), 7,48-7,50 (d, 2H, J=8,4 Hz, ArH), 7,30-7,33 (d, 2H, J=8,6 Hz, ArH), 7,17-7,22 (m, 3H, 2 ArH y NH), 6,92-6,93 (d, 1H, J=2,3 Hz, ArH), 6,85-6,88 (d, 1H, J=9,0 Hz, ArH), 6,69-6,73 (dd, 1 H, J=9,0 Hz y 2,4 Hz, ArH), 3,80 (s, 3 H, CH₃), 3,79 (s, 2 H, CH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃), 2,44 (s, 3 H, CH₃).

30 *La indometacin-N-(3-metilmercaptofenil)amida (compuesto 16)* se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 15:85) como sólido pálido (218 mg, 54%). pf =129-131°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,62-7,64 (d, 2H, J=8,2 Hz, ArH), 7,45-7,48 (d, 2H, J=8,4 Hz, ArH), 7,39 (s, 1H, NH), 7,09-7,18 (m, 2H, ArH), 6,94-6,96 (m, 3H, ArH), 6,86-6,89 (d, 1H, J=9,0 Hz), 6,69-6,72 (d, 1H, J=8,9 Hz, ArH), 3,80 (s, 3H, CH₃), 3,78 (s, 2H, CH₂), 2,42 (s, 3H, CH₃).

35 *La indometacin-N-(4-metoxifenil)amida (compuesto 17)* se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 10:90 a 25:75) como sólido naranja (239 mg, 61%). pf =201-202°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,67-7,70 (dd, 2H, J=6,8 Hz y 1,8 Hz, ArH), 7,48-7,51 (d, 2H, J=7,1 Hz, ArH), 7,28-7,29 (d, 1H, J=2,0 Hz, ArH), 7,20 (s, 1H, NH), 6,94-6,95 (d, 1H, J=2,4 Hz, ArH), 6,86-6,89 (d, 1H, J=9,0 Hz, ArH), 6,78-6,84 (m, 2H, ArH), 6,69-6,73 (dd, 1H, J=9,0 Hz y 2,4 Hz, ArH), 3,81 (s, 3H, CH₃), 3,79 (s, 2H, CH₂), 3,76 (s, 3H, CH₃), 2,45 (s, 3H, CH₃).

40 *La indometacin-N-(3-etoxifenil)amida (compuesto 18)* se obtuvo mediante recristalización a partir de metanol como sólido amarillo brillante (297 mg, 74%). pf =152-154°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,68-7,70 (d, 2H, J=8,4 Hz, ArH), 7,48-7,51 (d, 2H, J=8,4 Hz, ArH), 7,24 (s, 1H, NH), 7,13-7,18 (m, 2H, ArH), 6,94-6,82 (m, 3H, ArH), 6,70-6,73 (dd, 1H, J=9,0 Hz y 2,4 Hz), 6,61-6,65 (dd, 1H, J=8,2 Hz y 1,7 Hz, ArH), 3,96-4,03 (q, 2H, J=7,0 Hz, CH₂), 3,81 (s, 3H, CH₃), 3,80 (s, 2H, CH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃), 1,36-1,40 (t, 3H, J=7,0 Hz, CH₃).

50 *La indometacin-N-(3,4,5-trimetoxifenil)amida (compuesto 19)* se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 10:90 a 30:70) como sólido naranja flojo (191 mg, 44%). pf =239-241°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,67-7,69 (d, 2H, J=8,5 Hz, ArH), 7,48-7,51 (d, 2H, J=8,5 Hz, ArH), 7,20 (s, 1H, NH), 6,94 (d, 1H, J=8,9 Hz, ArH), 6,70-6,74 (m, 3H, ArH), 3,78-3,81 (m, 14H, 3CH₃ & CH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃).

55 *La indometacin-N-(3-piridil)amida (compuesto 20)* se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 50:50 a 75:25) como sólido amarillo (190 mg, 52%). pf =204-205°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 8,39-8,40 (d, 1H, J=2,1 Hz, ArH), 8,32-8,34 (d, 1H, J=4,4 Hz, ArH), 8,04-8,08 (m, 1H, ArH), 7,66-7,70 (m, 2H, ArH), 7,48-7,52 (m, 2H, ArH), 7,38 (s, 1H, NH), 7,22-7,25 (m, 1H, ArH), 6,93-6,94 (d, 1H, J=2,4 Hz, ArH), 6,85-6,88 (d, 1H, J=9,0 Hz, ArH), 6,70-6,74 (dd, 1H, J=9,1 Hz y 2,5 Hz, ArH), 3,84 (s, 2H, CH₂), 3,81 (s, 3H, CH₃), 2,47 (s, 3H, CH₃).

60 *La indometacin-N-5-((2-cloro)-piridil)amida (compuesto 21)* se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 5:95 a 50:50) como sólido amarillo pálido (221 mg, 56%). pf =196-198°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 8,19-8,20 (d, 1H, J=2,8 Hz, ArH), 8,03-8,06 (dd, 1H, J=8,7 Hz y 2,9 Hz, ArH), 7,59-7,63 (m, 2H, ArH), 7,46-7,51 (m, 3H, ArH), 7,24 (s, 1H, NH), 6,92-6,93 (d, 1H, J=2,4 Hz, ArH), 6,84-6,87 (d, 1H, J=9,0 Hz, ArH), 6,70-6,74 (dd, 1H, J=9,1 Hz y 2,5 Hz, ArH), 3,84 (s, 2H, CH₂), 3,82 (s, 3H, CH₃), 2,46 (s, 3H, CH₃).

65 *La indometacin-N-5-((1-etil)pirazolo)amida (compuesto 22)* se obtuvo mediante recristalización a partir de metanol como sólido amarillo pálido (153 mg, 40%). pf =193-194°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,99 (bs, 1H, NH), 7,66-7,68 (d, 2H, J=8,2 Hz, ArH), 7,47-7,50 (m, 3H, ArH), 7,00 (s, 1H, ArH), 6,83-6,86 (d, 1H, J=9,0 Hz, ArH), 6,69-6,72 (d, 1H, J=8,9 Hz, ArH), 6,35 (s, 1H, ArH), 4,01-4,04 (bd, 2H, J=6,8 Hz, CH₂), 3,90 (s, 2H, CH₂), 3,82 (s, 3H, CH₃), 2,47 (s, 3H, CH₃), 1,24-1,29 (t, 3H, J=7,1 Hz, CH₃).

ES 2 288 039 T3

5 *La indometacin-N-(3-cloropropil)amida (compuesto 23)* se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 30:70) como sólido blanco grisáceo (153 mg, 40%). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 8,11 (bs, 1H, NH), 7,62-7,69 (m, 4H, ArH), 7,09 (s, 1H, ArH), 6,92-6,95 (d, 1H, J=8,9 Hz, ArH), 6,68-6,71 (d, 1H, J=8,8 Hz, ArH), 3,80 (s, 3H, CH₃), 3,58-3,67 (t, 2 H, J=6,3 Hz, CH₂), 3,52 (s, 2H, CH₂), 3,15-3,17 (m, 2 H, CH₂), 2,20 (s, 3H, CH₃), 1,81-1,85 (t, 2H, J=6,5 Hz, CH₂).

10 *La indometacin-N-metoxicarbonilmetilamida (compuesto 24)* se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 30:70) como sólido amarillo (265 mg, 76%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,66-7,68 (dd, 2 H, J=6,7 Hz y 1,7 Hz, ArH), 7,47-7,50 (dd, 2 H, J=6,9 Hz y 1,9 Hz, ArH), 6,92-6,95 (m, 2 H, ArH), 6,70-6,73 (m, 1 H, ArH), 6,03 (bs, 1 H, NH), 3,98-4,00 (d, 2 H, J=5,5 Hz, CH₂), 3,84 (s, 3 H, CH₃), 3,71 (s, 3 H, CH₃), 3,69 (s, 2 H, CH₂), 2,38 (s, 3 H, CH₃).

15 *La indometacin-N-2-(3-L-metoxicarboniletil)amida (compuesto 25)* se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 30:70 y a continuación 50:50) como sólido amarillo (300 mg, 84%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,67-7,70 (dd, 2 H, J=8,5 Hz y 1,85 Hz, ArH), 7,47-7,50 (dd, 2 H, J=8,4 Hz y 1,9 Hz, ArH), 6,91-6,96 (m, 2 H, ArH), 6,69-6,73 (m, 1 H, ArH), 6,16-6,18 (d, 1 H, J=7,4 Hz, NH), 4,57-4,62 (m, 1 H, CH), 3,83 (s, 3 H, CH₃), 3,70 (s, 3 H, CH₃), 3,65 (s, 2 H, CH₂), 2,37 (s, 3 H, CH₃), 1,32-1,34 (d, 3 H, J=7,2 Hz, CH₃).

20 *La indometacin-N-2-(2-D-metoxicarboniletil)amida (compuesto 26)* se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 40:60) como sólido amarillo (803 mg, 67%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,67-7,70 (dd, 2 H, J=8,5 Hz y 1,85 Hz, ArH), 7,47-7,50 (dd, 2 H, J=8,4 Hz y 1,9 Hz, ArH), 6,91-6,96 (m, 2 H, ArH), 6,69-6,73 (dd, 1 H, ArH), 6,16-6,18 (d, 1 H, J=7,4 Hz, NH), 4,57-4,62 (m, 1 H, CH), 3,83 (s, 3 H, CH₃), 3,70 (s, 3 H, CH₃), 3,65 (s, 2H, CH₂), 2,36 (s, 3 H, CH₃), 1,32-1,34 (d, 3 H, J=7,2 Hz, CH₃).

25 *La indometacin-N-(4-metoxicarbonilbencil)amida (compuesto 27)* se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 40:60) como sólido amarillo (198 mg, 47%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,91-7,94 (d, 2 H, J=6,8 Hz, ArH), 7,61-7,65 (d, 2H, J=8,7 Hz, ArH), 7,45-7,48 (d, 2H, J=9,0 Hz, ArH), 7,19-7,21 (d, 2H, J=8,3 Hz, ArH), 6,83-6,88 (m, 2H, ArH), 6,68-6,88 (m, 2H, ArH), 6,68-6,72 (dd, 1H, J=9,0 Hz y 2,4 Hz, ArH), 5,97-5,99 (bt, 1H, J=5,9 Hz, NH), 4,45-4,47 (d, 2H, J=6,1 Hz, CH₂), 3,90 (s, 3H, CH₃), 3,83 (s, 3H, CH₃), 3,72 (s, 2H, CH₂), 2,38 (s, 3H, CH₃).

30 *La indometacin-N-(4-metoxicarbonilmetilfenil)amida (compuesto 28)* se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 20:80) como sólido amarillo (100 mg, 23%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,67-7,70 (d, 2H, J=8,5 Hz, ArH), 7,48-7,51 (d, 2H, J=8,5 Hz, ArH), 7,33-7,36 (d, 2H, J=8,4 Hz, ArH), 7,18-7,23 (d y bs, 3 H, ArH y NH), 6,92-6,93 (d, 1H, J=2,3 Hz, ArH), 6,85-6,88 (d, 1H, J=9,0 Hz, ArH), 6,70-6,73 (dd, 1H, J=9,0 Hz y 2,0 Hz, ArH), 3,81 (s, 5H, CH₂ y CH₃), 3,67 (s, 3H, CH₃), 3,56 (s, 3H, CH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃).

35 *La indometacin-N-(2-pirazinil)amida (compuesto 29)* se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 30:70 a 50:50) como sólido amarillo brillante (251 mg, 69%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 9,58 (d, 1 H, J=1,4 Hz, ArH), 8,33-8,34 (d, 1 H, J=2,5 Hz, ArH), 8,16-8,17 (m, 1 H, ArH), 7,86 (bs, 1 H, NH), 7,69-7,71 (d, 2H, J=8,5 Hz, ArH), 7,49-7,51 (d, 2H, J=8,5 Hz, ArH), 6,92-6,93 (d, 1H, J=2,4 Hz, ArH), 6,84-6,87 (d, 1H, J=8,9 Hz, ArH), 6,70-6,72 (dd, 1H, J=9,0 Hz y 2,5 Hz, ArH), 3,86 (s, 2H, CH₂), 3,81 (s, 3H, CH₃), 2,47 (s, 3H, CH₃).

40 *La indometacin-N-2-(4-metiltiazolil)amida (compuesto 30)* se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 30:70 y a continuación 70:30) para proporcionar los productos puros como un sólido amarillo pálido que fue recristalizado a partir de etiléter (241 mg, 63%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 8,68 (bs, 1H, NH), 7,70-7,74 (d, 2 H, J=9,0 Hz, ArH), 7,48-7,52 (d, 2H, J=9,0 Hz, ArH), 6,79-6,85 (m, 2 H, ArH), 6,67-6,71 (dd, 1 H, J=9,0 Hz y 2,4 Hz, ArH), 6,52 (s, 1 H, tiazol-H), 3,88 (s, 2 H, CH₂), 3,79 (s, 3 H, CH₃), 2,45 (s, 3 H, CH₃), 2,27 (s, 3 H, CH₃).

45 *La indometacin-N-(4-bifenil)amida (compuesto 31)* se obtuvo mediante cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc: hexanos; 30:70) para proporcionar los productos puros como un sólido amarillo pálido (421 mg, 59%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,68-7,71 (d, 2 H, J=8,4 Hz, ArH), 7,32-7,55 (m, 11 H, ArH), 6,95-6,96 (d, 1 H, J=2,0 Hz, ArH), 6,86-6,89 (d, 1 H, J=1,7 Hz, ArH), 3,83 (s, 2 H, CH₂), 3,81 (s, 3 H, CH₃), 2,47 (s, 3 H, CH₃).

50 Las estructuras y los valores de IC₅₀ para la indometacina y los compuestos del 1 al 31 se representan en la tabla que hay a continuación.




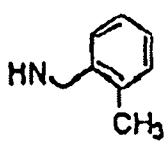
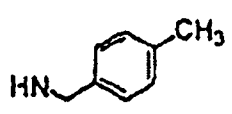
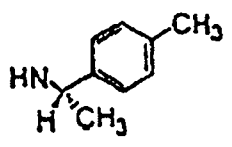
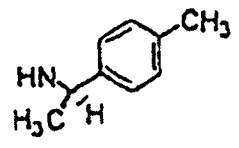
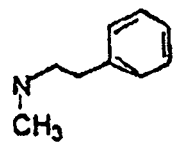

60

65

TABLA

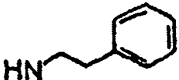
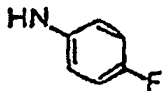
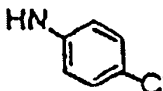
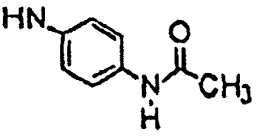
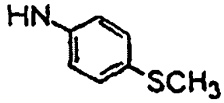
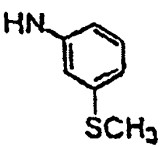
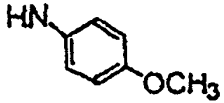
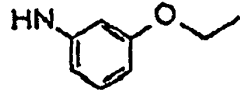
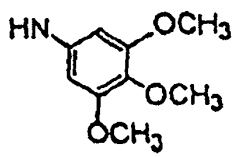
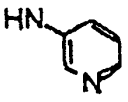
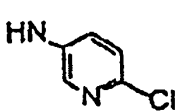
Inhibición selectiva de la COX-2 mediante derivados de amidas de indometacina

5

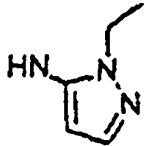

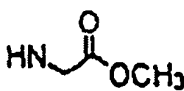
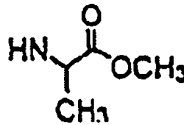
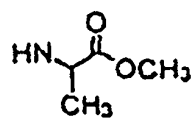
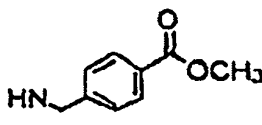
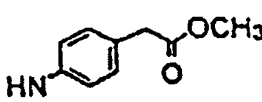
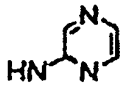
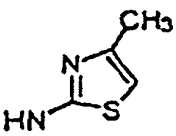
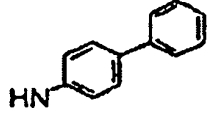
Compuesto	R	IC ₅₀ (μM) ^a		Selectividad ^b
		COX-2	COX-1	
Indometacina	OH	0.75	0.05	0.066
1	NHCH ₃	0.70	> 66 ^c	> 94
2		0.25	> 66	287
3		0.0375	66	1760
4		0.04	16.5	412.5
5		0.15	> 66 ^c	>440
6		0.06	.8.0	133
7		0.0625	4.0	64
8		0.20	4.0	20
9 (Comparación)		> 33 ^c	> 66	---
10 (Comparación)		> 33 ^c	> 66	---

60

65

Compuesto	R	IC ₅₀ (μM) ^a		selectividad ^b
		COX-2	COX-1	
11		0.06	> 66	> 1100
12		0.06	> 66 ^c	> 1100
13		0.062	> 66 ^c	> 1064
14		0.12	> 66 ^c	> 550
15		0.12	> 66 ^c	> 550
16		0.22	> 66 ^c	> 300
17		0.056	> 66 ^c	> 1178
18		0.65	52.5	81
19		> 1.0	> 66 ^c	> 66
20		0.052	> 66 ^c	> 1269
21		0.047	> 66 ^c	> 1404

ES 2 288 039 T3

Compuesto	R	IC ₅₀ (μM) ^a		selectividad ^b
		COX-2	COX-1	
22		0.70	> 66 ^c	> 94
23		0.050	45	900
24		4.0	> 66	> 16.5
25		0.4	> 66	> 165
26		0.19	> 66	> 347
27		0.080	> 66	> 825
28		0.058	> 66	> 1138
29		4.0	> 66	> 16.5
30		4.0	> 66	> 16.5
31		0.5	> 66	> 132

^a Los valores IC₅₀ se determinaron mediante incubación de varias concentraciones de inhibidor en DMSO con COX-2 humana (66 nM) o COX-1 ovina (44 nM) durante 20 minutos, seguido de tratamiento con 1-¹⁴C-AA (50 μM) a 37°C durante 30 segundos. Los análisis se hicieron dos veces.

^b Proporción de IC₅₀(COX-1):IC₅₀(COX-2).

^c >80% restante de actividad COX-1 a esa concentración.

*Discusión de derivados de amidas secundarias de indometacina**Derivados de amidas secundarias de ácidos alifáticos carboxílicos de indometacina*

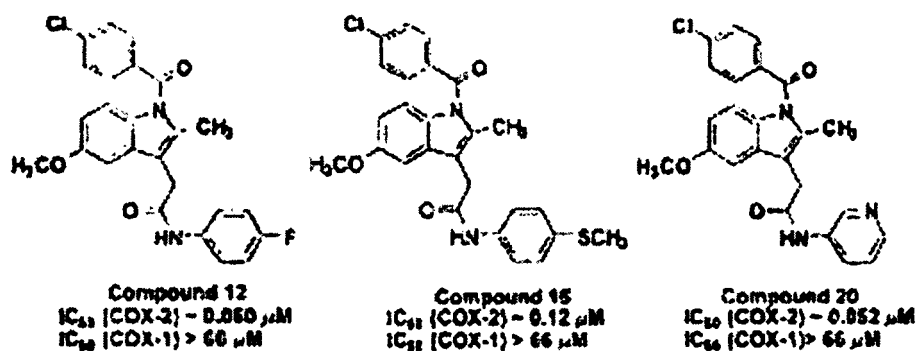
El derivado N-metilamida (compuesto 1) mostró inhibición selectiva de la COX-2 (IC_{50} (COX-2) 0,70 μ M; IC_{50} (COX-1) >66 μ M). Los incrementos en la potencia y la selectividad inhibitoras de la COX-2 se observaron con el homólogo octilo mayor (compuesto 3); no obstante, otro aumento en la longitud de la cadena del derivado nonil (compuesto 4) fue causa de cierta pérdida de selectividad de la COX-2 (compuesto 3: IC_{50} (COX-2) 37,5 nM; IC_{50} (COX-1) 66 μ M; compuesto 4: IC_{50} (COX-2) ~40 nM; IC_{50} (COX-1) ~16,5 μ M).

Derivados de amidas secundarias aromáticas de ácidos carboxílicos de indometacina

La incorporación de unidades espaciadoras de metileno (compuesto 11) entre el nitrógeno de amida y el anillo de fenilo también generó inhibidores potentes y selectivos de la COX-2.

Por ejemplo, el derivado 4-metilbencilamida (compuesto 6) era 133 veces más selectivo para la COX-2, mientras que el isómero 2-metilbencil correspondiente (compuesto 5) era más de 440 veces más selectivo como inhibidor de la COX-2. Además, el enantiómero R-metil-(4-metilbencil) (compuesto 7) era un mejor inhibidor de la COX-2 que el enantiómero S-metil correspondiente (compuesto 8).

Adicionalmente, las amidas aromáticas que contenían el 4-fluoro (compuesto 12), 4-metilmercapto (compuesto 15) o el otro sustituyente 3-piridil (compuesto 20), mostraban inhibición potente y selectiva de la COX-2, tal como se indica a continuación.

*Amidas terciarias (comparación de los compuestos 9 y 10)*

Otro aspecto interesante en los estudios SAR con las amidas de indometacina fue que los derivados de amidas *N,N*-metil-2-fenil (compuesto 9) y piperidinil (compuesto 10), ambos amidas terciarias, eran inactivos contra la COX-2. En otras palabras, sólo las amidas secundarias eran inhibidores selectivos de la COX-2, mientras que las amidas terciarias carecían de cualquier efecto inhibitor hacia cualquiera de las dos isoenzimas, es decir, la determinación de la inhibición de la COX-2 por parte de amidas terciarias se detuvo en un valor de CI extremadamente alto (véase el valor 33 para ambos compuestos 9 y 10) y la actividad de la COX-1 siguió manteniéndose >80%.

Ejemplo II

Comparación con sulfonamidas de otro estudio

Previamente se ha hecho mención de un estudio SAR similar de Li y otros publicado en la revista indicada anteriormente relativo a sulfonamidas ácidas. (Véase las estructuras dibujadas anteriormente para los compuestos L-745.337 y NS-398.) Específicamente, Li y otros descubrieron que la sustitución del protón N-H en la parte $NHSO_2CH_3$ de L-745.337 o de NS-398 por un grupo metilo era causa de la pérdida total de potencia inhibitor para cualquiera de las dos isoenzimas COX-1 y COX-2.

Este comportamiento puede explicarse a partir de la resolución reciente de la estructura cristalina de la COX-2 murina con NS-398. Véase Kurumbail y otros, "Abstract 197, Eicosanoids and Other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases", *Fifth International Conference*, La Jolla, California (17-20 de septiembre de 1997). A diferencia de los diarilheterocíclicos, el NS-398 no utiliza el bolsillo lateral a pesar de que contiene un grupo sulfonamida. En lugar de ello, la sulfonamida se une a Arg106 de una manera similar a la de los AINE que contienen ácido carboxílico.

Aunque los derivados de amidas secundarias de ácido carboxílico de indometacina de la presente invención no contienen ningún sustituyente captador de electrones, las observaciones de SAR discutidas anteriormente sobre la falta de inhibición de los derivados de amidas terciarias de ácido carboxílico sugieren que el grupo $-CONH-R_1$ proba-

blemente se une a un grupo de la enzima (véase anteriormente). Esto puede constatarse tras contrastar los datos que aparecen a continuación para los derivados de amidas secundarias de la invención (compuesto 11) con la comparación de derivados de amidas terciarias (compuestos 9 y 10) y el derivado de comparación del compuesto NS-398 de la técnica anterior en el cual el protón N-H de la parte NHSO_2CH_3 fue remplazado por metilo.

5

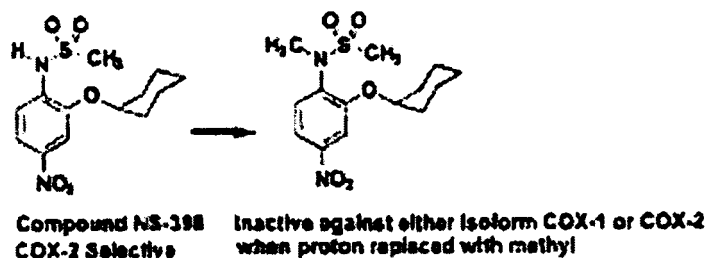
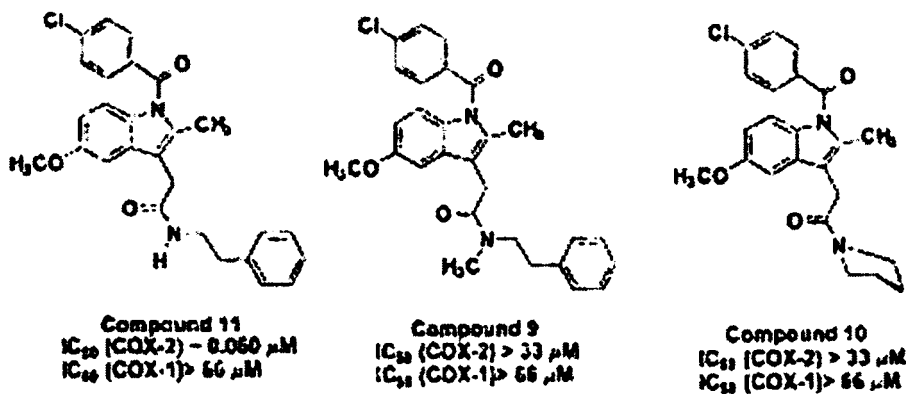
10

15

20

25

30



35

Ejemplo III

Comprobación de la actividad inhibidora adicional con COX de ratón

40

45

50

Compuesto 11. La base estructural de la selectividad de la COX-2 por parte del compuesto 11 también se probó mediante mutagénesis dirigida. Más particularmente, la potencia inhibidora de la indometacina comparada con la de la indometacin-*N*-fenetilamida (compuesto 11) se evaluó frente a mutantes murinos de la COX-2 dirigidos al sitio (Arg106Gln y Tyr341Ala) que representan residuos clave implicados en la unión de los AINE que contienen ácido carboxílico. La Arg106 es el único residuo cargado positivamente del sitio de unión del ácido graso y es importante para la unión entre la parte del ácido carboxílico de un AINE y Tyr341Ala, que se halla yuxtapuesta a ARG106 en el sitio de constricción y es responsable de la unión selectiva de los *S*-enantiómeros pero no de los *R*-enantiómeros en la clase 2-fenilpropionato de los AINE, incluido el ibuprofeno. Además de estos mutantes, también se analizó el perfil de inhibición del mutante Val509IleArg499HisVal420Ile (también conocido como el mutante VRV) que incorpora los principales cambios de aminoácidos entre la COX-1 y la COX-2 en la región del bolsillo lateral y es responsable de la unión de los diarilheterociclos. Los resultados fueron que la indometacina mostraba una potencia ligeramente superior contra la COX de ratón de tipo salvaje que el compuesto 11 (indometacina: IC_{50} (COX-2 de ratón) ~25 nM; compuesto 11: IC_{50} (COX-2 de ratón) ~35 nM). Además, el Tyr341Ala y el mutante triple VRV eran resistentes a la inhibición por parte de la indometacina y del compuesto 11, mientras que el mutante Arg106Gln era resistente a la inhibición por parte de la indometacina pero era eficazmente inhibido por el compuesto 11 (IC_{50} ~25 nM).

55

60

Compuesto 17. La inhibición por parte del compuesto de la actividad de la COX-2 en células de ratón intactas fue analizada en macrófagos murinos RAW264.7 en los que la actividad de la COX-2 era inducida por estímulos patológicos. Los macrófagos se trataron con LPS (500 ng/ml) y con interferón- γ (10 U/ml) durante 7,5 horas para inducir COX-2 y a continuación se trataron con varias concentraciones del derivado de indometacina 4-metoxifenilamida (compuesto 17) durante 30 minutos a 37°C. El valor de IC_{50} para PGD2 mediante el compuesto 17 era de 62,5 nM. Bajo estas condiciones, la indometacina era un mejor inhibidor de la actividad de la COX-2 en células murinas intactas (IC_{50} ~10 nM) que el compuesto 17.

65

En realidad, la comparación de la potencia de la indometacina como inhibidor de la COX-2 de ratón purificada frente a la COX-2 humana purificada reveló que la indometacina mostraba mayor inhibición de la enzima de ratón que de la isoforma humana (IC_{50} (COX-2 de ratón) ~350 nM; IC_{50} (COX-2 humana) ~1 μM). Por otro lado, un derivado de amidas de indometacina (compuesto 11) era un mejor inhibidor de la COX-2 humana que de la COX-2 murina (compuesto 11: IC_{50} (COX-2 de ratón) ~120 nM; IC_{50} (COX-2 humana) ~75 nM).

ES 2 288 039 T3

Estos resultados también refuerzan observaciones anteriores de otro científico que sugiere que las enzimas COX de rata son farmacológicamente distintas de las de los humanos, tal como se notificó en Ramesha, "Human and Rat Cyclooxygenases are Pharmacologically Distinct", *Adv. Exp. Med. Biol.* (1997) Vol. 407, págs. 67-71.

5 Ejemplo IV

Comprobación de la reducción de la inflamación

10 El compuesto 14 se probó en un análisis estándar de inflamación *in vivo*, el modelo de edema de la almohadilla de la pata de la rata. Este análisis ha sido muy utilizado en la industria farmacéutica para evaluar compuestos antiinflamatorios. Se inyectó a ratas carragenina, que desencadena un rápido edema (inflamación) antes de tres horas que puede determinarse cuantitativamente por desplazamiento de volumen. La administración de una única dosis del compuesto 14 (2 mg/kg) por vía oral al cabo de 1 hora de la inyección de carragenina causó una disminución radical de la inflamación.

15 En estos experimentos, la carragenina inyectada se hallaba en 0,1 ml de disolución salina acuosa de modo que el aumento de volumen de 0,1 ml se debía únicamente a la inyección. Teniendo esto en cuenta, tras el tratamiento con el compuesto 14 se observó una reducción de la inflamación de aproximadamente un 80-85%. Para comparar, en este análisis también se probó la indometacina a una dosis de 2 mg/kg por vía oral y se observó una reducción comparable de la inflamación.

20 Más específicamente, los machos de rata Sprague-Dawley (150 g) recibieron una inyección subplantar de carragenina (0,1 ml de una suspensión de carragenina al 1% en solución salina estéril) en la pata trasera derecha mientras eran levemente anestesiados con metoxiflurano. Al cabo de 1 hora de la inyección, se les administraron mediante sonda nasogástrica 0,5 ml de un aceite de maíz que contenía 90 μ l de DMSO o 90 μ l de compuesto 14 para las dosis especificadas a continuación. Para calcular la presencia de edema, se determinó con un pletismómetro de desplazamiento de agua el volumen ipsolateral de la almohadilla de la pata (ml) al cabo de 3 horas (t =3) de la inyección y se comparó con el volumen de la almohadilla en el momento anterior a la inyección (t =0).

30 Para cada dosis, se inyectó a 6 ratas y los resultados se resumen a continuación.

Compuesto 14		
<u>Concentración</u> (mg/ml)	<u>Edema a las 3</u> horas (ml)	<u>Desviación</u> estándar
0	0,87	0,1
0,2	0,55	0,04
0,5	0,47	0,07
1,0	0,39	0,03
2,0	0,38	0,07

50 Ejemplo V

Comprobación de la inhibición tumoral

55 Se determinó la capacidad del compuesto 11 para inhibir el crecimiento de una estirpe celular de cáncer de colon humano en ratones desnudos (análisis de xenotrasplante tumoral humano). Tras la inoculación subcutánea de los ratones con las células tumorales humanas, los animales recibieron tres inyecciones semanales por vía peritoneal que sólo contenían excipiente o con un excipiente que contenía 5 mg/kg de compuesto 11.

60 Más específicamente, los machos de ratón atímico (nu/nu) Harlan Sprague-Dawley de 6-8 semanas de vida (de 25 g de peso) recibieron una inyección intraperitoneal de 100 μ l de excipiente (etanol al 5%, Tween 80 al 5% en PBS acuosa estéril) o 100 μ l de compuesto 11 en excipiente inmediatamente antes del implante subcutáneo de 5 x 10⁶ células HCA-7 (adenocarcinoma de colon humano, colonia 29) y en PBS en la superficie dorsal. Los ratones, 5 animales por grupo, recibieron tres inyecciones semanales de excipiente o de excipiente que contenía el compuesto 11 (5 mg/kg). El volumen del tumor se determinó por medición externa con un calibrador electrónico.

65 De la comparación del crecimiento de los tumores, tal como se resume a continuación, puede verse que el compuesto 11 inhibió considerablemente el crecimiento del tumor.

ES 2 288 039 T3

<u>Día del explante</u>	<u>Tumor de control</u> (vol. tumor en cm ³)	<u>Compuesto 11 (vol.</u> <u>tumor en cm³)</u>
22	0,34	0,10
25	0,47	0,11
27	0,62	0,13
29	0,70	0,14
31	0,76	0,17

Se comprenderá que varios de los detalles de la invención pueden modificarse sin alejarse del alcance de la invención. Además, la descripción anterior es sólo con el propósito de ilustrar y no de limitar la invención definida por las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un derivado de amida secundaria de indometacina, en el que el derivado:

- 5 a) es selectivo para la inhibición de ciclooxigenasa 2; y
b) es un derivado de amidas secundarias aminoalquil, aminoaril, aminoéter o aminopiridinil del grupo ácido carboxílico de indometacina,

10 para la preparación de un medicamento que contiene una cantidad eficaz de dicho derivado, suficiente para inhibir un cáncer en un animal vertebrado de sangre caliente, incluidos los humanos.

2. Uso de la reivindicación 1, en el que el derivado tiene actividad antiangiogénica.

15 3. Uso de la reivindicación 1, en el que el derivado inhibe el crecimiento de un tumor.

4. Uso de la reivindicación 3, en el que el derivado también posee una propiedad analgésica, antiinflamatoria o antipirética en el animal.

20 5. Uso de la reivindicación 1, en el que el derivado de amidas secundarias se selecciona a partir del grupo que consta de indometacin-N-metilamida, indometacin-N-etan-2-olamida, indometacin-N-octilamida, indometacin-N-nonilamida, indometacin-N-(2-metilbencil)amida, indometacin-N-(4-metilbencil)amida, indometacin-N-((R)-,4-dimetilbencil)amida, indometacin-N-((S)-,4-dimetilbencil)amida, indometacin-N-(2-fenetfil)amida, indometacin-N-(4-fluorofenil)amida, indometacin-N-(4-clorofenil)amida, indometacin-N-(4-acetamidofenil)amida, indometacin-N-(4-metilmercapto)fenilamida, indometacin-N-(3-metilmercaptofenil)amida, indometacin-N-(4-5-metoxifenil)amida, indometacin-N-(3-etoxifenil)amida, indometacin-N-(3,4,5-trimetoxifenil)amida, indometacin-N-(3-piridil)amida, indometacin-N-((2-cloro)piridil)amida, indometacin-N-5-((1-etil)pirazolo)amida, indometacin-N-(3-cloropropil)amida, indometacin-N-metoxicarbonil-metilamida, indometacin-N-2-(2-L-metoxicarboniletil)amida, indometacin-N-2(2-D-metoxicarboniletil)amida, indometacin-N-(4-metoxicarbonilbencil)amida, indometacin-N-(4-metoxicarbonilmetilfenil)amida, indometacin-N-(2-pirazinil)amida, indometacin-N-2-(4-metiltiazolil)amida, indometacin-N-(4-bifenil)amida y combinaciones de las mismas.

35 6. Uso de la reivindicación 1, en el que la cantidad suficiente eficaz de tratamiento para inhibir el cáncer se halla entre aproximadamente 0,5 miligramos y aproximadamente 7,0 miligramos diarios por kilo de peso corporal del animal.

40 7. Uso de la reivindicación 1, en el que la cantidad suficiente eficaz de tratamiento para inhibir el cáncer se halla entre aproximadamente 1,5 miligramos y aproximadamente 6,0 miligramos diarios por kilo de peso corporal del animal.

45 8. Uso de la reivindicación 1, en el que la cantidad suficiente eficaz de tratamiento para inhibir el cáncer se halla entre aproximadamente 2,0 miligramos y aproximadamente 5,0 miligramos diarios por kilo de peso corporal del animal.