



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 298 497**

⑤1 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **03705859 .1**

⑧6 Fecha de presentación : **23.01.2003**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1470122**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **27.10.2004**

⑤4 Título: **Inhibidores de quinasa Rho.**

③0 Prioridad: **23.01.2002 US 349986 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

⑦3 Titular/es: **Bayer Pharmaceuticals Corporation**
400 Morgan Lane
West Haven, Connecticut 06516, US

⑦2 Inventor/es: **Nagarathnam, Dhanapalan;**
Dumas, Jacques;
Hatoum-Mokdad, Holia;
Boyer, Stephen y
Pluempe, Hans

⑦4 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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).

5 Campo de la invención

Antecedentes

dades cardiovasculares tales como la hipertensión (Uehata, y col. Nature 1997, 389, 990), la aterosclerosis (Retzer, y col. FEBS Lett. 2000, 466, 70), la restenosis (Eto, y col. Am J. Physiol Heart Circ Physiol 2000, 278, H1744; Negoro, y col. Biochem Biophys Res Commun 1999, 262, 211), la isquemia cerebral (Uehata, y col. Nature 1997, 389, 990; Seasholtz y col., Circ Res 1999, 84, 1186; Hitomi, y col. Life Sci 2000, 67, 1929; Yamamoto, y col. J Cardiovasc Pharmacol 2000, 35, 203), el vasoespasmo cerebral (Sato, y col. Circ Res 2000, 87, 195; Kim, y col. Neurosurgery 2000, 46, 440), la disfunción eréctil peniana (Chitaley, y col. Nat Med 2001, 7, 119), los trastornos del sistema nervioso central tales como la degeneración neuronal y la lesión de la médula espinal (Hara, y col. J Neurosurg 2000, 93, 94; Toshima, y col. Stroke 2000, 31, 2245) y en las neoplasias donde se ha demostrado que la inhibición de la quinasa Rho inhibe el crecimiento de las células tumorales y la metástasis (Itoh, y col. Nat Med 1999, 5, 221; Somlyo, y col. Biochem Biophys Res Commun 2000, 269, 652), la angiogénesis (Uchida, y col., Biochem Biophys Res Commun 2000, 269, 633; Gingras, y col. Biochem J 2000, 348 Pt 2, 273), los trastornos trombóticos arteriales tales como la agregación de plaquetas (Klages, y col. J. Cell Biol 1999, 144, 745; Retzer y col. Cell Signal 2000, 12, 645) y la agregación de leucocitos (Kawaguchi, y col., Eur J Pharmacol 2000, 403, 203; Sánchez-Madrid, y col., Embo J 1999, 18, 501), el asma (Setoguchi, y col. Br J Pharmacol 2001, 132, 111; Nakahara, y col. Eur J Pharmacol 2000, 389, 103), la regulación de la presión intraocular (Honjo, y col. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001, 42, 137) y la resorción de hueso (Chellaiah, y col. J Biol Chem 2000, 275, 11993; Zhang, y col. J Cell Sci 1995, 108, 2285).

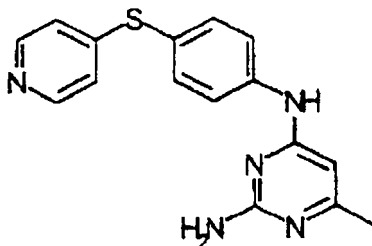
La inhibición de la actividad de la quinasa Rho en pacientes tiene beneficios para controlar los vasoespasmos cerebrales y la isquemia que siguen a la hemorragia subaracnoidea (Pharma Japan 1995, 1470, 16).

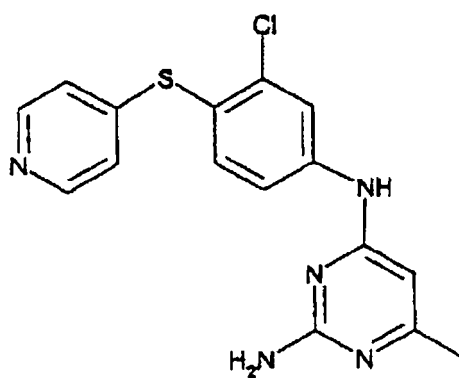
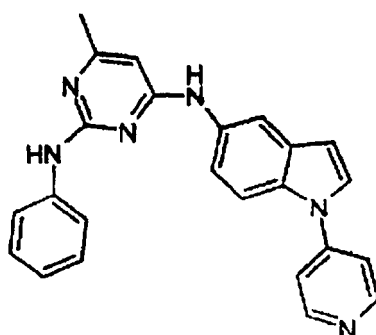
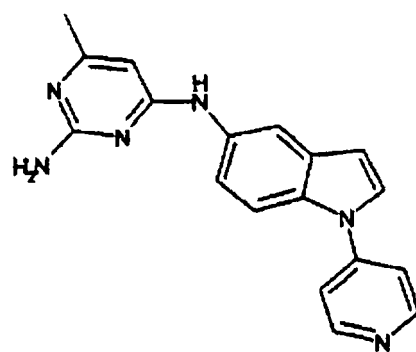
Sumario de la invención

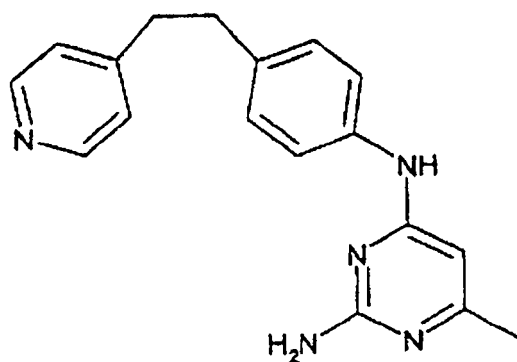
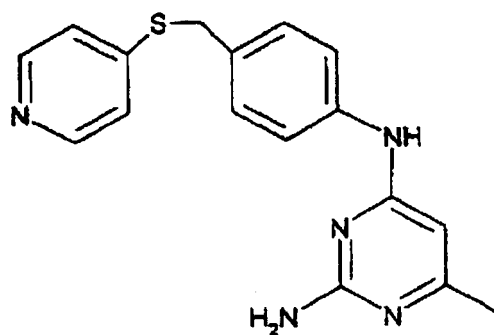
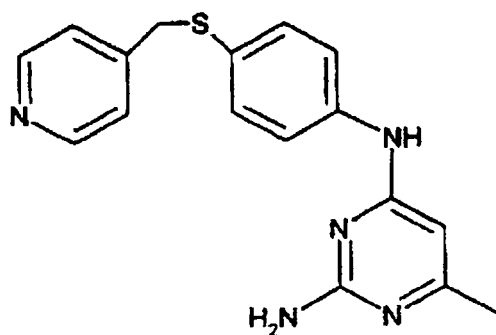
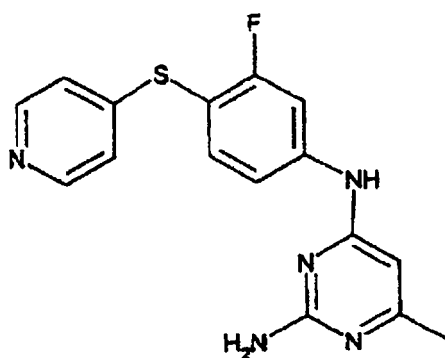
Los compuestos y sus derivados presentados en esta invención son útiles como inhibidores de la quinasa Rho y por tanto tienen utilidades en el tratamiento de la hipertensión, la aterosclerosis, la restenosis, la isquemia cerebral, el vasoespasmo cerebral, la degeneración neuronal, la lesión de la médula espinal, los cánceres de mama, colon, próstata, ovarios, cerebro y pulmón y sus metástasis, los trastornos trombóticos, el asma, el glaucoma y la osteoporosis.

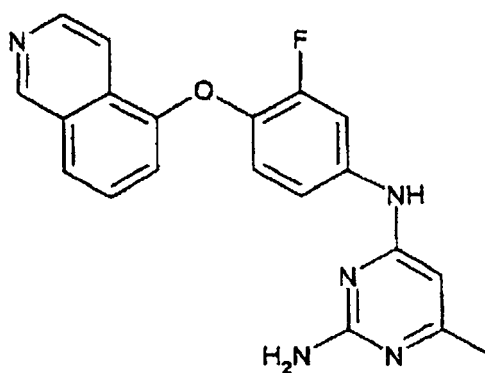
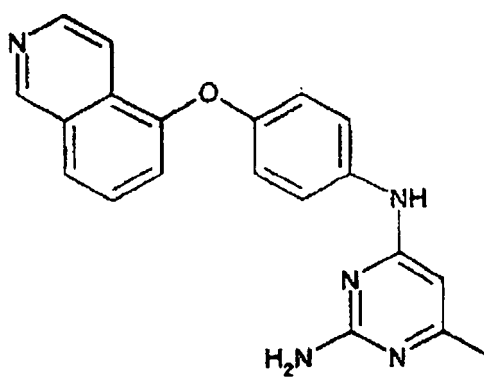
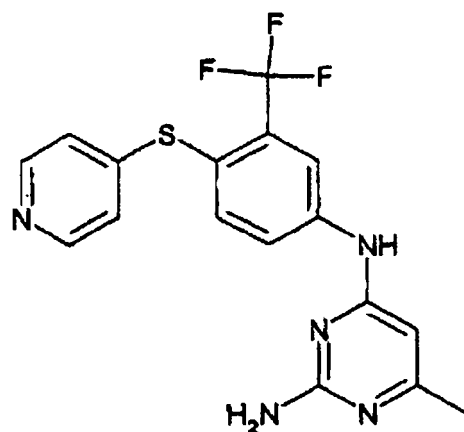
Además, los compuestos de la invención son útiles para tratar la disfunción eréctil, esto es, la disfunción eréctil mediada por la quinasa Rho. La disfunción eréctil puede ser definida como una incapacidad para obtener o mantener una erección adecuada para el coito, documentos WO 94/28902, U.S.P. 6.103.765 y U.S.P. 6.124.461.

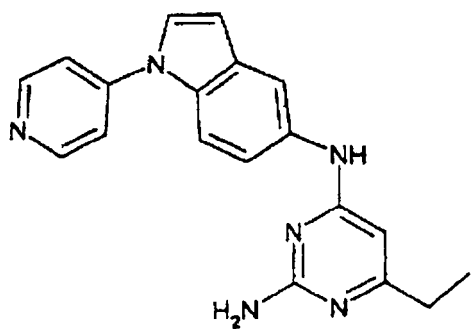
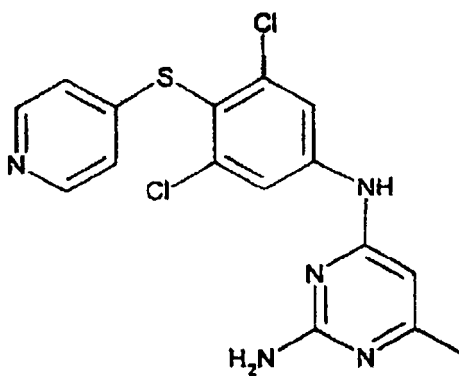
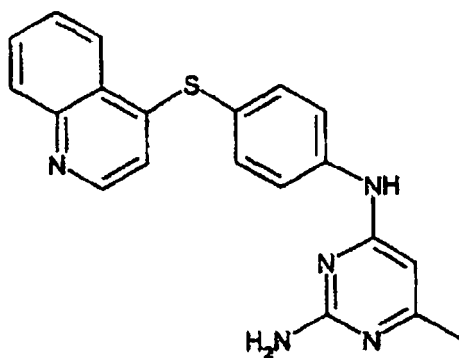
La invención implica compuestos de las estructuras siguientes:

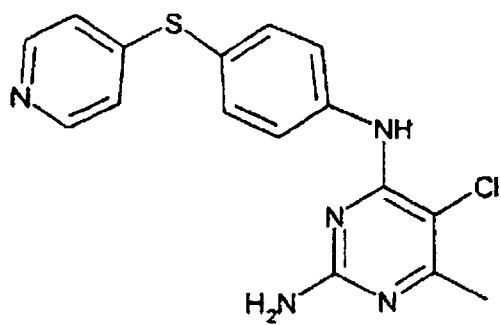
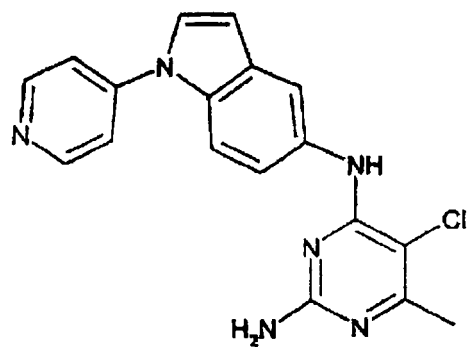
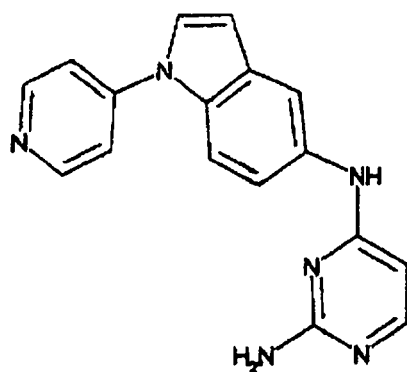


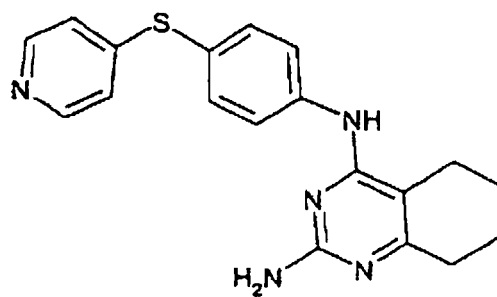
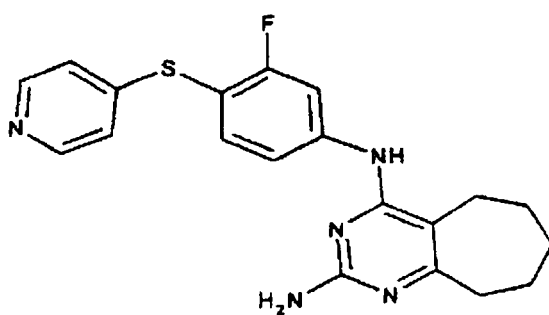
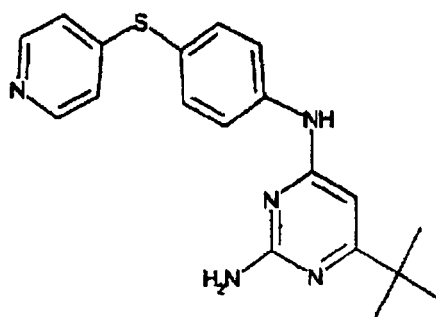
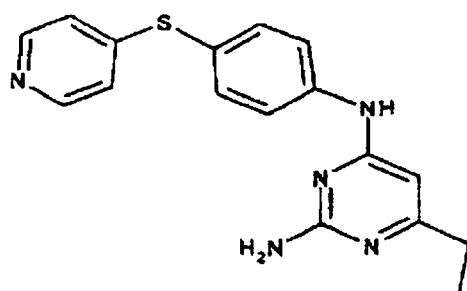


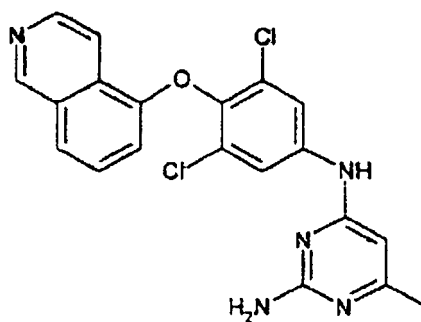
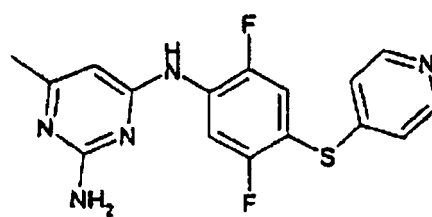
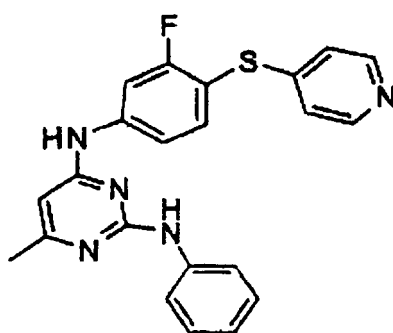
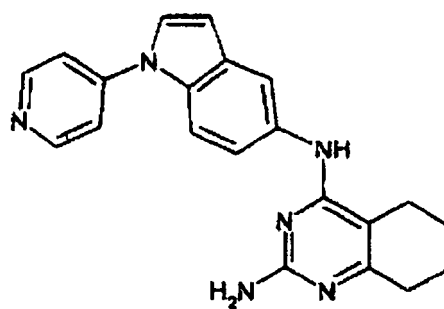




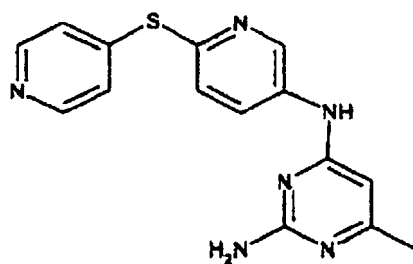






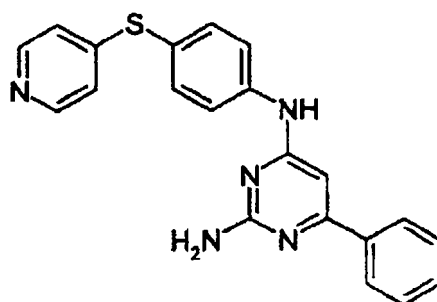


5



10

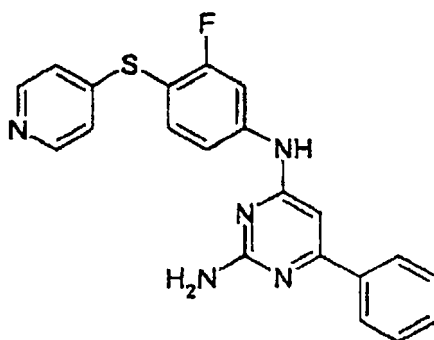
15



20

25

30

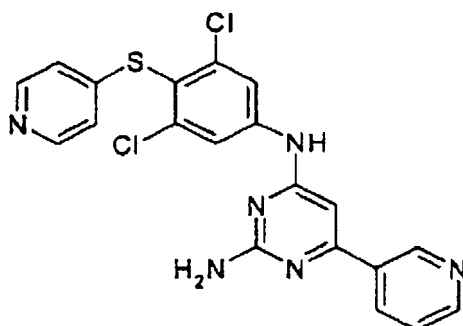


35

40

45

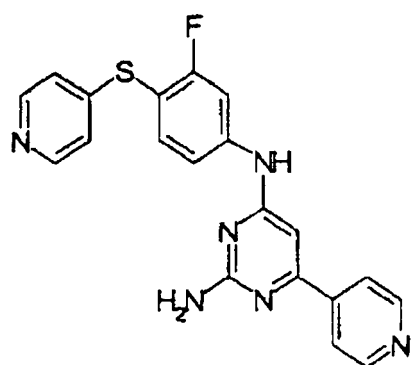
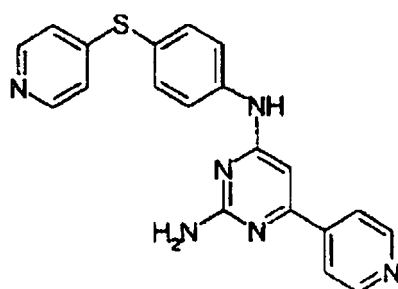
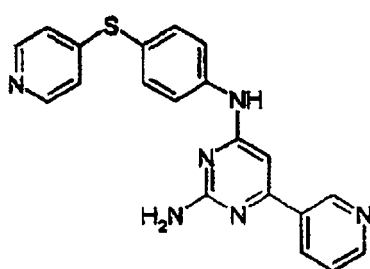
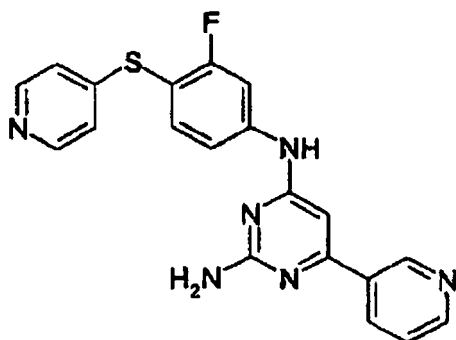
50

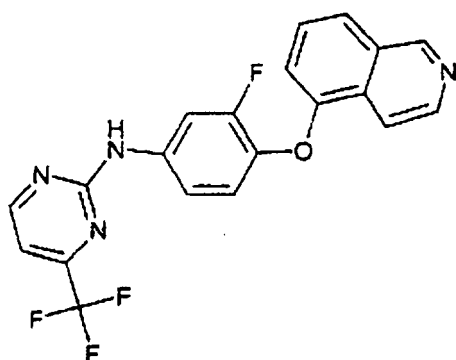
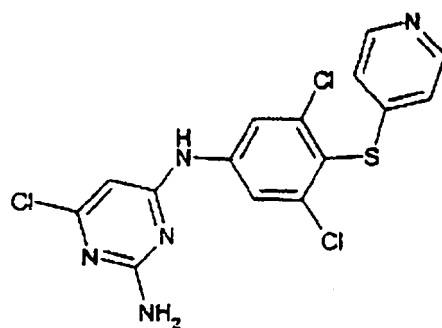
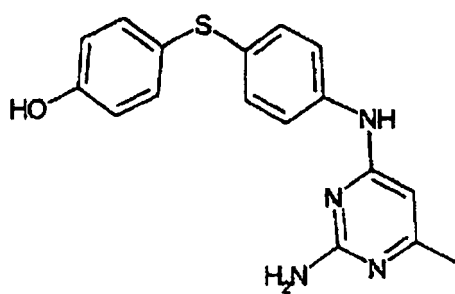
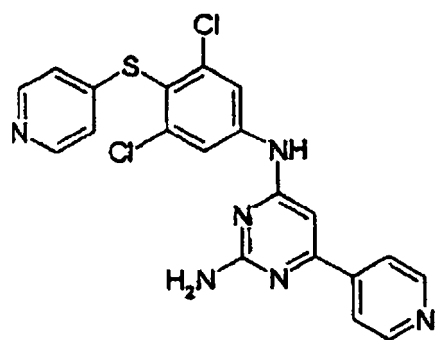


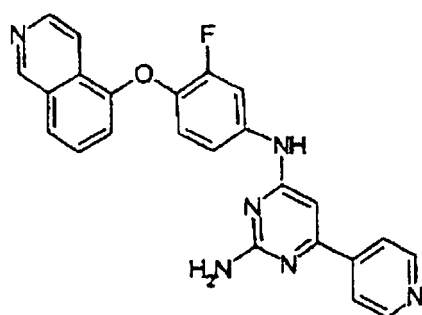
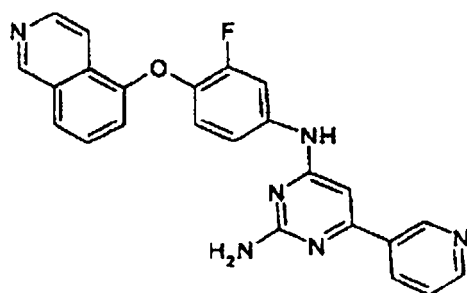
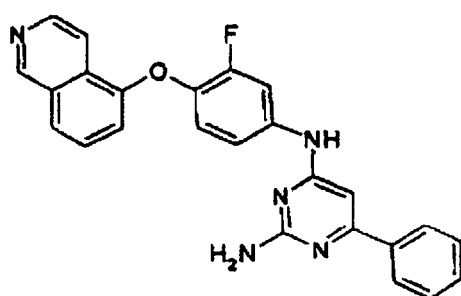
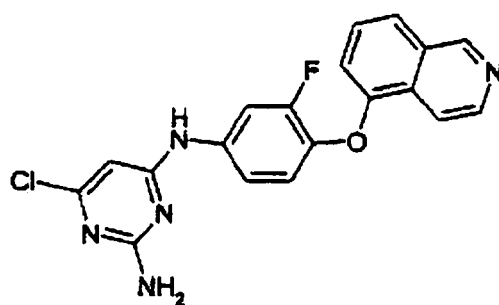
55

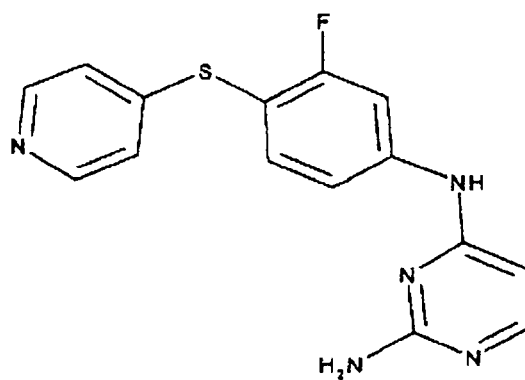
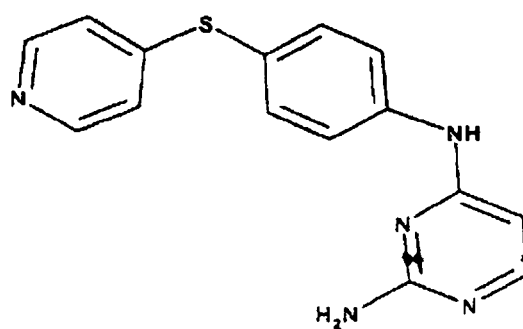
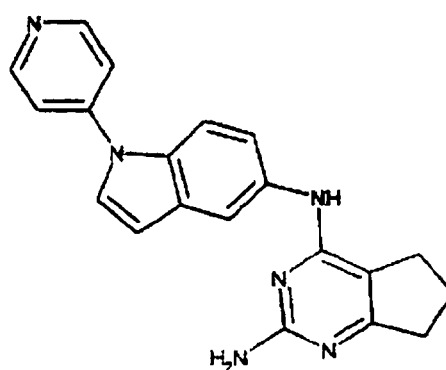
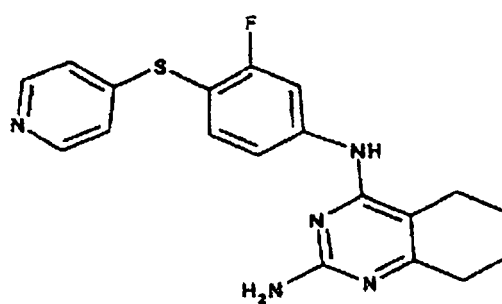
60

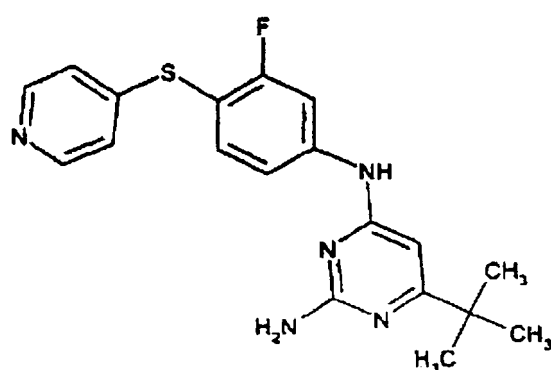
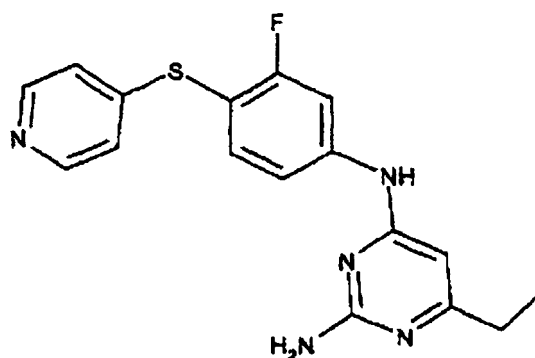
65











Los compuestos de la Fórmula I se pueden elaborar de acuerdo con procedimientos químicos convencionales, rutinarios, y/o como se describe más abajo, a partir de materiales de partida que están o bien disponibles en el mercado o bien producibles de acuerdo con procedimientos químicos convencionales, rutinarios. Los procedimientos para la preparación de los compuestos se dan más abajo en los Ejemplos.

En los siguientes ejemplos, todas las temperaturas se exponen sin corregir en grados Celsius; y, a menos que se indique otra cosa, todas las partes y porcentajes son en peso.

La descripción completa de todas las solicitudes, patentes y publicaciones, citadas anteriormente o a continuación, y la Solicitud Provisional N° 60/349.986, presentada el 23 de enero de 2002, se incorporan en el presente documento por referencia.

Abreviaturas y acrónimos

Cuando se utilizan las siguientes abreviaturas en la presente memoria descriptiva, tienen el siguiente significado:

Ac ₂ O	anhídrido acético
anhi	anhidro
n-BuOH	n-butanol
t-BuOH	t-butanol
CD ₃ OD	metanol-d ₄
Celite®	agente de filtración de tierra de diatomeas, ® Celite Corp.
CH ₂ Cl ₂	cloruro de metileno
CI-MS	espectroscopia de masas de ionización química
conc	concentrado
desc	descomposición

	DME	dimetoxietano
	DMF	N,N-dimetilformamida
5	DMSO	dimetilsulfóxido
	ELSD	detector evaporativo de dispersión de luz
	EtOAc	acetato de etilo
10	EtOH	etanol (100%)
	Et ₂ O	éter dietílico
15	Et ₃ N	triethylamina
	HPLC ES-MS	cromatografía líquida de alta resolución-espectroscopia de masas de electropulverización
	NMM	4-metilmorfolina
20	Ph ₃ P	trifenilfosfina
	Pd(dppf)Cl ₂	[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]-dicloropaladio(II)
	Pd(PPh ₃) ₄	tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0)
25	Pd(OAc) ₂	acetato de paladio
	P(O)Cl ₃	oxicloruro de fósforo
30	RT	tiempo de retención (HPLC)
	rt	temperatura ambiente
	THF	tetrahidrofurano
35	TFA	ácido trifluoroacético
	TCL	cromatografía en capa fina

Ejemplos experimentales

40 Todas las reacciones se realizaron en vidrio secado con llama o secado en horno bajo una presión positiva de argón seco, y se agitaron magnéticamente a no ser que se indique otra cosa. Los líquidos y soluciones sensibles se transfirieron a través de una jeringa o cánula, y se introdujeron en los vasos de la reacción a través de septos de goma. Los reactivos y disolventes de grado comerciales se usaron sin purificación adicional. La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó en placas de 250 μ m precubiertas con gel de sílice 60 A F-254 reforzadas con vidrio de Analtech UNIPATETM. La cromatografía en columna (cromatografía ultra-rápida) se realizó en un sistema Biotage usando cartuchos pre-envasados de gel de sílice, 60 A, de 32 - 63 micrómetros. La resonancia magnética nuclear de protón (¹H) (RMN) se midió con un espectrómetro Varian (300 MHz) con disolvente protonado residual (CHCl₃ δ 7,26; MeOH δ 3,30; DMSO δ 2,49) como patrón. Los espectros de masas de baja resolución (EM) se obtuvieron o bien como espectros de masas por impacto electrónico (IE) o bien como espectros de masas por bombardeo atómico rápido (BAR).

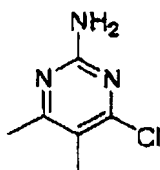
La designación IUPAC se obtuvo usando el servicio Web ACD/ILab.

55 A. Preparación de intermedios de cloropirimidina

Intermedio A1

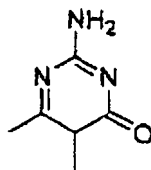
Preparación de 2-amino-4-cloro-5,6-dimetil-pirimidina

60



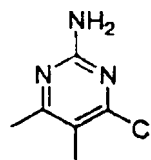
65

Etapa 1

Preparación de 2-amino-5,6-dimetil-pirimidinona

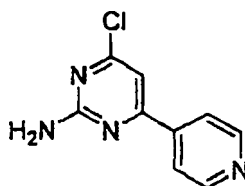
A una solución de 2-acetoacetato de etilo (6,0 g, 41,6 mmol) y carbonato de guanidina (5,6 g, 31,2 mmol) en EtOH (32 ml) se añadió HCl 12 N (350 μ l). La mezcla se mantuvo a reflujo durante 16 horas. Después, la reacción se enfrió a temperatura ambiente, el sólido se recogió por filtración y se lavó con EtOH. Una solución del sólido se mantuvo a reflujo en NaOH 1 N durante 3 horas. Después, la reacción se enfrió a temperatura ambiente, la mezcla acuosa se ajustó a pH = 5 con ácido acético concentrado. El precipitado resultante se recogió por filtración, se lavó con agua y después con hexanos, y se secó a vacío. El compuesto deseado (6,34 g, 45,6 mmol; rendimiento al 100%); ^1H RMN (D_2O ; NaOD) δ 1,47 (s, 3H), 1,29 - 1,30 (m, 2H), 1,22 (s, 3H); ES MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 140$.

Etapa 2

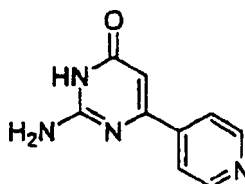
Preparación de 2-amino-4-cloro-5,6-dimetil-pirimidina

El producto de la etapa anterior (2,0 g, 14,4 mmol) y oxloruro de fósforo (6 ml, 57,5 mmol), se mantuvo a reflujo durante 4 horas. La reacción se enfrió a rt y se vertió sobre hielo. La mezcla se separó y la fase acuosa se extrajo con cloroformo (3 x 75 ml). La mezcla acuosa se ajustó a pH = 9 con hidróxido de amonio concentrado. El producto sólido resultante se recogió por filtración, se lavó con agua, y se secó en vacío. El compuesto deseado (963 mg, 6,1 mmol; rendimiento al 43%); mp = 212 - 220°C; ES MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 158$; TLC (CH_2Cl_2 - MeOH, 90:10); $R_f = 0,72$.

Intermedio A2

Preparación de 2-amino-4-cloro-6-(4-piridil)pirimidina

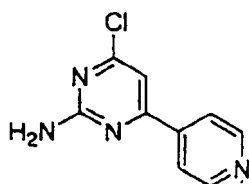
Etapa 1

Preparación de 2-amino-4-hidroxi-6-(4-piridil)pirimidina

Una solución de carbonato de guanidina (7,1 g, 39 mmol, 1,5 eq), isonicotinoil acetato de etilo (10 g, 51,76 mmol), y ácido clorhídrico (0,75 ml, 9,0 mmol) en etanol absoluto (80 ml) se mantuvo a reflujo bajo argón durante toda la noche. El precipitado formado se filtró, se lavó con etanol y se secó. Después el sólido se disolvió en NaOH 1 N (100 ml) y se mantuvo a reflujo durante 2 horas. La mezcla de la reacción se enfrió después a temperatura ambiente, se acidificó con ácido acético glacial, y el sólido formado se filtró y se secó para proporcionar el producto deseado en forma de un sólido blanco (5,45 g, 56%). ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ 6,24 (s, 1H), 6,79 (sa, 2H), 7,85 (d, $J=5,1$ Hz, 2H), 8,62 (d, $J=5,3$ Hz, 2H), 11,22 (sa, 1H).

Etapa 2

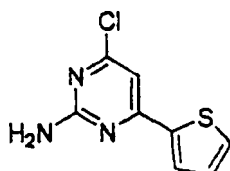
Preparación de 2-amino-4-cloro-6-(4-piridil)pirimidina



Una solución de 2-amino-4-hidroxi-6-(4-piridil)pirimidina (5,45 g, 29 mmol) en POCl₃ (12 ml) se mantuvo a reflujo bajo argón durante 5 horas. La mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente, se vertió sobre hielo, y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 2 horas para asegurar la interrupción de POCl₃. En ese momento, la mezcla se hizo básica tras la adición de NaOH 1 N y el sólido pardo se filtró para proporcionar 4,52 g de producto bruto, que se usó sin purificación adicional (el análisis RMN mostró 1:1 producto / material de partida). El filtrado formó más sólido tras permanecer a temperatura ambiente (1 g, el análisis RMN mostró 2:1 producto / material de partida). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 7,34 (sa, 2H), 7,38 (s, 1H), 7,99 (d, *J*=4,2 Hz, 2H), 8,72 (d, *J*=4,6 Hz, 2H).

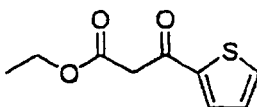
Intermedio A3

Preparación de 2-amino-4-cloro-6-(2-tienil)pirimidina



Etapa 1

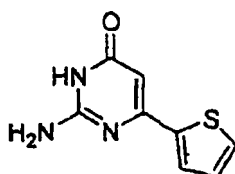
Preparación de etil-2-(tiofeno-2-yl)acetato



Una solución de ácido tiofeno-2-carboxílico (8,9 g, 68,5 mmol), 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona (12,0 g, 81,6 mmol), y 4-dimetilaminopiridina (17,0 g, 138 mmol) en CH₂Cl₂ seco (100 ml) se enfrió a 0°C y se trató con una solución de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (75 ml, 1,0 M en CH₂Cl₂, 75 mmol). La reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 2 horas y la diciclohexilurea se filtró después y se lavó con CH₂Cl₂. El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en etanol absoluto (400 ml). Después la solución se trató con una solución de monohidato de ácido *p*-toluenosulfónico (32 g, 168 mmol) en etanol absoluto (100 ml) y se mantuvo a reflujo bajo argón durante 1 hora. En ese momento, el etanol se retiró a presión reducida y el residuo se disolvió en EtOH y se lavó secuencialmente con H₂O (300 ml), NaHCO₃ saturado (200 ml), HCl 1 N (200 ml), NaCl saturado, y se secó (MgSO₄). El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se filtró a través de un lecho de sílice con EtOAc al 10% / hexanos al 90% para proporcionar el producto deseado en forma de un aceite (13 g, 96%). TLC (EtOAc al 20% / hexano al 80%) R_f 0,21; ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 1,17 (t, *J*=7,01, 3H), 4,06 - 4,14 (m, 4H), 7,25 (t, *J*=5,1 Hz, 1H), 7,98 (d, *J*=3,8 Hz, 1H), 8,06 (d, *J*=4,9 Hz, 1H).

Etapa 2

Preparación de 2-amino-4-hidroxi-6-(2-tienil)pirimidina

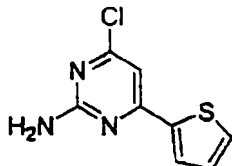


ES 2 298 497 T3

El procedimiento era similar al usado para el Intermedio A2, etapa 1, usando etil-2-(tienil-2-ol)acetato como material de partida. (Rendimiento al 43%). TLC (MeOH al 6%/ CH₂Cl₂ al 94%) R_f 0,23; MS ES 194 [M+H]⁺; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 6,06 (s, 1H), 6,70 (sa, 2H), 7,11 (t, J=4,9 Hz, 1H), 7,64 (d, J=4,9 Hz, 1H), 7,70 (d, J=3,6 Hz, 1H), 10,95 (sa, 1H).

Etapa 3

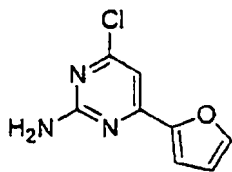
Preparación de 2-amino-4-cloro-6-(2-tienil)pirimidina



El procedimiento era similar al usado para el Intermedio A2, etapa 2, usando 2-amino-4-hidroxi-6-(2-tiofeno)pirimidina como material de partida. (Proporcionó un rendimiento al 33% después de la purificación sobre sílice con EtOAc al 15% / hexanos al 85%. TLC (EtOAc al 20% / hexanos al 80%) R_f 0,29; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 7,16 - 7,23 (m, 4H), 7,77 (dd, J=0,8, 5,0 Hz, 1H), 7,98 (dd, J=1,0, 3,8 Hz, 1H).

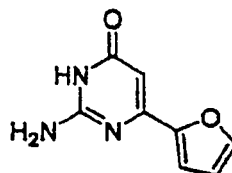
Intermedio A4

Preparación de 2-amino-4-cloro-6-(2-furil)pirimidina



Etapa 1

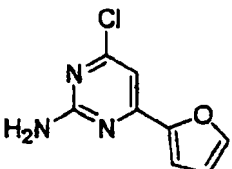
Preparación de 2-amino-4-hidroxi-6-(2-furil)pirimidina



Se usó el procedimiento general para la preparación del Intermedio A2, (etapa 1); (rendimiento al 37%). MS (ES) 178 [M+H]⁺.

Etapa 2

Preparación de 2-amino-4-cloro-6-(2-furil)pirimidina

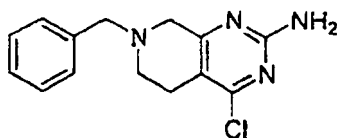


Una solución de 2-amino-4-hidroxi-6-(2-furil)pirimidina (1,40 g, 7,9 mmol) en POCl₃ (4 ml) se mantuvo a reflujo bajo argón durante 2 horas. El POCl₃ se destiló; el residuo se diluyó con EtOAc y se vertió sobre NaHCO₃ saturado helado. Las fases se separaron y la acuosa se extrajo con EtOAc (100 ml). Los extractos reunidos se lavaron con NaCl saturado, se secaron (MgSO₄), y el disolvente se retiró a presión reducida para proporcionar 0,5 g de producto bruto, que se usó sin purificación adicional. TLC (EtOAc al 20% / hexane al 80%) R_f 0,26; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 6,68 (dd, J=1,7,3,4 Hz, 1H), 6,94 (s, 1H), 7,25 (dd, J=1,3,7 Hz, 1H), 7,91 (dd, J=0,8, 1,9 Hz, 1H).

ES 2 298 497 T3

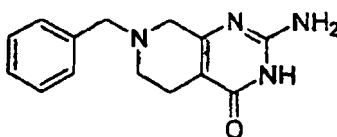
Intermedio A5

Preparación de 6-bencil-4-cloro-5,6,7,8-tetrahidropirido[4,3-d]pirimidin-2-amina



Etapla 1

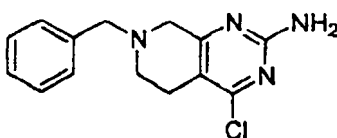
Preparación de 2-amino-7-bencil-5,6,7,8-tetrahidropirido[3,4-d]pirimidin-4(3H)-ona



A EtOH (16 ml) enfriado a 0°C (baño de hielo / H₂O) se añadió esferas de Na (204 mg, 8,9 mmol). La mezcla se agitó hasta que todo el Na se disolvió. Se añadió clorhidrato de 1-bencil-4-oxo-3-piperidina-carboxilato metílico (3,0 g, 10,1 mmol) y carbonato de guanidina (1,4 g, 7,6 mmol). La mezcla se mantuvo a reflujo durante 16 horas. Después la reacción se enfrió a temperatura ambiente, el sólido se recogió por filtración, se lavó con EtOH, y se secó en vacío. El compuesto deseado (2,58 g, 10,0 mmol; rendimiento al 99+%; mp = 202 - 212° (dec.); ES MS [M+H]⁺ = 257; TLC (CH₂Cl₂ - MeOH, 90:10); R_f = 0,20.

Etapla 2

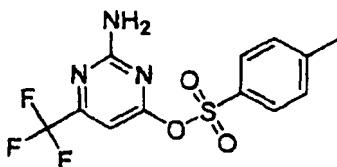
Preparación de 6-bencil-4-cloro-5,6,7,8-tetrahidropirido[4,3-d]pirimidin-2-amina



Una solución del producto de la etapa 1 (3,5 g, 13,7 mmol) en POCl₃ (52 ml) se mantuvo a reflujo bajo argón durante 5 horas. La mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente, se vertió sobre hielo, y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 2 horas para asegurar la interrupción de POCl₃. En ese momento, la mezcla se hizo básica tras la adición de hidróxido de amonio y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 200 ml). Los extractos orgánicos reunidos se lavaron con NaOH 1 N seguido de salmuera, se secaron (MgSO₄), y se concentraron a presión reducida. El residuo se recogió en benceno y se hizo ácido tras la adición de HCl 1 N en éter dietílico. El sólido pardo se filtró para proporcionar 0,35 g de producto bruto, que se usó sin purificación adicional. ES MS [M+H]⁺ = 275.

Intermedio A6

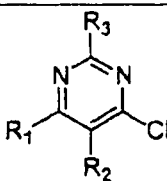
Preparación de 2-amino-6-(trifluorometil)-4-pirimidinil-4-metilbencenosulfonato



A una solución de 2-amino-6-(trifluorometil)-4(3H-pirimidinona) (250 mg, 1,4 mmol), trietilamina (196 µl, 1,4 mmol), N,N dimetilaminopiridina (17 mg, 0,14 mmol), en CH₂Cl₂ (13 ml) enfriada a 0°C se añadió cloruro de p-toluenosulfonilo (534 mg, 2,8 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con H₂O (2 x 20 ml) seguido de salmuera, se secó (Na₂SO₄), se evaporó, y se secó en vacío. El compuesto deseado (466 mg, 1,4 mmol; rendimiento al 99+%; ES MS [M+H]⁺ = 140.

Usando los procedimientos anteriores para la preparación de A1-A6 y sustituyendo los materiales de partida apropiados, también se prepararon los siguientes intermedios de pirimidina.

TABLA 1

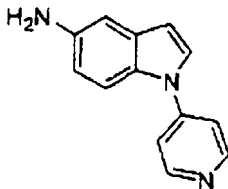
Intermedios A de cloropirimidina				
				
Intermedio nº	R ₁	R ₂	R ₃	Datos físicos
A7	Me	H	NH ₂	Aldrich
A8	Et	H	NH ₂	Aldrich o Lancaster
A9	H	H	NH ₂	Aldrich
A10	<i>t</i> -Bu	H	NH ₂	mp = 109 – 113 °C; ES MS [M+H] ⁺ = 186; TLC (90:10 CH ₂ Cl ₂ / MeOH); R _f = 0,37.
A11	Me	Cl	NH ₂	Aldrich o Lancaster?
A12	-(CH) ₄ -		NH ₂	¹ H RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 6,60 (s, 2H), 2,55 – 2,29 (m, 4H), 1,68 – 1,56 (m, 4H)
A13	-(CH) ₅ -		NH ₂	¹ H RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 6,65 (s, 2H), 2,72 – 2,58 (m, 4H), 1,74 – 1,60 (m, 2H), 1,55 – 1,34 (m, 4H)
A14	-(CH) ₃ -		NH ₂	¹ H RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 6,73 (s, 2H), 2,72 – 2,57 (m, 4H), 1,89 (sept, <i>J</i> = 7,0, 2H)
A15	<i>i</i> -Pr	H	NH ₂	mp = 104 – 112 °C; ¹ H RMN (D ₂ O) δ 6,11 (s, 1H), 2,23 – 2,11 (m, 1H), 0,46 (d, <i>J</i> = 6,2 Hz, 6H); ES MS [M+H] ⁺ = 172
A16	CH ₃	H	Ph- NH-	
A17	Ph	H	NH ₂	
A18	3-piridilo	H	NH ₂	
A19	2-piridilo	H	NH ₂	
A20	3-NO ₂ - Ph	H	NH ₂	
A21	Cl	H	NH ₂	Aldrich

B. Preparación de intermedios de arilamina

Intermedio B1

5 Preparación de 1-(4-piridinil)-1H-indol-5-amina

10



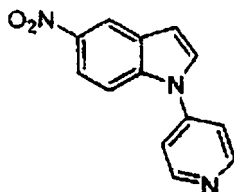
15

Etapa 1

20

Preparación de 5-nitro-1-(4-piridinil)-1H-indol

25



30

A una solución de 5-nitroindol (7,0 g, 43,2 mmol) y clorhidrato de 4-cloropiridina (7,8 g, 51,8 mmol) en DMF (43 ml) se añadió terc-butoxido de potasio (12,1 g, 108,0 mmol), en porciones. La reacción se calentó a 100°C durante 48 horas. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se vertió en agua (400 ml). El sólido resultante se retiró por filtración y se secó en vacío. El compuesto deseado (6,04 g, 25,3 mmol; rendimiento al 58%); ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 8,76 (dd, *J*=1,7, 4,5, 2H), 8,68 (d, *J*= 2,2, 1H), 8,06 - 8,13 (m, 2H), 7,92 (d, *J*= 9,2, 1H), 7,75 (dd, *J*=1,5, 4,6, 2H), 7,07 (dd, *J*= 0,9, 3,5, 1H); ES MS [M+H]⁺ = 240.

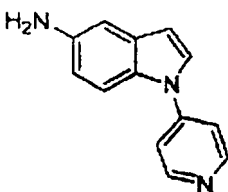
35

Etapa 2

40

Preparación de 1-(4-piridinil)-1H-indol-5-amina

45



50

Una mezcla del producto de la etapa 1 (8,27 g, 34,6 mmol) y catalizador de paladio sobre carbón vegetal al 10% (827 mg) en acetato de etilo (166 ml) y EtOH (9 ml) se agitó en hidrógeno a presión atmosférica durante 48 horas. Se añadió otro catalizador (414 mg) y la reacción se agitó durante 24 horas. De nuevo, se añadió otro catalizador (414 mg) y la reacción se agitó 24 horas más. El catalizador se retiró por filtración a través de tierra de diatomeas y el disolvente se retiró del filtrado por evaporación. El residuo se trituró con éter, se recogió por filtración, y se secó en vacío. El compuesto deseado (4,67 g, 22,3 mmol; rendimiento al 65%); mp = 149 - 154°C; ES MS [M+H]⁺ = 210; TLC (CH₂Cl₂ - MeOH, 95:5); R_f = 0,29.

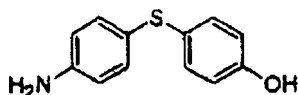
55

Intermedio B2

60

Preparación de 4-[(4-aminofenil)sulfanil]fenol

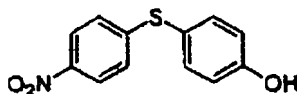
65



ES 2 298 497 T3

Etapa 1

Preparación de 4-[(4-nitrofenil)sulfanil]fenol

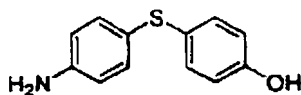


A una solución de cloruro de nitrobenzenosulfonilo (4 g, 21 mmol) en éter (25 ml) se añadió fenol (1,97 g, 20 mmol) en forma de una solución en éter (25 ml). Después de agitarse durante 15 horas a rt, la mezcla se concentró para proporcionar un sólido bruto que se recrystalizó a partir de ácido acético.

El compuesto deseado (4,0 g, 16,2 mmol, rendimiento al 76%). TLC (Hexanos / EtOAc, 70:30); $R_f = 0,54$.

Etapa 2

Preparación de 4-[(4-aminofenil)sulfanil]fenol

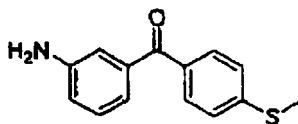


A una solución del producto de la etapa 1 (4 g, 16,2 mmol) en EtOH (500 ml) se añadió $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (18,3 g, 81 mmol). La solución se calentó a reflujo. Después de agitarse durante 3 horas, la mezcla se dejó enfriar a rt, y los compuestos volátiles se retiraron por rotavapor. La suspensión resultante se suspendió en EtOAc, y se añadió NaHCO_3 sólido. Subsiguientemente, la mezcla se filtró y el sólido filtrado se lavó concienzudamente con EtOAc. El filtrado orgánico se lavó con agua, y los lavados acuosos se extrajeron con EtOAc. Los extractos orgánicos reunidos se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron para proporcionar un sólido naranja, que se usó sin purificación adicional. Compuesto deseado (3,0 g, 13,8 mmol, rendimiento al 86%).

TLC (Hexanos / EtOAc, 70:30); $R_f = 0,34$.

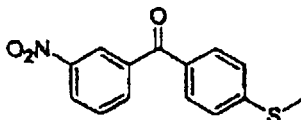
Intermedio B3

Preparación de (3-aminofenil)[4-metilsulfanil]fenil]metanona



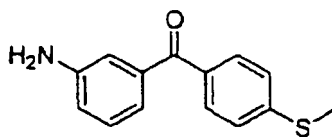
Etapa 1

Preparación de [4-(metilsulfanil)fenil](3-nitrofenil)metanona



Se añadió 3-nitrobenzoylcloruro (5,0 g, 26,94 mmol) a una solución de tioanisol (3,16 ml, 26,94 mmol) y 1,2-dicloroetano (95 ml). La mezcla de la reacción resultante se enfrió a 0°C (baño de hielo / H_2O) y se añadió 0,5 equivalentes de tricloruro de aluminio (1,8 g, 13,47 mmol). La reacción se dejó agitar durante 15 minutos a esta temperatura y se retiró el baño frío seguido de la adición de los equivalentes restantes de AlCl_3 (2,51 g, 18,87). La solución de la reacción se volvió un amarillo/verdoso oscuro y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 18 horas, al cabo de las cuales la reacción se interrumpió lentamente con H_2O (50 ml). La mezcla se diluyó con CH_2Cl_2 (50 ml) y se lavó con H_2O (3 x 50 ml), y las fases orgánicas reunidas se lavaron con NaHCO_3 saturado (50 ml), se secaron (MgSO_4) y se concentraron a presión reducida. El material bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc / hexano, 1/4) para proporcionar 3,3 g (44%) de 4-(metilsulfanil)fenil](3-nitrofenil)metanona en forma de un sólido. EI - LRMS m/z 274 (M^+); TLC R_f 0,68 (EtOAc / Hex, 2/3).

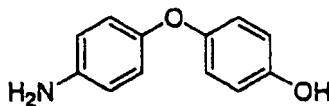
Etapa 2

Preparación de (3-aminofenil)[4-(metilsulfanil)fenil]metanona

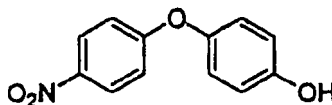
Preparado de forma análoga al Intermedio B2, etapa 2. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna ultra-rápida, eluyendo con 70:30 Hexanos / EtOAc. TLC: (Hexanos / EtOAc, 70:30);

$R_f=0,15$.

Intermedio B4

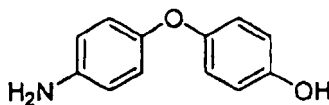
Preparación de 4-(4-aminofenoxi)fenol

Etapa 1

Preparación de 4-(4-nitrofenoxi)fenol

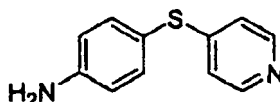
Una mezcla de *p*-nitrofluorobenceno (25 g, 0,177 mol), dihidroquinona (19,5 g, 0,177 mol), e hidróxido de sodio (7,08 g, 0,177 mol) en EtOH / H₂O (1:1 v/v, 176 ml) se calentó a reflujo durante 20 horas, y subsiguientemente se dejó enfriar a temperatura ambiente. La mezcla se filtró, el filtrado se hizo ácido con HCl diluido acuoso, y el precipitado resultante se filtró para proporcionar el producto bruto en forma de un sólido amarillo. El producto deseado se recrystalizó a partir de EtOH. (15 g, 0,064 mol, rendimiento al 37%). TLC (Hexanos / EtOAc, 70:30); $R_f = 0,44$.

Etapa 2

Preparación de 4-(4-aminofenoxi)fenol

A una solución del producto de la etapa 1 en EtOH (100 ml) se añadió paladio sobre carbono al 10% (200 mg). Después de agitarse bajo una atmósfera de hidrógeno durante toda la noche, la mezcla se filtró a través de Celite®. Los compuestos volátiles se retiraron del filtrado para proporcionar el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna ultra-rápida eluyendo con Hexanos / EtOAc (85:15, seguido de 75:25). Producto deseado (1,5 g, 7,45 mmol; 86%). TLC (Hexanos / EtOAc, 70:30); $R_f = 0,41$.

Intermedio B5

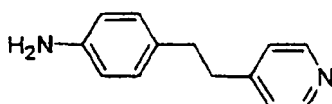
Preparación de 4-(4-piridiniltio)anilina

ES 2 298 497 T3

A una solución de 4-aminotiofenol (20,2 g, 156,5 mmol) en DMF anhidro (200 ml) se añadió clorhidrato de 4-cloropiridina (24,4 g, 161,0 mmol) seguido de carbonato de potasio (44 g, 318, 4 mmol). La mezcla de la reacción se calentó a 80°C durante toda la noche, después se diluyó acetato de etilo (400 ml) y agua (400 ml). La fase acuosa se volvió a extraer con acetato de etilo (2 x 200 ml). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una solución acuosa saturada de NaCl (200 ml), se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida. El residuo se filtró a través de un lecho de sílice con acetato de etilo y el material resultante se trituró con una solución éter etílico / hexano para proporcionar el producto deseado (24,7 g, 78%). TLC (acetato de etilo al 50% / hexano al 50%) R_f 0,25; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 5,67 (sa, 2H), 6,65 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,88 (d, J = 6,2 Hz, 2H), 7,19 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,27 (d, J = 6, 2 Hz, 2H), MS [M+H]⁺ = 203.

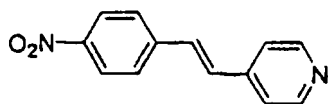
Intermedio B6

Preparación de 4-[2-(4-piridinil)etil]anilina



Etapa 1

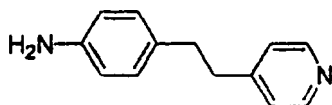
Preparación de 4-[(E)-2-(4-nitrofenil)etenil]piridina



A un matraz de 3 bocas de 500 ml secado en horno se añadió bromuro de (4-nitrobenzil)trifenilfosfonio (15 g, 30,42 mmol) seguido de la adición de THF (100 ml). La solución se enfrió a 0°C en un baño de hielo. Después se añadió t-butoxido de potasio (3,9 g, 33,02 mmol) en una porción resultando en una suspensión naranja. La suspensión se mantuvo a 0°C mientras se añadía una solución de 4-piridina-2-carboxaldehído (2,7 g, 24,70 mmol) en THF (20 ml) en 10 minutos. El baño de hielo se retiró y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. En ese momento la reacción se interrumpió con solución de cloruro de amonio saturado (50 ml) y se agitó durante 15 minutos. Después la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml), los extractos reunidos se lavaron con solución de NaCl acuosa saturada (100 ml) y se secaron (MgSO₄). El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se cromatografió sobre sílice con acetato de etilo al 0% - 50% en hexanos para proporcionar el producto deseado (1,8 g, 32%). TLC (acetato de etilo al 50% / hexano al 50%) R_f 0,28; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 6,84 (d, J=12,4Hz, 1H), 6,96 (d, J=12,4Hz, 1H), 7,14 (d, J=6,2Hz, 2H), 7,45 (d, J=8,7Hz, H), 8,15 (d, J=8,7Hz, 2H), 8,47 (d, J=6,2Hz, 2H).

Etapa 2

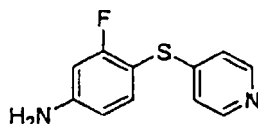
Preparación de 4-[2-(4-piridinil)etil]anilina



A un matraz de 50 ml seco purgado con argón se añadió Pd sobre carbono al 10% (285 mg) seguido de la adición de etanol (12 ml) y el producto de la etapa 1 (1,8 g, 8,0 mmol). En ese momento, la línea de argón se sustituyó con un globo de hidrógeno y la reacción se agitó durante toda la noche. La mezcla se filtró a través de un lecho de Celite[®] y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo sólido se trituró con éter etílico / hexanos para proporcionar el producto deseado. (1,2 g, 67%). TLC (acetona al 4% / cloruro de metileno al 96%) R_f 0,09; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2,67 - 2,83 (m, 4H), 4,83 (sa, 2H), 6,45 (d, J=8,2Hz, 2H), 6,84 (d, J=8,2Hz, 2H), 7,20 (d, J=6Hz, 2H), 8,41 (d, J=6Hz, 2H).

Intermedio B7

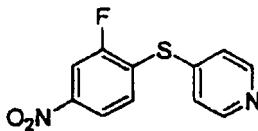
Preparación de 3-fluoro-4-(4-piridinilsulfanil)anilina



ES 2 298 497 T3

Etapa 1

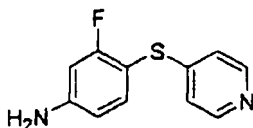
Preparación de 4-[(2-fluoro-4-nitrofenil)sulfanil]piridina



Una solución de 4-mercaptopiridina (4,2 g, 35,6 mmol), 3,4-difluoronitrobenzénico (5,7 g, 35,7 mmol), y carbonato de potasio (12,4 g, 89,7 mmol) en DMF anhidro (40 ml) se agitó a 40°C y bajo argón durante 3 horas. TLC mostró la reacción completa. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (100 ml) y agua (100 ml) y la fase acuosa se volvió a extraer con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las fases orgánicas se lavaron con una solución de NaCl saturada (100 ml) se secaron (MgSO₄) y se concentraron a presión reducida. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo al 50% / hexanos al 50%. Proporcionó el producto deseado en forma de un sólido amarillo (6,3 g, 71%). TLC (EtOAc al 50% / hexano al 50%). R_f 0,53; ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 7,27 (dd, *J*=0,76, 4,2 Hz, 2H), 7,78 (dt, *J*=0,76, 7,2 Hz, 1H), 8,11 - 8,15 (m, 1H), 8,28 - 8,33 (m, 1H), 8,5 (dd, *J*=1,4, 4,6 Hz, 2H), MS [M+H]⁺ = 251.

Etapa 2

Preparación de 3-fluoro-4-(4-piridinilsulfanil)anilina



Una suspensión de 3-fluoro-4-piridiniltio)nitrobenzénico (6,3 g, 25,2 mmol), polvo de hierro (6,0 g, 107,4 mmol), ácido acético (100 ml), y agua (1 ml) se agitaron a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla se diluyó con Et₂O (100 ml) y agua (100 ml). La fase acuosa se ajustó a pH 5 con una solución de NaOH 4 N. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una solución acuosa saturada de NaCl (100 ml), se secaron (MgSO₄) y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo al 50% / hexanos al 50%. Proporcionó el producto deseado en forma de un sólido blanco (4,8 g, 86%). TLC (EtOAc al 50% / hexano al 50%). R_f 0,28; ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ 6,04 (sa, 2H), 6,47-6,51 (m, 2H), 6,91 (d, *J*=6,1 Hz, 2H), 7,22 (t, *J*=8,4 Hz, 1H), 8,30 (d, *J*=6,4 Hz, 2H).

Usando procedimientos similares a los descritos para la preparación de los Intermedios B1 - B7, también se prepararon los siguientes compuestos adicionales:

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

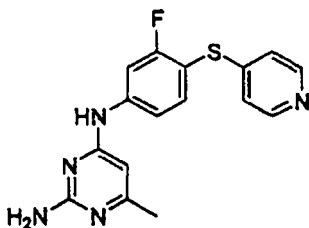
Intermedios B de arilamina

Intermedio n°	Z	(R ₅) _n	X-	A	Propiedades físicas
B8	CH	H	(4)-S- CH ₂ -	pirid-4-ilo	TLC R _f = 0,12 (EtOAc al 50% / hexanos al 50%). ¹ H RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 3,91 (s, 2H), 5,26 (sa, 2H), 6,44 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 6,96 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,12 (d, J = 6,3 Hz, 2H), 8,40 (d, J = 6,0 Hz, 2H).
B9	CH	3-CF ₃	(4)-S-	pirid-4-ilo	TLC R _f = 0,10 (EtOAc al 50% / hexanos al 50%). ¹ H RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 6,21 (sa, 2H), 6,84 – 6,87 (m, 3H), 7,10 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,39 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 8,29 (d, J = 6,3 Hz, 2H).
B10	CH	H	(4)-O-	Isoquinolin-5-ilo	
B11	CH	3-F	(4)-O-	Isoquinolin-5-ilo	¹ H RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 5,42 (sa, 2H), 6,41 – 6,55 (m, 2H), 6,81 – 7,05 (m, 2H), 7,48 – 7,54 (m, 1H), 7,73 – 7,76 (m, 1H), 8,06 – 8,08 (m, 1H), 8,54 – 8,56 (m, 1H), 9,32 (s, 1H).
B12	CH	3,5-(Cl) ₂	(4)-O-	Isoquinolin-5-ilo	TLC R _f = 0,29 (EtOAc al 45% / hexanos al 55%). ¹ H RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) δ 5,73 (sa, 2H), 6,69 (dd, J = 1,1 y 8,0 Hz, 1H), 6,75 (s, 2H), 7,51 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,78

Intermedio n°	Z	(R ₅) _n	X-	A	Propiedades físicas
					(d, J = 8,2 Hz, 1H), 8,12 (d, J = 5,9 Hz, 1H), 8,58 (d, J = 5,6 Hz, 1H), 9,34 (sa, 1H).
B13	CH	H	(4)-S-	pirid-4-ilo	TLC R _f = 0,07 (EtOAc al 100%). ¹ H RMN (DMSO-d ₆) δ 5,84 (sa, 2H), 6,95-6,99 (m, 3H), 7,32 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 8,00 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 8,31 (d, J = 4,7 Hz, 2H).
B14	CH	3,5-(Cl) ₂	(4)-S-	pirid-4-ilo	¹ H RMN (DMSO-d ₆) δ 6,30 (sa, 2H), 6,82 (s, 2H), 6,89, (d, J = 6,0 Hz, 2H), 8,33 (d, J = 6,1 Hz, 2H).
B15	CH	2,5-(F) ₂	(4)-S-	pirid-4-ilo	
B16	CH	3-C1	(4)-S-	pirid-4-ilo	
B17	CH	H	(4)-S-	Isoquinolin-5-ilo	
B18	CH	H	(4)-CH ₂ -S-	pirid-4-ilo	
B19	CH	H	(4)-S-	pirid-3-ilo	
B20	CH	H	(3)-S-	pirid-4-ilo	
B21	CH	H	(4)-O-	quinolin-5-ilo	

C. Preparación de los ejemplos de la invención

Ejemplo 1

5 Preparación de *N*-(2-amino-6-metil-4-pyrimidinil)-*N*-[3-fluoro-4-(4-piridinilsulfanil)fenil]amina

10

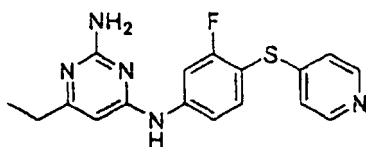
15

20

25

Una suspensión de 2-amino-4-cloro-6-metilpirimidina (Intermedio A7, 0,2 g, 1,3 mmol), 3-fluoro-4-(4-piridiniltio) anilina (Intermedio B7, 0,3 g, 1,3 mmol), y K_2CO_3 (0,2 g, 1,3 mmol) en *o*-xileno (1,3 ml) se calentó a 100°C en un vial de reacción de 5 ml durante toda la noche. La mezcla de la reacción se diluyó con MeOH y se revistió sobre sílice y se purificó por MPLC (Biotage) con MeOH al 5% - 7% en CH_2Cl_2 . Proporcionó 74 mg de producto (rendimiento al 18%). TLC (MeOH al 6% / CH_2Cl_2 al 94%) R_f 0,29; MS ES 328 $[M+H]^+$; 1H RMN (DMSO- d_6) δ 2,12 (s, 3H), 5,92 (s, 1H), 6,38 (sa, 2H), 6,96 (d, $J=5,1$ Hz, 2H), 7,39 - 7,52 (m, 2H), 8,26 (d, $J=11,9$ Hz, 1H), 8,33 (d, $J=4,8$ Hz, 2H), 9,55 (sa, 1H).

Ejemplo 2

30 Preparación de 6-etil-*N*4-[3-fluoro-4-(4-piridinilsulfanil)fenil]-2,4-pirimidinadiazina

35

40

45

2-Amino-4-cloro-6-etilpirimidina (Intermedio A8, 55,1 mg, 0,25 mmol) e Intermedio B7 (39,4 mg, 0,25 mmol) se suspendieron en HCl 0,01 M acuoso (500 μ l). La mezcla se mantuvo a reflujo durante 6 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se evaporó por vacío. El residuo se purificó por cromatografía en fase inversa sobre una columna YMC Pack-pro C18 (marca comercial) eluyendo con acetonitrilo / H_2O (gradiente 10:90 - 90:10). El compuesto se volvió a purificar por TLC de preparación eluyendo con CH_2Cl_2 - MeOH (90:10). Compuesto deseado (2,9 mg, 0,0085 mmol; rendimiento al 34%); 1H RMN (Metanol- d_4) 8,16 (dd, $J=1,7, 4,7$, 2H), 8,00 - 8,04 (m, 1H), 7,37 (m, 2H), 6,93 (dd, $J=1,8, 4,9$, 2H), 5,91 (s, 1H), 2,39 (q, $J=7,7$, 2H), 1,13 (t, $J=7,5$, 3H); ES MS $[M+H]^+=342$; TLC (CH_2Cl_2 - MeOH, 90:10); $R_f=0,48$.

50

Ejemplos 3-26

Usando los procedimientos anteriores, los ejemplos siguientes de piridinas se sintetizaron y resumieron en la Tabla 3.

55

60

65

Tabla 3

Ej. N°	Intermedio Pirimidona (A)	Intermedio Amina (B)	R ₁	R ₂	R ₄	Datos analíticos
3	A9	B1	H	H	a	mp = 245 – 247 °C; ¹ H RMN (Metanol-d ₄) 8,79 (d, J = 5,7, 2H), 832 (s, 1H), 8,13 (d, J = 5,9, 2H), 7,97 (d, J=9,2, 1H), 7,88 (d, J= 3,6, 1H), 7,71 (d, J=7,3, 1H), 7,56 (d, J= 9,1, 1H), 6,94 (d, J=4,0,

--	--	--	--

--	--	--	--

--	--	--

4	A1	B1	CH ₃ CH ₂ –	H	a	¹ H RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) 11,75 (s, 1H), 10,59 (s, 1H), 8,78 (d, <i>J</i> = 5,4, 2H), 8,21 (s, 1H), 7,87 – 7,97 (m, 5H), 7,47 (d, <i>J</i> = 8,1, 1H), 6,85 (d, <i>J</i> = 3,4, 1H), 6,21 (s, 1H), 1,29 (s, 9H); ES MS [M+H] ⁺ = 359.
5	A1	B1	CH ₃ –	Cl	a	¹ H RMN (Metanol- <i>d</i> ₄) 8,80 (d, <i>J</i> = 6,4, 1H), 8,21 (d, <i>J</i> = 6,6, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,99 (d, <i>J</i> = 8,9, 1H), 7,90 (d, <i>J</i> = 3,3, 1H), 7,60 (d, <i>J</i> = 8,9, 1H), 6,96 (d, <i>J</i> = 4,0, 1H), 2,93 – 2,99 (m, 2H), 2,86 (s, 2H), 2,23 – 2,29 (m, 2H); ES MS [M+H] ⁺ = 343; TLC : R _f = 0,46 (CH ₂ Cl ₂ – MeOH, 90:10).
6	A1	B1	–(CH ₂) ₄ –		a	¹ H RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) 11,75 (s, 1H), 10,59 (s, 1H), 8,78 (d, <i>J</i> = 5,4, 2H), 8,21 (s, 1H), 7,87 – 7,97 (m, 5H), 7,47 (d, <i>J</i> = 8,1, 1H), 6,85 (d, <i>J</i> = 3,4, 1H), 6,21 (s, 1H), 1,29 (s, 9H); ES MS [M+H] ⁺ = 359.
7	A1	B1	–(CH ₂) ₃ –		a	¹ H RMN (Metanol- <i>d</i> ₄) 8,80 (d, <i>J</i> = 6,4, 1H), 8,21 (d, <i>J</i> = 6,6, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,99 (d, <i>J</i> = 8,9, 1H), 7,90 (d, <i>J</i> = 3,3, 1H), 7,60 (d, <i>J</i> = 8,9, 1H), 6,96 (d, <i>J</i> = 4,0, 1H), 2,93 – 2,99 (m, 2H), 2,86 (s, 2H), 2,23 – 2,29 (m, 2H); ES MS [M+H] ⁺ = 343; TLC : R _f = 0,46 (CH ₂ Cl ₂ – MeOH, 90:10).
8	Aldrich	B1	H	H	b	¹ H RMN (Metanol- <i>d</i> ₄) 8,13 (dd, <i>J</i> = 1,4, 4,6, 2H), 7,80 (dd, <i>J</i> = 2,0, 6,7, 2H), 7,71 (d, <i>J</i> = 6,4, 1H), 7,38 – 7,42 (m, 2H), 6,92 (dd, <i>J</i> = 1,6, 4,7, 2H), 6,01 (d, <i>J</i> = 6,1, 1H); ES MS [M+H] ⁺ = 296; TLC : R _f = 0,28 (CH ₂ Cl ₂ – MeOH, 90:10).
9	A1	B1	(CH ₃) ₃ C–	H	b	mp = 126 – 129 °C; ES MS [M+H] ⁺ = 352; TLC : R _f = 0,62 (CH ₂ Cl ₂ – MeOH, 90:10).
10	A1	B1	CH ₃ –	Cl	b	¹ H RMN (Metanol- <i>d</i> ₄) 8,43 (d, <i>J</i> = 5,9, 2H), 7,93 – 7,96 (m, 2H), 7,68 – 7,71 (m, 2H), 7,46 (d, <i>J</i> = 6,6, 2H), 2,51 (s, 3H); ES MS [M+H] ⁺ = 344.

11	A1	B1	-(CH ₂) ₄ -	b	mp = 321–324 °C; ¹ H RMN (DMSO-d ₆) 9,35 (s, 1H), 8,37 (dd, J=1,4, 4,7, 2H), 7,91 (d, J= 8,9, 2H), 7,58 (d, J= 8,4, 2H), 7,02 (dd, J=1,5, 4,6, 2H), 3,33 (s a, 4H), 2,60 (s a, 2H), 1,77 (s a, 4H); ES MS [M+H] ⁺ = 350.
12	Aldrich	B1	H H	c	¹ H RMN (Metanol-d ₄) 8,26 (dd, J=1,4, 4,7, 2H), 8,11–8,16 (m, 1H), 7,84 (d, J= 6,2, 1H), 7,45 – 7,50 (m, 2H), 7,04 (dd, J=1,6, 4,9, 2H), 6,11 (d, J= 6,1, 1H); ES MS [M+H] ⁺ = 314; TLC: R _f = 0,40 (CH ₂ Cl ₂ – MeOH, 90:10).
13	A1	B1	(CH ₃) ₃ C– H	c	¹ H RMN (Metanol-d ₄) 8,25 – 8,27 (m, 2H), 8,11 – 8,16 (m, 1H), 7,46 – 7,48 (m, 2H), 7,03 (d, J= 4,9, 2H), 6,15 (s, 1H), 1,28 (s, 9H); ES MS [M+H] ⁺ = 370; TLC: R _f = 0,55 (CH ₂ Cl ₂ – MeOH, 90:10).
14	A1	B1	-(CH ₂) ₄ -	c	mp = 248 – 250 °C, ES MS [M+H] ⁺ = 368; TLC: R _f = 0,56 (CH ₂ Cl ₂ – MeOH, 90:10).
15	A1	B1	-(CH ₂) ₅ -	c	¹ H RMN (Metanol-d ₄) 8,78 (d, J= 6,6, 2H), 8,52 (d, J= 5,9, 1H), 8,34 (sa, 1H), 7,76 (d, J= 6,9, 2H), 7,42 (d, J= 6,1, 1H), 7,23 – 7,33 (m, 1H), 7,11 (s a, 1H), 6,51 – 6,58 (m, 3H), 2,85 – 2,87 (m, 2H), 2,60 – 2,63 (m, 1H), 2,31 – 2,34 (m, 2H), 1,42 – 1,75 (m, 6H); ES MS [M+H] ⁺ = 382.
16	A1	B1	– CH ₃ – H	d	mp = 254 – 256 °C, TLC: R _f = 0,03 (95:5 CH ₂ Cl ₂ / MeOH).
17	A7	B16	CH ₃ – H	e	TLC: R _f = 0,23 (MeOH al 6% / CH ₂ Cl ₂ al 94%); LC MS [M+H] ⁺ 344; (3,37 min)
18	A7	B10	CH ₃ – H	h	TLC: R _f = 0,39 (MeOH al 6% / CH ₂ Cl ₂ al 94%) LC MS [M+H] ⁺ 345; (3,07 min)

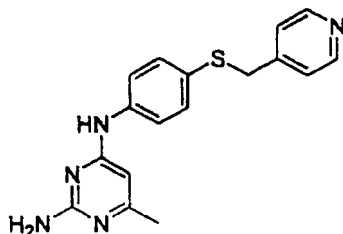
19	A7	B17	CH ₃	H	g	TLC: R _f = 0,44 (MeOH al 6% / CH ₂ Cl ₂ al 94%) LCMS: [M+H] ⁺ 360; (2,64 min)
20	A17	B7	Ph	H	c	TLC: R _f = 0,26 (MeOH al 4% / CH ₂ Cl ₂ al 96%); LCMS: ES [M+H] ⁺ 390; (276 min)
21	A18	B14	3-piridilo	H	f	TLC: R _f = 0,37 (MeOH al 6% / CH ₂ Cl ₂ al 94%); LCMS: ES m/z 441 (1,65 min)
22	A18	B5	3-piridilo	H	b	TLC: R _f = 0,35 (MeOH al 4% / CH ₂ Cl ₂ al 96%); LCMS: ES [M+H] ⁺ 373; (2,61 min)
23	A2	B5	4-piridilo	H	b	TLC: R _f = 0,13 (MeOH al 4% / CH ₂ Cl ₂ al 96%) LCMS: ES [M+H] ⁺ 373; (2,56 min)
24	A17	B11	Ph	H	i	TLC: R _f = 0,21 (MeOH al 2% / CH ₂ Cl ₂ al 98%); LCMS: ES [M+H] ⁺ 424; (2,75 min)
25	A2	B11	4-piridilo	H	i	TLC: R _f = 0,35 (MeOH al 6% / CH ₂ Cl ₂ al 94%); LCMS: ES [M+H] ⁺ 425; (2,60 min)
26	A7	B5	CH ₃	H	b	LCMS: ES [M+H] ⁺ 310; (3,53 min)

ES 2 298 497 T3

Seleccionando combinaciones de los Intermedios apropiados A1 - A21 con los Intermedios B1 - B17, se prepararon una diversidad de productos de manera similar y se describen en los Ejemplos 27 - 31.

Ejemplo 27

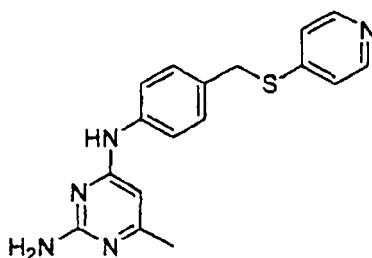
Preparación de *N*-(2-amino-6-metil-4-pirimidinil)-*N*-(4-[(4-piridinilmetil)sulfanil]fenil)amina



Preparado en rendimiento al 34% a partir del Intermedio A7 y B8: TLC (MeOH al 7% en CH₂Cl₂) R_f 0,36; MS (ES) 324[M+H]⁺; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2,09 (s, 3H), 4,12 (s, 2H), 5,87 (s, 1H), 6,33 (sa, 2H), 7,19 (d, J=8,5 Hz, 2H), 7,23 (d, J=5,8 Hz, 2H), 7,64 (d, J=8,5 Hz, 2H), 8,43 (d, J=5,3 Hz, 2H), 9,20 (sa, 1H).

Ejemplo 28

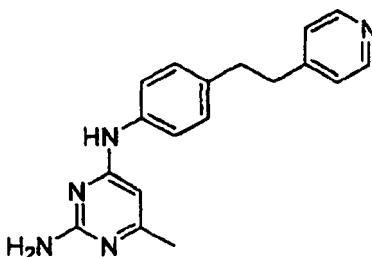
Preparación de *N*-(2-amino-6-metil-4-pirimidinil)-*N*-(4-[(4-piridinilsulfanil)metil]fenil)amina



Preparado en rendimiento al 6% a partir del Intermedio A7 y B8: TLC (MeOH al 7% en CH₂Cl₂) R_f 0,38; MS (ES) 342 [M+H]⁺; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2,06 (s, 3H), 4,30 (s, 2H), 5,84 (s, 1H), 6,13 (sa, 2H), 7,27 - 7,31 (m, 4H), 7,63 (d, J=7,9 Hz, 2H), 8,33 (d, J=6,1 Hz, 2H), 8,99 (sa, 1H).

Ejemplo 29

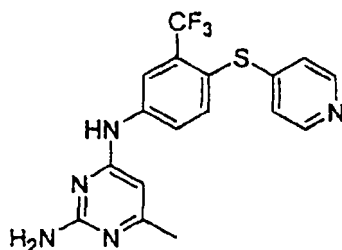
Preparación de *N*-(2-amino-6-metil-4-pirimidinil)-*N*-(4-[2-(4-piridinil)etil]fenil)amina



Preparado en rendimiento al 30% a partir del Intermedio A7 y B6: TLC (MeOH al 8% en CH₂Cl₂) R_f 0,34; MS (ES) 306 [M+H]⁺; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2,06 (s, 3H), 2,83 - 2,87 (m, 4H), 5,82 (s, 1H), 6,09 (sa, 2H), 7,07 (d, J=8,5 Hz, 2H), 7,21 (d, J=5,8 Hz, 2H), 7,54 (d, J=8,5 Hz, 2H), 8,41 (d, J=6,2 Hz, 2H), 8,87 (s, 1H).

Ejemplo 30

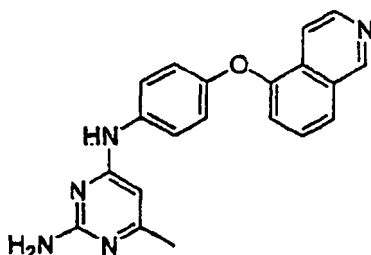
Preparación de *N*-(2-amino-6-metil-4-pirimidinil)-*N*-[4-(4-piridinilsulfanil)-3-(trifluorometil)fenil]amina



Preparado en rendimiento al 1,2% a partir de A7 y B9: TLC (MeOH al 7% en CH₂Cl₂) R_f 0,39; MS (ES) 378 [M+H]⁺; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2,03 (s, 3H), 5,94 (s, 1H), 6,33 (sa, 2H), 6,91 (d, J=6,5 Hz, 2H), 7,64 (d, J=8,9 Hz, 1H), 8,19 (d, J=2,2 Hz, 1H), 8,33 (d, J=5,9 Hz, 2H), 8,37 (dd, J=2,1, 8,6 Hz, 1H), 9,66 (s, 1H).

Ejemplo 31

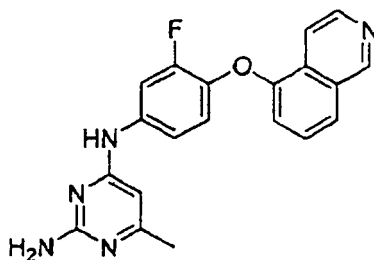
Preparación de *N*-(2-amino-6-metil-4-pirimidinil)-*N*-[4-(5-isoquinoliniloxy)fenil]amina



Preparado en rendimiento al 30% a partir de A7 y B10: TLC (MeOH al 6% en CH₂Cl₂) R_f 0,39; MS (ES) 344 [M+H]⁺; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2,08(s, 3H), 5,85 (s, 1H), 6,11 (sa, 2H), 7,02 - 7,08 (m, 3H), 7,58 (t, J=8,1 Hz, 1H), 7,74 (d, J=8,6 Hz, 2H), 7,84 (d, J=8,2 Hz, 1H), 7,98 (d, J=5,8 Hz, 1H), 8,54 (d, J=5,9 Hz, 1H), 9,03 (sa, 1H), 9,35 (sa, 1H).

Ejemplo 32

Preparación de *N*-(2-amino-6-metil-4-pirimidinil)-*N*-[3-fluoro-4-(5-isoquinoliniloxy)fenil]amina

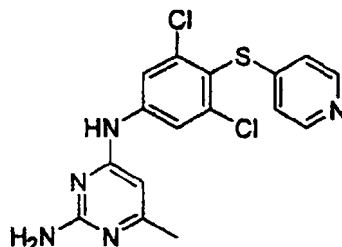


Una suspensión de 2-amino-4-cloro-6-metilpirimidina (Intermedio A7, 0,14 g, 1,0 mmol), 3-fluoro-4-(5-isoquinolin-oxi)anilina (Intermedio B10, 0,25 g, 1,0 mmol), y HCl (0,1 ml) en H₂O (1,0 ml) se calentó a 70°C en un vial de reacción de 5 ml durante toda la noche. La mezcla de la reacción se diluyó con MeOH, se trató con NaHCO₃ saturado, y se revistió sobre sílice y se purificó por MPLC (Biotage) con MeOH al 5% en CH₂Cl₂. Proporcionó 52 mg de producto (rendimiento al 14%). TLC (MeOH al 6% / CH₂Cl₂ al 94%) R_f 0,45; MS (ES) 362 [M+H]⁺; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2,10 (s, 3H), 5,88 (s, 1H), 6,29 (sa, 2H), 6,93 (d, J=7,9 Hz, 1H), 7,22 (t, J=8,9 Hz, 1H), 7,34 (dd, J=1,7, 8,9 Hz, 1H), 7,55 (t, J=8,1 Hz, 1H), 7,82 (d, J=8,3 Hz, 1H), 8,08 (d, J=5,6 Hz, 1H), 8,21 (dd, J=2,6, 14,2 Hz, 1H), 8,58 (d, J=5,9 Hz, 1H), 9,30 (sa, 1H), 9,36 (s, 1H).

Usando el procedimiento anteriormente descrito para el Ejemplo 32, los Ejemplos 33 - 41 se prepararon de forma similar.

Ejemplo 33

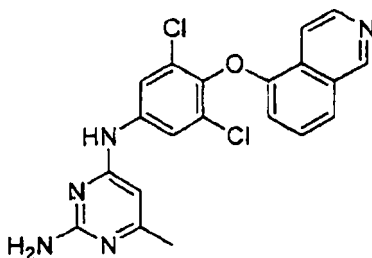
Preparación de *N*-(2-amino-6-metil-4-pirimidinil)-*N*-[3,5-dicloro-4-(4-piridinilsulfanil)fenil]amina



Preparado en rendimiento al 10% a partir de A7 y B14: TLC (MeOH al 5% en CH₂Cl₂) R_f 0,14; MS (ES) 378 [M+H]⁺; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2,14 (s, 3H), 5,92 (s, 1H), 6,49 (sa, 2H), 6,93 (d, J=6,1 Hz, 2H), 8,13 (s, 2H), 8,35 (d, J=6,2 Hz, 2H), 9,63 (sa, 1H).

Ejemplo 34

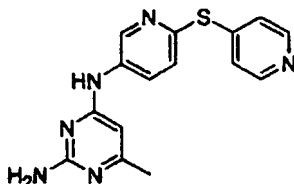
Preparación de *N*-(2-amino-6-metil-4-pirimidinil)-*N*-[3,5-dicloro-4-(5-isoquinoliniloxi)fenil]amina



Preparado en rendimiento al 58% a partir de A7 y B12: TLC (EtOAc al 70% / hexanos al 30%) R_f 0,18; MS (ES) 412 [M+H]⁺; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2,13 (s, 3H), 5,89 (s, 1H), 6,38 (sa, 2H), 6,73 (d, J=7,6 Hz, 1H), 7,52 (t, J=7,9 Hz, 1H), 7,82 (d, J=8,2 Hz, 1H), 8,05 (s, 2H), 8,16 (d, J=5,8 Hz, 1H), 8,61 (d, J=5,9 Hz, 1H), 9,36 (s, 1H), 9,42 (s, 1H).

Ejemplo 35

Preparación de *N*-(2-amino-6-metil-4-pirimidinil)-*N*-[6-(4-piridinilsulfani)-3-piridinil]amina

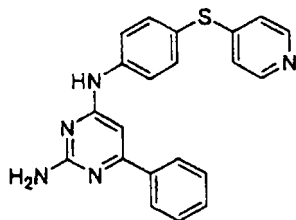


Preparado en rendimiento al 16% a partir de A7 y B13: TLC (MeOH al 6% en CH₂Cl₂) R_f 0,16; MS (ES) 311 [M+H]⁺; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 2,11 (s, 3H), 5,91 (s, 1H), 6,34 (sa, 2H), 7,15 (d, J=6,2 Hz, 2H), 7,48 (d, J=8,8 Hz, 1H), 8,30 (dd, J=2,5, 8,4 Hz, 1H), 8,38 (d, J=6,1 Hz, 2H), 9,00 (d, J=2,4 Hz, 1H), 9,45 (sa, 1H).

ES 2 298 497 T3

Ejemplo 36

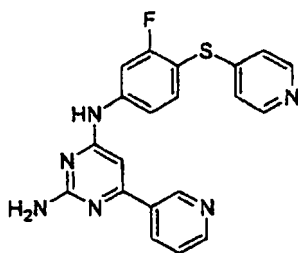
Preparación de N-(2-amino-6-fenil-4-pirimidinil)-N-[4-(4-piridinilsulfanil)fenil]amina



Preparado en rendimiento al 65% a partir de A17: TLC (MeOH al 4% en CH₂Cl₂) R_f 0,22; MS (ES) 372 [M+H]⁺; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 6,46 (sa, 2H), 6,55 (s, 1H), 6,96 (d, J=4,8 Hz, 2H), 7,46 - 7,49 (m, 5H), 7,91 - 8,00 (m, 4H), 8,32 (d, J=4,9 Hz, 2H), 9,57 (sa, 1H).

Ejemplo 37

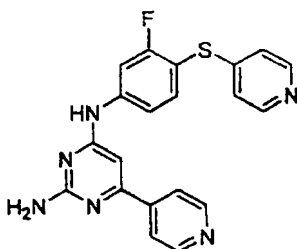
Preparación de N-[2-amino-6-(3-piridinil)-4-pirimidinil]-N-[3-fluoro-4-(4-piridinilsulfanil)fenil]amina



Preparado en rendimiento al 45%. TLC (MeOH al 4% en CH₂Cl₂) R_f 0,27; MS (ES) 391 [M+H]⁺; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 6,58 (s, 1H), 6,70 (sa, 2H), 6,99 (d, J=6,4 Hz, 2H), 7,46 - 7,57 (m, 3H), 8,23 - 8,36 (m, 4H), 8,65 (d, J=4,4 Hz, 1H), 9,09 (s, 1H), 9,86 (sa, 1H).

Ejemplo 38

Preparación de N-[2-amino-6-(4-piridinil)-4-pirimidinil]-N-[3-fluoro-4-(4-piridinilsulfanil)fenil]amina

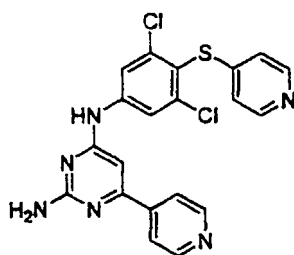


Preparado en rendimiento al 22% a partir de A2 y B7: TLC (MeOH al 6% en CH₂Cl₂) R_f 0,32; MS (ES) 391 [M+H]⁺; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 6,63 (s, 1H), 6,74 (sa, 2H), 6,99 (d, J=5,8 Hz, 2H), 7,46 - 7,58 (m, 2H), 7,85 (d, J=5,8 Hz, 2H), 8,31 - 8,36 (m, 3H), 6,70 (d, J=4,3 Hz, 2H), 9,92 (sa, 1H).

ES 2 298 497 T3

Ejemplo 39

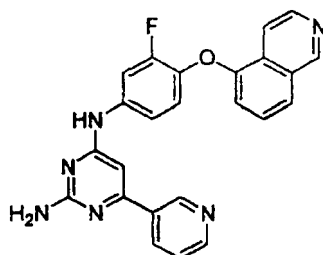
Preparación de *N*-[2-amino-6-(4-piridinil)4-pirimidinil]-*N*-[3,5-dicloro-4-(4-piridinilsulfanil)fenil]amina



Preparado en rendimiento al 0,4% a partir de A2 y B14: TLC (MeOH al 4% en CH₂Cl₂) R_f 0,15; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 6,60 (s, 1H), 6,82 (sa, 2H), 6,95 (d, J=5,9 Hz, 2H), 7,85 (d, J=5,9 Hz, 2H), 8,18 (s, 2H), 8,36 (d, J=3,8 Hz, 2H), 8,71 (d, J=4,7 Hz, 2H), 9,99 (sa, 1H).

Ejemplo 40

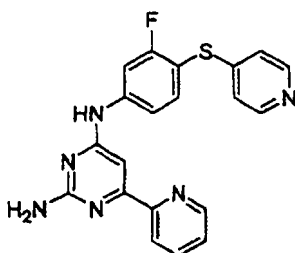
Preparación de *N*-[2-amino-6-(3-piridinil)4-pirimidinil]-*N*-[3-fluoro-4-(5-isoquinoliniloxi)fenil]amina



Preparado en rendimiento al 54% a partir de A18 y B11: TLC (MeOH al 5% en CH₂Cl₂) R_f 0,34; MS (ES) 425 [M+H]⁺; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 6,53 (s, 1H), 6,59 (sa, 2H), 6,96 (d, J=7,4 Hz, 1H), 7,26 (t, J=9,6 Hz, 1H), 7,38 - 7,59 (m, 3H), 7,83 (d, J=8,2 Hz, 1H), 8,09 (d, J=5,7 Hz, 1H), 8,23 - 8,31 (m, 2H), 8,58 - 8,65 (m, 2H), 9,09 (sa, 1H), 9,37 (sa, 1H), 9,61 (sa, 1H).

Ejemplo 41

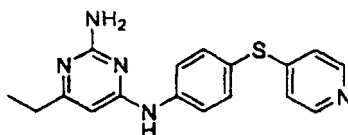
Preparación de *N*-[2-amino-6-(2-piridinil)4-pirimidinil]-*N*-[3-fluoro-4-(4-piridinilsulfanil)fenil]amina



Preparado en rendimiento al 60% a partir de A19 y B7: TLC (EtOAc al 50% / hexanos al 50%) R_f 0,14; MS (ES) 391 [M+H]⁺; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 6,63 (sa, 2H), 6,98 (d, J=6,6 Hz, 2H), 7,17 (s, 1H), 7,45 - 7,57 (m, 3H), 7,93 (dt, J=1,9,7,7 Hz, 1H), 8,23 - 8,37 (m, 4H), 8,65 - 8,67 (m, 1H), 9,90 (sa, 1H).

Ejemplo 42

Preparación de *N*-(2-amino-6-etil-4-pirimidinil)-*N*-[4-(4-piridinilsulfanil)fenil]amina

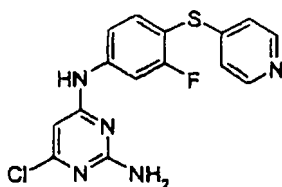


ES 2 298 497 T3

Una mezcla del Intermedio B5 (50,6 mg, 0,250 mmol) y 2-amino - 4- etil-6-cloropirimidina (Intermedio A8, 39,4 mg, 0,25 mmol) en HCl 0,01 M acuoso (500 ml) se mantuvo a reflujo durante 6 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se evaporó por vacío. El residuo se purificó por cromatografía en fase inversa sobre una columna YMC Pack-pro[®] eluyendo con acetonitrilo / H₂O (gradiente 10:90 - 90:10) para dar el compuesto deseado (13,0 mg, 0,040 mmol; rendimiento al 16%); mp = 181 °C - 186 °C; ES MS [M+H]⁺ = 324; TLC (CH₂Cl₂ - MeOH, 95:5); R_f = 0,41.

Ejemplo 43

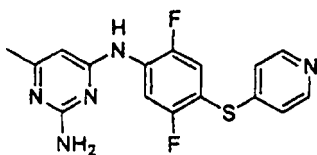
Preparación de *N*-(2-amino-6-cloro-4-pirimidinil)-*N*-[3-fluoro-4-(4-piridinilsulfanil)fenil]amina



2-Amino-4,6 dicloropirimidina (A21, 12 mmol) y 3-fluoro-4-(4-piridiniltio)-anilina (B7, 12 mmol) se suspendieron en agua (150 ml) y se trataron con 10 gotas de ácido clorhídrico concentrado. La mezcla se agitó a 100°C durante toda la noche. La solución transparente se neutralizó después con hidróxido de amonio. El producto precipitado amarillo se filtró, se lavó con agua, y se purificó por cromatografía en columna con MeOH al 1% - 3% en CH₂Cl₂ para dar el producto deseado en forma de un sólido blanco (1,98 g, 47%).

Ejemplo 44

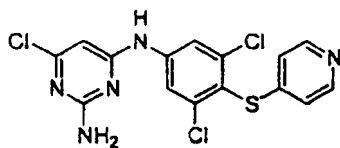
Preparación de *N*-(2-amino-6-metil-4-pirimidinil)-*N*-[2,5-difluoro-4-(4-piridinilsulfanil)fenil]amina



El compuesto se preparó usando un procedimiento similar usado para la preparación del Ejemplo 1 (descrito anteriormente) a partir de A7 y B15: HPLC / MS: [M+H]⁺ 346,1 m/z. Tiempo de retención (HPLC / MS) = 1,39 min.

Ejemplo 45

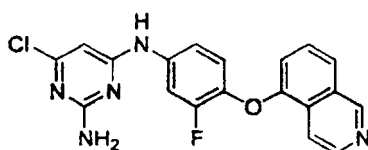
Preparación de *N*-(2-amino-6-cloro-4-pirimidinil)-*N*-(3,5-dicloro-4-(4-piridinilsulfanil)fenil]amina



El compuesto se preparó usando un procedimiento similar usado para la preparación del Ejemplo 43 (descrito anteriormente) a partir de A21 y B14: HPLC / MS: [M+H]⁺ 399,0 m/z. Tiempo de retención (HPLC / MS) = 3,02 min.

Ejemplo 46

Preparación de *N*-(2-amino-6-cloro-4-pirimidinil)-*N*-[3-fluoro-4-(5-isoquinoliniloxi)fenil]amina



El compuesto se preparó usando un procedimiento similar usado para la preparación del Ejemplo 43 (descrito anteriormente) a partir de A21 y B11: HPLC / MS: [M+H]⁺ 382,1 m/z. Tiempo de retención (HPLC / MS) = 2,91 min.

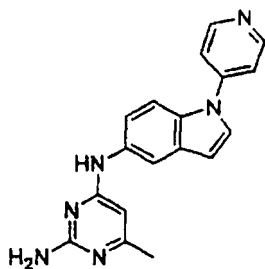
ES 2 298 497 T3

Ejemplos 47-49

Usando procedimientos similares a los ejemplos anteriores y usando los Intermedios A y B apropiados, se prepararon los siguientes ejemplos de forma similar:

Ejemplo 47

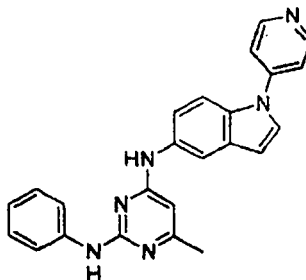
Preparación de *N*-(2-amino-6-metil-4-pirimidinil)-*N*-[1-(4-piridinil)-1*H*-indol-5-il]amina



Preparado por medio de la reacción del Intermedio A7 y B1.

Ejemplo 48

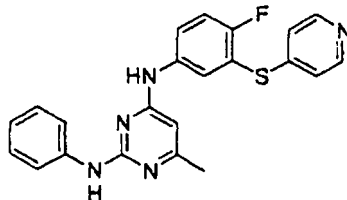
Preparación de *N*-(2-anilino-6-metil-4-pirimidinil)-*N*-[1-(4-piridinil)-1*H*-indol-5-il]amina



Preparado por medio de la reacción del Intermedio A16 y B1.

Ejemplo 49

Preparación de *N*-(2-anilino-6-metil-4-pirimidinil)-*N*[4-fluoro-3-(4-piridinilsulfanil)fenil]amina



Preparado por medio de la reacción del Intermedio A16 y B7.

Ensayo bioquímico de quinasa Rho

Criterios de actividad de ROCK-1: 0 sin efecto (inhibición al <40%), 1 efecto (inhibición al >40%). Las pruebas del ensayo para la inhibición de la fosforilación de ROCK-1 de MBP (Proteína Básica de la Mielina). La reacción (100 μ l del volumen final) se lleva a cabo en placas de 96 pocillos de polipropileno en tampón HEPES 50 mM pH

ES 2 298 497 T3

7,5 conteniendo MgCl_2 5 mM y DTT 1 mM. Para cada pocillo gstROCK1 (0,25 μg de gstROCK1 de BAYER DRT) se combina con MBP (1 μg) en tampón de reacción (volumen combinado 70 μl). Se añaden inhibidores (5 μl de 20 x conc. en DMSO al 40%) a cada pocillo para proporcionar un intervalo de respuesta de dosis en 8 puntos de 1,0 μM a 5 nM. La reacción se empieza añadiendo 25 μl de ATP (4x = 12 μM) en tampón de reacción conteniendo 0,8 μCi de ^{33}P gamma-ATP (4x) para proporcionar una concentración final de ATP 3 μM frío y 0,2 μCi caliente. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente deteniéndose la reacción por medio de la adición de 7 μl de HCl 1 N. La MBP radiactivamente marcada se transfirió a unidades de filtro P30 (EG&G Wallac), se lavó en ácido fosfórico al 1% seguido de lavados breves en agua. Después las unidades de filtro se secaron y la incorporación de ^{33}P se detectó por recuento de centelleo líquido. La incorporación de fondo de ^{33}P se determina por la autofosforilación de ROCK1 sin MBP. Los datos se expresan como inhibición porcentual: inhibición al % = $1 - ((\text{cpm con inhibidor} - \text{de fondo}) / (\text{cpm sin inhibidor} - \text{de fondo})) * 100$.

15

20

25

30

35

40

45

50

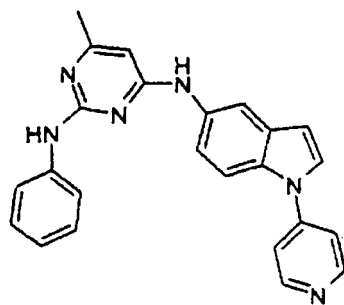
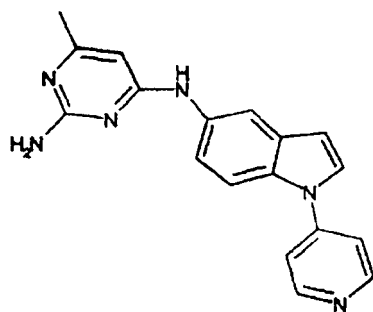
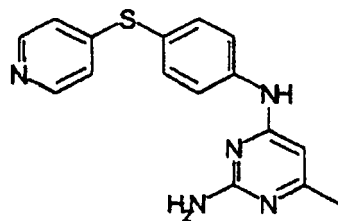
55

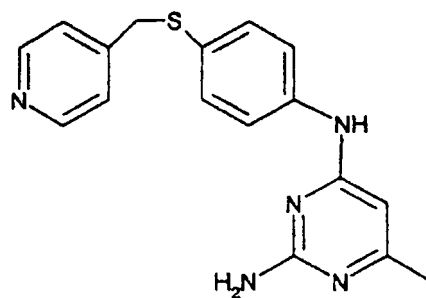
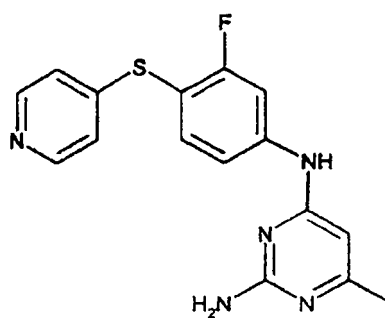
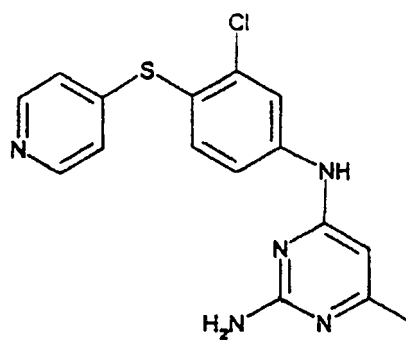
60

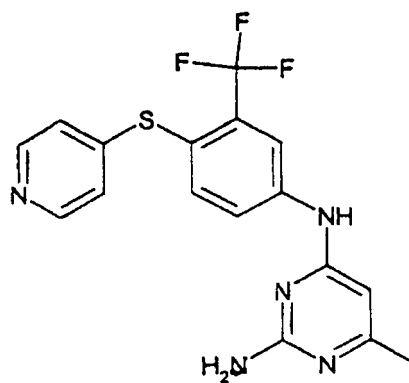
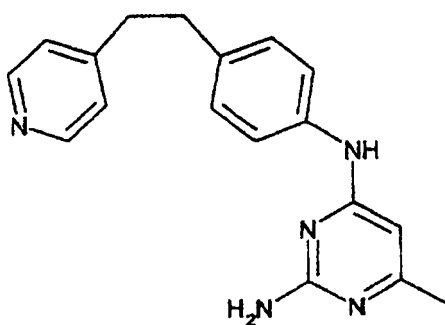
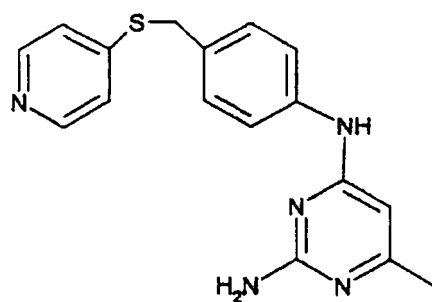
65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula



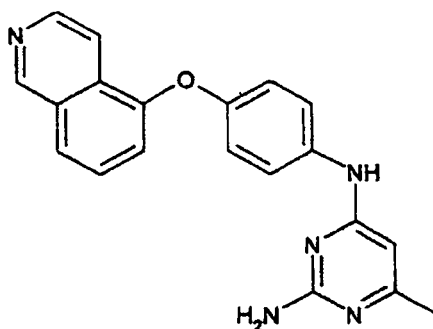




5

10

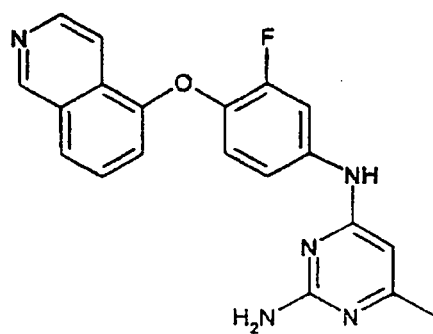
15



20

25

30



35

40

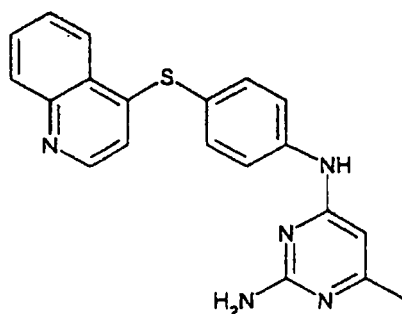
45

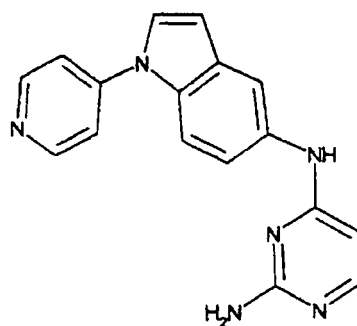
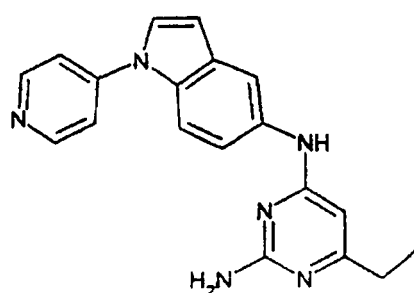
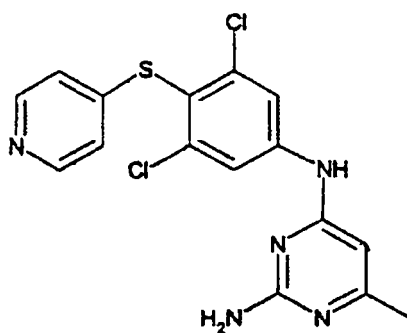
50

55

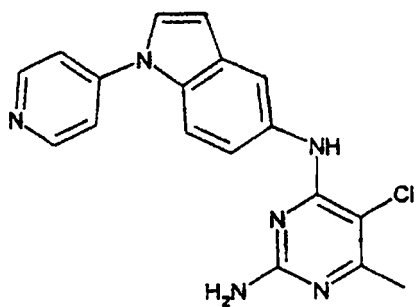
60

65



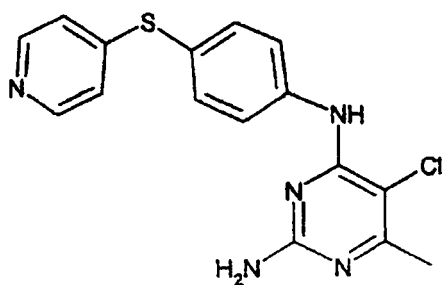


5



10

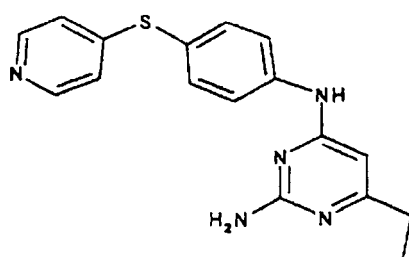
15



20

25

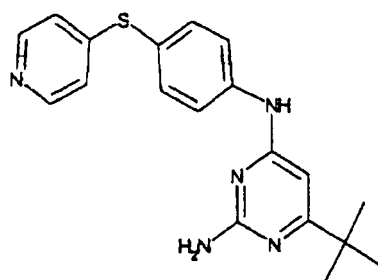
30



35

40

45

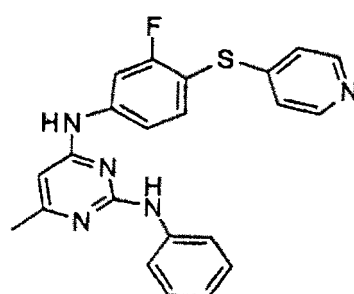
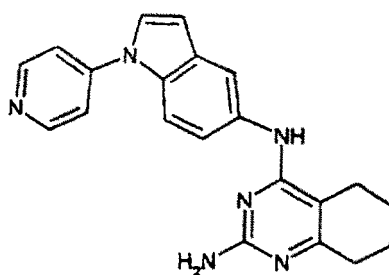
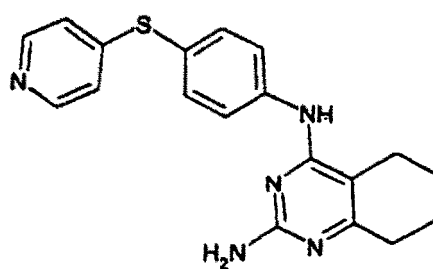
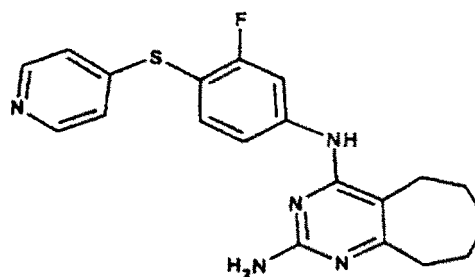


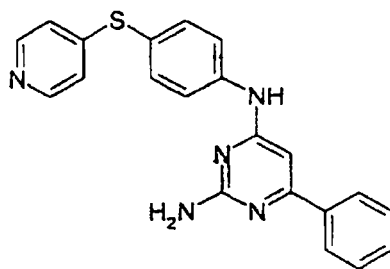
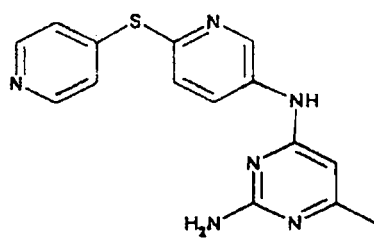
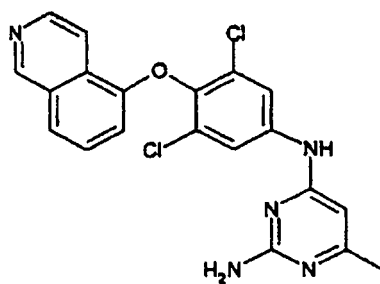
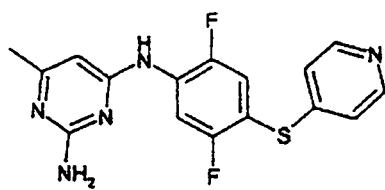
50

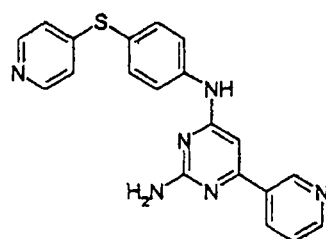
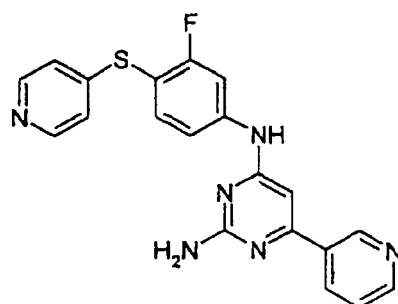
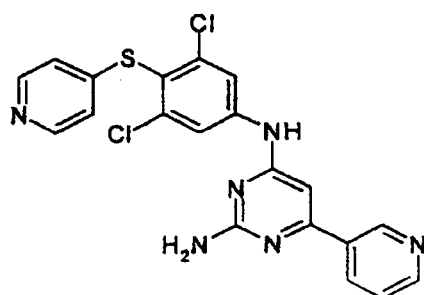
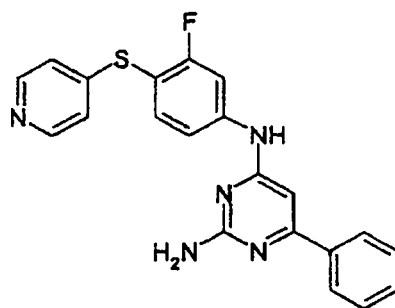
55

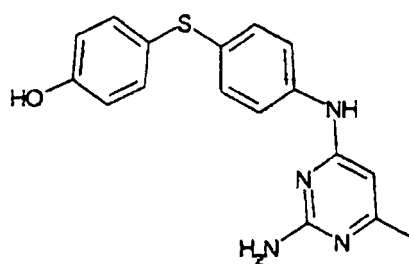
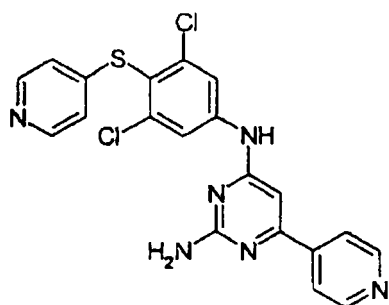
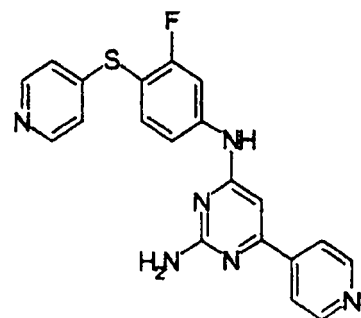
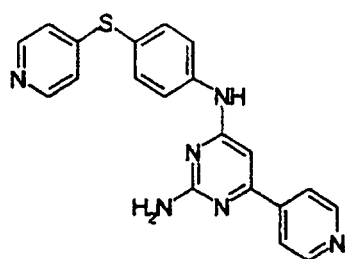
60

65









5

10

15

20

25

30

35

40

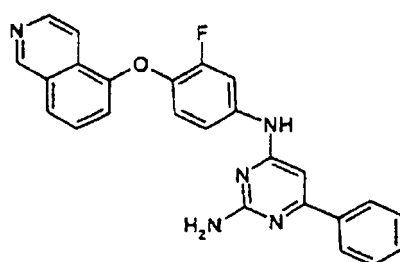
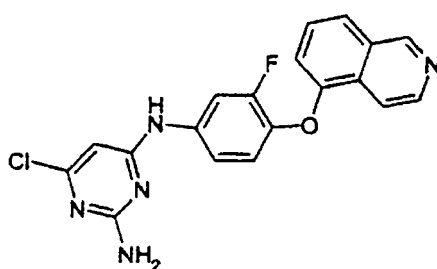
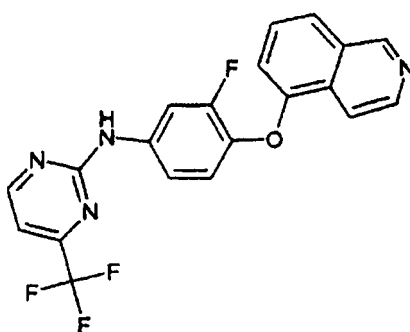
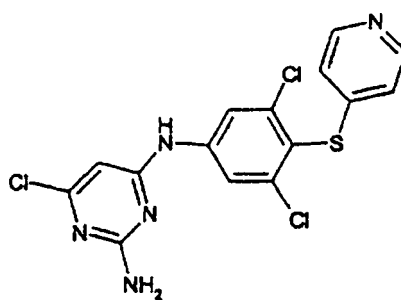
45

50

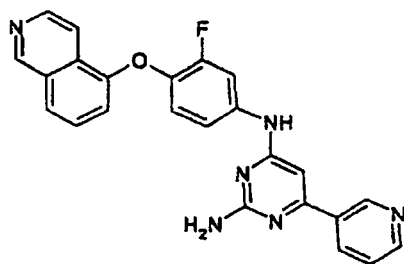
55

60

65



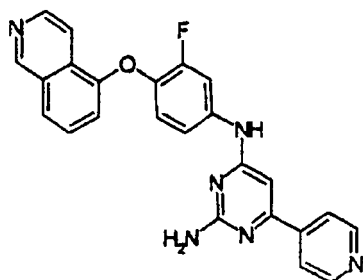
5



10

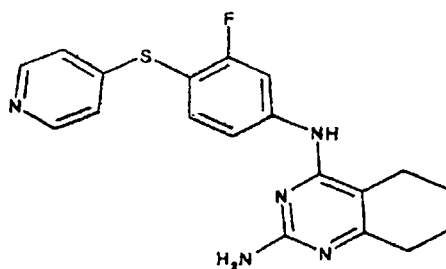
15

20



25

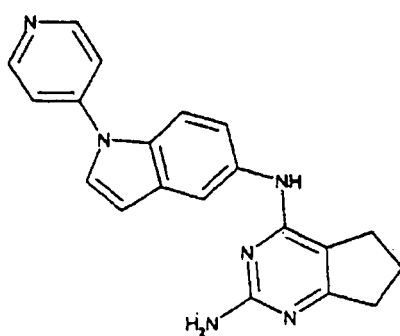
30



35

40

45

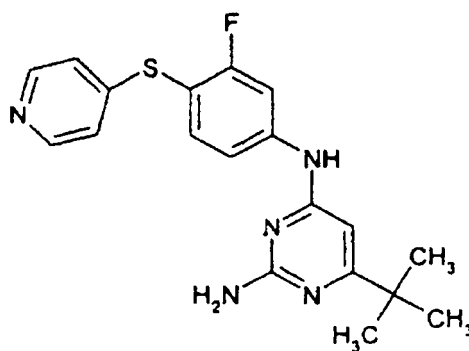
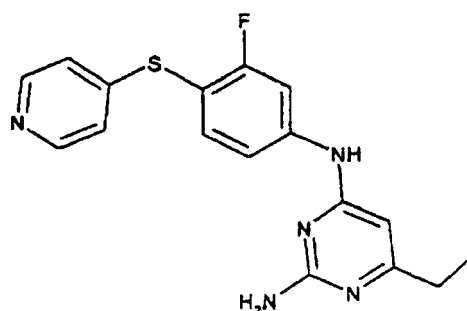
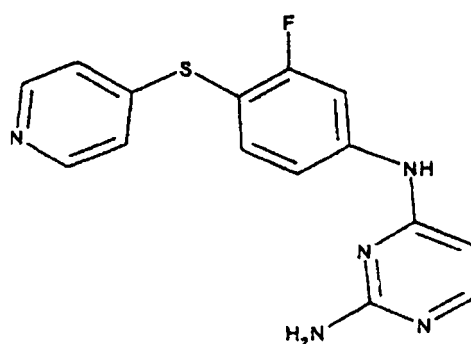
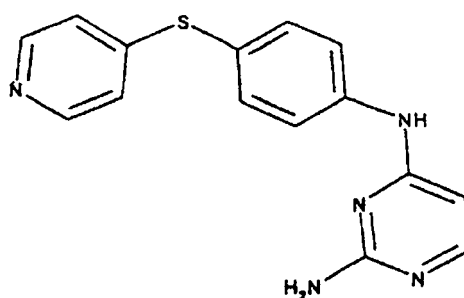


50

55

60

65



65 2. Uso de un compuesto como se define en la reivindicación 1, para la fabricación de un fármaco útil para el tratamiento de una indicación mediada por la quinasa Rho.

3. Uso, de acuerdo con la reivindicación 2, para la fabricación de un fármaco para el ser humano.

ES 2 298 497 T3

4. Uso de un compuesto como se define en la reivindicación 1, para la fabricación de un fármaco útil para el tratamiento de la hipertensión, la aterosclerosis, la restenosis, la isquemia cerebral, el vasoespasmo cerebral, la degeneración neuronal, la lesión de la médula espinal, el cáncer de mama, colon, próstata, ovarios, cerebro o pulmón, los trastornos trombóticos, el asma, el glaucoma, la osteoporosis o la disfunción eréctil.

5. Uso, de acuerdo con la reivindicación 4, para la fabricación de un fármaco para el ser humano.