

Drigard & Castro
Abogados

Apartado 3692

Cra. 7 16-56
Bogotá - Colombia S.A.

Tel. Conm. 3802200
Tel./Fax: (57.1) 2827976
(57.1) 3802700

E.Mail:bricas@brigardycastro.com.co

AS: 04.493

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y C
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 01002379 00000004 Folios: 47
Fecha (MD): 2001-06-06 17:09:16
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 444 REPUESTA
Dependencia: 2820 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REF: . Expediente No.01 002.379 - Solicitud de Patente
a favor de AstraZeneca AB

Titulada: COMPOSICIONES FARMACEUTICAS QUE COMPRENDEN
UN INHIBIDOR DE HMG CoA REDUCTASA Y UNA SAL
INORGÁNICA DONDE EL CATIÓN ES MULTIVALENTE

RAMIRO CASTRO DUQUE, vecino de Bogotá, portador de la tarjeta profesional No. 1003, obrando como apoderado de la Sociedad AstraZeneca AB, según lo acredita el documento de Poder presentado en esa División, para dar cumplimiento al requerimiento notificado por fijación en lista el 19 de Abril de 2001, y de acuerdo con los artículos 38 y 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, me permito anexar al presente escrito los siguientes documentos:

1. Nuevo título, acorde con la descripción y reivindicaciones, de acuerdo con lo solicitado.
2. Documento de poder con cesión del derecho a la Patente otorgado por los inventores, debidamente legalizado y autenticado ante Cónsul Colombiano, y autenticado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores junto con su correspondiente traducción oficial al español, debidamente avalada por el Ministerio de Relaciones Exteriores.
3. La dirección del solicitante es: S-151 85 Södertälje, Suecia. El lugar de constitución del solicitante es Suecia.
4. Extracto para publicación, Tarjeta de Archivo Temático y Tarjeta de propietarios con el nuevo título.

Drigard & Castro

Abogados

Apartado 3892

Cra. 7 16-56
Bogotá - Colombia S.A.

Tel. Conm. 3802200
Tel./Fax: (57.1) 2827976
(57.1) 3802700

E.Mail:bricas@brigardycastro.com.co

5. Copia certificada por la Oficina de Patentes del Reino Unido de la primera solicitud presentada para la misma invención, de la cual REIVINDICAMOS PRIORIDAD, junto con su correspondiente traducción del inglés al castellano.

Del señor Jefe atentamente,



RAMIRO CASTRO DUQUE

C.C. No. 170.322 de Bogotá

Código 340

Cra 7a. No. 16-56 Piso 9

Santafé de Bogotá, Junio 05, 2001

CPB/hsr

80

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

SOLICITANTE/S. RAZON SOCIAL O APELLIDOS Y NOMBRES AstraZeneca AB

DOMICILIO SÖDERTÄLJE, SUECIA

APODERADO RAMIRO CASTRO DUQUE

TITULO COMPOSICIONES FARMACEUTICAS QUE COMPRENDE UN INHIBIDOR DE HMG CoA REDUCTASA Y UNA SAL INORGANICA
DONDE EL CATION ES... CLASIFICACION

EXPEDIENTE No. 01 002.379 FECHA DE SOLICITUD 01-01-15 ROLLO MICROFILM

CERTIFICADO No. FECHA DE CONCESION VIGENCIA DESDE HASTA

PRORROGA CAMBIO DE NOMBRE

TRASPASO A

INVENTOR (ES) ALAN WELLINGTON FAULL, JASON KETTLE

OTROS

OFICINA DE COMUNICACIONES

82

(FORMA PI - 1B)	
EXTRACTO	
21	01 002.379
22	01-01-15
31	0000626.2
32	00-01-13
33	UK
51	

Dibujo Característico
se puede pegar aquí
6 cms. x 6 cms.

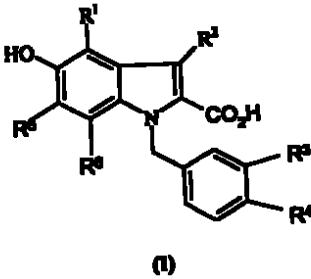
74	RAMIRO CASTRO DUQUE
72	Alan Wellington Faul1, Jason Kettle

Título No.
57)

Fecha

21/01/15

1. Un compuesto de la fórmula (I):



donde:

R¹ es hidrógeno, halo o metoxi;

R² es hidrógeno, halo, metil, etil o metoxi;

R³ es un grupo halo o un grupo trifluorometil;

Continúa al respaldo

71	AstraZeneca AB, Sodertalje, Suecia
REDUCTASA Y UNA SAL INORGANICA DONDE EL CATION ES MULTIVALENTE	
54	TITULO COMPOSICIONES FARMACEUTICAS QUE COMPRENDE UN INHIBIDOR DE HMG CoA

CORTAR POR AQUI

R^4 es un grupo halo o un grupo trifluorometil;

R^5 es hidrógeno o halo;

R^6 es hidrógeno o halo; teniendo en cuenta que cuando R^5 y R^6 son ambos hidrógeno, y uno de R^3 o R^4 es cloro o flúor, entonces el otro no es cloro o flúor;

o una sal farmacéticamente aceptable o prodroga de él.

02 624

~~28~~

**EXTRACTO PARA PUBLICACION
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION**

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

(21) No. SOLICITUD: 01 002.379

(51) INT.CL.:

(22) FECHA DE
PRESENTACION: 01-01-15

(71) SOLICITANTE:

(30) PRIORIDAD:

AstraZeneca AB

(31) No. DE SOLICITUD: 0000626.2

(72) INVENTOR/ES:

(32) FECHA DE
PRESENTACION: 00-01-13

Alan Wellington Faul, Jason Kettle

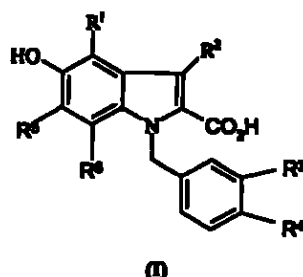
(33) PAIS: UK

(74) APODERADO: RAMIRO CASTRO DUQUE

(54) TITULO: **COMPOSICIONES FARMACEUTICAS QUE COMPRENDEN UN INHIBIDOR DE HMG CoA
REDUCTASA Y UNA SAL INORGANICA DONDE EL CATION ES MULTIVALENTE**

(57) RESUMEN:

1. Un compuesto de la fórmula (I):



donde:

R¹ es hidrógeno, halo o metoxi;

R² es hidrógeno, halo, metil, etil o metoxi;

R³ es un grupo halo o un grupo trifluorometil;

R⁴ es un grupo halo o un grupo trifluorometil;

R⁵ es hidrógeno o halo;

R⁶ es hidrógeno o halo;

teniendo en cuenta que cuando R⁵ y R⁶ son ambos hidrógeno, y uno de R³ o R⁴ es cloro o flúor, entonces el otro no es cloro o flúor;

o una sal farmacéticamente aceptable o prodroga de él.



4493

Columbia



INVESTOR IN PEOPLE

83

The Patent Office
Concept House
Cardiff Road
Newport
South Wales
NP10 8QQ

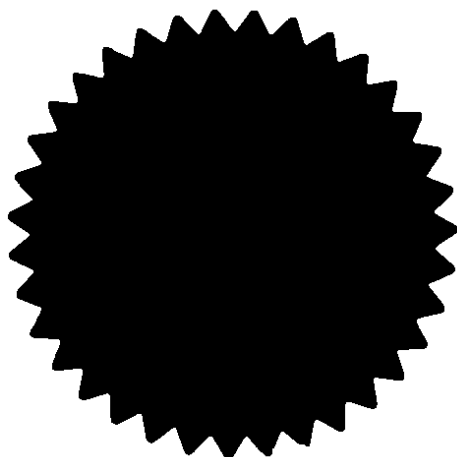
I, the undersigned, being an officer duly authorised in accordance with Section 74(1) and (4) of the Deregulation & Contracting Out Act 1994, to sign and issue certificates on behalf of the Comptroller-General, hereby certify that annexed hereto is a true copy of the documents as originally filed in connection with the patent application identified therein.

I also certify that by virtue of an assignment registered under the Patents Act 1977, the application is now proceeding in the name as substituted.

In accordance with the Patents (Companies Re-registration) Rules 1982, if a company named in this certificate and any accompanying documents has re-registered under the Companies Act 1980 with the same name as that with which it was registered immediately before re-registration save for the substitution as, or inclusion as, the last part of the name of the words "public limited company" or their equivalents in Welsh, references to the name of the company in this certificate and any accompanying documents shall be treated as references to the name with which it is so re-registered.

In accordance with the rules, the words "public limited company" may be replaced by p.l.c., plc, P.L.C. or PLC.

Re-registration under the Companies Act does not constitute a new legal entity but merely subjects the company to certain additional company law rules.



Signed

Dated

R. Mahoney
24 NOV 2000

04
10

GB0000626.2

By virtue of a direction given under Section of the Patents Act 1977, the application is proceeding in the name of

ASTRAZENECA AB,
Incorporated in Sweden,
S-151 85 Sodertalje,
Sweden

[ADP No. 07822448003]



Request for grant of a patent

(See the notes on the back of this form. You can also get an explanatory leaflet from the Patent Office to help you fill in this form)

INMANT OFFICE
E
13 JAN 2000
NEWPORT
PHM 00-002

The Patent Office

Cardiff Road
Newport
Gwent NP23 1RH

1. Your reference

2. Patent application number

(The Patent Office will fill in this part)

0000626.2

3. Full name, address and postcode of the or of each applicant (underline all surnames)

AstraZeneca UK Limited
15 Stanhope Gate
London, W1Y 6LN

Patents ADP number (if you know it)

6254007002

If the applicant is a corporate body, give the country/state of its incorporation

United Kingdom

4. Title of the invention

CHEMICAL COMPOUNDS

5. Name of your agent (if you have one)

Bill, Kevin

**"Address for service" in the United Kingdom
to which all correspondence should be sent
(including the postcode)**

**Global Intellectual Property
AstraZeneca PLC
Mereside, Alderley Park,
Macclesfield, Cheshire
SK10 4TG. GB.**

Patents ADP number (if you know it)

4469847002

6. If you are declaring priority from one or more earlier patent applications, give the country and the date of filing of the or of each of these earlier applications and (if you know it) the or each application number

Country

Priority application number
(if you know it)

Date of filing
(day / month / year)

7. If this application is divided or otherwise derived from an earlier UK application, give the number and the filing date of the earlier application

Number of earlier application

Date of filing
(day / month / year)

8. Is a statement of inventorship and of right to grant of a patent required in support of this request? (Answer 'Yes' if:

a) any applicant named in part 3 is not an inventor, or
b) there is an inventor who is not named as an applicant, or

2007-08-01

0000626.2

nts Form 1/77

Do not count copies of the same document

Continuation sheets of this form

Description	43
Claim(s)	0
Abstract	0
Drawing(s)	

10. If you are also filing any of the following,
state how many against each item.

Priority documents

Translations of priority documents

Statement of inventorship and right
to grant of a patent (Patents Form 7/77)

Request for preliminary examination
and search (Patents Form 9/77)

Request for substantive examination
(Patents Form 10/77)

Any other documents
(please specify)

11. I/We request the grant of a patent on the basis of this application.

Signature Lynda M Slack Date 21st Jan 2000
AstraZeneca UK Limited Authorised Signatory

12. Name and daytime telephone number of
person to contact in the United Kingdom

Mrs Lynda M Slack, Tel: 01625 516173

Warning

After an application for a patent has been filed, the Comptroller of the Patent Office will consider whether publication or communication of the invention should be prohibited or restricted under Section 22 of the Patents Act 1977. You will be informed if it is necessary to prohibit or restrict your invention in this way. Furthermore, if you live in the United Kingdom, Section 23 of the Patents Act 1977 stops you from applying for a patent abroad without first getting written permission from the Patent Office unless an application has been filed at least 6 weeks beforehand in the United Kingdom for a patent for the same invention and either no direction prohibiting publication or communication has been given, or any such direction has been revoked.

Notes

- If you need help to fill in this form or you have any questions, please contact the Patent Office on 0645 500505.
- Write your answers in capital letters using black ink or you may type them.
- If there is not enough space for all the relevant details on any part of this form, please continue on a separate sheet of paper and write "see continuation sheet" in the relevant part(s). Any continuation sheet should be attached to this form.
- If you have answered 'Yes' Patents Form 7/77 will need to be filed.
- Once you have filled in the form you must remember to sign and date it.

86
U6h
07CHEMICAL COMPOUNDS

The present invention relates to anti-inflammatory compounds that act via antagonism of the CCR2 receptor, (also known as the MCP-1 receptor), leading *inter alia* to inhibition of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1). These compounds contain an indole moiety. The invention further relates to pharmaceutical compositions containing them, processes for their preparation, intermediates useful in their preparation and to their use as therapeutic agents.

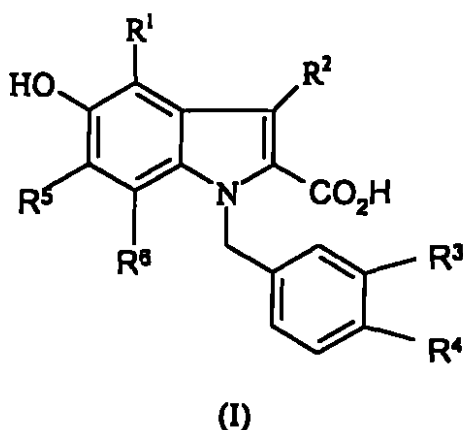
MCP-1 is a member of the chemokine family of pro-inflammatory proteins which mediate leukocyte chemotaxis and activation. MCP-1 is a C-C chemokine which is one of the most potent and selective T-cell and monocyte chemoattractant and activating agents known. MCP-1 has been implicated in the pathophysiology of a large number of inflammatory diseases including rheumatoid arthritis, glomerular nephritides, lung fibrosis, restenosis (International Patent Application WO 94/09128), alveolitis (Jones et al., 1992, *J. Immunol.*, 149, 2147) and asthma. Other disease areas where MCP-1 is thought to play a part in their pathology are atherosclerosis (e.g. Koch et al., 1992, *J. Clin. Invest.*, 90, 772 -779), psoriasis (Deleuran et al., 1996, *J. Dermatological Science*, 13, 228-236), delayed-type hypersensitivity reactions of the skin, inflammatory bowel disease (Grimm et al., 1996, *J. Leukocyte Biol.*, 59, 804-812), multiple sclerosis and brain trauma (Berman et al, 1996, *J. Immunol.*, 156, 3017-3023). An MCP-1 inhibitor may also be useful to treat stroke, reperfusion injury, ischemia, myocardial infarction and transplant rejection.

MCP-1 acts through the CCR2 receptor. MCP-2 and MCP-3 may also act, at least in part, through this receptor. Therefore in this specification, when reference is made to "inhibition or antagonism of MCP-1" or "MCP-1 mediated effects" this includes inhibition or antagonism of MCP-2 and/or MCP-3 mediated effects when MCP-2 and/or MCP-3 are acting through the CCR2 receptor.

The applicants have found a class of compounds containing an indole moiety which have useful inhibitory activity against MCP-1. Co-pending application UK 9716657.3 discloses a class of indoles with MCP-1 inhibitory activity. This application is based on the surprising discovery that particular substituted 5-hydroxy indoles are MCP-1 inhibitors which

possess unexpected and beneficial properties with respect to potency and/or blood levels and/or bioavailability and/or solubility.

Accordingly, the present invention provides a compound of the formula (I):



wherein:

R¹ is hydrogen, halo or methoxy;

R² is hydrogen, halo, methyl, ethyl or methoxy;

10 R³ is a halo group or a trifluoromethyl group;

R⁴ is a halo group or a trifluoromethyl group;

R⁵ is hydrogen or halo;

R⁶ is hydrogen or halo;

15 provided that when R⁵ and R⁶ are both hydrogen, and one of R³ or R⁴ is chloro or fluoro, the other is not chloro or fluoro;

or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof.

In this specification the term "alkyl" includes both straight and branched chain alkyl groups but references to individual alkyl groups such as "propyl" are specific for the straight chain version only. The term "halo" refers to fluoro, chloro, bromo and iodo.

20 Suitable examples of R¹ are hydrogen, fluoro, chloro, bromo, iodo or methoxy. Preferably R¹ is hydrogen, fluoro or chloro, and most preferably R¹ is hydrogen.

Particular examples of R² are hydrogen, fluoro, chloro, bromo, iodo, methyl, ethyl or methoxy. Suitably R² is hydrogen, chloro, bromo, iodo or methoxy, and preferably R² is hydrogen.

In one embodiment, R^5 and R^6 are both hydrogen. In this case, when R^4 is trifluoromethyl, R^3 is suitably a chloro, fluoro, bromo or iodo group, preferably a chloro, fluoro or bromo group, and most preferably chloro or fluoro.

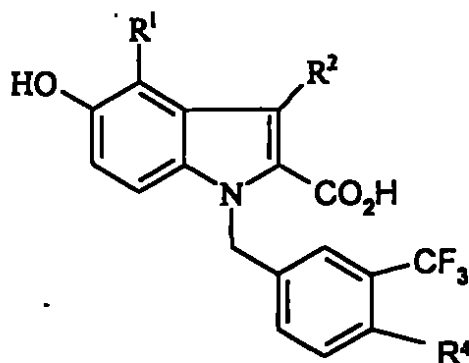
Alternatively, where R^5 and R^6 are both hydrogen, R^3 is trifluoromethyl, and R^4 is halo
5 such as fluoro, chloro, bromo or iodo, and preferably chloro or fluoro and most preferably chloro.

Similar combinations of R^3 and R^4 may apply where at least one of R^5 and R^6 is other than hydrogen, but in this case, R^3 and R^4 are suitably both halo such as fluoro, chloro, bromo and iodo, preferably fluoro, chloro or bromo, and most preferably fluoro or chloro. Particular
10 examples are cases where R^3 and R^4 are both chloro, or R^3 and R^4 are both fluoro. A further alternative is one in which one of R^3 or R^4 is chloro and the other is fluoro.

Suitably R^5 is hydrogen, fluoro, chloro or bromo, and preferably R^5 is hydrogen.

Suitably R^6 is hydrogen, fluoro, chloro or bromo, preferably R^6 is hydrogen or fluoro, and most preferably hydrogen.

15 In a preferred aspect of the invention there is provided a compound of formula (IA):



(IA)

or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof, wherein R^1 , R^2 and R^4 are as defined above. Preferably R^1 and R^2 are hydrogen. Preferably R^4 is chloro or fluoro.

20 Preferred compounds of the invention include any one of the compounds prepared in the Examples, which are summarised in Table 1.

Table 1

Example	R1	R2	R3	R4	R5	R6
1	H	H	CF ₃	Cl	H	H
2	H	H	F	CF ₃	H	H
3	H	H	Cl	CF ₃	H	H
4	H	H	Br	Cl	H	H
5	H	H	F	Br	H	H
6	H	H	Br	F	H	H
7	F	H	CF ₃	F	H	H
8	F	H	CF ₃	Cl	H	H
9	F	H	CF ₃	F	F	H
10	Cl	H	Cl	Cl	Cl	H
11	H	Br	CF ₃	F	H	H
12	H	Br	CF ₃	Cl	H	H
13	H	Br	Cl	CF ₃	H	H
14	H	Cl	F	CF ₃	H	H
15	H	I	F	CF ₃	H	H
16	H	CH ₃ O	CF ₃	Cl	H	H
17	H	H	CF ₃	F	Cl	H
18	H	H	CF ₃	Cl	Cl	H
19	H	H	CF ₃	Cl	H	F
20	H	H	CF ₃	Cl	Br	H
21	H	H	Cl	Cl	Br	H
22	H	H	CF ₃	Cl	F	H
23	H	H	Cl	Cl	F	H
24	H	H	Cl	Cl	Cl	H
25	Cl	H	CF ₃	Cl	H	H
26	Cl	H	CF ₃	Cl	Cl	H

88
1/10/94
1/10/94

The invention further relates to all tautomeric forms of the compounds of formula (I).

It is also to be understood that certain compounds of the formula (I) can exist in solvated as well as unsolvated forms such as, for example, hydrated forms. It is to be understood that the invention encompasses all such solvated forms.

5 Compounds of formula (I) are inhibitors of monocyte chemoattractant protein-1. In addition, they appear to inhibit RANTES induced chemotaxis. RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted) is another chemokine from the same family as MCP-1, with a similar biological profile, but acting through the CCR1 receptor. As a result, these compounds can be used to treat disease mediated by these agents, in particular
10 inflammatory disease.

Suitable pharmaceutically acceptable salts of compounds of formula (I) include base salts such as an alkali metal salt for example sodium, an alkaline earth metal salt for example calcium or magnesium, an organic amine salt for example triethylamine, morpholine, *N*-methylpiperidine, *N*-ethylpiperidine, procaine, dibenzylamine, *N,N*-dibenzylethylamine or
15 amino acids for example lysine. In another aspect, where the compound is sufficiently basic, suitable salts include acid addition salts such as methanesulphonate, fumarate, hydrochloride, hydrobromide, citrate, maleate and salts formed with phosphoric and sulphuric acid. There may be more than one cation or anion depending on the number of charged functions and the valency of the cations or anions. A preferred pharmaceutically acceptable salt is a sodium salt.

20 Various forms of prodrugs are known in the art. For examples of such prodrug derivatives, see:

- a) Design of Prodrugs, edited by H. Bundgaard, (Elsevier, 1985) and Methods in Enzymology, Vol. 42, p. 309-396, edited by K. Widder, *et al.* (Academic Press, 1985);
- b) A Textbook of Drug Design and Development, edited by Krogsgaard-Larsen and
25 H. Bundgaard, Chapter 5 "Design and Application of Prodrugs", by H. Bundgaard p. 113-191 (1991);
- c) H. Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, 8, 1-38 (1992);
- d) H. Bundgaard, *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 77, 285 (1988); and
- e) N. Kakeya, *et al.*, Chem Pharm Bull, 32, 692 (1984).

30 Examples of such prodrugs are *in vivo* cleavable esters of a compound of the invention. An *in vivo* cleavable ester of a compound of the invention containing a carboxy

group is, for example, a pharmaceutically-acceptable ester which is cleaved in the human or animal body to produce the parent acid. Suitable pharmaceutically-acceptable esters for carboxy include C₁₋₆alkyl esters, for example methyl or ethyl; C₁₋₆alkoxymethyl esters, for example methoxymethyl; C₁₋₆alkanoyloxymethyl esters, for example pivaloyloxymethyl;

5 phthalidyl esters; C₁₋₆cycloalkoxycarbonyloxyC₁₋₆alkyl esters, for example

1-cyclohexylcarbonyloxyethyl; 1,3-dioxolan-2-ylmethyl esters, for example

5-methyl-1,3-dioxolan-2-ylmethyl; C₁₋₆alkoxycarbonyloxyethyl esters, for example

1-methoxycarbonyloxyethyl; aminocarbonylmethyl esters and mono- or di- N-(C₁₋₆alkyl)

versions thereof, for example N,N-dimethylaminocarbonylmethyl esters and

10 N-ethylaminocarbonylmethyl esters; and may be formed at any carboxy group in the

compounds of this invention. An *in vivo* cleavable ester of a compound of the invention

containing a hydroxy group is, for example, a pharmaceutically-acceptable ester which is cleaved in the human or animal body to produce the parent hydroxy group. Suitable

pharmaceutically acceptable esters for hydroxy include C₁₋₆alkanoyl esters, for example

15 acetyl esters; and benzoyl esters wherein the phenyl group may be substituted with

aminomethyl or N- substituted mono- or di- C₁₋₆alkyl aminomethyl, for example

4-aminomethylbenzoyl esters and 4-N,N-dimethylaminomethylbenzoyl esters.

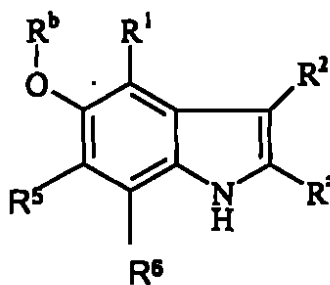
Further examples of such prodrugs are *in vivo* cleavable amides of a compound of the invention. Examples of such *in vivo* cleavable amides include an N-C₁₋₆alkylamide and an

20 N,N-di-(C₁₋₆alkyl)amide such as N-methyl, N-ethyl, N-propyl, N,N-dimethyl,

N-ethyl-N-methyl or N,N-diethylamide.

Another aspect of the present invention provides a process for preparing a compound of formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof which process comprises:

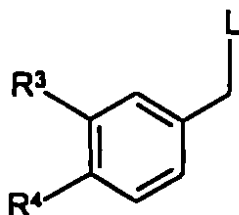
25 a) reacting compounds of formula (II):



(II)

where R^1 , R^2 , R^3 and R^6 are as defined in relation to formula (I), R^3 is carboxy or a protected form thereof, and R^b is hydrogen or a suitable hydroxy protecting group, with a compound of

5 formula (III):



(III)

where R^3 and R^4 are as defined in relation to formula (I) and L is a displaceable group; and thereafter if necessary:

- 10 i) converting a compound of the formula (I) into another compound of the formula (I);
- ii) removing any protecting groups; or
- iii) forming a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof.

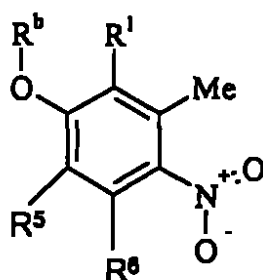
Suitable values for L are for example, a halogeno or sulphonyloxy group, for example a chloro, bromo, methanesulphonyloxy or toluene-4-sulphonyloxy group.

- 15 Compounds of formula (II) and (III) are suitably reacted together in an inert organic solvent such as *N,N*-dimethylformamide, dichloromethane or acetonitrile in the presence of a base such as sodium hydroxide, sodium hydride or potassium carbonate. Suitably the reaction is effected in the presence of a phase transfer catalyst such as tetra-*n*-butylammonium hydrogensulphate. Reaction times may range for 1-6 hours preferably for 1-3 hours.

- 20 Moderate temperatures for example of 15-30°C, preferably 20-25°C are employed.

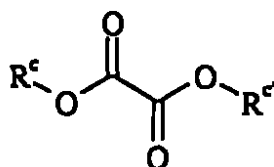
Compounds of formula (II) may be commercially available, or they may be made by modification using known processes of commercially available compounds of formula (II).

In particular, they may be prepared by reacting a compound of formula (IV):



(IV)

where R^1 , R^5 , R^6 and R^b is as defined above with a compound of formula (V)



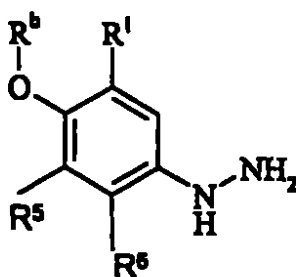
(V)

where R^c and $R^{c'}$ are independently selected from C_{1-4} alkyl.

Compounds of formula (IV) and (V) are suitably reacted together under Reissert reaction conditions such as in an inert solvent (such as tetrahydrofuran), in the presence of a base (such as potassium ethoxide), at a temperature range of 15-30°C preferably 20-25°C, for 10-20 hours preferably 15-17 hours. The resulting compound is isolated and dissolved in an alcohol such as ethanol and an organic acid (such as acetic acid) and a transition metal catalyst (such as 10% Pd/C) and cyclohexene is added. The mixture may then be heated at a temperature of 60-120°C preferably at 70-90°C for 15-25 hours preferably 16-20 hours to give a compound of formula (II) wherein R^a is $-CO_2R^c$.

R^c and $R^{c'}$ are suitably C_{1-4} alkyl, preferably methyl or ethyl.

Alternatively, compounds of formula (II) can be prepared by reacting a compound of formula (VI):

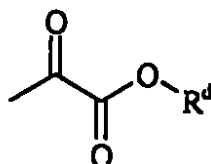


(VI)

90
M
X

- 9 -

where R^1 , R^5 , R^6 and R^b are as defined above, with a compound of formula (VII):



(VII)

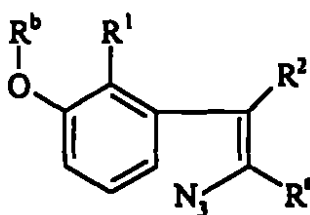
where R^d is C_{1-4} alkyl.

5 Suitably R^d is C_{1-4} alkyl, preferably methyl or ethyl.

Compounds of formula (VI) and (VII) are suitably reacted together under Fischer conditions such as with an organic acid (such as acetic acid), in an alcohol (such as ethanol), at a temperature of 60-90°C, preferably 75-85°C, for 1-5 hours, preferably 1-3 hours. The resulting compound is mixed with a strong acid (such as polyphosphoric acid) and heated at
10 90-150°C preferably 100-120°C, for 0.5-4 hours, preferably 0.5-2 hours to give a compound of formula (II) in which R^2 is hydrogen. Then, if desired, R^2 can be optionally converted into another value of R^2 as defined in formula (I) using techniques known in the literature.

In a preferred alternative, compounds of formula (II) are obtained by cyclisation of a compound of formula (VIII)

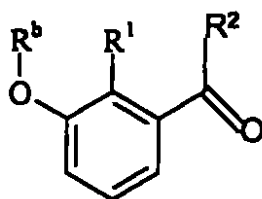
15



(VIII)

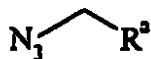
where R^1 , R^a , R^b and R^2 are as defined above.

Cyclisation may be effected by refluxing the compound in an organic solvent such as
20 xylene. Compounds of formula (VIII) are suitably prepared by reacting a compound of formula (IX)



(IX)

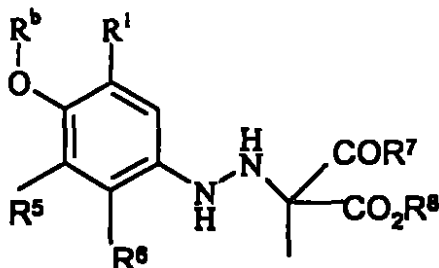
where R^1 , R^2 and R^b are as defined above, with a compound of formula (X)



(X)

where R^3 is as defined above. The reaction is suitably effected in an organic solvent such as an alcohol, in particular methanol, in the presence of a base such as an alkali metal alkoxide, in particular sodium methoxide. Moderate temperatures of from -30 to 20°C are suitably employed.

In yet a further modification, compounds of formula (II) are prepared by cyclisation of a compound of formula (XI)



(XI)

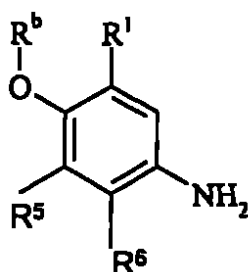
where R^1 and R^b are as defined above, R^7 is alkyl, such as methyl, and R^8 is a carboxy protecting group such as alkyl, in particular methyl.

Cyclisation is suitably effected under Japp Klingemann conditions, by warming a solution of the compound in an organic solvent such as toluene and a suitable acid, such as *p*-toluene sulphonic acid.

Compounds of formula (XI) are suitably prepared by reacting a compound of formula (XII)

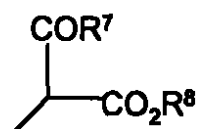
91 ~~102~~

- 11 -



(XII)

where R¹, R^b, R⁵ and R⁶ are as defined above, with a compound of formula (XIII)



(XIII)

where R⁷ and R⁸ are as defined in relation to formula (XI). The compound of formula (XII) is suitably dissolved in a dilute acid such as 1.5N-HCl in the presence of a nitrite such as sodium nitrite at moderately low temperatures from -30 to 0°C, preferably -5°C.

10 This solution is then mixed with a solution of a compound of formula (XIII) in an organic solvent such as ethanol, in the presence of a solution of a base such as an alkali metal hydroxide, for example aqueous sodium hydroxide solution.

Compounds of formula (III), (IV), (V), (VI), (VII), (IX), (X) and (XII) are known or commercially available or are prepared by processes known in the art by standard

15 manipulation of commercially available or known materials.

It will also be appreciated that in some of the reactions mentioned herein it may be necessary/desirable to protect any sensitive groups in the compounds. The instances where protection is necessary or desirable and suitable methods for protection are known to those skilled in the art. Thus, if reactants include groups such as carboxy or hydroxy it may be

20 desirable to protect the group in some of the reactions mentioned herein.

A suitable protecting group for a hydroxy group is, for example, an acyl group, for example an alkanoyl group such as acetyl, an aroyl group, for example benzoyl, or an arylmethyl group, for example benzyl. The deprotection conditions for the above protecting groups will necessarily vary with the choice of protecting group. Thus, for example, an acyl

25 group such as an alkanoyl or an aroyl group may be removed, for example, by hydrolysis with

a suitable base such as an alkali metal hydroxide, for example lithium or sodium hydroxide. Alternatively an arylmethyl group such as a benzyl group may be removed, for example, by hydrogenation over a catalyst such as palladium-on-carbon.

A suitable protecting group for a carboxy group is, for example, an esterifying group, 5 for example a methyl or an ethyl group which may be removed, for example, by hydrolysis with a base such as sodium hydroxide, or for example a *t*-butyl group which may be removed, for example, by treatment with an acid, for example an organic acid such as trifluoroacetic acid, or for example a benzyl group which may be removed, for example, by hydrogenation over a catalyst such as palladium-on-carbon.

10 The protecting groups may be removed at any convenient stage in the synthesis using conventional techniques well known in the chemical art.

Some of the intermediates described herein may be novel, for example intermediates of the formula (II), and as such they are provided as a further feature of the invention.

When a pharmaceutically-acceptable salt of a compound of formula (I) is required, it 15 may be obtained, for example, by reaction of said compound with the appropriate acid (which affords a physiologically acceptable anion), or with the appropriate base (which affords a physiologically acceptable cation), or by any other conventional salt formation procedure.

According to a further aspect of the invention there is provided a pharmaceutical composition which comprises a compound of the formula (I) as defined hereinbefore or a 20 pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof, in association with a pharmaceutically acceptable excipient or carrier.

The compositions of the invention may be in a form suitable for oral use (for example as tablets, lozenges, hard or soft capsules, aqueous or oily suspensions, emulsions, dispersible powders or granules, syrups or elixirs), for topical use (for example as creams, ointments, 25 gels, or aqueous or oily solutions or suspensions), for administration by inhalation (for example as a finely divided powder or a liquid aerosol), for administration by insufflation (for example as a finely divided powder) or for parenteral administration (for example as a sterile aqueous or oily solution for intravenous, subcutaneous, intramuscular or intramuscular dosing or as a suppository for rectal dosing).

30 The compositions of the invention may be obtained by conventional procedures using conventional pharmaceutical excipients, well known in the art. Thus, compositions intended

92
X

for oral use may contain, for example, one or more colouring, sweetening, flavouring and/or preservative agents.

Suitable pharmaceutically acceptable excipients for a tablet formulation include, for example, inert diluents such as lactose, sodium carbonate, calcium phosphate or calcium carbonate, granulating and disintegrating agents such as corn starch or algenic acid; binding agents such as starch; lubricating agents such as magnesium stearate, stearic acid or talc; preservative agents such as ethyl or propyl p-hydroxybenzoate, and anti-oxidants, such as ascorbic acid. Tablet formulations may be uncoated or coated either to modify their disintegration and the subsequent absorption of the active ingredient within the gastrointestinal track, or to improve their stability and/or appearance, in either case, using conventional coating agents and procedures well known in the art.

Compositions for oral use may be in the form of hard gelatin capsules in which the active ingredient is mixed with an inert solid diluent, for example, calcium carbonate, calcium phosphate or kaolin, or as soft gelatin capsules in which the active ingredient is mixed with water or an oil such as peanut oil, liquid paraffin, or olive oil.

Aqueous suspensions generally contain the active ingredient in finely powdered form together with one or more suspending agents, such as sodium carboxymethylcellulose, methylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, sodium alginate, polyvinyl-pyrrolidone, gum tragacanth and gum acacia; dispersing or wetting agents such as lecithin or condensation products of an alkylene oxide with fatty acids (for example polyoxyethylene stearate), or condensation products of ethylene oxide with long chain aliphatic alcohols, for example heptadecaethyleneoxycetanol, or condensation products of ethylene oxide with partial esters derived from fatty acids and a hexitol such as polyoxyethylene sorbitol monooleate, or condensation products of ethylene oxide with long chain aliphatic alcohols, for example heptadecaethyleneoxycetanol, or condensation products of ethylene oxide with partial esters derived from fatty acids and a hexitol such as polyoxyethylene sorbitol monooleate, or condensation products of ethylene oxide with partial esters derived from fatty acids and hexitol anhydrides, for example polyethylene sorbitan monooleate. The aqueous suspensions may also contain one or more preservatives (such as ethyl or propyl p-hydroxybenzoate, anti-oxidants (such as ascorbic acid), colouring agents, flavouring agents, and/or sweetening agents (such as sucrose, saccharine or aspartame).

Oily suspensions may be formulated by suspending the active ingredient in a vegetable oil (such as arachis oil, olive oil, sesame oil or coconut oil) or in a mineral oil (such as liquid paraffin). The oily suspensions may also contain a thickening agent such as beeswax, hard paraffin or cetyl alcohol. Sweetening agents such as those set out above, and flavouring agents
5 may be added to provide a palatable oral preparation. These compositions may be preserved by the addition of an anti-oxidant such as ascorbic acid.

Dispersible powders and granules suitable for preparation of an aqueous suspension by the addition of water generally contain the active ingredient together with a dispersing or wetting agent, suspending agent and one or more preservatives. Suitable dispersing or wetting
10 agents and suspending agents are exemplified by those already mentioned above. Additional excipients such as sweetening, flavouring and colouring agents, may also be present.

The pharmaceutical compositions of the invention may also be in the form of oil-in-water emulsions. The oily phase may be a vegetable oil, such as olive oil or arachis oil, or a mineral oil, such as for example liquid paraffin or a mixture of any of these. Suitable
15 emulsifying agents may be, for example, naturally-occurring gums such as gum acacia or gum tragacanth, naturally-occurring phosphatides such as soya bean, lecithin, an esters or partial esters derived from fatty acids and hexitol anhydrides (for example sorbitan monooleate) and condensation products of the said partial esters with ethylene oxide such as polyoxyethylene sorbitan monooleate. The emulsions may also contain sweetening, flavouring and preservative
20 agents.

Syrups and elixirs may be formulated with sweetening agents such as glycerol, propylene glycol, sorbitol, aspartame or sucrose, and may also contain a demulcent, preservative, flavouring and/or colouring agent.

The pharmaceutical compositions may also be in the form of a sterile injectable
25 aqueous or oily suspension, which may be formulated according to known procedures using one or more of the appropriate dispersing or wetting agents and suspending agents, which have been mentioned above. A sterile injectable preparation may also be a sterile injectable solution or suspension in a non-toxic parenterally-acceptable diluent or solvent, for example a solution in 1,3-butanediol.

30 Suppository formulations may be prepared by mixing the active ingredient with a suitable non-irritating excipient which is solid at ordinary temperatures but liquid at the rectal

93
10/11/11

- 15 -

temperature and will therefore melt in the rectum to release the drug. Suitable excipients include, for example, cocoa butter and polyethylene glycols.

Topical formulations, such as creams, ointments, gels and aqueous or oily solutions or suspensions, may generally be obtained by formulating an active ingredient with a
5 conventional, topically acceptable, vehicle or diluent using conventional procedure well known in the art.

Compositions for administration by insufflation may be in the form of a finely divided powder containing particles of average diameter of, for example, 30 μ or much less, the powder itself comprising either active ingredient alone or diluted with one or more
10 physiologically acceptable carriers such as lactose. The powder for insufflation is then conveniently retained in a capsule containing, for example, 1 to 50mg of active ingredient for use with a turbo-inhaler device, such as is used for insufflation of the known agent sodium cromoglycate.

Compositions for administration by inhalation may be in the form of a conventional
15 pressurised aerosol arranged to dispense the active ingredient either as an aerosol containing finely divided solid or liquid droplets. Conventional aerosol propellants such as volatile fluorinated hydrocarbons or hydrocarbons may be used and the aerosol device is conveniently arranged to dispense a metered quantity of active ingredient.

For further information on Formulation the reader is referred to Chapter 25.2 in
20 Volume 5 of Comprehensive Medicinal Chemistry (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990.

The amount of active ingredient that is combined with one or more excipients to produce a single dosage form will necessarily vary depending upon the host treated and the particular route of administration. For example, a formulation intended for oral administration
25 to humans will generally contain, for example, from 0.5 mg to 2 g of active agent compounded with an appropriate and convenient amount of excipients which may vary from about 5 to about 98 percent by weight of the total composition. Dosage unit forms will generally contain about 1 mg to about 500 mg of an active ingredient. For further information on Routes of Administration and Dosage Regimes the reader is referred to Chapter 25.3 in
30 Volume 5 of Comprehensive Medicinal Chemistry (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990.

The size of the dose for therapeutic or prophylactic purposes of a compound of the Formula I will naturally vary according to the nature and severity of the conditions, the age and sex of the animal or patient and the route of administration, according to well known principles of medicine. As mentioned above, compounds of the Formula I are useful in
5 treating diseases or medical conditions which are due alone or in part to the effects of farnesylation of rats.

In using a compound of the Formula I for therapeutic or prophylactic purposes it will generally be administered so that a daily dose in the range, for example, 0.5 mg to 75 mg per kg body weight is received, given if required in divided doses. In general lower doses will be
10 administered when a parenteral route is employed. Thus, for example, for intravenous administration, a dose in the range, for example, 0.5 mg to 30 mg per kg body weight will generally be used. Similarly, for administration by inhalation, a dose in the range, for example, 0.5 mg to 25 mg per kg body weight will be used. Oral administration is however preferred.

15 According to a further aspect of the present invention there is provided a compound of the formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof, as defined hereinbefore for use in a method of treatment of the human or animal body by therapy. Conveniently, the invention provides a method of treating inflammatory disease by administering a compound of formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug or a pharmaceutical composition
20 thereof, as described above.

..A further feature of the present invention is a compound of formula (I) and pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof, for use as a medicament.

Conveniently this is a compound of formula (I), or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof, for use as a medicament for antagonising an MCP-1 mediated effect in a
25 warm-blooded animal such as a human being.

Thus according to a further aspect of the invention there is provided the use of a compound of the formula (I), or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof, in the manufacture of a medicament for use in antagonising an MCP-1 mediated effect in a warm-blooded animal such as a human being.

30 According to a further feature of the invention there is provided a method of antagonising an MCP-1 mediated effect in a warm-blooded animal, such as a human being, in

94 ~~103~~
~~103~~

need of such treatment which comprises administering to said animal an effective amount of a compound of formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt or prodrug thereof, as defined hereinbefore.

Biological Testing.

- 5 The following biological test methods, data and Examples serve to illustrate the present invention.

Abbreviations:

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, USA.
BCA	Bicinchroninic acid, (used, with copper sulphate, to assay protein)
BSA	Bovine Serum Albumin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EGTA	Ethylenebis(oxyethylenenitrilo)tetraacetic acid
FCS	Foetal calf serum
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulphonic acid])
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hMCP-1	Human Monocyte Chemoattractant Protein-1
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction

AMPLITAQ™, available from Perkin-Elmer Cetus, is used as the source of thermostable DNA polymerase.

- 10 Binding Buffer is 50 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0.5% foetal calf serum, adjusted to pH 7.2 with 1 M NaOH.

Non-Essential Amino Acids (100X concentrate) is: L-Alanine, 890 mg/l; L-Asparagine, 1320 mg/l; L-Aspartic acid, 1330 mg/l; L-Glutamic acid, 1470 mg/l; Glycine, 750 mg/l; L-Proline, 1150 mg/l and; L-Serine, 1050 mg/l.

- 15 Hypoxanthine and Thymidine Supplement (50x concentrate) is: hypoxanthine, 680 mg/l and; thymidine, 194 mg/l.

Penicillin-Streptomycin is: Penicillin G (sodium salt); 5000 units/ml; Streptomycin sulphate, 5000 µg/ml.

- Human monocytic cell line THP-1 cells are available from ATCC, accession number
20 ATCC TIB-202.

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) was obtained from Gibco; see *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1949, 71, 196.

Synthetic cell culture medium, RPMI 1640 was obtained from Gibco; it contains inorganic salts [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/l; KCl 400 mg/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/l; NaCl 6000 mg/l; NaHCO_3 2000 mg/l & Na_2HPO_4 (anhyd) 800 mg/l], D-Glucose 2000 mg/l, reduced glutathione 1 mg/l, amino acids and vitamins.

FURA-2/AM is 1-[2-(5-carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid pentaacetoxymethyl ester and was obtained from Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA.

10 Blood Sedimentation Buffer contains 8.5g/l NaCl and 10g/l hydroxyethyl cellulose.

Lysis Buffer is 0.15M NH_4Cl , 10mM KHCO_3 , 1mM EDTA

Whole Cell Binding Buffer is 50 mM HEPES, 1 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 0.5% BSA, 0.01% NaN_3 , adjusted to pH 7.2 with 1M NaOH.

15 Wash buffer is 50mM HEPES, 1mM CaCl_2 , 5mM MgCl_2 , 0.5% heat inactivated FCS, 0.5M NaCl adjusted to pH 7.2 with 1M NaOH.

General molecular biology procedures can be followed from any of the methods described in "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Second Edition, Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

20 i) Cloning and expression of hMCP-1 receptor

The MCP-1 receptor B (CCR2B) cDNA was cloned by PCR from THP-1 cell RNA using suitable oligonucleotide primers based on the published MCP-1 receptor sequences (Charo *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 2752). The resulting PCR products were cloned into vector PCR-II™ (InVitrogen, San Diego, CA.). Error free CCR2B cDNA was
25 subcloned as a Hind III-Not I fragment into the eukaryotic expression vector pCDNA3 (InVitrogen) to generate pCDNA3/CC-CKR2A and pCDNA3/CCR2B respectively.

Linearised pCDNA3/CCR2B DNA was transfected into CHO-K1 cells by calcium phosphate precipitation (Wigler *et al.*, 1979, *Cell*, 16, 777). Transfected cells were selected by the addition of Geneticin Sulphate (G418, Gibco BRL) at 1mg/ml, 24 hours after the cells had
30 been transfected. Preparation of RNA and Northern blotting were carried out as described

95
2/26
T

previously (Needham *et al.*, 1995, *Prot. Express. Purific.*, 6, 134). CHO-K1 clone 7 (CHO-CCR2B) was identified as the highest MCP-1 receptor B expressor.

ii) Preparation of membrane fragments

CHO-CCR2B cells were grown in DMEM supplemented with 10% foetal calf serum, 2 mM glutamine, 1x Non-Essential Amino Acids, 1x Hypoxanthine and Thymidine Supplement and Penicillin-Streptomycin (at 50 µg streptomycin/ml, Gibco BRL). Membrane fragments were prepared using cell lysis/differential centrifugation methods as described previously (Siciliano *et al.*, 1990, *J. Biol. Chem.*, 265, 19658). Protein concentration was estimated by BCA protein assay (Pierce, Rockford, Illinois) according to the manufacturer's instructions.

iii) Assay

¹²⁵I MCP-1 was prepared using Bolton and Hunter conjugation (Bolton *et al.*, 1973, *Biochem. J.*, 133, 529; Amersham International plc]. Equilibrium binding assays were carried out using the method of Ernst *et al.*, 1994, *J. Immunol.*, 152, 3541. Briefly, varying amounts of ¹²⁵I-labeled MCP-1 were added to 7µg of purified CHO-CCR2B cell membranes in 100 µl of Binding Buffer. After 1 hour incubation at room temperature the binding reaction mixtures were filtered and washed 5 times through a plate washer (Brandel MLR-96T Cell Harvester) using ice cold Binding Buffer. Filter mats (Brandel GF/B) were pre-soaked for 60 minutes in 0.3% polyethylenimine prior to use. Following filtration individual filters were separated into 3.5ml tubes (Sarstedt No. 55.484) and bound ¹²⁵I-labeled MCP-1 was determined (LKB 1277 Gammamaster). Cold competition studies were performed as above using 100 pM ¹²⁵I-labeled MCP-1 in the presence of varying concentrations of unlabelled MCP-1. Non-specific binding was determined by the inclusion of a 200-fold molar excess of unlabelled MCP-1 in the reaction.

Ligand binding studies with membrane fragments prepared from CHO-CCR2B cells showed that the CCR2B receptor was present at a concentration of 0.2 pmoles/mg of membrane protein and bound MCP-1 selectively and with high affinity (IC₅₀ = 110 pM, K_d = 120 pM). Binding to these membranes was completely reversible and reached equilibrium after 45 minutes at room temperature, and there was a linear relationship between MCP-1 binding and CHO-CCR2B cell membrane concentration when using MCP-1 at concentrations between 100 pM and 500 pM.

Test compounds dissolved in DMSO (5µl) were tested in competition with 100 pM labelled MCP-1 over a concentration range (0.01-50µM) in duplicate using eight point dose-response curves and IC₅₀ concentrations were calculated.

Compounds tested of the present invention had IC₅₀ values of 50µM or less in the hMCP-1 receptor binding assay described herein.

b) MCP-1 mediated calcium flux in THP-1 cells

The human monocytic cell line THP-1 was grown in a synthetic cell culture medium RPMI 1640 supplemented with 10 % foetal calf serum, 6mM glutamine and Penicillin-Streptomycin (at 50 µg streptomycin/ml, Gibco BRL). THP-1 cells were washed in HBSS (lacking Ca²⁺ and Mg²⁺) + 1 mg/ml BSA and resuspended in the same buffer at a density of 3 x 10⁶ cells/ml. The cells were then loaded with 1mM FURA-2/AM for 30 min at 37°C, washed twice in HBSS, and resuspended at 1x10⁶ cells/ml. THP-1 cell suspension (0.9 ml) was added to a 5 ml disposable cuvette containing a magnetic stirrer bar and 2.1 ml of prewarmed (37°C) HBSS containing 1 mg/ml BSA, 1 mM MgCl₂ and 2 mM CaCl₂. The cuvette was placed in a fluorescence spectrophotometer (Perkin Elmer, Norwalk, CT) and preincubated for 4 min at 37°C with stirring. Fluorescence was recorded over 70 sec and cells were stimulated by addition of hMCP-1 to the cuvette after 10 sec. [Ca²⁺]_i was measured by excitation at 340 nm and 380 nm alternately and subsequent measurement of the intensity of the fluorescence emission at 510 nm. The ratio of the intensities of the emitted fluorescent light following excitation at 340 nm and 380 nm, (R), was calculated and displayed to give and estimate of cytoplasmic [Ca²⁺]_i according to the equation:-

$$[Ca^{2+}]_i = K_d (R - R_{min}) (Sf2/Sb2) / (R_{max} - R)$$

where the K_d for FURA-2 Ca²⁺ complex at 37°C was taken to be 224nm. R_{max} is the maximal fluorescence ratio determined after addition of 10 mM Ionomycin, R_{min} is the minimal ratio determined by the subsequent addition of a Ca²⁺ free solution containing 5 mM EGTA, and Sf2/Sb2 is the ratio of fluorescence values at 380 nm excitation determined at R_{min} and R_{max}, respectively.

Stimulation of THP-1 cells with hMCP-1 induced a rapid, transient rise in [Ca²⁺]_i in a specific and dose dependent manner. Dose response curves indicated an approximate EC₅₀ of 2 nm. Test compounds dissolved in DMSO (10µl) were assayed for inhibition of calcium

96
152
152

release by adding them to the cell suspension 10 sec prior to ligand addition and measuring the reduction in the transient rise in $[Ca^{2+}]_i$. Test compounds were also checked for lack of agonist activity by addition in place of hMCP-1.

c) hMCP-1 and RANTES mediated chemotaxis.

- 5 *In vitro* chemotaxis assays were performed using the human monocytic cell line THP-1. Cell migration through polycarbonate membranes was measured by enumerating those passing through either directly by Coulter counting or indirectly by use of a colourimetric viability assay measuring the cleavage of a tetrazolium salt by the mitochondrial respiratory chain (Scudiero D.A. *et al.* 1988, *Cancer Res.*, 48, 4827-4833).
- 10 Chemoattractants were introduced into a 96-well microtitre plate which forms the lower well of a chemotaxis chamber fitted with a PVP-free 5 μ m poresize polycarbonate adhesive framed filter membrane (NeuroProbe MB series, Cabin John, MD 20818, USA) according to the manufacturer's instructions. The chemoattractant was diluted as appropriate in synthetic cell culture medium, RPMI 1640 (Gibco) or supplemented with 2 mM glutamine
- 15 and 0.5% BSA, or alternatively with HBSS with Ca^{2+} and Mg^{2+} without Phenol Red (Gibco) plus 0.1% BSA. Each dilution was degassed under vacuum for 30 min and was placed (400 μ l) in the lower wells of the chamber and THP-1 cells (5×10^5 in 100 μ l RPMI 1640 + 0.5% BSA) were incubated in each well of the upper chamber. For the inhibition of chemotaxis the chemoattractant was kept at a constant submaximal concentration determined
- 20 previously (1nM MCP-1) and added to the lower well together with the test compounds dissolved in DMSO (final DMSO concentration < 0.05% v/v) at varying concentrations. The chamber was incubated for 2 h at 37°C under 5 % CO_2 . The medium was removed from the upper wells which were then washed out with 200 μ l physiological saline before opening the chamber, wiping dry the membrane surface and centrifuging the 96-well plate at 600 g for 5
- 25 min to harvest the cells. Supernatant (150 μ l) was aspirated and 10 μ l of cell proliferation reagent, WST-1, {4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-phenyl disulfonate} plus an electron coupling reagent (Boehringer Mannheim, Cat.no. 1644 807) was added back to the wells. The plate was incubated at 37°C for 3 h and the absorbance of the soluble formazan product was read on a microtitre plate reader at 450 nm. The data was input
- 30 into a spreadsheet, corrected for any random migration in the absence of chemoattractant and the average absorbance values, standard error of the mean, and significance tests were

calculated. hMCP-1 induced concentration dependent cell migration with a characteristic biphasic response, maximal 0.5-1.0 nm.

In an alternative form of the above assay, fluorescently tagged cells can be used in order to assist in end point detection. In this case, the THP-1 cells used are fluorescently tagged by incubation in the presence of 5mM Calcein AM (Glycine, N,N'-[[3',6'-bis(acetyloxy)-3-oxospiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthene]-2',7'-diyl]bis(methylene)]bis[N-[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]]-bis[(acetyloxy)methyl] ester; Molecular Probes) for 45 minutes in the dark. Cells are harvested by centrifugation and resuspended in HBSS (without Phenol Red) with Ca^{2+} , Mg^{2+} and 0.1% BSA. 50 μl (2×10^5 cells) of the cell suspension are placed on the filter above each well and, as above, the unit is incubated at 37°C for 2 hours under 5% CO_2 . At the end of the incubation, cells are washed off the upper face of the filter with phosphate buffered saline, the filter removed from the plate and the number of cells attracted to either the underside of the filter or the lower well estimated by reading fluorescence at 485nm excitation, 538nm emission wavelengths (f_{max} , Molecular Devices).

The data was input into a spreadsheet, corrected for any random migration in the absence of chemoattractant and the average fluorescence values, standard error of the mean, percentage inhibition and IC_{50} of compounds under test and significance tests can be calculated. In addition to MCP-1 induced chemotaxis, this alternative form of the assay was also used to measure inhibition of RANTES (2nM) induced chemotaxis.

20 d) Binding to human peripheral blood mononuclear cells(PBMCs)

i) Preparation of human PBMCs

Fresh human blood (200ml) was obtained from volunteer donors, collected into sodium citrate anticoagulant to give a final concentration of 0.38%. The blood was mixed with Sedimentation Buffer and incubated at 37°C for 20 minutes. The supernatant was collected and centrifuged at 1700rpm for 5 minutes (Sorvall RT6000D). The pellet obtained was resuspended in 20 ml RPMI/BSA (1mg/ml) and 4 x 5mls of cells were carefully layered over 4 x 5mls of Lymphoprep™ (Nycomed) in 15ml centrifuge tubes. Tubes were spun at 1700rpm for 30 minutes (Sorvall RT6000D) and the resultant layer of cells was removed and transferred to 50ml Falcon tubes. The cells were washed twice in Lysis Buffer to remove any remaining red blood cells followed by 2 washes in RPMI/BSA. Cells were resuspended in

97
26
24

5mls of Binding Buffer. Cell number was measured on a Coulter counter and additional binding buffer was added to give a final concentration of 1.25×10^7 PBMCs /ml.

ii) Assay

[125 I]MCP-1 was prepared using Bolton and Hunter conjugation (Bolton *et al.*, 1973, 5 *Biochem. J.*, 133, 529; Amersham International plc]. Equilibrium binding assays were carried out using the method of Ernst *et al.*, 1994, *J. Immunol.*, 152, 3541. Briefly, 50 μ l of 125 I-labeled MCP-1 (final concentration 100pM) was added to 40 μ l (5×10^5 cells) of cell suspension in a 96 well plate. Compounds, diluted in Whole Cell Binding Buffer from a stock solution of 10mM in DMSO were added in a final volume of 5 μ l to maintain a constant DMSO concentration in 10 the assay of 5%. Total binding was determined in the absence of compound. Non-specific binding was defined by the addition of 5 μ l cold MCP-1 to give a final assay concentration of 100nM. Assay wells were made up to a final volume of 100 μ l with Whole Cell Binding Buffer and the plates sealed. Following incubation at 37°C for 60 minutes the binding reaction mixtures were filtered and washed for 10 seconds using ice cold Wash Buffer using a plate 15 washer (Brandel MLR-96T Cell Harvester). Filter mats (Brandel GF/B) were pre-soaked for 60 minutes in 0.3% polyethylenimine plus 0.2% BSA prior to use. Following filtration individual filters were separated into 3.5ml tubes (Sarstedt No. 55.484) and bound 125 I-labeled MCP-1 was determined (LKB 1277 Gammamaster).

Test compound potency was determined by assay in duplicate using six point 20 dose-response curves and IC_{50} concentrations were determined.

No physiologically unacceptable toxicity was observed at the effective dose for compounds tested of the present invention.

The invention is further illustrated, but not limited by the following Examples in which the following general procedures were used unless stated otherwise.

- 25 i) N,N-Dimethylformamide (DMF) was dried over 4Å molecular sieves. Anhydrous tetrahydrofuran (THF) was obtained from Aldrich SURESEAL™ bottles. Other commercially available reagents and solvents were used without further purification unless otherwise stated. Organic solvent extracts were dried over anhydrous $MgSO_4$.
- ii) 1H , ^{13}C and ^{19}F NMR were recorded on Bruker WM200, WM250, WM300 or WM400 30 instruments using $DMSO-d_6$ with Me_4Si or CCl_3F as internal standard as appropriate, unless otherwise stated. Chemical shifts are quoted in δ (ppm) and peak multiplicities are designated

as follows: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; t, triplet; dt, doublet of triplets; q, quartet; m, multiplet; br, broad.

iii) Mass spectra were recorded on VG 12-12 quadrupole, VG 70-250 SE, VG ZAB 2-SE or a VG modified AEI/Kratos MS9 spectrometers.

5 iv) For TLC analysis, Merck precoated TLC plates (silica gel 60 F254, d = 0.25 mm) were used.

v) Flash chromatography was performed on silica (Merck Kieselgel: Art.9385).

Example 1

10 *N*-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid

Sodium hydroxide (1M, 100 ml) was added to a stirred solution of ethyl *N*-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-acetoxyindole-2-carboxylate (11.82 g) in water (50 ml) and methanol (150 ml). The reaction was stirred at 55°C for 6 hours. The methanol was removed under *vacuo* and the remaining solution was acidified by the addition of aqueous hydrochloric
15 acid (2M, 50 ml) precipitating the product as a white solid. The product was filtered, washed with water and dried in *vacuo* to yield a cream solid (9.53 g,) which was purified by column chromatography using ethylacetate as the eluant. Crystallisation from methanol/water yielded the title compound as a cream solid (7.08 g, 71%) NMR: (CD₃SOCD₃) δ 5.84 (s, 2H), 6.83 (dd, 1H), 6.95 (d, 1H), 7.11-7.19 (m, 2H), 7.36 (d, 1H), 7.55-7.64 (m, 2H), 9.03 (s, 1H); m/z
20 368 (M-H⁺).

The procedure described in the above example was repeated using the appropriate indole ester as the starting materials. Thus were obtained the compounds described below.

Example 2

25 *N*-(3-fluoro-4-trifluoromethylbenzyl)-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid

50% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.87 (s, 2H), 6.85 (m, 2H), 6.99 (dd, 1H), 7.11 (d, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.33 (d, 1H), 7.67 (t, 1H); m/z 352 (M-H⁺).

Example 3

N-(3-chloro-4-trifluoromethylbenzyl)-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid

30 (55% yield). NMR(CD₃SOCD₃) δ: 5.9 (s, 2H), 6.9 (m, 1H), 7.1 (m, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.4 (m, 2H), 7.8 (d, 1H), 9.1 (s, 1H); m/z 368/370 (M-H⁺).

98
2/2/2**Example 4****N-(3-bromo-4-chlorobenzyl)-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid**

71% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.76 (s, 2H), 6.80 (d, 1H), 6.95 (m, 2H), 7.12 (s, 1H), 7.36 (d, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.47 (d, 1H), 9.00 (s, 1H); m/z 380 (MH⁺).

5 Example 5**N-(3-fluoro-4-bromobenzyl)-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid**

53% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.77 (s, 1H), 6.70 (d, 1H), 6.80 (dd, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.00 (d, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.32 (d, 1H), 7.57 (t, 1H), 9.00 (s, 1H), 12.82 (s, 1H); m/z 362 (M-H⁻).

Example 6**10 N-(3-bromo-4-fluorobenzyl)-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid**

55% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.77 (s, 2H), 6.80 (dd, 1H), 6.97 (d, 1H), 6.99 (m, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.23 (t, 1H), 7.38 (m, 2H), 9.00 (s, 1H); m/z 362 (M-H⁻).

Example 7**N-(3-trifluoromethyl-4-fluorobenzyl)-4-fluoro-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid**

15 (58% yield). NMR(CD₃SOCD₃) δ: 5.85 (s, 2H), 7.0 (t, 1H), 7.1 (m, 2H), 7.2-7.3 (m, 3H), 7.4 (t, 1H), 7.95 (dd, 1H), 9.3 (s, 1H) 13.1 (s, 1H); m/z 370 (M-H⁻).

Example 8**N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-4-fluoro-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid**

97% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.80 (s, 2H), 7.00 (t, 1H), 7.16 (dd, 1H), 7.20 (m, 2H), 7.60 (m, 2H), 9.30 (s, 1H); m/z 386 (MH⁺).

Example 9**N-(3-trifluoromethyl-4-fluorobenzyl)-4,6-difluoro-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid**

83% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.80(s, 2H), 7.20(s, 1H), 7.23(m, 1H), 7.30-7.50(m, 2H), 7.58(m, 1H), 9.60(s, 1H); M/z(-) 388.2 (M-H⁻)

25 Example 10**N-(3,4-chlorobenzyl)-4,6-dichloro-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid**

82% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.92 (s, 2H), 6.87 (s, 1H), 6.99 (dd, 1H), 7.37 (d, 1H), 7.5 (d, 1H), 7.55 (s, 1H); m/z 406, 404, 402 (M-H⁻)

Example 11**30 N-(3-trifluoromethyl-4-fluorobenzyl)-3-bromo-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid**

(92% yield). NMR(CD₃SOCD₃) δ: 5.8 (s, 2H), 6.9 (m, 2H), 7.25 (dd, 1H), 7.35-7.55 (m, 2H), 7.6 (dd, 1H), 9.4 (s, 1H); m/z 430/432 (M-H⁺).

Example 12

N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-3-bromo-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid

5 (309mg, 87%). NMR(CD₃SOCD₃) δ:: 5.85 (s, 2H), 6.8-7.0 (m, 3H), 7.4 (d, 1H), 7.75 (d, 1H), 9.4 (s, 1H); m/z 446/448 (M-H⁺).

Example 13

N-(3-chloro-4-trifluoromethylbenzyl)-3-bromo-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid

(82% yield) NMR(CD₃SOCD₃) δ:: 5.8 (s, 2H), 6.9 (m, 2H), 7.1 (dd, 1H), 7.45 (d, 1H), 7.6 (m, 10 2H), 9.4 (s, 1H) ; m/z 447 (M-H⁺).

Example 14

N-(3-fluoro-4-trifluoromethylbenzyl)-3-chloro-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid

NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 6.9(m, 2H), 7.25(m, 1H), 7.4(m, 2H), 7.6(d, 1H), 9.4(s, 1H); m/z 386.0(M-H⁺).

15 **Example 15**

N-(3-fluoro-4-trifluoromethylbenzyl)-3-iodo-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid

NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 6.8(s, 1H), 6.9(d, 1H), 7.2(m, 1H), 7.4(m, 2H), 7.6(d, 1H), 9.3(s, 1H); m/z 478(M-H⁺).

Example 16

20 **N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-3-methoxy-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid**

(108% yield as hydrate) NMR: 3.9 (s, 3H) 5.7 (s, 2H), 6.8 (dd, 1H), 6.9 (d, 1H), 7.2(d, 1H) 7.4 (d, 1H), 7.6 (m, 2H), 9.1 (s, 1H) ; m/z 398 (M-H⁺).

Example 17

N-(3-trifluoromethyl-4-fluorobenzyl)-5-hydroxy-6-chloroindole-2-carboxylic acid

25 (68% yield). NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 7.1-7.2 (m, 3H), 7.4-7.55 (m, 2H), 7.7 (s, 1H), 9.8 (s, 1H); m/z 386 (M-H⁺).

Example 18

N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-hydroxy-6-chloroindole-2-carboxylic acid

71% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.74 (s, 2H), 7.04-7.21 (m, 3H), 7.53-7.63 (m, 2H), 7.7 (s, 30 1H), 9.72 (bs, 1H); m/z 402.1/404.5 (M-H⁺)

99 7/28/00

Example 19**N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-hydroxy-7-fluoroindole-2-carboxylic acid**

55% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.90 (s, 2H), 6.60 (m, 1H), 6.80 (m, 1H), 7.15 (m, 2H), 7.52(m, 1H), 7.60 (d, 1H); M/z(-) 385.85 (M-H⁺)

5

Example 20**N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-hydroxy-6-bromoindole-2-carboxylic acid**

90% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.82 (s, 2H), 7.10(m, 1H), 7.18 (d, 2H), 7.60 (m, 2H), 7.82(s, 1H), 9.80 (s, 1H), 13.0 (s, 1H); m/z 446.18 (M-H⁺)

10 **Example 21****N-(3,4-dichlorobenzyl)-5-hydroxy-6-bromoindole-2-carboxylic acid**

92% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.80 (s, 2H), 6.85 (m, 1H), 7.15 (s, 2H), 7.25 (m, 1H); 7.50 (d, 1H), 7.80 (s, 1H), 9.80 (s, 1H); m/z 412.1 (M-H⁺)

Example 2215 **N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-hydroxy-6-fluoroindole-2-carboxylic acid**

97% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 7.1-7.2 (m, 3H), 7.49 (d, 1H), 7.55-7.63 (m, 2H), 9.49 (s, 1H), 12.86 (bs, 1H); m/z 386, 388 (M-H⁺)

Example 23**N-(3,4-dichlorobenzyl)-5-hydroxy-6-fluoroindole-2-carboxylic acid**

20 97% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.75 (s, 2H), 6.9 (dd, 1H), 7.1-7.2 (m, 2H), 7.3 (d, 1H), 7.45 (d, 1H), 7.5 (d, 1H), 9.5 (bs, 1H); m/z 353 (M-H⁺)

Example 24**N-(3,4-dichlorobenzyl)-5-hydroxy-6-chloroindole-2-carboxylic acid**

25 41% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 6.9 (dd, 1H), 7.2 (s, 2H), 7.3 (d, 1H), 7.5 (d, 1H), 7.65 (s, 1H), 9.75 (s, 1H); m/z 398, 396 (M-H⁺)

Example 25**N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-4-chloro-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid**

93% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.86 (s, 2H), 7.01 (d, 1H), 7.09-7.13 (m, 2H), 7.4 (d, 1H), 7.58-7.68 (m, 2H), 9.66 (bs, 1H); m/z 402, 404 (M-H⁺).

30

Example 26**N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-4,6-dichloro-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid**

76% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.86 (s, 2H), 7.09 (dd, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.59 (d, 1H), 7.64 (d, 1H), 7.81 (s, 1H), 9.64 (bs, 1H); m/z 392, 394 (M-H⁺).

5 Example 27**N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-acetoxyindole-2-carboxylic acid (Prodrug of compound No. 1 of Example 1)**

To a solution of N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-hydroxyindole-2-carboxylic acid (1.01g) in warm ethyl acetate (80ml) was added 4-dimethylaminopyridine (30mg) and acetic anhydride (0.64ml) and the resulting mixture was stirred for 18 hours. The organics were washed with 1N HCl and dried. The organics were concentrated and purified by column chromatography, eluting with ethyl acetate to give the desired product (808 mg, 72%). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2.25 (s, 3H), 5.9 (s, 2H), 7.05 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.43 (d, 1H), 7.60 (m, 2H), 7.65 (d, 1H); m/z 410 (M-H⁺).

15

Preparation of Starting Materials

The starting materials for the Examples above are either commercially available or are readily prepared by standard methods from known materials. For example the following reactions (Methods A-E) are illustrations but not limitations of the preparation of the starting materials used in the above reactions.

20

Method A**Ethyl 5-acetoxy-N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)indole-2-carboxylate****i) Ethyl 5-hydroxyindole-2-carboxylate**

25 Boron tribromide (64.58 g) was added dropwise to a stirred solution of ethyl 5-methoxyindole-2-carboxylate (20 g) in dichloromethane (1000 ml) at -78°C under an atmosphere of argon. The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred for a further 2 hours. The reaction was poured into ice / saturated aqueous sodium hydrogen carbonate solution with stirring and extracted with ethyl acetate. Combined organic extracts
30 were washed with saturated aqueous sodium hydrogen carbonate solution, water, aqueous saturated sodium chloride solution and dried. The solution was concentrated *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography using 0 - 60% diethyl ether: *iso*-hexane as

100
84
74

eluent to yield product as a white solid (9.02 g, 48%). NMR(CD₃SOCD₃): δ 1.31 (t, 3H), 4.29 (q, 2H), 6.79 (dd, 1H), 6.90 (dd, 1H), 7.22 (d, 1H), 8.84 (s, 1H), 11.52 (brs, 1H); m/z 206 (MH⁺).

5 ii) Ethyl 5-acetoxyindole-2-carboxylate

A stirred solution of ethyl 5-hydroxyindole-2-carboxylate (7.79 g) and 4-dimethylaminopyridine (20 mg) in acetic anhydride (80 ml) was heated at 80°C for 4 hours. The reaction was concentrated *in vacuo* and the residue was dissolved in ethyl acetate. Combined organic extracts were washed with hydrochloric acid (2 M), saturated aqueous sodium hydrogen carbonate solution, water, aqueous saturated sodium chloride solution and dried. The solution was concentrated *in vacuo* to yield the product as a yellow solid (9.39 g, 100%). NMR(CD₃SOCD₃): δ 1.20 (t, 3H), 2.10 (s, 3H), 4.19 (q, 2H), 6.86 (dd, 1H), 6.97 (d, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.29 (d, 1H); m/z 248 (MH⁺).

iii) Ethyl 5-acetoxy-N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)indole-2-carboxylate

15 Sodium hydride (1.78 g) was added to a stirred solution of ethyl 5-acetoxyindole-2-carboxylate (10 g) and 3-trifluoromethyl-4-chlorobenzylbromide (11.64 g) in DMF (200 ml) under an atmosphere of argon. The reaction was stirred at ambient temperature for 16 hours, then concentrated *in vacuo* and the residue partitioned between ethyl acetate and water. Combined organic extracts were dried, concentrated under *vacuo* and
20 purified by column chromatography using i-hexane-15%ethylacetate/isohexane as the eluant to yield a cream solid. Crystallisation from ethylacetate/isohexane yielded the product as a cream solid (13.26 g, 74%). NMR (CD₃SOCD₃): δ 1.37 (t, 3H), 2.31 (s, 3H), 4.32 (q, 2H), 5.82 (s, 2H), 7.0-7.09 (m, 2H), 7.22 - 7.29 (m, 1H), 7.31-7.4 (m, 2H) 7.43 (d, 1H), 7.51 (s, 1H).

25

The procedures described in Method A i) - iii) were repeated using the appropriate benzyl halide. Thus were obtained the compounds described below.

30

Ethyl *N*-(3-fluoro-4-trifluoromethylbenzyl)-5-acetoxyindole-2-carboxylate

860mg, 96% NMR (CDCl₃) δ 1.39 (t, 3H), 2.36 (s, 3H), 4.37 (q, 2H), 5.83 (s, 2H), 6.83 (d, 1H), 6.90 (d, 1H), 7.08 dd, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.42 (d, 1H), 7.50 (t, 1H); m/z 424 (MH⁺).

5

Ethyl *N*-(3-chloro-4-trifluoromethylbenzyl)-5-acetoxyindole-2-carboxylate

55% yield. NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H) 2.3 (s, 3H) 4.3 (q, 2H) 5.8 (s, 2H), 6.95 (d, 1H), 7.1 (dd, 2H), 7.2 (m, 2H), 7.4 (s, 1H), 7.45 (d, 1H) 7.55 (d, 1H); m/z 440/422 (M+H⁺).

10 Ethyl *N*-(3-bromo-4-chlorobenzyl)-5-acetoxyindole-2-carboxylate

15% yield. NMR (CDCl₃) δ 1.37 (t, 3H), 2.30 (s, 3H), 4.31 (q, 2H), 5.74 (s, 2H), 6.83 (d, 1H), 7.03 (dd, 1H), 7.24 (m, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.40 (d, 1H). m/z 449 (MH⁺).

Ethyl *N*-(3-fluoro-4-bromobenzyl)-5-acetoxyindole-2-carboxylate

15 77% yield. NMR (CDCl₃) δ 1.37 (t, 3H), 2.30 (s, 3H), 4.37 (q, 2H), 5.77 (s, 2H), 6.72 (d, 1H), 6.74 (d, 1H), 7.03 (dd, 1H), 7.23 (m, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.40 (t, 1H).

Ethyl *N*-(3-bromo-4-fluorobenzyl)-5-acetoxyindole-2-carboxylate

41% yield. NMR (CDCl₃) δ 1.40 (t, 3H), 2.34 (s, 3H), 4.37 (q, 2H), 5.72 (s, 2H), 6.95 (dd, 1H), 7.05 (dd, 1H), 7.23 (m, 2H), 7.37 (s, 1H), 7.40 (d, 1H), 7.62 (d, 1H); m/z 433 (MH⁺).

20

Method BMethyl *N*-(3-trifluoromethyl-4-fluorobenzyl)-4-fluoro-5-hydroxyindole-2-carboxylate(i) 2-Fluoro-3-benzyloxybenzaldehyde

25

2-Fluoro-3-hydroxybenzaldehyde (16.49g) was dissolved in dimethylformamide (200ml) and stirred under an argon atmosphere. Sodium hydride was added (60% in mineral oil, 5.18g) and the mixture was stirred for 30 minutes. Benzyl bromide was added (16.8ml) and the mixture was stirred overnight. Reaction mixture was concentrated *in vacuo* and the resulting residue was partitioned between diethyl ether (200ml) and water (200ml). Combined organic extracts were washed with water (400ml), dried (MgSO₄) and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography, using a gradient of 0-10% ethyl

30

101
J. H. H.

acetate/iso-hexane as eluent to give the desired product as a yellow solid (18.41g, 68%): ¹H NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.20 (s, 2H), 7.2-7.6 (m, 8H), 10.21 (s, 1H) ;

5 (ii) Methyl-2-azido-3-(2-fluoro-3-benzyloxyphenyl)propenoate

A mixture of methylazidoacetate (36.64g) and 2-Fluoro-3-benzyloxy benzaldehyde (18.32g) in methanol (250ml) was added dropwise, with stirring, over 1 hour to a mixture of sodium methoxide (17.20g) in methanol (100ml) at -25°C under a stream of argon. Mixture
10 was left to stir for 20 minutes, allowed to warm to 5°C and stirred overnight.

The resulting precipitate was filtered, then washed sequentially with cold methanol, dilute solution of acetic acid in water and water. The resulting solid was dried under vacuum to give the product as a pale brown solid (16.70g) which was used without purification.

15

(iii) Methyl-4-fluoro-5-benzyloxyindole-2-carboxylate

A solution of methyl-2-azido-3-(2-fluoro-3-benzyloxyphenyl)propenoate (16.7g) in xylene (600ml) was added dropwise with stirring to refluxing xylene (2.4L) over 1 hour and
20 then stirred for a further 20 minutes. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* and purified by flash column chromatography, using a gradient of 0-100% ethyl acetate/iso-hexane as eluent to give the product as a yellow solid (12.93g, 54%). ¹H NMR (CD₃SOCD₃) δ 3.85 (s, 3H), 5.15 (s, 2H), 7.05-7.45 (m, 8H), 12.06 (s, 1H); m/z 300.4 (MH⁺)

In a similar manner, steps (ii) and (iii) were repeated, but using 2-chloro-3-methoxybenzaldehyde and ethyl azidoacetate was prepared:-
25

Ethyl-4-chloro-5-methoxyindole-2-carboxylate

¹H NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.31 (t, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.32 (q, 2H), 7.0 (d, 1H), 7.22 (d, 1H), 7.39 (d, 1H), 12.2 (bs, 1H).

30 (iv) Methyl-N-(3-trifluoromethyl-4-fluorobenzyl)-4-fluoro-5-benzyloxyindole-2-carboxylate

Sodium hydride (60% in mineral oil, 75mg) was added to a solution of methyl-4-fluoro-5-benzyloxyindole-2-carboxylate (257mg) in dimethylformamide (10ml) cooled to 5°C and the mixture was stirred under an argon atmosphere for 30 minutes. 3-Trifluoromethyl-4-fluorobenzyl chloride (280mg) was added and the mixture was allowed to warm to room
35

temperature and then stirred for 4 hours. The reaction mixture was partitioned between ethyl acetate and water. The organic extracts were washed with water, dried (MgSO₄), concentrated in vacuo and purified by flash column chromatography, using iso-hexane followed by 5% ethyl acetate/iso-hexane as eluent, to give the desired product (140mg, 34%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.9 (s, 3H), 5.15 (s, 2H), 5.75 (s, 2H), 6.9-7.2 (m, 4H), 7.3-7.5 (m, 7H); m/z 476 (M+H⁺)

In a similar manner but using the appropriate indole and benzyl halide was prepared:-

Ethyl-N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-4-chloro-5-methoxyindole-2-carboxylate

82% yield. NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.35 (q, 2H), 5.8 (s, 2H), 7.0-7.2 (m, 3H), 7.3-7.5 (m, 3H).

(v) Methyl-N-(3-trifluoromethyl-4-fluorobenzyl)-4-fluoro-5-hydroxyindole-2-carboxylate

A mixture of methyl-N-(3-trifluoromethyl-4-fluorobenzyl)-4-fluoro-5-benzyloxyindole-2-carboxylate (140mg) and 5% Pd/C (50mg) in ethyl acetate (10ml) was stirred under a hydrogen atmosphere for 5 hours, filtered through celite, concentrated in vacuo and purified by flash column chromatography using a gradient of 10-25% ethyl acetate/iso-hexane as eluent to give the desired product (60mg, 53%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.9 (s, 3H), 4.9 (d, 1H), 5.8 (s, 2H), 6.9-7.2 (m, 4H), 7.4 (m, 2H); m/z 384 (M-H⁺)

In a similar manner but using the appropriate benzyl halide was prepared:

Methyl-N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-4-fluoro-5-hydroxyindole-2-carboxylate

89% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 3.80 (s, 3H), 5.92 (s, 2H), 7.05 (t, 1H), 7.11 (dd, 1H), 7.22 (m, 2H), 7.60 (m, 2H), 9.37 (s, 1H); m/z 401 (MH⁺).

In a similar manner but starting from 2,4-difluoro-3-hydroxybenzaldehyde was prepared

Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-fluorobenzyl)-4,6-difluoro-5-hydroxyindole-2-carboxylate

¹H NMR (CD₃SOCD₃) δ 3.80 (s, 3H), 5.80 (s, 2H), 7.20-7.60 (m, 5H), 9.70 (s, 1H); m/z 402.2 (M-H⁺)

Ethyl-N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-4-chloro-5-hydroxyindole-2-carboxylate was prepared from ethyl-N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-4-chloro-5-methoxyindole-2-carboxylate by using the method as described in E(iv). 42% yield. ¹H NMR (CD₃SOCD₃) δ

102
✓
203

1.39 (t, 3H), 4.32 (q, 2H), 5.37 (s, 1H), 5.79 (s, 2H), 6.99-7.11 (m, 3H), 7.31-7.39 (m, 2H), 7.47 (d, 1H); m/z 430, 432 ($M-H^+$)

Method C

5 Ethyl 5-acetoxy-3-bromoindole-2-carboxylate

N-Bromosuccinimide (0.14 g) was added to a stirred solution of ethyl 5-acetoxyindole-2-carboxylate (0.2 g) in DMF (3.0 ml). The reaction was stirred for 4 hours, then poured into water. The resulting precipitate was filtered and dried *in vacuo* to give the title compound as a white powder (0.23 g, 87%). NMR 1.38 (t, 3H), 2.23 (s, 3H), 4.38 (q, 2H), 7.10 (dd, 1H), 10 7.23 (d, 1H), 7.50 (d, 1H), 12.28 (bs, 1H); m/z 326 (M^+).

Method C2

Ethyl 5-acetoxy-3-chloroindole-2-carboxylate

A solution of ethyl 5-acetoxyindole-2-carboxylate (500mg) in dichloromethane (10ml) was stirred at room temperature in the presence of *N*-chlorosuccinimide (297mg) and 15 potassium carbonate (279mg) overnight. The resulting precipitate was collected by filtration, washed with cold dichloromethane followed by water and dried under vacuum overnight to give the desired product as a white powder (425mg, 75%). NMR: 1.35 (t, 3H), 2.25 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 7.1 (d, 1H), 7.3 (s, 1H), 7.5 (d, 1H), 12.2 (s, 1H); m/z 281.9 (MH^+).

Method C 3

20 Ethyl 5-acetoxy-3-iodoindole-2-carboxylate

A solution of ethyl 5-acetoxyindole-2-carboxylate (1g) in dimethylformamide (2ml) was stirred at room temperature in the presence of potassium carbonate (1.12g) and iodine (1.029g) for 18 hours. The reaction was diluted with water (30ml) and the resulting solid was filtered, washed with water and dried to give the desired product 1.32g, 87%). NMR: δ (CD_3SOCD_3) 1.4 (t, 3H), 25 4.4 (q, 2H), 7.1 (d, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.45 (d, 1H), 12.3 (s, 1H); m/z 372 ($M-H^+$)

Ethyl *N*-(3-fluoro-4-trifluoromethylbenzyl)-5-acetoxy-3-iodoindole-2-carboxylate

To a solution of ethyl 5-acetoxy-3-iodoindole-2-carboxylate (400mg) in dimethylformamide (15ml) was added potassium carbonate (340mg), tetrabutyl ammonium iodide (10mg) and 4-fluoro-3-trifluoromethylbenzyl bromide (330mg). The mixture was stirred for 18 30 hours. The mixture was diluted with water (10ml) and extracted with ethyl acetate. The organic extracts were dried, concentrated and purified by column chromatography using 5% ethyl

acetate/iso-hexane as the eluant to give the desired product (520mg, 89%). NMR (CD₃SOCD₃): δ 1.3 (t, 3H), 2.25 (s, 3H), 4.3 (q, 2H), 5.85 (s, 2H), 7.2 (m, 3H), 7.4 (m, 1H), 7.8 (m, 2H); m/z 550 (MH⁺)

- 5 In a similar manner but using the appropriate ethyl 5-acetoxy-3-haloindole-2-carboxylate and benzyl halide were prepared :-

Ethyl N-(3-fluoro-4-trifluoromethylbenzyl)-5-acetoxy-3-chloroindole-2-carboxylate

70% yield. 458.1 (MH⁺)

Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-fluorobenzyl)-5-acetoxy-3-bromoindole-2-carboxylate

- 10 96% yield. NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 2.3 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 7.0-7.2 (m, 3H), 7.3 (m, 1H), 7.4 (m, 2H); m/z 502/504 (MH⁺).

Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-acetoxy-3-bromoindole-2-carboxylate

79% yield. NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 2.35 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 5.8 (s, 2H), 7.05 (d, 1H), 7.1 (dd, 1H), 7.3 (m, 1H), 7.4 (d, 1H), 7.5 (m, 1H), 7.6 (s, 1H); m/z 518/520 (MH⁺)

- 15 Ethyl N-(3-chloro-4-trifluoromethylbenzyl)-5-acetoxy-3-bromoindole-2-carboxylate

63% yield. NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 2.35 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 5.8 (s, 2H), 6.95 (d, 1H), 7.1 (dd, 1H), 7.25 (m, 2H), 7.5 (m, 1H), 7.6 (d, 1H); m/z 518/520 (MH⁺) .

Method D

- 20 Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-3-methoxy-5-hydroxyindole-2-carboxylate

(i) Ethyl 5-acetoxyindole-2-carboxylate

A mixture of ethyl 3-benzyloxyindole-2-carboxylate (10g), cyclohexene (50ml) and 10% palladium on carbon (2g) in ethyl acetate (500ml) was refluxed for 4 hours. The mixture was cooled and filtered through Celite. Acetic anhydride (5ml) and N-dimethylaminopyridine (0.1g) was added and

- 25 the mixture was refluxed for 15 mins. The mixture was cooled and ethanol was added to destroy excess acetic anhydride. The mixture was concentrated and the residue was recrystallised from ethyl acetate/iso-hexane to give the desired product as white needles (6.44g, 77%) NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.33 (t, 3H), 2.23 (s, 3H), 4.32 (q, 2H), 7.0 (dd, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.38 (d, 1H), 7.42 (d, 1H), 11.93 (bs, 1H); m/z (M-H⁺)

103

(ii) Ethyl 5-acetoxy diazoindole-2-carboxylate

To a solution of ethyl 5-acetoxyindole-2-carboxylate (5g) was added sodium nitrite (20g) followed dropwise by glacial acetic acid (20ml). After about half addition, brown fumes were evolved. The mixture was cooled to -10°C and the remainder of the acetic acid was added. The mixture was
5 allowed to stir for 18 hours. A further amount of sodium nitrite (10g) and acetic acid (10ml) was added and the resulting mixture was stirred for 18 hours. The mixture was partitioned between ethyl acetate and water. The organic extracts were separated, dried and concentrated to low volume. Hexane was added and the resulting solid was filtered to give the desired product (5.2g, 94%).
NMR (CDCl₃) δ 0.8 (t, 3H), 4.5 (q, 2H), 7.1 (dd, 1H), 7.4 (d, 1H), 8.0 (d, 1H); m/z 273 (M+H⁺)

(iii) Ethyl 3-methoxy-5-acetoxvindole-2-carboxylate

To a solution of ethyl 5-acetoxy diazoindole-2-carboxylate (4.6g) in 1,2-dichloroethane was added methanol (10ml), followed by a catalytic amount of rhodium (II) acetate dimer and the resulting mixture was refluxed for 18 hours. The mixture was concentrated and the resulting residue was
15 purified by column chromatography using 20% ethyl acetate / isohexane as eluent to give the desired product, which was purified further by titration with diethyl ether (2.34g, 50%). NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 2.3 (s, 3H), 4.05 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 7.05 (dd, 1H), 7.2-7.25 (m, 2H), 7.45 (d, 1H), 8.4 (bs, 1H); m/z 278.4 (M+H⁺).

20 Method E

Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-hydroxy-6-chloroindole-2-carboxylate

(i) Ethyl 2-acetyl-2-(N'-(3-chloro-4-methoxyphenyl)hydrazino) propionate

Ethereal HCl (60 ml) was added to a solution of 3-chloro-p-anisidine in ethyl acetate (300ml) to precipitate the salt, which was isolated by filtration and air dried. The salt (18.5 g) was
25 suspended in 1.5 N HCl (230 ml) at -5°C under argon. A solution of sodium nitrite (6.9 g) in water (50 ml) was added over 15 minutes to form a solution/slurry, which was stirred at -5°C for a further 1 hour. (solution A)

further 1 hour and the pH was then adjusted to 4 by addition of sodium acetate (20 g).(solution B)

Solution B was added to solution A at -5°C and the mixture was allowed to warm to ambient temperature over 3 hours before partitioning between water (250 ml) and ethylacetate (250 ml). The organic phase was dried (MgSO₄), concentrated under vacuo and purified by column chromatography using 15% ethylacetate / isohexane as the eluant to yield the desired product (7 g, 21%); NMR (CDCl₃) δ 1.24 (t, 3H), 1.63 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 4.22-4.35 (m, 2H), 7.02 (d, 1H), 7.72 (dd, 1H), 7.83 (d, 1H) m/z 270(M-CH₃COH)⁺

10 In a similar manner but starting from 3-fluoro-4-methoxyaniline was prepared:

Ethyl 2-acetyl-2-(N'-(3-fluoro-4-methoxyphenyl)hydrazino) propionate

NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.25 (t, 3H), 1.55 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 4.0 (s, 3H), 4.2 (q, 2H), 7.4 (t, 1H), 7.5 (dd, 1H), 7.6 (d, 1H); m/z 255(MH⁺)

In a similar manner but starting from 3,5-dichloro-4-methoxyaniline was prepared:

15 Ethyl 2-(N'-(3,5-dichloro-4-methoxyphenyl)hydrazino) propionate

NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 2.05 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 4.3 (q, 2H), 7.13 (s, 2H), 7.52 9bs, 1H); m/z 307 MH⁺)

(ii) Ethyl 5-methoxy-6-chloroindole-2-carboxylate

A solution of ethyl 2-acetyl-2-{N'-(3-chloro-4-methoxyphenyl)hydrazino} propionate (1 g) and p-toluenesulphonic acid (1 g) in toluene (30 ml) was stirred at 100°C for 18 hours. The mixture was then concentrated and purified by column chromatography using 15% ethylacetate / isohexane as the eluant to yield the desired product (70 mg, 8%); NMR (CDCl₃) δ 1.42 (t, 3H), 3.95, (s, 3H), 4.42 (q, 2H), 7.11 (s, 2H), 7.46 (s, 1H), 8.86 (bs, 1H)

In a similar manner but starting from ethyl 2-acetyl-2-(N'-(3-fluoro-4-methoxyphenyl) hydrazino) propionate was prepared :

Ethyl 5-methoxy-6-fluoroindole-2-carboxylate NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.3 (t, 3H), 3.8 (s, 3H), 4.3 (q, 2H), 7.1 (s, 1H), 7.2 (d, 1H), 7.3 (d, 1H); m/z 237 (MH⁺)

In a similar manner by starting from ethyl 2-(N'-(3,5-dichloro-4-methoxyphenyl) hydrazino) propionate was prepared :

30 Ethyl 5-methoxy-4,6-dichloroindole-2-carboxylate NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.38 (t, 3H), 2.08 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.31 (q, 2H), 7.23 (s, 2H), 7.5 (bs, 1H); m/z 307 (MH⁺)

104
2/16
2015

(iii) Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-methoxy-6-chloroindole-2-carboxylate

Ethyl 5-methoxy-6-chloroindole-2-carboxylate was alkylated with 3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl bromide using the methodology described in Method A(iii) to give the desired product (650 mg, 64%); NMR (CDCl₃) δ 1.36 (t, 3H), 3.93 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 7.01 (dd, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.35 (d, 1H), 7.43 (d, 1H)

In a similar manner using the appropriate indole and benzyl halide were prepared:

Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-fluorobenzyl)-5-methoxy-6-chloroindole-2-carboxylate

10 NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.25 (t, 3H), 3.9 (s, 3H), 4.3 (q, 2H), 5.85 (s, 2H), 7.1-7.4 (m, 4H), 7.55 (d, 1H), 7.9 (s, 1H).

Ethyl N-(3,4-dichlorobenzyl)-5-methoxy-6-fluoroindole-2-carboxylate

NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.25 (t, 3H), 3.8 (s, 3H), 4.2 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 6.9 (d, 1H), 7.3-7.4 (m, 3H), 7.5 (d, 1H), 7.6 (d, 1H)

15 Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-methoxy-6-fluoroindole-2-carboxylate

NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.36 (t, 3H), 3.92 (s, 3H), 4.31 (q, 2H), 5.72 (s, 2H), 6.95-7.05 (m, 2H), 7.15 (d, 1H), 7.3 (s, 1H), 7.36 (d, 1H), 7.43 (s, 1H).

Ethyl N-(3,4-dichlorobenzyl)-5-methoxy-4,6-dichloroindole-2-carboxylate

20 NMR (CDCl₃) δ 1.39 (t, 3H), 3.91 (s, 3H), 4.33 (q, 2H), 5.7 (s, 2H), 6.82 (dd, 1H), 7.11 (d, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.34 (d, 1H), 7.42 (s, 1H)

Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-dichlorobenzyl)-5-methoxy-4,6-dichloroindole-2-carboxylate

NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.35 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 7.09 (d, 1H), 7.25-7.5 (m, 4H).

Ethyl N-(3,4-dichlorobenzyl)-5-methoxy-6-chloroindole-2-carboxylate

25 NMR (CDCl₃) δ 1.36 (t, 3H), 3.94 (s, 3H), 4.31 (q, 2H), 5.69 (s, 2H), 6.82 (dd, 1H), 7.09 (d, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.24-7.35 (m, 3H); m/z 414 (MH⁺).

(iv) Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-hydroxy-6-chloroindole-2-carboxylate

30 A mixture of ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-methoxy-6-chloroindole-2-carboxylate (650 mgs) and trimethylsilyliodide (0.8 ml) in chloroform (50 ml) was stirred at 50°C for 18 hours. Further aliquots of trimethylsilyliodide were added until no starting

material remained and the reaction was then poured into methanol (100 ml). The mixture was concentrated under vacuo and purified by column chromatography using 15% ethyl acetate / isohexane as the eluant to yield the desired product as a white solid (276 mg, 44%); NMR (CDCl₃) δ 1.36 (t, 3H), 4.31 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 7.0 (dd, 1H), 7.24-7.51 (m, 3H), 7.38 (d, 1H), 7.44 (d, 1H)

In a similar manner, but using ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-fluorobenzyl)-5-methoxy-6-chloroindole-2-carboxylate or ethyl N-(3,4-dichlorobenzyl)-5-methoxy-6-fluoroindole-2-carboxylate or ethyl N-(3,4-dichlorobenzyl)-5-methoxy-4,6-dichloroindole-2-carboxylate or ethyl N-(3,4-dichlorobenzyl)-5-methoxy-6-chloroindole-2-carboxylate or ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-methoxy-6-fluoroindole-2-carboxylate or ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-dichlorobenzyl)-5-methoxy-4,6-dichloroindole-2-carboxylate were prepared:

Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-fluorobenzyl)-5-hydroxy-6-chloroindole-2-carboxylate

53% yield. NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.25 (t, 3H), 4.25 (q, 2H), 5.85 (s, 2H), 7.1-7.25 (m, 3H), 7.4 (t, 1H), 7.5 (d, 1H), 7.8 (s, 1H), 9.8 (s, 1H); m/z 414 (M-H⁺)

Ethyl N-(3,4-dichlorobenzyl)-5-hydroxy-6-fluoroindole-2-carboxylate

31% yield. NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 4.3 (q, 2H), 5.7 (s, 2H), 6.8 (dd, 1H), 7.0 (d, 1H), 7.1-7.3 (m, 2H); m/z 380 (M-H⁺)

Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-hydroxy-6-fluoroindole-2-carboxylate

26% yield. NMR (CDCl₃) δ 1.35 (t, 3H), 4.31 (q, 2H), 4.98 (bd, 1H), 5.72 (s, 2H), 6.96 (d, 1H), 7.01 (dd, 1H), 7.23-7.3 (m, 2H), 7.37 (d, 1H), 7.44 (s, 1H); m/z 414, 416 (M-H⁺).

Ethyl N-(3,4-dichlorobenzyl)-5-hydroxy-4,6-dichloroindole-2-carboxylate

69% yield. NMR (CDCl₃) δ 1.39 (t, 3H), 4.34 (q, 2H), 5.65 (bs, 1H), 7.7 (s, 2H), 6.82 (dd, 1H), 7.1 (d, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.33 (d, 1H), 7.35 (s, 1H); m/z 436, 434, 432, 430 (M-H⁺)

Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-hydroxy-4,6-dichloroindole-2-carboxylate

80% yield. NMR (CDCl₃) δ 1.39 (t, 3H), 4.36 (q, 2H), 5.66 (s, 1H), 5.75 (s, 2H), 7.0 (dd, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.35-7.41 (m, 2H), 7.43 (d, 1H); 466, 468 (M-H⁺)

Ethyl N-(3,4-dichlorobenzyl)-5-hydroxy-6-chloroindole-2-carboxylate

37% yield. m/z 398 (M-H⁺)

105
278
264
106**Method E2****Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-acetoxy-6-bromoindole-2-carboxylate****(i) Ethyl-5-methoxy-6-bromoindole-2-carboxylate**

The procedure described in method E(i)-(ii) was repeated using 3-bromo-4-methoxy aniline to give the desired product (24% yield): ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1.30 (t, 3H), 3.80 (s, 3H), 4.30 (q, 2H), 7.05 (m, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 11.79 (s, 1H); m/z 296.3 (M-H⁺).

(ii) Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-acetoxy-6-bromoindole-2-carboxylate

The procedure described in method A(i)-(iii) was repeated using the appropriate benzyl halide to give the desired product : ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1.22 (t, 3H), 2.32 (s, 3H), 4.25 (q, 2H), 5.90 (s, 2H), 7.10 (m, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.60 (d, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.68 (m, 1H), 8.10(s, 1H)

In a similar manner but using 3,4-dichlorobenzyl chloride was prepared :

Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-acetoxy-6-bromoindole-2-carboxylate

m/z 486.2 (M-H⁺)

Method E3**15 Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-hydroxy-7-fluoroindole-2-carboxylate****(i) Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-benzyloxy-7 fluoroindole-2-carboxylate**

The procedure described in Method E(i)-(iii) was repeated using 2-fluoro-4-benzyloxy aniline as starting material to give the desired product (71% yield): ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1.22(t, 3H), 4.25(q, 2H), 5.10(s, 2H), 5.90(s, 2H), 6.95(m, 1H), 7.15(m, 2H), 7.30-7.50(m, 6H), 7.60(m, 2H)

(ii) Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-hydroxy-7 fluoroindole-2-carboxylate

To a solution of Ethyl N-(3-trifluoromethyl-4-chlorobenzyl)-5-benzyloxy-7 fluoroindole-2-carboxylate (50mg) in ethyl acetate (5ml) was added a catalytic amount of 5% palladium on carbon and the resulting was stirred under a hydrogen atmosphere for 72 hours. The mixture was filtered and concentrated in vacuo to give the desired product (59mg): m/z 414.25 (M-H⁺)

Example 27**Pharmaceutical Compositions**

This Example illustrates, but is not intended to limit, representative pharmaceutical dosage forms of the invention as defined herein (the active ingredient being termed "Compound X"), for therapeutic or prophylactic use in humans:

(a)

Tablet I	mg/tablet
Compound X.	100
Lactose Ph.Eur	182.75
Croscarmellose sodium	12.0
Maize starch paste (5% w/v paste)	2.25
Magnesium stearate	3.0

5 (b)

Tablet II	mg/tablet
Compound X	50
Lactose Ph.Eur	223.75
Croscarmellose sodium	6.0
Maize starch	15.0
Polyvinylpyrrolidone (5% w/v paste)	2.25
Magnesium stearate	3.0

(c)

Tablet III	mg/tablet
Compound X	1.0
Lactose Ph.Eur	93.25
Croscarmellose sodium	4.0
Maize starch paste (5% w/v paste)	0.75
Magnesium stearate	1.0

106
27/11/17
10/11/17

(d)

Capsule	mg/capsule
Compound X	10
Lactose Ph.Eur	488.5
Magnesium	1.5

(e)

Injection I	(50 mg/ml)
Compound X	5.0% w/v
1M Sodium hydroxide solution	15.0% v/v
0.1M Hydrochloric acid	to adjust pH to 7.6
Polyethylene glycol 400	4.5% w/v
Water for injection	to 100%

5 (f)

Injection II	(10 mg/ml)
Compound X	1.0% w/v
Sodium phosphate BP	3.6% w/v
0.1M Sodium hydroxide solution	15.0% v/v
Water for injection	to 100%

(g)

Injection III	(1mg/ml buffered to pH6)
Compound X	0.1% w/v
Sodium phosphate BP	2.26% w/v
Citric acid	0.38% w/v
Polyethylene glycol 400	3.5% w/v
Water for injection	to 100%

(h)

Aerosol I	mg/ml
Compound X	10.0
Sorbitan trioleate	13.5
Trichlorofluoromethane	910.0
Dichlorodifluoromethane	490.0

(i)

Aerosol II	mg/ml
Compound X	0.2
Sorbitan trioleate	0.27
Trichlorofluoromethane	70.0
Dichlorodifluoromethane	280.0
Dichlorotetrafluoroethane	1094.0

5 (j)

Aerosol III	mg/ml
Compound X	2.5
Sorbitan trioleate	3.38
Trichlorofluoromethane	67.5
Dichlorodifluoromethane	1086.0
Dichlorotetrafluoroethane	191.6

(k)

Aerosol IV	mg/ml
Compound X	2.5
Soya lecithin	2.7
Trichlorofluoromethane	67.5
Dichlorodifluoromethane	1086.0
Dichlorotetrafluoroethane	191.6

107
108
109

(l)

Ointment	ml
Compound X	40 mg
Ethanol	300 µl
Water	300 µl
1-Dodecylazacycloheptan-2-one	50 µl
Propylene glycol	to 1 ml

Note:

Compound X in the above formulations may comprise a compound as illustrated in
5 Examples herein.

The above formulations may be obtained by conventional procedures well known in
the pharmaceutical art. The tablets (a)-(c) may be enteric coated by conventional means, for
example to provide a coating of cellulose acetate phthalate. The aerosol formulations (h)-(k)
may be used in conjunction with standard, metered dose aerosol dispensers, and the
10 suspending agents sorbitan trioleate and soya lecithin may be replaced by an alternative
suspending agent such as sorbitan monooleate, sorbitan sesquioleate, polysorbate 80,
polyglycerol oleate or oleic acid.

108
28
27
7/10

**TRADUCCIÓN DEL INGLÉS AL CASTELLANO de la Solicitud de
Patente Británica No.0000626.2 relacionada con:**

COMPUESTOS QUÍMICOS

ANEXOS: La solicitud de Patente Británica No. 0000626.2 arriba mencionada, Certificación de la Oficina de Patentes de Londres, Inglaterra.

**LA
OFICINA DE
PATENTES**

**LA OFICINA DE PATENTES
Concept House
Cardiff Road
Newport
South Wales
NP10 SQQ**

Yo, el suscrito, como funcionario debidamente autorizado de acuerdo con la Sección 74(1) y (4) de la Ley de Regulación y Contratación de 1994, para firmar y expedir certificaciones a nombre del Contralor General, por medio de la presente certifico que se encuentra anexa una fiel copia de los documentos tal como fueron originalmente presentados, en conexión con la solicitud de patente identificada en ella.

De acuerdo con las Normas de Patentes de 1982 (Re-registro de Compañías), si una compañía nombrada en esta certificación y cualesquiera documentos que la acompañan ha sido re-registrada bajo la Ley de Compañías de 1980 con el mismo nombre a aquel con el que fue registrada inmediatamente antes del re-registro, salvo por la sustitución, o la inclusión en la última parte del nombre de las palabras "compañía pública limitada" o sus equivalentes en Galés, las referencias al nombre de la compañía en esta certificación y cualesquiera documentos que la acompañan serán tratadas como referencias al nombre con el cual ésta así se re-registra.

De acuerdo con las normas, las palabras "compañía pública limitada" pueden reemplazarse por p.l.c., P:L:C: o PLC.

21092/0

El re-registro bajo la Ley de Compañías no constituye una nueva entidad legal sino que meramente somete la compañía a algunas normas adicionales de la Ley de Compañías.

Firmado (ILEGIBLE)

Fecha 24 NOV 2000

SELLO EN RELIEVE ADHERIDO CON CINTA

Agencia Ejecutiva del Departamento de Comercio e Industria

GB0000626.2

En virtud de una directriz dada bajo la Sección del Acta de Patentes 1977, la solicitud procede a nombre de
ASTRAZENECA AB.

S-151 85 Sodertalje

Suecia

(ADP No. 07822448003)

Forma 1/77

**La
Oficina de
Patentes**

Solicitud para la concesión de una patente

Ver notas en la parte posterior de esta forma

SELLO DE RADICACIÓN DE LA OFICINA DE PATENTES (Ilegible)

1. Su Referencia PHM 00-002

2. Número de Solicitud de Patente 0000626.2
(La Oficina de Patentes llenará en esta parte)

3. Nombre completo, dirección y código postal de los o de cada solicitante (subrayar todos los apellidos)
AstraZeneca UK Limited
15 Stanhope Gate
London, WTY 6LN

Número ADP de Patentes 6254007002
(si lo conoce)

Si el solicitante es un nombre corporativo, proporcione el país/estado de incorporación Reino Unido

110
24/11
24/11
24/11

4. Título de la Invención: **COMPUESTOS QUÍMICOS**

5. Nombre del agente *(si tiene uno)* **Bill Kevin**

**"Dirección para servicio" en el
Reino Unido a la cual se debe
enviar la correspondencia
(incluyendo el código postal)**

**Global Intellectual Property
AstraZeneca PLC
Mereside, Alderley Park,
Macclesfield, Cheshire
SK10 4TG, GB.**

Número ADP de Patentes *(si tiene uno)* **446984700**

**6. Si está usted reivindicando
prioridad de una o más solicitudes
previas de patente, proporcione
el país y la fecha de presentación
de las o de cada una de estas
solicitudes previas el o los números
de solicitud**

País	Número de la solicitud de prioridad <i>(si lo conoce)</i>	Fecha de presentación <i>(día/mes/año)</i>
-------------	--	---

**7. Si esta solicitud se divide o se
deriva de alguna otra forma de
una solicitud previa del Reino
Unido proporcione el número y
la fecha de presentación de la
solicitud previa**

Número de solicitud previa	Fecha de presentación <i>(día/mes/año)</i>
-----------------------------------	---

**8. Se requiere de una declaración de
inventoría o de derecho a la concesión
de patente como soporte de esta solicitud?**

(conteste "SI" si:

***a) si cualquiera de los solicitantes nombrados
en la parte 3 no es inventor, o***

b) hay un inventor que no ha sido nombrado

27/11/00

como solicitante, o
c) cualquier solicitante mencionado es un
cuerpo corporativo.
Ver nota (d))

9. Coloque el número de hojas para cada uno de los tipos siguientes de documentos contenidos en esta forma. No cuente las copias del mismo documento.

Hojas de continuación para esta forma	-
Descripción	43
Reivindicación(es)	0
Extracto	0
Dibujo(s)	

10. Si usted también está presentando algunos de los siguientes documentos establezca cuantos de cada uno

Documentos de prioridad	-
Traducciones de los documentos de prioridad	-
Declaración de inventoria y Derecho de concesión	-
(Forma 7/77 de Patentes)	
Solicitud de examen y búsqueda preliminar	-
(Forma 9/77 de Patentes)	
Solicitud de examen sustantivo	-
(Forma 10/77 de Patentes)	
Cualquier otro documento	-
Por favor especifique	

11. Yo/Nosotros Solicito/Solicitamos la concesión de una Patente sobre la base de esta solicitud

Firma Lynda M. Slack (firmado) Fecha 12 Junio 2000
Firma Autorizada por AstraZeneca UK Limited

12. Nombre y número de teléfono
durante el día de una persona para
contactar en el Reino Unido Linda M. Slack Tel. 01625 516173

Advertencia

Después de que se ha presentado una solicitud de Patente, el Contralor de la Oficina de Patentes considerará si deberá prohibirse o restringirse la publicación o comunicación bajo la Sección 22 del Acta de Patentes de 1977 e informará al solicitante si es necesaria dicha prohibición. Se advierte además a los solicitantes residentes en el Reino Unido que de acuerdo con la Sección 23 no se pueden presentar solicitudes en el

1237
112

extranjero sin previa autorización escrita a menos que una solicitud haya sido presentada no menos de 6 semanas previas en el Reino Unido, para una Patente para la misma invención y no se haya proferido directriz prohibiendo la publicación o comunicación, o cualquier directriz en tal sentido haya sido revocado.

Notas

- a) Si necesita ayuda para llenar esta forma o tiene algunas preguntas, por favor contacte a la Oficina de Patentes al 06545 500505
- b) Escriba sus respuestas en mayúsculas utilizando tinta negra o puede mecanografiarlas.
- c) Si no tiene suficiente espacio para todos los detalles relevantes en cualesquier parte de esta forma, por favor continúe sobre una hoja separada de papel y escriba "ver hoja de continuación" en la(s) parte(s) relevante(s). Cualquier hoja de continuación debe anexarse a esta forma.
- d) Si usted ha contestado "SI" debe llenar la Forma de Patentes 7/77
- e) Una vez haya llenado la forma debe recordar firmarla y fecharla.
- f) Para detalles de los impuestos y formas de pago por favor contacte a la Oficina de Patentes.

COMPUESTOS QUÍMICOS

La presente invención se relaciona con compuestos anti inflamatorios que actúan vía antagonismo del receptor CCR2, (también conocido como el receptor MCP-1), llevando entre otros a la inhibición de Monocyte Quimioatrayente Protein-1 (MCP-1). Estos compuestos contienen una fracción indole. La invención se relaciona adicionalmente con composiciones farmacéuticas que los contienen, procesos para su preparación, intermediarios útiles en su preparación y su utilización como agentes terapéuticos.

El MCP-1 es un miembro de la familia de quimioquinas de proteínas pro-inflamatorias que median la quimiotaxis y activación de leucocitos. El MCP-1 es una quimioquina C-C la cual es una de las más potentes y selectivas células T y quimioatrayentes monocitos y agentes de activación conocidos. El MCP-1 ha sido implicado en la patofisiología de un gran número de enfermedades inflamatorias incluyendo artritis reumatoide, nefritis glomerular, fibrosis de pulmón, restenosis (Solicitud de Patente Internacional WO 94/09128), alveolitis (Jones y otros, 1992, J Immunol, 149, 2147) y asma. Otras áreas de enfermedad donde se considera que el MCP-1 juega una parte en su patología son aterosclerosis (por ejemplo Koch y otros, 1992, J Clin. Invest., 90, 772 -779), psoriasis

113

(Deleuran y otros, 1996, J Dermatological Science, 13,. 228-236), reacciones de hipersensibilidad del tipo retrasado de la piel, enfermedad de baso inflamatorio (Grimm y otros, 1996, J Leukocyte Biol, 59,. 804-812), esclerosis múltiple y trauma cerebral (Berman y otros, 1996, J Immunol, 156,. 3017-3023). Un inhibidor MCP-1 puede también ser útil para tratar ataques cardiacos, heridas de reperfusión, isquemia, infarto del miocardio y rechazo de trasplantes.

El MCP-1 actúa a través del receptor CCR2. Los MCP-2 y MCP-3 pueden también actuar, por lo menos en parte, a través de este receptor. Consecuentemente en esta especificación, cuando se hace referencia a "inhibición o antagonismo de MCP-1" o "efectos mediados de MCP-1" esto incluye inhibición o antagonismo de MCP-2 y/o efectos mediados de MCP-3 cuando MCP-2 y/o MCP-3 actúan a través del receptor CCR2.

Los solicitantes han encontrado una clase de compuestos que contienen una fracción indolo que tiene útil actividad inhibitoria contra MCP-1. La Solicitud de Patente Internacional, Publicación No. WO 99/07351 divulga una clase de indoles con actividad inhibitoria de MCP-1. Esta solicitud se basa en el descubrimiento sorprendente de que particulares indoles sustituidos 5-hidroxi son inhibidores MCP-1 que poseen inesperadas y benéficas propiedades con respecto a la potencia y/o niveles de sangre y/o biodisponibilidad y/o solubilidad.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un compuesto de la fórmula (I):

(ver fórmula en la página 2 del original traducido)

donde:

R¹ es hidrógeno, halo o metoxi;

R² es hidrógeno, halo, metil, etil o metoxi;

R³ es un grupo halo o un grupo trifluorometil;

R⁴ es un grupo halo o un grupo trifluorometil;

R⁵ es hidrógeno o halo;

R⁶ es hidrógeno o halo;

teniendo en cuenta que cuando R⁵ y R⁶ son ambos hidrógeno, y uno de R³

o R⁴ es cloro o flúor, entonces el otro no es cloro o flúor;

o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él

En esta especificación el término "alquil" incluye grupos alquil tanto de cadena recta como ramificada pero las referencias un grupos alquil individuales tales como "propil" son específicas únicamente a la versión de cadena recta. El término "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo e iodo.

114
[Handwritten signature]

Adecuados ejemplos de R^1 son hidrógeno, flúor, cloro, bromo, yodo o metoxi. Preferiblemente R^1 es hidrógeno, flúor o cloro, y más preferiblemente R^1 es hidrógeno.

Particulares ejemplos de R^2 son hidrógeno, flúor, cloro, bromo, iodo, metil, etil o metoxi. Adecuadamente R^2 es hidrógeno, cloro, bromo, iodo o metoxi, y preferiblemente R^2 es hidrógeno.

En una modalidad, R^5 y R^6 son ambos hidrógeno. En este caso, cuando R^4 es trifluorometil, R^3 es adecuadamente un grupo cloro, flúor, bromo o iodo, preferiblemente un grupo cloro, flúor o bromo, y más preferiblemente cloro o flúor.

Alternativamente, donde R^5 y R^6 son ambos hidrógeno, R^3 es trifluorometil, y R^4 es halo tal como flúor, cloro, bromo o iodo, y preferiblemente cloro o flúor y más preferiblemente cloro.

Similares combinaciones de R^3 y R^4 pueden aplicarse donde por lo menos uno de R^5 y R^6 es diferente a hidrógeno, pero en este caso, R^3 y R^4 son adecuadamente ambos halo tal como flúor, cloro, bromo e iodo, preferiblemente flúor, cloro o bromo, y más preferiblemente aún flúor cloro. Particulares ejemplos son casos donde R^3 y R^4 son ambos cloro, R^3 y R^4 son ambos flúor. Una alternativa adicional es una donde uno de R^3 o R^4 es cloro y el otro es flúor.

Adecuadamente R^5 es hidrógeno, flúor, cloro o bromo, y preferiblemente R^5 es hidrógeno. Un valor adicionalmente preferido para R^5 es por ejemplo, flúor.

Adecuadamente R^6 es hidrógeno, flúor, cloro o bromo. Preferiblemente R^6 es hidrógeno o flúor, y más preferiblemente aún hidrógeno.

En un aspecto preferido de la invención se proporciona un compuesto de la fórmula (IA):

(ver fórmula en la página 3 del original traducido)

o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de ella, donde R^1 , R^2 y R^4 son tal como se definió arriba. Preferiblemente R^1 y R^2 son hidrógeno. Preferiblemente R^4 es cloro o flúor.

En un adicional aspecto preferido de la invención se proporciona un compuesto de la fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable prodroga de ella donde R^1 , R^2 y R^4 son tal como se definió arriba, R^3 es trifluorometil, R^5 es halo y R^6 es hidrógeno. Preferiblemente R^1 y R^2 son

115

hidrógeno. Preferiblemente R⁴ es cloro o flúor, especialmente cloro. Preferiblemente R⁵ es flúor.

Compuestos preferidos de la invención incluyen cualquiera de uno de los compuestos preparados en los Ejemplos, los cuales se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

Ejemplo	R1	R2	R3	R4	R5	R6
1	H	H	CF ₃	Cl	H	H
2	H	H	F	CF ₃	H	H
3	H	H	Cl	CF ₃	H	H
4	H	H	Br	Cl	H	H
5	H	H	F	Br	H	H
6	H	H	Br	F	H	H
7	F	H	CF ₃	F	H	H
8	F	H	CF ₃	Cl	H	H
9	F	H	CF ₃	F	F	H
10	Cl	H	Cl	Cl	Cl	H
11	H	Br	CF ₃	F	H	H
12	H	Br	CF ₃	Cl	H	H
13	H	Br	Cl	CF ₃	H	H
14	H	Cl	F	CF ₃	H	H
15	H	I	F	CF ₃	H	H
16	H	CH ₃ O	CF ₃	Cl	H	H
17	H	H	CF ₃	F	Cl	H
18	H	H	CF ₃	Cl	Cl	H
19	H	H	CF ₃	Cl	H	H
20	H	H	CF ₃	Cl	Br	H
21	H	H	Cl	Cl	Br	H
22	H	H	CF ₃	Cl	F	H
23	H	H	Cl	Cl	F	H
24	H	H	Cl	Cl	Cl	H
25	Cl	H	CF ₃	Cl	H	H
26	Cl	H	CF ₃	Cl	Cl	H

La invención se relaciona adicionalmente con todas las formas tautoméricas de los compuestos de la fórmula (I).

También debe entenderse que algunos compuestos de la fórmula (I) pueden existir en formas solvatadas así como formas no solvatadas tales

116 d
~~116 d~~



- a) **Diseño de Prodrogas**, editado por H. Bundgaard, (Elsevier, 1985) y **Métodos en Enzimología**, Vol. 42 p. 309-396, editado por K. Widder, y otros (Academic Press, 1985);
- b) **Texto de Diseño y Desarrollo de Drogas**, editado por Krogsgaard-Larsen y H. Bundgaard, Capítulo 5 "Diseño y Aplicación de Prodrogas", by H. Bundgaard, p. 113-191 (1991);
- c) H. Bundgaard, **Revistas de Suministro de Drogas Avanzadas**, 8, 1-38 (1992);
- d) H. Bundgaard, y otros, **Diario de Ciencias Farmacéuticas**, 77, 285 (1988); y
- e) N. Kakeya, y otros, **Boletín de Química Farmacéutica**, 32, 692 (1984).

117
11/8
11/8
11/8

Ejemplos de dichas prodrogas son ésteres penetrables en vivo de un compuesto de la invención. Un éster penetrable en vivo de un compuesto de la invención que contiene un grupo carboxi es, por ejemplo, un éster farmacéuticamente aceptable el cual es penetrado en el cuerpo humano o animal para producir un ácido padre. Adecuados ésteres aceptables farmacéuticamente para carboxi incluyen ésteres C₁₋₆alquil, por ejemplo metil o etil; ésteres C₁₋₆alcoximetil, por ejemplo ésteres metoximetil; C₁₋₆ alcanoiloximetil, por ejemplo pivaloiloiloximetil; ésteres ftalidil; ésteres C₃₋₈cicloalcoxycarboniloxiC₁₋₆alquil, por ejemplo 1-ciclohexilcarboniloxietil; ésteres 1,3-dioxolan-2-ilmetil, por ejemplo 5-metil-1,3-dioxolan-2-ylmetil; ésteres C₁₋₆alcoxycarboniloxietil, por ejemplo 1-metoxycarboniloxietil; ésteres aminocarbonilmetil y mono- o di-N-(C₁₋₆ alquil) sus versiones, por ejemplo ésteres N,N-dimetilaminocarbonilmetil y ésteres N-etilamino-carbonilmetil; y puede formarse en cualquier grupo carboxi en los compuestos de esta invención. Un éster penetrable en vivo de un compuesto de la invención que contiene un grupo hidroxil es, por ejemplo, un éster farmacéuticamente aceptable el cual es penetrado en el cuerpo humano o animal para producir el grupo padre hidroxil. Adecuados ésteres farmacéuticamente aceptables para hidroxil incluyen ésteres C₁₋₆ alcanoil, por ejemplo ésteres acetil; y ésteres benzoil donde el grupo fenil puede sustituirse con aminometil o N- sustituido mono- o di- C₁₋₆alquil aminometil, por ejemplo ésteres 4-aminometilbenzoil y ésteres 4-N,N-dimetilaminometilbenzoil.

Adicionales ejemplos de dichas prodrogas son amidas penetrables en vivo de un compuesto de la invención. Ejemplos de dichas amidas penetrables en vivo incluyen una N-C₁₋₆alquilamida y una N,N-di-(C₁₋₆ alquil)amida tal como N-metil, N-etil, N-propil, N,N-dimetil, N-etil-N-metil o N,N-dietilamida.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él cuyo proceso comprende:

a) reaccionar compuestos de la fórmula (II):
(ver fórmula de la página 7 del original traducido)
donde R³, R², R⁵ y R⁶ son tal como se definió en relación con la fórmula (I), R^a es carboxi o una forma protegida de él, y R^b es hidrógeno o un adecuado grupo de protección hidroxil, con un compuesto de fórmula (III):
(ver fórmula de la página 7 del original traducido)
donde R³ y R⁴ son tal como se definió en relación con la fórmula (I) y L es un grupo desplazable; y posteriormente si es necesario:

i) convertir un compuesto de la fórmula (I) en otro compuesto de la fórmula (I);

118
X 50
X 81

- Adecuados valores para L son por ejemplo, un grupo halógeno o sulfonilo, por ejemplo un grupo cloro, bromo, metanosulfonilo o tolueno-4-sulfonilo.

Los compuestos de la fórmula (II) y (III) se reaccionan adecuadamente conjuntamente en un solvente orgánico inerte tal como N,N-dimetilformamida, diclorometano o acetonitrilo en presencia de una base tal como hidróxido de sodio, hídrido de sodio, o carbonato de potasio. Adecuadamente la reacción se efectúa en presencia de un catalizador de transferencia de fase tal como tetra-n-butilamonio sulfato de hidrógeno. Los tiempos de reacción pueden variar dentro del rango de 1 a 6 horas preferiblemente durante 1 a 3 horas.

Moderadas temperaturas por ejemplo de 15 a 30°C, preferiblemente 20 a 25°C se emplean.

Los compuestos de la fórmula (II) pueden ser comercialmente disponibles, o pueden elaborarse mediante modificación utilizando procesos conocidos de compuestos comercialmente disponibles de la fórmula (II). En particular, pueden prepararse reaccionando un compuesto de la fórmula (IV):

donde R^1 , R^5 , R^6 y R^b son tal como se definió arriba con un compuesto de la fórmula (V)

donde R^c y R^e se seleccionan independientemente a partir de C_{14} alquil.

Los compuestos de la fórmula (IV) y (V) se reaccionan adecuadamente conjuntamente bajo condiciones de reacción Reissert tal como en un solvente inerte (tal como tetrahidrofurano), en presencia de una base (tal como etóxido de potasio), a un rango de temperatura de 15 a 30°C preferiblemente 20 a 25°C, durante 10 a 20 horas preferiblemente 15 a 17 horas. El compuesto resultante se aísla y disuelve en un alcohol tal como etanol y un ácido orgánico (tal como ácido acético) y un catalizador de metal de transición (tal como 0% Pd/C) y se agrega ciclohexeno. La mezcla puede entonces calentarse a una temperatura de 60 a 120°C preferiblemente a 70 a 90°C durante 15 a 25 horas preferiblemente 16 a 20 horas para dar un compuesto de la fórmula (II) donde R^a es -CO₂R.

R^c y R^d son adecuadamente C₁₋₄alquil, preferiblemente metil o etil.

119
120

Alternativamente, los compuestos de la fórmula (II) pueden prepararse reaccionando un compuesto de la fórmula (VI):

(ver fórmula de la página 9 del original traducido)

donde R^1 , R^5 , R^6 y R^b son tal como se definió arriba, con un compuesto de la fórmula (VII):

donde R^d es C_{1-4} alquil.

Adecuadamente R^d es C_{1-4} alquil, preferiblemente metil o etil.

Los compuestos de la fórmula (VI) y (VII) se reaccionan adecuadamente conjuntamente bajo condiciones de Fischer tal como con un ácido orgánico (tal como ácido acético), en un alcohol (tal como etanol), a una temperatura de 60 a 90°C, preferiblemente 75 a 85°C, durante 1 a 5 horas, preferiblemente 1 a 3 horas. El compuesto resultante se mezcla con un ácido fuerte (tal como ácido polifosfórico) y se calienta a 90 a 150°C preferiblemente 100 a 120°C, durante 0,5 a 4 horas, preferiblemente 0,5 a 2 horas para dar un compuesto de la fórmula (II) donde R^2 es hidrógeno. Entonces, si se desea, R^2 puede convertirse opcionalmente en otro valor de R^2 como se definió en la fórmula (I) utilizando técnicas conocidas en la literatura.

En una alternativa preferida, los compuestos de la fórmula (II) se obtienen mediante ciclización de un compuesto de la fórmula (VIII)

(ver fórmula de la página 9 del original traducido)

donde R^1 , R^a , R^b y R^2 son tal como se definió arriba.

La ciclización puede efectuarse sometiendo a reflujo el compuesto en un solvente orgánico tal como xileno. Los compuestos de la fórmula (VIII) se preparan adecuadamente reaccionando un compuesto de la fórmula (IX)

(ver fórmula de la página 10 del original traducido)

donde R^1 , R^2 y R^b son tal como se definió arriba, con un compuesto de fórmula (X)

(ver fórmula de la página 10 del original traducido)

donde R^a es tal como se definió arriba. La reacción se efectúa adecuadamente en un solvente orgánico tal como un alcohol, en particular metanol, en presencia de una base tal como alcóxido de metal alcalino, en particular metóxido de sodio. Moderadas temperaturas de desde -30 a 20°C se emplean adecuadamente.

En aún una adicional modificación, los compuestos de la fórmula (II) se preparan mediante ciclización de un compuesto de la fórmula (XI) (ver fórmula de la página 11 del original traducido)

120
X
10
121

donde R^1 y R^b son como se definió arriba, R^7 es alquil, tal como metil, y R^8 es un grupo de protección carboxi tal como alquil, en particular metil.

La ciclización se efectúa adecuadamente bajo condiciones de Japp Klingemann, calentando una solución del compuesto en un solvente orgánico tal como tolueno y un ácido adecuado, tal como ácido sulfónico p-tolueno.

Los compuestos de la fórmula (XI) se preparan adecuadamente reaccionando un compuesto de la fórmula (XII) (ver fórmula de la página 11 del original traducido) donde R^1 , R^b , R^5 y R^6 son como se definió arriba, con un compuesto de la fórmula (XIII) (ver fórmula de la página 11 del original traducido) donde R^7 y R^8 son como se definieron en relación con la fórmula (XI). El compuesto de la fórmula (XII) se disuelve adecuadamente en un ácido diluido tal como 1,5N HCl en presencia de un nitrito tal como nitrito de sodio a temperaturas moderadamente bajas de desde -30 a 0°C, preferiblemente -51C.

Esta solución se mezcla entonces con una solución de un compuesto de la fórmula (XIII) en un solvente orgánico tal como etanol, en presencia de una solución de una base tal como un hidróxido de metal alcalino, por ejemplo una solución acuosa de hidróxido de sodio.

Los compuestos de la fórmula (III), (IV), (V), (VI), (VII), (IX), (X) y (XII) son conocidos o están comercialmente disponibles o son preparados mediante procesos conocidos en el arte mediante manipulación estándar de materiales comercialmente disponibles o conocidos.

Se apreciará también que en algunas de las reacciones mencionadas aquí puede ser necesario/deseable proteger cualesquier grupos sensibles en los compuestos. Las instancias donde es necesaria o deseable la protección y adecuados métodos para protección son conocidos por aquellos expertos en el arte. Consecuentemente, si los reactivos incluyen grupos tales como carboxi o hidroxil puede ser deseable proteger el grupo en algunas de las reacciones aquí mencionadas.

Un adecuado grupo de protección para un grupo hidroxil es, por ejemplo, un grupo acilo, por ejemplo un grupo alcanoil tal como acetil, un grupo aroil, por ejemplo benzoil, o un grupo arilmetil, por ejemplo bencil. Las condiciones de desprotección para los grupos de protección de arriba variarán necesariamente con la escogencia del grupo de protección. Así, por ejemplo, un grupo acilo tal como un grupo alcanoil aroil puede

12/1/82
14

retirarse, por ejemplo, mediante hidrólisis con una base adecuada tal como un hidróxido de metal alcalino, por ejemplo hidróxido de litio o sodio.

Alternativamente un grupo arilmetil tal como un grupo bencil puede retirarse, por ejemplo, mediante hidrogenación sobre un catalizador tal como paladio sobre carbono.

Un adecuado grupo de protección para un grupo carboxi es, por ejemplo, un grupo de esterificación, por ejemplo un grupo metil o un etil que puede retirarse, por ejemplo, mediante hidrólisis con una base tal como hidróxido de sodio, o por ejemplo un grupo t-butilo que puede retirarse, por ejemplo, mediante tratamiento con un ácido, por ejemplo un ácido orgánico tal como ácido trifluoroacético, o por ejemplo un grupo bencilo el cual puede retirarse, por ejemplo, mediante hidrogenación sobre un catalizador tal como paladio sobre carbono.

Los grupos de protección pueden retirarse en cualquier etapa conveniente en la síntesis utilizando técnicas convencionales bien conocidas en el arte químico.

Algunos de los intermediarios descritos aquí pueden ser novedosos, por ejemplo intermediarios de la fórmula (II), y como tales se proporcionan como una adicional característica de la invención.

Cuando se requiere una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la fórmula (I), ésta puede obtenerse, por ejemplo, mediante la reacción de dicho compuesto con el ácido apropiado (el cual logra un anión fisiológicamente aceptable), o con la base apropiada (que lleva a un catión fisiológicamente aceptable), o por cualquier otro procedimiento convencional de formación de sal.

De acuerdo con un adicional aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la fórmula (I) tal como se define anteriormente aquí o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él, en asociación con un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de la invención pueden estar en una forma adecuada para uso oral (por ejemplo como tabletas, comprimidos, cápsulas duras o blandas, suspensiones acuosas o aceitosas, emulsiones, polvos dispersables o gránulos, jarabes o elixires), para uso tópico (por ejemplo como cremas, ungüentos, geles, o soluciones o suspensiones acuosas o aceitosas), para administración por inhalación (por ejemplo como un polvo finamente dividido o un aerosol líquido), para administración por inhalación (por ejemplo como un polvo finamente

dividido) o para administración parenteral (por ejemplo como una solución estéril acuosa o aceitosa para dosificación intravenosa, subcutánea, intramuscular o dosificación intramuscular o como un supositorio para dosificación rectal).

Las composiciones de la invención pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales utilizando excipientes farmacéuticos convencionales, bien conocidos en el arte. Consecuentemente, las composiciones pretendidas para uso oral pueden contener, por ejemplo, uno o más agentes colorantes, edulcorantes, saborizantes y/o preservativos.

Adecuados excipientes farmacéuticamente aceptables para una formulación en tabletas incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes tales como lactosa, carbonato de sodio, fosfato de calcio o carbonato de calcio, agentes de granulación y desintegración tales como almidón de maíz o ácido algínico; agentes de enlace tales como almidón, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco; agentes preservativos tales como etil o propil p-hidroxibenzoato, y anti oxidantes, tales como ácido ascórbico. Las formulaciones en tableta pueden ser no revestidas o revestidas ya sea para modificar su desintegración y la subsecuente absorción del ingrediente activo dentro del tracto gastrointestinal, o para mejorar su estabilidad y/o apariencia, en cualquier caso, utilizando agentes de revestimiento convencionales y procedimientos bien conocidos en el arte.

Las composiciones para uso oral pueden estar en forma de cápsulas de gelatina dura donde el ingrediente activo se mezcla con un diluyente inerte sólido, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio, o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda donde el ingrediente activo se mezcla con agua o un aceite tal como aceite de maní, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen generalmente el ingrediente activo en una forma finamente en polvo conjuntamente con uno o más agentes de suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinil-pirrolidona, goma tragacanto y goma acacia; agentes de dispersión o humectantes tales como lecitina o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos (por ejemplo estearato de polioxietileno), o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de sorbitol polioxietileno,

123
16 24
15

o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de sorbitol polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitan polietileno. Las suspensiones acuosas pueden también contener uno o más preservativos (tales como etil o propil p-hidroxibenzoato, anti oxidantes (tales como ácido ascórbico), agentes colorantes, agentes saborizantes, y/o agentes edulcorantes (tales como sacarosa, sacarina o aspartame).

Las suspensiones aceitosas pueden formularse suspendiendo el ingrediente activo en un aceite vegetal (tal como aceite de arracacha, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco) o en un aceite mineral (tal como parafina líquida). Las suspensiones aceitosas pueden también contener un agente espesante tal como cera de abejas, parafina dura alcohol cetil. Los agentes edulcorantes tales como aquellos establecidos arriba, y los agentes saborizantes pueden agregarse para proporcionar una preparación oral al paladar. Estas composiciones pueden preservarse mediante la adición de un anti oxidante tal como ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua contienen generalmente el ingrediente activo conjuntamente con un agente de dispersión o humectante, un agente de dispersión y uno o más preservativos. Adecuados agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión se ejemplifican mediante aquellos ya mencionados arriba. Adicionales excipientes tales como agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes pueden estar también presentes.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden también estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase aceitosa puede ser un aceite vegetal, tal como aceite de oliva o aceite de arracacha, o un aceite mineral, tal como por ejemplo parafina líquida o una mezcla de cualquiera de éstos. Adecuados agentes emusificantes pueden ser, por ejemplo, gomas que se presentan naturalmente tales como goma acacia goma tragacanto, fosfátidos que se presentan naturalmente tales como fríjol de soya, lecitina, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol (por ejemplo monooleato de sorbitan) y productos de condensación de los dichos ésteres parciales con óxido de etileno tal como monooleato de sorbitan de polioxietileno. Las emulsiones pueden también contener agentes edulcorantes, saborizantes y preservativos.

24

Los jarabes y elixires pueden formularse con agentes edulcorantes tales como glicerol, propilenglicol, sorbitol, aspartame o sacarosa, y pueden también contener un agente desmulcificante, preservativo, saborizante y/o colorante. Las composiciones farmacéuticas pueden también estar en forma de una suspensión estéril inyectable acuosa o aceitosa, la cual puede formularse de acuerdo con los procedimientos conocidos utilizando uno o más de los apropiados agentes de dispersión humectantes y agentes de suspensión, los cuales se han mencionado arriba. Una preparación estéril inyectable puede también ser una solución o suspensión estéril inyectable en un diluyente o solvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo una solución en 1,3-butanodiol.

Formulaciones en supositorio pueden prepararse mezclando el ingrediente activo con un adecuado excipiente no irritante el cual es sólido a temperaturas ordinarias pero líquido a la temperatura rectal y se fundirá consecuentemente en el recto para liberar la droga. Adecuados excipientes incluyen, por ejemplo, mantequilla de maní y polietilenglicoles.

Formulaciones tópicas, tales como cremas, ungüentos, geles y soluciones o suspensiones acuosas o aceitosas, pueden obtenerse generalmente formulando un ingrediente activo con un vehículo o diluyente convencional, tópicamente aceptable, utilizando procedimiento convencional bien conocido en el arte.

Las composiciones para administración por insuflación pueden estar en forma de un polvo finamente dividido que contiene partículas de un diámetro promedio de, por ejemplo, 30 μ o mucho menos, el polvo mismo que comprende ya sea ingrediente activo solo o diluido con uno o más portadores fisiológicamente aceptables tales como lactosa. El polvo para insuflación se retiene entonces convenientemente en una cápsula que contiene, por ejemplo, 1 a 50 mg de ingrediente activo para uso con un dispositivo turbo inhalador, tal como se utiliza para insuflación del agente conocido cromoglicato de sodio.

Las composiciones para administración por inhalación pueden estar en forma de un aerosol presurizado convencional colocado para dispensar el ingrediente activo ya sea como un aerosol que contiene pequeñas gotas líquidas o sólidas finamente divididas. Los propulsores de aerosol convencionales tales como hidrocarburos volátiles fluorizados o hidrocarburos pueden utilizarse y el dispositivo en aerosol se coloca convenientemente para suministrar una cantidad medida de ingrediente activo.

125
18
X 126
88

Para adicional información sobre la Formulación el lector debe referirse al Capítulo 25.2 en el Volumen 5 de Química Medicinal Comprehensiva (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990.

La cantidad de ingrediente activo que se combina con uno o más excipientes para producir una única forma de dosificación variará necesariamente dependiendo del huésped tratado y la ruta particular de administración. Por ejemplo, una formulación pretendida para administración oral a humanos contendrá generalmente, por ejemplo, desde 0,5 mg a 2 g de agente activo compuesto con una cantidad apropiada y conveniente de excipientes que pueden variar desde alrededor de 5 hasta alrededor de 98 por ciento en peso de la composición total. Las formas unitarias de dosificación contendrán generalmente alrededor de 1 mg hasta alrededor de 500 mg de un ingrediente activo. Para adicional información sobre las Rutas de Administración y Regímenes de Dosificación el lector debe referirse al Capítulo 25.3 en el Volumen 5 de Química Medicinal Comprehensiva (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990.

El tamaño de la dosis para propósitos terapéuticos o profilácticos de un compuesto de la fórmula I variarán naturalmente de acuerdo con la naturaleza y severidad de las condiciones, la edad y el sexo del animal o paciente y la ruta de administración, de acuerdo con principios bien conocidos de medicina. Como se mencionó arriba, los compuestos de la fórmula I son útiles en el tratamiento de enfermedades o condiciones médicas que se deben solas o en parte a los efectos de MCP-1 y/o RANTES, por ejemplo, artritis reumatoide.

Utilizando un compuesto de la fórmula I con propósitos terapéuticos o profilácticos se administrará generalmente en forma tal que una dosis diaria en el rango, por ejemplo, de 0,5 mg a 75 mg por kg de peso corporal se recibe, dada si se requiere en dosis divididas. En general menores dosis se administrarán cuando se emplea una ruta parenteral. Consecuentemente, por ejemplo, para administración intravenosa, una dosis en el rango, por ejemplo, de 0,5 mg a 30 mg por kg de peso corporal se utilizará generalmente. Similarmente, para administración por inhalación, una dosis en el rango de, por ejemplo, 0,5 mg a 25 mg por kg de peso corporal se utilizará. La administración oral se prefiere sin embargo.

De acuerdo con un adicional aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de ella, como se define aquí anteriormente para uso

126

Convenientemente éste es un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él, para uso como un medicamento para antagonizar un efecto mediado de MCP-1 (y/o un efecto mediado de RANTES en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.

De acuerdo con una adicional característica de la invención se proporciona un método de antagonizar un efecto mediado de MCP-1 en un animal de sangre caliente, tal como un ser humano, en necesidad de dicho tratamiento el cual comprende administrar a dicho animal una cantidad efectiva de un compuesto de la fórmula (1) o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él, como se define aquí anteriormente.

Los siguientes métodos de prueba biológica, datos y Ejemplos sirven para ilustrar la presente invención.

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, USA.
BCA	ácido bicíncroníco, (utilizado, con sulfato de cobre, para probar proteína)
BSA	Albúmina de Suero Bovino
DMEM	Medio Dulbecco modificado Eagle
EGTA	Etilenobis(oxietilenonitrilo) ácido tetracético
FCS	Suero de oveja fetal
HEPES	(N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfónico])
HBSS	Solución de Sal Balanceada de Hank

127
10
128

hMCP-1 Monocyte Quimioatrayente Protein-I Humana
PBS Salina de fosfato amortiguada
PCR Reacción en cadena de polimerasa

AMPLITAQ®, disponible en Perkin-Elmer Cetus, se utiliza como la fuente de polimerasa ADN termoestable.

El amortiguador de enlace es 50 mM HEPES, 1 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 0,5% de suero fetal de oveja, ajustado a pH 7,2 con 1 M NaOH.

Aminoácidos no esenciales (100X concentrado) es: L-Alanine, 890 mg/l; L-Asparagine, 1 320 mg/l; L-ácido aspártico, 1 330 mg/l; L-ácido glutámico, 1 470 mg/l; Glicina, 750 mg/l; L-Proline, 1 150 mg/l y; L-Serine, 1 050 mg/l.

Suplemento de Hipoxantine y Thimidine (50x concentrado) es: hypoxanthine, 680 mg/l y; thimidine, 194 mg/l.

Penicillin-Streptomycin es: Penicilina G (sal de sodio); 5 000 unidades/ml; Sulfato de estreptomicina, 5 000 $\mu\text{g/ml}$.

Células de Línea de células monocítica humana THP-1 están disponibles en ATCC, número de acceso ATCC TEB-202.

Solución de Sal Balanceada Hank (HBSS) se obtuvo de Gibco; ver Proc. Soc. Exp. Biol Med, 1949, 71, 196.

El medio de cultivo de células sintético, RPMI 1640 se obtuvo de Gibco; contiene sales inorgánicas [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/l; KCl 400 mg/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/l; NaCl 6000mg/l; NaHCO_3 2000 mg/l & Na_2HPO_4 (anhyd) 800 mg/l], D-Glucose 2000 mg/l, glutatona reducida 1 mg/l, aminoácidos y vitaminas.

FURA-2/AM es 1-[2-(5-carboxioxazol-2-il)-6-aminobenzofuran-5-oxi]-2-(2'-amino-5'-metilfenoxi)-etano-N,N,N'-ácido tetracético penta acetoximetil éster y se obtuvo de Molecular Probes, Eugene, Oregon, Estados Unidos.

El Amortiguador de Sedimentación de Sangre contiene 8,5g/l NaCl y 10g/l hidroxietil celulosa.

El Amortiguador de Lisis es 0,15 M NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 1mM EDTA

21

Amortiguador de Enlace Total de Células es 50 mM HEPES, 1 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 0,5% BSA, 0,01 % NaN_3 , ajustado a pH 7,2 con 1M NaOH.

El amortiguador de lavado es 50mM HEPES. 1MM CaCl_2 , 5mM MgCl_2 , 0,5% inactivado por calor FCS, 0.5MNaCl ajustado a pH 7,2 con 1M NAOH.

Los procedimientos generales de biología molecular puede seguirse a partir de cualquiera de los métodos descritos en "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Segunda Edición, Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

i) Clonación y expresión de receptor HMCP- I

El receptor MCP- 1 B (CCR2B) CDNA se clonó mediante PCR de TBP-1 célula RNA utilizando adecuados precursores oligonucleótidos basados en las secuencias publicadas de receptor MCP-I (Charo y otros, 1994, Proc. NatL Acad. Sci. Estados Unidos, 91, 2752). Los productos PCR resultantes se clonaron en vector PCR-IITM (InVitrogen, San Diego, CA.). Error libre CCR2B cADN se subclonó como un fragmento Hind III-Not I en el vector de expresión eucariótico pCDNA3 (InVitrogen) para generar pCDNA3/CC-CKR2A y pCDNA3/CCR2B respectivamente.

pCDNA3/CCR2B DNA lineada se transfectó en células CHO-KI mediante precipitación de fosfato de calcio (Wigler y otros, 1979, Cell, 16, 777). Las células transfectadas se seleccionaron mediante la adición de Sulfato de geneticina (G418, Gibco BR-L) a 1 mg/ml, 24 horas después de que las células han sido transfectadas. La preparación de RNA y manchado Norteflo se llevó a cabo como se describe previamente (Needham y otros, 1995, Prot. Express. Purific., 6, 134). CHO-KI clone 7 (CHO-CCR2B) se identificó como el mayor expresor receptor MCP-1 B.

ii) Preparación de fragmentos de membrana

Células CHO-CCR2B crecieron en DMEM suplementado con 10% de suero fetal de oveja, 2mM glutamina, 1x Aminoácidos No Esenciales, 1x Hipoxantine y Tymidine

Suplemento y Penicillin-Streptomycin (a 50 μg de estreptomycina/ml, Gibco BRL) Fragmentos de Membrana se prepararon utilizando métodos de células de lisis/centrifugación diferencial como se describe previamente (Siciliano y otros, 1990, J BioL Chem., 265, 19658). La concentración de

129
243
286

proteínas se estimó mediante ensayo de proteína BCA (Pierce, Rockford, Illinois) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

iii) Ensayo

125 I MCP-1 se preparó utilizando la conjugación de Bolton y Hunter (Bolton y otros, 1973, Biochem. J, 133, 529; Amersham International plc]. Los ensayos de enlace de equilibrio se llevaron a cabo utilizando el método de Ernst y otros, 1994, J Immunol, 152, 3541. Brevemente, cantidades variables de 125 I-etiquetado MCP-1 se agregaron a 7 μ g de membranas purificadas de células CHO-CCR2B en 100 μ l de Amortiguador de Enlace. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente las mezclas de la reacción de enlace se filtraron y lavaron 5 veces a través de un lavador de placa (Brandel MLR-96T Célula Harvester) utilizando Amortiguador de Enlace frío con hielo. Matraces de filtro (Brandel GF/B) se remojaron previamente durante 60 minutos en 0,3% de polietilenimina antes del uso. Después de la filtración los filtros individuales se separaron en tubos de 3,5 ml (Sarstedt No. 55.484) y unidos. 125 I-etiquetado MCP-1 se determinó (LKB 1277 Gammamaster). Se realizaron estudios de competición en frío como arriba utilizando 100 PM 125 I-etiquetado MCP-1 en presencia de variables concentraciones de MCP-1 no etiquetado. Enlace no específico se determinó mediante la inclusión de un exceso molar de 200 pliegues de MCP-1 no etiquetado en la reacción.

Los estudios de enlace de ligando con fragmentos de membrana preparados a partir de células CHO-CCR2B mostraron que el receptor CCR2B estaba presente a una concentración de 0,2 p moles/mg de proteína de membrana y unión MCP-1 selectivamente y con alta afinidad ($IC_{50} = 110$ pM, $K_d = 120$ pM). La unión a estas membranas era completamente reversible y alcanzó el equilibrio después de 45 minutos a temperatura ambiente, y hubo una relación lineal entre el enlace MCP-1 y la concentración de membranas de células CHO-CCR2B cuando se utiliza MCP-1 a concentraciones entre 100 pM y 500 pM.

Los compuestos de prueba disueltos en DMSO (5 μ l) se probaron en competición con 100 pM etiquetado MCP-1 en un rango de concentración (0,01-50 μ M) en duplicado utilizando curvas de respuesta de dosis de ocho puntos y concentraciones IC_{50} se calcularon.

Los compuestos probados de la presente invención tuvieron valores IC_{50} de 50 μ M o menos en el ensayo de enlace de receptor hMCP-1 descrito aquí.

b) Flujo de MCP-1 mediado de calcio en células THP-1

130
 2/10
 7/10

La línea de células monocítica humana THP-1 creció en un medio de cultivo de células sintético RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal de oveja, 6mM glutamine y Penicillin-Streptomycin (a 50 µg estreptomycin/ml, Gibco BRL). Las células THP-1 se lavaron en HBSS (lacking Ca^{2+} y Mg^{2+}) + 1 mg/ml BSA y resuspendieron en el mismo amortiguador a una densidad de 3×10^6 células/ml. Las células se cargaron entonces con 1 mM FURA-2/AM durante 30 minutos a 37°C, se lavaron dos veces en RBSS, y resuspendieron a 3×10^6 células/ml. La suspensión de células TBP-1 (0,9 ml) se agregó a una cubeta de 5 ml desechable que contiene una barra agitadora magnética y 2,1 ml de HBSS calentado previamente (37°C) que contiene 1 mg/ml BSA, 1 mM MgCl_2 y 2 mM CaCl_2 . La cubeta se colocó en un espectrofotómetro de fluorescencia (Perkin Elmer, Norwalk, CT) y se incubó previamente durante 4 minutos a 37°C con agitación. La fluorescencia se registró durante 70 segundos y las células se estimularon mediante adición de HMCP- 1 a la cubeta después de 10 segundos. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se midió mediante excitación a 340 nm y 380 nm alternativamente y subsecuente medición de la intensidad de la emisión de fluorescencia a 510 nm. La relación de las intensidades de la luz fluorescente emitida después de la excitación a 340 nm y 380 nm, (R), se calculó y distribuyó para dar y estimar el citoplásmico $[\text{Ca}^{2+}]$ de acuerdo con la ecuación:-

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \left(\frac{\text{Sf2}}{\text{Sb2}} \right)$$

donde el K_d para complejo FURA-2 Ca^{2+} a 37°C se tomó como 224nm. $R_{\max}$, es la máxima relación de fluorescencia determinada después de la adición de 10mM Ionomycin, $R_{\min}$ es la relación mínima determinada por la subsecuente adición de una solución libre de Ca^{2+} que contiene 5 mM EGTA, y Sf2/Sb2 es la relación de los valores de fluorescencia a 380 nm de excitación determinada a $R_{\min}$ y $R_{\max}$, respectivamente.

La estimulación de células THP-1 con hMCP-1 induce una rápida, elevación transiente en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en una manera específica y dependiente de la dosis. Las curvas de respuesta de dosis indicaron un EC_{50} aproximado de 2 nm. Los compuestos de prueba disueltos en DMSO (10µl) se probaron para inhibición de liberación de calcio agregándolas a la suspensión de células 10 segundos antes de la adición de ligando y midiendo la reducción en la elevación transiente en $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Los compuestos de prueba también se probaron en cuanto a falta de actividad agonista mediante adición en lugar de hMCP-1.

c) quimiotaxis mediada hMCP-1 y RANTES.

Los ensayos in vitro de quimiotaxis se llevaron a cabo utilizando línea RHP-1 de células monocíticas humanas. La migración de células a

131 ~~131~~
~~131~~

través de membranas de policarbonato se midió enumerando aquellas que pasan a través ya sea directamente por conteo Coulter o indirectamente mediante el uso de un ensayo de viabilidad colorimétrico midiendo la penetración de una sal de tetrazolo mediante la cadena respiratoria mitocondrial (Scudiero D.A. y otros 1988, *Cáncer Res.*, 48, 4827-4833).

Los quimioatrayentes se introdujeron dentro de una placa de 96 orificios microtitulada que forma el orificio inferior de una cámara de quimiotaxis ajustada con una membrana de filtro de estructura de adhesivo de policarbonato libre de PVP de 5 μm de tamaño de poros (serie NeuroProbe MB, Cabin John, MD 20818, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El quimioatrayente se diluyó como fue apropiado en un medio de cultivo sintético de células, RPMI 1640 (Gibco) o suplementado con 2 mM glutamina y 0.5% BSA, o alternativamente con HBSS con Ca^{2+} y Mg^{2+} sin Fenol Rojo (Gibco) más 0,1% BSA. Cada dilución se desgasificó bajo vacío durante 30 minutos y se colocó (400 μl) en los orificios más inferiores de la cámara y THP-1 células (5×10^5 en 100 μl RPMI 1640 + 0,5%BSA) se incubaron en cada orificio de la cámara superior. Para la inhibición de la quimiotaxis el quimioatrayente se mantuvo a una concentración constante submáxima determinada previamente (1 nM MCP- 1) y se agregó al orificio inferior conjuntamente con los compuestos de prueba disueltos en DMSO (concentración final de DMSO < 0.05% v/v) a concentraciones variables. La cámara se incubó durante 2 h a 37°C bajo 5 % CO_2 . El medio se retiró de los orificios superiores los cuales se lavaron entonces con 200 μl de salina fisiológica antes de abrir la cámara, enjuagando en seco la superficie de la membrana y centrifugando la placa de 96 orificios a 600 g durante 5 minutos para cosechar las células. El sobrenadante (150 μl) se aspiró y 10 μl de reactivo de proliferación de células, WST-1, {4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-fenil disulfonato} más un reactivo de acoplamiento de electrones (Boehringer Mannheim, Cat.no. 1644 807) se agregó nuevamente a los orificios. La placa se incubó a 37°C durante 3 h y la absorbancia del producto soluble formazan se leyó sobre un lector de placa de microtítulo a 450 nm. Los datos se entraron en una hoja de amplitud, se corrigieron para cualquier migración al azar en ausencia de quimioatrayente y los valores promedio de absorbancia, error estándar de la media, y pruebas de significación se calcularon. hMCP-1 indujo la concentración dependiente de migración de células con una respuesta bifásica característica, máxima 0,5 a 1,0 nm.

En una forma alternativa del anterior ensayo, las células atraídas de fluorescencia pueden utilizarse con el fin de ayudar en la detección de punto final. En este caso, las células THP-1 células utilizadas son atraídas en fluorescencia mediante incubación in presencia de 5mM de calceína AM

132
L. 5
782

(Glycine, N,N'-[[3',6'-bis(acetyloxy)-3-oxospiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthene]-2',7'-diyl]bis(metileno)] bis[N-[2-[(acetiloxi)metoxi]-2-oxoetil]]-bis[(acetiloxi)metil] éster; Sondas Moleculares) durante 45 minutos en la oscuridad. Las células se cosechan mediante centrifugación y se resuspenden en HBSS (sin fenol Rojo) con Ca^{2+} , Mg^{2+} y 0.1% BSA. 50 μl (2×10^5 células) de la suspensión de células se colocan sobre el filtro encima de cada orificio y, como arriba, la unidad se incubaba a 37°C durante 2 horas bajo 5% CO_2 . Al final de la incubación, las células se lavan fuera de la cara superior del filtro con salina amortiguada de fosfato, el filtro se retira de la placa y el número de células atraídas ya sea al lado inferior del filtro o el orificios inferior estimado leyendo la fluorescencia a 485 nm de excitación, 538 nm de emisión de longitudes de onda (f_{max} , Dispositivos Moleculares). Los datos se entraron en una hoja de amplitud, se corrigieron para cualquier migración al azar en ausencia de quimioatrayente y los valores promedios de fluorescencia, error estándar de la media, porcentaje de inhibición e IC_{50} de los compuestos bajo prueba y pruebas de significación se pueden calcular. Adicionalmente a quimiotaxis inducida por MCP-1, esta forma alternativa del ensayo se utilizó también para medir la inhibición de quimiotaxis inducida por RANTES (2 nM).

d) Enlace a células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs)

i) Preparación de PBMC humanas

Sangre humana fresca (200 ml) se obtuvo de donantes voluntarios, se recogió dentro de anti coagulante de citrato de sodio para dar una concentración final de 0,38%. La sangre se mezcló con Amortiguador de Sedimentación y se incubó a 37°C durante 20 minutos. El sobrenadante se recogió y centrifugó a 1 700 rpm durante 5 minutos (Sorvall RT6000D). El pellet obtenido se resuspendió en 20 ml RPM1/BSA (1 mg/ml) y 4 x 5 ml de células se laminaron cuidadosamente sobre 4 x 5 ml de Lymphoprep™ (Nycomed) en tubos centrífugos de 15 ml. Los tubos se esponjaron a 1 700 rpm durante 30 minutos (Sorvall RT6000D) y la capa resultante de células se retiró y transfirió a tubos Falcon de 50 ml. Las células se lavaron dos veces en Amortiguador Lysis para retirar cualesquiera células de sangre roja restantes seguido por 2 lavados en RPM1/BSA. Las células se resuspendieron en 5 ml de Amortiguador de Enlace. El número de células se midió en un contador Coulter y adicional amortiguador de enlace se agregó para dar una concentración final de $1,25 \times 10^7$ PBMC/ml.

ii) Ensayo

133
133
133

[¹²⁵I]MCP-1 se preparó utilizando conjugación Bolton y Hunter (Bolton y otros, 1973, Biochem. J, 133, 529; Amersham International plc]. Ensayos de enlace de equilibrio se llevaron a cabo utilizando el método de Ernst y otros, 1994, J Immunol, 152, 3541. Brevemente, 50 µl de ¹²⁵I-labeled MCP-1 (concentración final 100 pM) se agregó a 40µl (5 x 10⁵ células) de suspensión de células en una placa de 96 orificios. Los compuestos, diluidos en el Amortiguador Total de Enlace de Células a partir de una solución en lote de 10 mM en DMSO se agregó en un volumen final de 5 µl para mantener una concentración constante de DMSO en el ensayo de 5%. El enlace total se determinó en ausencia de compuesto. Enlace no específico se definió mediante la adición de 5 µl de MCP-1 frío para da una concentración final de ensayo de 100 nM. Los orificios del ensayo se desarrollaron a un volumen final de 100 µl con el Amortiguador Total de Enlace de Células y las placas se sellaron. Después de la incubación a 37°C durante 60 minutos la mezcla de enlace de las reacciones se filtró y lavó durante 10 segundos utilizando Amortiguador de Lavado en hielo frío utilizando un lavador de placa (Cosechador de Células Brandel MLR-96T). Matraces de filtro (Brandel GF/B) se humedecieron previamente durante 60 minutos en 0,3% de polietilenimina más plus 0,2% de BSA antes del uso. Después de la filtración los filtros individuales se separaron en tubos de 3,5 ml (Sarstedt No. 55.484) y ¹²⁵I-etiquetado MCP-1 de enlace se determinó (LKB 1277 Gammamaster).

La potencia del compuesto de prueba se determinó mediante ensayo en duplicado utilizando curvas de respuestas de dosis de seis puntos y determinaron concentraciones IC₅₀.

No se observó toxicidad fisiológicamente no aceptable en la dosis efectiva para los compuestos probados de la presente invención.

La invención se ilustra adicionalmente, pero no está limitada por los siguientes Ejemplos donde los siguientes procedimientos generales se utilizaron a menos que se establezca de otra forma.

i) N,N-Dimetilformamida (DMF) se secó sobre tamices moleculares de 4 Å. Tetrahidrofurano anhidro (THF) se obtuvo en botellas Aldrich SURESEAL™. Otros reactivos y solventes comercialmente disponibles se utilizaron sin adicional purificación a menos que se establezca de otra forma. Los extractos de solvente orgánico se secaron sobre MgSO₄ anhidro

ii) ¹H, ¹³C y ¹⁹F NMR se registraron sobre instrumentos Bruker WM200, WM250, WM300 WM400 utilizando DMSO-d₆ con Me₄Si o CCl₃F

~~134~~ ~~134~~

v) La cromatografía de destello se llevó a cabo sobre sílice (Merck Kieselgel: Art.9385).

Ejemplo 3

135 #5
28
D

N-(3-cloro-4-trifluorometilbencil)-5-hidroxiindolo-2-ácido carboxílico
(55% de obtenido). NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.5.9 (s, 2H), 6.9 (m, 1H), 7.1 (m, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.4 (m, 2H), 7.8 (d, 1H), 9.1 (s, 1H); m/z 368/370 (M-H⁺).

Ejemplo 4

N-(3-bromo-4-clorobencil)-5-hidroxiindolo-2-ácido carboxílico

71% de obtenido. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.76 (s, 2H), 6.80 (d, 1H), 6.95 (m, 2H), 7.12 (s, 1H), 7.36 (d, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.47 (d, 1H), 9.00 (s, 1H); m/z 380

Ejemplo 5

N-(3-fluoro-4-bromobencil)-5-hidroxiindolo-2-ácido carboxílico

53% de obtenido. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.77 (s, 1H), 6.70 (d, 1H), 6.80 (dd, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.00 (d, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.32 (d, 1H), 7.57 (t, 1H), 9.00 (s, 1H), 12.82 (s, 1H); m/z 362 (M-H⁺).

Ejemplo 6

N-(3-bromo-4-fluorobencil)-5-hidroxiindolo-2-ácido carboxílico

55% de obtenido. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.77 (s, 2H), 6.80 (dd, 1H), 6.97 (d, 1H), 6.99 (m, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.23 (t, 1H), 7.38 (m, 2H), 9.00 (s, 1H); m/z 362 (M-H⁺).

Ejemplo 7

N-(3-trifluorometil-4-fluorobencil)-4-fluoro-5-hidroxiindolo-2-ácido carboxílico

(58% de obtenido). NMR(CD₃SOCD₃) δ: 5.85 (s, 2H), 7.0 (t, 1H), 7.1 (m, 2H), 7.2-7.3 (m, 3H), 7.4 (t, 1H), 7.95 (dd, 1H), 9.3 (s, 1H) 13.1 (s, 1H); m/z 370 (M-H⁺).

Ejemplo 8

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-4-fluoro-5-hidroxiindolo-2-ácido carboxílico

97% de obtenido. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.80 (s, 2H), 7.00 (t, 1H), 7.16 (dd, 1H), 7.20 (m, 2H), 7.60 (m, 2H), 9.30 (s, 1H); m/z 386 (MH⁺).

Ejemplo 9

N-(3-trifluorometil-4-fluorobencil)-4,6-difluoro-5-hidroxiindolo-2-ácido carboxílico

83% de obtenido. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.80 (s, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.23 (m, 1H), 7.30-7.50 (m, 2H), 7.58 (m, 1H), 9.60 (s, 1H); M/z(-) 388.2 (M-H⁺)

Ejemplo 10

136
X
626

N-(3, 4-clorobencil)-4,6-dicloro-5-hidroxiindolo-2-ácido carboxílico

82% de obtenido. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.92 (s, 2H), 6.87 (s, 1H), 6.99 (dd, 1H), 7.37 (d, 1H), 7.5(d, 1H), 7.5 5 (s, 1H); m/z 406, 404, 402 (M-H⁺)

Ejemplo 11

N-(3-trifluorometil-4-fluorobencil)-3-bromo-5-hidroxiindolo-2-ácido carboxílico

(92% de obtenido). NMR(CD₃SOCD₃) δ::5.8 (s, 2H), 6.9 (m, 2H), 7.25 (dd, 1H), 7.35-7.55 (M, 2H), 7.6 (dd, 1H), 9.4 (s, 1H); m/z 430/432 (M-H⁺).

Ejemplo 12

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-3-bromo-5-hidroxiindolo-2-ácido carboxílico

(309 mg, 87%). NMR(CD₃SOCD₃) δ:: 5.85 (s, 2H), 6.8-7.0 (m, 3H), 7.4 (d, 1H), 7.75 (d, 1H), 9.4 (s, 1H); m/z 446/448 (M-H⁺).

Ejemplo 13

N-(3-cloro-4-trifluorometilbencil)-3-bromo-5- hidroxiindolo-2-ácido carboxílico

(82% de obtenido) NMR(CD₃SOCD₃) δ:: 5.8 (s, 2H), 6.9 (m, 2H), 7.1 (dd, 1H), 7.45 (d, 1H), 7.6 (m, 2H), 9.4 (s, 1H) ; m/z 447 (M-H⁺).

Ejemplo 14

N-(3-fluoro-4-trifluorometilbencil)-3-cloro-5-hidroxiindolo-2-ácido carboxílico

NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 6.9 (m, 2H), 7.25(m, 1H),7.4 (m, 2H), 7.6 (d, 1H), 9.4(s, 1H); m/z 386.0 (M-H⁺).

Ejemplo 15

N-(3-fluoro-4-trifluorometilbencil)-3-iodo-5-hidroxiindolo-2-ácido carboxílico

NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 6.8(s, 1H), 6.9(d, 1H), 7.2(m, 1H), 7.4 (m, 2H), 7.6(d, 1H), 9.3(s, 1H); m/z 478 (M-H⁺).

Ejemplo 16

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-3-metoxi-5-hidroxiindolo-2-ácido carboxílico

(108% de obtenido como hidrato) NMR: 3.9 (s, 3H) 5.7 (s, 2H), 6.8 (dd, 1H), 6.9 (d, 1H), 7.2(d, 1H) 7.4 (d, 1H), 7.6 (m, 2H), 9.1 (s, 1H); m/z 398 (M-H⁺).

Ejemplo 17

N-(3-trifluorometil-4-fluorobencil)-5-hidroxi-6-cloroindolo-2-ácido carboxílico

(68% de obtenido). NMR (CD_3SOCD_3) δ 5.8 (s, 2H), 7.1-7.2 (m, 3H), 7.4 7.55 (m, 2H), 7.7 (s, 1H), 9.8 (s, 1H); m/z 386 (M-H^+).

Ejemplo 18

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-hidroxi-6-cloroindolo-2-ácido carboxílico

71% de obtenido. NMR (CD_3SOCD_3) δ 5.74 (s, 2H), 7.04-7.21 (m, 3H), 7.53-7.63 (m, 2H), 7.7 (s, 1H), 9.72 (bs, 1H); m/z 402.1/404.5 (M-H⁺)

Ejemplo 19

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-hidroxi-7-fluoroindolo-2-ácido carboxílico

55% de obtenido. NMR (CD_3SOCD_3) δ 5.90 (s, 2H), 6.60 (m, 1H), 6.80 (m, 1H), 7.15 (m, 2H), 7.52 (m, 1H), 7.60 (d, 1H); M/z (-) 385.85 (M-H^+)

Ejemplo 20

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5- hidroxi-6-bromoindolo-2-ácido
carboxílico

90% de obtenido. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.82 (s, 2H), 7.10(m, 1H), 7.18 (d, 2H), 7.60 (m, 2H), 7.82(s, 1H), 9.80 (s, 1H), 13.0 (s, 1H); m/z 446.18 (M-H⁺)

Ejemplo 21

N-(3,4-diclorobencil)-5-hidroxi-6-bromoindolo-2-ácido carboxílico

92% de obtenido. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.80 (s, 2H), 6.85 (m, 1H), 7.15 (s, 2H), 7.25 (m, 1H), 7.50 (d, 1H), 7.80 (s, 1H), 9.80 (s, 1H); m/z 412.1 (M-H⁺)

Ejemplo 22

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-hidroxi-6-fluoroindolo-2-ácido carboxílico

97% de obtenido. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 7.1-7.2 (m, 3H), 7.49 (d, 1H), 7.55-7.63 (m, 2H), 9.49 (s, 1H), 12.86 (br, 1H); m/z 3 86, 388 (M-H⁺)

Ejemplo 23

N-(3,4-diclorobencil)-5-hidroxi-6-fluoroindolo-2-ácido carboxílico

97% de obtenido. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.75 (s, 2H), 6.9 (dd, 1H), 7.1-7.2 (m, 2H), 7.3 (d, 1H), 7.45 (d, 1H), 7.5 (d, 1H), 9.5 (bs, 1H); m/z 353 (M-H⁺)

Ejemplo 24

133
138
139

N-(3,4-diclorobencil)-5-hidroxi-6-cloroindolo-2-ácido carboxílico

41% de obtenido. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 6.9 (dd, 1H), 7.2 (s, 2H), 7.3 (d, 1H), 7.5 (d, 1H), 7.65 (s, 1H), 9.75 (s, 1H); m/z 398,396 (M-H⁺)

Ejemplo 25

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-4-cloro-5-hidroxiindolo-2-ácido carboxílico

93% de obtenido. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.86 (s, 2H), 7.01 (d, 1H), 7.09-7.13 (m, 2H), 7.4 (d, 1H), 7.58-7.68 (m, 2H), 9.66 (bs, 1H); m/z 402,404 (M-H⁺).

Ejemplo 26

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-4,6-dicloro-5-hidroxiindolo-ácido carboxílico

76% de obtenido. NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.86 (s, 2H), 7.09 (dd, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.59 (d, 1H), 7.64 (d, 1H), 7.81 (s, 1H), 9.64 (bs, 1H); m/z 392, 394 (M-H⁺).

Ejemplo 27

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-acetoxiindolo-2-ácido carboxílico (Prodroga del compuesto No. 1 del Ejemplo 1)

Una solución de N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-hidroxiindolo-2-ácido carboxílico (1,01g) en etil acetato caliente (80 ml) se agregó 4-dimetilaminopiridina (30 mg) y anhídrido acético (0,64 ml) y la mezcla resultante se agitó durante 18 horas. Los orgánicos se lavaron con 1N HCl y se secaron. Los orgánicos se concentraron y purificaron mediante cromatografía de columna, levigando con acetato de etilo para dar el producto deseado (808 mg, 72%). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2.25 (s, 3H), 5.9 (s, 2H), 7.05 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.43 (d, 1H), 7.60 (m, 2H), 7.65 (d, 1H); m/z 410 (M-H⁺).

Preparación de Materiales de Partida

Los materiales de partida para los Ejemplos anteriores son ya sea comercialmente disponibles o son fácilmente preparados mediante métodos estándares a partir de materiales conocidos. Por ejemplo las siguientes reacciones (Métodos A a E) son ilustraciones pero no limitaciones de la preparación de los materiales de partida utilizados en las reacciones de arriba.

Método A

Etil 5-acetoxi-N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)indolo-2-carboxilato

i) Etil 5-hidroxiindolo-2-carboxilato

23
2
1
0

Tribromuro de borono (64,58 g) se agregó gota a una solución agitada de etil 5-metoxiindolo-2-carboxilato (20 g) en diclorometano (1 000 ml) a -78°C bajo una atmósfera de argón. La reacción se dejó tibia a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas adicionales. La reacción se vertió dentro de hielo/solución de carbonato de hidrógeno de sodio acuosa saturada con agitación y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con solución saturada acuosa de carbonato de hidrógeno de sodio, agua, solución acuosa saturada de cloruro de sodio y se secaron. La solución se concentró en vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía de columna utilizando 0 a 60% de éter dietilo:isohexano como levigado para lograr el producto como un sólido blanco (9.02g, 48%). NMR(CD_3SOCD_3): δ 1.31 (t, 3H), 4.29 (q, 2H), 6.79 (dd, 1H), 6.90 (dd, 1H), 7.22 (d, 1H), 8.84 (s, 1H), 11.52 (br, 1H); m/z 206 (MH^+).

ii) Etil 5-acetoxiindolo-2-carboxilato

Una solución agitada de etil 5-hidroxiindolo-2-carboxilato (7,79 g) y 4-dimetilaminopiridina (20 mg) en anhídrido acético (80 ml) se calentó a 80°C durante 4 horas. La reacción se concentró en vacío y el residuo se disolvió en acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con ácido clorhídrico (2 M), solución saturada acuosa de carbonato de hidrógeno de sodio, agua, solución acuosa saturada de cloruro de sodio y se secaron. La solución se concentró en vacío para lograr el producto como un sólido amarillo (9,39g, 100 %). NMR (CD_3SOCD_3): δ 1.20 (t, 3H), 2.10 (s, 3H), 4.19 (q, 2H), 6.86 (dd, 1H), 6.97 (d, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.29 (d, 1H); m/z 248 (MH^+).

iii) Etil 5-acetoxi-N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)indolo-2-carboxilato

Hidrido de sodio (1,78 g) se agregó a una solución agitada de etil 5-acetoxiindolo-2-carboxilato (10 g) y 3-trifluorometil-4-clorobencilbromuro (11,64 g) en DMF (200 ml) bajo una atmósfera de argón. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, entonces se concentró en vacío y el residuo se fraccionó entre acetato de etilo y agua. Los extractos orgánicos combinados se secaron, concentraron bajo vacío y se purificaron mediante cromatografía de columna utilizando hexano 15% acetato de etilo/isohexano como levigado para lograr a sólido en crema. La cristalización a partir de acetato de etilo/isohexano logró el producto como un sólido en crema (13.26 g, 74%). NMR (CD_3SOCD_3): δ 1.37 (t, 3H), 2.31 (s, 3H), 4.32 (q, 2H), 5.82 (s, 2H), 7.0-7.09 (m, 2H), 7.22 - 7.29 (m, 1H), 7.31-7.4 (m, 2H) 7.43 (d, 1H), 7.51 (s, 1H).

33
2140
288

Los procedimientos descritos en el Método A1)-iii) se repitieron utilizando el apropiado haluro de bencil. Así se obtuvieron los compuestos descritos siguientes.

Etil N-(3-fluoro-4-trifluorometilbencil)-5-acetoxiindolo-2-carboxilato

860 mg, 96% NMR (CDCl₃) δ 1.39 (t, 3H), 2.36 (s, 3H), 4.37 (q, 2H), 5.83 (s, 2H), 6.83 (d, 1H), 6.90 (d, 1H), 7.08 dd, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.42 (d, 1H), 7.50 (t, 1H); M/z 424 (MH⁺).

Etil N-(3-cloro-4-trifluorometilbencil)-5-acetoxiindolo-2-carboxilato

55% de obtenido. NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H) 2.3 (s, 3H) 4.3 (q, 2H) 5.8 (s, 2H), 6.95 (d, 1H), 7.1 (dd, 2H), 7.2 (m, 2H), 7.4 (s, 1H), 7.45 (d, 1H) 7.55 (d, 1H); m/z 440/422 (M+H⁺).

Etil N-(3-bromo-4-clorobencil)-5-acetoxiindolo-2-carboxilato

15% de obtenido. NMR (CDCl₃) δ 1.37 (t, 3H), 2.30 (s, 3H), 4.31 (q, 2H), 5.74 (s, 2H), 6.83 (d, 1H), 7.03 (dd, 1H), 7.24 (m, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.40 (d, 1H). m/z 449 (MH⁺).

Etil N-(3-fluoro-4-bromobencil)-5-acetoxiindolo-2-carboxilato

77% de obtenido. NMR (CDCl₃) δ 1.37 (t, 3H), 2.30 (s, 3H), 4.37 (q, 2H), 5.77 (s, 2H), 6.72 (d, 1H), 6.74 (d, 1H), 7.03 (dd, 1H), 7.23 (m, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.40 (t, 1H).

Etil N-(3-bromo-4-fluorobencil)-5-acetoxiindolo-2-carboxilato

41% de obtenido. NMR (CDCl₃) δ 1.40 (t, 3H), 2.34 (s, 3H), 4.37 (q, 2H), 5.72 (s, 2H), 6.95 (dd, 1H), 7.05 (dd, 1H), 7.23 (m, 2H), 7.37 (s, 1H), 7.40 (d, 1H), 7.62 (d, 1H); m/z 433 (MH⁺).

Método B

Metil-N-(3-trifluorometil-4-fluorobencil)-4-fluoro-5-hidroxiindolo-2-carboxilato

(i) 2-Fluoro-3-benciloxibenzaldehido

2-Fluoro-3-hidroxibenzaldehido (16,49 g) se disolvió en dimetil-formamida (200 ml) y se agitó bajo una atmósfera de argón. Hidrido de sodio se agregó (60% en aceite mineral, 5,18 g) y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Se agregó bromuro de bencil (16,8 ml) y la mezcla se agitó durante la noche. La mezcla de la reacción se concentró en vacío y el residuo resultante se fraccionó entre éter dietilo (200 ml) y agua (200 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (400 ml), se secaron (MgSO₄) y se concentraron en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de destello de columna, utilizando un gradiente de 0 a 10% de acetato de etilo/isohexano como levigado para dar el producto

141. ~~141~~

deseado como un sólido amarillo (18,41 g, 68%): ^1H NMR (CD_3SOCD_3) δ 5.20 (s, 2H), 7.2-7.6 (m, 8H), 10.21 (s, 1H)

(ii) Metil-2-azido-3-(2-fluoro-3-benciloxifenil)propenoato

Una mezcla de metilazidoacetato (36,64 g) y 2-Fluoro-3-benciloxibenzaldehído (18,32 g) en metanol (250 ml) se agregó gota a gota, con agitación, durante 1 hora a una mezcla de metóxido de sodio (17,20 g) en metanol (100 ml) a -25°C bajo una corriente de argón. La mezcla se dejó agitar durante 20 minutos, se dejó tibiar a 5°C y se agitó durante la noche. El precipitado resultante se filtró, se lavó entonces secuencialmente con metanol frío, se diluye la solución de ácido acético en agua y agua. El sólido resultante se secó bajo vacío para dar el producto como un sólido castaño pálido (16,70 g) el cual se utilizó sin purificación.

(iii) Metil-4-fluoro-5-benciloxiindolo-2-carboxilato

Una solución de metil-2-azido-3-(2-fluoro-3-benciloxifenil)propenoato (16,7 g) en xileno (600 ml) se agregó gota a gota con agitación a xileno en reflujo (2,4 L) durante 1 hora y luego se agitó durante 20 minutos adicionales. La mezcla de la reacción se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía de destello de columna, utilizando un gradiente de 0 a 100% de acetato de etilo/isohexano como levigado para dar el producto como un sólido amarillo (12,93 g, 54 %). ^1H NMR (CD_3SOCD_3) δ 3.85 (s, 3H), 5.15 (s, 2H), 7.05-7.45 (m, 8H), 12.06 (s, 1H); m/z 300.4 (MH $^+$)

En una forma similar, los pasos (ii) y (iii) se repitieron, pero utilizando 2-cloro-3-metoxibenzaldehído y etil azido acetato se preparó

Etil-4-cloro-5-metoxiindolo-2-carboxilato

^1H NMR (CD_3SOCD_3) δ 1.31 (t, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.32 (q, 2H), 7.0 (d, 1H), 7.22 (d, 1H), 7.39 (d, 1H), 12.2 (bs, 1H).

(iv) Metil-N-(3-trifluorometil-4-fluorobencil)-4-fluoro-5-benciloxiindolo-2-carboxilato

Hidrido de sodio (60% en aceite mineral, 75 mg) se agregó a una solución de metil-4-fluoro-5-benciloxiindolo-2-carboxilato (257 mg) en dimetilformamida (10 ml) se enfrió a 5°C y la mezcla se agitó bajo una atmósfera de argón durante 30 minutos. 3-Trifluorometil-4-fluorobencil cloruro (280 mg) se agregó y la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y luego se agitó durante 4 horas. La mezcla de la reacción se fraccionó entre acetato de etilo y agua. Los extractos orgánicos se lavaron con agua, se secaron (MgSO_4), se concentraron en vacío y se purificaron mediante cromatografía de columna de destello, utilizando isohexano seguido por 5% acetato de etilo/isohexano como levigado, para dar el

142
35
~~142~~
~~142~~

producto deseado (140 mg, 34%). ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.9 (s, 3H), 5.15 (s, 2H), 5.75 (s, 2H), 6.9-7.2 (m, 4H), 7.3-7.5 (m, 7H); m/z 476 ($\text{M}+\text{H}^+$)

En una forma similar pero utilizando el apropiado indolo y bencil haluro se preparó:

Etil-N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-4-cloro-5-metoxiindolo-2-carboxilato

82% de obtenido. NMR (CDCl_3) δ 1.4 (t, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.35 (q, 2H), 5.8 (s, 2H), 7.0-7.2 (m, 3H), 7.3-7.5 (m, 3H).

(v) Metil-N-(3-trifluorometil-4-fluorobencil)-4-fluoro-5-hidroxiindolo-2-carboxilato

Una mezcla de metil-N-(3-trifluorometil-4-fluorobencil)-4-fluoro-5-benciloxiindolo-2-carboxilato (140 mg) y 5% Pd/C (50 mg) en acetato de etilo (10 ml) se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante 5 horas, se filtró a través de celita, se concentró en vacío y se purificó mediante cromatografía de destello de columna utilizando un gradiente de 10 a 25% de acetato de etilo/isohexano como levigado para dar el producto deseado (60 mg, 53%). ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.9 (s, 3H), 4.9 (d, 1H), 5.8 (s, 2H), 6.9-7.2 (m, 4H), 7.4 (m, 2H); m/z 384 ($\text{M}-\text{H}^+$)

En una forma similar pero utilizando el apropiado bencil haluro se preparó:

Metil-N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-4-fluoro-5-hidroxiindolo-2-carboxilato

89% de obtenido. NMR (CD_3SOCD_3) δ 3.80 (s, 3H), 5.92 (s, 2H), 7.05 (t, 1H), 7.11 (dd, 1H), 7.22 (m, 2H), 7.60 (m, 2H), 9.37 (s, 1H); m/z 401 (MH^+).

En una forma similar pero iniciando a partir de 2,4-difluoro-3-hidroxibenzaldehído se preparó

Etil N-(3-trifluorometil-4-fluorobencil)-4,6-difluoro-5-hidroxiindolo-2-carboxilato

^1H NMR (CD_3SOCD_3) δ 3.80 (s, 3H), 5.80 (s, 2H), 7.20-7.60 (m, 5H), 9.70 (s, 1H); M/z 402.2 ($\text{M}-\text{H}^+$)

Etil-N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-4-cloro-5-hidroxiindolo-2-carboxilato se preparó a partir de etil-N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-4-cloro-5-metoxiindolo-2-carboxilato utilizando el método como se describe en E(iv). 42% de obtenido. ^1H NMR (CD_3SOCD_3) δ 1.39 (t, 3H), 4.32 (q, 2H), 5.37 (s, 1H), 5.79 (s, 2H), 6.99-7.11 (m, 3H), 7.31-7.39 (m, 2H), 7.47 (d, 1H); m/z 430, 432 ($\text{M}-\text{H}^+$)

Método C

Etil 5-acetoxi-3-bromoindolo-2-carboxilato

143
143
143

N-Bromosuccinimida (0,14 g) se agregó a una solución agitada de etil 5-acetoxiindolo-2-carboxilato (0,2 g) en DMF (3,0 ml). La reacción se agitó durante 4 horas, entonces se vertió dentro de agua. El precipitado resultante se filtró y se secó en vacío para dar el compuesto titulado como un polvo blanco (0,23 g, 87 %). NMR 1.38 (t, 3H), 2.23 (s, 3H), 4.38 (q, 2H), 7.10 (dd, 1H), 7.23 (d, 1H), 7.50 (d, 1H), 12.28 (bs, 1H); m/z 326 (M^+).

Método C2

Etil 5-acetoxi-3-cloroindolo-2-carboxilato

Una solución de etil 5-acetoxiindolo-2-carboxilato (500 mg) en diclorometano (10 ml) se agitó a temperatura ambiente en presencia de N-clorosuccinimida (297 mg) y carbonato de potasio (279 mg) durante la noche.. El precipitado resultante se recogió mediante filtración, se lavó con diclorometano frío seguido por agua y se secó bajo vacío durante la noche para dar el producto deseado como un polvo blanco (425 mg, 75%). NMR: 1.35 (t, 3H), 2.25 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 7.1 (d, 1H), 7.3 (s, 1H), 7.5 (d, 1H), 12.2 (s, 1H); m/z 281.9 (MH^+).

Método C 3

Etil 5-acetoxi-3-iodoindolo-2-carboxilato

Una solución de etil 5-acetoxiindolo-2-carboxilato (1 g) en dimetilformamida (2 ml) se agitó a temperatura ambiente en presencia de carbonato de potasio (1,12 g) e yodo (1,029 g) durante 18 horas. La reacción se diluyó con agua (30 ml) y el sólido resultante se filtró, se lavó con agua y se secó para dar el producto deseado 1.32g, 87%). NMR: δ (CD_3SOCD_3) 1.4 (t, 3H), 4.4 (q, 2H), 7.1 (d, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.45 (d, 1H), 12.3 (s, 1H); M/z 372($M-H^+$)

Etil N-(3-fluoro-4-trifluorometilbencil)-5-acetoxi-3-iodoindolo-2-carboxilato

A una solución de etil 5-acetoxi-3-iodoindolo-2-carboxilato (400 mg) en dimetilformamida (15 ml) se agregó carbonato de potasio (340 mg), yoduro tetrabutil amonio (10 mg) y 4-fluoro-3-trifluorometilbencil bromuro (330 mg). La mezcla se agitó durante 18 horas. La mezcla se diluyó con agua (10 ml) y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se secaron, concentraron y purificaron mediante cromatografía de columna utilizando 5% de acetato de etilo/isohexano as el levigado para dar el producto deseado (520 mg, 89%). NMR (CD_3SOCD_3): δ 1.3 (t, 3H), 2.25 (s, 3H), 4.3 (q, 2H), 5.85 (s, 2H), 7.2 (m, 3H), 7.4 (m, 1H), 7.8 (m, 2H); M/z 550 (MH^+)

En una forma similar pero utilizando el apropiado etil 5-acetoxi-3-haloindolo-2-carboxilato y bencil haluro se prepararon:-

104
37
2114
1004
1004

Etil N-(3-fluoro-4-trifluorometilbencil)-5-acetoxi-3-cloroindolo-2-carboxilato

70% de obtenido. 458.1 (MH⁺)

Etil N-(3-trifluorometil-4-fluorobencil)-5-acetoxi-3-bromoindolo-2-carboxilato

96% de obtenido.

NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 2.3 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 7.0-7.2 (m, 3H), 7.3 (m, 1H), 7.4 (m, 2H); m/z 502/504 (MH⁺).

Etil N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-acetoxi-3-bromoindolo-2-carboxilato

79% de obtenido. NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 2.35 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 5.8 (s, 2H), 7.05 (d, 1H), 7.1 (dd, 1H), 7.3 (m, 1H), 7.4 (d, 1H), 7.5 (m, 1H), 7.6 (s, 1H); m/z 518/520 (MH⁺)

Etil N-(3-cloro-4-trifluorometilbencil)-5-acetoxi-3-bromoindolo-2-carboxilato

63% de obtenido. NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 2.35 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 5.8 (s, 2H), 6.95 (d, 1H), 7.1 (dd, 1H), 7.25 (m, 2H), 7.5 (m, 1H), 7.6 (d, 1H); m/z 518/520 (MH⁺).

Método D

Etil N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-3-metoxi-5-hidroxiindolo-2-

Carboxilato Etil 5-acetoxiindolo-2-carboxilato

Una mezcla de etil 3-benciloxiindolo-2-carboxilato (10 g), ciclohexeno (50 ml) y 10% de paladio sobre carbono (2g) en acetato de etilo (500 ml) se sometió a reflujo durante 4 horas. La mezcla se enfrió y filtró a través de Celita. Anhídrido acético (5 ml) y N-dimetilaminopiridina (0,1 g) se agregó y 30 la mezcla se sometió a reflujo durante 15 minutos. La mezcla se enfrió y etanol se agregó para destruir el exceso de anhídrido acético. La mezcla se concentró y el residuo se recrystalizó a partir de acetato de etilo/isohexano para dar el producto deseado como agujas blancas (6,44 g, 77 %) NMR

(CD₃SOCD₃) δ 1.33 (t, 3H), 2.23 (s, 3H), 4.32 (q, 2H), 7.0 (dd, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.38 (d, 1H), 7.42 (d, 1H), 11.93 (bs, 1H); m/z (M-H⁺)

ii) Etil 5-acetoxi-diazoindolo-2-carboxilato

A una solución de etil 5-acetoxiindolo-2-carboxilato (5 g) se agregó nitrito de sodio (20 g) seguido gota a gota por ácido acético glacial (20 ml). Después de alrededor de media adición, se levigaron fumantes castaños. La mezcla se enfrió a -10 °C y el resto del ácido acético se agregó. La mezcla se dejó agitar durante 18 horas. Una cantidad adicional de nitrito de sodio (10 g) y ácido acético (10 ml) se agregó y la mezcla

145
38
17.0
10.8
6

resultante se agitó durante 18 horas. La mezcla se fraccionó entre acetato de etilo y agua. Los extractos orgánicos se separaron, secaron y concentraron a bajo volumen. Hexano se agregó y el sólido resultante se filtró para dar el producto deseado (5.2g, 94%).

NMR (CDCl₃) δ 0.8 (t, 3H), 4.5 (q, 2H), 7.1 (dd, 1H), 7.4 (d, 1H), 8.0 (d, 1H); m/z 273 (M+H⁺)

(iii) Etil 3-metoxi-5-acetoxiindolo-2-carboxilato

A una solución de etil 5-acetoxi-diazoindolo-2-carboxilato (4,6 g) en 1,2 dicloroetano se agregó metanol (10 ml), seguido por una cantidad catalítica de dímero de acetato de rodio (II) y la mezcla resultante se sometió a reflujo durante 18 horas. La mezcla se concentró y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía de columna utilizando 20% de etil acetato/isohexano como levigado para el producto deseado, el cual se purificó adicionalmente mediante titulación con éter dietilo (2,34g, 50%). NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 2.3 (s, 3H), 4.05 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 7.05 (dd, 1H), 7.2-7.25 (m, 2H), 7.45 (d, 1H), 8.4 (bs, 1H); m/z 278.4 (M+H⁺).

Método E

Etil N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-hidroxi-6-cloroindolo-2-carboxilato

(i) Etil 2-acetil-2-(N'-(3-cloro-4-metoxifenil)hidrazina)propionato

HCl etéreo (60 ml) se agregó a una solución de 3-cloro-p-anisidina en acetato de etilo (300 ml) para precipitar la sal, la cual se aisló mediante filtración y se secó al aire. La sal (18,5 g) se suspendió en 1,5 N HCl (230 ml) a -5°C bajo argón. Una solución de nitrito de sodio (6,9 g) en agua (50 ml) se agregó durante 15 minutos para formar una solución/precipitado, la cual se agitó a -5°C durante 1 hora adicional. (solución A)

Una solución de hidróxido de sodio (5,36 g) en agua (10 ml) se agregó a una solución de etil-2-metilacetoacetato (13,5 ml) en etanol (80 ml) a 5 °C. La reacción se agitó a 5°C durante 1 hora adicional y el pH se ajustó entonces a 4 mediante la adición de acetato de sodio (20 g). (solución B)

La Solución B se agregó a la Solución A a -5°C y la mezcla se dejó tibia a temperatura ambiente durante 3 horas antes del fraccionamiento entre agua (250 ml) y acetato de etilo (250 ml). La fase orgánica se secó (MgSO₄), se concentró bajo vacío y se purificó mediante cromatografía de columna utilizando 15% de acetato de etilo/isohexano como levigado para lograr el producto deseado (7 g, 21%); NMR (CDCl₃) δ 1.24 (t, 3H), 1.63 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 4.22-4.35 (m, 2H), 7.02 (d, 1H), 7.72 (dd, 1H), 7.83 (d, 1H) m/z 270(M-CH₃COH)⁺

146 ~~147~~ ~~148~~ ~~149~~ ~~150~~
~~30~~
~~6~~ ~~7~~ ~~8~~ ~~9~~ ~~10~~
~~0~~

Etil 5-metoxi-6-cloroindolo-2-carboxilato se alquilató con 3-trifluorometil-4-clorobencil bromuro utilizando la metodología descrita en Método A(iii) para dar el producto deseado (650 mg, 64%);.NMR (CDC13) δ 1.36 (t, 3H), 3.93 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 7.01 (dd, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.35 (d, 1H), 7.43 (d, 1H)

147
7/8/89

En una forma similar utilizando el indolo apropiado y bencil haluro se prepararon:

Etil N-(3-trifluorometil-4-fluorobencil)-5-metoxi-6-cloroindolo-2-carboxilato

NMR (CD_3SOCD_3) δ 1.25 (t, 3H), 3.9 (s, 3H), 4.3 (q, 2H), 5.85 (s, 2H), 7.1-7.4 (m, 4H), 7.55 (d, 1H), 7.9 (s, 1H).

Etil N-(3,4-diclorobencil)-5-metoxi-6-fluoroindolo-2-carboxilato

NMR (CD_3SOCD_3) δ 1.25 (t, 3H), 3.8 (s, 3H), 4.2 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 6.9 (d, 1H), 7.3-7.4 (m, 3H), 7.5 (d, 1H), 7.6 (d, 1H)

Etil N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-metoxi-6-fluoroindolo-2-carboxilato

NMR (CD_3SOCD_3) δ 1.36 (t, 3H), 3.92 (s, 3H), 4.31 (q, 2H), 5.72 (s, 2H), 6.95-7.05 (m, 2H), 7.15 (d, 1H), 7.3 (s, 1H), 7.36 (d, 1H), 7.43 (s, 1H).

Etil N-(3,4-diclorobencil)-5-metoxi-4,6-dicloroindolo-2-carboxilato

NMR (CDCl_3) δ 1.39 (t, 3H), 3.91 (s, 3H), 4.33 (q, 2H), 5.7 (s, 2H), 6.82 (dd, 1H), 7.11 (d, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.34 (d, 1H), 7.42 (s, 1H)

Etil N-(3-trifluorometil-4-diclorobencil)-5-metoxi-4,6-dicloroindolo-2-carboxilato

NMR (CDCl_3) δ 1.4 (t, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.35 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 7.0 (dd, 1H), 7.25-7.5 (m, 4H).

Etil N-(3,4-diclorobencil)-5-metoxi-6-cloroindolo-2-carboxilato

NMR (CDCl_3) δ 1.36 (t, 3H), 3.94 (s, 3H), 4.31 (q, 2H), 5.69 (s, 2H), 6.82 (dd, 1H), 7.09 (d, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.24-7.35 (m, 3H); m/z 414 (MH^+)

Etil N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-hidroxi-6-cloroindolo-2-carboxilato

Una mezcla de etil N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-metoxi-6-cloroindolo-2-carboxilato (650 mg) y trimetilsililioduro (0,8 ml) en cloroformo (50 ml) se agitó a 50°C durante 18 horas. Adicionales alícuotas de trimetilsililioduro se agregaron hasta que no permaneció material de partida y la reacción se vertió entonces en metanol (100 ml). La mezcla se concentró bajo vacío y se purificó mediante cromatografía de columna utilizando 15% de acetato de etilo/isohexano como el levigado para lograr el producto deseado como un sólido blanco (276 mg, 44%); NMR (CDCl_3) δ 1.36 (t, 3H), 4.31 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 7.0 (dd, 1H), 7.24-7.51 (m, 3H), 7.38 (d, 1H), 7.44 (d, 1H)

148 + 18 = 166
✓

En una forma similar, pero utilizando etil N-(3-trifluorometil-4-fluorobencil)-5-metoxi-6-cloroindolo-2-carboxilato o etil N-(3,4-diclorobencil)-5-metoxi-6-fluoroindolo-2-carboxilato o etil N-(3,4-diclorobencil)-5-metoxi-4,6-dicloroindolo-2-carboxilato o etil N-(3,4-diclorobencil)-5-metoxi-6-cloroindolo-2-carboxilato o etil N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-metoxi-6-fluoroindolo-2-carboxilato o etil N-(3-trifluorometil-4-diclorobencil)-5-metoxi-4,6-dicloroindolo-2-carboxilato se prepararon:

Etil N-(3-trifluorometil-4-fluorobencil)-5-hidroxi-6-cloroindolo-2-carboxilato

53% de obtenido. NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.25 (t, 3H), 4.25 (q, 2H), 5.85 (s, 2H), 7.1-7.25 (m, 3H), 7.4 (t, 1H), 7.5 (d, 1H), 7.8 (s, 1H), 9.8 (s, 1H); m/z 414 (M-H⁺)

Etil N-(3,4-diclorobencil)-5-hidroxi-6-fluoroindolo-2-carboxilato

31 % de obtenido. NMR (CDC13) δ 1.4 (t, 3H), 4.3 (q, 2H), 5.7 (s, 2H), 6.8 (dd, 1H), 7.0 (d, 1H), 7.1-7.3 (m, 2H); m/z 380 (M-H)

Etil N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-hidroxi-6-fluoroindolo-2-carboxilato

26% de obtenido. NMR (CDC13) δ 1.35 (t, 3H), 4.31 (q, 2H), 4.98 (bd, 1H), 5.72 (s, 2H), 6.96 (d, 1H), 7.01 (dd, 1H), 7.23-7.3 (m, 2H), 7.37 (d, 1H), 7.44 (s, 1H); M/z 414, 416 (M-H⁺).

Etil N-(3,4-diclorobencil)-5-hidroxi-4,6-dicloroindolo-2-carboxilato

69% de obtenido. NMR (CDC13) δ 1.39 (t, 3H), 4.34 (q, 2H), 5.65 (bs, 1H), 7.7 (s, 2H), 6.82 (dd, 1H), 7.1 (d, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.33 (d, 1H), 7.35 (s, 1H); m/z 436, 434, 432, 430 (M-H⁺)

Etil N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-hidroxi-4,6-dicloroindolo-2-carboxilato

80% de obtenido. NMR (CDC13) δ 1.39 (t, 3H), 4.36 (q, 2H), 5.66 (s, 1H), 5.75 (s, 2H), 7.0 (dd, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.35-7.41 (m, 2H), 7.43 (d, 1H); 466, 468 (M-H⁺)

Etil N-(3,4-diclorobencil)-5-hidroxi-6-cloroindolo-2-carboxilato

37% de obtenido. m/z 398 (M-H⁺)

Método E2

Etil N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-acetoxi-6-bromoindolo-2-carboxilato

149 ~~150~~ ~~151~~

(i) Etil-5-metoxi-6-bromoindolo-2-carboxilato

150
27690
27690

Ejemplo 27

Composiciones Farmacéuticas

Este Ejemplo ilustra, pero no pretende limitar, formas de dosificación farmacéutica representativas de la invención como se define aquí (el ingrediente activo denominado "Compuesto X"), para uso terapéutico o profiláctico en humanos:

(a)

Tableta I	mg/tableta
Compuesto X.	100
Lactosa Ph.Eur	182,75
Croscarmelosa de sodio	12,0
Pasta de almidón de maíz (5% p/v pasta)	2,25
Estearato de Magnesio	3,0

(b)

Tableta II	mg/tableta
Compuesto X	50
Lactosa Ph.Eur	223,75
Croscarmelosa de sodio	6,0
Almidón de Maíz	15,0
Polivinilpirrolidona (5% p/v pasta)	2,25
Estearato de Magnesio	3,0

(c)

Tableta III	mg/tableta
Compuesto X	1,0
Lactosa Ph.Eur	93,25
Croscarmelosa de sodio	4,0
Pasta de almidón de maíz (5% p/v pasta)	0,75
Estearato de magnesio	1,0

(d)

Cápsula	mg/cápsula
Compuesto X	10
Lactosa Ph.Eur	488,5
Magnesio	1,5

(e)

Inyección I	
Compuesto X	5,0% p/v
1M de solución de Hidróxido de sodio	15,0% v/v

151

0,1 M Ácido clorhídrico	para ajustar pH a 7,6
Polietilenglicol 400	4,5% p/v
Agua para inyección	a 100%

(f)

Inyección II	
Compuesto X	1,0% p/v
Fosfato de Sodio BP	3,6% p/v
0,1 M de solución de Hidróxido de sodio	15,0% v/v
Agua para inyección	a 100%

(g)

Inyección III	(1 mg/ml, amortiguado a pH 6)
Compuesto X	0,1% p/v
Fosfato de sodio BP	2,26% p/v
Ácido cítrico	0,38% p/v
Polietilenglicol 400	3,5% p/v
Agua para inyección	a 100%

(h)

Aerosol I	Mg/ml
Compuesto X	10,0
Sorbitan trioleato	13,5
Triclorofluorometano	910,0
Diclorodifluorometano	490,0

(i)

Aerosol II	mg/ml
Compuesto X	0,2
Sorbitan trioleato	0,27
Triclorofluorometano	70,0
Diclorodifluorometano	280,0
Diclorotetrafluoroetano	1 094,0

(j)

Aerosol III	mg/ml
Compuesto X	2,5
Sorbitan trioleato	3,38
Triclorofluorometano	67,5
Diclorodifluorometano	1 086,0
Diclorotetrafluoroetano	191,6

(k)

152
X
106
X

Aerosol IV	mg/ml
Compuesto X	2,5
Lecitina de soya	2,7
Triclorofluorometano	67,5
Diclorodifluorometano	1 086,0
Diclorotetrafluoroetano	191,6

(I)

Ungüento	ml
Compuesto X	40 mg
Etanol	300 µl
Agua	300 µl
I-Dodecilazacicloheptan-2-ona	50 µl
Propilenglicol	a 1 ml

Nota:

El Compuesto X en las formulaciones anteriores puede comprender un compuesto tal como se ilustra en los Ejemplos presentes.

Las anteriores formulaciones pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales bien conocidos en el arte farmacéutico. Las tabletas (a)-(c) pueden revestirse entéricamente mediante medios convencionales, por ejemplo para proporcionar un revestimiento de ftalato de acetato de celulosa. Las formulaciones en aerosol (h)-(k) pueden utilizarse en conjunción con dispensadores estándares, de dosis medida, y los agentes de suspensión trioleato de sorbitan y lecitina de soya pueden remplazarse por un agente de suspensión alternativo tal como monooleato de sorbitan, sesquioleato de sorbitan, polisorbato 80, oleato de poliglicerol o ácido oleico.

**ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA DEL DOCUMENTO ANEXO
TERMINADA ESTE 2 DE JUNIO, 2001.**

**POWER WITH ASSIGNMENT
COLOMBIA**

The undersigned

ALAN WELLINGTON FAULL
JASON GRANT KETTLE

residing at

Alderley Park, Macclesfield, Cheshire, SK10 4TG, UK

hereby appoint

RAMIRO CASTRO and HECTOR GOMEZ
Carrera 7 No 16-56 Pisos 9 & 10
Apartado Aereo 3692
Bogota, COLOMBIA

as attorney/s with special and sufficient powers to apply for and obtain from the competent national offices and authorities of COLOMBIA a Letters Patent for

CHEMICAL COMPOUNDS

to be issued in the name of

AstraZeneca AB

of

S-151 85, Sodertalje, Sweden

to whom assignment has been made of all right and title to the said invention for the territory of COLOMBIA foresaid, without any restriction whatever. The assignee/s also sign these presents in token of acceptance of the said assignment and hereby authorise the said attorney/s to take all necessary steps before the said offices and authorities for the purposes above stated; to make petitions, declarations and claims; to draw and sign specifications, amendments and appeals; to pay all fees and instalments and to make all payments required by law and withdraw the same if necessary; to receive all documents and securities giving proper receipts therefor; to desist and to fulfill all other requisites and, finally, to use, all means which said attorney/s shall deem proper for the safeguard of the interests of the constituents, who hereby ratify and confirm all and whatsoever the said attorney/s shall lawfully do by virtue of these presents, with full powers of substitution and revocation.

IRAGO NAVARRO ALVAREZ
TRANSLATOR E INTERPRETE OFICIAL
BOG. 1078 Bogotá D.C.

154
504
2134
7

Assignee/s

Joanne Marshall
JOANNE MARGARET MARSHALL
AUTHORISED OFFICER - ASTRAZENECA AB

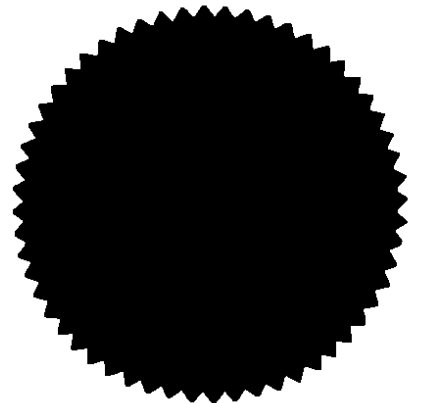
Assignor/s

Alan Wellington Faulk
ALAN WELLINGTON FAULK

Jason Grant Kettle
JASON GRANT KETTLE

LB / H. A. J.
NOTARY PUBLIC

ALVARO ALVAREZ
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
IN A. A. 20. 10. 1988



UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND**No. D650782****Date 15 December, 2000**

**This document bears
the signature / seal of J B Hodgson**

Acting in the capacity of Notary Public



Signed by: J. M. A. Mason

***For Her Majesty's Principal Secretary of State
For Foreign and Commonwealth Affairs***

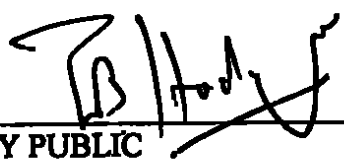
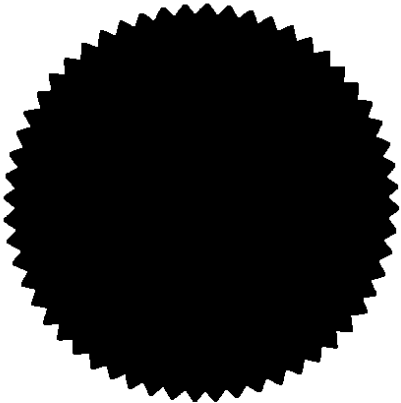
156
AS

NOTARIAL CERTIFICATION

- (1) I, a Notary Public, certify that
(2) on the 24th day of November 2000
before me personally appeared
(3) ALAN WELLINGTON FAULL
JASON GRANT KETTLE
to me known and known to me to
be of legal capacity and
acknowledged their signatures
appearing on the foregoing
instrument and ratified the same.

I attest.

- (4) Signed in: Macclesfield, Cheshire, England.
(5) Dated on: 24th November 2000


NOTARY PUBLIC

HUGO NAVARRO ALVAREZ
INTERPRETE OFICIAL
1990

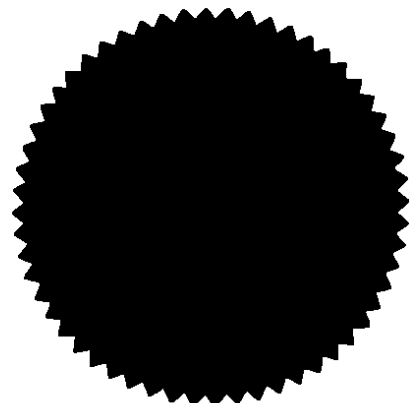
157
[Handwritten signature]

NOTARIAL CERTIFICATION

- I certify that Mr.(Messrs.)
- (1) JOANNE MARGARET MARSHALL
who signed the foregoing
instrument on behalf of
 - (2) ASTRAZENECA AB
a corporation duly organized and
legally existing under the laws
 - (3) of the State of Sweden
 - (4) domiciled at Sweden
is(are) its legitimate
 - (5) Attorney
in accordance with the appointment
issued in the City of
 - (6) Sodertalje, Sweden
 - (7) On 3rd January 2000
by the Board of Directors of
said corporation, which appointment
I have seen.
- I further certify that said
individual(s) is(are) duly
authorized to sign the foregoing
instrument in the name of said
Corporation in accordance with
his(their) above-mentioned
position(s)
- I finally certify that the
purposes for which said
instrument is granted are within
the scope of the object or
activities of said corporation,
in accordance with the Act of
Incorporation
- (8) issued in the City of Sodertalje
 - (9) and dated 31st October 1913
which both I have seen.
- I attest.
- (10) Signed in: Macclesfield, Cheshire
 - (11) Dated on: 11 December 2000

 NOTARY PUBLIC

[Handwritten signature]

 HUGO NAVARRO ALVAREZ
 TRANSLATOR & INTERPRETE OFFICIAL
 1214 Municipalidad


159
2690
28

TRADUCCION OFICIAL No. 32/2001 de un Poder con Cesión otorgado por ALAN WELLINGTON FAULL, y JASON GRANT KETTLE, residentes en Alderley Park, Macclesfield, Cheschire, SK10 4TG, RU al doctor RAMIRO CASTRO y HECTOR GOMEZ, de Carrera 7 No. 16-56 Pisos 9 & 10, Apartado Aéreo 3692, Bogotá, Colombia, con Cesión a AstraZeneca AB de 15 S-151 85 Sodertalje, Suecia de la Invención titulada COMPUESTOS QUIMICOS, del Inglés al español, el cual para su identificación se sella con el Sello del Traductor al mismo tiempo que la presente.-

+++++
ANEXOS: El Poder con Cesión arriba mencionado, Certificaciones Notariales, Certificaciones por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad Para los Asuntos de la Comunidad y el Extranjero en Londres, Inglaterra, Certificaciones del Consulado General de Colombia en Londres, Inglaterra, Autenticaciones por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.-
+++++

PHM. 70637/CO

**PODER CON CESION
COLOMBIA**

**Los suscritos
ALAN WELLINGTON FAULL
JASON GRANT KETTLE
residentes en
Alderley Park, Macclesfield, Cheschire, SK10 4TG, RU**

**por medio del presente nombran a
RAMIRO CASTRO y HECTOR GOMEZ
Carrera 7 No. 16-56 Pisos 9 & 10
Apartado Aéreo 3692
Bogotá, COLOMBIA**

**HUGO NAVARRO ALVAREZ
TRADUCTOR E. INTERPRETE OFICIAL
Ene. 2020 Matriculado 1998**

160
2694
X 759

como abogado/s con poderes especiales y suficientes para solicitar para y obtener de las oficinas y autoridades nacionales competentes de COLOMBIA unos Títulos de Patente para

COMPUESTOS QUIMICOS

para ser expedidos en el nombre de:

AstraZeneca AB

de:

S-151 85 Sodertälje, Suecia

a quien esta cesión ha sido hecha de todo derecho y título a la dicha invención para el territorio de COLOMBIA anteriormente mencionado, sin ninguna restricción cualquiera que sea. La cesionaria/s también firma estas presentes en prueba de aceptación de la dicha cesión y por medio del presente autoriza al dicho abogado/s para tomar todos los pasos necesarios ante las dichas oficinas y autoridades para los propósitos arriba declarados; para hacer peticiones, declaraciones y reclamos; para hacer y firmar especificaciones, enmiendas y apelaciones; pagar todos los honorarios e instalaciones y hacer todos los pagos requeridos por la ley y retirar los mismos si es necesario; recibir todos los documentos y valores dando recibos apropiados por éstos; asistir y llenar todos los otros requisitos y, finalmente, usar, todos los medios los cuales dicho abogado/s consideren apropiados para la salvaguarda de los intereses de los constituyentes, quienes por medio del presente ratifican y confirman toda y cualquier cosa que dicho abogado/s legalmente hiciere por virtud de estas presentes, con plenos poderes de sustitución y revocación.

Cesionaria/s

Firma ilegible (Firmado)

JOANNE MARGARET MARSHALL

FUNCIONARIO AUTORIZADO - ASTRAZENECA AB

HUGO NAVARRO ALVAREZ
TRADUCTOR E. INTERPRETE OFICIAL
Exp. 2076 N° 104 de 1988

161 008
16

Cedente/s

Firma ilegible (Firmado)

ALAN WELLINGTON FAULL

Firma ilegible (Firmado)

JASON GRANT KETTLE

Firma ilegible (Firmado)

NOTARIO PUBLICO

SELLO NOTARIAL EN RELIEVE.

+++++

REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

No. D650782

Fecha...15 de Diciembre del año 2000.....

Este documento porta

la firma/sello de J. B. Hodgson

.....

actuando en la capacidad

Notario Público

.....

Firmado por: J. M. A. Mason

Firma ilegible (firmado)

**Por el Secretario de Estado Principal de
Su Majestad para los Asuntos de la
Comunidad y el Extranjero.**

SELLO EN RELIEVE.

HAY SELLO DE LA COMUNIDAD

Y EL EXTRANJERO EN LONDRES,

INGLATERRA.

+++++

HUGO NAVARRO ALVAREZ
TRADUCTOR E. INTERPRETE OFICIAL
Reg: 2076 Ministerio 1998

162
7/28/01
J. J. J.**CERTIFICACION NOTARIAL**

- (1) Yo, un Notario Público, certifico que
- (2) En el día 24 de Noviembre del año 2000 ante mí personalmente compareció
- (3) ALAN WELLINGTON FAULL, y JASON GRANT KETTLE a quienES conozcoS y me son conocidos como de capacidad legal y reconocieron sus firmas que aparece en el instrumento anterior y ratificaron las mismas.
Atesto.
- (4) Firmado en: Macclesfield, Cheschire, Inglaterra
- (5) Fechado en: 24 de Noviembre del año 2000.

Firma ilegible (Firmado)

NOTARIO PUBLICO

HAY UN SELLO QUE DICE:

MARIE M. GRELOCH

NOTARIO PUBLICO DE DELAWARE

NOMBRADO EL 22 DE JULIO DE 1999

TERMINO DE 2 AÑOS

SELLO NOTARIAL EN RELIEVE.

+++++

CERTIFICACION NOTARIAL

Certifico que el Sr.(Sra)

- (1) JOANNE MARGARET MARSHALL
quien firmó el instrumento anterior a
nombre de


HUGO NAVARRO ALVAREZ
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 Dec. 1876 Minjército 1998

163
202
162

- (2) **ASTRAZENECA AB una compañía debidamente organizada y legalmente existente bajo las leyes**
- (3) **del Estado de Suecia**
- (4) **domiciliada en Suecia**
- es(son) su legítimo**
- (5) **Abogado**
- de acuerdo con el nombramiento expedido en la Ciudad de**
- (6) **Södertälje, Suecia**
- (7) **En Enero 3 del año 2000 por la Junta Directiva de dicha Compañía, cuyo nombramiento he visto. Además certifico que dicho individuo(s) está(están) debidamente autorizado para firmar el instrumento anterior en el nombre de dicha Compañía de acuerdo con su(sus) posición(es) arriba mencionada.**
- Finalmente certifico que el propósito para el cual dicho instrumento está otorgado está dentro del alcance del objeto o actividades de dicha compañía, de acuerdo con la Ley de Incorporación.**
- (8) **expedido en la ciudad de Södertälje**
- (9) **y fechada el 31 de Octubre de 1913, las cuales ambas he visto.**
- Atesto**
- (10) **Firmado en: Macclesfield, Cheshire**
- (11) **fechado en: Diciembre 11 del año 2000**

Firma ilegible (Firmado)

NOTARIO PUBLICO

SELLO NOTARIAL EN RELIEVE.


HUGO NAVARRO ALVAREZ
TRADUCTOR E. INTERPRETE OFICIAL
Reg. 2076 Minj. Justicia 1993

164
87X
203
163

+++++
EN ESPAÑOL: La Certificación del Consulado General de Colombia en Londres, Inglaterra bajo el Número de Certificación 12/1911 de fecha 18 de Diciembre del año 2000; Autenticación Hasta por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia bajo el Número 211693 de fecha 24 de Enero del año 2001.

(Pagados Derechos por valor de \$106.00 Dólares)

+++++
ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA DE LOS DOCUMENTOS ADJUNTOS.


HUGO NAVARRO ALVAREZ
 TRADUCTOR E. INTERPRETE OFICIAL
 Res. 1876 Ministerio 1999

Resolución Número 1876 del Ministerio de Justicia
Fecha: 26 de Enero del año 2001.

MINISTERIO DE RELACIONES
 EXTERIORES
 213907
 CON FIRMAS ADECUADAS EN EL
 PROCEDIMIENTO DE SEPEÑA
 LAS FIRMAS INDICADAS.

TO SE AGRADECE
 RESQUISABILIDAD DEL TRABAJO
 2001 EN ENE 29
 JEFE DE LEGALIZACIONES
 SECRETARÍA DE BOGOTÁ D.C.