

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 993 583**

(21) Número de solicitud: 202330530

(51) Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación:

27.06.2023

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

02.01.2025

(71) Solicitantes:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (32.00%)

Av. Blasco Ibáñez 13

46010 Valencia (Valencia) ES;

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (22.00%);**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(18.00%);**

**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
CARDIOVASCULARES CARLOS III F.S.P.**

(14.00%) y

DEL POZO LOSADA, Jesús (14.00%)

(72) Inventor/es:

DEL POZO LOSADA, Jesús;

MARCILLA DÍAZ, Antonio;

DEL POZO LOSADA, Carlos;

SÁNCHEZ LÓPEZ, Christian Miquel;

SÁNCHEZ SANCHO, Francisco Antonio;

GARCÍA CSÁKY, Aurelio;

OLIVER PÉREZ, Eduardo;

IBÁÑEZ CABEZA, Borja;

BAQUERO GÁLVEZ, María Gracia;

ROSCALES GARCÍA, Silvia y

CUMELLA MONTÁNCHEZ, José María

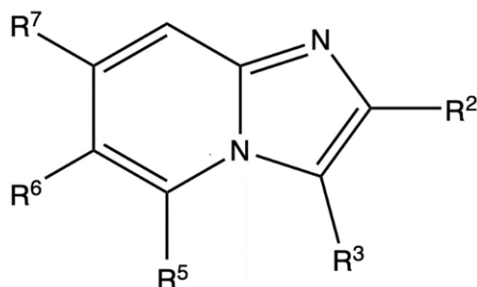
(74) Agente/Representante:

CUETO PRIEDE, Sénida Remedios

(54) Título: **DERIVADOS DE IMIDAZO[1,2-A]PIRIDINA CON ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA**

(57) Resumen:

La presente invención se refiere a la síntesis química y producción de compuestos derivados de Imidazo[1,2-a]piridina de fórmula I



donde R², R³, R⁵, R⁶ y R⁷ tienen los significados indicados en la descripción, método de obtención de los mismos, así como a su uso terapéutico como composición farmacéutica para uso antiinflamatorio *in vitro* e *in vivo* en enfermedades que cursen con procesos inflamatorios y pro-fibróticos.

DESCRIPCIÓN**DERIVADOS DE IMIDAZO[1,2-A]PIRIDINA CON ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA****CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención está relacionada con la obtención de productos químicos sintéticos con aplicación cosmética, nutracéutica y terapéutica (sector Biomédico).

Se enmarca en el campo de la preparación de nuevos compuestos mediante proceso de síntesis química de derivados de imidazo[1,2-a] piridina mediante reacción de acoplamiento de Suzuki y heterociclación, con potente actividad antiinflamatoria *in vitro* en cultivos celulares e *in vivo* en modelos de ratón.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La inflamación es una respuesta normal del sistema inmunológico a la infección. Sin embargo, cuando se permite que continúe sin control, puede resultar en trastornos autoinmunes o autoinflamatorios, enfermedades neurodegenerativas o incluso cáncer. La comprensión cada vez mayor de que la inflamación crónica es crucial en muchas enfermedades abre nuevas vías de tratamiento.

Actualmente se encuentra disponible una variedad de agentes antiinflamatorios seguros y efectivos, incluida la aspirina y otros medicamentos antiinflamatorios no esteroides (AINE), con muchos más medicamentos en desarrollo. Un fármaco antiinflamatorio eficaz debería poder inhibir el desarrollo de la inflamación sin interferir en la homeostasis normal. Por lo general, los medicamentos antiinflamatorios inhiben las ciclooxigenasas (COX), que participan en la biosíntesis de prostaglandinas que promueven la inflamación. Los AINE convencionales se asocian con efectos secundarios gástricos y renales, ya que inhiben tanto la COX-1 constitutiva como la COX-2 inducible. La mayoría de los inhibidores selectivos de la COX-2 (COXIB) carecen de efectos secundarios gástricos, pero están asociados con efectos secundarios cardíacos en el uso a largo plazo.

Por otro lado, el exceso de especies reactivas al oxígeno (ROS) en el cuerpo causa estrés oxidativo, que daña la proteína p53 y la poli (ADP-ribosil)ación (PARP), que, a su vez, desencadena la activación de proteasas (calpaínas), la degradación de proteínas y la alteración de las funciones mitocondriales, lo que reduce los niveles de ATP y finalmente

conduce a la necrosis celular. La desregulación de ROS puede causar disfunción celular que resulta en el desarrollo de muchas enfermedades como cánceres, enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares y, en última instancia, la muerte.

5 Los enfoques actuales para superar la inflamación incluyen el uso de derivados antiinflamatorios inmuno selectivos, agonistas selectivos del receptor de glucocorticoides, estatinas, inhibidores de histonas desacetilasas, agonistas de PPAR, resolvinas y proteínas e inhibidores de TNF α , entre otros.

10 El factor de crecimiento transformante-beta (TGF β) es un agente crucial en la homeostasis del sistema inmunológico, involucrado entre otros, en la migración de células inflamatorias, inhibición del crecimiento, invasión, transición epitelio-mesenquimal (EMT), remodelación de la matriz extracelular (MEC) y la inmunosupresión. Sin embargo, aunque normalmente está regulado dinámicamente e involucrado en el mantenimiento de la homeostasis tisular, el TGF β a menudo se sobreexpresa crónicamente en diferentes patologías, como cáncer, fibrosis e inflamación. La vía de señalización de TGF β se ha
15 convertido en un objetivo popular para el desarrollo de fármacos.

Además, TGF β es la citoquina profibrogénica más potente y su expresión aumenta en casi todas las enfermedades fibróticas. Existe una creciente evidencia de que las especies reactivas de oxígeno (ROS) modulan la señalización de TGF β a través de diferentes vías. En particular, TGF β 1 aumenta la producción de ROS y suprime las
20 enzimas antioxidantes, lo que conduce a un desequilibrio redox. Las ROS, a su vez, inducen / activan TGF β 1 y median muchos de los efectos fibrogénicos de TGF β .

En ese sentido, los compuestos que inhiben selectivamente los receptores de TGF β podrían tener el potencial de inhibir la respuesta inflamatoria y desarrollarse para
25 aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de la fibrosis, carcinogénesis en etapa tardía, aterosclerosis y enfermedades de cicatrización excesiva en las que la actividad de TGF β se ha implicado en la vía de señalización. La inhibición de TGF β es capaz de reducir la inflamación perivascular, retardando así el progreso de la enfermedad. En este sentido, la deficiencia de su receptor ALK5 es capaz de inhibir la inflamación mediada por
30 macrófagos. A su vez, la vía TGF β / ALK5 se ha propuesto como una diana terapéutica capaz de restaurar la sensibilidad a la actividad antiinflamatoria de los corticoides en inflamaciones provocadas por infecciones virales respiratorias.

En la mayoría de las células, TGF β envía señales a través de la combinación de TGF β R-II y ALK5.

ALK5 es una tirosina quinasa que es el receptor tipo I del factor de crecimiento tumoral beta (TGF β -I), y que ha sido descrito como mediadora en la respuesta inflamatoria, inductora de fibrosis de diversos orígenes, así como promotora de la supervivencia, la migración, la diferenciación y la proliferación celular, relacionada con diversas patologías, incluyendo procesos tumorales. De hecho, la inhibición de Alk5 tiene un claro efecto inhibidor de la respuesta inflamatoria promoviendo la respuesta antiinflamatoria en macrófagos humanos. A la inhibición de Alk5 se refiere Ling LE, Lee WC. Tgf-beta type I receptor (Alk5) kinase inhibitors in oncology. Curr Pharm Biotechnol. 2011 Dec;12(12):2190-202. <https://doi.org/10.2174/138920111798808257>.

Por otro lado, recientemente se ha descrito que el direccionamiento de la vía de señalización TGF β / Smad atenúa la formación de cicatrices queloides e hipertróficas. La formación de cicatrices aberrantes, que incluye cicatrices queloides e hipertróficas, se asocia con una cicatrización patológica desorganizada proceso con inflamación crónica. La vía de señalización de TGF β / Smad es la vía más canónica a través de la cual se regula la formación de colágenos en los fibroblastos y miofibroblastos. En los últimos años se han desarrollado varias estrategias terapéuticas que se dirigen a la vía de señalización de TGF- β / Smad para atenuar la formación anormal de cicatrices en la piel.

Muy recientemente, también se ha descrito el posible tratamiento de COVID-19 con bloqueo de TGF β (Chen et al., 2020; Ferreira-Gomes et al., 2021). La principal causa de muerte en pacientes infectados es un síndrome de dificultad respiratoria aguda grave (SDRA) causado por el virus SARS-Cov-2. El síndrome se atribuye a respuestas inflamatorias en gran parte incontroladas caracterizadas por una "tormenta de citocinas", edema y fibrosis en los pulmones en las etapas finales. Esto conduce al fallo funcional de los pulmones y a la muerte de los pacientes.

El síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) es una forma de edema pulmonar no cardiogénico, debido a una lesión alveolar secundaria a un proceso inflamatorio intenso de los pulmones. A pesar de su alta incidencia, el SDRA no tiene un tratamiento específico, más allá de atacar el origen (antibióticos en caso de infección bacteriana), minimizar la ventilación potencialmente defina y evitar un balance de líquidos positivo.

La fibrosis en el pulmón puede deberse principalmente al factor de crecimiento transformante beta (TGF β). Además, el TGF β también participa en la homeostasis de líquidos en el pulmón. Se ha propuesto que la tormenta de citocinas y la patogénesis de COVID-19 son una consecuencia de la red de citocinas desequilibrada, resultante del aumento de la actividad biológica del factor de crecimiento transformante- β (TGF β) (Shen et al., 2021). El aumento repentino e incontrolado del TGF- β activo (posiblemente con la ayuda de algunas citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-6 e IL-1 β) inevitablemente dan como resultado un edema y fibrosis rápidos y masivos que remodelan y finalmente bloquean las vías respiratorias. Además, TGF β , por internalización del canal de sodio epitelial (ENaC), también suprime el sistema antioxidante y las especies reactivas de oxígeno juegan un papel importante en la lesión pulmonar, que se eleva durante la infección por SARS-CoV-2. Con todas estas características, se sugiere una posible inmunoterapia para el COVID-19 grave mediante el bloqueo del factor de crecimiento transformante beta (TGF β).

Recientemente ha sido descrita la evaluación antiinflamatoria de derivados del ácido imidazo[1,2-a]piridincarboxílico (Márquez-Flores et al, 2012), derivados de imidazo[1,2-a]piridina 2,3,6-sustituidos con actividad anti-inflamatoria in vitro medida mediante el ensayo de desnaturalización de proteína de albúmina de suero bovino (BSA), (Budumuru et al, 2019), y 7-aril-imidazo[1,2-a]piridin-3-ilquinolinas como inhibidores de ALK. ((Engers et al., 2020).

Galunisertib y Vactosertib son inhibidores de la vía TGF β y/o ALK5 que han mostrado un buen perfil de seguridad en ensayos en Fase I, y están siendo considerados como potenciales agentes antitumorales debido a la implicación de la mencionada vía en la proliferación y migración celular.

Los compuestos de la invención utilizan la inhibición de ALK5, perteneciente a la familia de receptores TGF β , como estrategia antiinflamatoria, capaz de prevenir eventos fibróticos entre otros (Nolte y Margadant, 2020). Estos compuestos son útiles en el tratamiento del cáncer, enfermedades pulmonares, enfermedades fibróticas, prevención de la formación de cicatrices queloides e hipertróficas y así como un tratamiento para COVID-19 grave.

Los compuestos de la invención tienen la estructura química de un esqueleto de imidazo[1,2-a]piridina aromático planar funcionalizado en distintas posiciones de este esqueleto heterocíclico, destacando especialmente aquellos derivados sustituidos en C-7 con un sistema heterocíclico aromático. Algunos de ellos se prepararon a partir de 7-

bromoimidazo[1,2-a]piridina y ácidos (hetero) arilborónicos mediante acoplamientos de Suzuki. El esqueleto de imidazo[1,2-a]piridina es conocido como una estructura privilegiada ya que está presente en muchos fármacos comerciales como Zolpidem, Olprinona, Soraprazan y muchos otros compuestos que actualmente se encuentran en
5 diferentes etapas de pruebas biológicas y evaluación preclínica. mostrando múltiples aplicaciones terapéuticas.

Los compuestos de la invención son compuestos basados en estructuras con actividad inhibidora de la tirosina quinasa Alk5, que es el receptor I del factor de crecimiento transformante o TGFβ.

10 Presentaron potente actividad antiinflamatoria tanto *in vitro* (sobre macrófagos humanos en cultivo y macrófagos humanos en cultivo) como *in vivo* en un modelo animal de daño pulmonar agudo, así como efecto antifibrótico en un modelo murino.

Referencias:

15

Chen et al., 2020: Chen W. A potential treatment of COVID-19 with TGF-β blockade. Int J Biol Sci. 2020 Apr 21;16(11):1954-1955.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.46891>

20 Ferreira-Gomes et al., 2021: Ferreira-Gomes M, Kruglov A, Durek P, Heinrich F, Tizian C, Heinz GA, Pascual-Reguant A, Du W, Mothes R, Fan C, Frischbutter S, Habenicht K, Budzinski L, Ninnemann J, Jani PK, Guerra GM, Lehmann K, Matz M, Ostendorf L, Heiberger L, Chang HD, Bauherr S, Maurer M, Schönrich G, Raftery M, Kallinich T, Mall MA, Angermair S, Treskatsch S, Dörner T, Corman VM, Diefenbach A, Volk HD,
25 Elezkurtaj S, Winkler TH, Dong J, Hauser AE, Radbruch H, Witkowski M, Melchers F, Radbruch A, Mashreghi MF. SARS-CoV-2 in severe COVID-19 induces a TGF-β-dominated chronic immune response that does not target itself. Nat Commun. 2021 Mar 30;12(1):1961. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22210-3>.

30 Shen et al., 2021: Shen WX, Luo RC, Wang JQ, Chen ZS. Features of Cytokine Storm Identified by Distinguishing Clinical Manifestations in COVID-19. Front Public Health. 2021 May 24;9:671788. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.671788>.

Márquez-Flores et al., 2012: Márquez-Flores YK, Campos-Aldrete ME, Sagado-Zamora H, Correa-Basurto J, Meléndez-Camargo ME. Acute and chronic anti-inflammatory evaluation of imidazo[1,2-A]pyridine carboxylic acid derivatives and docking analysis. Medicinal Chemistry Research, 2012; 3491-3498.

5 <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9870-3>.

Budumuru et al.; 2019: Budumuru P, Golagani S, and Pushpanjali B. Microwave-assisted synthesis of imidazo[1,2-a]pyridine derivatives and their anti-inflammatory activity IJPSR, 2019; 10(3): 1172-1179

10 [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(3\).1172-79](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(3).1172-79)

Engers et al., 2020: Engers DW, Bollinger SR, Felts AS, Vadukoot AK, Williams CH, Blobaum AL, Lindsley CW, Hong CC, Hopkins CR. Discovery, synthesis and characterization of a series of 7-aryl-imidazo[1,2-a]pyridine-3-ylquinolines as activin-like

15 kinase (ALK) inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2020 Sep 15;30(18):127418.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127418>

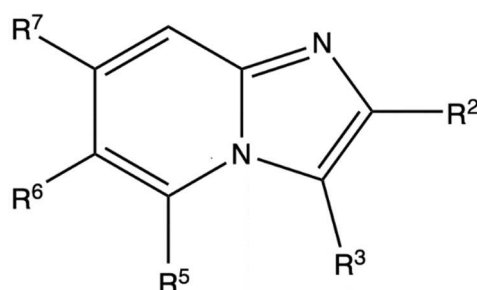
Nolte and Margadant et al., 2020: Nolte M, Margadant C. Controlling Immunity and Inflammation through Integrin-Dependent Regulation of TGF- β . Trends Cell Biol. 2020

20 Jan;30(1):49-59. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.10.002>

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I:

25



I

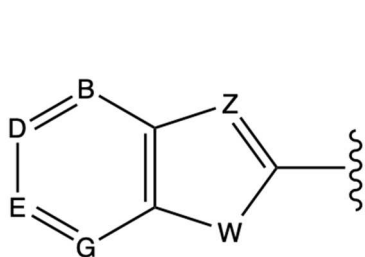
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:

R² representa H; arilo, donde el grupo arilo puede estar no sustituido o puede estar sustituido con grupos alquilo de 1 a 5 átomos de carbono, o sustituido con haloalquilo (tal como -CF₃), o sustituido con un grupo alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono, tal como metoxi,

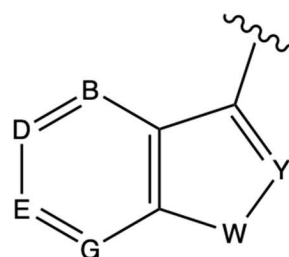
R³ representa H, halógeno; haloalquilo; alcóxicarbonilo de 2 a 5 átomos de carbono; amino; arilo ó heteroarilo, donde los grupos arilo y heteroarilo pueden estar no sustituidos o pueden estar sustituidos con grupos alquilo de 1 a 5 átomos de carbono o con uno o más grupos alcóxicarbonilo de 2 a 5 átomos de carbono (tal como etóxicarbonilo),

R⁵ representa H; alqueno de 2 a 10 átomos de carbono; alcóxicarbonilo de 2 a 5 átomos de carbono; nitro; carboxilo; alquilo de 1 a 5 átomos de carbono no sustituido o sustituido con uno o más grupos hidroxilo, preferentemente sustituido con un grupo hidroxilo; por un grupo N-(3-metilén-2-oxoindolin-5-il)-3-(piperidin-1-il)propanamida o carbaldehído,

R⁶ representa un átomo de hidrógeno (H); un grupo alquilo no sustituido de 1 a 5 átomos de carbono; un grupo alquilo de 1 a 5 átomos de carbono sustituido con uno o más grupos hidroxilo, preferentemente sustituido con uno o más grupos hidroxilo, tal como hidroximetilo; un grupo alcóxido de 1 a 5 átomos de carbono; halógeno (F, Cl, Br, I); un grupo alcóxicarbonilo (-O-(C=O)-R) donde R tiene de 1 a 3 átomos de carbono, tal como metóxicarbonilo; un grupo nitro; un grupo alqueno de 2 a 10 átomos de carbono no sustituido o sustituido, por ejemplo, por un grupo arilo, tal como fenilo; arilo, donde el grupo arilo puede ser no sustituido o puede estar sustituido por uno o más grupos hidroxilo (por ejemplo, sustituido por un hidroxilo), o sustituido con uno o más grupos metóxido; heteroarilo, tal como furanilo, tiofenilo, pirrolilo o piridinilo; o heteroarilo donde el grupo heteroarilo está seleccionado entre, dibenzotiofenilo, un grupo de fórmula II, un grupo de fórmula III:



II



III

donde D, B, E, G representan independientemente N, CH ó C-R, donde R puede ser alquilo de uno a 3 átomos de carbono no sustituido, arilo no sustituido o cicloalquilo no sustituido

Z representa CH ó N

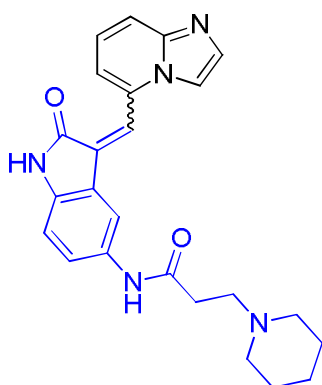
Y representa CH ó N

W representa O ó S ó NH,

tal como benzotiofenilo, benzofuranilo, benzopirrolilo,

- 5 - R⁷ representa un átomo de hidrógeno (H); un grupo arilo no sustituido o un grupo arilo sustituido con uno o más grupo hidroxilo, tal como hidroxifenilo (por ejemplo, sustituido por un hidroxilo), o sustituido con uno o más grupos metoxilo; halógeno (F, Cl, Br, I); alquenilo no sustituido de 2 a 10 átomos de carbono, o alquenilo de 2 a 10 átomos de carbono sustituido por un grupo arilo tal como fenilo; alcóxicarbonilo de 2 a 5 átomos de carbono;
- 10 un grupo heteroarilo, tal como furanilo, tiofenilo, pirrolilo o piridinilo; o heteroarilo donde el grupo heteroarilo está seleccionado entre benzotiofenilo, benzofuranilo, benzopirrolilo; dibenzotiofenilo, un grupo de fórmula II y un grupo de fórmula III como se han definido anteriormente,
- en el que:
- 15 - al menos 3 de los sustituyentes R², R³, R⁵, R⁶ y R⁷ son simultáneamente H, y la posición del carbono 8 de la estructura de imidazo[1,2a]piridina no lleva sustituyentes, y
- cuando R⁵ es carbaldehído, al menos uno de R², R³, R⁶ o R⁷ es distinto de H.

- El grupo es N-(3-metilén-2-oxoindolin-5-il)-3-(piperidin-1-il)propanamida) en la posición
- 20 R⁵, da lugar a un compuesto de fórmula I que es como se muestra a continuación:



“Arilo ”significa un grupo fenilo; carbociclo aromático condensado, tal como naftilo o antranilo; o indanilo, sin heteroátomos.

“Alquilo”, si no se indica otra cosa, significa alquilo de 1 a 5 átomos de carbono.

“Alquenilo”, si no se indica otra cosa, significa alquenilo de 2 a 10 átomos de carbono.

“Heteroarilo” si no se indica otra cosa, significa un grupo monocíclico, o bicíclico fusionado, compuesto por entre 5 y 10 miembros en el anillo, que tiene al menos un resto aromático y que contiene de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno.

“Haloalquilo”, si no se indica otra cosa, significa un grupo alquilo de 1 a 3 átomos de carbono, sustituido con uno o más átomos de halógeno, seleccionado entre flúor, cloro, bromo o yodo.

Según realizaciones particulares R^2 representa arilo sustituido con un grupo CF_3 o con un grupo alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, sustituido con metoxi; y de forma preferente para estas realizaciones, R^3 y R^5 son simultáneamente H.

Según realizaciones particulares adicionales, R^2 representa arilo sustituido con alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, sustituido con metoxi, y simultáneamente R^6 es un alquilo de uno a 5 átomos de carbono, por ejemplo metilo, o simultáneamente R^6 es un grupo arilo sustituido con un hidroxilo, o con halógeno (F, Cl, Br, I); y de forma preferente para estas realizaciones, R^3 y R^5 son simultáneamente H.

Según realizaciones particulares adicionales, R^2 representa un grupo seleccionado entre arilo sustituido con alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, sustituido con metoxi; y simultáneamente R^6 es alquilo de uno a 5 átomos de carbono, por ejemplo metilo, o simultáneamente R^6 es un grupo arilo sustituido con un hidroxilo, o con halógeno; y de forma preferente para estas realizaciones, R^3 y R^5 son simultáneamente H.

Según realizaciones particulares adicionales, R^2 representa un fenilo sustituido con alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, sustituido con p-metoxilo, o R^2 representa fenilo sustituido con trihalometilo, tal como un grupo p-trifluorometilfenilo; y simultáneamente R^7 es un grupo heteroarilo, por ejemplo, 2-benzo[b]furilo; y de forma preferente, para estas realizaciones, R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son simultáneamente H.

Según realizaciones particulares adicionales:

- R^2 representa arilo sustituido con alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, sustituido con metoxi, y R^7 es arilo sustituido con hidroxilo o con un grupo alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, sustituido con metoxi, o

- R^2 representa arilo sustituido con alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, sustituido con metoxi, y R^7 representa alquenilo sustituido con un grupo arilo, por ejemplo, sustituido con un fenilo; y de forma preferente para estas realizaciones, R^3 y R^5 son simultáneamente H.

- 5 Según realizaciones particulares adicionales, R^2 representa arilo sustituido con alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, sustituido con metoxi, y R^7 es arilo sustituido con hidroxilo o con un grupo alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, sustituido con metoxi, o alquenilo sustituido con un grupo arilo, por ejemplo, sustituido con un fenilo; y de forma preferente para estas realizaciones, R^3 y R^5 son simultáneamente H.
- 10 Según realizaciones preferentes, R^2 representa arilo sustituido con alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, sustituido con metoxi, R^3 es H, R^6 es H, grupo alquilo o grupo arilo, y R^7 es H o arilo sustituido con hidroxilo o con un grupo alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, sustituido con metoxi; y de forma preferente, para estas realizaciones, R^3 y R^5 son simultáneamente H.
- 15 Según realizaciones particulares adicionales, R^3 es un arilo no sustituido; y de forma preferente para estas realizaciones, R^2 , R^5 y R^6 son simultáneamente H; y de forma más preferente para estas realizaciones, R^2 , R^5 , R^6 y R^7 son simultáneamente H.

- Según realizaciones particulares adicionales, R^3 representa un heterociclo aromático, que puede estar no sustituido, o puede estar sustituido con un grupo alcóxicarbonilo de 2 a 5
- 20 átomos de carbono, tal como un grupo etóxicarbonilo; y de forma preferente para estas realizaciones, R^2 , R^5 y R^6 son simultáneamente H; y de forma más preferente para estas realizaciones, R^2 , R^5 , R^6 y R^7 son simultáneamente H.

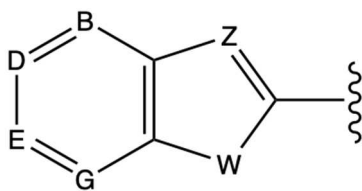
- Según realizaciones particulares adicionales, R^3 es un grupo seleccionado entre benzofuranilo, benzotiofenilo e indol, que puede estar no sustituido o puede estar
- 25 sustituido con un grupo alcóxicarbonilo de 2 a 5 átomos de carbono, tal como un grupo etóxicarbonilo; y de forma preferente para estas realizaciones, R^2 , R^5 y R^6 son simultáneamente H; y de forma más preferente, para estas realizaciones, R^2 , R^5 , R^6 y R^7 son simultáneamente H.

- Según realizaciones particulares adicionales, R^3 es un grupo seleccionado entre
- 30 benzofuranilo, benzotiofenilo e indol, que puede estar no sustituido o puede estar sustituido con un grupo alcóxicarbonilo de 2 a 5 átomos de carbono, tal como un grupo etóxicarbonilo; y simultáneamente y R^7 es un grupo seleccionado entre benzofuranilo,

benzotiofenilo e indol; de forma preferente para estas realizaciones, R^2 , R^5 y R^6 son simultáneamente H.

Según realizaciones particulares adicionales, R^5 representa H, etoxycarbonilo, nitro, carboxilo, hidroximetilo, carbaldehído, o etoxilo, y preferentemente, para estas
5 realizaciones R^2 , R^3 , R^6 y R^7 son simultáneamente H.

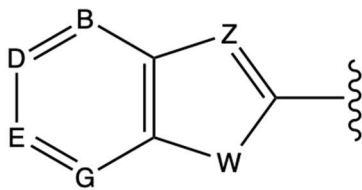
Según realizaciones particulares adicionales, R^7 y R^6 representan independientemente un fragmento



II

10 en el que D, B, E, G representan independientemente CH ó C-R, donde R puede ser alquilo no sustituido de uno a 3 átomos de carbono, arilo no sustituido o cicloalquilo no sustituido, Z representa CH y W representa O.

Según realizaciones particulares adicionales, R^7 o R^6 representa un fragmento



II

15

en el que D, B, E, G representan independientemente CH, Z representa CH y W representa O.

Según realizaciones particulares adicionales, R^6 representa un grupo alquilo de 1 a 5 átomos de carbono o alcóxicarbonilo (-O-(C=O)-R) donde R tiene de 1 a 3 átomos de
20 carbono, tal como metóxicarbonilo; y preferentemente, para estas realizaciones R^2 , R^3 , R^5 y R^7 son simultáneamente H.

Según realizaciones particulares adicionales, R⁷ representa un grupo arilo no sustituido, tal como fenilo, y preferentemente, para estas realizaciones R², R³, R⁵ y R⁷ son simultáneamente H.

Según realizaciones particulares, el compuesto de fórmula I está seleccionado entre:

- 5 - Ácido imidazo[1,2-a]piridin-5-carboxílico (2)
- Imidazo[1,2-a]piridin-5-carboxilato de etilo (3)
- 3-Fenilimidazo[1,2-a]piridina (4)
- Imidazo[1,2-a]piridin-5-ilmetanol (5)
- 2-(4-Metoxifenil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridina (8)
- 10 - 4-(Imidazo[1,2-a]piridin-7-il)fenol (12)
- 4-(2-(4-(Trifluorometil)fenil)imidazo[1,2-a]piridin-7-il)fenol (13)
- 4-(2-(4-(Trifluorometil)fenil)imidazo[1,2-a]piridin-6-il)fenol (15)
- 4-(2-(4-Metoxifenil)imidazo[1,2-a]piridin-7-il)fenol (16)
- 4-(2-(4-Metoxifenil)imidazo[1,2-a]piridin-6-il)fenol (17)
- 15 - (E)-7-Estirilimidazo[1,2-a]piridina (19)
- (E)-2-(4-Metoxifenil)-7-estirilimidazo[1,2-a]piridina (20)
- 7-(3,4-Dimetoxifenil)imidazo[1,2-a]piridina (21)
- 6-Iodo-2-(4-(trifluorometil)fenil)imidazo[1,2-a]piridina (25)
- 7-(Benzofuran-2-il)imidazo[1,2-a]piridina (26) PS1906
- 20 - 4-(Imidazo[1,2-a]piridin-6-il)fenol (27)
- (E)-6-Estirilimidazo[1,2-a]piridina (28)
- 6-(Benzofuran-2-il)imidazo[1,2-a]piridina (29)
- 6-(3,4-Dimetoxifenil)imidazo[1,2-a]piridina (30)
- Etil 5-(imidazo[1,2-a]piridin-3-il)-1*H*-indol-2-carboxilato (31) (PS1801)
- 25 - 7-(Benzofuran-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (32)
- 6-(Benzofuran-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (33)
- 7-(Furan-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (34)
- 6-(Furan-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (35)
- 7-(Tiofen-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (36)
- 30 - 6-(Tiofen-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (37)
- 7-(Piridin-4-il)imidazo[1,2-a]piridina (38)

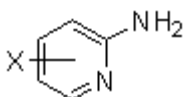
- 6-(Piridin-4-il)imidazo[1,2-a]piridina (39)
- 7-(Dibenzotiofen-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (40)
- 6-(Dibenzotiofen-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (41)
- 5-(7-(Benzofuran-2-il)-3-imidazo[1,2-a]piridin)-1*H*-indol-2-carboxilato de etilo, (42)
- 5 - N-(3-(imidazo[1,2-a]piridin-5-ilmetilén)-2-oxoindolin-5-il)-3-(piperidin-1-il)propanamida.

Según una realización preferente, el compuesto de fórmula I es 7-(benzofuran-2-il)imidazo[1,2-a]piridina. (26), PS1906.

- 10 Según una realización preferente adicional, el compuesto de fórmula I es etil 5-(imidazo[1,2-a]piridin-3-il)-1*H*-indol-2-carboxilato, compuesto (31).

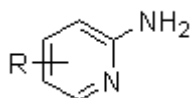
La presente invención se refiere también a un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula I que comprende:

- 15 1) Hacer reaccionar una amino piridina de fórmula (IV) (comercial)



(IV)

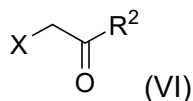
en el que X es Cl, Br, o I, con R-B(OH)₂ en el que R es un fragmento de fórmula R⁷ o R⁶ definido anteriormente para obtener un compuesto de fórmula (V)



20 (V)

y

- 2) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (V) con una halocetona de fórmula (VI)



(VI)

en la que X es Cl, Br o I y R₂ dando lugar a un compuesto de fórmula I definida anteriormente.

La reacción de la etapa 1) se puede llevar a cabo en presencia de un catalizador de Pd(0) y una base inorgánica tal como carbonato potásico.

La temperatura para la reacción de la etapa 1) puede estar entre 80 y 150 °C.

La reacción de la etapa 1) se puede realizar de forma convencional (18-24 h) o con microondas (1-5 h).

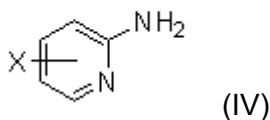
El disolvente para la reacción de la etapa 1), puede ser, por ejemplo, un disolvente polar, tal como 1,2-dimetoxietano, 1,4-dioxano, DMF, DMSO.

La reacción de la etapa 2) se puede llevar a cabo en presencia de un disolvente, tal como los que se han mencionado para la etapa 1) y una base orgánica o inorgánica, tal como bicarbonato sódico o potásico, fosfato sódico o potásico, acetato potásico, metóxido potásico.

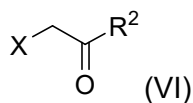
La reacción de la etapa 2) se puede llevar a cabo a una temperatura entre 25 y 120 °C, preferentemente a reflujo.

Una alternativa adicional del procedimiento para preparar un compuesto de fórmula I comprende:

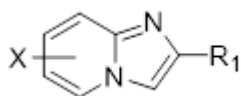
1) Hacer reaccionar una amino piridina de fórmula (IV)



en la que X es Cl, Br, o I, con una halocetona de fórmula (VI))



en la que X es Cl, Br o I y R₂ tiene el significado dado anteriormente dando lugar a un compuesto de fórmula VII



(VII)

2) y hacer reaccionar el compuesto de fórmula (VII) con R-B(OH)₂ en la que R- es un
5 fragmento de fórmula R⁶ o R⁷ definido anteriormente dando lugar a un compuesto de fórmula I.

En el caso de los compuestos de fórmula I sustituidos en la posición 7 con un sustituyente heterocíclico aromático, el procedimiento comprende hacer reaccionar 7-
10 bromoimidazo[1,2-a]piridina y ácidos (hetero) arilborónicos mediante acoplamientos de Suzuki.

Una tercera alternativa del procedimiento para preparar los compuestos de fórmula I, cuando llevan un heteroarilo como sustituyente en el carbono C3 es utilizar la reacción
15 de Heck, que comprende hacer reaccionar una imidazopiridina con un haloheteroarilo, en presencia de un catalizador de Pd(0) que se genera in situ.

Para analizar la actividad inhibidora de Alk5 de los compuestos de la invención en ensayos de actividad quinasa in vitro se siguieron los estudios de Roth y col. (Roth et al.,
20 2010). Para ello se utilizaron Alk5 recombinante (Abcam, ref. ab105908), determinando la actividad quinasa mediante el sistema comercial Kinase-Glo® Luminiscent kinase assay platform (Promega, ref. TB372). Como control positivo de inhibición se utilizó el compuesto GW788388 Hydrate (Sigma-Aldrich ref. SML0116) cuya fórmula es (4-{4-[3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]-piridin-2-il}-N-(tetrahydro-2H-piran-4-il)benzamida hidrato, un
25 potente inhibidor de Alk5 y de uso oral.

La invención tiene aplicaciones en Biomedicina, en el sector farmacéutico, así como en cosmética, y nutracéutica. Se pueden obtener formulaciones efectivas para su aplicación tanto tópica, como por vías oral y parenteral.

Un objeto adicional de la invención se refiere a un compuesto de fórmula I, tal como se
30 ha descrito anteriormente, para su uso como medicamento.

Según realizaciones particulares dicho uso comprende el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto.

Los términos "tratamiento" y "tratar" utilizados en el presente documento se refieren al tratamiento médico de un sujeto con la intención de curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, afección patológica o trastorno. Este término incluye el tratamiento activo, es decir, el tratamiento dirigido específicamente a la mejora de una enfermedad, afección patológica o trastorno, y también incluye el tratamiento causal, es decir, el tratamiento dirigido a la eliminación de la causa de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociado. Además, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, el tratamiento diseñado para aliviar los síntomas en lugar de curar la enfermedad, afección patológica o trastorno; el tratamiento preventivo, es decir, el tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociados; y el tratamiento de apoyo, es decir, el tratamiento empleado para complementar otra terapia específica dirigida a la mejora de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociados. Se entiende que el tratamiento, aunque esté destinado a curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, afección patológica o trastorno, no tiene por qué producir realmente la curación, mejora, estabilización o prevención. Los efectos del tratamiento pueden medirse o evaluarse como se describe en el presente documento y como se conoce en la técnica, según convenga para la enfermedad, afección patológica o trastorno de que se trate. Dichas mediciones y evaluaciones pueden realizarse en términos cualitativos y/o cuantitativos. Así, por ejemplo, las características o rasgos de una enfermedad, afección patológica o trastorno y/o los síntomas de una enfermedad, afección patológica o trastorno pueden reducirse a cualquier efecto o en cualquier cantidad. En el contexto de un sujeto que padece una enfermedad inflamatoria, los términos "tratamiento" y "tratar" se refieren a la gestión médica de un sujeto con la intención de curar, mejorar o estabilizar dicha enfermedad inflamatoria.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" incluye, entre otros, animales, plantas y cualquier otro organismo o entidad. El sujeto puede ser un vertebrado, más concretamente un mamífero (por ejemplo, un ser humano, un caballo, un cerdo, un conejo, un perro, una oveja, una cabra, un primate no humano, una vaca, un gato, una cobaya o un roedor), un pez, un ave o un reptil o anfibio.. El término no denota una edad o sexo en particular. Por lo tanto, los sujetos adultos y recién nacidos, así como los fetos, ya sean varones o hembras, están cubiertos por la definición de sujeto. Un paciente es un sujeto afectado por una enfermedad o trastorno. El término "paciente" incluye sujetos

humanos y veterinarios. En otro aspecto de la invención, uno o más compuestos de fórmula I para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria pueden administrarse a un sujeto que comprenda un ser humano o un animal, incluidos, entre otros, un ratón, un perro, un gato, un caballo, un bovino o un ovino y similares.

- 5 Tal y como se ha indicado anteriormente, los compuestos de la fórmula I son capaces de inhibir la actividad fosforilante de la kinasa Alk5 lo que inhibe la activación de los macrófagos inhibiéndose así la respuesta inflamatoria.

El término "inhibir" significa reducir o disminuir la actividad fosforilante de la kinasa Alk5. Puede tratarse de una inhibición completa de la actividad o la expresión de la kinasa, o
 10 de una inhibición parcial. La inhibición puede compararse con un control o con un nivel estándar. La inhibición puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90,
 15 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% comparado con dicho control.

En una realización particular, la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo consistente en enfermedades que cursan con componente inflamatorio y/o pro-fibrótico.

En otra realización particular, la enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria pulmonar seleccionada del grupo consistente en síndrome por distres respiratorio agudo,
 20 la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la fibrosis pulmonar, la hipertensión pulmonar, inflamación pulmonar, preferentemente síndrome por distres respiratorio agudo y fibrosis pulmonar.

En otra realización particular, la enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria intestinal que cursa con un fuerte componente inflamatorio como por ejemplo la
 25 enfermedad de Chron y la colitis ulcerosa,

En otra realización particular, la enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria cardiovascular que cursa con un fuerte componente inflamatorio como por ejemplo infarto agudo de miocardio, miocarditis, o aterosclerosis.

En otra realización particular, la enfermedad inflamatoria es cualquier enfermedad
 30 inflamatoria que cursa con un fuerte componente inflamatorio como por ejemplo la diabetes de tipo 2, esclerosis múltiple o cáncer.

En otra realización particular el compuesto de formula I es etil 5-(imidazo[1,2-a]piridin-3-il)-1H-indol-2-carboxilato (31) (PS1801).

En otra realización particular el compuesto de formula I es etil 5-(imidazo[1,2-a]piridin-3-il)-1*H*-indol-2-carboxilato (31) (PS1906).

- 5 En una realización particular, la concentración de PS1801 o PS1906 administrada a un sujeto está comprendida entre 1000 mg/kg y 1 µg/kg de peso corporal, preferiblemente entre 500 mg/kg y 2 µg/kg, más preferiblemente entre 100 mg/kg y 3 µg/kg, aún más preferiblemente entre 50 mg/kg y 4 µg/kg, aún más preferiblemente entre 25 mg/kg y 5 µg/kg, aún más preferiblemente entre 20 mg/kg y 8 µg/kg, aún más preferiblemente entre
10 15 mg/kg y 10 µg/kg, aún más preferiblemente entre 1 mg/kg y 50 µg/kg, y aún más preferiblemente entre 800 µg/kg y 80 µg/kg.

Otro objeto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica, que comprende uno o más compuesto de formula I, tal y como se ha definido anteriormente y uno o más compuestos activos adicionales, y/o uno o más portadores, adyuvantes o
15 vehículos farmacéuticamente aceptables.

Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que puede ser administrado a un sujeto junto con el compuesto seleccionado sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de manera deletérea con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

- 20 En una realización adicional, el vehículo fármaceuticamente aceptable puede ser un desintegrante, tensioactivo, aglutinante y lubricante farmacéuticamente aceptables.

En una realización particular la composición farmacéutica comprende otro compuesto activo adicional, tal como esteroides o corticosteroides (por ejemplo, dexametasona), y los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) como salicilatos, ibuprofeno,
25 naproxeno.

En una realización particular, cuando se emplea el compuesto de fórmula I para el Síndrome por Distrés respiratorio Agudo, el otro principio activo es Dexametasona.

En otra realización particular, el compuesto activo adicional es otro compuesto de fórmula I, descrito anteriormente.

- 30 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "una combinación de", cuando se refiere a dos o más compuestos, agentes o ingredientes farmacéuticos activos

adicionales, significa la administración de dos o más compuestos, agentes o ingredientes farmacéuticos activos al sujeto antes, simultáneamente o posteriormente entre sí.

En una realización particular, el compuesto activo adicional se selecciona entre un agente mucolítico, un broncodilatador, un antibiótico, un agente antivírico, un agente antiinflamatorio, un agente nutricional y combinaciones de los mismos.

Los compuestos de formula I de la invención y las composiciones farmacéuticamente aceptables pueden administrarse a un sujeto por vía oral, intravenosa, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como polvos, pomadas o gotas), bucal, como aerosol oral o nasal, o similares, dependiendo de la gravedad de la infección que se esté tratando preferentemente por vía intravenosa. En ciertas realizaciones, los compuestos o las composiciones de la invención pueden administrarse a niveles de dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg y preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, del peso corporal del sujeto por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado.

Otro objeto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica, que comprende uno o más compuesto de formula I, tal y como se ha definido anteriormente y uno o más compuestos activos adicionales, y/o uno o más portadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

Cada uno de los términos "comprende", "consiste esencialmente en" y "consiste en" puede sustituirse por cualquiera de los otros dos términos. Los términos "un" o "una" pueden referirse a uno o a una pluralidad de los elementos que modifican (por ejemplo, "un reactivo" puede significar uno o más reactivos), a menos que esté contextualmente claro que se describe uno de los elementos o más de uno. El término "aproximadamente", tal como se utiliza aquí, se refiere a un valor dentro del 10% del parámetro subyacente (es decir, más o menos el 10%; por ejemplo, un peso de "aproximadamente 100 gramos" puede incluir un peso entre 90 gramos y 110 gramos). El uso del término "aproximadamente" al principio de un listado de valores modifica cada uno de los valores (por ejemplo, "aproximadamente 1, 2 y 3" se refiere a "aproximadamente 1, aproximadamente 2 y aproximadamente 3"). Cuando se describe un listado de valores, el listado incluye todos los valores intermedios y todos los valores fraccionarios de los mismos (por ejemplo, el listado de valores "80%, 85% o 90%" incluye el valor intermedio

86% y el valor fraccionario 86,4%). Cuando un listado de valores va seguido del término "o más", el término "o más" se aplica a cada uno de los valores enumerados (por ejemplo, el listado de "80%, 90%, 95% o más" o "80%, 90% o 95% o más" se refiere a "80% o más, 90% o más, o 95% o más"). Cuando se describe un listado de valores, el listado incluye todos los rangos entre dos de los valores listados (por ejemplo, el listado de "80%, 90% o 95%" incluye rangos de "80% a 90%", "80% a 95%" y "90% a 95%"). A continuación, se exponen algunos ejemplos de aplicación de la tecnología.

Entre las ventajas de la presente invención se encuentran:

ventajas tanto a nivel de producción, por ser compuestos de síntesis química, la cual se ha optimizado en el laboratorio, manteniendo los lotes de producto idénticas propiedades de solubilidad, estabilidad y características reproducibles. Dicha optimización debe derivar en ventajas tanto de índole económica, siendo mas económica la síntesis que la obtención a partir de productos naturales, como de rapidez en la producción de los compuestos. La dosis utilizada en los ensayos in vitro muestran que se requiere muy poca cantidad de producto para obtener el efecto deseado, y a dicha dosis no se ha observado efecto tóxico en las células analizadas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Representación gráfica del porcentaje de inhibición de la quinasa Alk5 in vitro de diferentes compuestos sintetizados de la presente invención. (como control se utilizó el compuesto comercial GW788388 (GW)).

Figura 2: Evaluación de la viabilidad celular (citotoxicidad) sobre macrófagos humanos THP-1-XBlue™-CD14 de los diferentes compuestos a tres concentraciones diferentes (1, 5 y 10 µM), el vehículo es PBS. GW788388 (GW) se utilizó como control. ***p<0,001

***p<0.001

Figura 3: Efecto de los compuestos PS1906 y PS1801 sobre la viabilidad de células epiteliales humanas (Caco-2) y macrófagos (THP-1-XBlue™-CD14) a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 µM). GW788388 (GW) se utilizó como control.

Figura 4. Evaluación del efecto antiinflamatorio en macrófagos THP-1-XBlue™-CD14 estimulados con LPS bacteriano y posteriormente tratados con los compuestos PS1906 y PS1801 a 5 µM. GW788388 (GW) se utilizó como control. ****p<0.0001

Figura 5. Evaluación de efecto antiinflamatorio en macrófagos THP-1-XBlue™-CD14 sin estimular previamente con LPS bacteriano y tratados con los compuestos PS1906 y PS1801 a 5 µM. GW788388 (GW) fue usado como control.

Figura 6. Evaluación in vivo (modelo de ratón con daño agudo pulmonar (ALI) producido por la exposición a LPS bacteriano) del efecto protector del compuesto PS1906 a diferentes dosis equipotentes (D1 y D2) siendo D1 = 156 µg/kg y D2 = 312 µg/kg. A) Imágenes cortes histológicos de pulmón de ratones teñidos con Hematoxilina y Eosina; B) representación gráfica de valoración de daño pulmonar (ALI Score) en los diferentes tratamientos; C) Recuento de neutrófilos por mL de lavado broncoalveolar de los ratones analizados (representados en escala logarítmica Log10); D) Recuento de linfocitos por mL de lavado broncoalveolar de los ratones analizados (representados en escala logarítmica Log10). Los datos se representaron como el valor de la media ± el error estándar de la media. Siendo # p<0.01; ## p<0.001; ***p<0.0001 analizado mediante ANOVA de una vía ajustado con el método múltiple de comparaciones de Dunnet.

15

EJEMPLOS

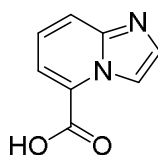
MATERIALES Y MÉTODOS

A. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS

Síntesis de derivados de imidazo[1,2-a]piridina

20

Ácido imidazo[1,2-a]piridin-5-carboxílico (2)

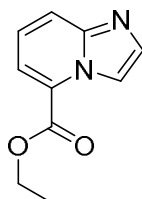


Se irradia con microondas, en atmósfera inerte, una mezcla de reacción de 2-cloroacetilo (13 mg, 0,173 mmol), ácido 6-aminopicolínico (20 mg, 0,144 mmol) en isopropanol (1,5 mL). Después de 40 min. a 170 °C bajo irradiación de microondas el sólido resultante es filtrado y secado para obtener 25 mg, Rto 43%.

RMN ¹H (400 MHz, Metanol-*d*₄) δ 9,22 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 8,29 (dd, *J* = 7,2, 1,3 Hz, 1H); 8,21 - 8,13 (m, 2H); 8,06 (dd, *J* = 9,0; 7,3 Hz, 1H).

RMN ^{13}C (101 MHz, Metanol- d_4) δ 161,7; 140,9; 132,3; 129,5; 122,8; 121,5; 116,5; 115,9.

5 **Imidazo[1,2-a]piridin-5-carboxilato de etilo (3)**

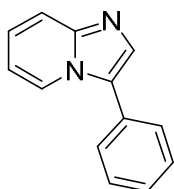


Se añade lentamente cloruro de tionilo (0,072 mL, 0,987 mmol) a una disolución, en un tubo sellado, del ácido imidazo[1,2-a]piridin-5-carboxílico (64 mg, 0,395 mmol) en EtOH (7 mL). Después de 24 horas a 78 °C el disolvente se elimina a presión reducida y la
 10 mezcla de reacción se neutraliza usando una solución acuosa de NaHCO_3 . El crudo de reacción es extraído usando como disolvente orgánico AcOEt. Las fases orgánicas se secan sobre MgSO_4 y el disolvente es eliminado a presión reducida para obtener 50 mg, Rto 66%.

RMN ^1H (400 MHz, Acetona- d_6) δ 8,82 (s, 1H); 7,86 (dd, J = 10,7; 8,2 Hz, 2H); 7,75 (s, 1H); 7,36 (dd, J = 8,9; 7,2 Hz, 1H); 4,49 (q, J = 7,1 Hz, 2H); 1,44 (t, J = 7,1 Hz, 3H).
 15

RMN ^{13}C (101 MHz, Acetona- d_6) δ 162,7; 147,0; 135,6; 127,2; 123,50; 123,3; 119,5; 115,4; 62,8; 14,6.

20 **3-Fenilimidazo[1,2-a]piridina (4)**



Se irradia con microondas, en atmósfera inerte, una mezcla de reacción de imidazo[1,2-a]piridina (115 mg, 0,973 mmol), bromo benceno (0,204 mL, 1,946 mmol), $\text{Pd}(\text{AcO})$ (0,027 mg, 0,097 mmol) y KOAc (0,200 mg, 1,946 mmol) en DMF (4 mL). Después de 1 hora a

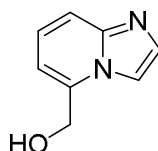
160 °C el disolvente es eliminado a presión reducida y la mezcla de reacción es extraída usando AcOEt como disolvente orgánico. Las fases orgánicas son secadas sobre MgSO₄ y el disolvente es eliminado a presión reducida. El crudo de reacción es purificado en columna cromatográfica usando una mezcla de Tolueno/MeOH (10:1) para obtener 147 mg, Rto 77%.

RMN ¹H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 8,34 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H); 7,74 - 7,64 (m, 2H); 7,54 (dt, *J* = 15,4; 7,4 Hz, 4H); 7,46 - 7,39 (m, 1H); 7,25 - 7,15 (m, 1H); 6,81 (t, *J* = 6,8 Hz, 1H).

RMN ¹³C (101 MHz, Cloroformo-*d*) δ 146,3; 132,7; 129,5; 129,4; 128,3; 128,2; 125,9; 124,4; 123,5; 118,4; 112,7.

10

Imidazo[1,2-*a*]piridin-5-ilmetanol (5)



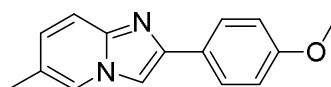
Se añade lentamente, bajo atmosfera inerte, MeOH (13 μL, 0,325 mmol) a una mezcla de etil imidazo[1,2-*a*]piridina-5-carboxilato (30 mg, 0,158 mmol) y LiBH₄ (7 mg, 0,325 mmol) en Et₂O (3 mL). Después de 5 horas a temperatura ambiente la mezcla de reacción se saturó con una disolución de HCl 2M a 0 °C. La mezcla de reacción es extraída AcOEt usando como disolvente orgánico, las fases orgánicas son secadas sobre MgSO₄ y el disolvente es eliminado a presión reducida para obtener el producto buscado.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,88 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H); 7,63 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H); 7,53 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H); 7,26 (dd, *J* = 9,1; 6,8 Hz, 1H); 6,92 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H); 4,76 (s, 2H).

20

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO) δ 145,0; 138,4; 133,2; 124,2; 115,5; 110,5; 109,4; 59,6.

2-(4-Metoxifenil)-6-metilimidazo[1,2-*a*]piridina (8)



25

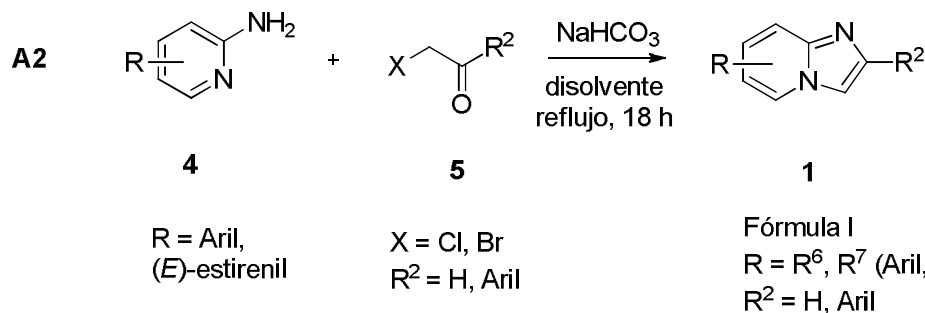
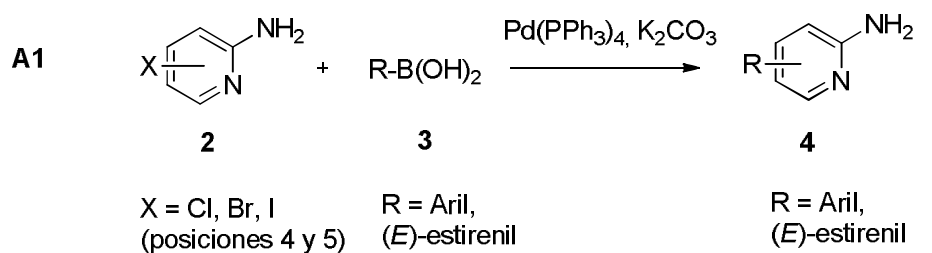
Se añade, bajo atmosfera inerte, 2-bromo-1-(4-metoxifenil)etan-1-ona (160 mg, 0,694 mmol) a una disolución de 5-metilpiridin-2-amina (50 mg, 0,462 mmol) en acetona (4 mL). Después de 18 horas a 60 °C se elimina el disolvente a presión reducida y la mezcla de reacción se basifica con una solución acuosa de NaOH (1M). La mezcla de reacción es extraída usando CH₂Cl₂ como disolvente orgánico, las fases orgánicas son secadas sobre MgSO₄ y el disolvente es eliminado a presión reducida. El crudo de reacción es purificado en columna cromatográfica usando una mezcla de Hex/AcOEt (1:1) como eluyente para obtener 72 mg, Rto 65%.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,28 (s, 1H); 8,17 (s, 1H); 7,87 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H); 7,45 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H); 7,07 (dd, *J* = 9,2; 1,8 Hz, 1H); 6,99 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H); 3,79 (s, 3H); 2,27 (s, 3H).

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158,9; 144,2; 143,8; 127,5; 126,7; 126,7; 124,1; 121,15; 115,8; 114,1; 107,7; 55,1; 17,5.

15

Procedimiento experimental A: Reacción de acoplamiento cruzado (A1) y heterociclación (A2)



20

Reacción de Suzuki (A1):

La 4- ó 5- halo-2-aminopiridina (1 eq) correspondiente se añade a una mezcla del correspondiente ácido borónico (1,2 eq), K_2CO_3 (1,3 eq) y $Pd(PPh_3)_4$ (2% mol) en una mezcla de DME/ H_2O (4:1, 5 mL/mmol) bajo atmosfera inerte en un tubo de microondas, Después de 30 minutos a 110 °C el disolvente es evaporado a presión reducida y el crudo de reacción se purifica en columna cromatográfica empleando los eluyentes correspondientes.

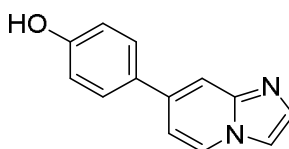
Alternativa del procedimiento mediante calefacción convencional

Alternativamente, la 4- ó 5- halo-2-aminopiridina (1 eq) correspondiente se añade a una mezcla del correspondiente ácido borónico (1,6 eq), Na_2CO_3 (2 eq) y $Pd(PPh_3)_4$ (2-10% mol) en una mezcla de dioxano/ H_2O (12:1, 20 mL/mmol), y la mezcla se mantiene a reflujo bajo argón durante 18 h. Tras evaporar el disolvente a presión reducida, el crudo de reacción se purifica en columna cromatográfica empleando los eluyentes correspondientes.

15

Heterociclación (A2):

Se añade la correspondiente α -halo cetona (1,75 eq) a una mezcla de la aminopiridina sustituida en posición 2 (1 eq) y $NaHCO_3$ (0,1 g/ 5 mL) en EtOH (4 mL). Después de 18 horas a 90°C el disolvente fue evaporado a presión reducida, el sólido resultante fue suspendido en una disolución de K_2CO_3 en H_2O y fue extraído usando como fase orgánica AcOEt. Las fases orgánicas fueron secadas sobre $MgSO_4$ y el disolvente orgánico fue evaporado a presión reducida para dar lugar a las imidazopiridinas correspondientes.

25 **4-(Imidazo[1,2-a]piridin-7-il)fenol (12)**

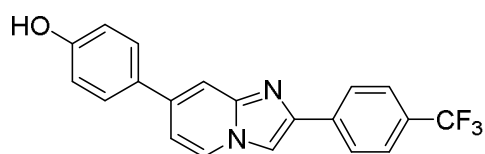
Empleando el método experimental A2, una mezcla de 4-(4-hidroxifenil)-2-aminopiridina (30 mg, 0,161 mmol), $NaHCO_3$ (83 mg, 0,1 g/5 mL EtOH) y 2-cloroacetaldehído (20 μ L, 0,322 mmol) en EtOH (4 mL) fue agitada a 90 °C para obtener 25 mg, Rto 74%.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,53 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H); 7,89 (s, 1H), 7,70 (s, 1H); 7,61 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H); 7,54 (s, 1H); 7,20 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H); 6,86 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H).

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173,7; 158,6; 145,2; 136,2; 133,5; 127,5; 126,7; 116,0; 112,4; 111,3; 111,0.

- 5 **HPLC-MS (ES⁺)**: CH₃CN/H₂O 2:98 a 95:5 (5 min), tr = 3,95 min, [M+H⁺] = 211.

4-(2-(4-(Trifluorometil)fenil)imidazo[1,2-a]piridin-7-il)fenol (13)



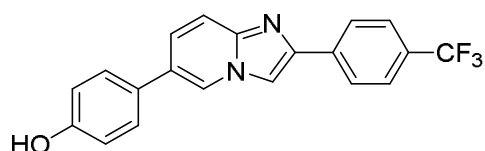
- 10 Empleado el método experimental A2 una mezcla de 4-(4-hidroxifenil)-2-aminopiridina (30 mg, 0,161 mmol), NaHCO₃ (83 mg, 0,1 g/5 mL EtOH) y 2-bromo-1-(4-(trifluorometil)fenil)etan-1-ona (30 mg, 0,322 mmol) en EtOH (4 mL) fue agitada a 90 °C. El crudo de reacción fue purificado en columna cromatográfica usando CH₂Cl₂/MeOH como eluyente para obtener 31 mg, Rto 54%.

- 15 **RMN ¹H** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,74 (s, 1H); 8,56 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H); 8,52 (s, 1H); 8,19 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H); 7,80 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H); 7,68 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H); 7,26 (dd, *J* = 7,2; 1,9 Hz, 1H); 6,89 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H);

RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158,4; 146,2; 143,6; 138,4; 137,5; 128,7; 128,2; 127,3; 126,4; 126,1 (q, *J*_{CF} = 3,8 Hz); 124,8 (q, *J*_{CF} = 271 Hz); 116,3; 112,2; 111,8; 110,5.

- 20 **HPLC-MS (ES⁺)**: CH₃CN/H₂O 30: 70 a 95:5 (10 min), tr = 1,96 min, [M+H⁺] = 355.

4-(2-(4-(Trifluorometil)fenil)imidazo[1,2-a]piridin-6-il)fenol (15)



- Empleado el método experimental A2 una mezcla de 5-(4-hidroxifenil)-2-aminopiridina (50 mg, 0,268 mmol), NaHCO₃ (83 mg, 0,1 g/5 mL EtOH) y 2-bromo-1-(4-
- 25

(trifluorometil)fenil)etan-1-ona (215 mg, 0,805 mmol) en EtOH (4 mL) fue agitada a 90 °C. El crudo de reacción fue purificado en columna cromatográfica para obtener 31 mg, Rto 31%.

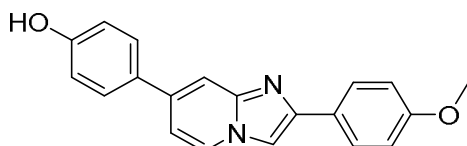
RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,65 (s, 1H); 8,77 (dd, *J* = 1,9; 1,0 Hz, 1H); 8,52 (s, 1H); 8,20 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H); 7,80 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H); 7,65 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H); 7,58 (dd, *J* = 9,4; 1,8 Hz, 1H); 7,56 - 7,53 (m, 2H); 6,89 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157,4; 144,1; 142,9; 137,9; 127,7; 127,1; 126,0; 125,7; 125,6 (q, *J*_{CF} = 3,8 Hz); 125,6; 124,3 (q, *J*_{CF} = 272,5 Hz); 122,9; 116,7; 115,9; 110,8.

HPLC-MS (ES⁺): CH₃CN/H₂O 30:70 a 95:5 (10 min), tr = 2,91 min, [M+H⁺] = 355.

10

4-(2-(4-Metoxifenil)imidazo[1,2-*a*]piridin-7-il)fenol (16)



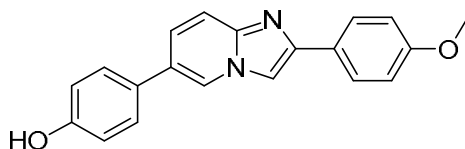
Empleando el método experimental A2 una mezcla de 4-(2-aminopiridin-4-il)fenol (69 mg, 0,386 mmol) y 2-bromo-1-(4-(metoxi)fenil)etan-1-ona (103 mg, 0,464 mmol) en acetona (5 mL) fue agitada a 90 °C. El crudo de reacción fue filtrado (0,22 μM) para obtener 82 mg, Rto 67%.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,79 (s, 1H); 8,58 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H); 8,33 (s, 1H); 7,89 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H); 7,77 (s, 1H); 7,69 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H); 7,34 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H); 7,05 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H); 6,91 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H); 3,81 (s, 3H).

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159,4; 158,2; 144,2; 142,7; 127,9; 127,9; 127,0; 127,0; 124,7; 115,9; 114,3; 112,1; 109,6; 108,0; 55,2.

HPLC-MS (ES⁺): CH₃CN/H₂O 15:85 a 95:5 (5 min), tr = 4,09 min, [M+H⁺] = 317.

4-(2-(4-Metoxifenil)imidazo[1,2-*a*]piridin-6-il)fenol (17)



Empleando el método experimental A2 una mezcla de 4-(6-aminopiridin-3-il)fenol (70 mg, 0,375 mmol) y 2-bromo-1-(4-(metoxi)fenil)etan-1-ona (103 mg, 0,464 mmol) en acetona (5 mL) fue agitada a 90 °C. El crudo de reacción fue filtrado para obtener 71 mg, Rto 60%.

5

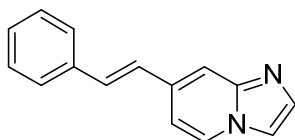
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,64 (s, 1H); 8,76 (s, 1H); 8,30 (s, 1H); 7,90 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H); 7,61 (m, 2H); 7,54 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H); 7,04 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H); 6,89 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H); 3,81 (s, 3H).

RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159,2; 157,4; 143,1; 127,7; 127,0; 126,9; 125,8; 125,7; 122,8; 115,8; 115,6; 114,2; 108,5; 55,1.

10

HPLC-MS (ES⁺): CH₃CN/H₂O 15:85 a 95:5 (5 min), tr = 4,13 min, [M+H⁺] = 317.

(*E*)-7-Estirilimidazo[1,2-*a*]piridina (19)



Empleando el método experimental A2 una mezcla de (*E*)-4-estirilpiridin-2-amina (50 mg, 0,254 mmol) y 2-cloroacetaldehído (19 μL, 0,305 mmol) en acetona (6 mL) fue agitada a 40 °C para obtener 53 mg, Rto 94%.

15

RMN ¹H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 8,00 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H); 7,54 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H); 7,46 (d, *J* = 8,8 Hz, 3H); 7,31 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 7,26 – 7,17 (m, 2H); 7,03 (dd, *J* = 16,5; 6,5 Hz, 3H).

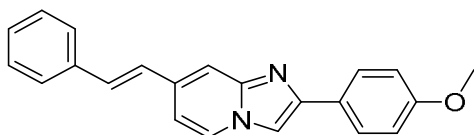
20

RMN ¹³C (101 MHz, Cloroformo-*d*) δ 145,8; 136,7; 134,4; 134,1; 130,6; 128,9; 128,3; 126,8; 125,5; 115,7; 112,6; 110,2.

HPLC-MS (ES⁺): CH₃CN/H₂O 5:95 a 95:5 (5 min), tr = 4,59 min, [M+H⁺] = 221.

(*E*)-2-(4-Metoxifenil)-7-estirilimidazo[1,2-*a*]piridina (20)

25



Empleando el método experimental A2 una mezcla de (*E*)-4-estirilpiridin-2-amina (63 mg, 0,323 mmol) y 2-bromo-1-(4-(trifluorometil)fenil)etan-1-ona (88 mg, 0,387 mmol) en acetona (2 mL) fue agitada a 40 °C. El crudo de reacción fue filtrado (0,22 µM) para
5 obtener 60 mg, Rto 47%.

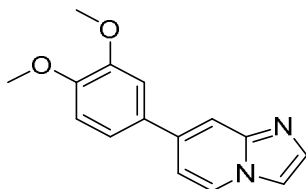
RMN ¹H (500 MHz, Cloroformo-*d*) δ 7,98 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H); 7,73 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H); 7,67 (s, 1H); 7,44 (s, 1H); 7,39 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H); 7,22 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H); 7,14 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H); 7,01 (d, *J* = 16,3 Hz, 1H); 6,98 - 6,92 (m, 2H); 6,81 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H); 3,69 (s, 3H).

RMN ¹³C (126 MHz, Cloroformo-*d*) δ 159,4; 145,5; 145,3; 136,2; 134,3; 130,2; 128,5;
10 127,9; 127,0; 126,4; 126,45; 125,7; 125,2; 114,3; 113,9; 109,9; 107,5; 55,1.

HPLC-MS (ES⁺): CH₃CN/H₂O 15:85 a 95:5 (5 min), tr = 4,81 min, [M+H⁺] = 327.

7-(3,4-Dimetoxifenil)imidazo[1,2-a]piridina (21)

15

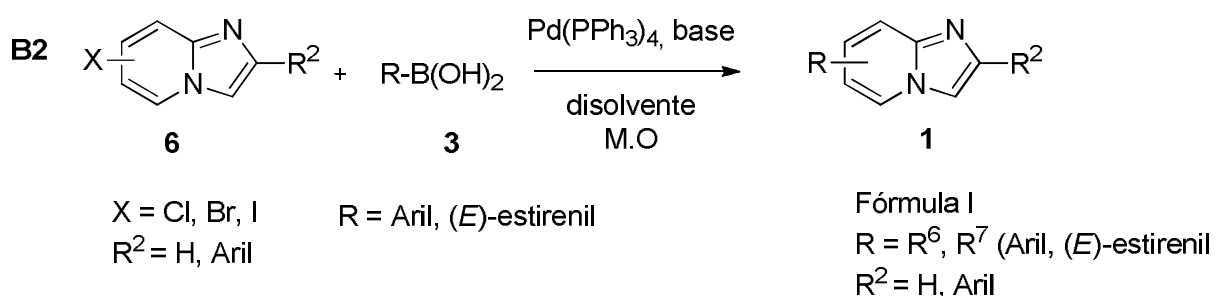
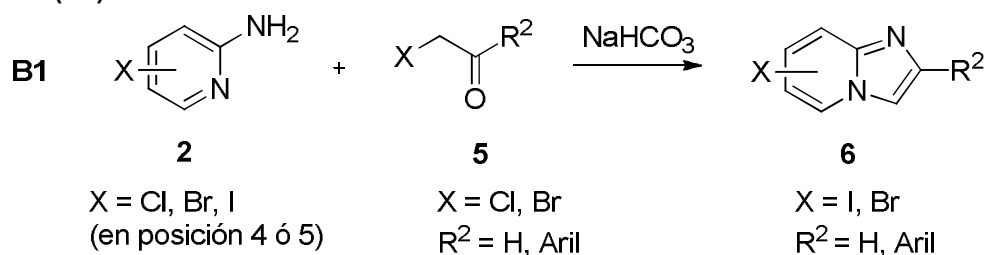


Empleando el método experimental A2 una mezcla de 4-(3,4-dimetoxifenil)piridin-2-amina (50 mg, 0,217 mmol), NaHCO₃ (50 mg, 0,1 g/5 mL EtOH) y 2-cloroacetaldehido (27 µL, 0,434 mmol) en EtOH (2,5 mL) fue agitada a 90 °C para obtener 52 mg, Rto 94%.

20 **RMN ¹H** (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 8,13 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H); 7,76 (s, 1H); 7,63 (s, 1H); 7,55 (s, 1H); 7,20 (dd, *J* = 8,3; 2,2 Hz, 1H); 7,15 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 7,04 (dd, *J* = 7,1; 1,8 Hz, 1H); 6,95 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 3,95 (s, 3H); 3,92 (s, 3H).

RMN ¹³C (101 MHz, Cloroformo-*d*) δ 149,5; 146,1; 137,4; 134,3; 131,6; 125,6; 119,3; 113,9; 112,3; 111,9; 111,7; 109,9; 56,1.

25 **HPLC-MS (ES⁺):** CH₃CN/H₂O 10:90 a 95:5 (5 min), tr = 1,46 min, [M+H⁺] = 255.

Procedimiento experimental B: Heterociclación (B1) y reacción de acoplamiento de Suzuki (B2)

5

Heterociclación (B1):

Se añade la correspondiente α -halo-cetona (1,5 - 2 eq) a una mezcla de la correspondiente halo-2-aminopiridina y NaHCO_3 (0,1 g/5 mL -si se utilizó EtOH como disolvente-) en EtOH. La mezcla de reacción fue calentada a una temperatura superior a la temperatura de ebullición del disolvente empleado, en cada caso, durante 18 horas. Transcurrido el tiempo de reacción el disolvente fue evaporado a presión reducida y el crudo de reacción fue suspendido en una disolución acuosa de K_2CO_3 y posteriormente fue extraído utilizando AcOEt. Las fases orgánicas fueron secadas sobre MgSO_4 anhidro, filtradas y el disolvente fue evaporado a presión reducida para obtener las correspondientes imidazo[1,2-a]piridinas.

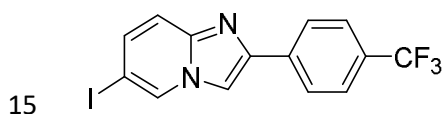
Reacción de Suzuki (B2):

Se añade la correspondiente halo-imidazo[1,2-a]piridina (1 eq) a una mezcla del correspondiente ácido borónico (1,2 eq), y la correspondiente base (NaHCO_3 (1,3 eq) o K_2CO_3 (1,1 eq)) y de $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (2 mmol%) en 1,4-dioxano/ H_2O (3:1) o DME/ H_2O (4:1) - dependiendo de la reacción- en un tubo de microondas. La mezcla se calienta a 130 °C

durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de reacción el disolvente fue evaporado a presión reducida y el crudo de reacción fue purificado en columna cromatográfica para obtener las correspondientes imidazo[1,2-a]piridinas.

- 5 Se añade la correspondiente halo-imidazo[1,2-a]piridina (1 eq) a una mezcla del correspondiente ácido borónico (1,2 eq) y la correspondiente base (NaHCO_3 (1,3 eq) o K_2CO_3 (1,1 eq)) y de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (2 mmol%) en 1,4-dioxano/ H_2O (3:1) o DME/ H_2O (4:1) - dependiendo de la reacción. La mezcla se calienta a reflujo durante 18 h. Transcurrido el tiempo de reacción el disolvente fue evaporado a presión reducida y el crudo de reacción
- 10 fue purificado en columna cromatográfica para obtener las correspondientes imidazo[1,2-a]piridinas.

6-Iodo-2-(4-(trifluorometil)fenil)imidazo[1,2-a]piridina (25)



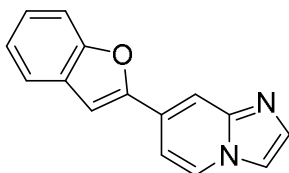
- Empleando el método experimental B1 una mezcla de 5-iodo-2-aminopiridina (41 mg, 0,136 mmol), NaHCO_3 (80 mg, 0,1 g/5 mL EtOH) y 2-bromo-1-(4-(trifluorometil)fenil)etan-1-ona (60 mg, 0,204 mmol) en EtOH (4 mL) fue agitada a 90 °C y el crudo de reacción fue purificado en columna cromatográfica usando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ como eluyente para
- 20 obtener 25 mg, Rto 47%.

RMN ^1H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 8,40 (s, 1H); 8,03 (d, J = 8,0 Hz, 2H); 7,85 (s, 1H); 7,68 (d, J = 8,1 Hz, 2H); 7,45 (d, J = 9,4 Hz, 1H); 7,37 (dd, J = 9,5; 1,6 Hz, 1H).

RMN ^{13}C (101 MHz, Cloroformo-*d*) δ 144,6; 144,4; 136,6; 133,4; 126,3; 125,9 (q, J_{CF} = 273 Hz); 124,3 (q, J_{CF} = 3,8 Hz); 118,7; 108,7; 75,8.

- 25 **HPLC-MS (ES $^+$)**: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 40:60 a 95:5 (10 min), t_r = 5,57, $[\text{M}+\text{H}^+]$ = 389.

7-(Benzofuran-2-il)imidazo[1,2-a]piridina. (26) PS1906



Empleando el método experimental A1, se añaden sucesivamente 4-iodo-2-aminopiridina (440 mg, 2.15 mmol), ácido benzofuran-2-borónico (584 mg, 3.6 mmol), Pd(PPh₃)₄ (248 mg, 10 mol%), y Na₂CO₃ (477 mg, 4.5 mmol) a una mezcla de dioxano (74 mL) y H₂O (6 mL). La mezcla se mantiene a reflujo bajo argón durante 18 h. Tras eliminación del disolvente a vacío, el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna empleando CH₂Cl₂/MeOH como eluyente para obtener 431 mg, Rto 95 %. Empleando el método experimental A2, el producto así obtenido (5-(benzofuran-2-il)piridin-2-amina) se disolvió en EtOH (15 mL) y se añadieron sucesivamente una disolución de cloroacetaldehído (40% en agua, 1.0 mL) y NaHCO₃ (344 mg, 4.1 mmol). La mezcla se mantuvo a reflujo durante 18 h. Tras dilución con acetato de etilo, filtración a través de celita, lavado con disolución saturada de cloruro sódico, secado de la fase orgánica sobre MgSO₄, filtración, y evaporación del disolvente a vacío, el crudo de reacción fue purificado en columna cromatográfica usando CH₂Cl₂/MeOH como eluyente para obtener 440 mg del compuesto **26**. Rto 92 %.

Empleando el método experimental B2 se disolvió el ácido benzofuran-2-borónico (62 mg, 0,106 mmol), K₂CO₃ (46 mg, 0,106 mmol), Pd(PPh₃)₄ (6 mg, 2 mol%) y 7-bromoimidazo[1,2-a]piridina (50 mg, 0,082 mmol) en 5 mL de una mezcla de DME/ H₂O (4:1). El crudo de reacción fue purificado en columna cromatográfica usando CH₂Cl₂/MeOH como eluyente para obtener 42 mg, Rto 70 %.

RMN ¹H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 8,09 - 8,00 (m, 2H); 7,62 (s, 1H); 7,55 - 7,43 (m, 3H); 7,29 - 7,21 (m, 1H); 7,20 - 7,11 (m, 2H); 7,01 (s, 1H).

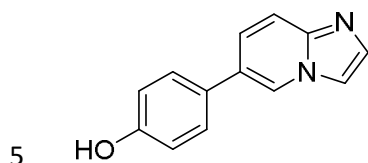
RMN ¹³C (101 MHz, Cloroformo-*d*) δ 155,2; 153,8; 145,5; 135,0; 129,0; 126,7; 125,8; 125,1; 123,3; 121,2; 113,0; 112,9; 111,4; 109,7; 103,2.

HPLC-MS (ES⁺): CH₃CN/H₂O 15:85 a 95:5 (5 min), tr = 1,39 min, [M+H⁺] = 235.

El compuesto PS1906, tiene también efecto antiinflamatorio en un modelo murino *in vivo* de daño pulmonar agudo (ALI en inglés), donde presenta grandes diferencias macroscópicas y un significativamente diferente al grupo de ratones enfermos tratados con LPS. El análisis por citometría de flujo del lavado broncoalveolar evidenció un efecto

antiinflamatorio dependiente de dosis del compuesto PS1906, tanto en neutrófilos como en linfocitos y en el recuento total de células infiltradas.

4-(Imidazo[1,2-a]piridin-6-il)fenol (27)



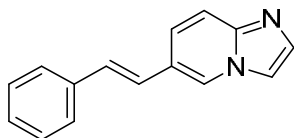
Empleando el método experimental B2 se disolvió el ácido 4-hidroxifenil borónico (20 mg, 0,147 mmol), K_2CO_3 (22 mg, 0,160 mmol), $Pd(PPh_3)_4$ (2 mg, 2 mmol%) y 6-iodoimidazo[1,2-a]piridina (30 mg, 0,123 mmol) en 3 mL de una mezcla de DME/ H_2O (4:1). El crudo de reacción fue purificado en columna cromatográfica usando $CH_2Cl_2/MeOH$ como eluyente para obtener 28 mg, Rto 70 %.

RMN 1H (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 9,60 (s, 1H); 8,78 (s, 1H); 7,93 (s, 1H); 7,63 – 7,55 (m, 2H); 7,55 – 7,48 (m, 3H); 6,87 (d, J = 8,6 Hz, 2H).

RMN ^{13}C (101 MHz, $DMSO$) δ 157,2; 143,5; 133,3; 127,6; 127,3; 125,1; 124,4; 122,9; 116,7; 115,8; 113,3.

15 **HPLC-MS (ES^+)**: CH_3CN/H_2O 2:98 a 95:5 (5 min), t_r = 3,92 min, $[M+H]^+$ = 211.

(*E*)-6-Estirilimidazo[1,2-a]piridina (28)



Empleando el método experimental B2 se disolvió el ácido estilil borónico (22 mg, 0,147 mmol), $NaHCO_3$ (11 mg, 0,135 mmol), $Pd(PPh_3)_4$ (2 mg, 2 mmol%) y 6-iodoimidazo[1,2-a]piridina (30 mg, 0,123 mmol) en 3 mL de una mezcla de 1,4-dioxano/ H_2O (3:1). El crudo de reacción fue purificado en columna cromatográfica usando $CH_2Cl_2/MeOH$ como eluyente para obtener 25 mg, Rto 91 %.

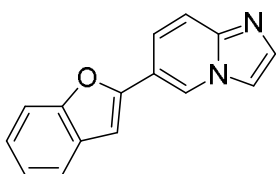
25 **RMN 1H** (400 MHz, $Cloroformo-d$) δ 8,05 (s, 1H); 7,57 - 7,50 (m, 2H); 7,47 (s, 1H); 7,46 - 7,36 (m, 3H); 7,34 - 7,25 (m, 2H); 7,25 - 7,17 (m, 1H); 6,99 (d, J = 16,3 Hz, 1H); 6,92 (d, J = 16,3 Hz, 1H).

RMN ^{13}C (101 MHz, Cloroformo- d) δ 145,1; 136,9; 134,1; 129,5; 128,9; 128,1; 126,5; 124,3; 124,2; 123,5; 122,4; 117,9; 112,9.

HPLC-MS (ES $^{+}$): CH₃CN/H₂O 10:90 a 95:5 (5 min), tr = 4,13 min, [M+H $^{+}$] = 221.

5

6-(Benzofuran-2-il)imidazo[1,2-a]piridina (29)



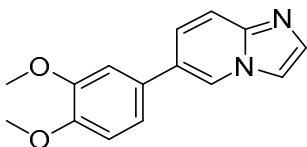
Empleando el método experimental B2 se disolvió el ácido benzofuran-2-borónico (16 mg, 0,106 mmol), K₂CO₃ (15 mg, 0,106 mmol), Pd(PPh₃)₄ (2 mg, 2 mmol%) y 6-iodoimidazo[1,2-a]piridina (20 mg, 0,082 mmol) en 3 mL de una mezcla de DME/H₂O (4:1). El crudo de reacción fue purificado en HPLC semipreparativo (gradiente: 10: 90 a 40: 60 CH₃CN/H₂O durante 30 min) para obtener 10 mg, Rto 52 %.

RMN ^1H (400 MHz, Acetona- d_6) δ 9,07 (s, 1H); 8,02 (s, 1H); 7,74 (dd, J = 9,5; 1,8 Hz, 1H); 7,70 – 7,60 (m, 3H); 7,56 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 7,41 – 7,32 (m, 2H); 7,27 (t, J = 7,4 Hz, 1H).

RMN ^{13}C (101 MHz, Acetona- d_6) δ 155,6; 153,9; 145,4; 135,0; 130,0; 125,6; 124,1; 123,9; 122,5; 121,9; 118,5; 117,0; 114,8; 111,7; 103,2.

HPLC-MS (ES $^{+}$): CH₃CN/H₂O 10:90 a 95:5 (5 min), tr = 4,40 min, [M+H $^{+}$] = 235.

6-(3,4-Dimetoxifenil)imidazo[1,2-a]piridina (30)



Empleando el método experimental B2 se disolvió el ácido 3,3,4-dimetoxifenil borónico (33 mg, 0,184 mmol), Na₂CO₃ (20 mg, 0,246 mmol), Pd(PPh₃)₄ (7 mg, 5 mmol%) y 6-iodoimidazo[1,2-a]piridina (30 mg, 0,123 mmol) en 3 mL de una mezcla de

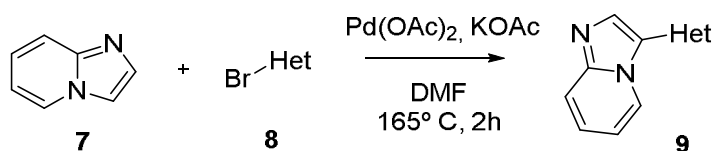
H₂O/MeOH/Tolueno (1:2:8). El crudo de reacción fue purificado en columna cromatográfica usando CH₂Cl₂/MeOH como eluyente para obtener 30 mg, Rto 96 %.

RMN ¹H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 8,25 (s, 1H); 7,64 (t, *J* = 10,9 Hz, 3H); 7,39 (dd, *J* = 9,3; 1,9 Hz, 1H); 7,09 (dd, *J* = 8,2; 2,2 Hz, 1H); 7,03 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H); 6,95 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H); 3,95 (s, 3H); 3,92 (s, 3H).

RMN ¹³C (101 MHz, Cloroformo-*d*) δ 149,5; 149,2; 144,7; 134,0; 130,3; 126,9; 125,4; 122,6; 119,5; 117,7; 112,8; 111,8; 110,3; 56,1; 56,1.

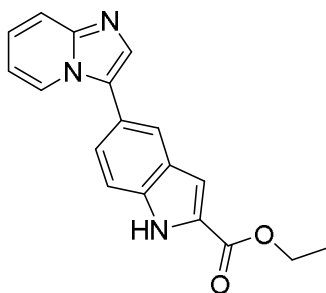
HPLC-MS (ES⁺): CH₃CN/H₂O 10:90 a 95:5 (5 min), tr = 1,39 min, [M+H⁺] = 255.

10 Procedimiento experimental C: Reacción de Heck



Se añade Pd(OAc)₂ (10 mmol%) a una disolución de la correspondiente imidazo[1,2-*a*]piridina (1 eq), el correspondiente haloheteroaril (1,3 eq) y KOAc (2 eq) en DMF (4 mL) en un tubo de microondas, bajo corriente de argón. Después de irradiar el tubo a 165 °C durante 2 horas se añade a la mezcla de reacción una solución concentrada de KOH (1 mL) y se deja bajo agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se añade H₂O y la mezcla de reacción es extraída con AcOEt. Las fases orgánicas se secan sobre MgSO₄ y el disolvente es evaporado a presión reducida. El crudo de reacción se purifica en columna cromatográfica usando una mezcla de Hexano/AcOEt para obtener las correspondientes imidazo[1,2-*a*]piridinas.

Etil 5-(imidazo[1,2-*a*]piridin-3-il)-1*H*-indol-2-carboxilato (31)



Empleando el método experimental C se añade $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (15 mg, 10 mmol%) a una disolución de imizado[1,2-a]piridina (80 mg, 0,677 mmol), 5-bromo-1*H*-indol-2-carboxilato de etilo (0,235 mg, 0,880 mmol) y KOAc (86 mg, 0,880 mmol) en DMF (4 mL). El crudo de reacción se purificó en columna cromatográfica usando una mezcla de Hexano/AcOEt como eluyente para obtener 130 mg, Rto 62%.

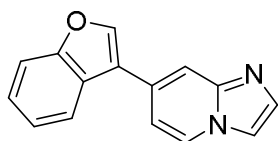
RMN ^1H (400 MHz, Cloroformo-*d*): δ 9,61 (s, 1H); 8,33 (d, J = 6,9 Hz, 1H); 7,86 (s, 1H); 7,70 (d, J = 11,5 Hz, 2H); 7,58 (d, J = 8,4 Hz, 1H); 7,48 (d, J = 8,5 Hz, 1H); 7,29 (s, 1H); 7,20 (t, J = 7,9 Hz, 1H); 6,80 (t, J = 6,9 Hz, 1H); 4,44 (q, J = 7,1 Hz, 2H); 1,43 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (101 MHz, Cloroformo-*d*): δ 161,9; 145,8; 136,7; 132,1; 128,8; 128,1; 126,4; 126,0; 124,2; 123,5; 122,6; 121,8; 118,2; 113,0; 112,6; 108,7; 61,3; 14,5.

HPLC-MS (ES $^+$): $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 10:90 a 90:10 (5 min), t_r = 4,24, $[\text{M}+\text{H}^+] = 306$.

15

7-(Benzofuran-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (**32**)

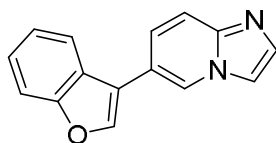


La síntesis de **32** fue realizada empleando el procedimiento general B2. Utilizando 7-bromoimidazo[1,2-a]piridina (0,25 mmol), ácido benzofuran-3-borónico (0,33 mmol) en DME/ H_2O (4:1). Obteniendo un sólido de color blanco amarillento con un rendimiento de 82%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.21 (d, J = 7.0 Hz, 1H, **5**), 7.98 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 7.97 – 7.90 (m, 2H), 7.69 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.61 – 7.55 (m, 1H), 7.44 – 7.33

(m, 2H), 7.09 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, **6**). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 156.32, 142.59, 134.44, 132.54, 128.94, 128.85, 126.31, 126.03, 125.45, 123.87, 120.73, 115.14, 112.96, 112.79, 112.41. MS (ES^+ , m/z), 235 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

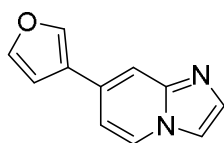
5 **6-(Benzofuran-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (33)**



La síntesis de **33** fue realizada empleando el procedimiento general B2. Utilizando 6-iodoimidazo[1,2-a]piridina (0,20 mmol), ácido benzofuran-3-borónico (0,26 mmol) en DME/ H_2O (4:1). Obteniendo un sólido verde oscuro con un rendimiento de 68%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.42 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.79 – 7.76 (m, 1H), 7.74 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.58 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.44 (dd, $J = 9.3, 1.7$ Hz, 1H), 7.42 – 7.38 (m, 1H), 7.35 (td, $J = 7.6, 1.0$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 155.9, 144.8, 141.7, 134.0, 126.1, 125.5, 125.2, 123.5, 123.2, 120.0, 118.6, 118.3, 117.9, 113.0, 112.2. MS (ES^+ , m/z), 235 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-(Furan-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (34)

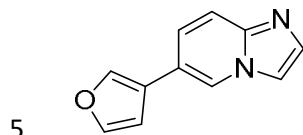


La síntesis de **34** fue realizada empleando el procedimiento general B2. Utilizando 7-bromoimidazo[1,2-a]piridina (0,25 mmol), ácido furan-3-borónico (0,33 mmol) en 1,4-dioxano/ H_2O (3:1). Obteniendo un aceite marrón con un rendimiento de 73%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.26 (dd, $J = 1.7, 1.0$ Hz, 1H, **10**), 7.75 – 7.74 (m, 1H, **3**), 7.71 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, **5**), 7.66 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, **2**), 7.61 (m, 1H, **8**), 7.53 – 7.52 (m, 1H, **12**), 7.37 (dd, $J = 9.3, 1.7$ Hz, 1H, **6**), 6.67 (dd, $J = 1.9, 0.9$ Hz, 1H, **11**). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 144.29 (C12), 138.84 (C3), 132.13 (C2), 132.05 (C8a or C10a), 128.5 (C8a or C10a), 124.90 (C6), 122.14 (C10), 121.6 (C5) 117.64

(C5), 112.76 (C8), 108.33 (C11). HPLC-MS (ES⁺): CH₃CN/H₂O 20:95 to 95:20, *t_r* = 0.98 (92%); MS (ES⁺, *m/z*), 185 [M+H]⁺.

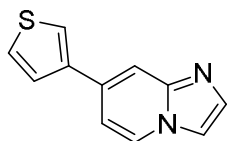
6-(Furan-3-il)imidazo[1,2-*a*]piridina (**35**)



La síntesis de **35** fue realizada empleando el procedimiento general B2. Utilizando 6-iodoimidazo[1,2-*a*]piridina (0,25 mmol), ácido furan-3-borónico (0,32 mmol) en 1,4-dioxano/H₂O (3:1). Obteniendo un aceite de color marrón con un rendimiento de 58%.

10 ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.11 (dd, *J* = 7.0, 1.0 Hz, 1H, **12**), 7.81 (s, 1H, **5**), 7.71 (m, 1H, **10**), 7.63 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, **2**), 7.56 (m, 1H, **3**), 7.52 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H, **7**), 6.94 (dd, *J* = 7.0, 1.7 Hz, 1H, **11**), 6.78 - 6.77 (m, 1H, **8**). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 146.1 (C10a), 144.7 (C2), 139.8 (C5), 134.2 (C3), 126 (C8a), 125.7 (C12), 125.2 (C6), 113.3 (C7), 112.7 (C10), 111.9 (C11), 108.8 (C8). HPLC-MS
15 (ES⁺): CH₃CN/H₂O 2:50 to 50:2, *t_r* = 1.67 (98%); MS (ES⁺, *m/z*), 185 [M+H]⁺.

7-(Tiofen-3-il)imidazo[1,2-*a*]piridina (**36**)

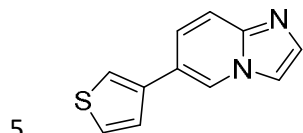


La síntesis de **36** fue realizada empleando el procedimiento general B2. Utilizando 7-bromoimidazo[1,2-*a*]piridina (0.30 mmol), ácido tiofen-3-borónico (0.39 mmol) en 1,4-dioxano/H₂O (3:1). Obteniendo un sólido de color rojo oscuro con un rendimiento de 87%.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.12 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, **5**), 7.82 (s, 1H, **8**), 7.65 (s, 1H), 7.58 - 7.54 (m, 2H), 7.45 - 7.42 (m, 2H), 7.07 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, **6**). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 146.0, 140.1, 134.4, 132.3, 127.1, 125.9 (C5), 125.8, 121.6,
25

113.7 (C8), 112.3, 112.1 (C6). HPLC-MS (ES⁺): CH₃CN/H₂O 2:50 to 50:2, *t_r* = 4.41 (99%); MS (ES⁺, *m/z*), 200 [M+H]⁺.

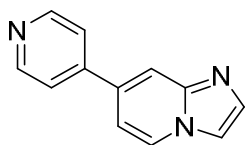
6-(Tiofen-3-il)imidazo[1,2-*a*]piridina (**37**)



La síntesis de **37** fue realizada empleando el procedimiento general B2. Utilizando 6-iodoimidazo[1,2-*a*]piridina (0,25 mmol), ácido tiofen-3-borónico (0,32 mmol) en 1,4-dioxano/H₂O (3:1). Obteniendo un sólido de color marrón grisáceo con un rendimiento de 82%.

10 ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.16 (s, 1H), 7.47 – 7.43 (m, 4H), 7.30 – 7.23 (m, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.08 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 144.7, 138.2, 134.1, 132.2, 127.2, 125.8, 125.0, 122.5, 120.9, 117.9, 112.9. HPLC-MS (ES⁺): CH₃CN/H₂O 5:95 to 95:5, *t_r* = 4.21 (99%); MS (ES⁺, *m/z*), 200 [M+H]⁺.

15 7-(Piridin-4-il)imidazo[1,2-*a*]piridina (**38**)

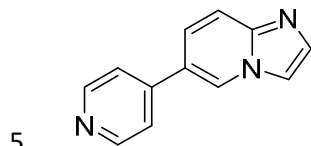


20 La síntesis de **38** fue realizada empleando el procedimiento general B2. Utilizando 7-bromoimidazo[1,2-*a*]piridina (0,41 mmol), ácido piridinil-4-borónico (0,52 mmol) en 1,4-dioxano/H₂O (3:1). Obteniendo un sólido de color marrón claro con un rendimiento de 61%.

¹H NMR (500 MHz, MeOD₄) δ 8.65 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, **10**), 8.59 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, **5**), 7.99 (s, 1H, **8**), 7.95 (s, 1H, **3**), 7.86 – 7.83 (m, 2H, **11**), 7.69 (s, 1H, **2**), 7.37 (dd, *J* = 7.2, 1.8 Hz, 1H, **6**). ¹³C NMR (126 MHz, MeOD₄) δ 150.9 (C10), 148.0 (C11a), 146.4 (C8a), 136.1 (C7), 134.7 (C2), 128.6 (C5), 122.8 (C11), 115.3 (C8),

114.9 (C3), 112.6 (C6). HPLC-MS (ES⁺): CH₃CN/H₂O 2:95 to 95:2, *t_r* = 0.96 (97%); MS (ES⁺, *m/z*), 196 [M+H]⁺.

6-(Piridin-4-il)imidazo[1,2-*a*]piridina (39)

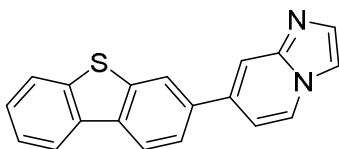


La síntesis de **20** fue realizada empleando el procedimiento general B2. Utilizando 6-iodoimidazo[1,2-*a*]piridina (0,33 mmol), ácido piridinil-4-borónico (0,42 mmol) en 1,4-dioxano/H₂O (3:1). Obteniendo un sólido morado con un rendimiento de 70%.

¹H NMR (500 MHz, MeOD₄) δ 9.03 – 9.01 (m, 1H, **5**), 8.63 (dd, *J* = 4.7, 1.6 Hz, 2H, **10**), 7.98 (s, 1H, **3**), 7.79 (dd, *J* = 4.7, 2.0 Hz, 2H, **11**), 7.74 (dd, *J* = 9.4, 1.8 Hz, 1H, **7**), 7.69 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, **8**), 7.65 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, **2**). ¹³C NMR (126 MHz, MeOD₄) δ 150.8 (C10), 146.9 (C11a), 146.0 (C8a), 134.2 (C8), 126.9 (C5), 125.9 (C7), 124.9 (C6), 122.8 (C11), 117.9 (C2), 115.4 (C3). HPLC-MS (ES⁺): CH₃CN/H₂O 2:95 to 95:2, *t_r* = 0.71 (95%); MS (ES⁺, *m/z*), 196 [M+H]⁺.

15

7-(Dibenzotiofen-3-il)imidazo[1,2-*a*]piridina (40)

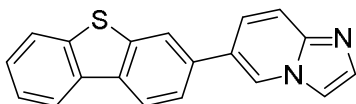


La síntesis de **40** fue realizada empleando el procedimiento general B2. Utilizando 7-bromoimidazo[1,2-*a*]piridina (0,41 mmol), ácido dibenzotiofen-4-borónico (0,52 mmol) en 1,4-dioxano/H₂O (3:1). Obteniendo un sólido naranja con un rendimiento de 90%.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (dd, *J* = 7.0, 0.5 Hz, 1H, **5**), 8.21 – 8.19 (m, 2H), 8.02 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 7.86 – 7.84 (m, 1H), 7.73 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.67 – 7.66 (m, 1H), 7.60 – 7.60 – 7.57 (m, 1H), 7.55 (dd, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1H), 7.49 – 7.47 (m, 2H), 7.22 (dd, *J* = 7.0, 1.8 Hz, 1H, **6**). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 145.91 (C8a), 139.73, 138.66, 137.30, 136.96, 135.95, 134.92 (C7), 132.52, 128.93, 127.44,

127.11, 126.12, 125.63 (C5), 124.98, 123.08, 121.63, 117.01, 113.59 (C6), 112.80. HPLC-MS (ES⁺): CH₃CN/H₂O 15:95 to 95:15, *t_r* = 4.50 (96%); MS (ES⁺, *m/z*), 301 [M+H]⁺.

5 **6-(Dibenzotiofen-3-il)imidazo[1,2-*a*]piridina (41)**

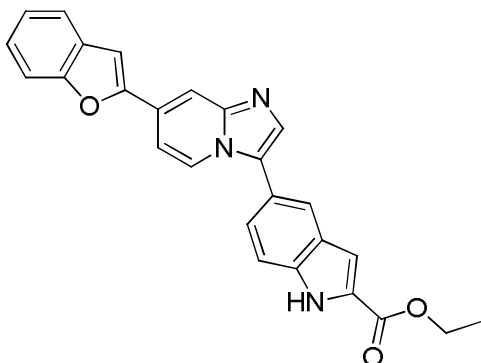


La síntesis de **41** fue realizada empleando el procedimiento general B2. Utilizando 6-iodoimidazo[1,2-*a*]piridina (0,33 mmol), ácido dibenzotiofen-4-borónico (0,42 mmol) en 1,4-dioxano/H₂O (3:1). Obteniendo un sólido de color amarillo claro con un rendimiento de 69%.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.50 (p, *J* = 1.3 Hz, 1H), 8.23 – 8.19 (m, 2H), 7.87 – 7.84 (m, 1H), 7.78 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.61 – 7.53 (m, 2H), 7.51 – 7.48 (m, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 144.80, 139.20, 138.80, 136.51, 135.65, 134.25, 132.71, 132.13, 127.14, 126.94, 126.08, 125.77, 125.27, 124.69, 124.54, 122.71, 121.88, 121.17, 117.93, 112.94. HPLC-MS (ES⁺): CH₃CN/H₂O 30:95 to 95:30, *t_r* = 1.17 (94%); MS (ES⁺, *m/z*), 301 [M+H]⁺.

Síntesis 5-(7-(Benzofuran-2-il)-3-imidazo[1,2-*a*]piridin)-1*H*-indol-2-carboxilato de etilo, (42)

20



Se disuelven 7-(benzofuran-2-il)imidazo[1,2-*a*]piridina (0,21 mmol) y 5-bromo-1*H*-indol-2-carboxilato de etilo (0,28 mmol) en DMF (6 mL) en un tubo de microondas,

bajo corriente de nitrógeno Se añade $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (10 mmol%). Transcurridas 2 horas bajo irradiación de microondas a 165 °C se añadió a la mezcla de reacción una solución concentrada de KOH (1 mL). Transcurrida 1 hora a temperatura ambiente se añadió H_2O y la mezcla de reacción fue extraída con AcOEt. Las

5 fases orgánicas fueron secadas sobre MgSO_4 anhidro, filtradas y el disolvente fue evaporado a presión reducida. El crudo de reacción fue purificado en columna cromatográfica usando como eluyente una mezcla de Hexano/AcOEt (1:4) para obtener el producto correspondiente (**42**) como un sólido amarillo con un rendimiento de 33%.

10 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 9.38 (s, 1H, **15**) 8.36 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, **5**), 8.18 (s, 1H, **11**), 7.89 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.62 – 7.59 (m, 2H), 7.56 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.51 (dd, $J = 8.5, 1.7$ Hz, 1H), 7.35 – 7.30 (m, 2H, **17**), 7.27 – 7.23 (m, 2H, **6**), 7.11 (s, 1H), 4.45 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, **23**), 1.45 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, **24**). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 162.0, 155.2, 154.0, 145.9, 136.7, 133.7, 129.1, 128.9, 128.0,

15 127.1, 126.3, 126.0, 125.2, 123.5 (C5), 123.4, 122.5, 121.6, 121.3, 113.2 (C11), 111.5, 109.8 (C6), 109.6, 108.8 (C17), 103.2, 61.2 (C23), 14.3 (C24). HPLC-MS (ES⁺): $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 40:95 to 95:40, $t_r = 1.10$ (91%); MS (ES⁺, m/z), 422 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

20 B. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA QUINASA $\text{TGF}\beta\text{-1R}$ (ALK5)

Se analizaron los siguientes compuestos de síntesis química (Tabla 1) para determinar su actividad inhibidora *in vitro* mediante la determinación de capacidad de fosforilación de la quinasa Alk5 ($\text{TGF}\beta\text{RI}$), siguiendo las indicaciones de Roth et al. (2010) (Roth GJ, Heckel A, Brandl T, Grauert M, Hoerer S, Kley JT, et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Indolinones as Inhibitors of the Transforming Growth Factor β Receptor I ($\text{TGF}\beta\text{RI}$). J Med Chem.2010;53(20):7287-95; <https://doi.org/10.1021/jm100812a>).

25

Fórmula Molecular / Pm	Referencia
C₁₈H₁₅N₃O₂ 305,337	31/ PS1801
C₂₀H₁₆N₂O₂ 316,36	16
C₁₃H₁₀N₂O 210,236	12
C₁₅H₁₀N₂O 234,258	26/ PS1906

Tabla 1. Listado inicial de compuestos analizados

Para ello se utilizó la proteína Alk5 recombinante de origen comercial (Abcam, ref. ab105908), así como el sistema comercial Kinase-Glo® Luminiscent kinase assay platform (Promega, ref. TB372), que determina el adenosin trifosfato (ATP) no consumido en la reacción de fosforilación por su conjugación a luciferina en una reacción catalizada por la enzima luciferasa en presencia de Mg²⁺. La luminiscencia observada es inversamente proporcional a la actividad quinasa. Como control de inhibición se utilizó el compuesto GW788388 Hydrate (Sigma-Aldrich ref. SML0116), ampliamente utilizado en este tipo de ensayos.

Inicialmente se puso a punto el ensayo de reacción de fosforilación con diluciones seriadas de sustrato (se estimó 1:8 como la mejor); y diferentes concentraciones de ATP, estimándose en este caso la concentración de 100 µM como la idónea. Así mismo se determinó la concentración de quinasa recombinante realizando ensayos con diluciones seriadas de la misma (de 20ng hasta 0.62 ng), determinándose 3 ng como la concentración idónea por pocillo (volumen final 100 µL).

Una vez determinadas la condiciones óptimas de la reacción, se probaron los compuestos de síntesis química, que inicialmente fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 1mM. A partir de dicha solución madre se realizaron diluciones en tampón quinasa (Tris-HCl pH 7.5 40 mM; MgCl₂ 20 mM; Albúmina suero bovino (BSA) 0.1 mg/mL) de 10µM y valorando concentraciones de 5 y 10 µM. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 50 µL en placas de plástico multipocillo (96 pocillos) de microtitulación Microtiter® Microlite™ 1+ (Thermo Scientific, ref. 7571), que permiten su uso para determinar luminiscencia en luminómetros.

La reacción incluía:

	Inhibidores (10 μ M).....	5 μ L
	ATP (1mM).....	5 μ L
	Alk5 quinasa (10 ng/uL)..	3 μ L
5	Tampón.....	37 μ L

La incubación fue 2h a temperatura ambiente en agitación y oscuridad siguiendo las instrucciones del sistema comercial.

Transcurrido ese tiempo se añadía 50 μ L de sustrato comercial (diluido 1:8), se dejaba en agitación 10 min a temperatura ambiente y se procedía a la lectura de la luminiscencia en un lector Luminoskan Ascent instrument (Thermo Scientific, Waltham, USA).

Todas las reacciones se realizaron por duplicado.

15 C. ESTUDIOS DE TOXICIDAD DE COMPUESTOS QUÍMICOS SINTETIZADOS EN CÉLULAS EN CULTIVO

El primer estudio que se realizó fue investigar si dichos compuestos presentaban toxicidad sobre células humanas en cultivo. Se analizó su efecto sobre macrófagos y sobre células de epitelio intestinal.

20

C.1. Ensayo de citotoxicidad (MTT).

Para cuantificar el porcentaje de células que se mantenían viables en cada uno de los experimentos, se evaluaron macrófagos THP-1-XBlue™-CD14 (InvivoGen de 8 a 13 pases), derivados de monocitos humanos THP-1, y que expresan de forma estable el gen de la enzima fosfatasa alcalina inducible por promotor de NF-kB y AP-1.

Se utilizó el colorante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetratozoliobromuro) (Biotium). Este ensayo está basado en la escisión de la sal de tetrazolio MTT (de color amarillo), para formar cristales de formazán (de color morado), producida por las células metabólicamente activas. El formazán se solubiliza con DMSO y su concentración se determina por espectrofotometría; la densidad óptica es proporcional al número de células viables.

En primer lugar, los monocitos THP1-XBlue™-CD14 (InvivoGen, de 8 a 13 pases) se diferenciaron a un fenotipo de tipo macrófago utilizando forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma Aldrich), que a 100 ng/mL se ha mostrado como la alternativa más eficaz para la obtención de macrófagos THP-1, con similitud con macrófagos mononucleares de sangre periférica (PBMC) (Starr et al., 2018). Para ello, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/mL en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con un 10% de FBS, penicilina, estreptomycin (ambas a una concentración de 100 µg/mL, Sigma-Aldrich) y PMA (100 ng/mL) (Sigma-Aldrich), y fueron cultivadas a 37 °C, 5% CO₂ durante 48 h. Posteriormente, el medio fue sustituido por uno equivalente, pero sin la suplementación con PMA, cultivándose esta vez las células a 37 °C, 5% CO₂ durante 24 h más. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS (10mM, pH 7.4), y se añadieron 100 µL de RPMI 1640 suplementado con penicilina y estreptomycin (100µg/mL) pero sin FBS. se sembraron en placas de 96 pocillos en condiciones idénticas a las empleadas en los ensayos de antiinflamación. A continuación, se lavaron las células con PBS y se trataron con diferentes compuestos: 1) PBS (10 µL) (control positivo de crecimiento, (vehículo)); 2) diferentes concentraciones de los compuestos químicos producidos (1 µM, 5 µM y 10 µM). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C, 5% CO₂ y, a continuación, se añadieron 10 µL de MTT a cada pocillo y la placa se incubó durante 4 horas a 37 °C, 5% CO₂. Los cristales de formazán formados se disolvieron en 180 µL de DMSO y la placa se incubó 20 minutos en agitación a temperatura ambiente. La absorbancia se midió en cada pocillo a 595 nm (problema) y a 655 nm (*background*), siguiendo las instrucciones del fabricante, en un equipo iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad). Las muestras fueron analizadas por triplicado. El porcentaje de células viables se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = (A_{595} - A_{655} \text{ Muestra problema}) / (A_{595} - A_{655} \text{ Control positivo}) \times 100$$

D. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA EN MACRÓFAGOS EN CULTIVO DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS

D.1. Ensayo de efecto antiinflamatorio

Para el estudio de la actividad antiinflamatoria de los compuestos químicos sintetizados hemos utilizado como biomarcador el factor de transcripción NF-κB, implicado en procesos de inflamación. Para ello se ha utilizado la línea celular THP-1-XBlue™-CD14 (InvivoGen), derivada de monocitos humanos THP-1, y que expresa de forma estable el gen de la enzima fosfatasa alcalina inducible por promotor de NF-κB y AP-1. Además,

estas células sobre-expresan de manera estable CD14, un receptor específico de macrófagos de tipo Toll (*Toll like receptors*, TLR), como TLR4. Así, al estimular este receptor CD14 (por ejemplo, con lipopolisacárido bacteriano, LPS, InvivoGen), las células THP1-XBlue™-CD14 activan esos factores de transcripción y consecuentemente la síntesis y secreción de fosfatasa alcalina, que es detectada fácilmente al añadir el sustrato comercial QUANTI-Blue™ (InvivoGen), que vira a color azul/púrpura en presencia de la fosfatasa secretada.

Las células THP1-XBlue™-CD14 (InvivoGen, de 8 a 13 pases) se procesaron como se mencionó anteriormente, diferenciándolas a macrófagos en presencia de PMA (Sigma Aldrich). A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS (10mM, pH 7.4), y se añadieron 100 µL de RPMI 1640 suplementado con penicilina y estreptomicina (100µg/mL) pero sin FBS. Posteriormente, las células en cultivo se trataron con: 1) 10 µL PBS (control negativo); 2) GW788388 (control positivo); y concentraciones de 5 µM de los compuestos sintetizados. Tras 1 h de incubación se añadió lipopolisacárido (LPS), de la bacteria *Escherichia coli* (InvivoGen), a una concentración final de 300 ng/mL, y los cultivos se mantuvieron a 37 °C, 5% CO₂ durante 24 h.

Tras ese tiempo, se extrajeron 20 µL de sobrenadante del medio de cultivo de cada pocillo y se pasaron a una nueva placa y se añadieron 180 µL del reactivo QUANTI-Blue™. Tras 5 h de incubación a 37 °C, se midió la absorbancia a 655 nm en los pocillos de la placa con un lector iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad). Las muestras fueron analizadas por cuadruplicado.

Por otro lado, el mismo proceso se realizó en paralelo, sin añadir el estimulante LPS a las placas, para comprobar la posible actividad inflamatoria intrínseca de dichos compuestos.

Se realizaron 8 réplicas de los ensayos biológicos.

E. ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR Y TOXICIDAD DE COMPUESTOS QUÍMICOS 31 (PS1801) Y 26 (PS1906)

Para estudiar si dichos compuestos de los ejemplos 26 y 31 presentaban toxicidad sobre células humanas en cultivo se analizó su efecto sobre macrófagos y sobre células de epitelio intestinal.

E.1. Cuantificación de viabilidad celular.

Para cuantificar el porcentaje de células que se mantenían viables en cada uno de los experimentos, se evaluaron macrófagos THP-1-XBlue™-CD14 (InvivoGen de 8 a 13 pases), derivados de monocitos humanos THP-1, y que expresan de forma estable el gen de la enzima fosfatasa alcalina inducible por promotor de NF- κ B y AP-1. Así mismo se evaluaron células de epitelio intestinal humano Caco-2 (ATCC®, HTB-37™ de 10 a 12 pases). Para ello, se usó azul tripán (Gibco) como tinción de exclusión. Este colorante penetra en aquellas células cuya membrana está deteriorada (signo de muerte celular), y tiñe su citoplasma de color azul oscuro. Para ello, las suspensiones celulares ensayadas se centrifugaron a 500 x g (5 min a 24 °C), los sedimentos celulares se resuspendieron en 0,1 mL de PBS, y, a continuación, 10 μ L se mezclaron con 10 μ L de azul tripán (0,4%) filtrado por 0,22 μ m. El porcentaje de células vivas se determinó en 10 μ L de la mezcla anterior empleando una cámara y un aparato de conteo celular Countess™ (Invitrogen). Se realizaron 8 réplicas de los ensayos biológicos.

15

E.2. Ensayo de citotoxicidad (MTT).

En esta segunda evaluación de citotoxicidad sobre THP-1-XBlue-CD14 y Caco-2, se utilizó la técnica previamente descrita con el colorante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolobromuro) (Biotium).

Para ello, ambos tipos de células se sembraron en placas de 96 pocillos en condiciones idénticas a las empleadas en los ensayos de antiinflamación. A continuación, se lavaron las células con PBS y se trataron con diferentes compuestos: 1) PBS (10 μ L) (control positivo de crecimiento, (vehículo)); 2) DMSO 20% (control negativo, ya que dosis elevadas de este compuesto son citotóxicas); 3) diferentes concentraciones de los compuestos PS1801 y PS1906 (1, 5 y 10 μ M). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C, 5% CO₂ y, a continuación, se añadieron 10 μ L de MTT a cada pocillo y la placa se incubó durante 4 horas a 37 °C, 5% CO₂. Los cristales de formazán formados se disolvieron en 180 μ L de DMSO y la placa se incubó 20 minutos en agitación a temperatura ambiente. La absorbancia se midió en cada pocillo a 595 nm (problema) y a 655 nm (*background*), siguiendo las instrucciones del fabricante, en un equipo iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad). Las muestras fueron analizadas por triplicado. Se realizaron 8 réplicas de los ensayos biológicos.

El porcentaje de células viables se calculó igualmente con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = (A_{595} - A_{655} \text{ Muestra problema}) / (A_{595} - A_{655} \text{ Control positivo}) \times 100$$

F. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA EN MACRÓFAGOS EN CULTIVO DE LOS COMPUESTOS PS1801 Y PS1906

F.1. Ensayo de efecto antiinflamatorio

Para el estudio de la actividad antiinflamatoria de los compuestos químicos PS1801 y PS1906 hemos seguido el protocolo previamente descrito utilizado como biomarcador el factor de transcripción NF-kB, usando la línea celular THP-1-XBlue™-CD14 (InvivoGen).

De manera análoga a los ensayos previamente descritos, los monocitos THP1-XBlue™-CD14 (InvivoGen, de 8 a 13 pases) se diferenciaron a un fenotipo de tipo macrófago utilizando PMA (Sigma Aldrich) y se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/mL en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con un 10% de FBS, penicilina, estreptomina (ambas a una concentración de 100 µg/mL, Sigma-Aldrich) y PMA (100 ng/mL) (Sigma-Aldrich), y fueron cultivadas a 37 °C, 5% CO₂ durante 48 h. Posteriormente, el medio fue sustituido por uno equivalente, pero sin la suplementación con PMA, cultivándose esta vez las células a 37 °C, 5% CO₂ durante 24 h más. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS (10mM, pH 7.4), y se añadieron 100 µL de RPMI 1640 suplementado con penicilina y estreptomina (100µg/mL) pero sin FBS.

Posteriormente, las células en cultivo se trataron con: 1) 10 µL PBS (control negativo); 2) GW788388 (control positivo); y 3) 5 µM de los compuestos PS1801 y PS1906. Tras 1 h de incubación se añadió lipopolisacárido (LPS), de la bacteria *Escherichia coli* (InvivoGen), a una concentración final de 300 ng/mL, y los cultivos se mantuvieron a 37 °C, 5% CO₂ durante 24 h.

Tras ese tiempo, se extrajeron 20 µL de sobrenadante del medio de cultivo de cada pocillo y se pasaron a una nueva placa y se añadieron 180 µL del reactivo QUANTI-Blue™. Tras 5 h de incubación a 37 °C, se midió la absorbancia a 655 nm en los pocillos de la placa con un lector iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad). Las muestras fueron analizadas por cuadruplicado.

Por otro lado, el mismo proceso se realizó en paralelo, sin añadir el estimulante LPS a las placas, para comprobar la posible actividad inflamatoria intrínseca de dichos compuestos.

Se realizaron 8 réplicas de los ensayos biológicos.

G. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados experimentales obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza, ANOVA, y para aquellos parámetros que no mostraron una distribución poblacional normal, se aplicó el test no-paramétrico Kruskal-Wallis. Se ha utilizado el programa GraphPad Prism versión 7.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com), *P valor < 0.05, **P valor < 0.01, ***P valor < 0.001.

H. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA *IN VIVO*: MODELO MÚRIDO DE DAÑO AGUDO DE PULMÓN (ACUTE LUNG INJURY, ALI)

Con el fin de evaluar el posible efecto antiinflamatorio de la molécula PS1906 en un modelo *in vivo*, seleccionamos el modelo de ALI inducido por instilación traqueal de lipopolisacárido (LPS) ampliamente descrito en la literatura y previamente realizado por miembros del grupo de investigación (Clemente-Moragón et al., 2020). Este modelo murino es un modelo de inflamación o daño agudo de pulmón que lleva asociado un periodo fibrótico a largo plazo, por lo que puede servir tanto para el estudio de enfermedades pulmonares inflamatorias como de procesos fibróticos pulmonares.

H.1. Animales

Para este modelo se escogieron ratones de la cepa C57BL/6J-OlaHsd. Los ratones adultos se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en una habitación con temperatura controlada y un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas. La dieta y el agua estaban disponibles *ad libitum*. Los ratones fueron anestesiados por vía i.p. con una inyección de un cóctel anestésico conteniendo sulfato de atropina (1 mg / kg; B. Braun, 1 mg / mL), clorhidrato de xilazina (20 mg / kg; Rompun® Bayer, 20 mg / mL) y ketamina (100 mg / kg; Anesketin Dechra, 100 mg / mL). Todos los procedimientos experimentales y otros procedimientos científicos con animales se ajustaron a la Directiva de la UE 2010 / 63EU y la Recomendación 2007/526 / EC, promulgada en la ley española bajo el Real Decreto 53/2013. Los protocolos animales fueron aprobados por los comités éticos locales y el Área de Protección Animal de la Comunidad Autónoma de Madrid.

H.2. Elección de las dosis y administración de los tratamientos.

Para la selección de las dosis a administrar se tuvieron en cuenta los estudios *in vitro*, tomando como concentración eficaz máxima (no toxica) la concentración de 10 μ M. Asumiendo una volemia aproximada de 2 mL para un ratón de unos 30g de peso, y
5 teniendo en cuenta una pérdida por distribución, metabolismo o secreción del 50% de los productos, calculamos la dosis 1 (D1) y seleccionamos como dosis 2 (D2) el doble de la primera. Así, teniendo en cuenta los respectivos pesos moleculares, las dosis correspondientes para el producto PS1906 fueron 156 μ g/kg (D1) y 312 μ g/kg (D2). Para la preparación de las diferentes dosis se utilizó como diluyente suero fisiológico. Todas
10 las dosis fueron preparadas para administrar el mismo volumen en el ratón. Las dosis se administraron vía intravenosa con el animal debidamente anestesiado momentos previos a la inducción de la inflamación pulmonar.

H.3. Inducción del modelo de inflamación aguda pulmonar.

15 Con el animal debidamente anestesiado, se expuso la tráquea, se insertó un catéter (Introcan Safety 22G, Braun) y los ratones recibieron una inyección intratraqueal de lipopolisacárido estéril (LPS) (L2262, Sigma) a una dosis alta de 10 mg / kg en 25 μ l de PBS 1X, seguida de por 200 l de aire para asegurar la deposición en cada pulmón. Los ratones del grupo control sanos recibieron una inyección intratraqueal de 25 μ l de PBS.
20 Después de la administración intratraqueal, se cerraron las heridas y se permitió que los ratones se recuperaran con libre acceso a comida y agua.

H.4. Evaluación del infiltrado inflamatorio en lavado broncoalveolar.

Después de 24 h, se sacrificaron los animales y se lavaron los pulmones con 1,5 mL de
25 PBS frío a través de un catéter traqueal (Introcan Safety 22G, Braun), y se extrajo un total de 1 mL de líquido de lavado broncoalveolar de cada ratón para la detección. de neutrófilos y linfocitos por citometría de flujo. La detección se realizó por tamaño y complejidad, así como el marcaje positivo para el marcador Ly6G (neutrófilos) y el marcador CD4 (linfocitos), así como el número total de células usando un citómetro de
30 flujo FACS Canto-3L equipado con software DIVA (BD Biosciences). Los datos se analizaron con el software FlowJo (Ashland).

H.5. Procesado de los pulmones para evaluación histopatológica

Al finalizar el protocolo y ras proceder a la eutanasia de los animales, se extrajo el pulmón separando el lóbulo derecho del izquierdo. El lóbulo derecho se fijó en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 24 h a 4°C, y el lóbulo izquierdo se congeló rápidamente en nitrógeno líquido para el posterior aislamiento de proteínas y ensayos de inmunotransferencia. Los lobulos derechos fijados con PFA se colocaron en alcohol al 70% a 4°C y se cortaron transversalmente en dos porciones. Para la puntuación histopatológica de la lesión pulmonar aguda (ALI score), ambas porciones transversales se deshidrataron mediante una serie de etanol, se aclararon en xileno, se incrustaron en cera de parafina, se cortaron en secciones de 5 µm, se montaron en portaobjetos Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific) y se tiñeron con solución de hematoxilina y eosina. Los tejidos se procesaron en la Unidad de Histopatología del CNIC, y todos los portaobjetos se escanearon con un escáner de portaobjetos digital NanoZoomer-2.0-RS (C110730®, Hamamatsu, Japón) y se visualizaron con el software NanoZoomer Digital Pathology (Hamamatsu). El ALI se puntuó con un sistema semicuantitativo, utilizando una escala de 0 a 4 que combinaba evaluaciones de la infiltración de células inflamatorias del espacio aéreo y la pared de los vasos, la congestión alveolar, la hemorragia, el grosor de la pared alveolar y la formación de la membrana hialina. Una puntuación de 0 indica que no hay lesiones, 1 indica una lesión leve, 2 una lesión moderada, 3 una lesión grave y 4 una lesión muy grave.

20

H.6. Análisis estadístico

Los datos se transformaron en escala logarítmica para apreciar mejor las diferencias entre grupos. Se presentan como media $\pm$ desviación estándar y se analizaron con el software Prism v7 (Graph pad, Inc.). Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante ANOVA de una vía. Los valores p se ajustaron con el método de comparaciones múltiples de Dunnet. *** p < 0.0001 vs control; # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001 vs grupo LPS para un n= 4-7 ratones.

25

RESULTADOS

RESULTADOS DE ENSAYOS DE INHBICION DE ACTIVIDAD QUINASA DE ALK5

30

Los ensayos realizados pusieron de manifiesto que varios compuestos presentaban actividad inhibidora de la quinasa Alk5, en comparación con el compuesto GW788388, que rondaba el 25% de inhibición. Los compuestos presentaron el efecto inhibidor que se muestran en la Tabla 2.

5

Fórmula Molecular / Pm	Referencia	% reducción actividad quinasa
C₁₈H₁₅N₃O₂ 305,337	31/ PS1801	79.1
C₂₀H₁₆N₂O₂ 316,36	16	75.4
C₁₃H₁₀N₂O 210,236	12	87.5
C₁₅H₁₀N₂O 234,258	26/ PS1906	93.4

Tabla 2. Fórmula y referencia de los compuestos con actividad inhibidora de quinasa Alk5 *in vitro*.

- 10 Los valores de % de reducción de actividad quinasa se refieren considerando el 100% de reducción de actividad del compuesto control de inhibición GW788388 Hydrate (Sigma-Aldrich ref. SML0116).

- 15 En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos con los diferentes compuestos, donde se observa que el compuesto PS1906 (16) fue de los que mostraron mayor efecto inhibidor de la tirosina quinasa Alk5.

RESULTADOS DE ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD *IN VITRO* EN CULTIVOS CELULARES

- 20 Como se observa en la Figura 2, los tratamientos realizados con los compuestos utilizados a 1 μ M carecen de efectos citotóxicos sobre macrófagos THP-1 (Figura 2), ya que no disminuyen la viabilidad celular. Se pudo observar que el compuesto 16 resultaba tóxico para las células a concentraciones de 5 μ M y 10 μ M, mientras que el resto no resultaban tóxicos. También se probó el compuesto GW788388 (control), conocido
25 inhibidor de la actividad quinasa de Alk5 y carente de actividad citotóxica (Figura 2).

Se realizaron 8 réplicas de los ensayos biológicos.

RESULTADOS DE VIABILIDAD Y CITOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS PS1801 Y PS1906

Como se observa en la Figura 3, los tratamientos realizados con los compuestos PS1801 y PS1906 carecen de efectos citotóxicos sobre células epiteliales Caco-2 (Figura 3A) o macrófagos THP-1 (Figura 3B) a todas las concentraciones utilizadas, ya que no disminuyen la viabilidad celular. Dichos resultados confirman los datos previos obtenidos en macrófagos THP-1 y ponen de manifiesto la ausencia de toxicidad en células de epitelio intestinal. Se utilizó DMSO como sustancia tóxica para las células (control positivo), así como el compuesto GW788388 (control) conocido inhibidor de la actividad quinasa de Alk5 y carente de actividad citotóxica.

Se decidió continuar los ensayos utilizando una concentración de 5 μ M por ser donde menos disminuía la viabilidad celular en ambos tipos celulares.

9.5. LOS COMPUESTOS PS1801 Y PS1906 PRESENTAN ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA EN MACRÓFAGOS HUMANOS THP-1-XBLUE™ CD14.

Para el estudio de la actividad antiinflamatoria de los compuestos PS1801 y PS1906 hemos utilizado como biomarcador el factor de transcripción implicado en inflamación NF- κ B. Se estimularon macrófagos THP-1-XBlue™-CD14 con LPS (Figura 4), un promotor de la expresión de este factor transcripcional, que se une al receptor TLR4, sobreexpresado en estos macrófagos. Con una concentración de los compuestos de 5 μ M se consiguió una inhibición significativa de la producción de NF- κ B ($p < 0.001$) dependiente de LPS. Estos resultados confirmaban los resultados obtenidos previamente.

A su vez, se comprobó la actividad de estas vesículas en un ambiente control, sin la estimulación con LPS (Figura 5), revelándose que por sí solas no producen la expresión de NF- κ B *in vitro*. Estos resultados nos indican que los compuestos PS1906 y PS1801 son útiles para disminuir la inflamación derivada de los efectores dependientes de este factor transcripcional, con especial interés cuando se usen como tratamiento en un ambiente previo de inflamación.

9.6. RESULTADOS OBTENIDOS *IN VIVO* EN MODELO MÚRIDO DE INFLAMACIÓN Y DAÑO AGUDO PULMONAR

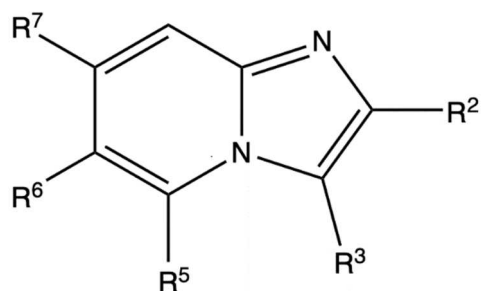
Para el estudio de la actividad antiinflamatoria *in vivo* hemos elegido un modelo de inflamación y daño agudo de pulmón (ALI) empleado para el estudio de enfermedades pulmonares inflamatorias como el Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo. Este modelo es evaluado siguiendo una puntuación extraída del análisis histopatológico de cortes fijados de pulmón y teñidos con Hematoxilina y Eosina. El panel A de la figura 6 muestra imágenes representativas del pulmón de cada grupo donde se pueden observar diferencias macroscópicas. La cuantificación del ALI score (mostrada en el panel B de la Fig. 6) muestra un efecto positivo para el producto PS1906. El análisis por citometría de flujo del lavado broncoalveolar evidenció un efecto antiinflamatorio dependiente de dosis del compuesto PS1906, tanto en neutrófilos (panel C de la Fig. 6), como en linfocitos (panel D de la Fig. 6; si bien estos resultados no muestran significancia estadística probablemente debido a la escasa participación de este tipo celular en etapas tempranas del daño agudo de pulmón).

REFERENCIAS

Clemente-Moragón A, Gómez M, Villena-Gutiérrez R, Lalama DV, García-Prieto J, Martínez F, Sánchez-Cabo F, Fuster V, Oliver E, Ibáñez B. Metoprolol exerts a non-class effect against ischaemia-reperfusion injury by abrogating exacerbated inflammation. Eur Heart J. 2020 Dec 7;41(46):4425-4440. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa733>

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



I

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:

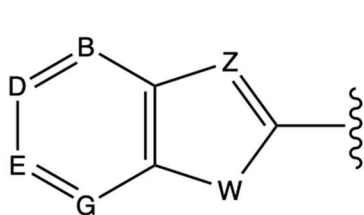
R² representa H; arilo, donde el grupo arilo no está sustituido, o está sustituido con grupos alquilo de 1 a 5 átomos de carbono, o está sustituido con haloalquilo, o está sustituido con un grupo alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono,

10 R³ representa H; halógeno; haloalquilo; alcóxicarbonilo de 2 a 5 átomos de carbono; amino; arilo ó heteroarilo, donde los grupos arilo y heteroarilo no están sustituidos o están sustituidos con grupos alquilo de 1 a 5 átomos de carbono, o con alcóxicarbonilo de 2 a 5 átomos de carbono,

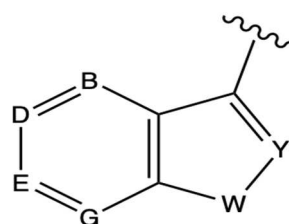
15 R⁵ representa H; alqueno de 2 a 10 átomos de carbono; alcóxicarbonilo de 2 a 5 átomos de carbono; nitro; carboxilo; alquilo de 1 a 5 átomos de carbono no sustituido o sustituido con uno o más grupos hidroxilo; un grupo N-(3-metilén-2-oxoindolin-5-il)-3-(piperidin-1-il)propanamida); o carbaldehído,

20 R⁶ representa un átomo de hidrógeno (H); alquilo no sustituido de 1 a 5 átomos de carbono; un grupo alquilo de 1 a 5 átomos de carbono sustituido con uno o más grupos hidroxilo; un grupo alcóxido de 1 a 5 átomos de carbono; halógeno; alcóxicarbonilo (-O-(C=O)-R) donde R tiene de 1 a 3 átomos de carbono; nitro; alqueno de 2 a 10 átomos de carbono no sustituido o sustituido; arilo, donde el grupo arilo no está sustituido o está sustituido por uno o más grupos hidroxilo, o sustituido con uno o más grupos metóxido; heteroarilo; o heteroarilo donde el grupo heteroarilo está seleccionado entre, dibenzotiofenilo, un grupo de fórmula II, un grupo de fórmula III:

25



II



III

donde D, B, E, G representan independientemente N, CH ó C-R, donde R es alquilo de uno a 3 átomos de carbono no sustituido, arilo no sustituido o cicloalquilo no sustituido,

5 Z representa CH ó N

Y representa CH ó N

W representa O ó S ó NH,

R⁷ representa un átomo de hidrógeno (H); un grupo arilo no sustituido o un grupo arilo sustituido con uno o más grupo hidroxilo, o sustituido con uno o más grupos metoxilo; halógeno; alqueno no sustituido o sustituido por un grupo arilo; alcoxycarbonilo de 2 a 5 átomos de carbono; un grupo heteroarilo; o heteroarilo donde el grupo heteroarilo está seleccionado entre benzotiofenilo, benzofuranilo, benzopirrolilo; dibenzotiofenilo, un grupo de fórmula II y un grupo de fórmula III como se han definido anteriormente,

- en el que:

15 - al menos 3 de los sustituyentes R², R³, R⁵, R⁶ y R⁷ son simultáneamente H, y la posición del carbono 8 de la estructura de imidazo[1,2a]piridina no lleva sustituyentes, y

- cuando R⁵ es carbaldehído, al menos uno de R², R³, R⁶ o R⁷ es distinto de H.

20 2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R² representa arilo sustituido con un grupo CF₃ o con un grupo alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono; y de forma preferente, además, R³ y R⁵ son simultáneamente H.

3. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que:

25 - R² representa arilo sustituido con alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono, y

- simultáneamente R⁶ es:

- un alquilo de uno a 5 átomos de carbono, o

- un grupo arilo sustituido con un hidroxilo, o con halógeno, y preferentemente, además, R^3 y R^5 son simultáneamente H.

4. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R^2 representa un grupo seleccionado entre arilo sustituido con alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono; y simultáneamente R^6 es

- alquilo de uno a 5 átomos de carbono, o

- un grupo arilo sustituido con un hidroxilo, o con halógeno;

y de forma preferente R^3 y R^5 son simultáneamente H.

5. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R^2 representa un fenilo sustituido con alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono o fenilo sustituido con trihalometilo; y

- simultáneamente R^7 es un grupo heteroarilo, preferentemente, 2-benzo[b]furilo;

y de forma más preferente, R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son simultáneamente H.

6. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que:

- R^2 representa arilo sustituido con alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono y R^7 es arilo sustituido con hidroxilo o con un grupo alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono, o

- R^2 representa arilo sustituido con alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono y R^7 representa alquenilo sustituido con un grupo arilo;

y de forma preferente, además, R^3 y R^5 son simultáneamente H.

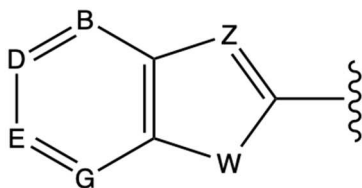
7. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R^2 representa arilo sustituido con alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono y R^7 es arilo sustituido con hidroxilo o con un grupo alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono o alquenilo sustituido con un grupo arilo; y de forma

preferente, además, R^3 y R^5 son simultáneamente H.

8. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R^2 representa arilo sustituido con alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono, R^3 es H, R^6 es H, grupo alquilo o grupo arilo, y R^7 es H o arilo sustituido con hidroxilo o con un grupo alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono;

y de forma preferente, R^3 y R^5 son simultáneamente H.

9. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R^3 es un arilo no sustituido; y de forma preferente, además, R^2 , R^5 y R^6 son simultáneamente H; y de forma más preferente, además, R^2 , R^5 , R^6 y R^7 son simultáneamente H.
- 5 10. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R^3 representa un heterociclo aromático no sustituido, o un heterociclo aromático sustituido con un grupo alcóxicarbonilo de 2 a 5 átomos de carbono; y de forma preferente, además, R^2 , R^5 y R^6 son simultáneamente H; y de forma más preferente, además, R^2 , R^5 , R^6 y R^7 son simultáneamente H.
- 10 11. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R^3 es un grupo seleccionado entre benzofuranilo, benzotiofenilo e indol, no sustituido o sustituido con un grupo alcóxicarbonilo de 2 a 5 átomos de carbono; y de forma preferente, además, R^2 , R^5 y R^6 son simultáneamente H; y de forma más preferente, además, R^2 , R^5 , R^6 y R^7 son
- 15 simultáneamente H.
12. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R^3 es un grupo seleccionado entre benzofuranilo, benzotiofenilo e indol, sustituido o sustituido con un grupo alcóxicarbonilo de 2 a 5 átomos de carbono; y simultáneamente, R^7 es un grupo seleccionado entre
- 20 benzofuranilo, benzotiofenilo e indol; de forma preferente, R^2 , R^5 y R^6 son simultáneamente H.
13. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R^5 representa H, etóxicarbonilo, nitro, carboxilo, hidroximetilo, carbaldehído, o etoxilo, y preferentemente, R^2 , R^3 , R^6 y R^7
- 25 son simultáneamente H.
14. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R^6 o R^7 representan un fragmento



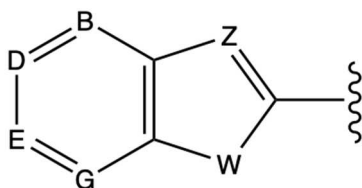
II

en el que D, B, E, G representan independientemente CH ó C-R, donde R puede ser alquilo no sustituido, arilo no sustituido o cicloalquilo no sustituido,

5 Z representa CH y

W representa O.

15. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R^6 o R^7 representa un fragmento



II

10

en el que D, B, E, G representan independientemente CH, Z representa C y W representa O.

16. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R^6 representa un grupo alquilo de 1 a 5 átomos de carbono o alcóxicarbonilo ($-O-(C=O)-R$) donde R tiene de 1 a 3 átomos de carbono, y preferentemente, además, R^2 , R^3 , R^5 y R^7 son simultáneamente H.

15

17. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R^7 representa un grupo arilo no sustituido, y preferentemente, además, R^2 , R^3 , R^5 y R^7 son simultáneamente H.

20

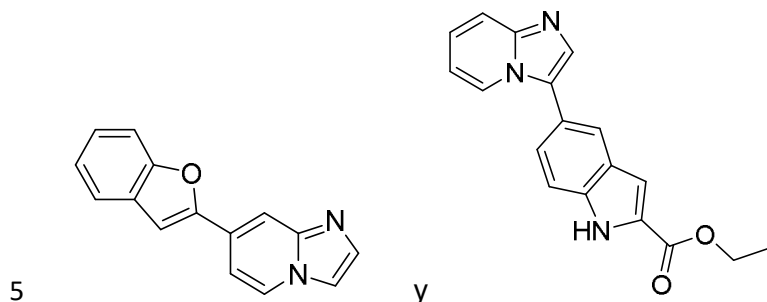
18. Un compuesto según la reivindicación 1 seleccionado entre:

- Ácido imidazo[1,2-a]piridin-5-carboxílico (2)

- Imidazo[1,2-a]piridin-5-carboxilato de etilo (3)
- 3-Fenilimidazo[1,2-a]piridina (4)
- Imidazo[1,2-a]piridin-5-ilmetanol (5)
- 2-(4-Metoxifenil)-6-metilimidazo[1,2-a]piridina (8)
- 5 - 4-(Imidazo[1,2-a]piridin-7-il)fenol (12)
- 4-(2-(4-(Trifluorometil)fenil)imidazo[1,2-a]piridin-7-il)fenol (13)
- 4-(2-(4-(Trifluorometil)fenil)imidazo[1,2-a]piridin-6-il)fenol (15)
- 4-(2-(4-Metoxifenil)imidazo[1,2-a]piridin-7-il)fenol (16)
- 4-(2-(4-Metoxifenil)imidazo[1,2-a]piridin-6-il)fenol (17)
- 10 - (E)-7-Estirilimidazo[1,2-a]piridina (19)
- (E)-2-(4-Metoxifenil)-7-estirilimidazo[1,2-a]piridina (20)
- 7-(3,4-Dimetoxifenil)imidazo[1,2-a]piridina (21)
- 6-Iodo-2-(4-(trifluorometil)fenil)imidazo[1,2-a]piridina (25)
- 7-(Benzofuran-2-il)imidazo[1,2-a]piridina. (26) PS1906
- 15 - 4-(Imidazo[1,2-a]piridin-6-il)fenol (27)
- (E)-6-Estirilimidazo[1,2-a]piridina (28)
- 6-(Benzofuran-2-il)imidazo[1,2-a]piridina (29)
- 6-(3,4-Dimetoxifenil)imidazo[1,2-a]piridina (30)
- Etil 5-(imidazo[1,2-a]piridin-3-il)-1H-indol-2-carboxilato (31)
- 20 - 7-(Benzofuran-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (32)
- 6-(Benzofuran-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (33)
- 7-(Furan-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (34)
- 6-(Furan-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (35)
- 7-(Tiofen-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (36)
- 25 - 6-(Tiofen-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (37)
- 7-(Piridin-4-il)imidazo[1,2-a]piridina (38)
- 6-(Piridin-4-il)imidazo[1,2-a]piridina (39)
- 7-(Dibenzotiofen-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (40)
- 6-(Dibenzotiofen-3-il)imidazo[1,2-a]piridina (41)
- 30 - 5-(7-(Benzofuran-2-il)-3-imidazo[1,2-a]piridin)-1H-indol-2-carboxilato de etilo, (42)
- 2-(4-Metoxifenil)-6-iodo-imidazo[1,2-a]piridina,

- N-(3-(imidazo[1,2-a]piridin-5-ilmetilén)-2-oxoindolin-5-il)-3-(piperidin-1-il)propanamida.

19. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula I está seleccionado entre



20. Un compuesto de fórmula I, definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para su uso como medicamento.

10 21. El compuesto de fórmula I, de acuerdo con la reivindicación anterior para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto.

22. El compuesto de fórmula I, de acuerdo con la reivindicación anterior en el que la enfermedad inflamatoria es una enfermedad pulmonar inflamatoria seleccionada entre
15 síndrome por distrés respiratorio agudo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, inflamación pulmonar, preferentemente síndrome por distrés respiratorio agudo y fibrosis pulmonar.

23. El compuesto de fórmula I, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones
20 anteriores 20 a 22, en el que el compuesto es etil 5-(imidazo[1,2-a]piridin-3-il)-1H-indol-2-carboxilato.

24. El compuesto de fórmula I, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 20 a 22, en el que el compuesto es 7-(benzofuran-2-il)imidazo[1,2-a]piridina.

25

25. El compuesto de fórmula I, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 20 a 22, en una concentración comprendida entre 15 mg/kg y 10 µg/kg, aún más preferiblemente entre 1 mg/kg y 50 µg/kg, y aún más preferiblemente entre 800 µg/kg y 80 µg/kg.
- 5
26. Una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de fórmula I, definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y uno o más compuestos activos adicionales, y/o uno o más portadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 10
27. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación anterior, donde el uno o más vehículos farmacéuticamente aceptable se selecciona entre un desintegrante, tensioactivo, aglutinante, lubricante y combinaciones de los anteriores.
- 15
28. La composición farmacéutica de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores 26 a 27, donde el uno o más compuestos activos adicionales se seleccionan entre esteroides, corticosteroides y medicamentos antiinflamatorios no esteroideos.
- 20
29. La composición farmacéutica de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores 26 a 28, donde el uno o más compuestos activos adicionales es uno o más compuestos de fórmula I definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.
30. Una composición farmacéutica, definida en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 25 a 29 para su uso como medicamento
- 25
31. Una composición farmacéutica, según la reivindicación anterior para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, preferentemente, una enfermedad pulmonar inflamatoria seleccionada entre síndrome por distrés respiratorio agudo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, inflamación pulmonar, preferentemente síndrome por distrés respiratorio agudo y fibrosis pulmonar.
- 30

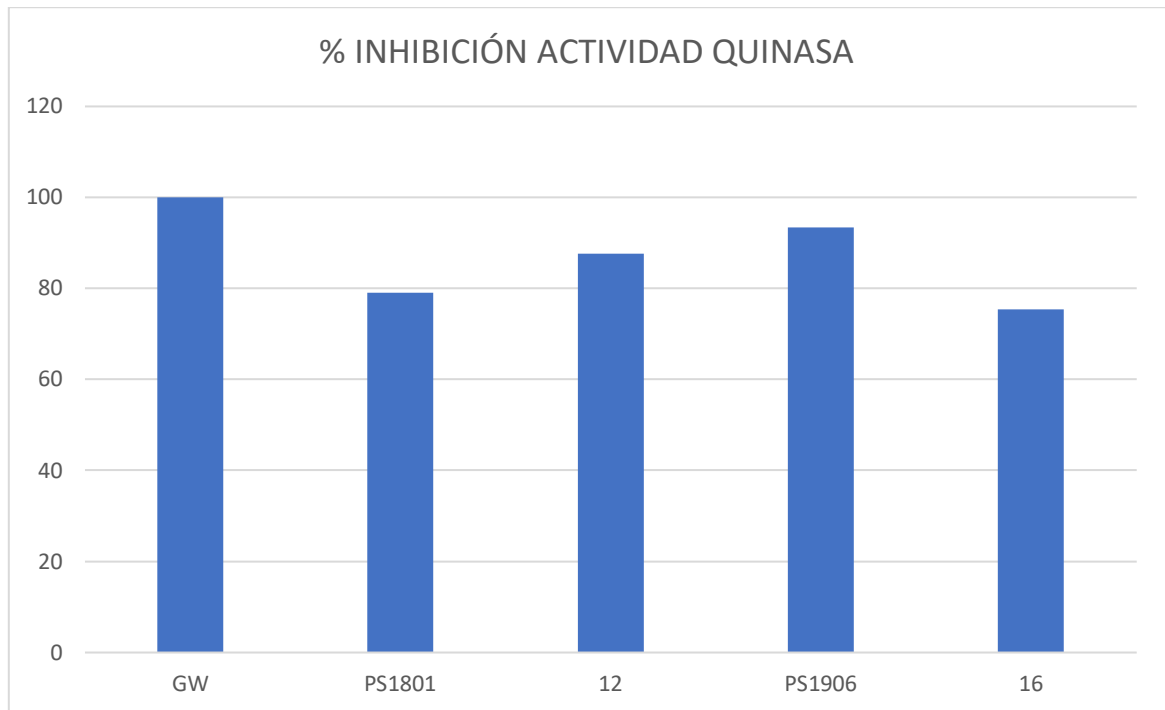


Figura 1

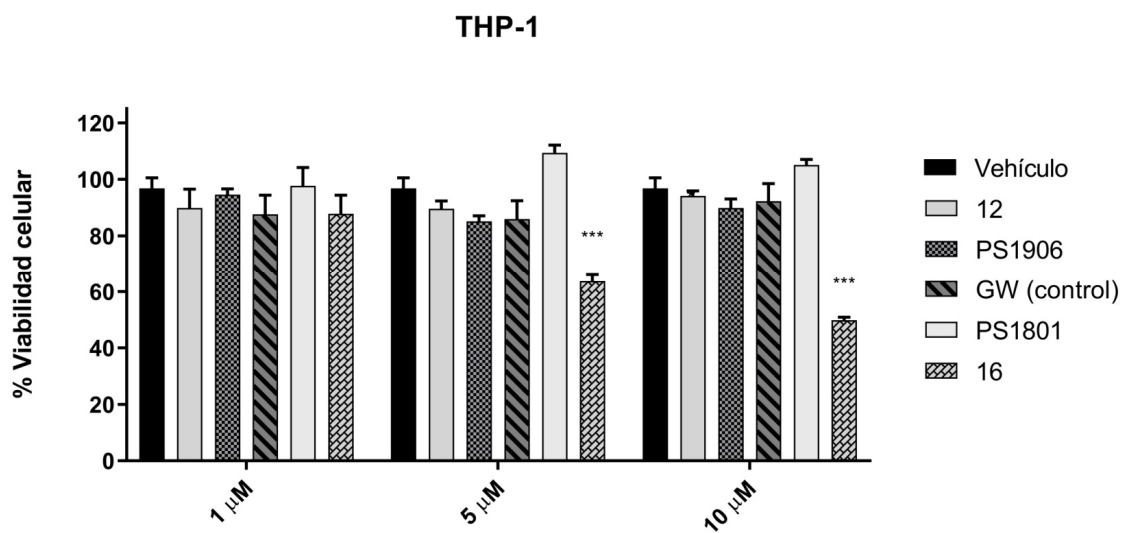


Figura 2

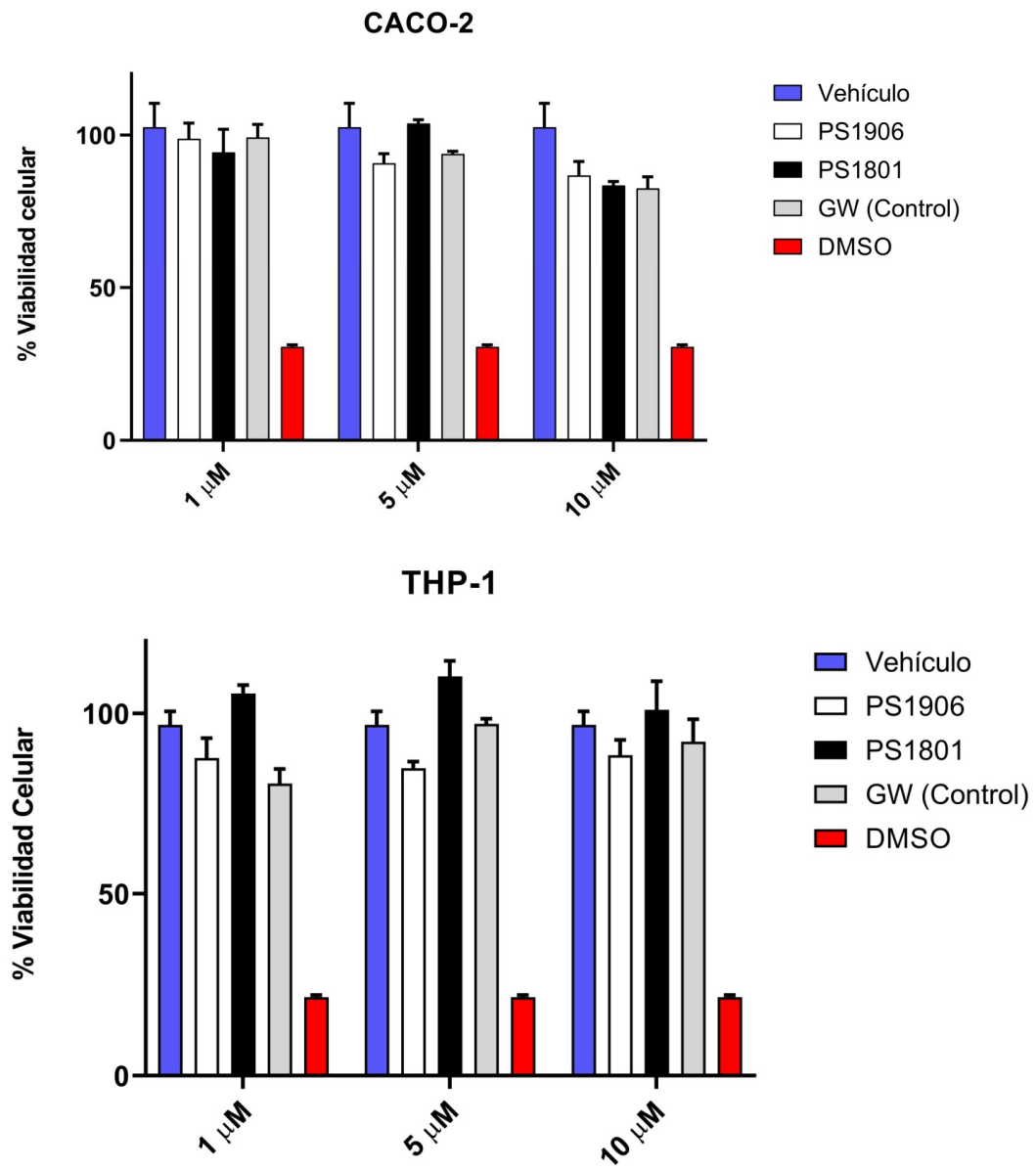


Figura 3

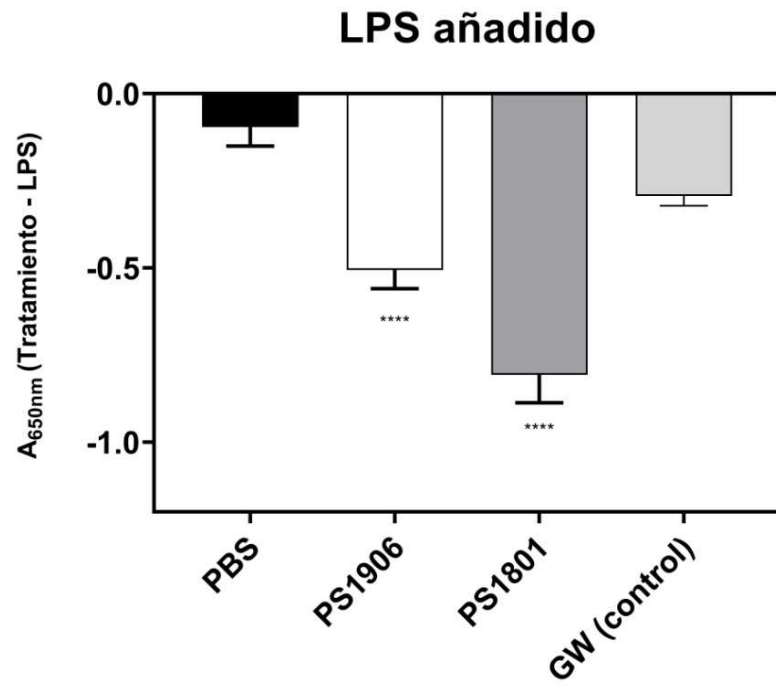


Figura 4

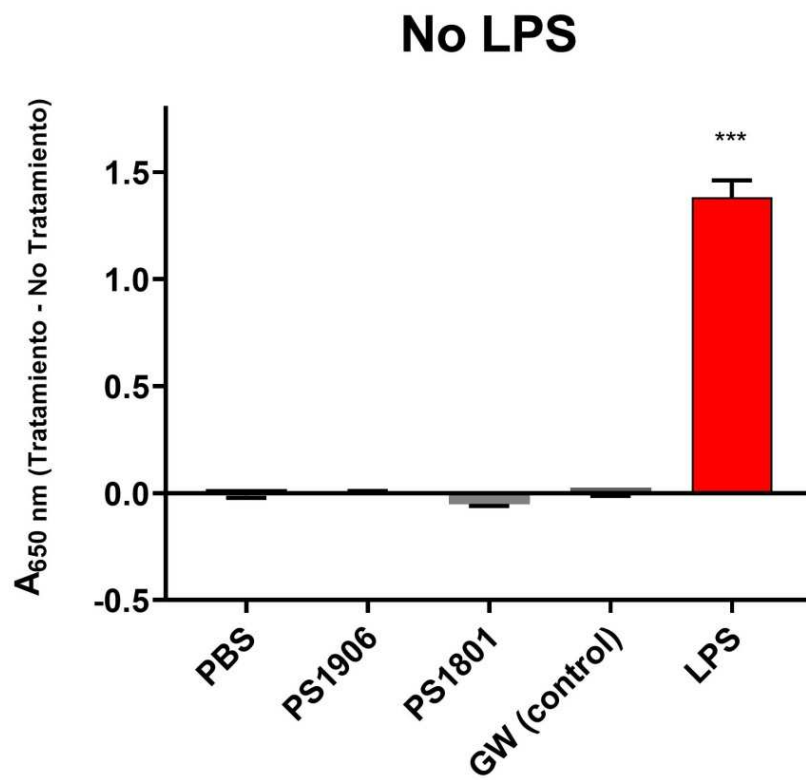


Figura 5

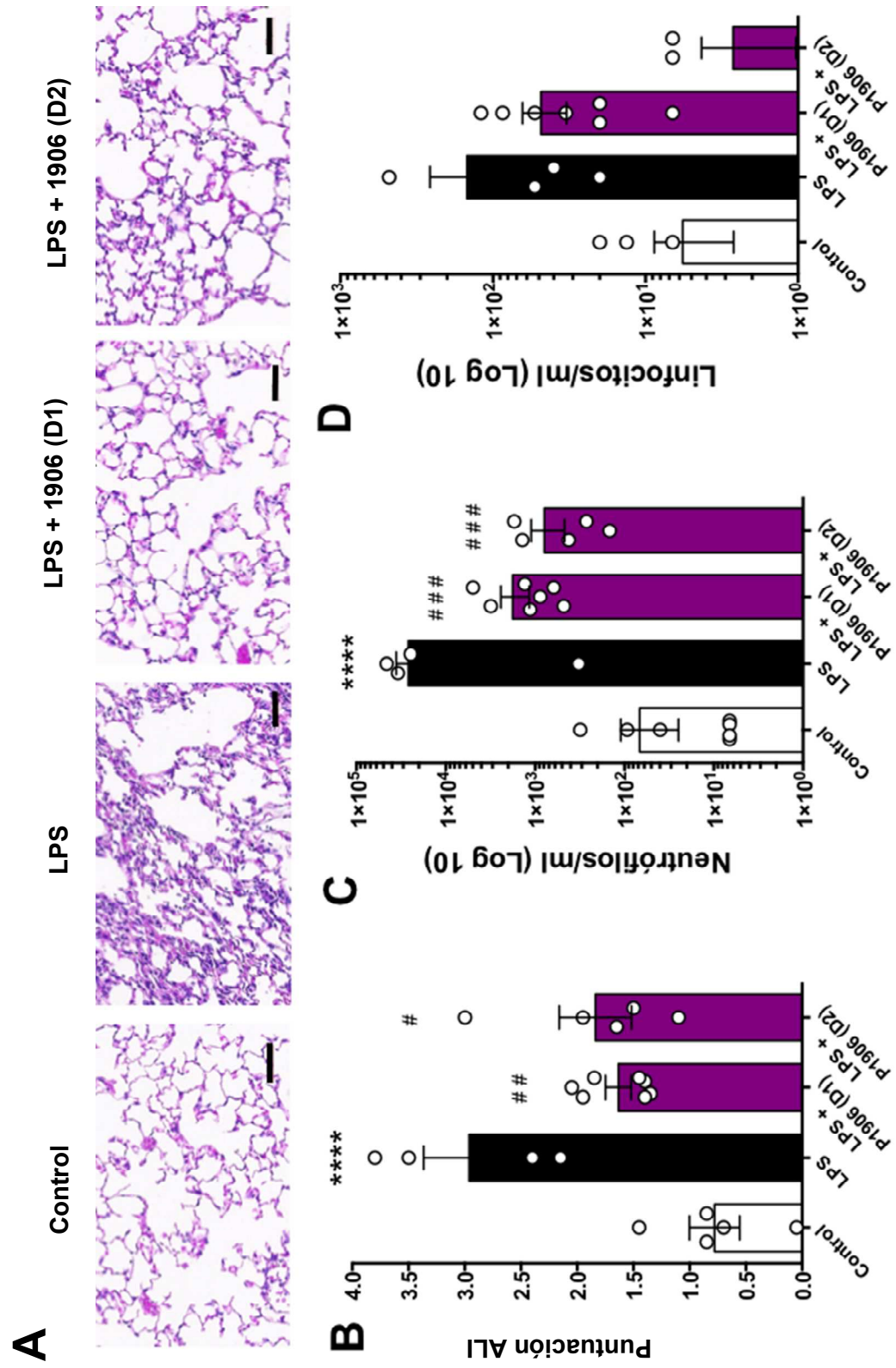


Figura 6



- ②① N.º solicitud: 202330530
②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.06.2023
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2013147711 A1 (AGENCY SCIENCE TECH & RES) 03/10/2013, reivindicaciones 1-13; pagina 61, líneas 26-32.	1-17, 20-22, 25-31
X	US 2004122044 A1 (MAUL CORINNA et al.) 24/06/2004, párrafos 2, 3, 8-17 y 60-63; reivindicación 1.	1-17, 20-22, 25-31
X	WO 2019099336 A1 (BRISTOL MYERS SQUIBB CO) 23/05/2019, páginas 2, 3, 70-80 y 103-130; reivindicación 1.	1-17, 20-22, 25-31
X	RODRIGUEZ, J. C. et al., "Microwave-assisted synthesis and luminescent activity of imidazo[1,2-a]pyridine derivatives". Journal of Heterocyclic Chemistry, 2020, páginas 1-9. Ver resumen; tabla 5.	1, 2, 8, 13
X	WO 2008014219 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP et al.) 31/01/2008, páginas 39-41, esquemas generales 1-7; reivindicación 1.	1, 10, 13 y 16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
08.02.2024

Examinador
N. Martín Laso

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D471/04 (2006.01)**A61K31/437** (2006.01)**A61P29/00** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT-DB, NPL, XPESP, BIOSIS, CAS