

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 035**

51 Int. Cl.:
A61K 31/505 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08716828 .2**
96 Fecha de presentación: **13.02.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2117552**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.11.2009**

54 Título: **USO DE DERIVADOS DE PIRIMIDINA CONDENSADOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES E INFLAMATORIAS.**

30 Prioridad:
14.02.2007 EP 07102410

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.11.2011

73 Titular/es:
STOICESCU, DAN
CH. DE LA DULLIVE 3
1195 DULLY, CH

72 Inventor/es:
Stoicescu, Dan

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 035 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de derivados de pirimidina condensados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias

La presente invención se refiere a terapia inmunosupresora y a nuevos tratamientos para enfermedades autoinmunes e inflamatorias. En una realización preferida, la presente invención se refiere a nuevos fármacos para el tratamiento de la artritis reumatoide.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad, inflamatoria autoinmune, crónica. Se caracteriza por un dolor cada vez más debilitante y destrucción de las articulaciones, comenzando especialmente por las manos, pies y muñecas. Sin embargo, siendo una enfermedad sistémica, la inflamación también puede producirse en tejidos extra-articulares tales como en la piel, el corazón, los pulmones y los ojos. La Organización Mundial de la Salud informa que la frecuencia de la AR varía entre el 0,3 y el 1 %, siendo más común en mujeres. Las personas que la padecen con frecuencia son mayores de 40 años (aunque puede diagnosticarse a cualquier edad) y en países desarrollados, al menos el 50 % de los pacientes, no pueden conservar su empleo de jornada completa a los 10 años de la aparición de la enfermedad.

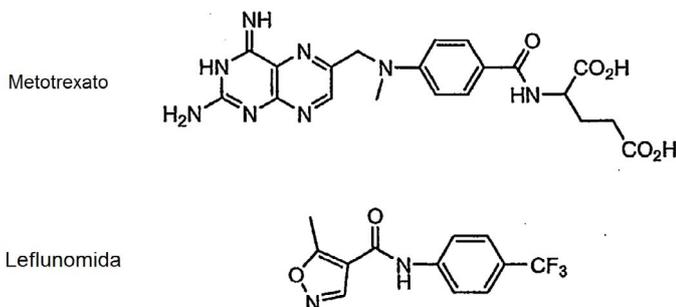
La causa exacta de la AR se desconoce. Se han implicado factores genéticos y diversos factores ambientales, y se cree que puede estar implicada una combinación compleja de rutas moleculares. En cambio, los mecanismos mediante los cuales la inflamación produce lesión articular en la AR se comprenden mejor. El centro de ataque es la membrana sinovial, el revestimiento de tejidos blandos de las articulaciones que aísla el líquido sinovial del tejido adyacente. La membrana sinovial sana contiene fibroblastos que secretan los constituyentes principales del líquido sinovial en la cavidad articular, así como macrófagos responsables de eliminar sustancias no deseadas de este líquido. También tiene una pequeña cantidad de vasos sanguíneos para proporcionar nutrientes al cartílago vascular adyacente, pero no leucocitos.

Una vez activada, la respuesta autoinmune conduce a la inflamación de la membrana sinovial, que comienza a llenarse de leucocitos que se han introducido mediante nuevos vasos sanguíneos. El consumo de nutrientes por las células de la membrana sinovial aumenta y la producción de líquido sinovial se intensifica. Toda la cápsula articular se inflama y se bloquea el acceso de nutrientes al cartílago, lo que conduce a la inanición y muerte de los condrocitos. Además, los fibroblastos y los macrófagos se activan para secretar citocinas, tales como el factor α de necrosis tumoral o diferenciarse en células destructoras tales como osteoclastos. La superficie del cartílago se disuelve y el hueso subyacente comienza a desgastarse.

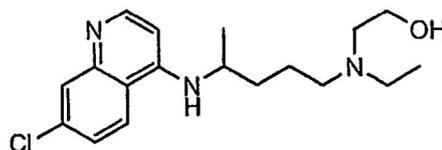
Todavía no hay cura para la AR, y los tratamientos existentes se centran en los síntomas de la enfermedad, que puede variar ampliamente entre pacientes. Los objetivos generales son reducir el dolor y la rigidez en las articulaciones afectadas y minimizar la lesión articular, siendo esta última irreversible.

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tales como el ibuprofeno y el meloxicam se usan para reducir la inflamación y aliviar el dolor leve y la rigidez, pero estos no aminoran el ciclo de la enfermedad y pueden producir hemorragia en el estómago si se toman durante un largo periodo de tiempo. Los corticosteroides pueden inyectarse en una articulación para reducir el dolor y la inflamación en el caso de un empeoramiento grave localizado, pero de nuevo estos no aminoran el progreso de la AR.

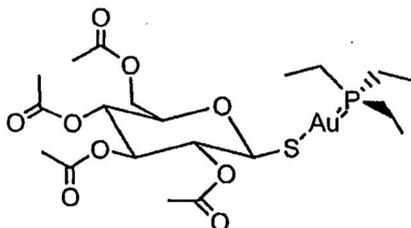
A largo plazo, a los pacientes normalmente se les proporciona un fármaco anti-reumático modificador de la enfermedad (FARME) para retrasar el desarrollo de la enfermedad y prevenir la lesión articular. Pueden pasar de semanas a meses para comenzar a surtir efecto, por tanto las medicaciones anteriores proporcionan alivio a corto plazo y frecuentemente también se toman en estas primeras etapas. La clase de fármacos FARME es química y farmacológicamente muy diversa; a continuación se muestran ejemplos.



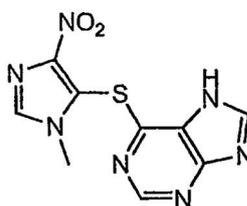
Hidroxicloroquinina



Auranofina



Azatioprina



El metotrexato es un FARME que se receta normalmente. El mecanismo de acción exacto del metotrexato no se ha aclarado por completo, pero se cree que induce la promoción directa de apoptosis de las células de la membrana sinovial, bloqueando la proliferación de linfocitos, reduciendo la producción de interleucina 1 e inducción de liberación de adenosina lo que conduce a inmunosupresión. A pesar de su eficacia, su perfil de toxicidad no es óptimo y sus propiedades farmacocinéticas son poco satisfactorias: más del 80 % experimenta una eliminación rápida sin cambios después de la absorción. Además, aproximadamente el 35 % de los pacientes no responde lo suficientemente bien al tratamiento sólo con metotrexato.

La leflunomida es un FARME relativamente nuevo que inhibe la dihidroorotato deshidrogenasa, una enzima implicada en la síntesis *de novo* de la pirimidina. Actúa más rápidamente que el metotrexato pero es más probable que cause efectos secundarios. Por ejemplo, en pacientes que tomaban este fármaco, se han descrito graves lesiones hepáticas, algunas con un desenlace clínico letal.

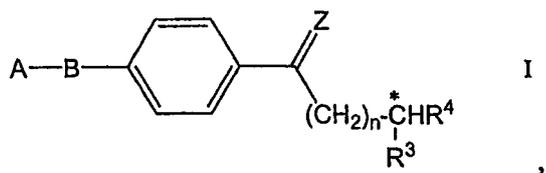
Existen otros fármacos que producen pocos efectos secundarios pero son menos fuertes, tales como la auranofina y la hidroxicloroquinina. Para la AR grave se reservan otros FARME ya que son muy eficaces pero producen graves efectos secundarios; dichos fármacos incluyen azatioprina, ciclosporina y ciclofosfamida.

También se han usado inhibidores de citocina con algún efecto en el tratamiento de la AR. Por ejemplo, se han administrado inhibidores del factor α de necrosis tumoral, tales como etanercept e infliximab, por inyección o goteo, mientras que los inhibidores de interleucina-1, tales como anakinra, algunas veces se combinan con terapia de metotrexato cuando este último es ineficaz en solitario.

En investigaciones realizadas se han identificado genes que pueden contribuir a artritis reumatoide y también pueden estar implicados en otras diversas enfermedades autoinmunes/inflamatorias (Kawahito y col., Journal of Immunology, 1998, 161: 4411-4419). De hecho, adicionalmente se ha descubierto que algunos de los fármacos anteriores son eficaces en el tratamiento de dichas enfermedades. Por ejemplo, la hidroxicloroquinina puede usarse para tratar el lupus eritematoso sistémico, mientras que tanto el metotrexato como la leflunomida pueden recetarse para la artritis psoriásica. Se ha descubierto que la ciclosporina es útil en el tratamiento de psoriasis o eccema grave, la azatioprina alivia los síntomas de la anemia hemolítica autoinmune y de la hepatitis activa crónica autoinmune y el infliximab puede tratar la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y la espondilitis anquilosante. La azatioprina y la ciclosporina también son fármacos inmunosupresores que pueden usarse para impedir que el cuerpo rechace un trasplante de órgano.

Considerando lo anteriormente citado, aún existe una necesidad de fármacos inmunosupresores alternativos y de terapias alternativas para la artritis reumatoide y enfermedades relacionadas que pueden abordar uno o más de los problemas mencionados anteriormente.

Por consiguiente, en un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para su uso en la modulación de una respuesta inmune o inflamatoria.



en la que:

Z = O o S;

n = 1;

5 R³ = -CO₂R⁸, -C(O)SR⁸, -C(O)NHR⁸, -C(S)OR⁸, -C(S)SR⁸, -C(S)NHR⁸, -C(NH)SR⁸ o -C(NH)NHR⁸,

en los que R⁸ es -H o alquilo;

R⁴ = -H, -CH₂R⁵ o -CH₂CH₂R⁵,

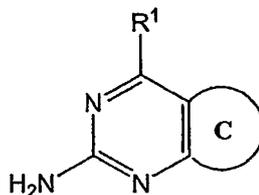
en el que R⁵ tiene independientemente uno de los significados de R³;

B = -NR² -CH₂NR²-, -CH₂CH₂NR²-, -CH₂CHR⁷- o -CH₂O-,

10 en los que R² es H o un grupo alquilo C₁₋₃, alquenilo o alquinilo y

R⁷ es H o un grupo alquilo C₁₋₃ o alcoxi;

A=



en la que R¹ = -NH₂ o -OH, es

15 C es un anillo aromático o no aromático, sustituido o sin sustituir de 5 ó 6 miembros que también puede contener uno o más heteroátomos, y C se conecta al grupo B en cualquier posición disponible.

Realizaciones preferidas de la invención son como se describen a continuación o como se definen en las reivindicaciones.

20 La Figura 1 es una representación esquemática de la síntesis total de dos compuestos usados en la presente invención (compuestos 3 y 4), como se describe en detalle a continuación en los Ejemplos 1 y 2;

La Figura 2 muestra los marcadores de artritis medios de ratones tratados con el compuesto I-A1 durante un estudio de artritis inducida por colágeno.

25 En la fórmula I, el carbono marcado con C* puede ser asimétrico (cuando R⁴ no es H) y, en este caso, se apreciará que los compuestos de la fórmula I pueden existir en forma racémica o pueden separarse en sus enantiómeros (+) o (-) por procedimientos convencionales. Además, otros centros quirales pueden estar presentes en algunos compuestos dando lugar a uno o más pares adicionales de enantiómeros. Por ejemplo, un segundo centro quiral existe en aquellos compuestos en los que B = -CH₂CHR⁷-, en el que R⁷ es un grupo alquilo C₁₋₃ o alcoxi. El uso de todas estas formas racémicas o enantioméricas pretenden entrar dentro del alcance de la presente invención.

30 Además, se entenderá que los compuestos de fórmula I pueden existir en una o más formas tautoméricas y el uso de cada una de estas formas también pretende entrar dentro del alcance de la presente invención.

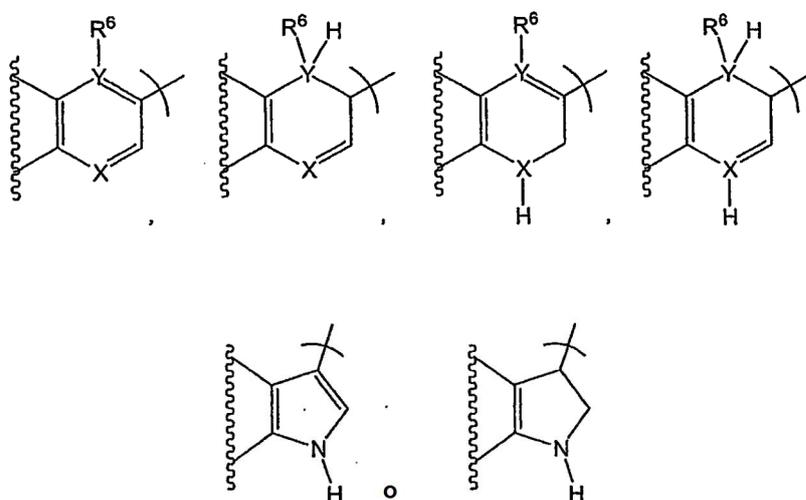
Se prefiere usar compuestos de la fórmula I en la que se satisfagan una o más de las siguientes condiciones:

- Z sea O;
- n sea 1;

- R³ sea -CO₂R⁸ y R⁴ sea -CH₂CH₂CO₂R⁸;
- R⁸ sea -H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo o butilo terciario, preferentemente -H, -Me o -Et, preferentemente -H;
- B sea -CH₂NR²-, -CH₂CHR⁷- o -CH₂O-, preferentemente -CH₂NR²-;
- 5 - R² sea -H, -Me, -Et o -CH₂-C≡CH, preferentemente H;
- R⁷ sea -H, -Me, -Et o -OMe, preferentemente H.

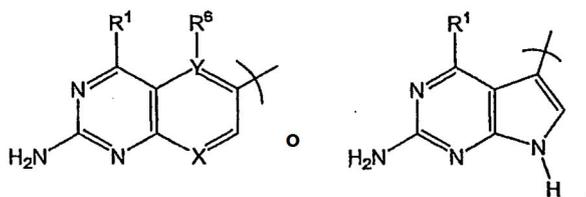
Además, compuestos preferidos de la fórmula III, V o VII muestran una o más de las designaciones preferidas de Z, n, R², R³, R⁴ y/o R⁷ expuestas anteriormente.

10 En el grupo A, C puede ser uno de los siguientes grupos (se muestran puntos de unión con el anillo adyacente y con el grupo B):



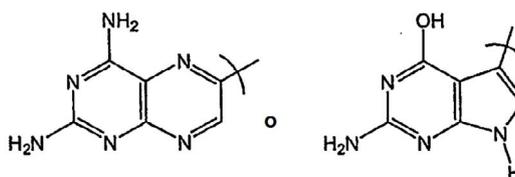
en las que X es CH o N y también: Y es C y R⁶ es H, Me, Et o HCO; o Y es N y R⁶ es un solo par de electrones. En realizaciones preferidas, X e Y son N y R⁶ es un solo par de electrones.

Son grupo A especialmente preferidos aquellos de las siguientes estructuras:



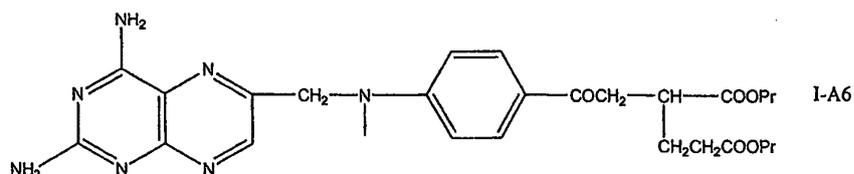
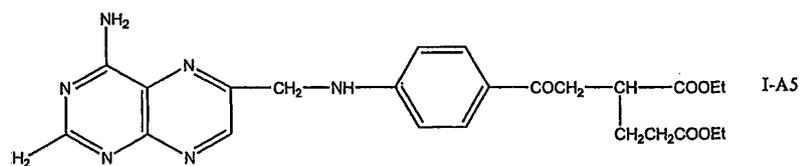
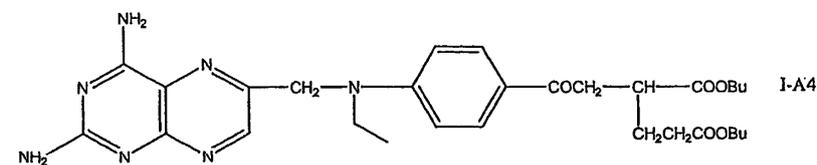
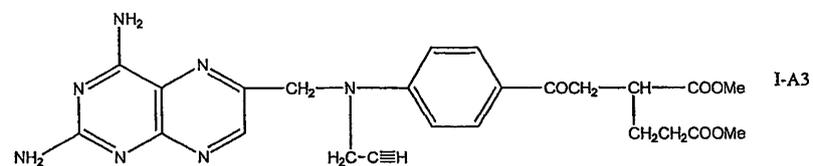
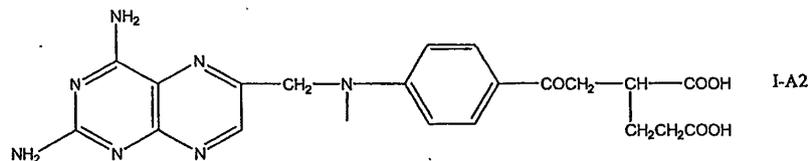
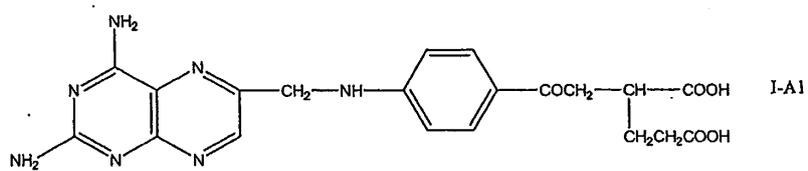
15

Son de particular interés los siguientes dos grupos A:

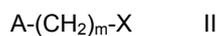


20

Se prefieren especialmente compuestos de la fórmula I que tienen los dos grupos A anteriores, en los que B es -CH₂NR²-, R² es -H, -Me, -Et o -CH₂C≡CH, Z es O, n es 1 y R³ es -CO₂R⁸, preferentemente cualquier grupo éster hidrolizable. A continuación se exponen ejemplos individuales de este grupo de compuestos.

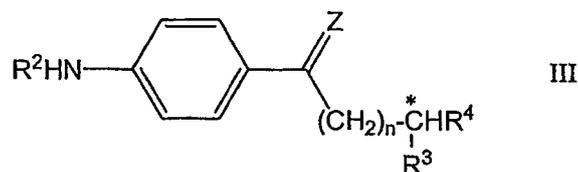


5 Los compuestos de la fórmula I pueden sintetizarse por una diversidad de procedimientos a partir de materiales de partida fácilmente disponibles y económicos. Por ejemplo, en el caso en el que B es $-NR^2-$, $-CH_2NR^2-$ o $-CH_2CH_2NR^2-$, un compuesto de la fórmula II



en la que A es como se ha definido anteriormente, m es 0,1 ó 2 y X es un grupo saliente, puede hacerse reaccionar

con un compuesto de la fórmula III

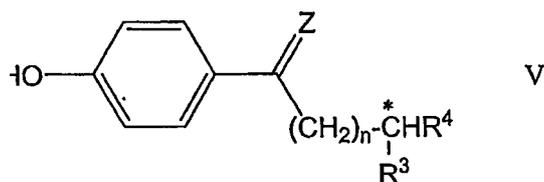


5 en la que Z, n, R², R³ y R⁴ son como se han definido anteriormente. El grupo saliente X será normalmente un halógeno, tal como cloro, bromo o yodo, especialmente bromo o yodo. Esta reacción se realiza preferentemente en un disolvente aprótico dipolar, tal como dimetilformamida (DMF) o dimetilacetamida (DMAc). Puede usarse un catalizador básico, tal como fluoruro potásico, que proporciona un rendimiento mayor que aminas terciarias o bicarbonato sódico. Cuando sea necesario, pueden protegerse grupos sensibles antes de la reacción usando grupos protectores adecuados conocidos en la técnica y después desprotegerse mediante procedimientos convencionales. Por ejemplo, cuando R³ es H y R⁴ es CH₂CH₂CO₂H, estos grupos ácidos pueden protegerse, por ejemplo, como grupos de éster metílico, con desprotección posterior por procedimientos conocidos, tal como hidrólisis alcalina con hidróxido sódico en etanol y precipitación mediante la adición de ácido, tal como ácido acético glacial.

10 En el caso en el que B es -CH₂O-, los compuestos de fórmula I pueden prepararse, por ejemplo, acoplado un compuesto de la fórmula IV

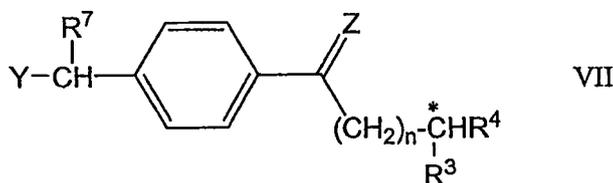


15 en la que A es como se ha definido anteriormente y X es un grupo saliente, con un compuesto de la fórmula V



20 en la que Z, n, R³ y R⁴ son como se han definido anteriormente, mediante una reacción tipo éter de Williamson. En esta reacción, el compuesto de fórmula V se convierte generalmente en su forma de ión aróxido antes de la reacción con el compuesto de fórmula IV, usando una base, tal como NaH, por ejemplo. X puede ser cualquier grupo saliente adecuado, en particular un haluro.

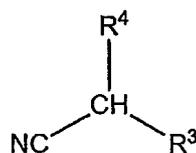
En el caso en el que B es -CH₂CHR⁷-, el compuesto de fórmula I puede prepararse, por ejemplo, acoplado un compuesto de la fórmula VI con un compuesto de la fórmula VII



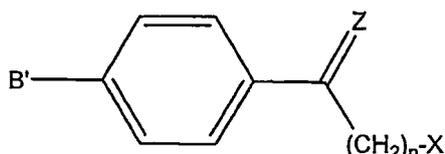
25 en la que A, Z, n, R³, R⁴ y R⁷ son como se han definido anteriormente e Y es, independientemente en cada caso, un haluro, por cualquier reacción de formación de enlace carbono-carbono conocida, especialmente las que implican el uso o formación de reactivos organometálicos, tales como reactivos de Grignard y compuestos de litio o cobre-litio. Por ejemplo, un compuesto de la fórmula VII puede convertirse en su reactivo de Grignard correspondiente o reactivo de cuprato de litio y hacerse reaccionar con un compuesto de la fórmula VI. Como alternativa, un compuesto de la fórmula VI puede convertirse en su reactivo de Grignard correspondiente o reactivo de cuprato de litio y hacerse reaccionar con un compuesto de la fórmula VII. Una vez más, los grupos protectores adecuados para cualquiera de los grupos sustituyentes reactivos serán bien conocidos para los expertos en la materia.

30

Los intermedios II a VII pueden prepararse por procedimientos convencionales. A modo de ilustración, pueden prepararse compuestos de la fórmula III, V o VII haciendo reaccionar un compuesto de la fórmula



con un compuesto de la fórmula



5 en la que B' es $-\text{NHR}^2$, $-\text{OH}$ o $-\text{CHYR}^7$ y X es un grupo saliente, en presencia de una base. A esto le puede seguir la retirada del grupo ciano por hidrólisis y descarboxilación, con el uso de grupos protectores adecuados cuando sea necesario.

10 Aunque sin desear limitarse a una teoría, se cree que la cadena lateral cetometilénica o tiocetometilénica modificada de los compuestos de fórmula I conduce a una menor toxicidad renal en comparación con el metotrexato. La inactivación debida a la hidrólisis es mínima debido a la menor inestabilidad del grupo cetometilénico o tiocetometilénico, permitiendo una semivida más alargada. Además, los compuestos de fórmula I muestran características físico-químicas mejoradas en comparación con los de la técnica anterior.

15 Como se ha analizado anteriormente, el interés principal de los compuestos de fórmula I es el uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias tales como artritis reumatoide. Sin embargo, la utilidad terapéutica de estos compuestos se amplía adicionalmente a la modulación de una respuesta inmunitaria y/o inflamatoria en general, tal como en terapia inmunosupresora. La inmunosupresión puede ser un efecto adverso de determinadas enfermedades tales como el SIDA. Sin embargo, la terapia inmunosupresora se refiere a la inducción deliberada de inmunosupresión para un fin terapéutico, tal como para el tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmune o para la prevención de rechazo de un trasplante de órgano. La terapia inmunosupresora puede implicar, por ejemplo, inhibición de producción de citocina, especialmente factor α de necrosis tumoral, interleucina-4 ó 13; o interferón- γ .

25 Son ejemplos de otras enfermedades autoinmunes e inflamatorias que puede tratar esta invención: enfermedades artríticas, tales como, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil y espondilitis anquilosante; enfermedades musculares inflamatorias, tales como, dermatomiositis y polimiositis; enfermedades que implican inflamación de otros tejidos, tales como, tejido neuronal y del oído interno; enfermedades dérmicas tales como psoriasis eccema, pénfigo vulgar y púrpura trombocitopénica idiopática refractaria crónica; enfermedades intestinales inflamatorias, tales como, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; vasculitis, por ejemplo poliarteritis nodosa; anemia hemolítica autoinmune, tal como, lupus eritematoso sistémico, hepatitis autoinmune; enfermedades autoinmunes neurodegenerativas, tales como, esclerosis múltiple; pericarditis; asma bronquial o atópica; diabetes de tipo I; uveitis; tiroiditis y esclerodermia.

30 Preferentemente los compuestos de la fórmula I se usan para tratar cualquiera de las siguientes enfermedades: artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil, espondilitis anquilosante, dermatomiositis, polimiositis, psoriasis, eccema, pénfigo vulgar, púrpura trombocitopénica idiopática refractaria crónica; enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa; poliarteritis nodosa; anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune; o inflamación de tejido neuronal o del oído interno.

35 En otra realización, los compuestos de fórmula I se usan para impedir el rechazo de un trasplante de órgano.

Un uso preferido de los compuestos de fórmula I es tratar enfermedades reumáticas, especialmente enfermedades artríticas, muy preferentemente artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil o espondilitis anquilosante.

40 Los compuestos pueden administrarse mediante cualquier modo de administración adecuado, preferentemente por vía oral (en forma sólida, por ejemplo, en comprimidos o en forma líquida) o por vía parenteral o mediante aplicaciones tópicas. Pueden proporcionarse a un mamífero, preferentemente a un ser humano, en solitario o en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como otros agentes biológicos, agentes antirreumáticos, otros inmunosupresores o inmunomodulares, tales como anticuerpos monoclonales. También pueden administrarse con adyuvantes, tales como derivados de folato, ácido fólico o ácido folínico.

Los siguientes ejemplos pretenden demostrar la invención pero, de ninguna manera, pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1

Síntesis del compuesto 3

Fuente de materiales de partida

5 Se obtuvieron cloruro de 3-cloropropanoilo y cianoacetato de etilo en el mercado de Sigma-Aldrich Company Ltd., The Old Brickyard, New Road, Gillingham, Dorset SP84XT, Reino Unido, o se sintetizaron por procedimientos convencionales. Se obtuvo α -bromo-p-nitro-acetofenona 7 por bromación de p-nitroacetofenona con bromo en tetrahidrofurano (THF). Se obtuvo 2,4-diamino-6-bromometilpteridina 2 por procedimientos convencionales (véase, por ejemplo, los documentos US 4.077.957 y US 4.224.446).

10 **Etapa A:**

Síntesis del compuesto 6

Se esterificó cloruro de 3-cloropropanoilo con etanol en presencia de piridina o acetato de trietilo para producir 3-cloropropionato de etilo 5. EL último se condensó con cianoacetato de etilo de acuerdo con el procedimiento de L. Ruzicka y col., Helv. Chim. Acta 17, 183 - 200 (1934), CA 28:2584 o Koelsch, C.F., J. Am. Chem. 65, 2458-9 (1943), para formar α -cianoglutarato de dietilo 6. El análisis por RMN ¹H confirmó la estructura esperada. GC: pureza 97 %.

Etapa B:

Síntesis del compuesto 8

Se añadieron en porciones 175 g (0,71 mmol) α -bromo-p-nitro-acetofenona 7 a 0 - 5 °C, a una suspensión de 175 g (0,82 mmol) de α -cianoglutarato 6 de dietilo y 175 g (3 mmol) de KF en 500 ml de DMF. La reacción se controló por cromatografía de capa fina (TLC). Después de 4 horas, la mezcla de reacción se suspendió en 2 l de agua que contenía ácido acético al 0,1 % a pH 5. Después de decantar el agua, el precipitado gomoso se lavó con agua (2 x 750 ml) y después se trituró con 300 ml de metanol. Cuando se completó la cristalización, el precipitado se filtró y se lavó sucesivamente con un exceso de metanol y éter, proporcionando 210 g del compuesto 8, un sólido de color amarillo con p.f. 92,1 °C. (Rendimiento 68 %). Después de cromatografía sobre gel de sílice (benceno-ciclohexano-etanol 50:50:5) el producto tenía un p.f. de 99,7 °C. La TLC sobre placas de gel de sílice (benceno-etanol-ciclohexano-éter de petróleo-AcOH 5:1:3:10:0,1) mostró un solo punto con Fr (factor de retención) 0,38, HPLC: pureza 97 %.

Etapa C:

Síntesis del compuesto 9

30 Se disolvieron 30 g (0,08 mmol) del compuesto 8 en 400 ml de metanol y hidrogenaron en un matraz de hidrogenación a temperatura ambiente en presencia de 6 g de catalizador de Pd al 20 %/C. El volumen teórico de hidrógeno (c: 6200 ml; 0,28 mmol) se absorbió en 1 hora (control por TLC). El catalizador de platino se filtró y el metanol se evaporó. El producto en bruto obtenido se solidificó al secarlo al vacío, dando como resultado 27,6 g del compuesto 9, un sólido de color amarillo (rendimiento del 99 %) que se usó sin purificación adicional en la conversión del compuesto 10 en bruto descrito a continuación. La pureza fue aceptable por análisis TLC. La TLC (cloroformo-metanol 4:1) mostró un solo punto, Fr 0,5 (reacción característica con 4-dimetil-aminobenzaldehído). La sal HCl se aisló después de reflujo en HCl. Los análisis CL-EM y RMN ¹H confirmaron la estructura esperada; HPLC: pureza 99 %.

Etapa D:**Síntesis del compuesto 10**

Se preparó una solución de 52,2 g (0,15 mmol) de intermedio 9 en 1000 ml de metanol. Se añadieron gota a gota 188 ml de NaOH 6 N a temperatura ambiente durante 1 hora y la solución se dejó en reposo durante 12 horas. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 300 ml de agua y se concentró a alto vacío. Se añadieron 700 ml de HCl al 37 % al residuo y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 4 horas. La mezcla obtenida se diluyó con 1,5 l de metanol y el precipitado de NaCl se retiró por filtración. El filtrado se usó en la etapa E. Se aisló una pequeña cantidad del diácido 10 antes de la dilución, filtrando la suspensión y lavando el precipitado sucesivamente con un exceso de agua, acetona y éter. El análisis por TLC (cloroformo-metanol 4:1) mostró un solo punto, Fr 0,26.

Etapa E:**Síntesis del compuesto 1**

La solución metanólica del ácido dicarboxílico 10 obtenido en la etapa D se enfrió a 0 - 5 °C y se añadieron gota a gota 100 ml de cloruro de tionilo. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura de reflujo durante 3 horas, después se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se retiró por evaporación. El precipitado obtenido se filtró y se lavó con éter, dando como resultado 27 g del compuesto 1 (rendimiento 63 %), un sólido con p.f. 115-116 °C. Después de la recristalización en tetrahidrofurano, se obtuvieron 17,5 g de cristales de color blanco de 1, teniendo p.f. 116 -117 °C. El análisis por TLC (cloroformo-metanol 4:1) mostró un solo punto, Fr 0,73, espectros UV: 234, 319 nm (MeOH). Espectros RMN ¹H: 2,0 (2H, m, CH₂CH₂COOCH₃), 2,5 (2H, t, CH₂CH₂COOCH₃), 3,1 (2H, m, COCH₂), 3,5 (1H, m, COCH₂CH), 3,75 (6H, s, COOCH₃), 7,6- 8,0 (4H, m, CH arom.). HPLC: pureza 99 %.

Etapa F:**Síntesis de éster N-[4-[[2,4-diamino-6-pteridinil]metil]amino]benzoil]pseudoglutámico (compuesto 3)**

Una mezcla de 7 g (27,4 mmol) de 2,4-diamino-6-bromometilpteridina 2 y 7 g (23,4 mmol) de N-[4-metil-amino]benzoil]pseudogluamato de dimetilo 1 en 70 ml de N,N-dimetilacetamida, se agitó durante 30 minutos a 70 °C, después se dejó permanecer a temperatura ambiente durante una noche protegida de la luz y después se calentó de nuevo durante 10 minutos a 100 °C. La reacción se controló por TLC. Después de un periodo de refrigeración, la mezcla de reacción se vertió en agua y se acidificó con AcOH a pH 4 (1000 ml). El precipitado de color pardo oscuro que se formó, se filtró, se lavó tres veces con agua y se dejó que se secase al aire. Se obtuvieron 2,6 g de producto de color amarillo 3, p.f. 200 - 210 °C. El filtrado se trató con NaHCO₃ al 10 % y el precipitado formado se separó en de la misma manera, dando como resultado una segunda fracción de éster dimetilico 3 (2 g). Rendimiento total: 36 %. El análisis TLC (cloroformo-metanol 4:1) mostró un solo punto, Fr 0,48, Espectros UV: 210, 242, 332 (HCl 0,1 N); 238, 335 (MeOH).

Ejemplo 2**Síntesis de ácido N-[4-[[2,4-diamino-6-pteridinil]metil]amino]benzoil]pseudoglutámico (compuesto 4)**

Se añadió en porciones 1 g (2,1 mmol) de éster dimetilico 3 a una solución de 10 ml de NaOH 2 N y 25 ml de etanol y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El precipitado formado se filtró y se disolvió en agua destilada. La solución alcalina se trató con carbón, se filtró y el pH se ajustó a 4,5 con AcOH al 10 %. El precipitado se filtró y se lavó con agua a pH 4,5 y después con acetona, dando como resultado 0,8 g del compuesto 4 (rendimiento 85 %). El producto, un sólido de color pardo, se purificó por HPTLC preparativa (Cromatografía de capa fina y alto rendimiento). Después de elución con CH₃CN-H₂O-NH₄OH 50:50:5, el diácido se extrajo del gel de sílice con 100 ml de una solución de NaOH a pH 8. El agua se retiró por liofilización. El análisis por TLC (CH₃CN-H₂O-NH₄OH 7:2:1) mostró un solo punto, Fr 0,80. Espectro de masas: m/z 120 (M+, 100 %). Espectros IR (KBr): 1651 (C=O), 1594 (C=C), 1563, 1403 (C=O ácido), 1176 (C-O), 823 (CH). Espectros UV: 242, 332 nm (HCl 0,1 N); 232, 259, 325 nm (NaOH 0,1 N); 229, 262, 318 (MeOH).

RMN ¹H: 1,6 (3H, m, CH-CH₂), 2,2 (2H, t, CH₂CH₂COOH), 2,9 (2H, m, COCH₂), 4,6 (2H, s, CH₂NH), 6,8 - 7,8 (4H, m, CH arom.), 9 (1H, s, 7-CH). HPLC: pureza 97 %.

Pueden producirse otros compuestos de la fórmula I adaptando los procedimientos expuestos anteriormente de forma adecuada. Por ejemplo, el intermedio 1 y compuestos análogos pueden convertirse en sus derivados N-metilo correspondientes por reacción con formaldehído y cianoborohidruro sódico. El intermedio 6 también puede producirse haciendo reaccionar cianoacetato de etilo con acrilato de etilo de acuerdo con procedimientos convencionales.

Ejemplo 3

Tratamiento de la AR en ratones *in vivo*: modelo de AR inducida por colágeno (AIC)

Se examinó la capacidad de los compuestos de fórmula I para tratar, en ratones, la artritis reumatoide inducida por colágeno. El modelo AIC está pensado para implicar tanto inmunidad celular como humoral.

5 Inducción de AR

Se encerraron ratones macho DBA/1 de 7-8 semanas de vida (Harlan, RU) en grupos de 10 con acceso libre al alimento y al agua. Se emulsionó un volumen de colágeno bovino de tipo II (solución de 2 mg/ml en ácido acético 0,05 M) con un volumen igual de Adyuvante Completo de Freund (CFA; *Mycobacterium tuberculosis* 4 mg/ml). El día 0 se inmunizó a todos los ratones por inyección intradérmica en sus colas de 0,1 ml de esta emulsión (100 µg de colágeno por ratón), con anestesia de Halotano, usando una jeringa de plástico. El lugar de la inyección estaba a una distancia caudal aproximada de un 1 cm desde la base de la cola. El día 21, los ratones también recibieron una exposición de colágeno por inyección intraperitoneal (colágeno bovino de tipo II 200 µg por ratón en solución salina tamponada con fosfato, PBS).

Tratamiento

15 Como control negativo se usó vehículo solo, mientras que como control positivo se usó metotrexato (MTX) en PBS. El compuesto ácido de fórmula I-A1 se disolvió en NaOH 0,2 N para conseguir una solución madre de 50 mg/ml y después se diluyó en PBS para proporcionar una serie de concentraciones. Se disolvieron otros compuestos de fórmula I de manera similar. A cada uno de los grupos de 10 ratones se les proporcionó 5 ml/kg de un líquido de ensayo o de control por inyección intraperitoneal, una vez al día desde el día 0 durante 6 semanas.

20 Observaciones y exámenes

25 El día 17 se examinó a los ratones para detectar síntomas de respuestas artrítogénicas en las articulaciones periféricas y posteriormente una vez al día hasta concluir el estudio. Se registraron las reacciones artríticas de cada pata de acuerdo con una escala en orden de gravedad ascendente de 0-4 como se describe a continuación y se calculó una puntuación artrítica total por ratón. Se midió el grosor de la pata en mm en las dos patas traseras (izquierda y derecha, justo por debajo de la almohadilla plantar y por encima del calcáneo) de cada animal. Las mediciones se realizaron el día 17 y posteriormente vez al día hasta concluir el estudio usando un calibrador dial (Kroeplin, Munich Alemania).

<i>Puntuación artrítica</i>	Nivel
Sin reacción, normal	0
Leve, aunque enrojecimiento e inflamación definidas en el tobillo/muñecas o enrojecimiento e inflamación apreciables limitado en dedos individuales, independientemente del número de dedos afectados	1
Enrojecimiento e inflamación de moderado a grave en el tobillo/muñeca	2
Enrojecimiento e inflamación de toda la pata incluyendo dedos	3
Pata inflamada en grado máximo con afectación de articulaciones múltiples	4

30 El día 0, 17 y posteriormente una vez al día, se realizaron y se registraron exámenes clínicos meticulosos. Las observaciones incluyeron cambios en la piel, pelo, ojos, membranas mucosas, aparición de secreciones y excreciones (por ejemplo, diarrea) y actividad autónoma (por ejemplo, lacrimación, salivación, piloerección tamaño de la pupila, modelo respiratorio atípico). También se observaron cambios en cuanto al modo de andar, en cuanto a la postura y en cuanto a respuestas frente al comportamiento así como en cuanto a la presencia de comportamiento extraño, temblores, convulsiones, sueño y estado de coma.

35 Durante el experimento se controlaron los pesos corporales individuales de los animales.

El estudio concluyó el día 42.

Resultados

Los resultados demostraron que, en este modelo, los compuestos de fórmula I ejercieron efectos antiartríticos significativos. Los ratones tratados con el control negativo (vehículo) tuvieron puntuaciones artríticas significativamente más altas y mayor grosor en las patas traseras que los ratones tratados con los compuestos del ensayo (véase Figura 2). Además, los efectos antiartríticos de los compuestos del ensayo se correlacionaron con puntuaciones histológicas significativamente reducidas en las patas (hiperplasia sinovial, desgaste óseo/cartilaginoso reducido e infiltrado celular).

En comparación con el metotrexato, los compuestos se toleraron a dosis absolutas más altas y fueron eficaces a un menor porcentaje de la dosis máxima tolerada. Por ejemplo, el compuesto de fórmula I-A1 fue eficaz a una dosis terapéutica del 10 % de la dosis máxima tolerada mientras que el metotrexato necesitó una dosis terapéutica dos veces más alta.

Con respecto a otros síntomas clínicos examinados al final del estudio, los grupos tratados con los compuestos de fórmula I mostraron una mejora notable sobre los grupos correspondientes tratados con metotrexato. Por ejemplo, los ratones tratados con metotrexato presentaron síntomas de anemia grave al final del estudio, pero en los grupos tratados con los compuestos del ensayo estos síntomas estuvieron completamente ausentes. Las mediciones del recuento de eritrocitos confirmaron esto, como se muestra en la Figura 3. No se observaron otros efectos secundarios durante el tratamiento, lo que sugiere la buena tolerancia de los compuestos del ensayo.

Ejemplo 4**Tratamiento de AR en ratas *in vivo*: modelo de AR inducido por adyuvante (AIA)**

Se examinó la capacidad de los compuestos de fórmula I para tratar, en ratas, la artritis reumatoide inducida por adyuvantes. El modelo AIA está pensado para implicar principalmente mecanismos mediados por linfocitos T.

Inducción de AR

Se encerraron ratas Lewis macho con un peso de 200 ± 10 g en grupos de 6 con libre acceso a alimento y agua. El día 1 del estudio se inyectaron 0,1 ml de CFA (*Mycobacterium tuberculosis* 3 mg/ml) en la región subplantar de la pata trasera derecha de cada rata.

Tratamiento

Las sustancias del ensayo se disolvieron primero en NaOH (si fuera necesario) como se ha explicado anteriormente y después se suspendieron en Tween 80 al 2 % para proporcionar una serie de concentraciones. Se administraron 10 ml/kg por sonda oral durante 21 días consecutivos, comenzando (el día 1) 1 hora antes de la inyección de CFA. Como control negativo se usó Tween 80 al 2 % y como control positivo metotrexato en Tween 80 al 2 %.

Observaciones y exámenes

Los volúmenes de la pata trasera derecha se midieron por desplazamiento de agua el día 0, 4 horas después de la inyección de CFA el día 1 y los días 7, 14 y 21. Los volúmenes de la pata trasera izquierda se midieron por desplazamiento de agua los días 0, 1, 7, 14 y 21. Se calcularon los aumentos acumulativos en el volumen de las patas en comparación con el observado para el control tratado con vehículo. Se consideró que una reducción del 30 % o más en el volumen de la pata con respecto al control negativo significaba actividad anti-inflamatoria. También se registró el peso corporal los días 1, 7, 14 y 21. El día 21 se registraron los síntomas de inflamación en las patas delanteras, en la cola, en el hocico y en las orejas.

Resultados

Síntomas generales de poliartritis: el 100 % de las ratas tratadas con control negativo desarrollaron poliartritis mientras que los animales no tratados desarrollaron estos síntomas. No se observaron cambios significativos en cuanto al peso corporal en las ratas tratadas con las dosis más bajas de los compuestos de ensayo frente al grupo negativo tratado con control. A continuación se indica la media de los volúmenes de las patas traseras de los grupos ensayados representativos.

ES 2 369 035 T3

Grupo 1 - Control negativo (sólo vehículo); Grupo 2 - control MTX; Grupo 3 - compuesto de fórmula I-A1 (dosis baja)

Fase aguda: Inflamación en pata tratada con CFA

Grupo	Media del volumen de la pata trasera derecha (desplazamiento de agua ml) Día					% de Inhibición de inflamación en cada intervalo de tiempo con respecto al control negativo			
	0	1	7	14	21	0-1	0-7	0-14	0-21
1	1,06	1,66	2,17	2,63	2,93	0	0	0	0
2	1,06	1,56	1,79	1,48	1,37	15	34	73	83
3	1,05	1,63	1,99	1,68	1,50	3	15	60	76

Fase tardía: inflamación en pata no tratada con CFA

Grupo	Media del volumen de la pata trasera izquierda (desplazamiento de agua ml) Día					% de Inhibición de inflamación en cada intervalo de tiempo con respecto al control negativo			
	0	1	7	14	21	0-1	0-7	0-14	0-21
1	1,07	1,07	1,08	1,91	2,46	0	0	0	0
2	1,06	1,06	1,08	1,10	1,14	-	-	95	94
3	1,05	1,05	1,06	1,09	1,11	-	-	95	95

5

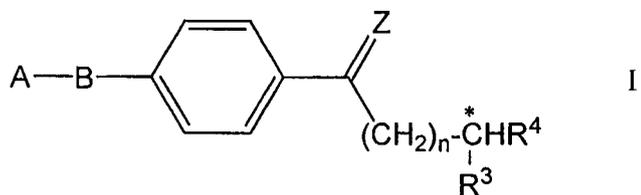
Se llega a la conclusión de que los compuestos de fórmula I son muy activos contra la fase aguda y tardía de la artritis inducida por Adyuvante Completo de Freund (CFA) en ratas.

Los resultados de estos estudios demuestran que la administración de los compuestos de fórmula I inhibe el desarrollo y la gravedad de la enfermedad en modelos animales de artritis usando mediciones clínicas múltiples.

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en terapia inmunosupresora, en el tratamiento o la prevención de una enfermedad autoinmune y/o reducción o prevención de la inflamación.



5

en la que:

Z = O o S;

n = 1;

R³ = -CO₂R⁸, -C(O)SR⁸, -C(O)NHR⁸, -C(S)OR⁸, -C(S)SR⁸, -C(S)NHR⁸,

10 -C(NH)SR⁸ o -C(NH)NHR⁸,

en los que R⁸ es -H o alquilo;

R⁴ = -H, -CH₂R⁵ o -CH₂CH₂R⁵,

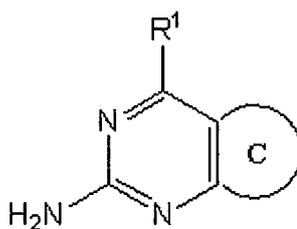
en los que R⁵ tiene independientemente uno de los significados de R³;

B = -NR²-, -CH₂NR²-, -CH₂CH₂NR²-, -CH₂CHR⁷- o -CH₂O-,

15 en los que R² es H o un grupo alquilo C₁₋₃, alquenoilo o alquinoilo, y

R⁷ es H o un grupo alquilo C₁₋₃ o alcoxi;

A=



en la que R¹ = -NH₂ o -OH,

20 C es un anillo aromático o no aromático, sustituido o sin sustituir de 5 o 6 miembros que también puede contener uno o más heteroátomos y C se conecta con el grupo B en cualquier posición disponible.

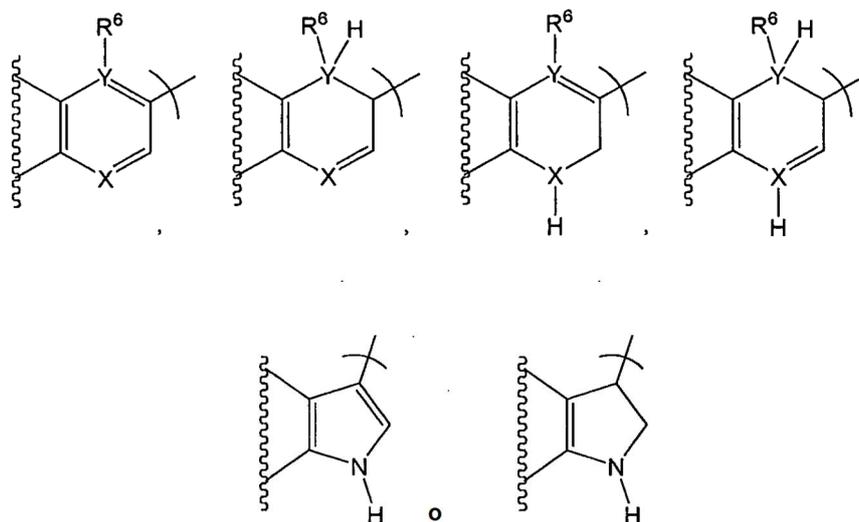
2. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el tratamiento o la prevención de una enfermedad autoinmune inflamatoria.

25 3. Compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el tratamiento o la prevención de artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil, espondilitis anquilosante, dermatomiositis, polimiositis, psoriasis, eccema, pénfigo vulgar, púrpura trombocitopénica idiopática refractaria crónica; enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa; poliarteritis nodosa; anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune o inflamación de tejido neuronal.

30 4. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 en el tratamiento o la prevención de artritis reumatoide, artritis psoriásica o espondilitis anquilosante.

5. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el tratamiento o la prevención de artritis reumatoide.

6. Compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Z es O.
7. Compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R⁸ es -H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo o butilo terciario.
8. Compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R³ es -CO₂R⁸ y R⁴ es -CH₂CH₂CO₂R⁸.
9. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que R⁸ es H, metilo o etilo.
10. Compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que B es -CH₂NR²-CH₂CHR⁷- o -CH₂O-.
11. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que B es -CH₂NR²-.
12. Compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R² es -H, -Me, -Et o -CH₂C≡CH.
13. Compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R⁷ es -H, -Me, -Et o -OMe.
14. Compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que C es:

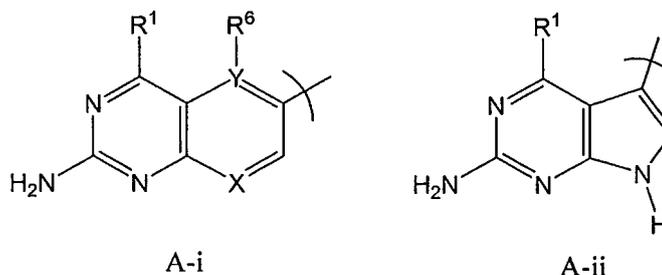


- 15 en las que X es CH o N y o bien:

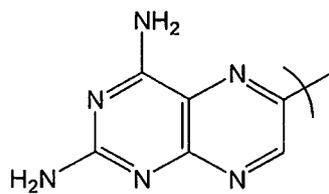
Y es C y R⁶ es H, Me, Et o HCO; o

Y es N y R⁶ es un solo par de electrones.

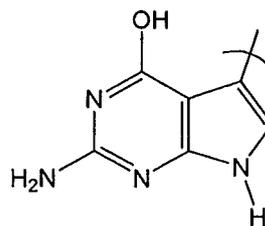
15. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que A es de la fórmula A-i o A-ii:



- 20 16. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que A es de la fórmula A-i-1 o A-ii-1:



A-i-1



A-ii-1

- 17 . Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que B es $-\text{CH}_2\text{NR}^2-$; R^2 es -H, - Me, -Et o $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$; Z es O; n es 1; y R^3 es $-\text{CO}_2\text{R}^8$.
- 5 18. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que B es $-\text{CH}_2\text{NR}^2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CHCH}_3-$ o $-\text{CH}_2\text{O}-$; R^2 es -H, -Me, -Et o $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$; Z es O; n es 1; R^3 es $-\text{CO}_2\text{R}^8$; R^4 es -H o $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}^8$; R^6 es independientemente -H, -Me o -Et; Si A es A-i e Y es C, R^6 es -H; y si A es A-ii, R^1 es -OH.

Figura 1

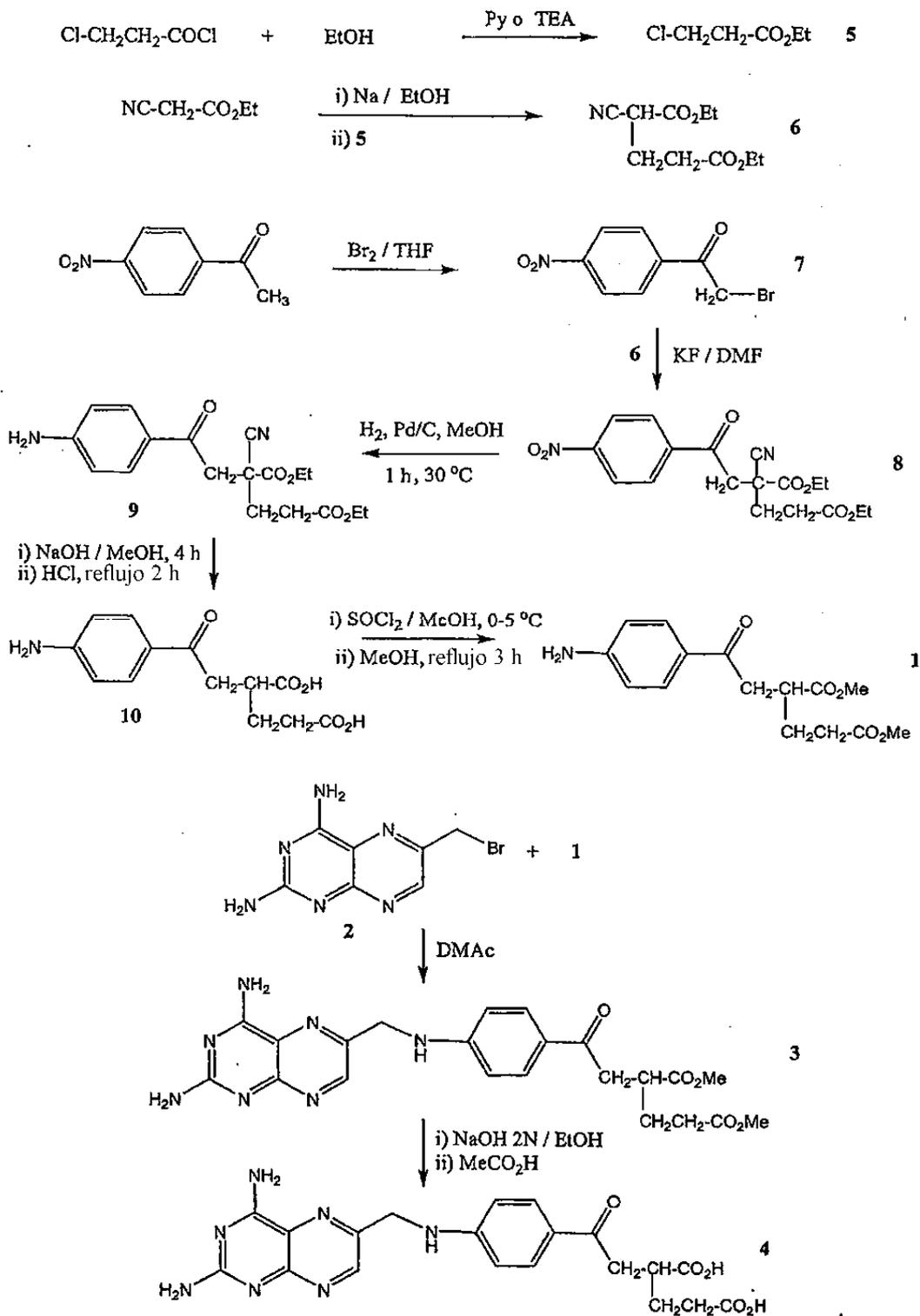
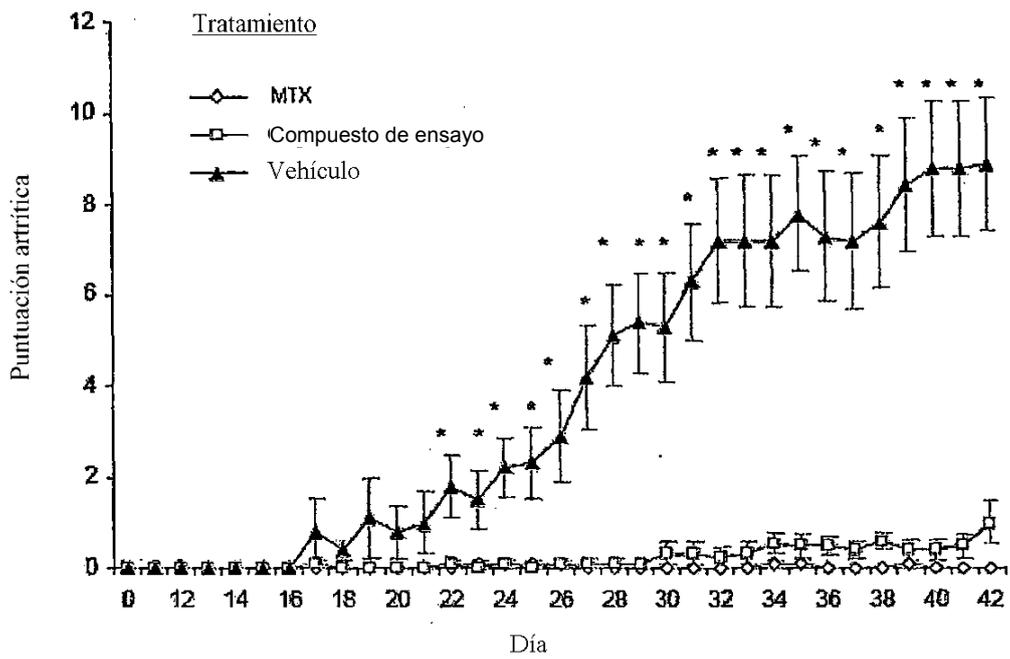


Figura 2

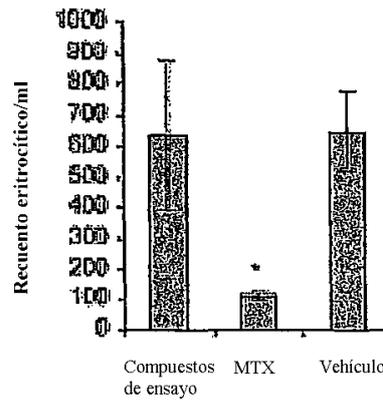
Puntuaciones artríticas medias



* P < 0,05 mayor para ratones tratados con vehículo que para ratones tratados con compuesto de ensayo o tratados con metotrexato

Figura 3

Recuentos eritrocíticos medios al final del estudio



*El uso de metatrexato conduce a recuentos eritrocíticos significativamente inferiores ($p < 0,05$) por ANOVA con ensayo Post-Hoc de Tukey