

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 163**

51 Int. Cl.:

C07D 251/18 (2006.01)

C07D 251/70 (2006.01)

A61K 31/53 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2008 E 08748198 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 2152676**

54 Título: **Derivados de triazina, composiciones que contienen tales derivados, y métodos de tratamiento de cáncer y enfermedades autoinmunitarias usando tales derivados**

30 Prioridad:

30.04.2007 US 924111 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.07.2013

73 Titular/es:

**PROMETIC BIOSCIENCES INC. (100.0%)
531, boulevard des Prairies, Édifice 15
Laval (Quebec) H7V 1B7, CA**

72 Inventor/es:

**ZACHARIE, BOULOS;
PENNEY, CHRISTOPHER;
GAGNON, LYNE;
GROUX, BRIGITTE;
GEERTS, LILIANNE y
ABBOTT, SHAUN, D.**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 415 163 T3

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

DESCRIPCIÓN

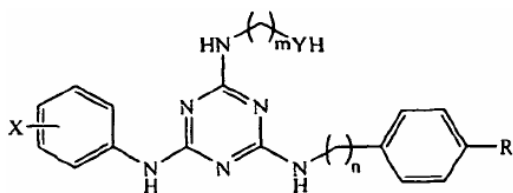
Derivados de triazina, composiciones que contienen tales derivados, y métodos de tratamiento de cáncer y enfermedades autoinmunitarias usando tales derivados

Referencia cruzada a solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional n.º 60/924.111, presentada el 30 de abril de 2007.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de la siguiente fórmula:



en la que X es flúor o cloro; Y es oxígeno, azufre o un grupo imino; R es un grupo amino, hidroxilo, sulfonamida o carboxamida o un análogo de N-monometilo o N-dimetilo de los mismos; m es un número entero desde 2 hasta 6; y n es un número entero desde 0 hasta 2. Los compuestos pueden usarse para tratar determinados cánceres y enfermedades autoinmunitarias.

Antecedentes de la invención

Cáncer se refiere a más de cien formas de enfermedad clínicamente distintas. Casi cada tejido del cuerpo puede dar lugar a cáncer y algunos incluso pueden producir varios tipos de cáncer. El cáncer se caracteriza por un crecimiento anómalo de células que pueden invadir el tejido de origen o propagarse a otros sitios. De hecho, la gravedad de un cáncer particular, o su grado de malignidad, se basa en la propensión de las células cancerosas a invadir tejido adyacente y a propagarse. Es decir, diversos cánceres humanos (por ejemplo, carcinomas) difieren apreciablemente en cuanto a su capacidad para propagarse desde un sitio o tumor primario, y para metastatizarse por todo el cuerpo. De hecho, es el proceso de metástasis tumoral lo que es perjudicial para la supervivencia a largo plazo del paciente con cáncer. Un cirujano puede eliminar un tumor primario, pero un cáncer que se ha metastatizado a menudo alcanza demasiados lugares como para permitir una curación quirúrgica. Para metastatizarse satisfactoriamente, las células cancerosas deben desprenderse de su ubicación original, invadir un vaso sanguíneo o linfático, viajar en la circulación hasta un nuevo sitio y establecer un tumor allí.

Los doce cánceres principales son cánceres de próstata, de mama, de pulmón, colorrectal, de vejiga, linfoma no Hodgkin, uterino, melanoma, de riñón, leucemia, ovárico y pancreático. El melanoma es un cáncer principal y un problema de salud creciente a nivel mundial en virtud de su capacidad para metastatizarse a la mayoría de los órganos del cuerpo, lo que incluye ganglios linfáticos, pulmones, hígado, cerebro y hueso. El desenlace clínico para pacientes con metástasis en sitios distantes es significativamente peor que el observado con metástasis en ganglios linfáticos regionales. La mediana del tiempo de supervivencia para pacientes con metástasis en pulmón es de once meses mientras que para pacientes con metástasis en hígado, cerebro y hueso es de cuatro meses. Se han usado cuatro tipos de tratamiento para metástasis de melanoma distantes: cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia. La cirugía se usa lo más frecuentemente para mejorar la calidad de vida del paciente, tal como eliminando una metástasis que está obstruyendo el tubo digestivo. La radioterapia tiene algún grado de eficacia en el control local de metástasis, pero se limita principalmente a metástasis cutánea y/o de ganglios linfáticos. Se han evaluado varios agentes quimioterápicos para el tratamiento de melanoma metastásico. Sin embargo, sólo dos fármacos citotóxicos pueden lograr una tasa de respuesta del 10% o más. Estos fármacos son decarbazina (DTIC) y nitrosoureas. Sólo la DTIC está aprobada para el tratamiento de melanoma en la mayoría de países. Posteriormente, la ausencia de efectos a largo plazo clínicamente significativos, beneficiosos de la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia para el tratamiento de melanoma metastásico ha conducido al uso de inmunoterapia. Hasta ahora, se le había prestado la mayor parte de la atención a las citocinas interleucina-2 e interferón- α . Los ensayos clínicos han producido mejores resultados con interleucina-2 pero, en promedio, solo el 15% de los pacientes con melanoma metastásico presentan una reducción significativa en la carga tumoral en respuesta a interleucina-2.

De manera similar al melanoma, otros cánceres se vuelven potencialmente mortales gravemente una vez que se produce la metástasis. El cáncer pancreático produce un 3% de posibilidad de supervivencia más allá de un año después de que se produzca la metástasis (por ejemplo, primer diagnóstico). Esto aumenta sólo hasta un 18% con el tratamiento con el fármaco citotóxico gemcitabina y un 24% con el tratamiento con gemcitabina, Tarceva y el inhibidor de EGFR cinasa. El cáncer de próstata puede controlarse satisfactoriamente mediante cirugía o radiación

siempre que el cáncer esté confinado en la próstata. Pero existen pocos tratamientos eficaces disponibles una vez que se produce la metástasis, especialmente si falla la terapia de deprivación androgénica.

Otros cánceres pueden tratarse más eficazmente con agentes quimioterápicos que el melanoma, cáncer pancreático o de próstata. Sin embargo, los agentes quimioterápicos padecen dos limitaciones principales. En primer lugar, los agentes quimioterápicos no son específicos para células cancerosas y, particularmente a altas dosis, son tóxicos para células normales que se dividen rápidamente. En segundo lugar, con el tiempo, las células cancerosas desarrollan resistencia a los agentes quimioterápicos, dejando de proporcionar de este modo beneficio adicional al paciente. Tal como se indicó para el melanoma, se han investigado otras modalidades de tratamiento para abordar las limitaciones que surgen del uso de agentes quimioterápicos. No obstante, estos tratamientos adicionales han tenido éxito limitado para el tratamiento de otros cánceres. Los ejemplos de tratamientos del cáncer adicionales y sus limitaciones incluyen cirugía (incapacidad para eliminar completamente metástasis extensa), radiación (incapacidad para suministrar selectivamente radiación a células cancerosas) e inmunoterapia (el uso de citocinas tóxicas con eficacia limitada). Por este motivo, están investigándose otros enfoques terapéuticos más nuevos (por ejemplo, agentes antiangiogénicos, agentes de apoptosis, terapia génica) pero estos tratamientos están, relativamente, en sus comienzos. Por tanto, existe todavía una necesidad de enfoques novedosos mostrados a modo de ejemplo por agentes quimioterápicos novedosos que sean eficaces (por ejemplo, reducción en el tamaño tumoral o en la propagación de metástasis), tengan toxicidad limitada para el tratamiento de cáncer, prolonguen el tiempo hasta desarrollar resistencia al fármaco o cualquier combinación de los mismos.

El documento EP 1479397 A1 se refiere a un agente antidemencia que usa un inhibidor del canal de potasio BEC 1 como principio activo. Se dice que el inhibidor del canal de potasio BEC 1 tiene una acción mejorando trastornos del aprendizaje y es útil como agente preventivo o terapéutico para enfermedades, preferiblemente demencia, en las que se considera que el canal de potasio BEC 1 está implicado. Además, se dice que un compuesto que tiene 2,4,6-triamino-1,3,5-triazina tiene una acción inhibitoria del canal de potasio BEC I.

El documento WO 9710887 A1 se refiere a conjugados de ligando de afinidad-matriz que comprenden un ligando, ligando que está unido a una matriz de soporte, opcionalmente a través de un brazo espaciador interpuesto entre la matriz y el ligando. Las enseñanzas de este documento se refieren además a estos conjugados de ligando de afinidad-matriz y a la preparación y al uso de los mismos en la purificación de materiales proteínicos tales como por ejemplo inmunoglobulinas, insulinas, factor VII u hormona de crecimiento humana o análogos, derivados y fragmentos de los mismos y precursores.

El documento CA 2216486 A1 se refiere a compuestos de triazina, a sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y a las formas estereoquímicamente isoméricas de los mismos, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de sujetos que padecen infección por VIH (virus de la inmunodeficiencia humana).

El documento CA 2578995 A1 describe compuestos de triazina que se dice que son útiles en la unión a la parte de cola o Fc de inmunoglobulinas y por lo tanto tienen utilidad en aquellas aplicaciones que requieren la interacción por unión no covalente de una molécula con la parte Fc de inmunoglobulinas. Tales aplicaciones incluyen la detección y purificación de inmunoglobulinas así como el tratamiento de determinadas enfermedades autoinmunitarias.

Sumario de la invención

En una realización, se proporcionan compuestos, composiciones que contienen tales compuestos y usos de tales compuestos en métodos de fabricación de medicamentos.

Estos compuestos, composiciones y medicamentos pueden actuar a través de un mecanismo de acción útil con toxicidad reducida para el tratamiento de al menos algunos cánceres. Aunque pueden usarse solos para tratar cáncer, un tratamiento más eficaz puede comprender el uso de los compuestos en combinación con otras terapias o fármacos anticancerígenos. El uso de los compuestos en combinación con agentes quimioterápicos puede proporcionar un posible método para abordar las limitaciones indicadas anteriormente que surgen con el uso de quimioterapia: toxicidad del fármaco y resistencia al fármaco. Por tanto, los compuestos pueden ser relativamente menos tóxicos que otros agentes quimioterápicos, tal como se demuestra mediante los datos de animales y citotoxicidad celular, y su mecanismo de acción diferente debe reducir la resistencia al fármaco quimioterápico, especialmente si la dosis del agente quimioterápico puede disminuirse cuando se usa en combinación con compuestos de la presente invención. Los compuestos pueden usarse en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer.

Además, estos compuestos, composiciones y medicamentos pueden actuar a través de un mecanismo de acción útil con toxicidad reducida para el tratamiento de al menos algunas enfermedades autoinmunitarias. Aunque pueden usarse solos para tratar una enfermedad autoinmunitaria, un tratamiento más eficaz puede comprender el uso de los compuestos en combinación con otras terapias o fármacos antiinflamatorios. Los compuestos pueden usarse en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad autoinmunitaria.

Aspectos adicionales de la invención resultarán evidentes para el experto en la técnica a partir de la siguiente

descripción y reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 muestra el efecto del compuesto V sobre la adhesión de células PC-3 sobre una variedad de sustratos: (A) laminina, (B) matriz de membrana basal MATRIGEL™ o (C) colágeno.
- La figura 2 muestra los efectos antitumorales sobre un melanoma primario B16F10 de diferentes compuestos. Los efectos del compuesto I, compuesto II o doxorubicina se comparan en la figura 2A. Los efectos del compuesto V o Cytosan se comparan en la figura 2B.
- 10 La figura 3 muestra los efectos antitumorales de la administración intravenosa de compuesto II, compuesto IV, compuesto V o ciclofosfamida sobre un tumor de mama DA-3.
- 15 La figura 4 muestra los efectos antitumorales de la administración intravenosa de combinaciones de compuestos sobre un tumor de mama DA-3. Los efectos del compuesto II, ciclofosfamida y ciclofosfamida + compuesto II se comparan en la figura 4A. Los efectos del compuesto I, ciclofosfamida y ciclofosfamida + compuesto I se comparan en la figura 4B. Los efectos del compuesto V, ciclofosfamida y ciclofosfamida + compuesto V se comparan en la figura 4C.
- 20 La figura 5 muestra la eficacia antitumoral de la administración oral de cisplatino solo comparada con la combinación de compuesto VII y cisplatino sobre un tumor de mama DA-3.
- La figura 6 muestra la eficacia antitumoral del compuesto I, compuesto II, compuesto V o ácido acetilsalicílico sobre un mastocitoma P815.
- 25 La figura 7 muestra la eficacia antitumoral del compuesto II sobre un tumor de pulmón LL/2. Los efectos del compuesto II y cisplatino se comparan en la figura 7A. Los efectos del compuesto II solo, ciclofosfamida sola y la combinación de ciclofosfamida + compuesto II se comparan en la figura 7B.
- 30 La figura 8 muestra la eficacia antitumoral del compuesto II, compuesto III, compuesto VII o ciclofosfamida sobre un tumor de pulmón LL/2.
- La figura 9 muestra la eficacia antitumoral del compuesto I, compuesto V o gemcitabina sobre un tumor pancreático PAN02.
- 35 La figura 10 muestra la eficacia antitumoral de los compuestos sobre un tumor de próstata PC-3: compuesto II solo (figura 10A), combinación de ciclofosfamida + compuesto II (figura 10B) y comparación de compuesto V con la combinación de ciclofosfamida + compuesto V (figura 10C).
- 40 La figura 11 muestra el efecto del compuesto V sobre la inhibición de PGE₂ liberada mediante inducción por LPS a partir de células J774A.1.
- La figura 12 muestra el efecto del compuesto I sobre la mortalidad de ratones NZB x NZW.
- 45 La figura 13 muestra el efecto de la administración intravenosa de compuesto I sobre el desarrollo de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH): exposición primaria (figura 13A) y exposición secundaria (figura 13B).
- La figura 14 muestra el efecto de administración intravenosa del compuesto II sobre el desarrollo de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH): exposición primaria (figura 14A) y exposición secundaria (figura 14B).
- 50 La figura 15 muestra el efecto de la administración oral de compuesto IV o compuesto V sobre la inflamación tal como se midió mediante el grosor de la oreja tras DTH.
- 55 La figura 16 muestra el efecto de la administración oral de compuesto III sobre el desarrollo de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH): exposición primaria (figura 16A) y exposición secundaria (figura 16B).
- La figura 17 muestra el efecto de la administración intravenosa de compuesto X o compuesto XI sobre la inflamación tal como se midió mediante el grosor de la oreja tras DTH.
- 60 La figura 18 muestra el efecto de la administración oral de compuesto I, compuesto IV o compuesto V sobre la artritis inducida por adyuvante (AIA).
- La figura 19 muestra el efecto de la administración intravenosa de compuesto II o compuesto V sobre el recuento de glóbulos blancos inducidos mediante lipopolisacárido (LPS).
- 65

La figura 20 muestra el efecto de la administración intravenosa de compuesto II o compuesto V sobre la producción de diferentes mediadores solubles en un modelo de rata de bolsa de aire dos horas tras la inducción mediante lipopolisacárido (LPS): TNF α (figura 20A), PGE $_2$ (figura 20B), LTB $_4$ (figura 20C) o MCP-1 (figura 20D).

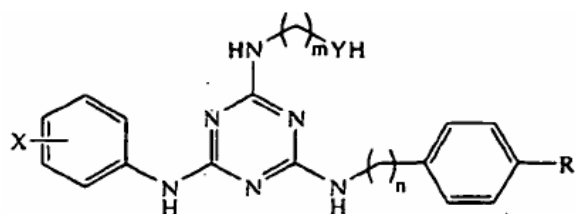
5 La figura 21 muestra el efecto de la administración intravenosa de compuesto II o compuesto V sobre la producción de diferentes mediadores solubles en un modelo de rata de bolsa de aire doce horas tras la inducción mediante lipopolisacárido (LPS): TNF α (figura 21A) o PGE $_2$ (figura 21B).

La figura 22 muestra la inhibición del daño macroscópico del colon distal mediante el compuesto V.

10 La figura 23 muestra el efecto del compuesto V sobre los signos clínicos de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).

Descripción de determinadas realizaciones de la invención

15 Los compuestos de la presente invención, o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, se describen mediante la siguiente fórmula:



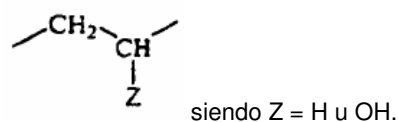
20 en la que X es F o Cl;

Y es NH, O o S;

25 R es NH $_2$, OH, SO $_2$ NH $_2$, SO $_2$ N(CH $_3$)H, SO $_2$ N(CH $_3$) $_2$ o CONH $_2$;

m es 2, 3, 4, 5 ó 6; y

30 n es 0, 1 ó 2 en el que un fragmento de dos carbonos (n = 2) puede representarse por



En realizaciones preferidas, puede aplicarse uno o más de los siguientes:

35 X = F; y/o

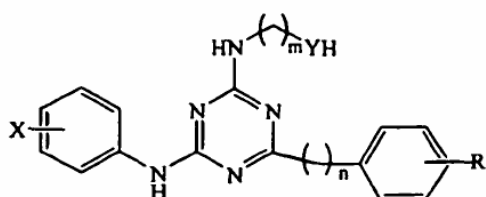
Y = NH u O; y/o

R = NH $_2$, OH, SO $_2$ NH $_2$, o SO $_2$ N(CH $_3$) $_2$; y/o

40 m = 4, 5 ó 6; y/o

n = 2.

45 La presente invención se refiere además a un compuesto de la siguiente fórmula:



en la que X es F o Cl;

Y es NH, O o S;

5 R es NH₂, OH, F o Cl;

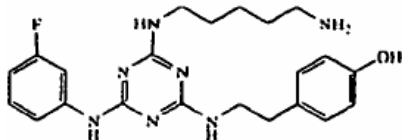
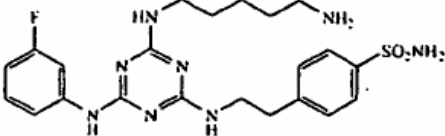
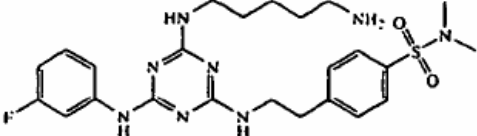
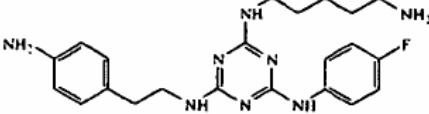
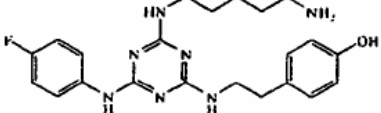
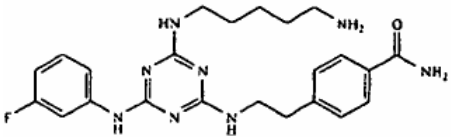
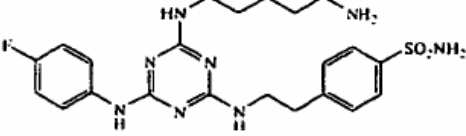
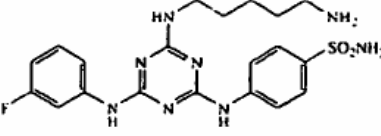
m es un número entero desde 2 hasta 6; y

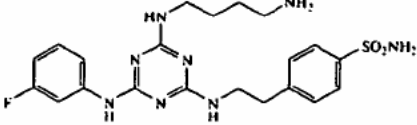
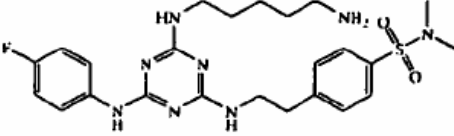
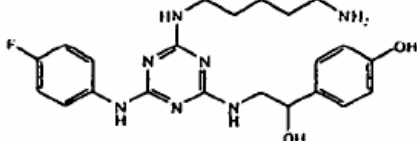
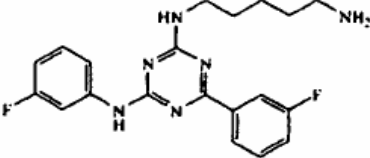
n es un número entero desde 0 hasta 2

10 para el tratamiento de cáncer o para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un paciente humano que lo necesita.

Una realización preferida de este aspecto de la invención es el compuesto XII mostrado a continuación.

15 Se prefieren particularmente los compuestos I-XI que tienen las siguientes estructuras:

Compuesto	Estructura
I	
II	
III	
IV	
V	
VI	
VII	
VIII	

IX	
X	
XI	
XII	

Aunque algunos compuestos se describen mediante la fórmula general anterior, cualquier experto en la técnica apreciará que determinadas modificaciones estructurales que están fuera de la fórmula, pero que no obstante son obvias, se encuentran dentro del alcance de esta invención. Por ejemplo, es posible sintetizar compuestos descritos mediante la fórmula anterior que no contienen una sustitución con halógeno en el anillo de fenilo. Se prepararon tales compuestos, pero se observó que eran generalmente más tóxicos que compuestos de triazina sustituidos con monocloro o fluorofenilo. De manera similar, compuestos de triazina sustituidos con dihalofenilo se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Adicionalmente, aunque la fórmula general describe compuestos de fenilo sustituidos en para (amino, hidroxilo, sulfonamida, etc.), es posible que tales sustituyentes también puedan prepararse en las posiciones orto o meta de la parte de anillo de benceno del resto fenilo. Finalmente, la parte de etileno del resto fenilo sustituido puede reemplazarse por un fragmento de etileno insaturado o una estructura cíclica condensada (anillo de cinco o seis miembros) con el anillo de benceno para introducir una estructura con menos grados de libertad que el resto fenilo o una alternativa más rígida.

Un enfoque novedoso al tratamiento de cáncer reside en el descubrimiento de nuevos compuestos que son eficaces en la reducción del tamaño tumoral y/o la propagación de la metástasis y que también pueden reducir la inflamación. Los compuestos de la presente invención pueden satisfacer este requisito de una clase novedosa de este tipo de compuestos útiles para el tratamiento de cáncer. Es decir, compuestos que simultáneamente presentan propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias significativas ofrecen un posible enfoque de doble acción que selecciona como diana tanto células tumorales genéticamente inestables (tasa de mutación alta y posterior resistencia a la quimioterapia) como células genéticamente normales presentes en el tejido inflamado.

Este enfoque de doble acción para el tratamiento de cáncer se hace más convincente al aumentar el reconocimiento de que existe un vínculo entre inflamación crónica y el desarrollo posterior de cáncer. Esta inflamación crónica, a su vez, es a menudo el resultado de infecciones bacterianas o virales persistentes y no potencialmente mortales (en ese momento). De hecho, la etiología de numerosos cánceres específicos puede vincularse directamente con patógenos específicos. Por ejemplo, el virus del papiloma humano, el virus de la hepatitis B o C y el virus de Epstein-Barr son factores de riesgo para cáncer de cuello uterino, carcinoma hepatocelular y trastornos linfoproliferativos respectivamente. *H. pylori* es uno de los principales contribuyentes al cáncer gástrico. Más recientemente se descubrió que la enfermedad periodontal (encías), un estado inflamatorio crónico asociado con la presencia de un número superior de bacterias en la boca, está vinculada con un riesgo significativamente superior de desarrollar cáncer pancreático.

El vínculo entre cáncer e inflamación parece tener sus raíces a nivel molecular. Las moléculas asociadas con inflamación, o una respuesta inmunitaria proinflamatoria, están vinculadas con la progresión del cáncer. Por ejemplo, el factor de necrosis tumoral (TNF α) puede considerarse como la más importante de las citocinas proinflamatorias puesto que regula la producción de otras citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-1, IL-6, IL-8 y GM-CSF). De manera interesante, altas dosis de TNF α administradas a animales que portan tumores presentan actividad anticancerígena. Sin embargo, esto no se ha traducido en actividad anticancerígena significativa en seres humanos tal como se demuestra mediante un ensayo clínico de fase I con TNF α recombinante. De manera más importante, se expresa TNF α en una gama de tumores humanos y su presencia se asocia generalmente con mal pronóstico. De

hecho, parece que concentraciones relativamente bajas de TNF α endógeno producido de manera crónica en el microentorno del tumor potencia el desarrollo y la propagación del tumor. Es decir, la actividad anticancerígena de TNF α sólo se observa a concentraciones suprafisiológicas de esta citocina. Otra molécula, o conjunto de moléculas proteicas, de la que se planteó la hipótesis de que proporciona un vínculo entre cáncer e inflamación, es el factor transcripción NF κ B. NF κ B, una familia de proteínas de unión al ADN, puede ser el activador de la transcripción más fuerte en células de mamífero. Este factor de transcripción activa la biosíntesis de varias proteínas que incluyen varias citocinas proinflamatorias (incluyendo TNF α) y quimiocinas. Tal como se indicó anteriormente para TNF α , muchos cánceres tiene actividad de NF κ B elevada. El trabajo con varios modelos de ratón ha aclarado el mecanismo mediante el cual la activación sostenida de NF κ B podría vincular la inflamación con la promoción y progresión tumoral. Este trabajo se revisó recientemente por Karin y Greten (Nature Immunology, 5:749-759, 2005). Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse incluyen artritis (por ejemplo, artritis psoriásica o reumatoide), psoriasis, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, espondilitis anquilosante, síndrome de Sjögren, enfermedad de Still (síndrome de activación macrofágica), esclerosis múltiple, uveítis, esclerodermia, miositis, síndrome de Reiter, síndrome de Wegener, lupus eritematoso sistémico (SLE), púrpura trombocitopénica inmunitaria (ITP), glomerulonefritis y vasculitis.

Una indicación de la capacidad de los compuestos de la presente invención para abordar al menos uno de los vínculos moleculares descritos anteriormente entre cáncer e inflamación, TNF α , se demuestra en los ejemplos 21 y 22. En estos ejemplos, se muestra en ensayos basados en células (células WEHI-13VAR y J774A.1) que los compuestos de la presente invención pueden antagonizar la actividad proinflamatoria de TNF α . Es decir, estos compuestos pueden inhibir el efecto de TNF α tal como se determinó mediante su capacidad para inhibir la apoptosis o citotoxicidad inducida por TNF α en la línea celular WEHI-13VAR y para inhibir la producción de TNF α inducida por LPS en la línea celular J774A.1.

Otra indicación de la capacidad de los compuestos de la presente invención para abordar otros vínculos moleculares descritos anteriormente entre cáncer e inflamación, metabolitos de ácido araquidónico, se demuestra en el ejemplo 28. En este ejemplo, se muestra en un modelo de bolsa de aire, inducido por LPS que los compuestos de la presente invención inducen una inhibición de la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) y leucotrieno B₄ (LTB₄). Además de sus propiedades proinflamatorias, está bien documentado que la ruta de eicosanoides está activada en cáncer de próstata, mama y colon. Los metabolitos de ciclooxigenasa (COX; prostaglandina) y lipooxigenasa (LOX; leucotrieno) contribuyen a la progresión de la enfermedad mediante la promoción de la angiogénesis, invasión, motilidad y proliferación celular. Es decir, estos compuestos pueden inhibir enfermedades inflamatorias y cáncer mediante su efecto inhibitorio sobre la producción de PGE₂ y LTB₄ tal como se determinó mediante su capacidad para inhibir la inflamación inducida por LPS en un modelo de bolsa de aire.

Los compuestos de la presente invención incluyen todos los derivados farmacéuticamente aceptables, tales como sales así como cualquier enantiómero o isómero geométrico. Pueden prepararse formulaciones del compuesto activo para proporcionar una composición farmacéutica en una forma adecuada para la administración enteral, mucosa (por ejemplo, sublingual, pulmonar y rectal), parenteral (por ejemplo, intramuscular, intraarterial, intradérmica, subcutánea e intravenosa) o tópica (por ejemplo, pomadas, cremas y lociones). En particular, los compuestos de la presente invención pueden solubilizarse en un alcohol o disolvente de poliol (por ejemplo, ésteres de polioxietileno SOLUTOL® HS 15 de ácido 12-hidroxiesteárico de BASF, glicerol, etanol, etc.), disolución acuosa de mono o disacáridos o cualquier otro disolvente biocompatible tal como dimetilsulfóxido (DMSO) o aceite de ricino polietoxilado CREMOPHOR EL® (también de BASF). La formulación puede presentarse convenientemente, cuando sea apropiado, en unidades de dosificación diferenciadas y puede prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Todos los métodos incluyen la etapa de juntar el principio farmacéutico activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos según dicte la necesidad. Cuando sea apropiado, las formulaciones descritas anteriormente pueden adaptarse de modo que proporcionen liberación sostenida del principio farmacéutico activo. La formulaciones de liberación sostenida bien conocidas en la técnica incluyen el uso de una inyección en bolo, infusión continua, polímeros biocompatibles o liposomas.

Las elecciones adecuadas en cantidades y tiempos de dosis, formulación y vías de administración pueden hacerse con los objetivos de lograr una respuesta favorable en el mamífero (es decir, eficacia) y evitar toxicidad excesiva u otro daño al mismo (es decir, seguridad). Por tanto, "eficaz" se refiere a tales elecciones que implican manipulación rutinaria de condiciones para lograr un efecto deseado: por ejemplo, reducir la morbimortalidad de un paciente con un cáncer o una enfermedad autoinmunitaria; disminuir el crecimiento o la metástasis de células cancerosas; alterar el ciclo celular o la apoptosis; reducir o mejorar de otra manera la lesión tisular asociada con una respuesta inmunitaria a los constituyentes del cuerpo (órganos y tejidos como glándula suprarrenal, ojo, riñón, hígado, pulmón, páncreas, sistema nervioso, piel, articulación sinovial, tiroides, etc.); restaurar el estado inmunológico o normalizar un trastorno/estado patológico del mamífero (título de anticuerpos, subconjuntos de células inmunitarias, señalización por citocinas o quimiocinas, complejos inmunitarios de anticuerpo-antígeno, etc.); eliminar anticuerpos libres y/o complejos inmunitarios de anticuerpo-antígeno de la circulación; mejorar los indicios de laboratorio de enfermedad autoinmunitaria (concentración o cantidad absoluta de mediadores solubles de inflamación, presencia de autoanticuerpos, proliferación celular, etc.); aumentar la eficacia de la terapia con fármacos quimioterápicos o

antiinflamatorios convencional; y combinaciones de los mismos. En particular, deben evitarse efectos perjudiciales del tratamiento quimioterápico o anti-TNF α convencional. El mamífero puede ser un paciente humano o animal.

La cantidad de compuesto administrada depende de factores tales como, por ejemplo, bioactividad y biodisponibilidad del compuesto (por ejemplo, semivida en el cuerpo, estabilidad y metabolismo); propiedades químicas del compuesto (por ejemplo, peso molecular, hidrofobicidad y solubilidad); vía y programa de administración; y similares. También se entenderá que el nivel de dosis específico que hay que lograr para cualquier paciente particular puede depender de una variedad de factores, incluyendo edad, salud, historial médico, peso, combinación con uno o más otros compuestos y gravedad de la enfermedad.

El término "tratamiento" se refiere a, entre otros, reducir o aliviar uno o más síntomas de cáncer o enfermedad autoinmunitaria. Para un paciente dado, la mejora de un síntoma, su empeoramiento, regresión o progresión puede determinarse mediante una medición objetiva o subjetiva.

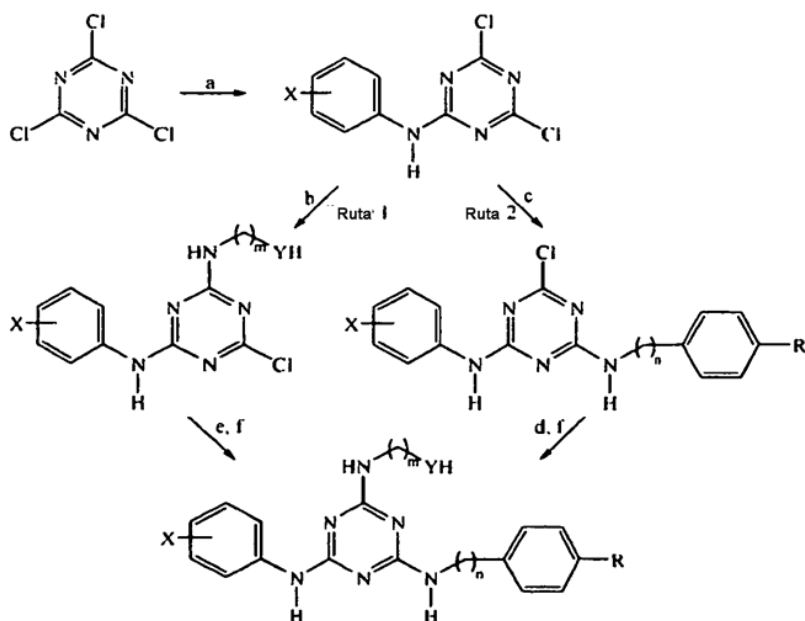
Finalmente, los expertos en la técnica apreciarán que la referencia en el presente documento a tratamiento se extiende a profilaxis así como a terapia de un cáncer o una enfermedad autoinmunitaria establecidos. Por tanto, por ejemplo, los compuestos de la presente invención podrían usarse tras la extirpación quirúrgica del tumor primario o antes de la cirugía o quimioterapia agresiva o incluso cuando el paciente está en remisión. La carencia relativa de toxicidad de los compuestos observada en los estudios con ratones in vivo (por ejemplo, tal como se observa en los ejemplos adjuntos) en comparación con las terapias de cáncer habituales permite un mayor uso profiláctico de lo que sería aconsejable con terapias convencionales. De manera similar, los compuestos de la presente invención pueden usarse en combinación con otros modos de tratamiento existentes de cáncer o enfermedad autoinmunitaria o agentes usados para el tratamiento de cáncer (por ejemplo, fármacos citotóxicos, inhibidores de la angiogénesis, inmunoestimulantes, inhibidores de proteína cinasa) o enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, corticosteroides antiinflamatorios, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, metotrexato, DMARD, productos biológicos tales como proteína recombinante o anticuerpo monoclonal). Los ejemplos de agentes quimioterápicos que pueden usarse con uno o más compuestos de la invención incluyen decarbazina, doxorubicina, daunorubicina, ciclofosfamida, vinblastina, vincristina, bleomicina, etopósido, topotecán, irinotecán, Taxotere, Taxol, 5-fluorouracilo, gemcitabina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino y clorambucilo. Los ejemplos de agentes terapéuticos que pueden usarse con uno o más compuestos de la invención incluyen los que bloquean la unión de TNF α a su receptor o la transducción de señales posterior (por ejemplo, proteínas recombinantes que se unen específicamente a TNF α , anticuerpos anti-TNF α , receptores de TNF α solubles, compuestos no proteínicos que tienen un PM menor de 1000). La dosis de compuesto que va a administrarse estará en última instancia a la discreción del oncólogo, reumatólogo u otro médico. Sin embargo, en general las dosis estarán en el intervalo de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 75 mg/kg al día. Más preferiblemente, el intervalo será de desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 50 mg/kg al día.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la práctica de esta invención pero no se pretende que limiten el alcance de la presente invención tal como se especifica mediante las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

La secuencia sintética general para la preparación de los compuestos útiles en la presente invención se explica resumidamente en la ruta 1 o la ruta 2 (esquema 1). La ruta 1 ilustra la reacción de cloruro cianúrico con haloanilina para dar el producto intermedio de dicloro-triazina. Se añadieron entonces aril o aralquilaminas seguido por alquilaminas. La ruta 2 demuestra la preparación del producto intermedio de dicloro-triazina como en la ruta 1 seguido por la reacción con alquilaminas, entonces mediante la adición de aril o aralquilaminas. La última etapa fue la eliminación de los grupos protectores.

Esquema 1



Reactivos: (a) haloanilina, acetona/agua, $-10^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$; (b) alquildiamina o alcanolamina o tioalquilamina, $\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{THF}/\text{acetona}$, t.a.; (c) $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R}$, NaHCO_3 , acetona/ H_2O ; (d) alquildiamina o

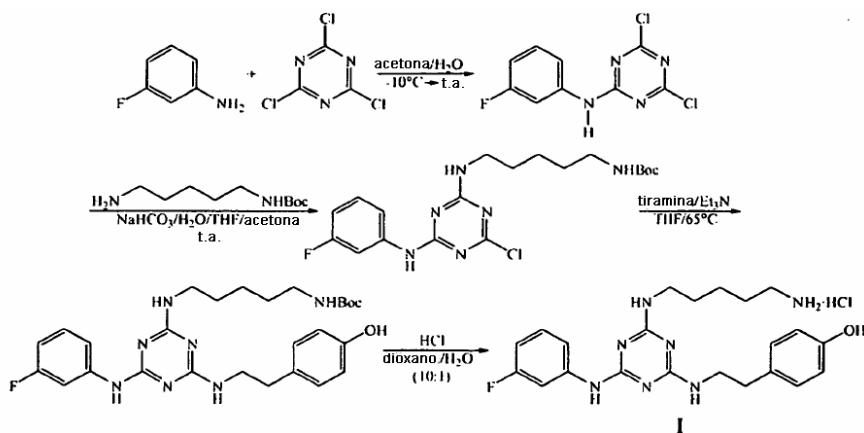
5 alcanolamina o tioalquilamina, THF/MeOH , $130^{\circ}\text{C}/10 \text{ min.}$, microondas; (e) $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R}$, Et_3N , THF , 65°C ; (f) eliminación de los grupos protectores (cuando sea aplicable).

Instrumentos

10 Se registraron todos los cromatogramas de HPLC y espectros de masas en un instrumento HP 1100 CL-EM de Agilent usando un detector de red de diodos. Se usó una columna C18 analítica (75 x 4,6 mm, 5 micrómetros) con un gradiente del 1%-40% de acetonitrilo-agua que contenía TFA al 0,01% en 6 min. y un flujo de 2 ml/min. (método 1), una columna C18 analítica (75 x 4,6 mm, 5 micrómetros) con un gradiente del 15-99% de acetonitrilo-agua que contenía TFA al 0,01% en 6 min. y un flujo de 2 ml/min. (método 2), una columna C18 analítica (75 x 4,6 mm, 5 micrómetros) con un gradiente del 0,1%-20% de acetonitrilo-agua que contenía TFA al 0,01% en 5 min. y un flujo de 1 ml/min. (método 3) o una columna C18 analítica (75 x 4,6 mm, 5 micrómetros) con un gradiente del 1%-50% de acetonitrilo-agua que contenía TFA al 0,01% en 5 min. y un flujo de 1 ml/min. (método 4).

Ejemplo 1: Síntesis del compuesto I (ejemplo representativo de la ruta 1)

20

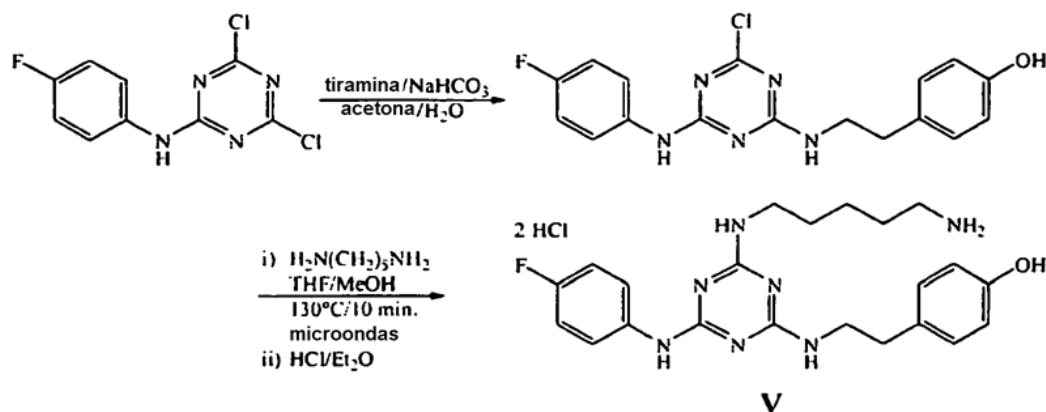


Se añadió cloruro cianúrico (10,0 g, 54,2 mmol) en porciones pequeñas a una mezcla enfriada (-10°C) de agua (50 ml) y acetona (50 ml). Se añadió lentamente una disolución de la 3-fluoroanilina (5,2 ml, 54,2 mmol) en acetona (50 ml) a lo largo de 50 min., manteniendo la temperatura de la reacción por debajo de -5°C . Entonces se agitó la reacción a temperatura ambiental durante una hora. Se ajustó el pH de la reacción desde 2 hasta 8 con bicarbonato de sodio acuoso saturado (200 ml) y se continuó la agitación durante 30 min. adicionales. Se recogió el sólido

25

precipitado mediante filtración, se lavó con agua y se secó a vacío. Esto dio 2,4-dicloro-3-fluorofenilamino-1,3,5-triazina como un sólido de color blanco: 13,3 g, rendimiento del 94%; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, d_6 -DMSO): δ 6,97-7,01 (1H, m), 7,38-7,43 (2H, m), 7,52-7,55 (1H, m), 11,25 (1H, a); EMBR (ESI): m/z 259 (MH⁺); HPLC (método 2): 4,1 min. Se usó el producto en la siguiente etapa sin purificación adicional. Se disolvió este derivado de dicloro-triazina (6,4 g, 24,7 mmol) en THF (70 ml) a temperatura ambiente y se trató con una disolución de la 5-(terc-butoxicarbonilamino)pentilamina (7,5 g, 37,0 mmol) en una mezcla de acetona (50 ml) y agua (50 ml). Entonces se trató la disolución resultante con bicarbonato de sodio acuoso saturado (70 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante de 2,5 h a 3 h. Entonces se concentró la mezcla a vacío, se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. Se lavaron los extractos orgánicos combinados con cloruro de sodio acuoso saturado, HCl acuoso 2 M, cloruro de sodio saturado, bicarbonato de sodio saturado y cloruro de sodio saturado, entonces se secaron (sulfato de magnesio-carbón), se filtraron a través de tierra de diatomeas CELITE y se concentraron a vacío hasta 200 ml. Se vertió esta disolución, con agitación, en 1,2 l de hexano y se recogió el precipitado mediante filtración, se lavó con hexano y se secó a vacío para producir el derivado de monocloro-[1,3,5]triazina como un sólido de color blanco: 6,6 g, rendimiento del 63%; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 1,23-1,30 (2H, m), 1,31-1,56 (2H, m), 1,34 (9H, s), 1,44-1,56 (2H, m), 2,85-2,91 (2H, m), 3,20-3,30 (2H, m), 6,70-6,77 (1H, m), 6,79-6,85 (1H, m), 7,25-7,33 (1H, m), 7,38-7,43 (1H, m), 7,67-7,75 y 7,76-7,85 (1H, a), 8,14-8,21 y 8,22-8,30 (1H, a), 10,05-10,11 y 10,15-10,26 (1H, a); EMBR (ESI): m/z 425 (MH⁺), 447 (MH+Na); HPLC (método 2): 4,5 min. Se trató una disolución de la monocloro-triazina (6,6 g, 15,6 mmol) en THF (300 ml) con tiramina (6,4 g, 46,7 mmol) y trietilamina (77,7 mmol, 10,9 ml). Se calentó la reacción a 65-70°C durante de 16 h a 60 h, entonces se enfrió hasta temperatura ambiental y se concentró a vacío. Se extrajo el residuo con acetato de etilo y se filtró. Se lavó el filtrado con HCl acuoso 1 M, cloruro de sodio saturado, bicarbonato de sodio saturado acuoso y cloruro de sodio saturado, entonces se secó (sulfato de magnesio-carbón), se filtró a través de tierra de diatomeas CELITE y se concentró a vacío. Entonces se disolvió el residuo en éter (150 ml) y se añadió gota a gota esta disolución a 1,4 l de hexano con agitación vigorosa. Se recogió el sólido precipitado mediante filtración y se secó a vacío para producir el derivado de tri(amino-sustituido)-[1,3,5]triazina como un sólido de color blanquecino: 6,5 g, rendimiento del 80%; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 1,21-1,29 (2H, m), 1,32-1,41 (2H, m), 1,34 (9H, s), 1,44-1,54 (2H, m), 2,65-2,71 (2H, m), 2,88 (2H, dt, J = 6,5, 6,5 Hz), 3,15-3,27 (2H, m), 3,33-3,42 (2H, m), 6,61-6,70 (1H, m), 6,67 (2H, d, J = 8,5 Hz), 6,71-6,76 (1H, m), 6,84-7,02 (1H, m), 7,01 (2H, d, J = 8,5 Hz), 7,16-7,23 (1H, m), 7,39-7,47 (1H, m), 7,87-7,91 (1H, m), 8,92-8,94 y 9,00-9,06 (1H, 2 x a), 9,13 (1H, s); EMBR (ESI): m/z 526 (MH⁺), 548 (MH+Na); HPLC (método 2): 2,9 min. Se agitó una disolución del compuesto protegido con Boc (6,5 g, 12,4 mmol) en HCl 4 M/1,4-dioxano (100 ml) y agua (10 ml) a temperatura ambiente durante 2 h. Se evaporaron los disolventes y el ácido en exceso a vacío y se eliminaron las trazas de agua mediante evaporación conjunta (x 2) con isopropanol (25 ml). Se disolvió el residuo secado en isopropanol (25 ml) y se añadió gota a gota la disolución a éter (450 ml) con agitación vigorosa. Se recogió el sólido precipitado mediante filtración, se secó a vacío y entonces se disolvió en agua libre de pirógenos (800 ml), se filtró (0,22 μm) y se liofilizó dando el compuesto I desprotegido como un sólido de color blanquecino: 5,5 g, rendimiento del 89%; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 1,26-1,35 (2H, m), 1,47-1,57 (4H, m), 2,64-2,73 (4H, m), 3,24-3,31 (2H, m), 3,32-3,55 (5H, m, CH₂ + NH₃⁺), 6,63 (2H, d, J = 8,5 Hz), 6,82-6,89 (1H, m), 6,93-7,06 (2H, m), 7,24-7,39 (2H, m), 7,61-7,73 (1H, m), 7,81-7,93 (3H, m), 8,15-8,25, 8,40-8,60, 9,10-9,30, 10,25-10,40 y 10,55-10,65 (2H, a); $^{19}\text{F-RMN}$ (376,5 MHz, CD₃OD): δ de -114,50 a -113,84 (1F, m); EMBR (ESI): m/z 426 (MH⁺), 448 (MH+Na); HPLC (método 2): 1,6 min.

Ejemplo 2: Síntesis del compuesto V (ejemplo representativo de la ruta 2)



Se preparó 2,4-dicloro-4-fluorofenilamino-1,3,5-triazina según el ejemplo 1 usando 4-fluoroanilina (18 ml, 190 mmol) reemplazando a 3-fluoroanilina para producir un sólido de color blanco: 44,3 g, rendimiento del 90%; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, d_6 -DMSO) δ ; EMBR (ESI): m/z 259 (MH⁺) HPLC (método 2): 4,0 min. Se acopló la dicloro-triazina (44,2 g, 0,2 mol) con tiramina (35,1 g, 0,3 mol) según el ejemplo 1 con tiramina reemplazando a 5-(terc-butoxicarbonilamino)pentilamina para producir un sólido de color blanco: 56,1 g, rendimiento del 91%; EMBR (ESI): m/z 360 (MH⁺), 382 (MH+Na); HPLC (método 2): 3,7 min. Se dividió una disolución de la monoclorotriazina (15,0 g, 41,8 mmol) y 1,5-diaminopentano (24,5 ml, 209 mmol) en tetrahidrofurano (125 ml) y metanol (60 ml) en nueve porciones. Se calentó cada porción en un aparato de microondas para química a 130°C durante 10 min. Entonces se

volvieron a combinar las porciones, se concentraron a vacío y se disolvió el residuo en acetato de etilo. Se lavó la disolución de acetato de etilo con agua y con cloruro de sodio saturado y entonces se extrajo con HCl acuoso 2 M. Se lavó el extracto acuoso con acetato de etilo, entonces se basificó con bicarbonato de sodio saturado acuoso. Se extrajo el precipitado con acetato de etilo y se lavaron los extractos con cloruro de sodio saturado, entonces se secaron (sulfato de magnesio-carbón), se filtraron a través de tierra de diatomeas CELITE y se concentraron a vacío. Se disolvió el residuo en metanol (300 ml) y se trató la disolución con una disolución 1 M de HCl en éter (60 ml) y se concentró la disolución a vacío. Se disolvió el residuo en isopropanol caliente (150 ml) y se añadió gota a gota esta disolución a éter (1,5 l) con agitación vigorosa. Se recogió el sólido precipitado mediante filtración, se secó a vacío y entonces se disolvió en agua libre de pirógenos (1,6 l), se filtró (0,22 µm) y se liofilizó dando el compuesto V como su sal de clorhidrato: 14,9 g, rendimiento del 72%; pf 130-133°C; ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) δ 1,16-1,27 (2H, m), 1,37-1,54 (4H, m), 2,53-2,64 (2H, m), 2,76-2,83 (2H, m), 3,09-3,17 (2H, m), 3,21-3,48 (2H, m), 6,56-6,64 (2H, m), 6,85-7,02 (4H, m), 7,16-7,27 (2H, m); ¹⁹F-RMN (376,5 MHz, CD₃OD): δ de -118,1 a -116,0 (1F, m); EMBR (ESI): m/z 426 (MH⁺); HPLC (método 2): 1,6 min.

15 Ejemplo 3: Compuesto II

Se preparó el compuesto anterior según el ejemplo 1 usando 4-[2-aminoetil]benceno-sulfonamida en vez de tiramina. Sólido de color blanco, rendimiento del 77%; pf 145-147°C; ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) δ 1,14-1,26 (2H, m), 1,33-1,44 (2H, m), 1,46-1,55 (2H, m), 2,64-2,84 (4H, m), 3,04-3,15 (2H, m), 3,33-3,56 (2H, m), 6,68-6,84 (1H, m), 6,88-6,99 (1H, m), 7,09-7,32 (4H, m), 7,44-7,63 (2H, m); ¹⁹F-RMN (376,5 MHz, CD₃OD): δ de -114,50 a -113,81 (1F, m); EMBR (ESI): m/z 489 (MH⁺); HPLC (método 2): 1,6 min.

Ejemplo 4: Compuesto III

Se preparó el compuesto anterior según el ejemplo 2 usando N,N-dimetil-4-[2-aminoetil]bencenosulfonamida en vez de tiramina. N,N-dimetil-4-(2-aminoetil)benceno-sulfonamida, que se sintetizó tal como sigue: Se trató una disolución de 4-[2-aminoetil]benceno-sulfonamida (26,5 g, 0,1 mol) en DMF anhidra (120 ml) con anhídrido ftálico (23,5 g, 0,2 mol), y se calentó la reacción a 70°C durante 4 h. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiental y se añadió 1,1'-carbonildiimidazol (21,5 g, 0,1 mol) en porciones pequeñas, y se agitó la reacción a temperatura ambiental durante la noche. Se evaporó el disolvente a vacío y se lavó el residuo con agua, se secó y se trituró con acetato de etilo dando el compuesto protegido con ftaloilo como un sólido de color blanco: 38,1 g, rendimiento del 89%; ¹H-RMN (400 MHz, d₆-DMSO) δ 2,98 (2H, t, J = 7,0 Hz), 3,82 (2H, t, J = 7,0 Hz), 7,29 (2H, s), 7,38 (2H, d, J = 8,0 Hz), 7,69 (2H, t, J = 8,0 Hz), 7,76-7,84 (4H, m); EMBR (ESI): m/z 331 (MH⁺), 348 (MH⁺Na); HPLC (método 2): 2,9 min. Se trató una disolución del compuesto protegido con ftaloilo (12,7 g, 38,6 mmol) en DMF anhidra (120 ml) bajo N₂ a 0°C con NaH (dispersión al 60% en aceite; 3,5 g, 88,8 mmol) en porciones pequeñas a lo largo de 15 min. y se agitó la reacción bajo N₂ a 0°C durante una hora. Entonces se añadió gota a gota yodometano (4,8 ml, 77,2 mmol) a lo largo de 15 min. y se agitó la reacción bajo N₂ a 0°C hasta temperatura ambiente durante la noche. Se vertió la suspensión de color amarillo resultante sobre hielo/agua (1,4 l) y se agitó durante 30 min. Se recogió el precipitado mediante filtración, se lavó secuencialmente con agua, hexano y éter y entonces se secó a vacío dando el derivado de N,N-dimetil-bencenosulfonamida como un sólido de color blanco: 11,3 g, rendimiento del 81%; EMBR (ESI): m/z 359(MH⁺), 381 (MH⁺Na); HPLC (método 2): 3,7 min. Se calentó a reflujo durante 2 h una disolución del compuesto protegido con ftaloilo (11,3 g, 31,5 mmol) e hidrato de hidrazina (4,6 ml, 44,6 mmol) en etanol al 95% (125 ml). Se separó el sólido de color blanco que se formó mediante filtración y se lavó con etanol. Se concentraron los lavados y el filtrado combinados a vacío y se retiró el sólido que se formó mediante filtración y se lavó con etanol. Se repitió este procedimiento tres veces y se evaporó el filtrado final hasta sequedad a vacío. Se extrajo el sólido con acetato de etilo. Se concentraron los extractos a vacío dando la amina libre como un aceite de color amarillo: 4,8 g, rendimiento del 67%; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 2,65 (6H, s), 2,84-2,92 (4H, m), 7,47 (2H, d, J = 8,5 Hz), 7,71 (2H, d, J = 8,5 Hz); EMBR (ESI): m/z 229 (MH⁺), 251 (MH⁺Na); HPLC (método 2): 2,3 min. Se hizo reaccionar este compuesto con la diclorotriazina seguido por la alquilamina y entonces se desprotegió dando el producto final. Sólido de color blanco (2,2 g, 92%); pf 143-146°C; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 1,42-1,53 (2H, m), 1,64-1,78 (4H, m), 2,60 y 2,64 (6H, 2 x s), 2,92-2,99 (2H, m), 3,01-3,07 (2H, m), 3,39-3,48 (2H, m), 3,68-3,78 (2H, m), 6,83-6,92 (1H, m), 7,24-7,37 (2H, m), 7,42-7,71 (5H, m); EMBR (ESI): m/z 517(MH⁺), 539 (MH⁺Na); HPLC (método 1): 4,3 min.

Ejemplo 5: Compuesto IV

Se preparó el compuesto anterior según el ejemplo 1 usando 2-[4-aminofenil]-etilamina en vez de tiramina. Sólido de color amarillo, rendimiento del 97%; pf 155-158°C; ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) δ 1,42-1,53 (2H, m), 1,63-1,76 (4H, m), 2,87-3,02 (4H, m), 3,40-3,48 (2H, m), 3,62-3,77 (2H, m), 7,07-7,15 (2H, m), 7,28-7,38 (3H, m), 7,40-7,49 (1H, m), 7,52-7,63 (2H, m); EMBR (ESI): m/z 425 (MH⁺), 447 (MH⁺Na); HPLC (método 3): 1,9 min.

Ejemplo 6: Compuesto VI

Se preparó el compuesto anterior según el ejemplo 2 usando 4-[2-aminoetil]benzamida y 3-fluoroanilina en vez de tiramina y 4-fluoroanilina, respectivamente. Se preparó 4-[2-aminoetil]-benzamida tal como sigue: Se trató una suspensión de clorhidrato de ácido 4-[2-aminoetil]benzoico (5,0 g, 24,8 mmol) en metanol (200 ml) con una

disolución 4 M de HCl en 1,4-dioxano (10 ml, 40 mmol) y se calentó la reacción a reflujo durante la noche. Se eliminaron los disolventes y el ácido en exceso a vacío. Se trituró el residuo con éter y se secó a vacío dando el éster como un sólido de color blanco: (5,5 g, cuantitativo); ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 3,04 (2H, t, J = 7,0 Hz), 3,21 (2H, td, J = 7,0, 0,5 Hz), 3,89 (3H, s), 7,41 (2H, dd, J = 8,0, 0,5 Hz), 8,00 (2H, d, J = 8,0 Hz). Se trató una suspensión de esta sal de clorhidrato (5,4 g, 24,8 mmol) en tetrahidrofurano (60 ml) y metanol (30 ml) con diisopropiletamina (4,8 ml, 27,3 mmol) y dicarbonato de di-terc-butilo (8,1 g, 37,2 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiental bajo N₂ durante 5 h. Se evaporaron los disolventes a vacío y se disolvió el residuo en acetato de etilo. Se lavó la disolución con agua y cloruro de sodio saturado, entonces se secó (sulfato de magnesio), se filtró y se evaporó a vacío. Se trituró el residuo con éter frío y se secó a vacío dando el compuesto protegido como un sólido de color blanco (5,6 g, 81%); EMBR (ESI): m/z 192 (MH⁺), 302 (MH+Na); HPLC (método 2): 3,9 min. Se trató una disolución del éster (5,6 g, 20,0 mmol) en 1,4-dioxano (36 ml) con amoniaco acuoso saturado (36 ml). Se calentó la reacción en un tubo sellado a 100°C durante la noche. Tras enfriar, se recogió el sólido precipitado mediante filtración, se lavó con agua y se secó a vacío dando la amida como un sólido de color blanco (4,4 g, 82%); EMBR (ESI): m/z 287 (MH+Na); HPLC (método 2): 2,6 min. Se acometió la desprotección del compuesto de terc-butoxicarbonilo (4,4 g, 16,5 mmol) mediante una modificación del procedimiento en el ejemplo 2 en la que se omitió el codisolvente de agua y se secó el sólido a vacío en lugar de liofilizarlo, produciendo un sólido de color blanco (3,3 g, cuantitativo); EMBR (ESI): m/z 165 (MH⁺), 187 (MH+Na); HPLC (método 2): 0,3 min. Se hizo reaccionar este compuesto con la dicloro-triazina, seguido por la alquilamina y entonces se desprotegió dando el producto final. Sólido de color blanco, 1,0 g, rendimiento del 20%; pf 190-192°C; ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) δ 1,13-1,26 (2H, m), 1,31-1,55 (4H, m), 2,54-2,84 (4H, m), 2,99-3,12 (2H, m), 3,23-3,49 (2H, m), 6,66-6,82 (1H, m), 6,86-7,14 (3H, m), 7,16-7,25 (2H, m), 7,36-7,57 (2H, m); EMBR (ESI): m/z 453 (MH⁺); HPLC (método 2): 1,5 min.

Ejemplo 7: Compuesto VII

Se desprotegió el compuesto protegido con Boc (4,8 mmol) mediante una variación del procedimiento usado en el ejemplo 1. En este caso, se usó HCl 4 M/1,4-dioxano (36 ml) en cloruro de metileno (30 ml), a de 0°C a temperatura ambiental, produciendo un sólido de color blanco, de baja densidad, rendimiento del 87%; pf 165-168°C; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 1,40-1,51 (2H, m), 1,62-1,74 (4H, m), 2,87-3,04 (4H, m), 2,93 (2H, t, J 7,5 Hz), 3,01 (2H, t, J 6,5 Hz), 3,41 (2H, t, J 7,5 Hz), 3,64-3,77 (2H, m), 7,07-7,16 (2H, m), 7,29-7,48 (2H, m), 7,50-7,62 (2H, m), 7,77-7,86 (2H, m); ¹⁹F-RMN (376,5 MHz, CD₃OD): δ de -120,2 a -119,8 (1F, m); EMBR (ESI): m/z 245 (MH⁺), 489 (MH+Na); HPLC (método 1): 3,6 min.

Ejemplo 8: Compuesto VIII

Se preparó el compuesto anterior según el ejemplo 2 usando 4-aminobencenosulfonamida y 3-fluoroanilina en vez de tiramina y 4-fluoroanilina, respectivamente. Sólido de color beis pálido, rendimiento del 95%; pf 162-163°C; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 1,47-1,56 (2H, m), 1,67-1,78 (4H, m), 2,95 (2H, t, J = 7,5 Hz), 3,52 (2H, t, J = 7,0 Hz), 6,92-7,00 (1H, m), 7,29-7,42 (2H, m), 7,60-7,78 (1H, m), 7,82-7,95 (4H, m); ¹⁹F-RMN (376,5 MHz, CD₃OD): δ de -114,17 a -113,71 (1F, m); EMBR (ESI): m/z 461 (MH⁺), 483 (MH+Na); HPLC (método 4): 3,7 min.

Ejemplo 9: Compuesto IX

Se preparó el compuesto anterior según el ejemplo 2 usando 4-[2-aminoetil]bencenosulfonamida y 4-aminobutilamina en vez de tiramina y 5-aminopentilamina, respectivamente. Sólido de color blanco, rendimiento del 74%; pf 181-184°C; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 1,65-1,77 (4H, m), 2,93-3,04 (4H, m), 3,42-3,54 (2H, m), 3,68-3,78 (2H, m), 6,86-6,95 (1H, m), 7,24-7,50 (4H, m), 7,57-7,66 (1 H, m), 7,78-7,86 (2H, m); ¹⁹F-RMN (376,5 MHz, CD₃OD): δ de -116,10 a -115,43 (1F, m); EMBR (ESI): m/z 475 (MH⁺), 497 (MH+Na); HPLC (método 1): 3,6 min.

Ejemplo 10: Compuesto X

Se preparó el compuesto anterior según el ejemplo 2 usando N,N-dimetil-4-(2-aminoetil)benceno-sulfonamida en vez de tiramina. Sólido de color beis pálido, rendimiento del 57%; pf 290-295°C (descomp.); ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) δ 1,12-1,27 (2H, m), 1,32-1,57 (4H, m), 2,30-2,44 (6H, m), 2,75-2,84 (4H, m), 3,06-3,19 (2H, m), 3,53-3,65 (2H, m), 6,98-7,04 (2H, m), 7,17-7,35 (3H, m), 7,37-7,48 (2H, m), 7,52-7,58 (1H, m); EMBR (ESI): m/z 517 (MH⁺), 539 (MH+Na); HPLC (método 2): 1,8 min.

Ejemplo 11: Compuesto XI

Se preparó el compuesto anterior según el ejemplo 2 usando [±]-octopamina en vez de tiramina. Sólido de color blanco; rendimiento del 36%; pf 122-125°C; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 1,36-1,43 (2H, m), 1,50 (2H, tt, J = 7,0, 7,0 Hz), 1,57-1,63 (2H, m), 2,62 (2H, t, J = 7,0 Hz), 3,28-3,40 (2H, m), 3,45 (1H, J = 13,5, 8,0 Hz), 3,54-3,63 (1H, m), 4,67-4,75 (1H, m), 6,69 (2H, d, J = 8,5 Hz), 6,96-7,00 (2H, m), 7,13 (2H, d, J = 8,5 Hz), 7,56-7,67 (2H, m); EMBR (ESI): m/z 442 (MH⁺); HPLC (método 1): 3,3 min.

65 ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

Ejemplo 12: Citotoxicidad in vitro de los compuestos sometidos a ensayo sobre células normales y cancerosas

Se realizó este ensayo para determinar el efecto de los compuestos de la presente invención sobre la citotoxicidad celular. Se incubaron células en presencia o ausencia de compuestos en sus respectivos medios condicionados. Tras 24 h o 72 h de incubación, se añadieron 50 µl de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT; 2 mg/ml) y se incubó adicionalmente durante 4 h. Se desechó el sobrenadante y se añadieron 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). Se leyó la absorbancia a 570 nm con un lector de placas de ELISA Tecan Sunrise. El grupo control consistía en células sin compuestos y se le hace referencia como el 100% de células viables. Se determinó la CI₅₀ usando el software Prism.

La tabla 1 representa el efecto (CI₅₀) de los compuestos sobre líneas celulares normales (NHDF o fibroblasto dérmico humano normal; HUVEC o célula endotelial de vena umbilical humana) y cancerosas (célula de carcinoma de próstata humano PC-3; célula de mastocitoma murino P815) es un cultivo celular de 24 h o 72 h. Todos los compuestos tienen un débil efecto sobre la citotoxicidad celular. La utilidad predictiva de los ensayos de citotoxicidad basados en células para evaluar la actividad anticancerígena in vivo potencial de los compuestos con líneas de células cancerosas seleccionadas está bien establecida en la técnica y el uso de células completas, en lugar de enzimas o receptores proteicos aislados, proporciona una determinación más fiable de la actividad. Véanse, por ejemplo, Paull et al. (J. Nat'l Cancer Inst. 81:1088-1092, 1989); Monks et al. (J. Nat'l Cancer Inst. 83:757-766, 1991); Bandes et al. (J. Nat'l Cancer Inst. 86:770-775, 1994); y Kamate et al. (Int'l J. Cancer 100:571-579, 2002).

Tabla 1. Efecto de los compuestos sobre la citotoxicidad de células normales y cancerosas en cultivo celular de 24 horas o 72 horas.

Compuesto	CI ₅₀ de cultivo de 24 horas				CI ₅₀ de cultivo de 72 horas			
	NHDF	HUVEC	PC-3	P815	NHDF	HUVEC	PC-3	P815
I	56,8	18,8	49,4	34	16,3	10,1	11,8	4,0
II	> 100	92,2	32,2	66,5	28,6	38,9	18,5	1,6
III	nd	nd	30,1	13,6	nd	nd	27,6	5,5
IV	82,1	51,3	56,6	33	42,5	> 100	51,9	nd
V	78,6	31,8	43,3	23,5	45,8	> 100	26,8	7,5
VII	nd	nd	17,7	12,6	nd	nd	14,1	4,0
VIII	nd	nd	31,0	10,9	nd	nd	5,2	2,9
XII	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9,0	21,7

nd = no determinado

25

Ejemplo 13: Efecto in vitro de los compuestos sobre la invasión o migración de células PC-3

Se usó un ensayo de migración in vitro para evaluar la movilidad celular en dos dimensiones. Se sembraron en placa células PC-3 en una placa de 12 pocillos y se hicieron crecer hasta la confluencia en RPMI + FBS al 10%. Se usó una espátula de caucho para crear un área denudada. Se hicieron quiescentes las células confluentes mediante tratamiento con mitomicina C (0,5 µM) a la concentración usada para evitar el problema de confusión de proliferación celular y síntesis de proteínas. Se incubaron también las células en presencia o ausencia de factor de crecimiento endotelial (EGF) y compuesto durante 24 h, entonces se fotografiaron.

Se determinaron los efectos de EGF y compuesto V sobre la invasión o migración de células PC-3 en el ensayo de migración in vitro. EGF promueve la migración o invasión de células PC-3 tratadas con mitomicina en comparación con el control (es decir, sin EGF añadido). La adición de diferentes concentraciones (es decir, de 1 µM a 10 µM) de compuesto V al medio de cultivo celular produce una inhibición de la invasión o migración de PC-3 inducida por EGF. Se observaron resultados similares con el compuesto 1. La adición de diferentes concentraciones (es decir, de 1 µM a 20 µM) de compuesto I al cultivo celular produce una inhibición de la invasión o migración de PC-3 inducida por EGF tras 24 h de cultivo.

40

Ejemplo 14: Efecto in vitro de los compuestos sobre la adhesión de células PC-3 a componentes de la matriz extracelular

45

Se usó un ensayo de adhesión celular in vitro para evaluar el efecto de los compuestos sobre la adhesión de células cancerosas. Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos durante 1 h a temperatura ambiente con 50 µl/ml de ligandos adhesivos previamente diluidos hasta 5 µg/ml para laminina, 10 µg/ml para matriz de membrana basal MATRIGEL™ o 10 µg/ml para colágeno en PBS. Se bloquearon los pocillos con una disolución de BSA al 1% en

PBS (100 μ l/pocillo) durante 1 h a 37°C. Se incubaron cultivos subconfluentes de células PC-3 con una disolución 5 μ M de calceína-AM durante 30 min. a 37°C, y entonces se eliminó por lavado la calceína-AM libre (30 min.) mediante incubación de las células PC-3 en medio sin calceína-AM. Se tripsinizaron las células marcadas con calceína-AM, se lavaron y se resuspendieron en tampón de adhesión (RPMI-1640, FBS al 10% complementado con 1 mM de $MgCl_2$). Se preincubaron las células PC-3 marcadas en ausencia o presencia de compuestos durante 30 min. y entonces se dejó unir a 37°C un volumen final de 100 μ l de células preincubadas en un incubador humidificado durante 15 min., 30 min. o 60 min. a 37°C. Se eliminaron las células no unidas mediante dos lavados con PBS y se lisaron las células unidas con 100 μ l de una disolución de Triton X-100 al 1% en PBS. Se leyeron las placas en un lector fluorescente Tecan GENios Plus con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. Se calculó el número de células unidas basándose en curvas patrón. La unión celular no específica (unión a pocillos recubiertos con BSA) era siempre inferior al 5%.

La adición de diferentes concentraciones de compuesto V en el ensayo de adhesión celular in vitro descrito anteriormente inhibe la adhesión de células PC-3 de una manera dependiente de la dosis a una variedad de sustratos: laminina (figura 1A), matriz de membrana basal MATRIGEL™ (figura 1B) o colágeno (figura 1C).

Ejemplo 15: Efectos antitumorales de los compuestos sobre un tumor de melanoma B16F10 primario

Se les inyectó por vía intradérmica a ratones C57BL/6 de 6-8 semanas de edad hembra en el día 0 50 μ l de $3,75 \times 10^4$ células de melanoma B16F10 viables de la ATCC (fuente de cultivo celular, Dr. I.J. Fidler). En el día 14, los tumores alcanzaron 80 mm y los animales se aleatorizaron para los tratamientos. Se les inyectó entonces por vía i.v. a los animales solución salina (control negativo) o compuesto (5 mg/kg, 25 mg/kg o 50 mg/kg) en el día 14, día 16 y día 18 o doxorubicina 10 mg/kg (control positivo) en el día 14. Se sacrificaron los ratones en el día 29. Se registraron el peso corporal y el volumen tumoral. Se obtuvo el volumen tumoral en serie mediante mediciones del diámetro bidimensionales con calibres, usando la fórmula 0,4 ($a \times b^2$) en la que "a" era el diámetro tumoral mayor y "b" el diámetro perpendicular menor. Puede cuantificarse un efecto antitumoral mediante T/C, que se calcula como (volumen tumoral tratado / volumen tumoral control) \times 100%.

La figura 2A muestra la eficacia antitumoral de los compuestos I o II sobre células B16F10 de tumor primario. Ambos compuestos inducen una débil reducción (T/C de aproximadamente el 80%) del volumen tumoral en comparación con el control. La figura 2B muestra la eficacia antitumoral del compuesto V sobre células B16F10 de tumor primario. El compuesto V induce una reducción significativa (T/C < 40%, $p = 0,001$) del volumen tumoral en comparación con el control.

Ejemplo 16: Efectos antitumorales de los compuestos sobre un tumor de mama DA-3 primario

La línea celular DMBA3 singénica (DA-3, modelo de carcinoma de mama) surgió de una lesión preneoplásica tratada con 7,12-dimetilbenzantraceno en ratones BALB/c hembra. Se hicieron crecer células DA-3 como cultivos en monocapa en frascos de plástico en RPMI-1640 que contenía aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 0,1 μ M, L-glutamina 2 mM. Se complementó esto adicionalmente con 2-mercaptoetanol 50 μ M y suero bovino fetal al 10%. Se realizaron pases en serie de los tumores DA-3 in vivo mediante inoculación intradérmica de 50 μ l de 5×10^5 células tumorales viables para producir tumores localizados en ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad. Se monitorizaron entonces en serie los animales mediante palpación manual para detectar pruebas de tumor. Se trataron los ratones en el día 11, 18 y 25 con ciclofosfamida (100 mg/kg, inyección i.v.) y mediante tratamiento intravenoso en el día 11, día 12, día 13, día 15, día 18, día 20, día 22 y día 25 con compuesto. Se sacrificaron los ratones desde el día 27 hasta el día 55. Se obtuvo el volumen tumoral en serie mediante mediciones del diámetro bidimensionales con calibres, usando la fórmula 0,4 ($a \times b^2$) en la que "a" era el diámetro tumoral mayor y "b" el diámetro perpendicular menor. Los tumores eran palpables, en general, de 7 días a 10 días tras la inoculación. El National Cancer Institute (EE.UU.) define el producto como eficaz si T/C es \leq 40%.

La figura 3 muestra la eficacia antitumoral de la administración intravenosa (5 mg/kg) de compuesto II, compuesto IV, compuesto V o ciclofosfamida. Todos los compuestos inducen una inhibición significativa ($p < 0,05$) del volumen tumoral con un T/C entre el 25% y el 70%. Además, en comparación con ciclofosfamida que induce una inhibición significativa ($p < 0,04$) del volumen tumoral con un T/C entre el 24% y el 50%, todos los compuestos eran similares a ciclofosfamida hasta el día 20. Se determinó también la eficacia antitumoral de combinaciones de compuesto y ciclofosfamida CYTOXAN contra el tumor DA-3.

La figura 4A compara la eficacia antitumoral de la administración intravenosa (50 mg/kg) de compuesto II solo con la combinación de compuesto II y ciclofosfamida. El compuesto II induce una inhibición significativa ($p < 0,05$) del volumen tumoral con un T/C entre el 40% y el 70%. Además, en comparación con ciclofosfamida que induce una inhibición significativa ($p < 0,05$) del volumen tumoral con un T/C entre el 24% y el 50%, los ratones tratados con la combinación de ciclofosfamida y compuesto II también demuestran una inhibición significativa ($p < 0,0001$) del volumen tumoral con una regresión y un T/C inferior al 10%. Se observó una regresión y un efecto citostático (sin crecimiento) en el régimen de combinación.

La figura 4B compara la eficacia antitumoral de la administración intravenosa (50 mg/kg) de compuesto I solo con la combinación de compuesto I y ciclofosfamida. El compuesto I tiene un débil efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral de DA-3. La ciclofosfamida induce una inhibición significativa ($p < 0,01$) del volumen tumoral con un T/C entre el 20% y el 50%, los ratones tratados con la combinación de ciclofosfamida y compuesto I también demuestran una inhibición significativa ($p < 0,05$) del volumen tumoral con un T/C entre el 10% y el 40%. Se observó un efecto citostático (sin crecimiento) en el régimen de combinación hasta el día 35. Se detuvieron todos los tratamientos en el día 35. Se mantuvieron los ratones tratados con ciclofosfamida y tratados con la combinación CY + compuesto I para observar el recrecimiento del tumor. El recrecimiento del tumor era similar en ambos grupos, aunque menos pronunciado o retardado en el grupo de régimen de combinación.

La figura 4C compara la eficacia antitumoral de la administración intravenosa (12,5 mg/kg) de compuesto V solo con la combinación de compuesto V y ciclofosfamida. Todos los regímenes inducen una inhibición significativa ($p < 0,04$) del volumen tumoral hasta el día 20. Los ratones tratados con el compuesto V demostraron una reducción del volumen tumoral con un T/C entre el 36% y el 74%. Sin embargo, en comparación con ciclofosfamida que induce una inhibición del volumen tumoral con un T/C entre el 30% y el 45%, los ratones tratados con la combinación de ciclofosfamida y compuesto V demuestran una inhibición significativa del volumen tumoral con un T/C entre el 1% y el 20%.

La figura 5 compara la eficacia antitumoral de la administración oral (50 mg/kg) de cisplatino solo con la combinación de compuesto VII y cisplatino. El cisplatino induce una inhibición significativa ($p < 0,01$) del volumen tumoral con un T/C entre el 40% y el 77% desde el día 40 hasta el 77. Los ratones tratados con la combinación de cisplatino y compuesto VII también demuestran una inhibición significativa ($p < 0,01$) del volumen tumoral con un T/C entre el 34% y el 71% desde el día 34 hasta el 71.

Ejemplo 17: Efectos antitumorales de los compuestos sobre un tumor de mastocitoma P815 primario

El P815 singénico es un mastocitoma derivado de DBA/2 (H-2^d) obtenido de la ATCC (TIB64). Se hicieron crecer células P815 en DMEM que contenía suero bovino fetal al 10%. En el día 0, se inyectaron por vía intradérmica 50 μ l de 5×10^5 células P815 viables para producir tumores localizados en ratones DBA/2 de 6 a 8 semanas de edad. Se monitorizaron entonces en serie los animales mediante palpación manual para determinar pruebas de tumor. Se trataron entonces los ratones cada día con administración oral de vehículo (control negativo), ácido acetilsalicílico (control positivo, 50 mg/kg) o compuesto (50 mg/kg). Se sacrificaron los ratones en el día 23. Se obtuvo el volumen tumoral en serie mediante mediciones del diámetro bidimensionales con calibres, usando la fórmula $0,4(a \times b^2)$ en la que "a" era el diámetro tumoral mayor y "b" el diámetro perpendicular menor. Los tumores eran palpables, en general, de 3 días a 5 días tras la inoculación.

La figura 6 muestra el efecto de la administración oral de compuesto I, compuesto II, compuesto V o ácido acetilsalicílico (control positivo) sobre células P815 de tumor primario. Todos los compuestos inducen una reducción significativa (T/C entre el 40% y el 50%) del crecimiento tumoral. Además, los efectos de todos los compuestos eran comparables con el tratamiento de referencia, ácido acetilsalicílico soluble.

Ejemplo 18: Efectos antitumorales de los compuestos sobre un tumor de carcinoma LL/2 de pulmón de Lewis primario

El LL/2 singénico es una línea celular de tumor de pulmón obtenida de la ATCC (CRL-1642). Se hicieron crecer células LL/2 en DMEM que contenía suero bovino fetal al 10%. En el día 0, se inyectaron por vía intradérmica 50 μ l de 3×10^5 células LL/2 viables para producir tumores localizados en ratones de 6 a 8 semanas de edad. Se monitorizaron entonces en serie los animales mediante palpación manual para determinar pruebas de tumor. Se trataron entonces los ratones cada día con administración oral de vehículo (control negativo) o compuesto (50 mg/kg) y con inyección intravenosa de cisplatino (5 mg/kg) en el día 6 y el día 13. Se sacrificaron los ratones en el día 16. Se obtuvo el volumen tumoral en serie mediante mediciones del diámetro bidimensionales con calibres, usando la fórmula $0,4(a \times b^2)$ en la que "a" era el diámetro tumoral mayor y "b" el diámetro perpendicular menor. Los tumores eran palpables, en general, de 3 días a 5 días tras la inoculación.

La figura 7A muestra el efecto de la administración oral de compuesto II o cisplatino (control positivo) sobre células LL/2 de tumor primario. El compuesto II induce una reducción significativa (T/C entre el 36% y el 60%, $p < 0,04$) del crecimiento tumoral desde el día 7 hasta el día 16. El cisplatino induce una reducción significativa (T/C entre el 42% y el 84%, $p < 0,04$) del crecimiento tumoral en el día 7 y día 8. En otro experimento, se usó ciclofosfamida (100 mg/kg) como control positivo y se inyectó en el día 9 y día 15. Se sacrificaron los ratones en el día 20. La figura 7B muestra el efecto de la terapia de combinación de ciclofosfamida y compuesto II. Esta terapia de combinación logró una actividad sinérgica en la reducción de células LL/2 de tumor primario.

La figura 8 muestra el efecto de la administración oral de compuesto II, compuesto III, compuesto VII o ciclofosfamida (control positivo) sobre células LL/2 de tumor primario. El compuesto II induce una reducción (T/C entre el 53% y el 74%) del crecimiento tumoral. El compuesto III induce una reducción (T/C entre el 67% y el 96%) del crecimiento tumoral. El compuesto VII induce una reducción (T/C entre el 72% y el 85%) del crecimiento tumoral.

La ciclofosfamida induce una reducción (T/C entre el 50% y el 67%) del crecimiento tumoral.

Ejemplo 19: Efectos antitumorales de los compuestos sobre un tumor pancreático PAN02

5 El PAN02 singénico es una línea celular de tumor pancreático obtenida del NCI (0507232). Se hicieron crecer células PAN02 en RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal al 10%. En el día 0, se inyectaron por vía intradérmica 50 µl de $7,5 \times 10^5$ células PAN02 viables para producir tumores localizados en ratones C57BU6 de 6 a 8 semanas de edad. Se monitorizaron entonces en serie los animales mediante palpación manual para determinar pruebas de tumor. Se trataron entonces los ratones cada día con administración oral de vehículo (control negativo) o compuesto 10 (50 mg/kg) y con inyección intraperitoneal de gemcitabina (50 mg/kg) en el día 6 y día 12. Se sacrificaron los ratones en el día 40. Se obtuvo el volumen tumoral en serie mediante mediciones del diámetro bidimensionales con calibres, usando la fórmula $0,4 (a \times b^2)$ en la que "a" era el diámetro tumoral mayor y "b" el diámetro perpendicular menor. Los tumores eran palpables, en general, de 3 días a 5 días tras la inoculación.

15 La figura 9 muestra el efecto de la administración oral de compuesto I, compuesto V o gemcitabina (control positivo) sobre células PAN02 de tumor primario. Ambos compuestos I y V inducen una débil reducción (T/C entre el 17% y el 67% y el 40% y el 84%, respectivamente) del crecimiento tumoral. Además, los efectos de todos los compuestos eran comparables con el tratamiento de referencia, gemcitabina (T/C entre el 52% y el 77%), usado para la terapia de cáncer pancreático.

20

Ejemplo 20: Efectos antitumorales de los compuestos sobre tumor PC-3 de próstata humano de xenoinjerto

Se obtuvo el tumor de próstata humano xenogénico PC-3 de la ATCC (CRL1435). Se hicieron crecer células PC-3 en RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal al 10%. En el día 0, se inyectaron por vía intradérmica 50 µl de células PC-3 viables (de $1,5$ a 2×10^6) para producir tumores localizados en ratones CDI nu/nu macho de 6 a 8 semanas de edad. Se monitorizaron entonces en serie los animales mediante palpación manual para determinar pruebas de tumor. Cuando los tumores alcanzaron un volumen satisfactorio, se aleatorizaron los ratones, y entonces se trataron cuatro, tres y tres veces a la semana durante la primera, segunda y tercera semana respectivamente con inyección intravenosa de vehículo (control negativo), ciclofosfamida (control positivo, 100 mg/kg) o compuesto 30 (5 mg/kg). Se sacrificaron los ratones entre el día 56 y el día 65. Se obtuvo el volumen tumoral en serie mediante mediciones del diámetro bidimensionales con calibres, usando la fórmula $0,4 (a \times b^2)$ en la que "a" era el diámetro tumoral mayor y "b" el diámetro perpendicular menor.

35 La figura 10A muestra el efecto de compuesto II o ciclofosfamida sobre tumor PC-3 de próstata humano de xenoinjerto. El compuesto II induce una reducción significativa (T/C entre el 29% y el 75%) del crecimiento tumoral. La ciclofosfamida induce una reducción significativa (T/C entre el 1% y el 52%) del crecimiento tumoral. Además, el compuesto II demostró un efecto citostático (sin crecimiento) hasta el día 42.

40 La figura 10B muestra el efecto de compuesto II, ciclofosfamida o la combinación de compuesto II y ciclofosfamida sobre tumor PC-3 de próstata humano de xenoinjerto. La ciclofosfamida induce una reducción significativa (T/C entre el 8% y el 31%) del crecimiento tumoral. El tratamiento con la combinación de compuesto II y ciclofosfamida dio como resultado una reducción significativa (T/C entre el 1% y el 23%) seguido por regresión tumoral. El crecimiento del tumor era más rápido en el grupo tratado con ciclofosfamida tras la terminación del tratamiento en el día 48.

45 La figura 10C muestra la eficacia antitumoral de la administración oral de compuesto V con o sin ciclofosfamida sobre tumor PC-3 de próstata humano de xenoinjerto. La administración oral de compuesto V induce una inhibición significativa ($p < 0,05$) del volumen tumoral con un T/C entre el 14% y el 40%. La ciclofosfamida induce una inhibición significativa ($p < 0,05$) del volumen tumoral con un T/C entre el 1% y el 39%. Los ratones tratados con la combinación de ciclofosfamida y administración oral de compuesto V demostraron una inhibición significativa 50 ($p < 0,01$) del volumen tumoral con un T/C entre el 1% y el 40% acompañada con regresión tumoral.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Ejemplo 21: Efecto de los compuestos sobre la apoptosis inducida por $TNF\alpha$ en la línea celular WEHI-13VAR

55

Se midió el efecto de los compuestos sobre la apoptosis inducida por $TNF\alpha$ mediante un ensayo biológico convencional usando células WEHI-13VAR. Estas células experimentan apoptosis cuando se incuban en presencia de $TNF\alpha$ y actinomicina D. Se incubaron 2×10^4 células WEHI-13VAR en RPMI complementado con piruvato de sodio al 1% y FBS al 10%, durante la noche a 37°C para la adherencia celular. Se cultivaron entonces las células en presencia de 1 µg/ml de actinomicina D (para inhibir la síntesis de proteínas) y $TNF\alpha$ 0,04 nM con o sin compuestos 60 a 37°C. Tras de 16 h a 24 h, se añadieron a cada pocillo 50 µl de una disolución de 2 mg/ml de MTT y se incubó entonces la placa durante 4 h a 37°C. Solo las células viables metabolizan MTT para formar sal de formazán, que puede detectarse mediante la medición de la absorbancia a 570 nm. Tras la incubación, se invirtió la placa para eliminar el medio y las células muertas. Se añadieron a cada pocillo 150 µl de DMSO para detener la reacción y 65 solubilizar la sal de formazán. Se leyó la densidad óptica en un lector de microplacas Bio-Tek EL 800 UV. Una

disminución en la densidad óptica es una prueba directa de apoptosis celular inducida por TNF α . Se compararon también los compuestos con la actividad de un anticuerpo neutralizante anti-TNF α .

5 La tabla 2 representa el porcentaje de inhibición de TNF α (apoptosis) de compuestos sometidos a prueba en el ensayo de proliferación de células WEHI-13VAR sensibles a TNF α basado en células. Los compuestos demostraron una actividad inhibidora de TNF α en el intervalo del 40-80%. En comparación, el anticuerpo frente a TNF α demostró una actividad inhibidora de TNF α del 90-95%. Estos datos ilustran la capacidad de los compuestos de esta invención para inhibir la actividad apoptótica de TNF α sobre células WEHI-13VAR sensibles a TNF α .

10 Tabla 2. Efecto de los compuestos sobre la inhibición de TNF- α (apoptosis).

Compuesto	Ensayo de WEHI-13VAR (% de inhibición de la apoptosis)			
	4x10 ⁻⁵ M	2x10 ⁻⁵ M	1x10 ⁻⁵ M	5x10 ⁻⁶ M
I	-	58,9	33,1	17,9
II	78,9	83,8	64,2	45,2
III	-	89,7	52,0	20,4
IV	47,2	31,6	13,1	3,7
V	75,9	51,9	22,2	8,2
VI	89,5	74,1	54,8	28,2
VII	118,1	99,9	65,8	30,0
VIII	55,6	48,1	35,6	17,0
IX	65,5	46,7	29,8	13,2
X	53,9	79,9	44,4	19,4
XI	35,0	23,7	14,6	9,9

Ejemplo 22: Efecto de los compuestos sobre la producción de TNF α inducida por LPS en la línea celular J774A.1 de ratón

15 Se midió el efecto de los compuestos sobre la producción de TNF α mediante ELISA usando células J774A.1 estimuladas mediante LPS. Se cultivaron células J774A.1 en presencia o ausencia de LPS y compuesto. Se cultivaron las células durante 24 h a 37°C y después de eso se recogieron los sobrenadantes para la determinación de la concentración de TNF α mediante ELISA tal como recomienda el fabricante (BD Biosciences). Se analizaron los datos en el software Microsoft Excel y se calculó la concentración de compuesto que inhibe el 50% de la producción de TNF α (CI₅₀) usando el software Prism.

20

La tabla 3 resume el efecto de los compuestos sobre la producción de TNF α inducida por LPS en células J774A.1.

Tabla 3. Efecto de los compuestos sobre la producción de TNF α inducida por LPS

Compuesto	CI ₅₀ (μ M)
I	29
V	13

25 Ejemplo 23: Efecto de los compuestos sobre la producción de PGE₂ inducida por LPS en la línea celular J774A.1 de ratón

30 Se midió el efecto de los compuestos sobre la producción de PGE₂ mediante ELISA usando células J774A.1 estimuladas mediante LPS. Se cultivaron células J774A.1 en presencia o ausencia de LPS y compuesto. Se cultivaron las células durante 24 h a 37°C y después de eso se recogieron los sobrenadantes para la determinación de la concentración de PGE₂ mediante ELISA tal como recomienda el fabricante (GE Healthcare). Se analizaron los datos en el software Microsoft Excel y se calculó la concentración de compuesto que inhibe el 50% de la producción de PGE₂ (CI₅₀) usando el software Prism.

35

La figura 11 muestra el efecto del compuesto V sobre la producción de PGE₂ en J774A.1 estimuladas con LPS. El compuesto V inhibe la producción de PGE₂ con una CI₅₀ de 2 μ M.

Ejemplo 24: Efecto de los compuestos sobre la citotoxicidad celular, síntesis de ADN, ARN y proteínas en leucocitos

mononucleares de sangre periférica (PBML)

Se obtuvieron PBML de la sangre periférica de voluntarios sanos. Se sometió la sangre a centrifugación en gradiente con medio Lympholyte-Poly (Cedarlane, Hornby, Canadá). Se recogió la capa que contenía los leucocitos mononucleares y se lavaron las células tres veces en PBS. Se suspendieron entonces las células en RPMI (Gibco, Burlington, Canadá) complementado con FBS al 10% (Hyclone, Logan EE.UU.). La viabilidad era mayor del 99% tal como se determinó mediante exclusión de azul tripano.

Se resuspendieron PBML a 2×10^6 células/ml. Se incubaron 100 μ l de PBML (2×10^5 células) en una placa de microtitulación de 96 pocillos durante 48 h en presencia o ausencia de compuesto. Las células eran quiescentes o se estimularon con concanavalina A (con A; células T) o mitógeno de fitolaca americana (PWM; células B). Tras la incubación, se trataron las células con MTT (citotoxicidad) o se pulsaron con 1 μ Ci de [³H]-timidina (síntesis de ADN), [³H]-uridina (síntesis de ARN) o [³H]-leucina (síntesis de proteínas) durante 6 h. Se recogieron las placas en un instrumento Tomteck y se contaron en un contador β Microbeta.

La tabla 4 resume el efecto de los compuestos sobre la citotoxicidad celular, síntesis de ADN, ARN y proteínas en leucocitos mononucleares de sangre periférica (PBML). No se observó citotoxicidad celular. Sin embargo, todos los compuestos suprimen el ADN cuando se estimulan PBML con A, un mitógeno que estimula la proliferación de células T y PWM, un mitógeno que estimula la proliferación de células B. Se inhibe la síntesis de ARN en PBML tanto en reposo como estimulados (con A y PWM). Sin embargo, sólo los compuestos I y II inhiben la síntesis de proteínas en PBML estimulados. Estos resultados sugieren una supresión de células tanto T como B. Estas células están fuertemente implicadas en enfermedades inflamatorias tales como enfermedades autoinmunitarias.

Tabla 4. Efecto de los compuestos sobre la citotoxicidad, síntesis de ADN, ARN y proteínas en PBML en reposo o estimulados.

Compuesto	PBML (resultados de CI ₅₀ en μ M)											
	Citotoxicidad			Síntesis de ADN			Síntesis de ARN			Síntesis de proteínas		
	Reposo	Con A	PWM	Reposo	Con A	PWM	Reposo	Con A	PWM	Reposo	Con A	PWM
I	> 10	> 10	> 10	> 10	3,7	2,8	6,8	nd	2,2	> 10	4,4	9,9
II	> 10	> 10	> 10	> 10	2,9	1,7	5,8	nd	1,1	> 10	6,4	5,7
V	> 10	> 10	>10	> 10	8	6,1	7,4	6	4,5	> 10	> 10	> 10

nd = no determinado

Ejemplo 25: Efectos de los compuestos sobre el lupus eritematoso sintético (LES)

Ratones New Zealand del cruce híbrido F1 NZB x NZW desarrollan la mayoría de las anomalías autoinmunitarias observadas en LES humano y mueren de glomerulonefritis mediada por complejo inmunitario (CI) similar a LES. Los ratones desarrollan altos títulos de anticuerpos anti-ADN (bicatenario y monocatenario) y extracto nuclear (EN), así como manifestaciones clínicas relacionadas con LES incluyendo leucopenia, trombocitopenia, proteinuria y glomerulonefritis. Estos ratones desarrollan anticuerpos anti-ADN tras la edad de tres meses, produciéndose un pico de respuesta de anticuerpos anti-ADN a los siete meses. Posteriormente, la concentración sérica de anticuerpos anti-ADN disminuye, presumiblemente como consecuencia de uremia progresiva. Las primeras manifestaciones serológicas de la enfermedad se producen a aproximadamente 150 días (es decir, cinco meses). Se evalúa su supervivencia a aproximadamente 250 días.

La figura 12 muestra el efecto del compuesto I sobre la mortalidad de los ratones NZB x NZW. Se acometió la administración intravenosa de compuesto o vehículo una vez a la semana desde la semana 10 hasta la semana 46. Los resultados indican que el compuesto I reduce la mortalidad de ratones NZB x NZW.

Ejemplo 26: Efectos de los compuestos sobre la hipersensibilidad de tipo retardado (DTH)

Se sometieron a prueba los compuestos para determinar su capacidad para tratar hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) inducida por oxazolona en ratones. En el día 0, se sensibilizaron los ratones con 100 μ l de oxazolona en acetona al 5%. En el día 0, día 1 y día 2, se trataron los ratones mediante administraciones intravenosas (i.v.) u orales (v.o.) del vehículo (control) o metotrexato (MTX; control positivo/i.v.) o hidrocortisona (control positivo/v.o.) o el compuesto a una concentración inferior o igual a 50 mg/kg o tal como se especifica. Se expusieron los ratones con una aplicación de 50 μ l de oxazolona en la superficie de la oreja derecha (primera exposición, día 3; segunda exposición, día 10). Se midió el grosor de la oreja en del día 4 al día 7, y en del día 11 al 14. También se observó enrojecimiento y formación de costra. Se sacrificaron los ratones en el día 14. Las células T_{DTH} (CD4) desempeñan un importante papel en la regulación de la intensidad de la respuesta de DTH. Los compuestos pueden ejercer una influencia inhibitoria sobre la respuesta de DTH a través de su inhibición de la activación de células T y la síntesis de

ADN, ARN y/o proteínas.

5 Tal como se muestra en la figura 13A, la administración intravenosa (25 mg/kg) de compuesto I induce una reducción significativa de la inflamación inducida tras la primera exposición de oxazolona tal como se observa por una disminución del grosor de la oreja. Además, la inhibición de la inflamación inducida por el compuesto I era comparable a los resultados obtenidos mediante una dosis inmunosupresora de metotrexato. La administración intravenosa (25 mg/kg) de compuesto I induce una reducción significativa de la inflamación inducida tras la segunda exposición de oxazolona tal como se observa mediante la disminución del grosor de la oreja (figura 13B). Además, la inhibición de la inflamación inducida por el compuesto I era comparable a los resultados obtenidos mediante una dosis inmunosupresora de metotrexato.

15 Tal como se muestra en la figura 14A, la administración intravenosa (5 mg/kg) de compuesto II induce una reducción significativa de la inflamación inducida tras la primera exposición de oxazolona tal como se observa mediante la disminución del grosor de la oreja. Además, la inhibición de la inflamación inducida por el compuesto II era comparable a los resultados obtenidos mediante una dosis inmunosupresora de metotrexato. La administración intravenosa (5 mg/kg) de compuesto II induce una reducción significativa de la inflamación inducida tras la segunda exposición de oxazolona tal como se observa mediante la disminución del grosor de la oreja (figura 14B). Además, la inhibición de la inflamación inducida por el compuesto II era comparable a los resultados obtenidos mediante una dosis inmunosupresora de metotrexato.

20 Tal como se muestra en la figura 15, la administración oral (50 mg/kg) de compuesto IV o compuesto V induce una reducción significativa de la inflamación tal como se observa mediante la disminución del grosor de la oreja. Además, la inhibición de la inflamación inducida por el compuesto IV o compuesto V era comparable al resultado obtenido mediante una dosis terapéutica (50 mg/kg) de hidrocortisona.

25 La figura 16 muestra el efecto de la administración oral de 50 mg/kg de compuesto III tras la primera (figura 16A) y la segunda (figura 16B) exposición de oxazolona. El compuesto III induce una reducción significativa de la inflamación tal como se observa mediante la disminución del grosor de la oreja en ambas exposiciones.

30 La figura 17 muestra el efecto de la administración intravenosa de 5 mg/kg o 25 mg/kg de compuesto X o compuesto XI, respectivamente, tras la primera exposición de oxazolona. Los compuestos X y XI inducen una reducción significativa de la inflamación tal como se observa mediante un grosor inferior de la oreja. Además, la inhibición de la inflamación inducida por el compuesto X o XI era comparable a los resultados obtenidos mediante una dosis inmunosupresora de metotrexato.

35 Ejemplo 27: Efectos de los compuestos sobre la artritis inducida por adyuvante (AIA) de Freund.

40 Se indujo AIA en ratas Lewis hembra mediante la inyección de *Mycobacterium butyricum* liofilizada suspendida en aceite mineral en la almohadilla plantar. Se monitorizó el desarrollo de la artritis a lo largo de un periodo de 3 semanas tras la inyección de adyuvante. La inflamación es máxima en el día 3 tras la administración de adyuvante. Aparece activación inmunitaria aproximadamente del día 10 al día 16. Se administraron por vía oral los compuestos desde el día -3 hasta el día 21. Se registró el peso corporal. Se usó el índice de artritis, que es una medición de la inflamación (edema), el enrojecimiento y la rigidez de las articulaciones, para monitorizar el desarrollo de la enfermedad. Se determinó el grado de artritis midiendo dos diámetros perpendiculares de los tobillos en los planos mediolateral y dorsoventral usando un calibre. Se calcula entonces la circunferencia de la articulación en milímetros usando una fórmula geométrica.

50 Tal como se muestra en la figura 18, el 100% de los animales desarrolla rápidamente sinovitis. Se observó una reducción significativa en la gravedad de la artritis (índice inflamatorio) mediante la administración oral de indometacina (control positivo) desde el día 1 hasta el día 5 y el día 8 y en adelante. También se observó una reducción similar del índice inflamatorio con los compuestos desde el día 1 hasta el día 4 y el día 8 hasta el día 16.

Ejemplo 28: Efecto de los compuestos sobre el modelo de inflamación de bolsa de aire.

55 Se cree que la inflamación inducida por LPS en el modelo de bolsa de aire de rata imita el proceso patológico que se produce en enfermedades articulares tales como artritis. Esto se debe a que los tejidos conjuntivos formados a lo largo de la bolsa de aire son similares a los encontrados en enfermedades articulares crónicas. La inflamación inducida por LPS y las enfermedades articulares crónicas comparten otras características, incluyendo PGE₂, infiltración de neutrófilos, formación de citocinas y daño tisular notablemente elevados.

60 Se produjo una cavidad de aire en el día -6 mediante inyección subcutánea de 20 ml de aire estéril en el área intraescapular de la espalda de ratas Lewis macho (de 175 a 200 g). Se inyectaron 10 ml adicionales de aire en la cavidad en el día -3 para mantener el espacio abierto. En el día 0, se administraron los compuestos por vía intravenosa y una hora más tarde se inyectó lipopolisacárido (LPS: 2,5 ml de 2 µg/ml en PBS) en la bolsa para producir una reacción inflamatoria. Tras 2 h, 4 h o 18 h de tratamiento con LPS, se sacrificaron los animales mediante asfixia con CO₂ y se inyectaron 5 ml de PBS/heparina (10 U/ml)/indometacina (36 µg/ml) en la bolsa. Se

65

recogió el fluido de la bolsa. Se midió el volumen de los exudados y se determinó el número de leucocitos presentes en los exudados con un contador Coulter. Se determinó el recuento diferencial mediante tinción con Wright-Giemsa. Se determinaron PGE₂, LTB₄, MCP y TNF α en los exudados de la bolsa mediante ELISA específicos.

5 Tal como se muestra en la figura 19, la administración intravenosa de compuesto II o compuesto V induce una inhibición significativa del recuento de glóbulos blancos dos horas tras la inducción con LPS. El recuento diferencial de estos glóbulos blancos demostró más del 90% de neutrófilos tal como se observa mediante tinción con Wright-Giemsa. La inhibición lograda por el compuesto II o V era similar a la obtenida a partir del control positivo indometacina.

10 La figura 20A muestra el efecto de la administración intravenosa de compuesto II o compuesto V sobre la producción de TNF α inducida por LPS (dos horas tras la inducción) en un modelo de rata de bolsa de aire. El compuesto V induce una inhibición significativa de la producción de TNF α inducida por LPS. Pero o bien el compuesto II o bien la indometacina aumentan la concentración de TNF α después de dos horas tras la inducción con LPS.

15 La figura 20B muestra el efecto de la administración intravenosa de compuesto II o compuesto V sobre la producción de PGE₂ inducida por LPS (dos horas tras la inducción) en un modelo de rata de bolsa de aire. El compuesto V y la indometacina inducen una inhibición significativa de la producción de PGE₂ inducida por LPS. Pero se observó una inhibición débil y no significativa de PGE₂ con el compuesto II.

20 La figura 20C muestra el efecto de la administración intravenosa de compuesto II o compuesto V sobre la producción de LTB₄ inducida por LPS (dos horas tras la inducción) en un modelo de rata de bolsa de aire. Los compuestos II y V inducen una débil inhibición de la producción de LTB₄ inducida por LPS. Pero la indometacina no afectó a la producción de LTB₄.

25 La figura 20D representa el efecto de la administración intravenosa de compuesto II o compuesto V sobre la producción de MCP-1 inducida por LPS (dos horas tras la inducción) en un modelo de rata de bolsa de aire. El compuesto V induce una débil inhibición de la producción de MCP-1 inducida por LPS. Pero la indometacina induce un aumento significativo mientras que el compuesto II no tiene influencia sobre la presencia de MCP-1 en los exudados después de dos horas tras la inducción con LPS.

30 En otro conjunto de experimentos, se recogieron los exudados después de doce horas tras la inducción con LPS. La figura 21 A representa el efecto de la administración intravenosa de compuesto II o compuesto V sobre la producción de TNF α inducida por LPS. El compuesto V induce una inhibición significativa de la producción de TNF α inducida por LPS. Pero el compuesto II no tiene ningún efecto sobre la concentración de TNF α en los exudados después de doce horas tras la inducción con LPS. La indometacina induce una débil inhibición de TNF α en los exudados después de doce horas tras la inducción con LPS.

35 La figura 21B muestra el efecto de la administración intravenosa de compuesto II o compuesto V sobre la producción de PGE₂ inducida por LPS (doce horas tras la inducción) en un modelo de rata de bolsa de aire. El compuesto V o la indometacina inducen una inhibición significativa de la producción de PGE₂ inducida por LPS. Pero se observó un aumento débil y no significativo de PGE₂ con el compuesto II.

45 Ejemplo 29: Efecto del compuesto V sobre la colitis inducida por DNBS.

El modelo de ratón de colitis experimental inducida por ácido 2,4-dinitrobenzenosulfónico (DNBS) sirve como modelo de enfermedad inflamatoria del intestino. En el día 0, se sensibilizaron ratones CDI con DNBS mediante instilación intracolónica de 0,1 ml de una disolución etanólica (30%) de DNBS (40 mg/ml). Se administró por vía oral el compuesto V una vez al día durante cuatro días consecutivos a 25 mg/kg y 50 mg/kg, comenzando una hora tras la sensibilización con DNBS. En el cuarto día, se sacrificaron los ratones y se recogieron 8 cm del colon distal y se abrió longitudinalmente para la evaluación macroscópica.

50 El compuesto V indujo un aumento débil pero significativo del peso corporal ($p = 0,049$ a 25 mg/kg y $p = 0,038$ a 50 mg/kg) en comparación con el control negativo (vehículo), lo que sugiere que los ratones tratados tenían mejor salud. De hecho, se observó mortalidad en el grupo control pero no en los grupos tratados con el compuesto V.

55 Tal como se muestra en la figura 22, el compuesto V indujo una disminución fuerte y significativa en el área de daño macroscópico inducido por DNBS del tejido mucoso del colon ($p = 0,003$ a 25 mg/kg y $p = 0,012$ a 50 mg/kg) en comparación con el control negativo (vehículo).

60 Ejemplo 30: Efecto del compuesto V sobre la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental.

El modelo de ratón de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) inducida por PLP sirve como modelo de esclerosis múltiple. En el día 0, se inmunizaron ratones SJL con 75 μ g de PLP (139-151) emulsionado en adyuvante completo de Freund (200 μ l de emulsión por ratón por vía s.c. divididos entre cuatro sitios) y con toxina pertussis

65

(200 ng, i.p.). Se repitió la inyección i.p. de toxina pertussis en el día 2. Se administró por vía oral el compuesto V una vez al día a 25 mg/kg y 50 mg/kg, comenzando el día 0 y hasta 30 días tras la inmunización, seis veces a la semana.

5 Se observaron los ratones para detectar signos clínicos de EAE hasta 30 días tras la inmunización. Se llevó a cabo la clasificación clínica de los síntomas según la siguiente escala: 0 = sin enfermedad, 1 = cola flácida, 2 = paraparesia moderada, 3 = paraparesia grave, 4 = estado moribundo, 5 = muerte. Tal como se muestra en la figura 23, el compuesto V reduce de una manera dependiente de la dosis la aparición de signos de EAE. A 50 mg/kg, el compuesto V presentaba una actividad significativa ($p = 0,048$) en comparación con el control negativo (vehículo).

10 Todas las modificaciones y sustituciones que se encuentran dentro del significado de las reivindicaciones y el intervalo de sus equivalentes legales tal como se define por el art. 69 CPE y el protocolo de interpretación del art. 69 CPE estarán abarcadas dentro de su alcance. Una reivindicación que usa la transición "que comprende" permite la inclusión de otros elementos dentro del alcance de la reivindicación.

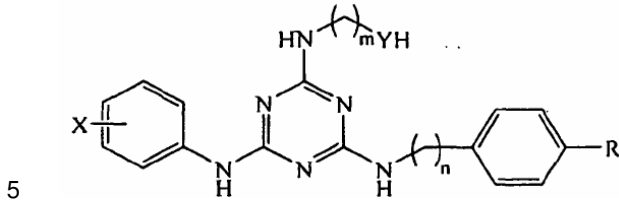
15 Debe entenderse que, según el art. 69 CPE y el protocolo de interpretación del art. 69 CPE, un elemento descrito en esta memoria descriptiva no debe interpretarse como una limitación de la invención reivindicada a menos que se mencione explícitamente en las reivindicaciones. Por tanto, las reivindicaciones son la base para determinar el alcance de protección legal concedido en lugar de una limitación de la memoria descriptiva que se lee en las
20 reivindicaciones.

Todas las posibles combinaciones y permutaciones de los elementos individuales dados a conocer en el presente documento que están cubiertas por el alcance de las reivindicaciones adjuntas se considera que son aspectos de la invención; de manera similar, las generalizaciones de la descripción de la invención que están cubiertas por el
25 alcance de las reivindicaciones adjuntas se considera que son parte de la invención.

A partir de lo anterior, resultaría evidente para un experto en esta técnica que la invención puede realizarse en otras formas específicas sin apartarse de sus características esenciales tal como se especifica en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones descritas deben considerarse sólo como ilustrativas, no restrictivas, porque el alcance de
30 la protección legal proporcionada por la invención se indicará por las reivindicaciones adjuntas, que deben interpretarse conforme al art. 69 CPE y el protocolo de interpretación del art. 69.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la siguiente fórmula:



en la que:

X es F o Cl;

10

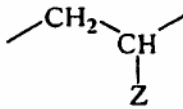
Y es NH, O o S;

R es NH₂, OH, SO₂NH₂, SO₂N(CH₃)₂ o CONH₂;

15

m es un número entero desde 2 hasta 6; y

n es un número entero desde 0 hasta 2 en el que un fragmento de dos carbonos (n = 2) incluye



siendo Z = H u OH.

20

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que:

X es F;

25

Y es NH u O;

R es NH₂, OH, SO₂NH₂, SO₂N(CH₃)₂ o CONH₂;

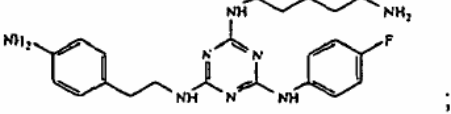
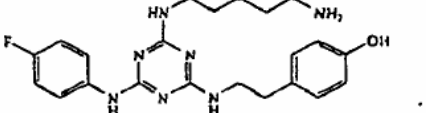
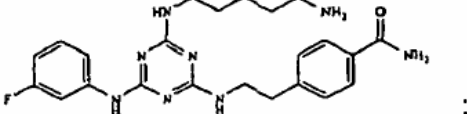
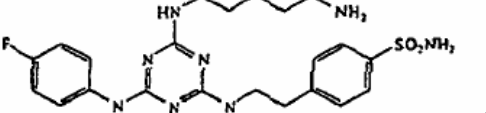
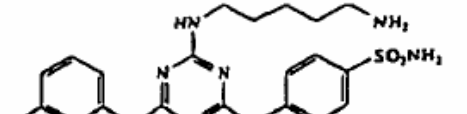
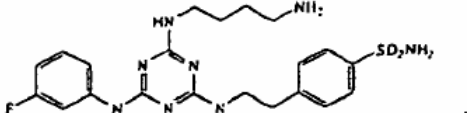
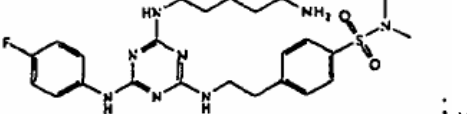
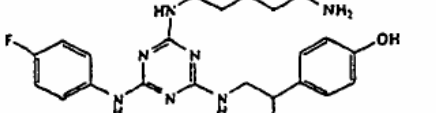
m es 4-6; y

30

n es 0 o n es 2 cuando Z es OH.

3. Compuesto según la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste en:

Compuesto	Estructura
I	
II	
III	

IV	
V	
VI	
VII	
VIII	
IX	
X	
XI	

4. Composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un portador farmacéuticamente aceptable.

5. Composición según la reivindicación 4, en la que el portador farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en alcoholes, disolventes de poliol y disoluciones acuosas de mono o disacáridos.

6. Composición según la reivindicación 4 ó 5, que comprende además un agente quimioterápico.

10. 7. Composición según la reivindicación 6, en la que el agente quimioterápico se selecciona del grupo que consiste en decarbazina, doxorubicina, daunorubicina, ciclofosfamida, vinblastina, vincristina, bleomicina, etopósido, topotecán, irinotecán, Taxotere, Taxol, 5-fluorouracilo, gemcitabina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino y clorambucilo.

15. 8. Composición según la reivindicación 4 ó 5, que comprende además un agente terapéutico que bloquea la unión de TNF α a su receptor o la transducción de señales posterior.

9. Composición según la reivindicación 4 ó 5, que comprende además un agente seleccionado del grupo que

consiste en metotrexato, un corticosteroide antiinflamatorio, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo y combinaciones de los mismos.

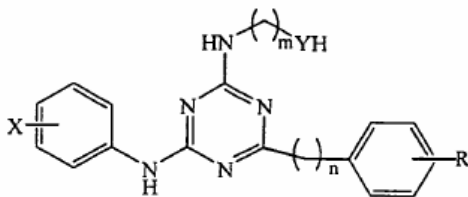
5 10. Uso de uno o más compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, para la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer.

10 11. Uso de uno o más compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 4, 5, 8 y 9, para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad autoinmunitaria.

12. Uso según la reivindicación 11, en el que la enfermedad autoinmunitaria es enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino o esclerosis múltiple.

15 13. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para reducir la inflamación en un mamífero.

14. Compuesto de la siguiente fórmula:



20 en la que:

X es F o Cl;

25 Y es NH, O o S;

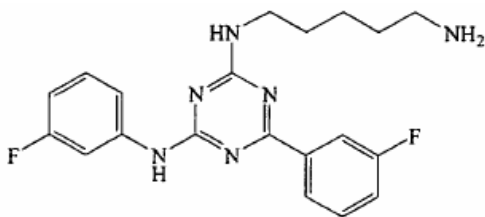
R es NH₂, OH, F o Cl;

m es un número entero desde 2 hasta 6; y

30 n es un número entero desde 0 hasta 2

para el tratamiento de cáncer o para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un paciente humano que lo necesita.

35 15. Compuesto según la reivindicación 14, siendo dicho compuesto



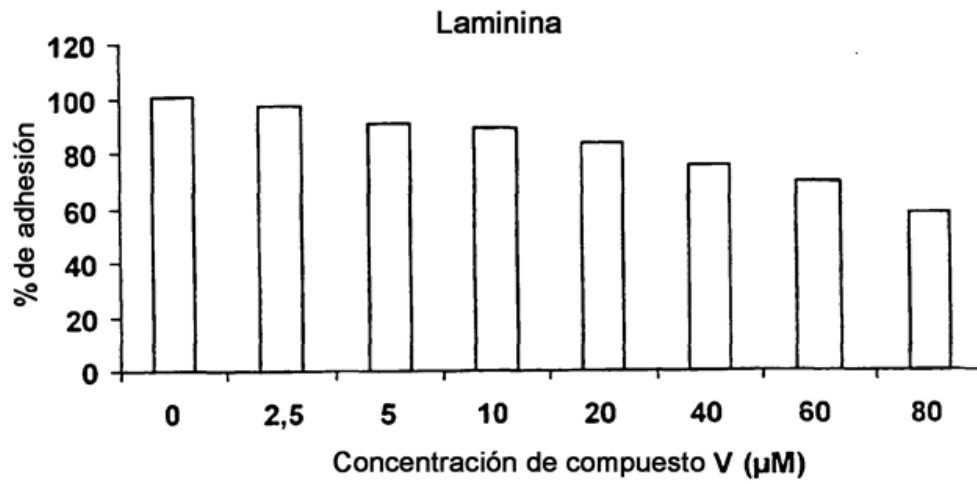


Figura 1A

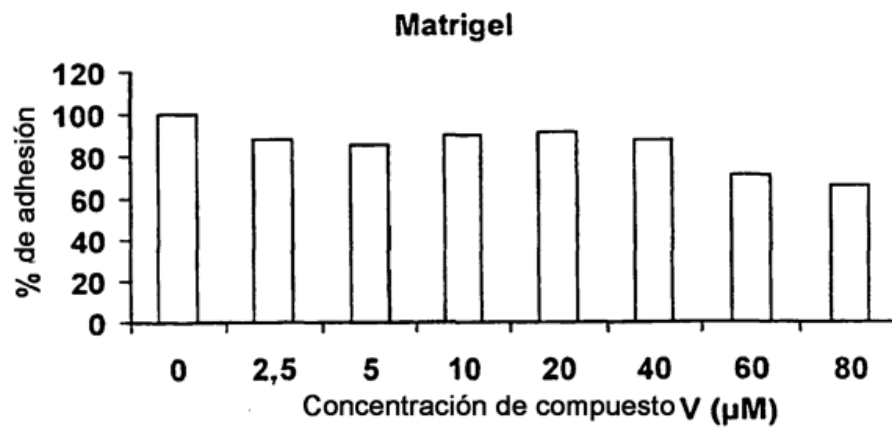


Figura1B

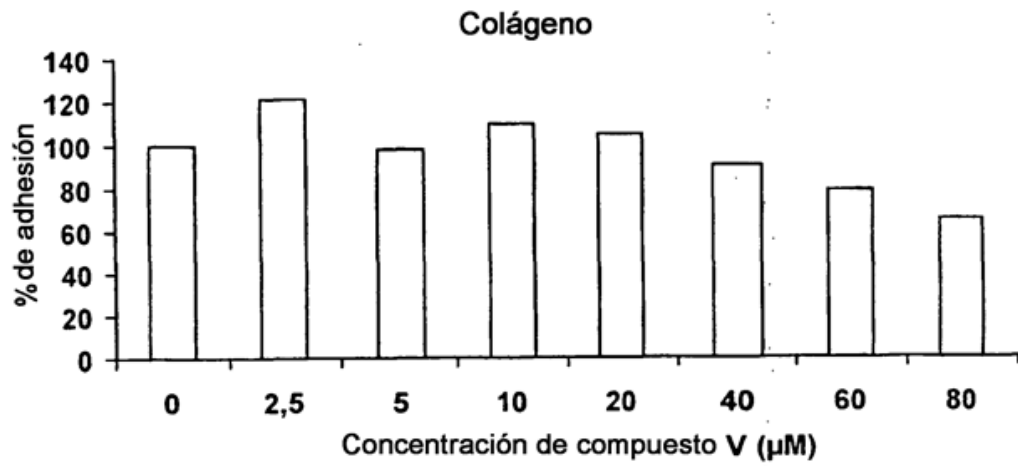


Figura 1C

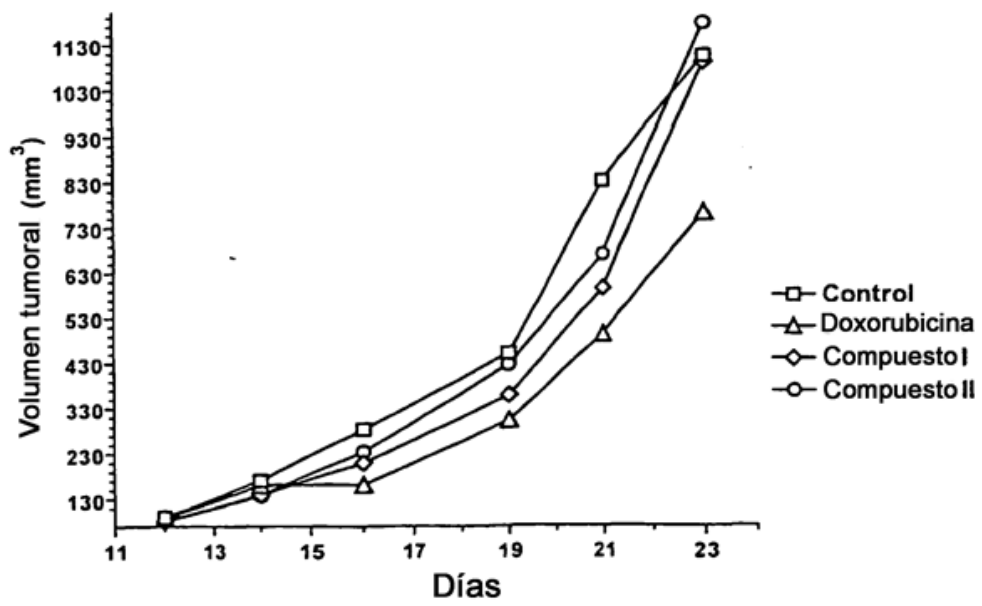
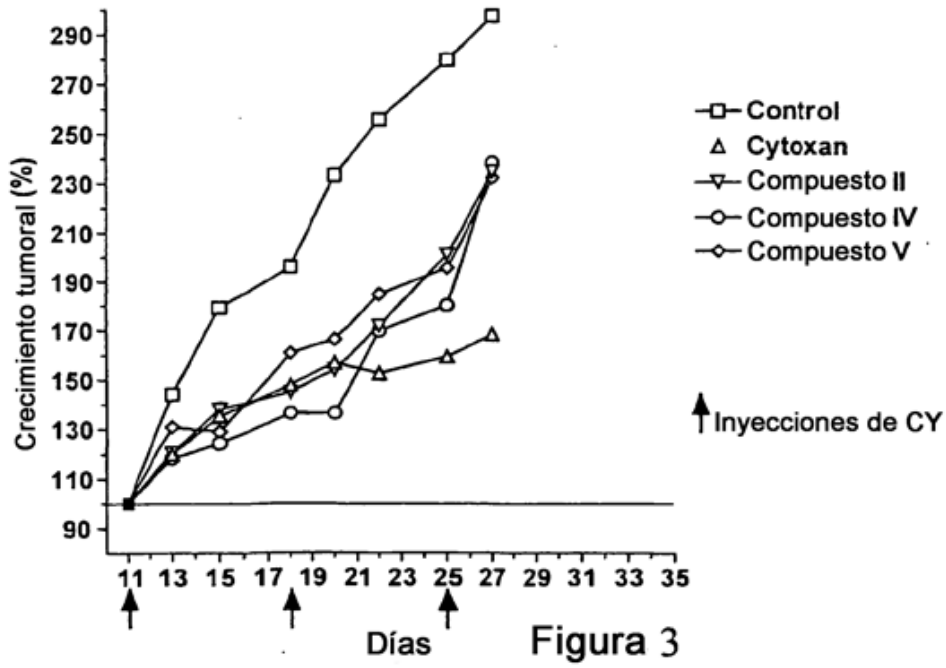
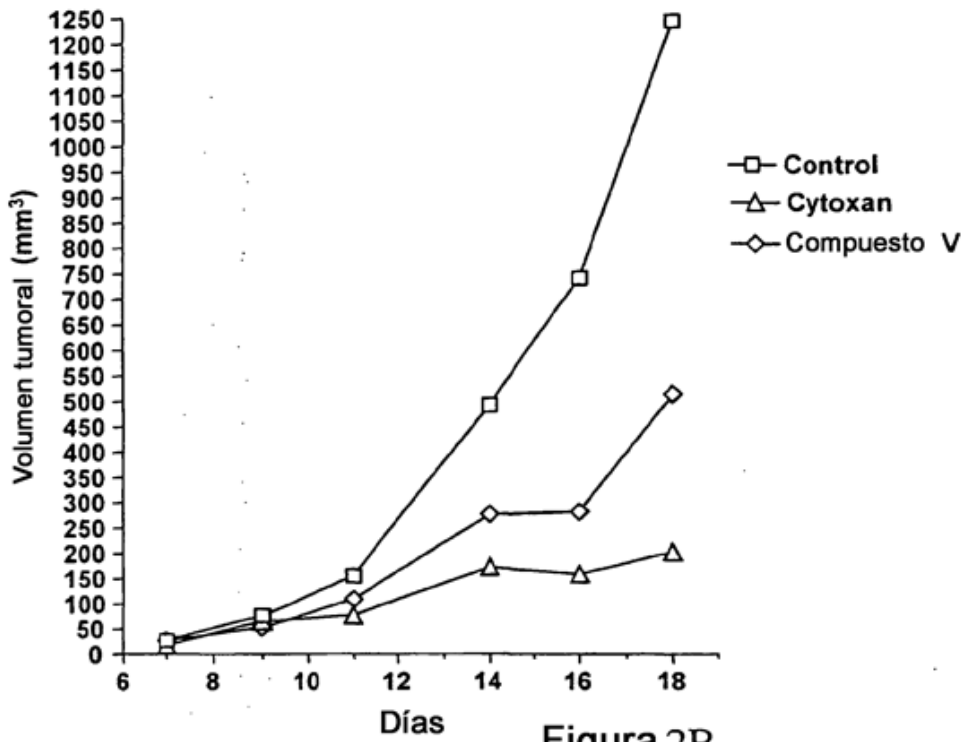
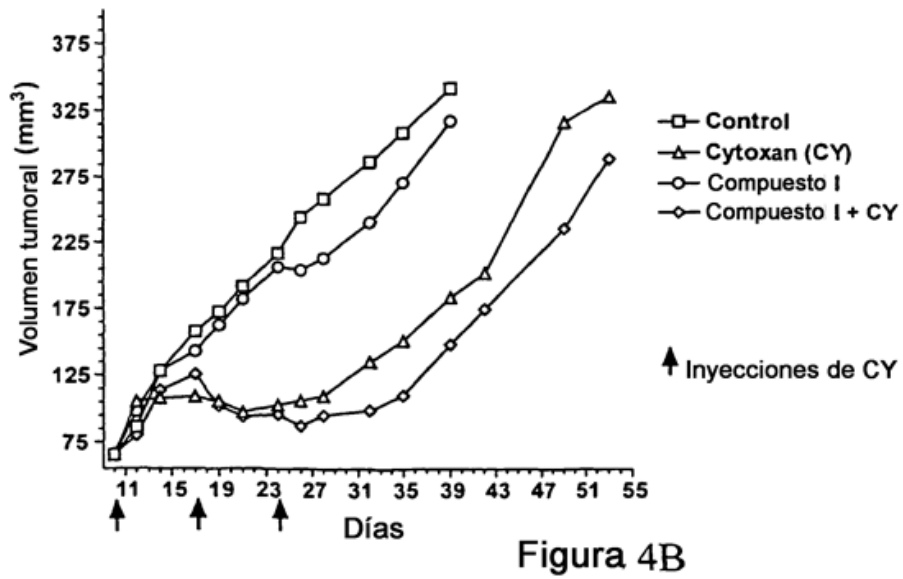
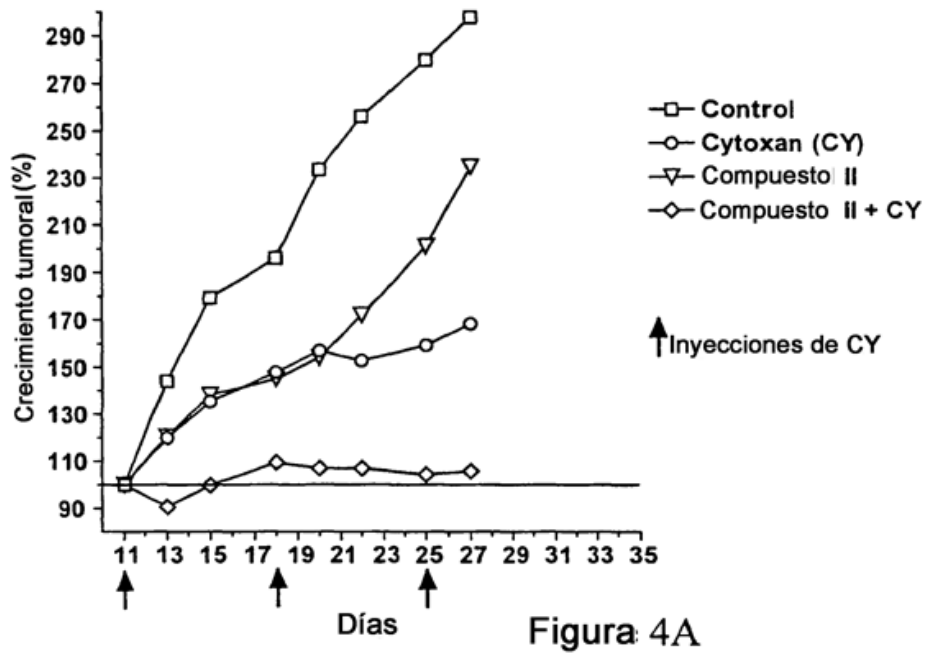


Figura 2A





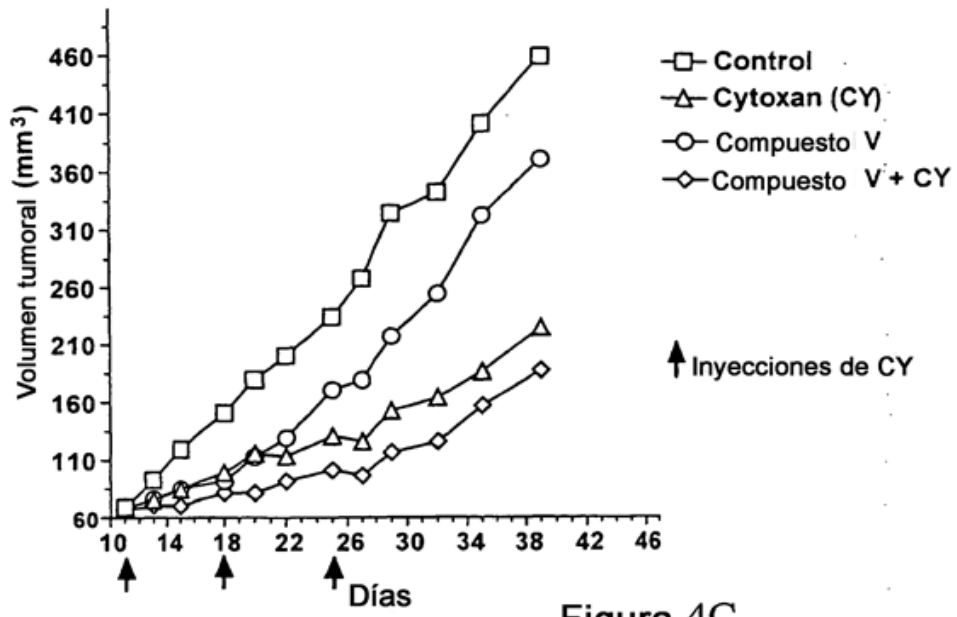


Figura 4C

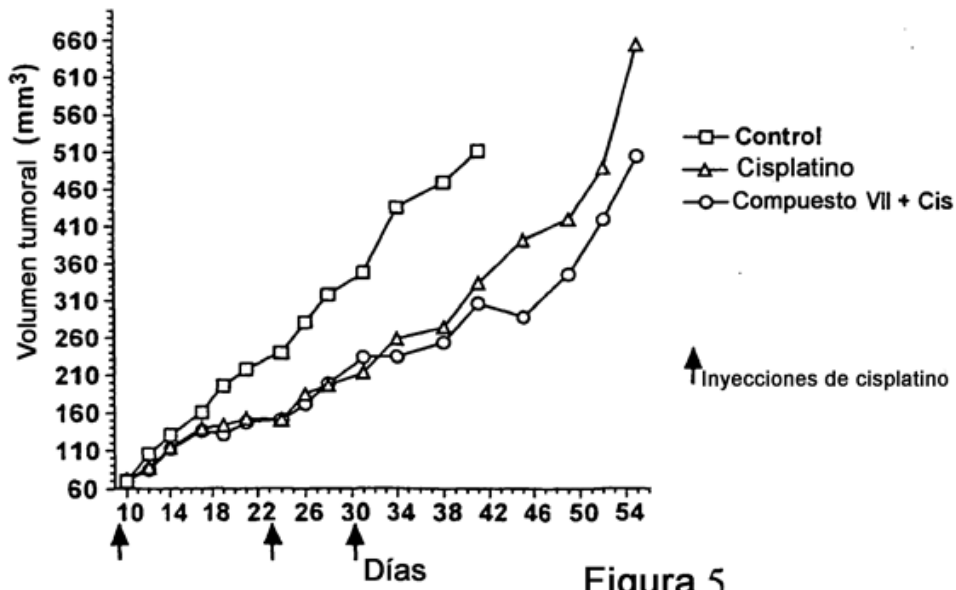


Figura 5

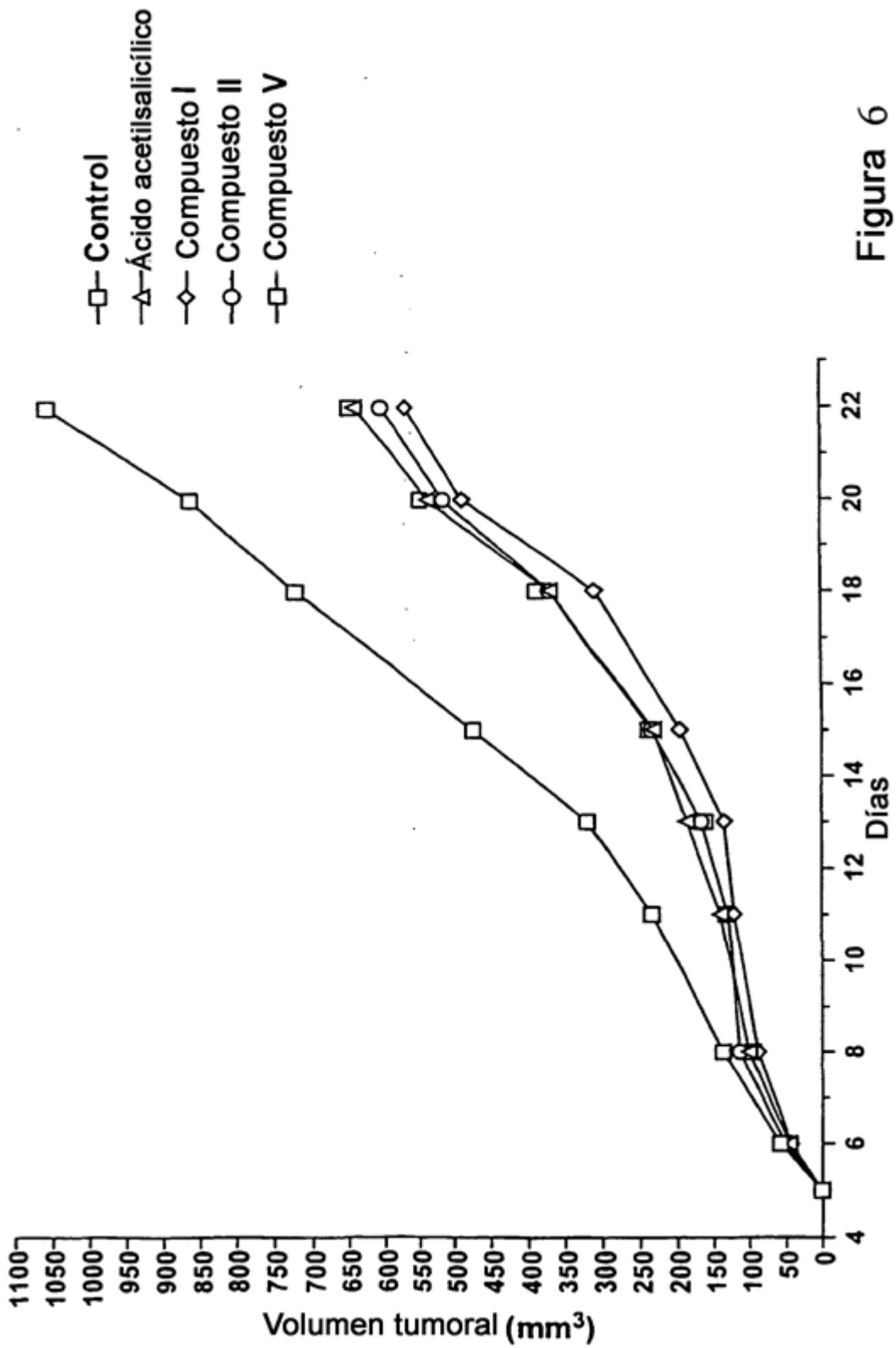


Figura 6

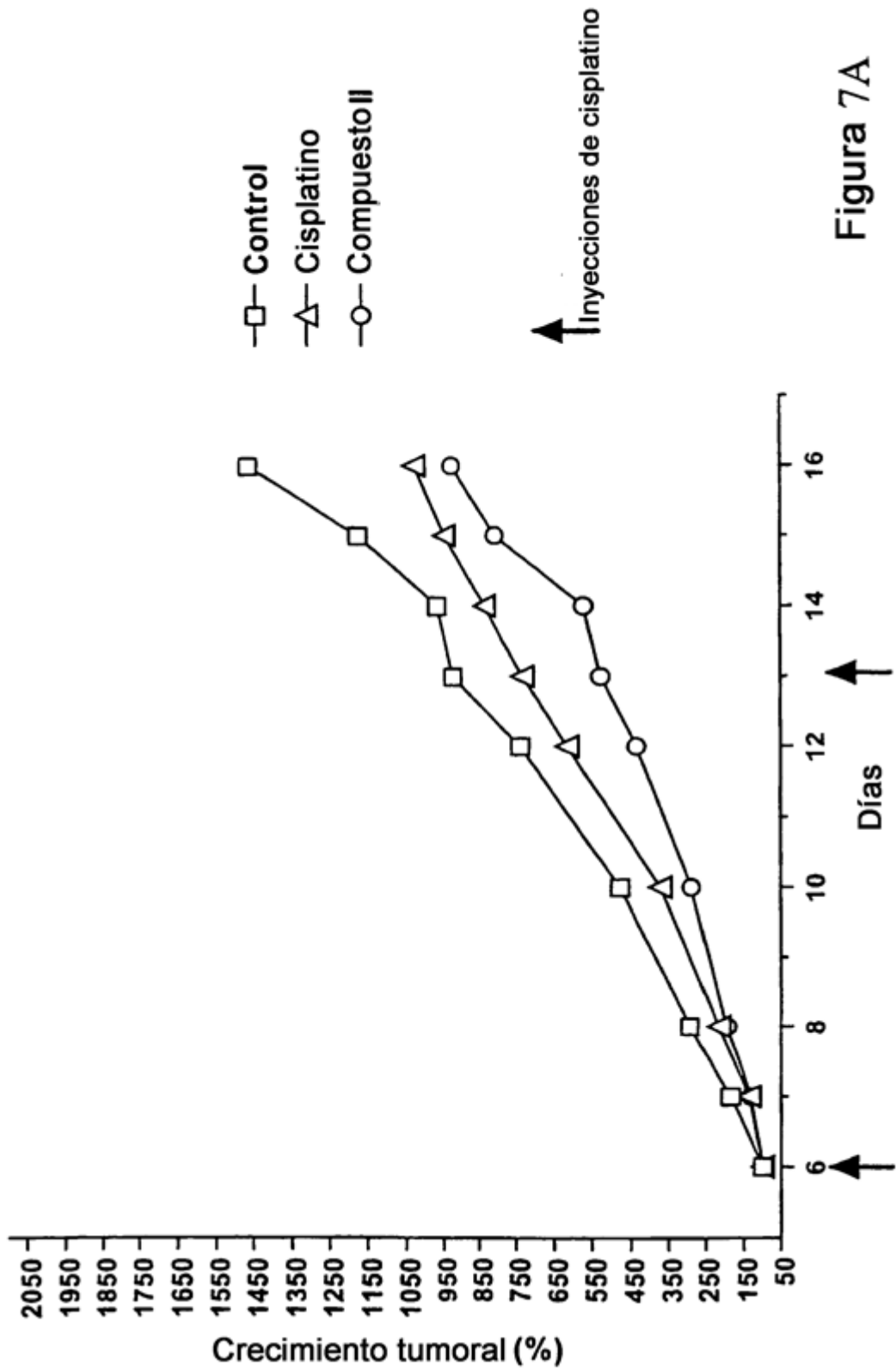


Figura 7A

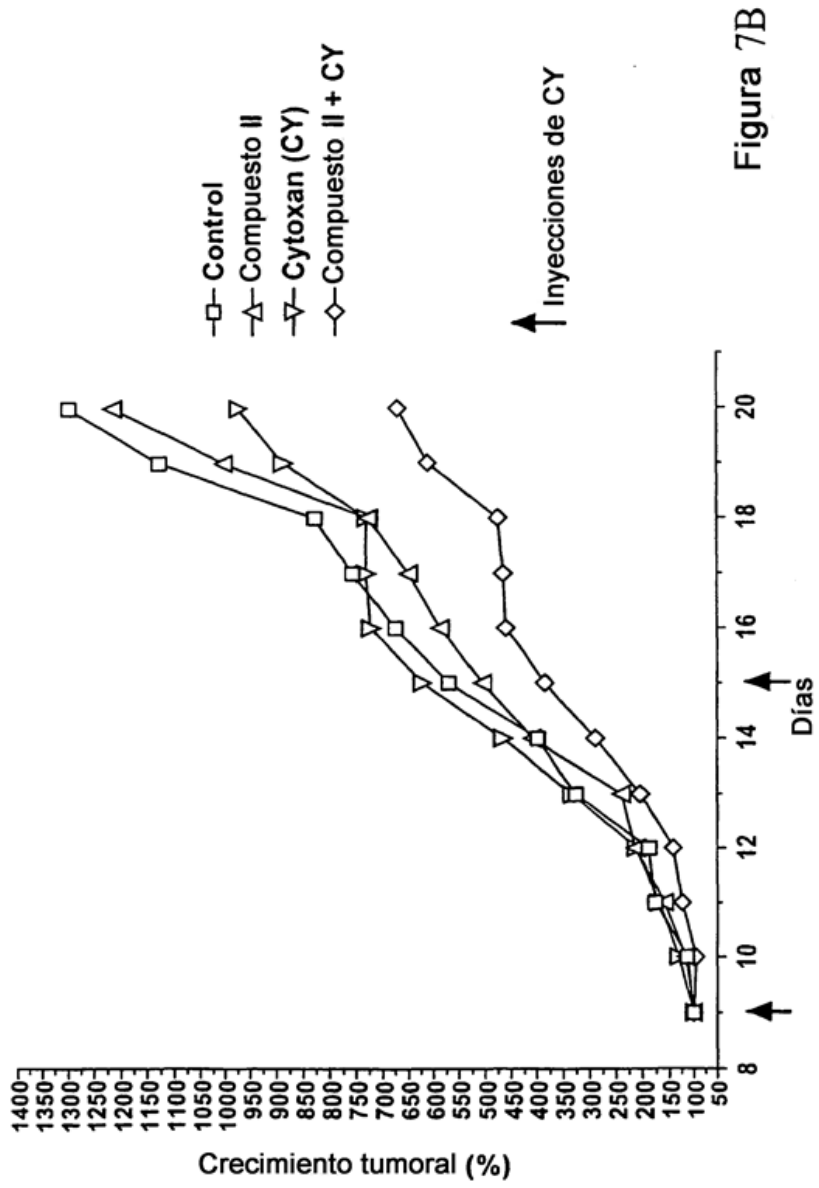


Figura 7B

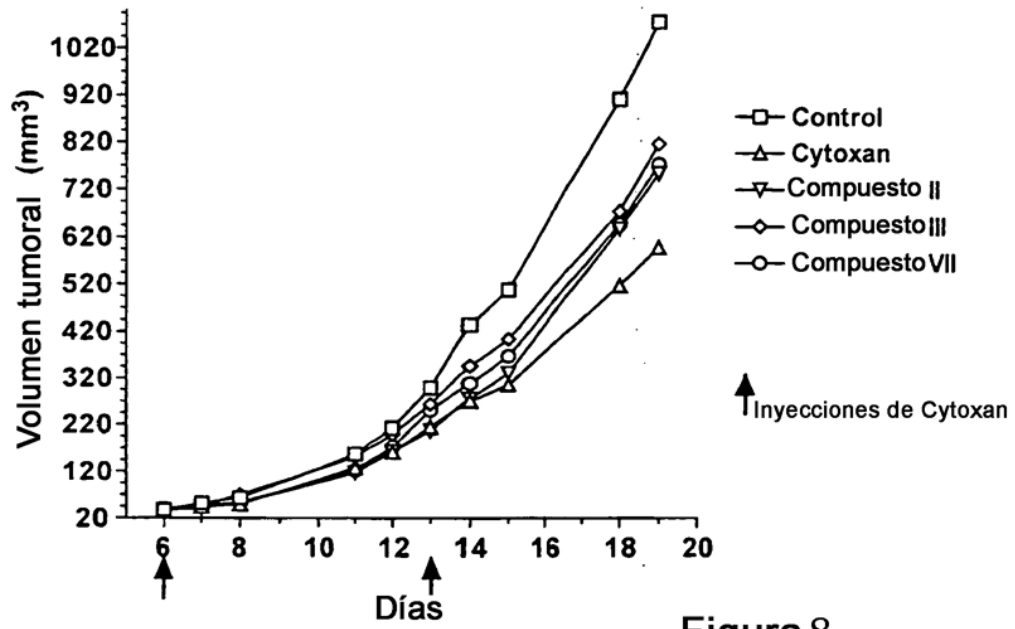


Figura 8

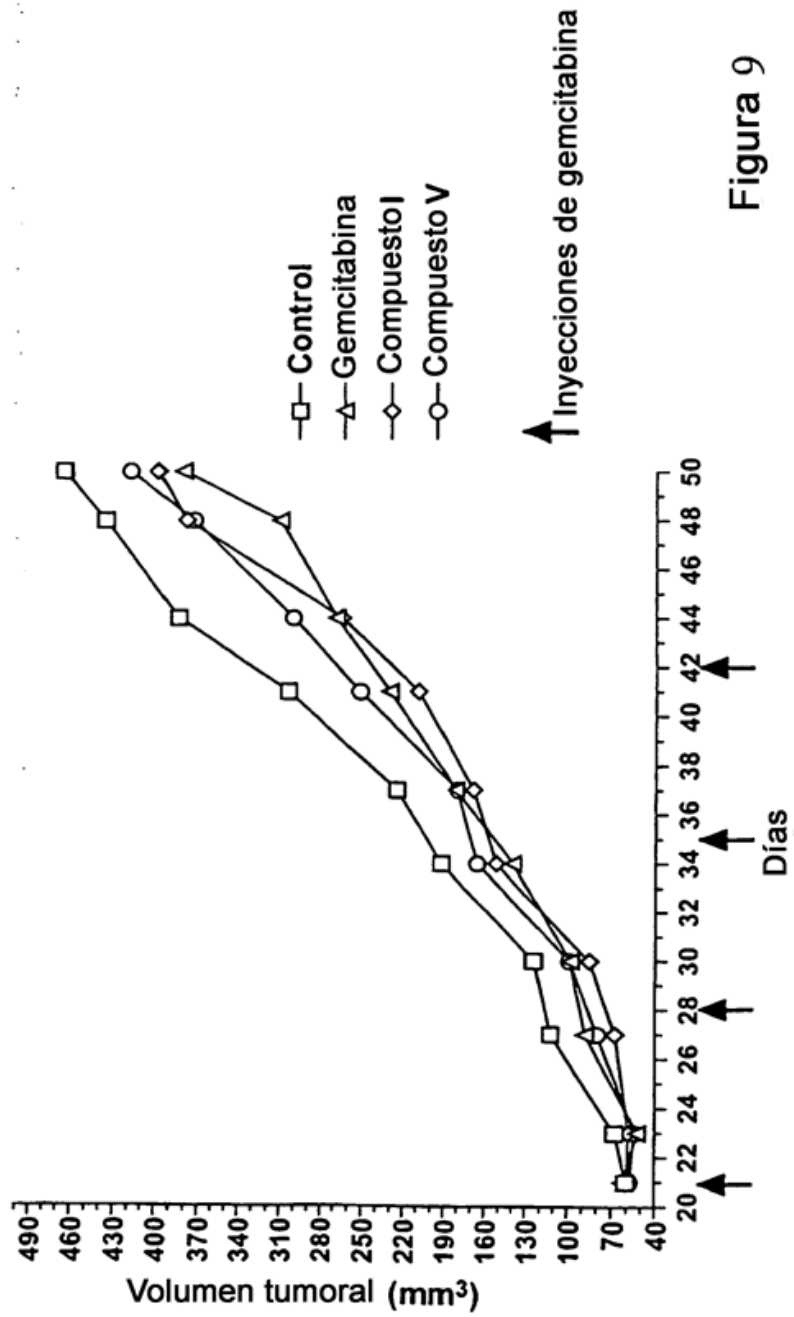


Figura 9

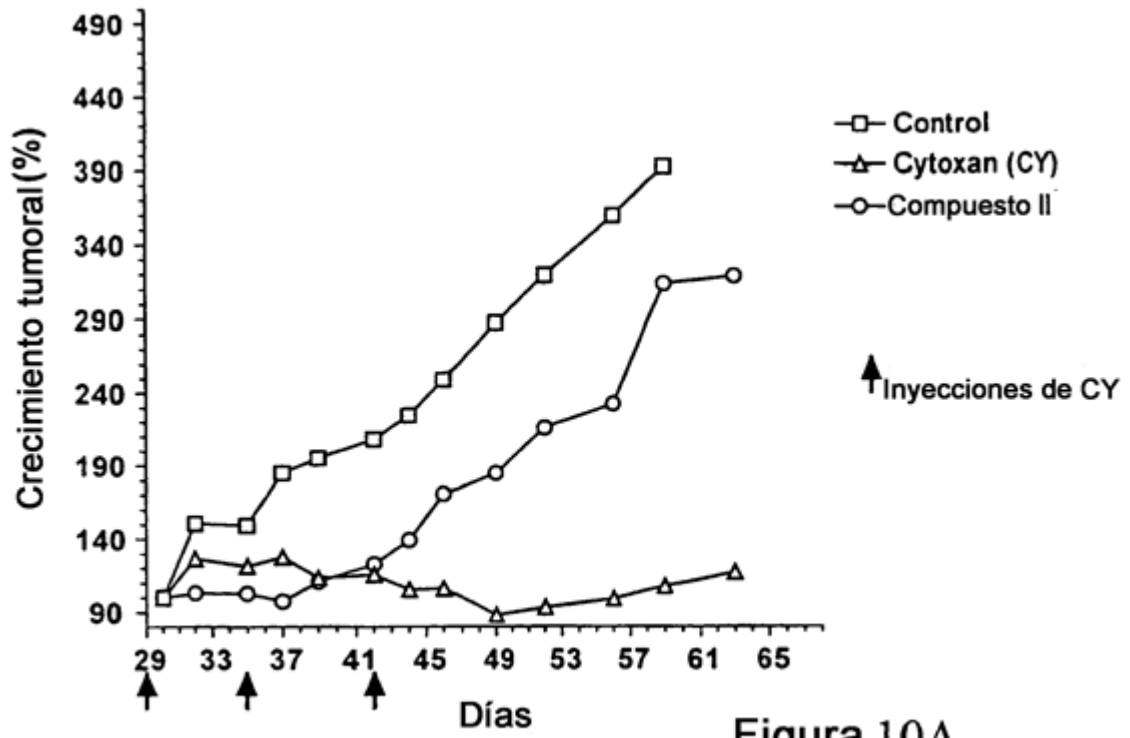


Figura 10A

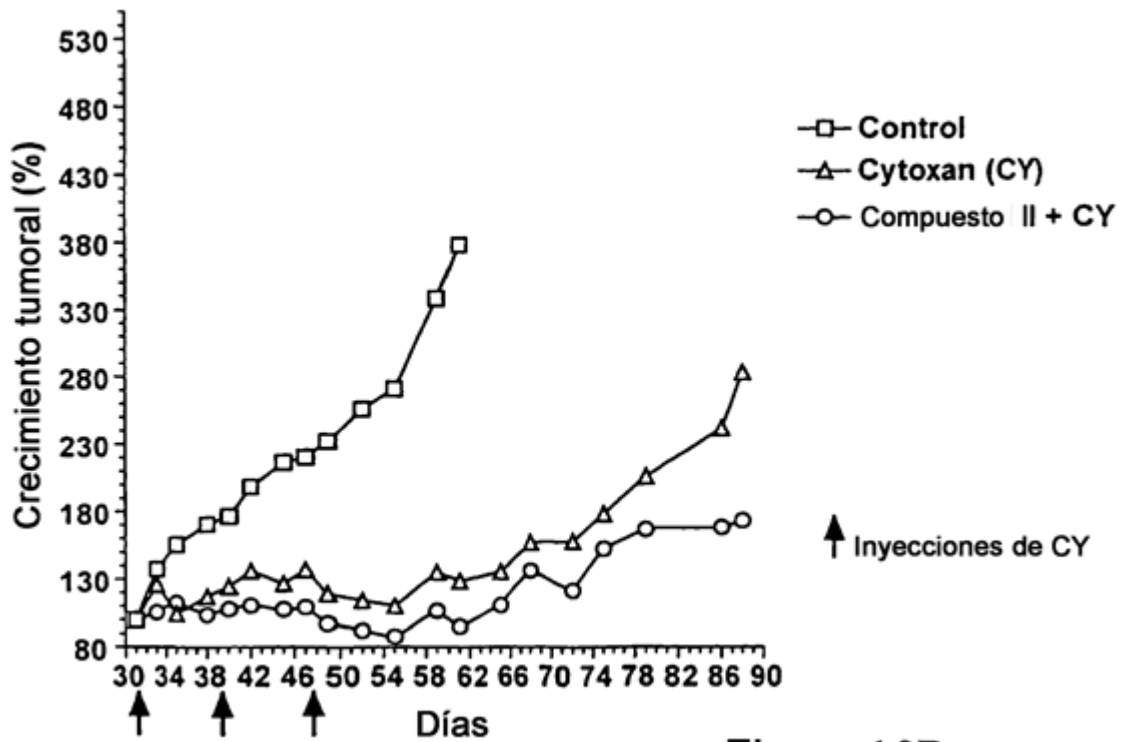


Figura 10B

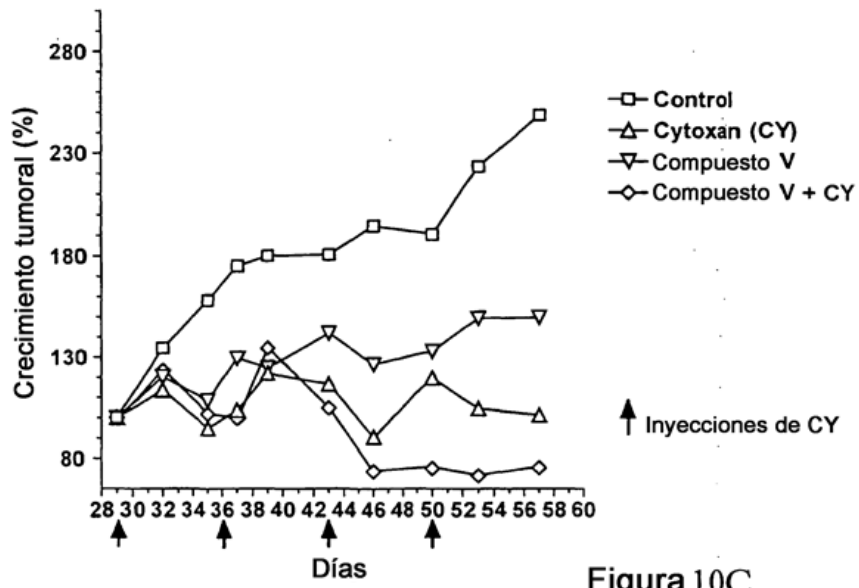


Figura 10C

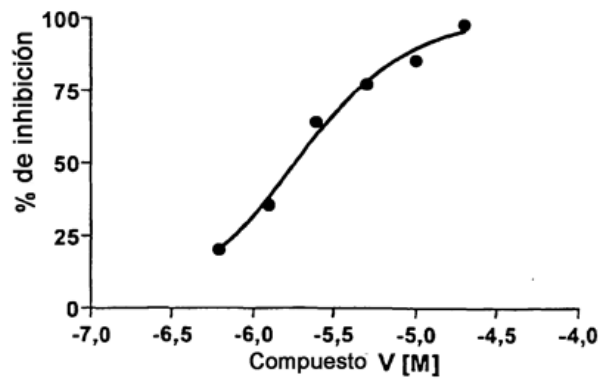


Figura 11

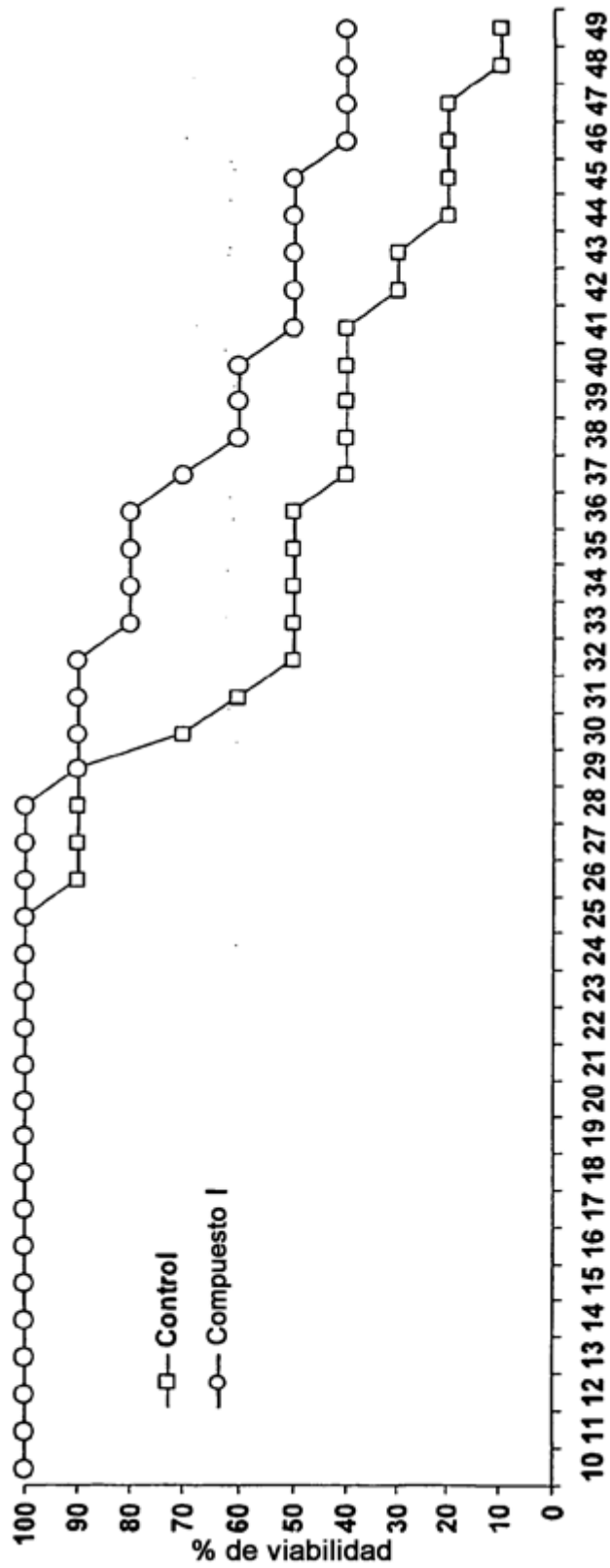


Figura 12
Semanas

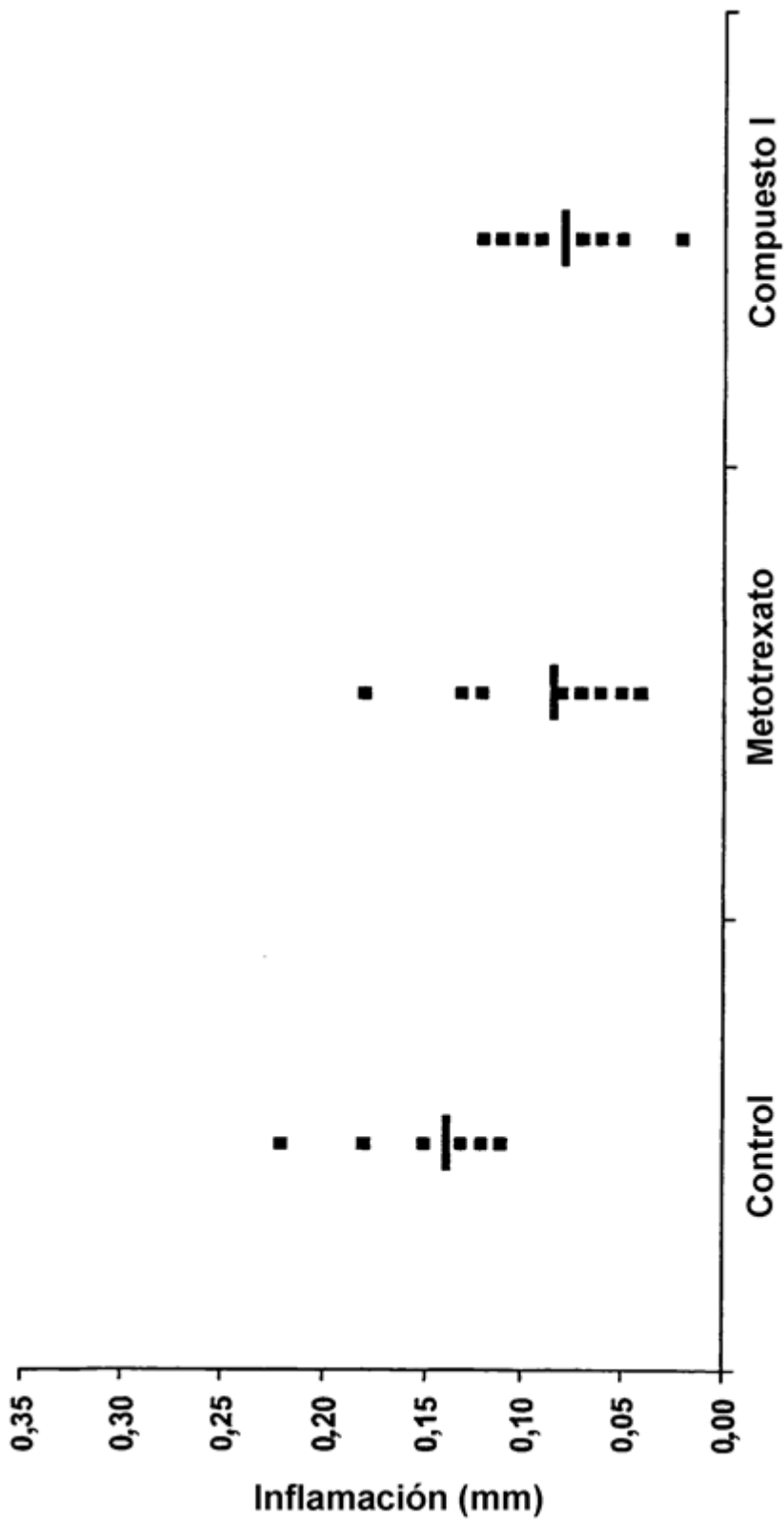


Figura 13A

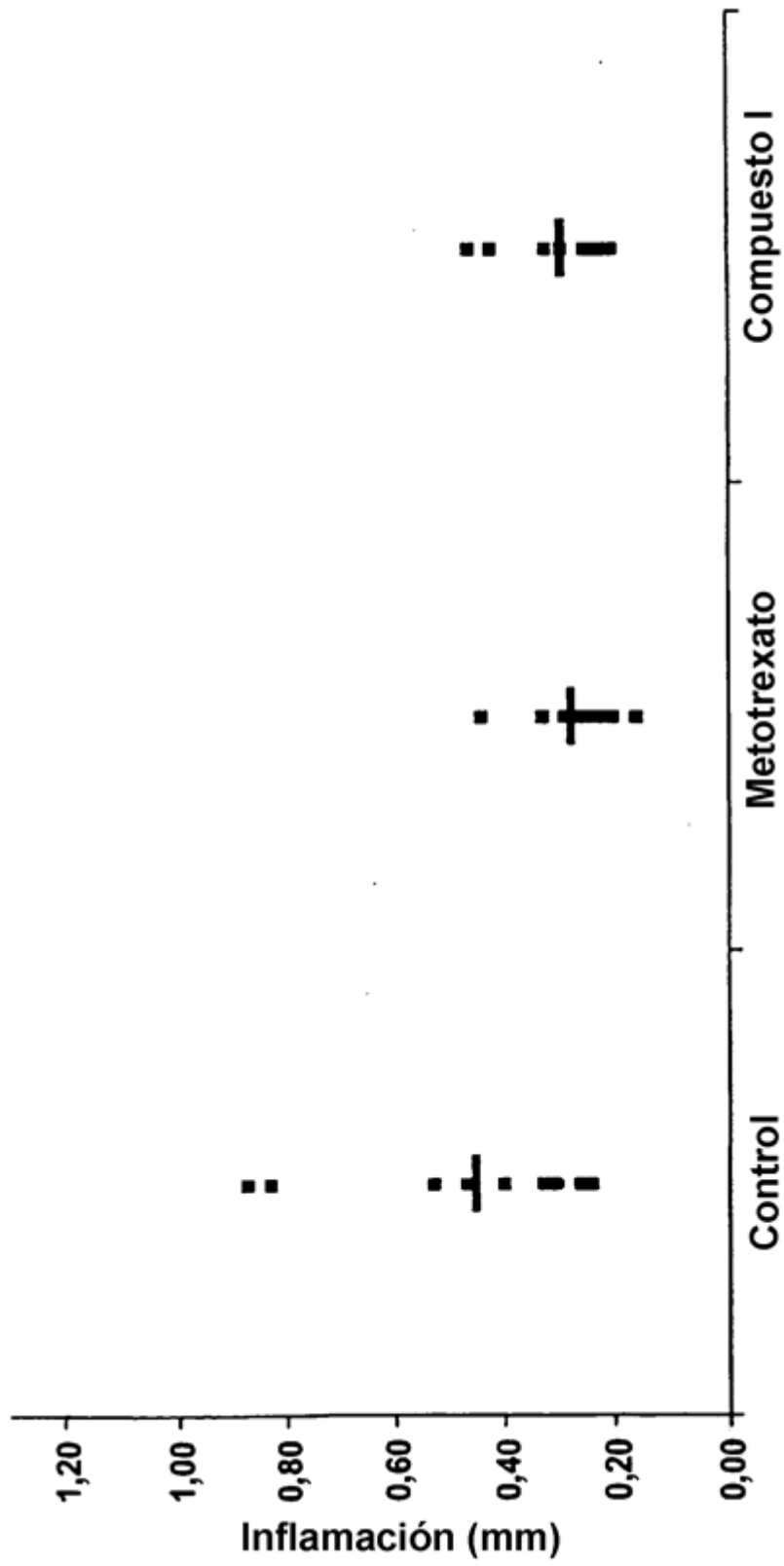


Figura 13B

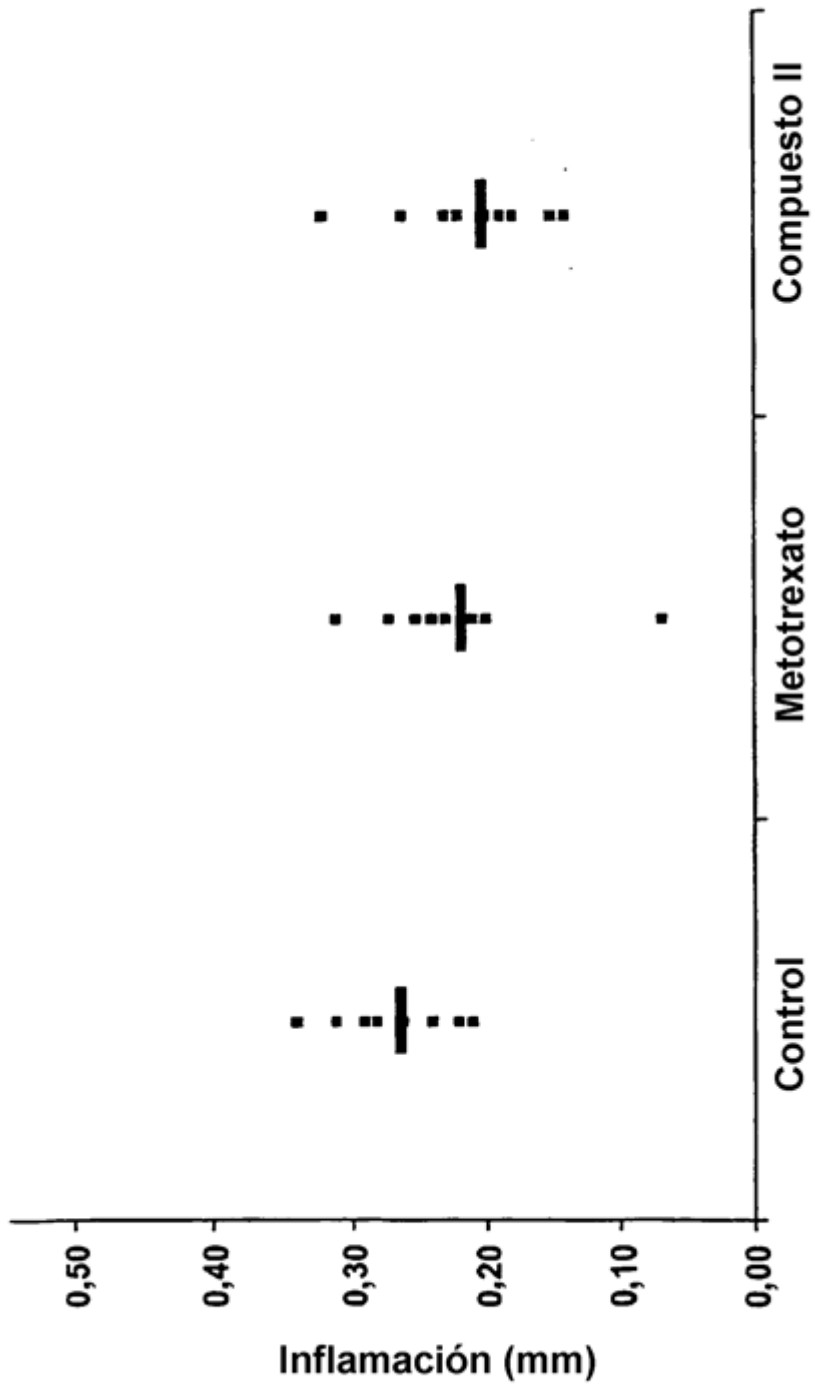


Figura 14A

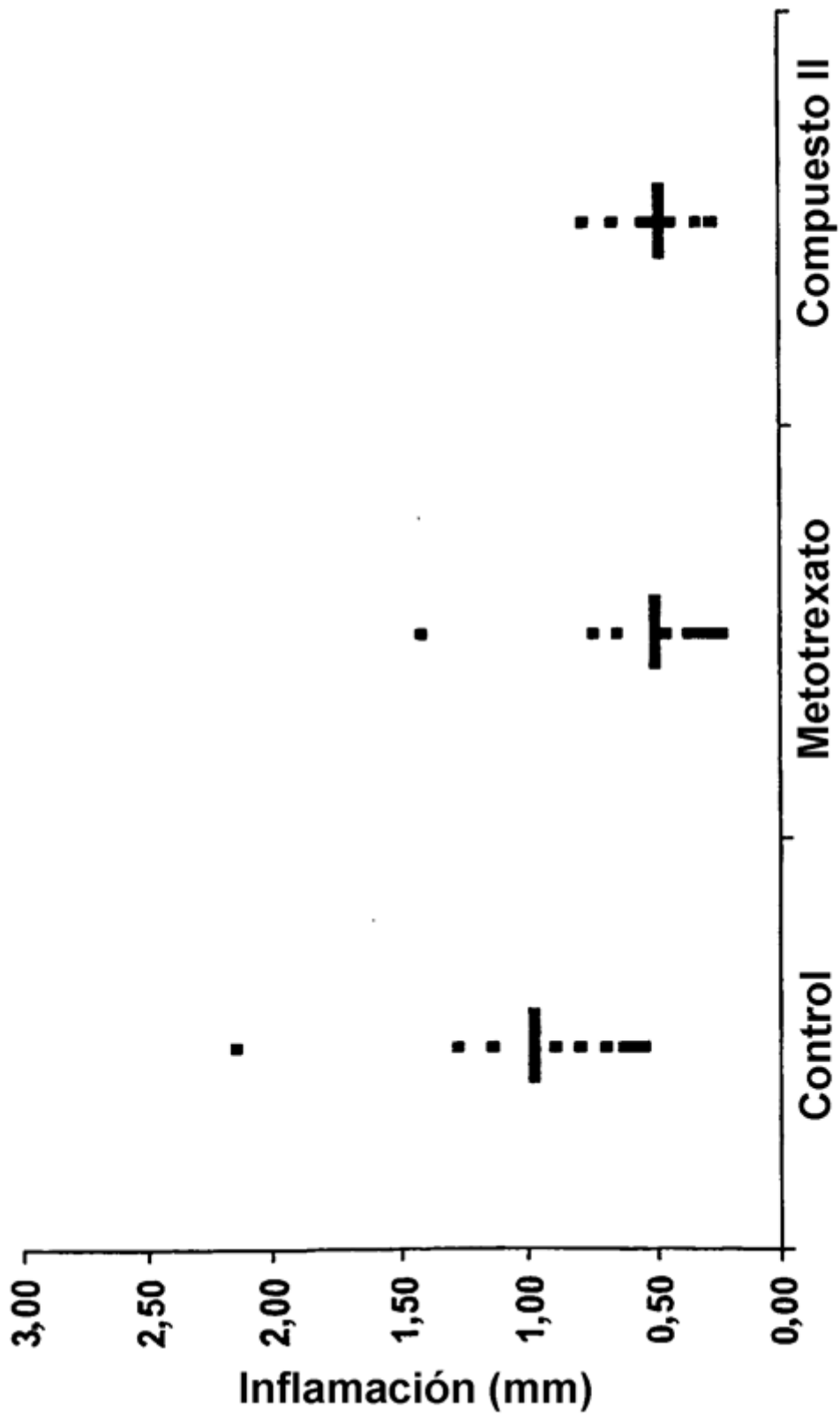


Figura 14B

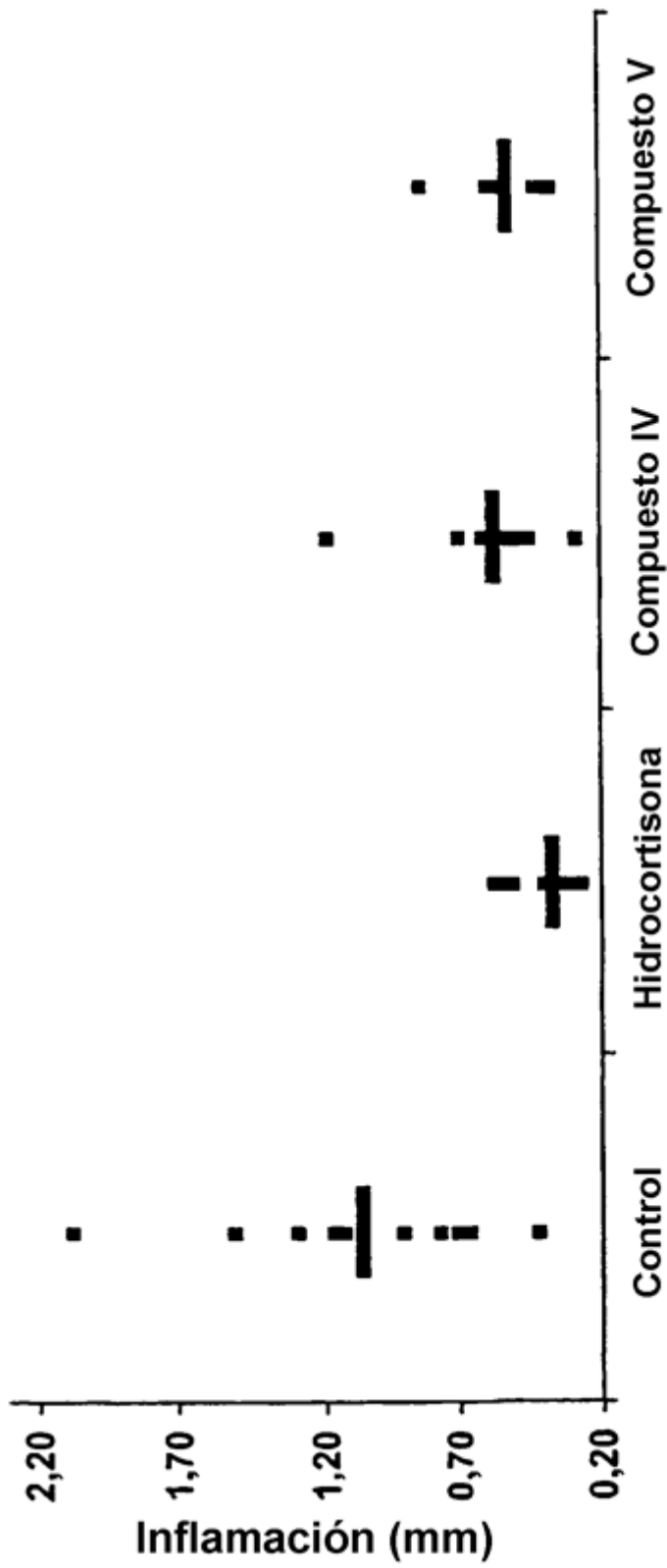


Figura 15

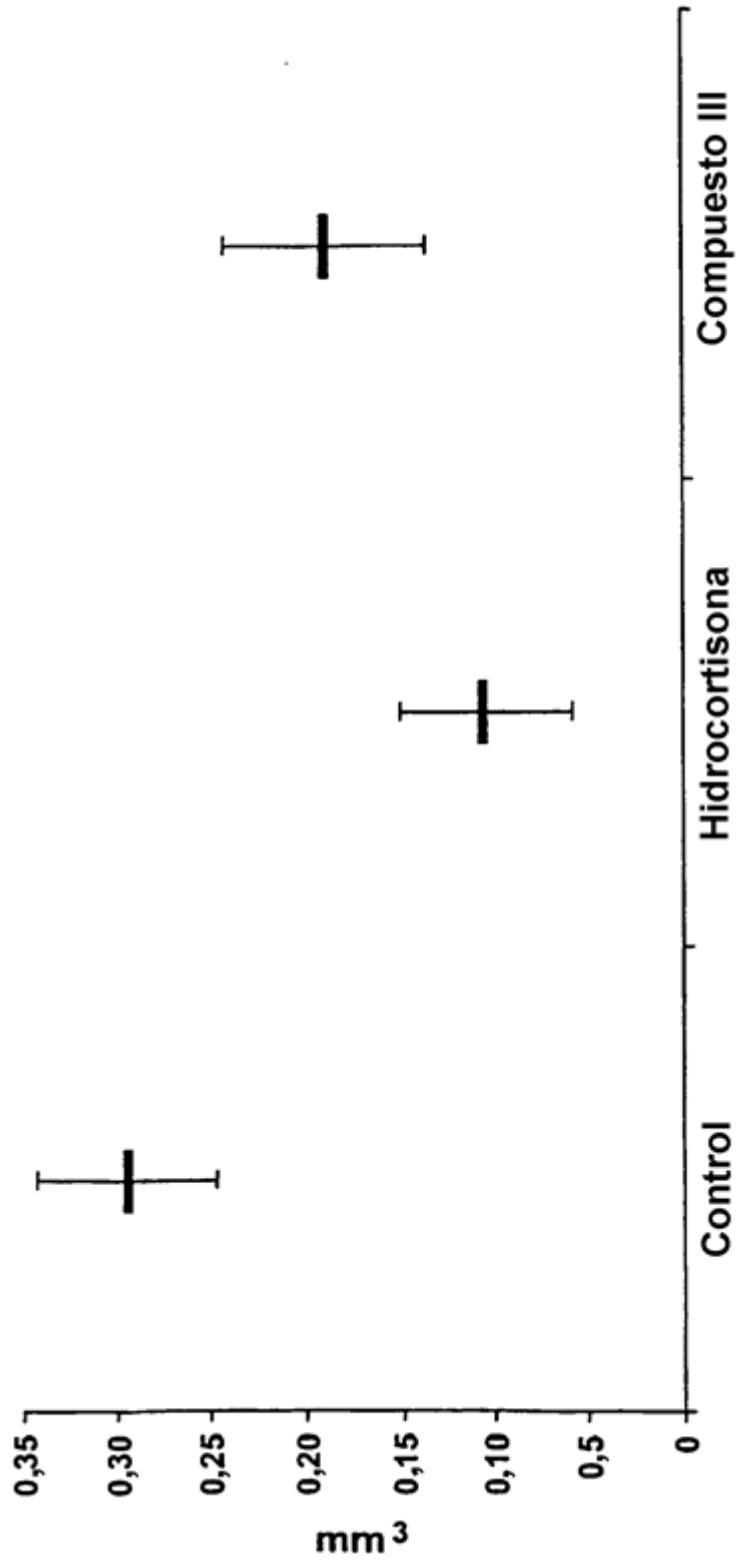


Figura 16A

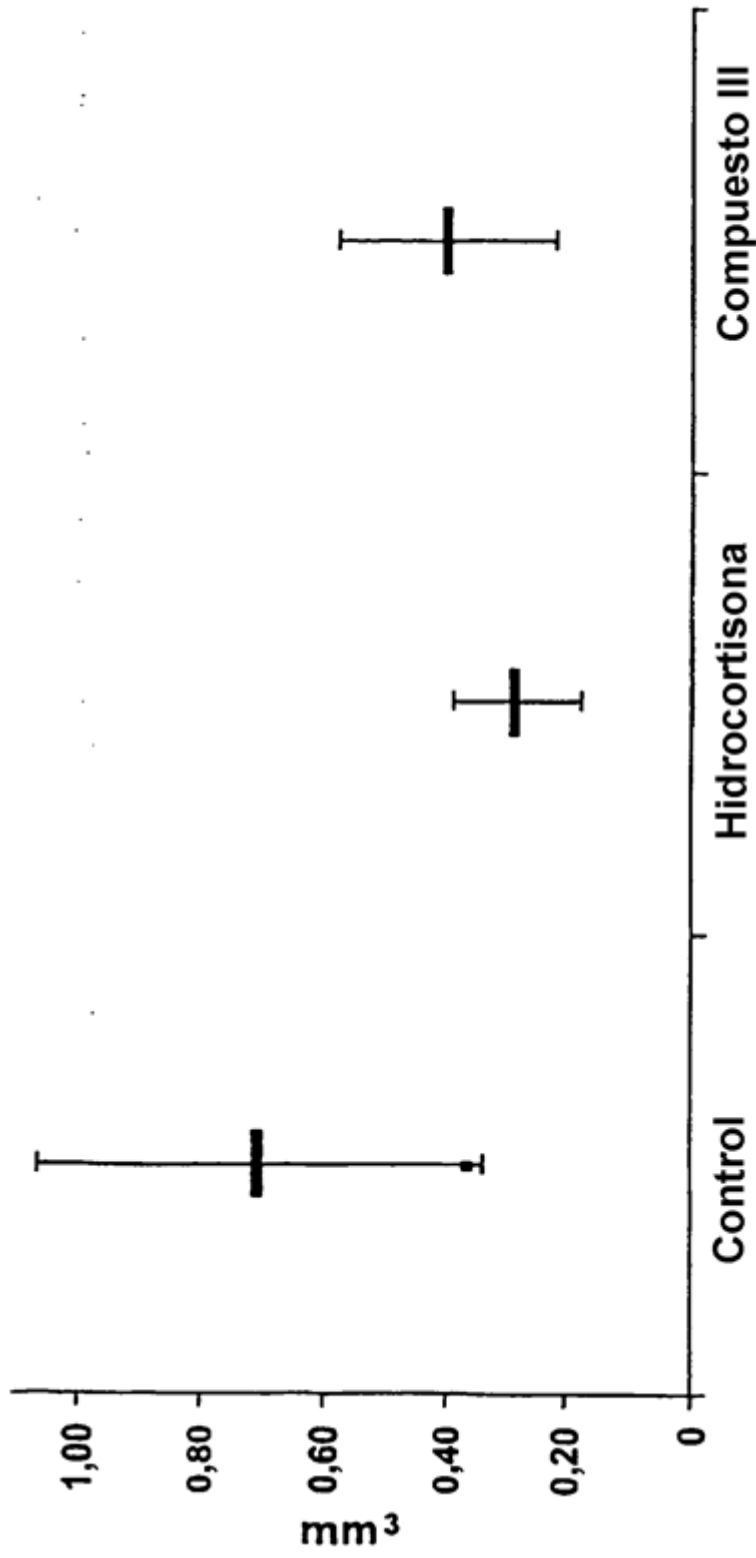


Figura 16B

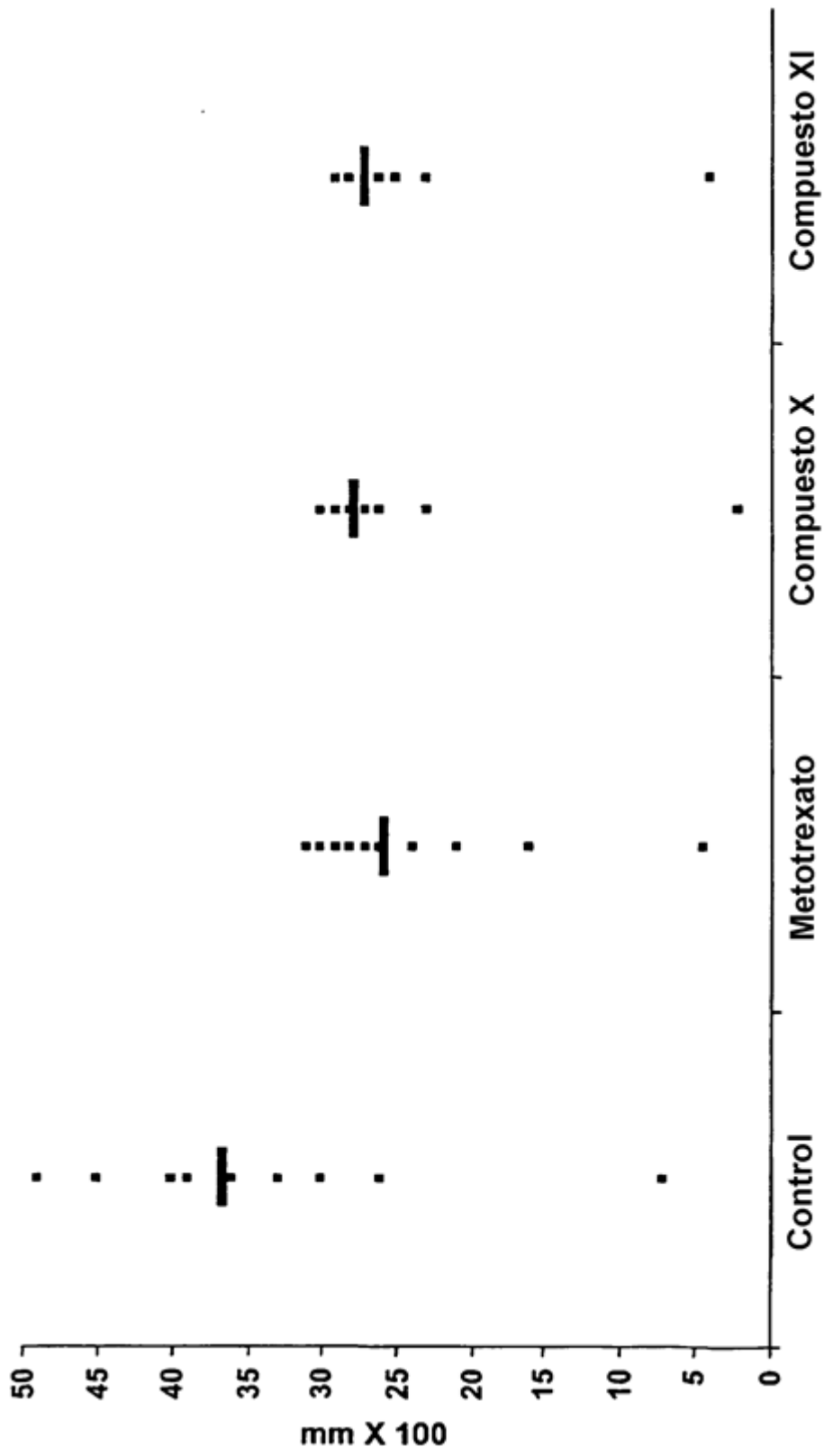


Figura 17

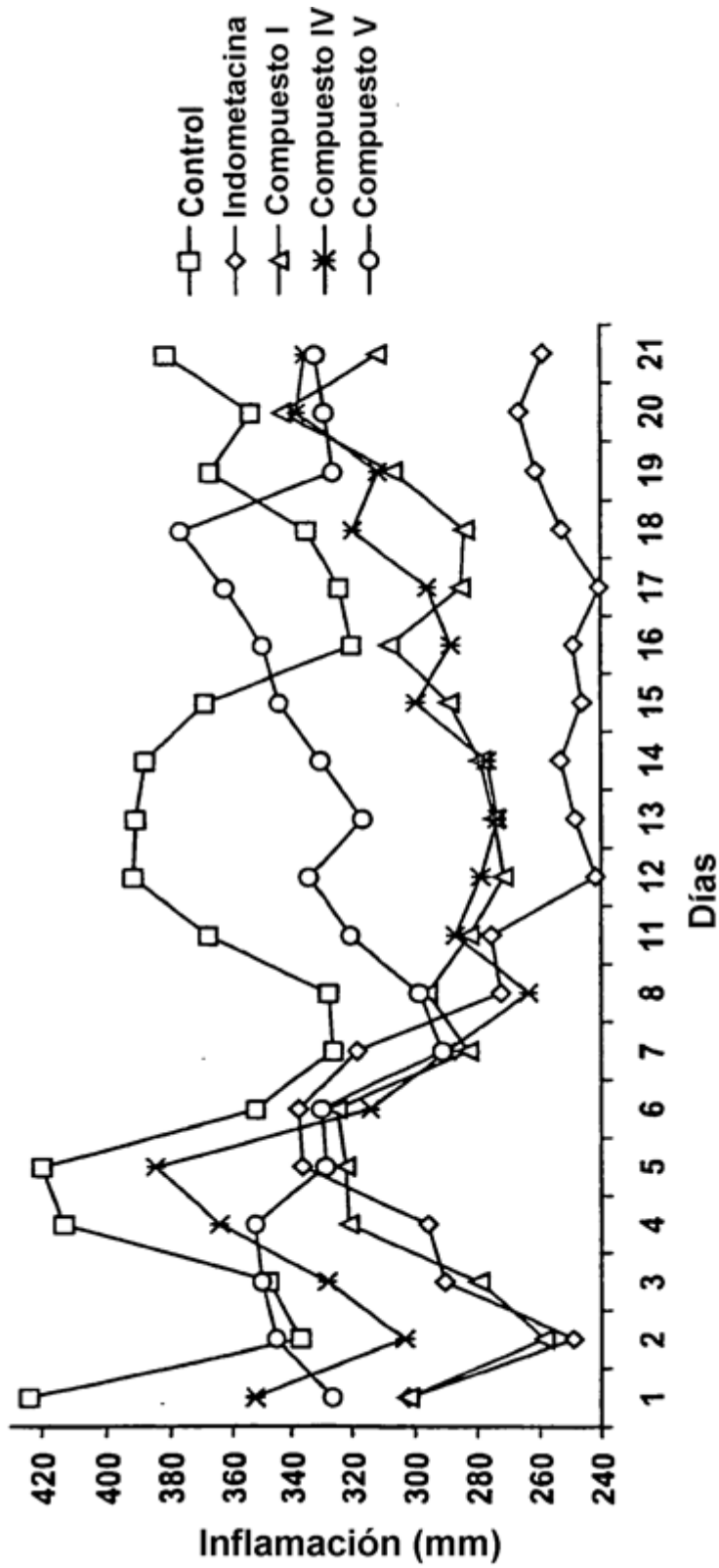


Figura 18

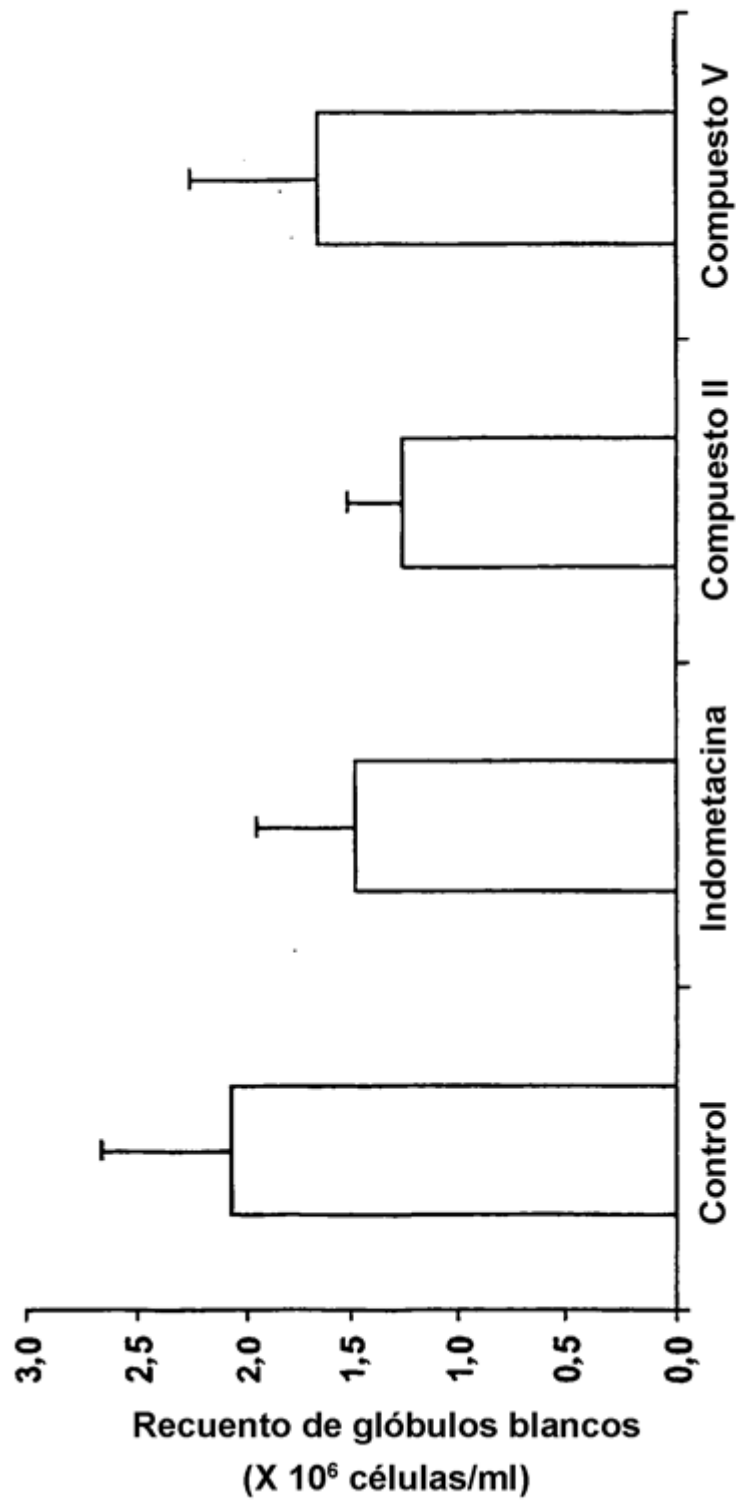


Figura 19

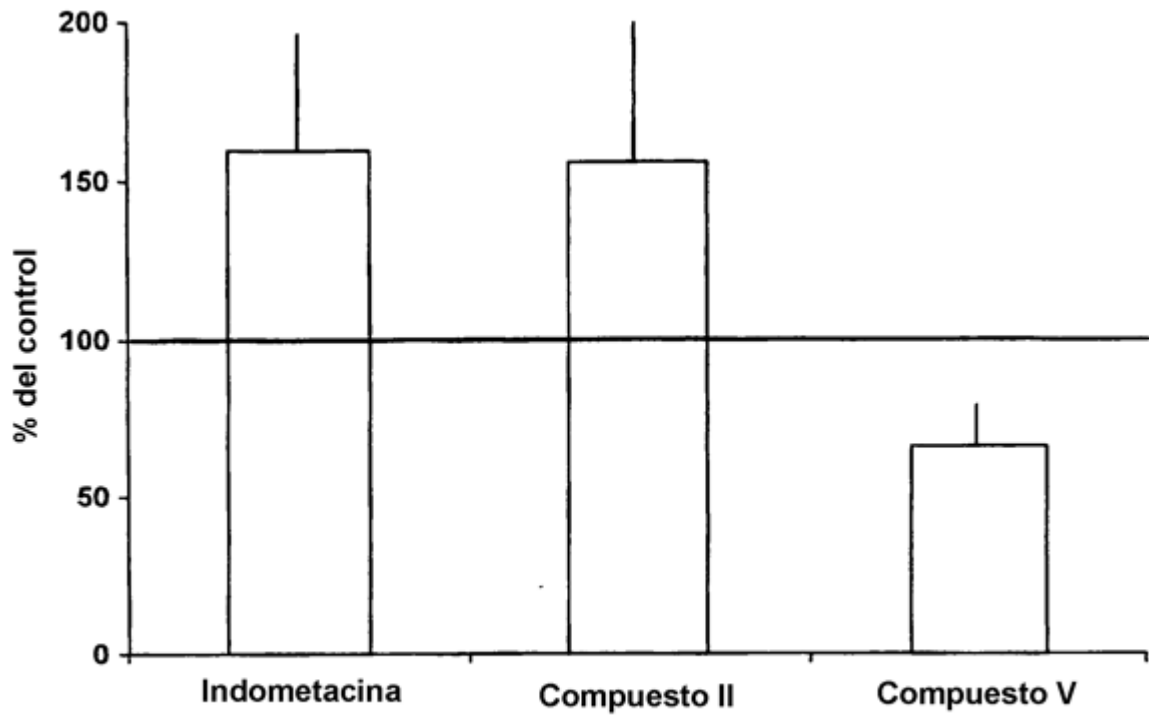


Figura 20A

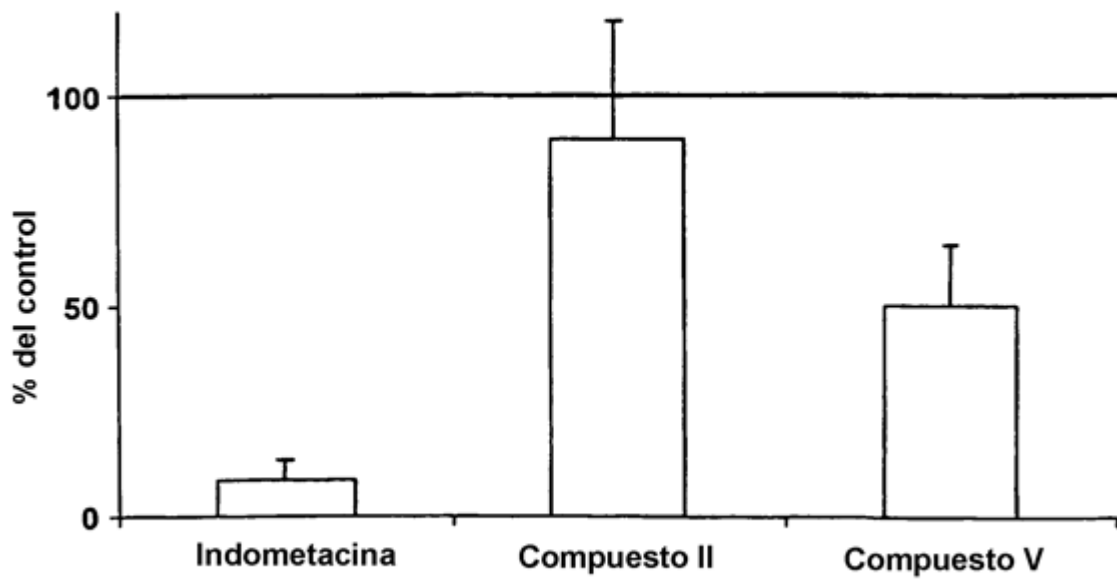


Figura 20B

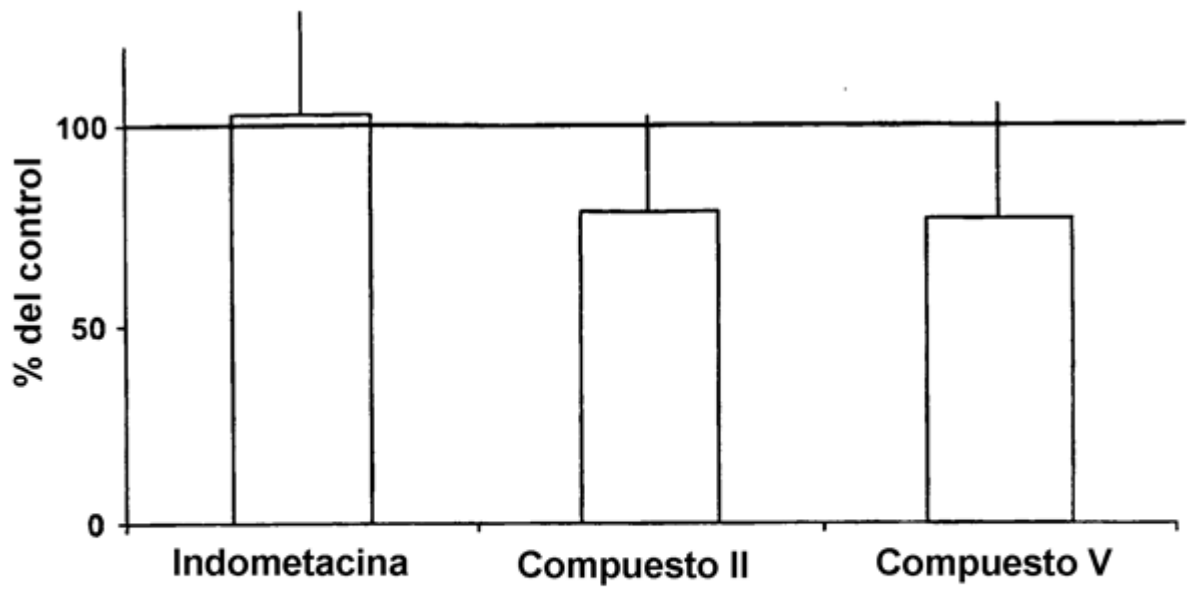


Figura 20C

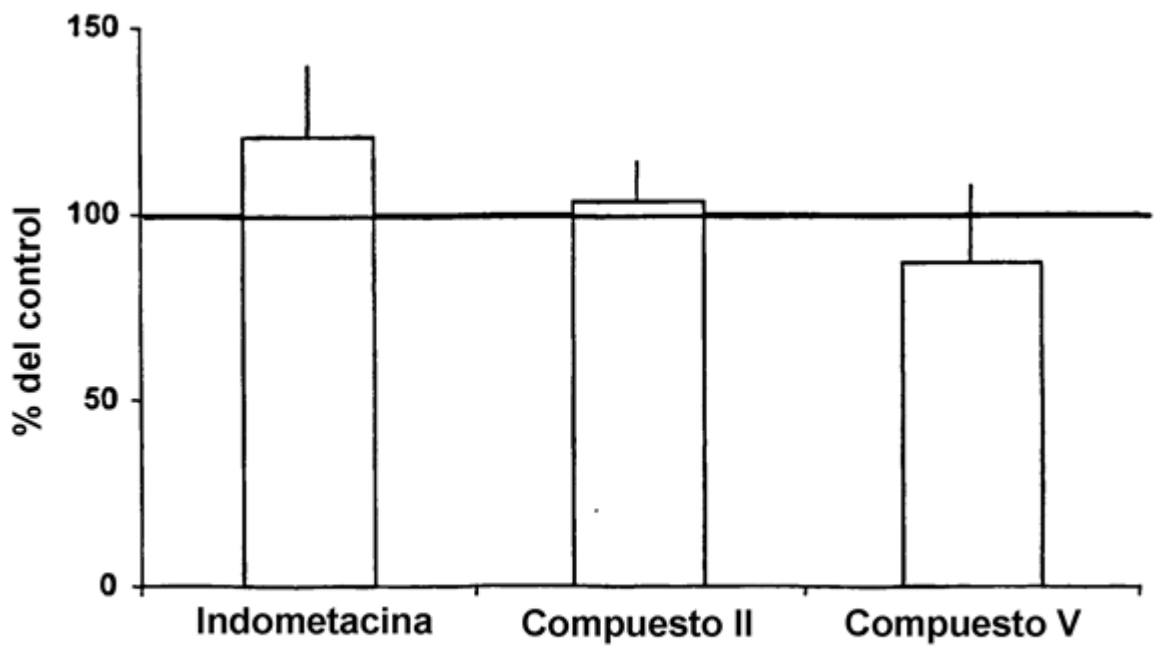


Figura 20D

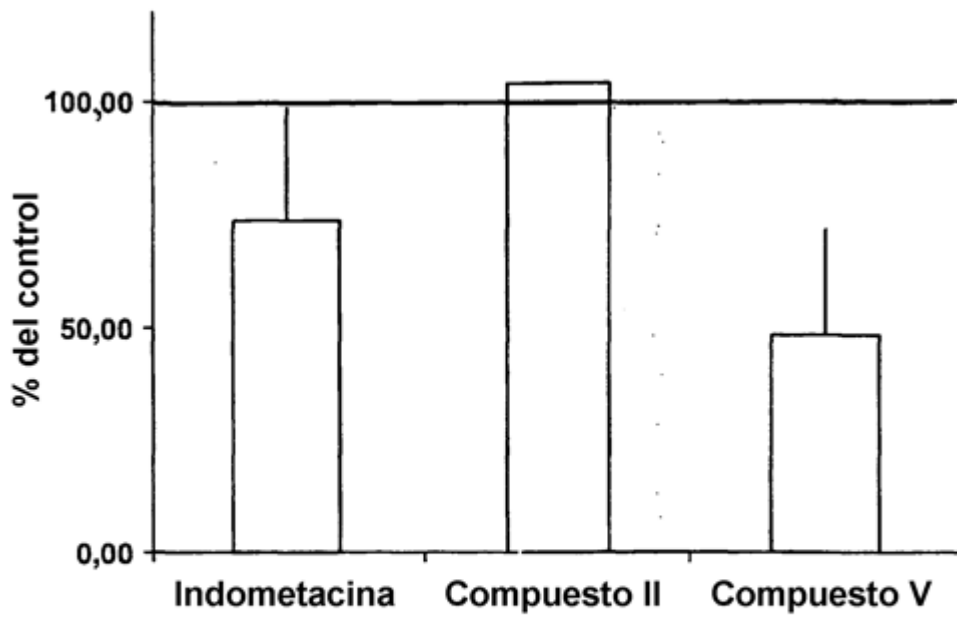


Figura 21A

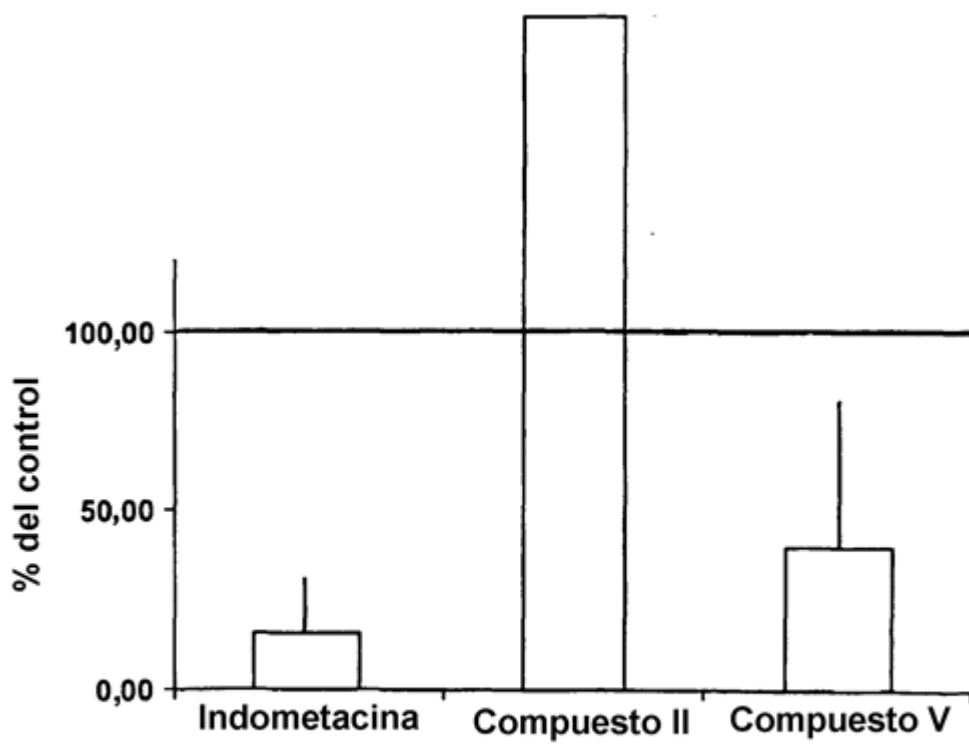


Figura 21B

Puntuación de daño macroscópico

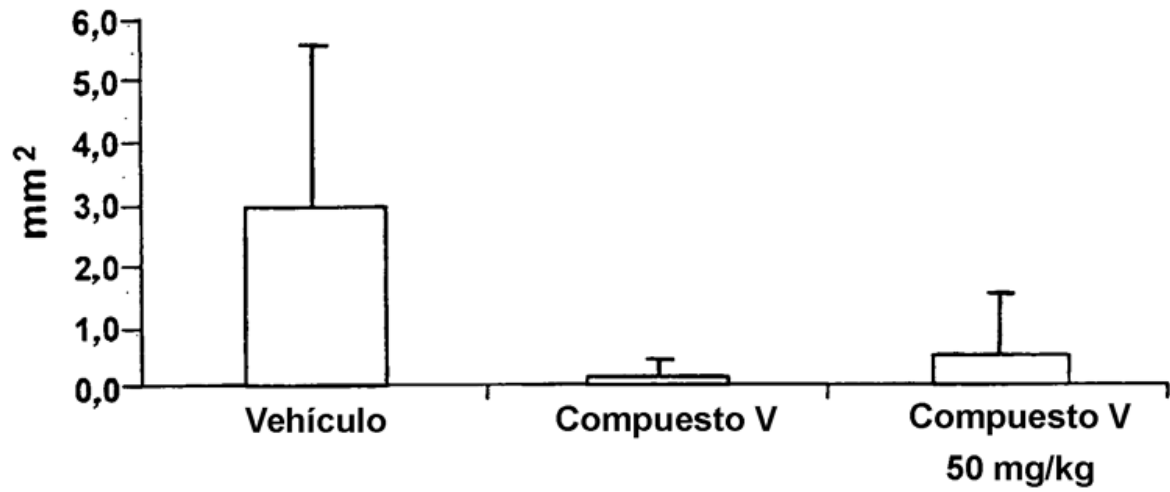


Figura 22

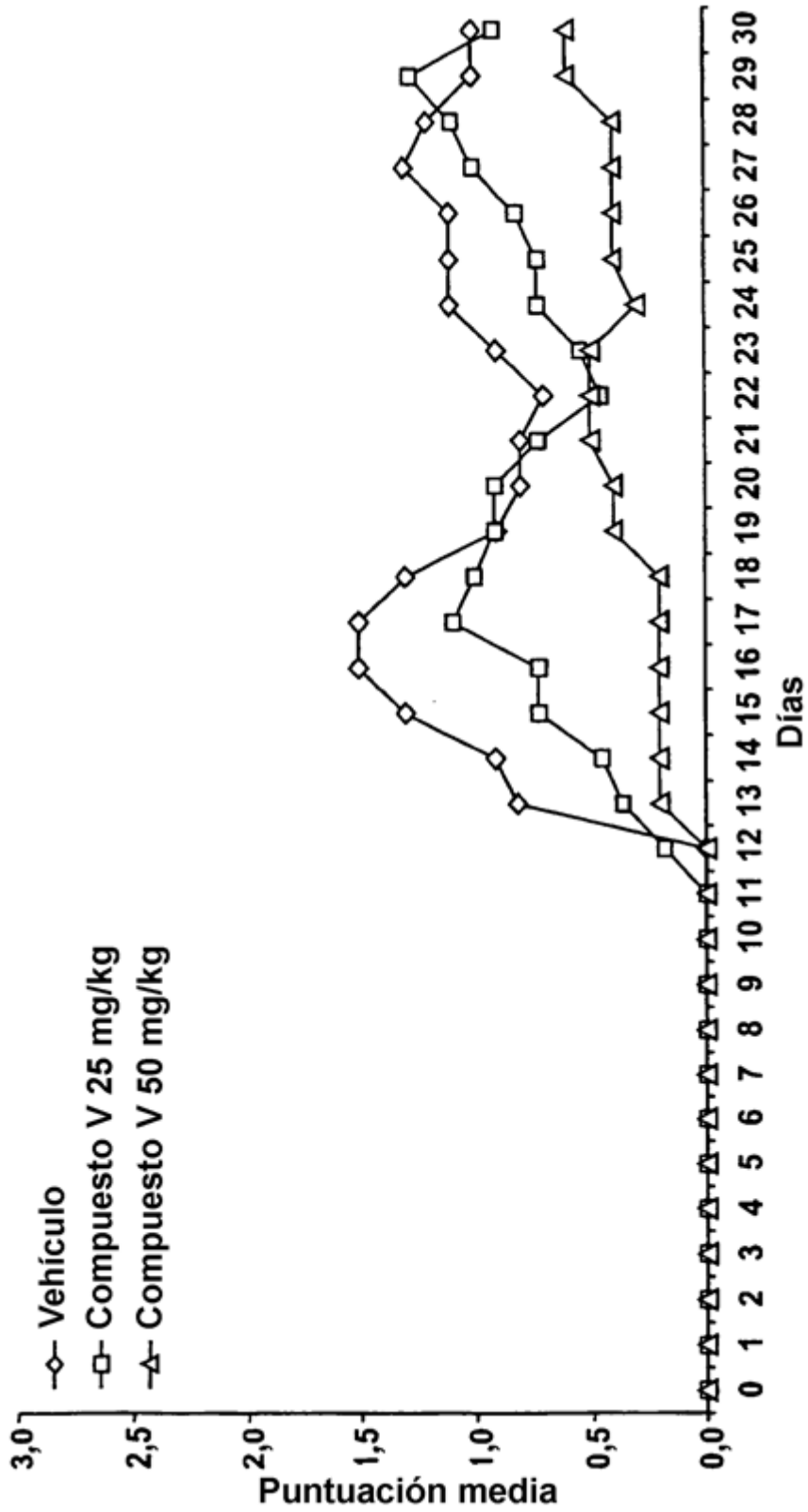


Figura 23