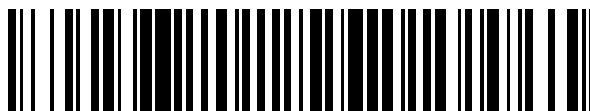


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 501 169**

51 Int. Cl.:

C07D 251/70 (2006.01)

C07D 403/14 (2006.01)

C07D 403/12 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/53 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2004 E 04818743 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 1687297**

54 Título: **Dímeros de triazina para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias**

30 Prioridad:

24.11.2003 US 524021 P

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

01.10.2014

73 Titular/es:

**PROMETIC BIOSCIENCES INC. (100.0%)
6100 ROYALMOUNT
MONTREAL, QUÉBEC H4P 2R2, CA**

72 Inventor/es:

**PENNEY, CHRISTOPHER;
ZACHARIE, BOULOS;
ABBOTT, SHAUN D.;
BIENVENU, JEAN-FRANÇOIS;
CAMERON, ALAN D.;
DUCEPPE, JEAN-SIMON;
EZZITOUNI, ABDALLAH;
FORTIN, DANIEL;
HOUDE, KARINE;
MOREAU, NANCIE;
WILB, NICOLE;
GROUX, BRIGITTE y
GAGNON, LYNE**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 501 169 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

Dímeros de triazina para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades autoinmunitarias con nuevos compuestos orgánicos. Estos compuestos contienen dos anillos de triazina mono- o disustituida unidos covalentemente por un grupo de unión orgánico, pero no unidos directamente entre sí.

10

Antecedentes de la invención

La enfermedad autoinmunitaria se refiere a cualquiera de un grupo de trastornos o enfermedades en los que la lesión tisular está asociada con una respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células frente a constituyentes corporales o, en un sentido más amplio, una respuesta inmunitaria "frente a uno mismo". La respuesta inmunitaria patológica puede ser sistémica o específica de órgano. Es decir, por ejemplo, la respuesta inmunitaria dirigida frente a uno mismo puede afectar a las articulaciones, la piel, la vaina de mielina que protege neuronas, riñón, hígado, páncreas, tiroides, glándulas suprarrenales y ovarios. De hecho, la lista de enfermedades autoinmunitarias está compuesta por más de ochenta trastornos. Algunas enfermedades autoinmunitarias tales como vitíligo, en la que parches de piel pierden la pigmentación, son meramente molestas. La mayoría de las otras son debilitantes, a menudo progresivas con el tiempo y en última instancia son mortales. El lupus eritematoso sistémico (LES), por ejemplo, es una enfermedad crónica en la que el 10-15% de los pacientes mueren en el plazo de una década desde el diagnóstico. En todas menos algunas de las enfermedades autoinmunitarias, la razón de sexos está sesgada hacia las mujeres. Por ejemplo, en LES la razón de pacientes femeninas con respecto a masculinos es de nueve con respecto a uno. En un caso particular, la enfermedad de Hashimoto en la que el sistema inmunitario ataca a la glándula tiroides, la razón es de cincuenta con respecto a uno.

25

Desde hace mucho tiempo se sabe que la formación de complejos inmunitarios desempeña un papel en la etiología y progresión de la enfermedad autoinmunitaria. Por ejemplo, en Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 16ª edición (1980), Macmillan Publishing Co., en la página 683, se menciona que la inflamación en pacientes con artritis implica probablemente fagocitosis por leucocitos de complejos de antígeno, anticuerpo y complemento-complejos inmunitarios. Pero sólo ahora está reconociéndose que la inflamación provocada por complejos inmunitarios en las articulaciones (artritis), los riñones (glomerulonefritis) y los vasos sanguíneos (vasculitis) es una causa principal de morbilidad en enfermedades autoinmunitarias tal como se indica por P.M. Hogarth *et al.*, Annual Reports in Medicinal Chemistry, 37, 217-224 (2002). El aumento de la formación de complejos inmunitarios se correlaciona con la presencia de anticuerpos dirigidos contra uno mismo o los denominados autoanticuerpos, y la presencia de estos últimos también puede contribuir a la inflamación tisular o bien como parte de un complejo inmunitario o bien no unido a antígeno (anticuerpo libre). En algunas enfermedades autoinmunitarias, la presencia de autoanticuerpo libre contribuye significativamente a la patología de la enfermedad. Esto se ha demostrado claramente por ejemplo en LES (anticuerpos anti-ADN), PTI (respuesta de anticuerpos dirigida a plaquetas) y en un menor grado artritis reumatoide (factor reumatoide reactivo con IgG). La importancia del papel de complejos inmunitarios y autoanticuerpos libres se demuestra además por el hecho de que se ha logrado tratamiento satisfactorio de determinadas enfermedades autoinmunitarias mediante la eliminación de complejos inmunitarios y anticuerpo libre mediante procedimientos de inmunoadsorción específicos. Por ejemplo, el uso de un procedimiento de aféresis en el que se eliminan complejos inmunitarios y anticuerpos mediante el paso de la sangre del paciente a través de una columna de inmutoadsorción (ProSORBA®) se aprobó por la FDA estadounidense en 1987 para PTI y en 1999 para artritis reumatoide. Sin embargo, actualmente, no hay ningún método aprobado para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias que facilite la eliminación de complejos inmunitarios y autoanticuerpos mediante la administración de un fármaco.

50

Otro aspecto de la etiología y progresión de una enfermedad autoinmunitaria es el papel de citocinas proinflamatorias. En circunstancias normales, citocinas proinflamatorias tales como factor de necrosis tumoral α (TNF α) e interleucina-1 (IL-1) desempeñan un papel protector en la respuesta frente a la infección y el estrés celular. Pero se cree que las consecuencias patológicas que resultan de la producción crónica y/o excesiva de TNF α e IL-1 subyacen a la progresión de muchas enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino y psoriasis. Otras citocinas proinflamatorias incluyen interleucina 6, interleucina 8, interleucina 17 y factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos. Sin embargo, parece que TNF α está en la parte superior de la cascada de citocinas proinflamatorias. Es decir, en cuanto al bloqueo de una citocina proinflamatoria, el bloqueo de TNF α proporcionaría el máximo efecto terapéutico. La capacidad de TNF α para regular por disminución otras citocinas proinflamatorias se revisa por M. Feldmann en Perspectives, 2:364-371 (2002). De hecho, el impacto del antagonismo de TNF α como opción de tratamiento para artritis, artritis psoriásica, psoriasis y enfermedad de Crohn se ha ilustrado mediante la aprobación por la FDA estadounidense de Remicade (anticuerpo monoclonal quimérico anti-TNF α), Enbrel (proteína de fusión de receptor p75 de TNF α soluble) y Humira (anticuerpo monoclonal humano anti-TNF α).

65

Tal como puede deducirse de la discusión anterior referente a la etiología y progresión de la enfermedad autoinmunitaria, su patogénesis es compleja y multifactorial. Como tales, hay una multitud de terapias disponibles. Pero la mayoría de las enfermedades autoinmunitarias se controlan mal mediante los tratamientos actuales. Los tratamientos convencionales no son eficaces uniformemente y a menudo están asociados con toxicidad de moderada a intensa. No obstante, la discusión anterior indica que hay una necesidad de compuestos orgánicos sencillos, bien definidos, que puedan ayudar al cuerpo a eliminar complejos inmunitarios o al menos prevenir la deposición de complejos inmunitarios circulantes y/o (simultáneamente) inhibir la actividad de TNF α al mismo tiempo que todavía no son generalmente tóxicos para el paciente. En resumen, hay una necesidad de un tratamiento eficaz aunque no tóxico de enfermedad autoinmunitaria crónica.

El documento WO 01/47897 describe inhibidores a base de monotriazina de TNF-alfa y usos médicos de los mismos.

La presente invención proporciona compuestos que son útiles para el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria crónica. Aunque inicialmente no son potencialmente mortales, la mayoría de las enfermedades autoinmunitarias son estados crónicos que progresan lentamente hasta un estado debilitante. Aunque están disponibles numerosas terapias, los tratamientos convencionales no son eficaces de manera rutinaria. Más problemática es la toxicidad acompañante que a menudo impide el uso a largo plazo necesario con una enfermedad crónica. Los tratamientos actuales para enfermedad autoinmunitaria pueden clasificarse ampliamente en dos grupos: los fármacos que reducen o suprimen la respuesta inmunitaria frente a uno mismo y los fármacos que abordan los síntomas que surgen de la inflamación crónica. En mayor detalle, los tratamientos convencionales para enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, principalmente artritis) son los siguientes:

1. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE): Estos incluyen aspirina, ibuprofeno, naproxeno, etodolaco y ketoprofeno. Los AINE no son fármacos relativamente potentes y por tanto se usan lo más comúnmente como fármacos antiinflamatorios en los estadios tempranos de la enfermedad (por ejemplo, para aliviar el dolor y la hinchazón que acompañan a la artritis). Pero los AINE están asociados con irritación gastrointestinal y toxicidad hepática. Con el fin de abordar la ulceración gastrointestinal asociada con el uso de muchos AINE, se han desarrollado recientemente fármacos AINE más selectivos que inhiben selectivamente (Vioxx, Celebrex) o inhiben preferentemente (Mobicox) ciclooxigenasa 2 (inhibidores de COX-2). Sin embargo, los inhibidores de COX-2 presentan efectos secundarios no deseados que incluyen irritación gastrointestinal, especialmente con el uso a más largo plazo.

2. Corticosteroides: Estos incluyen prednisona y doxametasona. Los corticosteroides son los agentes antiinflamatorios más ampliamente usados para el tratamiento de artritis reumatoide. Pero aumentan significativamente el riesgo de osteoporosis, toxicidad gastrointestinal e infección que surge de la supresión inmunitaria generalizada. Por tanto, los corticosteroides tienden a usarse para el tratamiento de empeoramientos de la enfermedad (por ejemplo, LES) y no como tratamiento crónico.

3. Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME): Estos incluyen fármacos citotóxicos tales como metotrexato, azatioprina y ciclofosfamida, inmunosupresores potentes tales como ciclosporina A (Sandimmune, Neoral) y FK506 (tacrolimus) y una variedad de otros fármacos tales como hidrocloroquina y sales de organo-oro (por ejemplo, aurotioglucosa). Los FAME son fármacos potentes y por tanto pueden presentar una eficacia significativa en la reducción de la inflamación y la ralentización de la velocidad de progresión de la enfermedad. Como tales, los médicos han usado tradicionalmente FAME como terapia de segunda línea tras los AINE. Sin embargo, como fármacos potentes, los FAME tienen toxicidad significativa asociada con su uso. Los fármacos citotóxicos, por ejemplo, interfieren con la replicación del ADN lo que se manifiesta con varios efectos tóxicos. Estos últimos incluyen depresión de la médula ósea y riesgo posterior de infección y neoplasia. El uso de ciclosporina A y FK506 está limitado por efectos secundarios graves que incluyen toxicidades renal y hepática. Los efectos tóxicos asociados con el uso de hidrocloroquina incluyen ceguera, neuromiopatía y molestias gastrointestinales. El efecto secundario más común que surge de la terapia con sales de oro es la dermatitis. Pero la toxicidad del oro también puede provocar nefritis y depresión de la médula ósea.

4. Productos biológicos: Estos incluyen las proteínas recombinantes Remicade, Enbrel y Humira, todas las cuales seleccionan como diana TNF α , Kineret, que selecciona como diana interleucina 1, Amevive, que selecciona como diana células T (glicoproteína de superficie CD2) y Raptiva que también selecciona como diana células T (anticuerpo anti-CD11a). Pero las proteínas recombinantes y, en particular, los anticuerpos recombinantes son difíciles de producir para su uso extendido y tienen efectos secundarios tóxicos asociados con su uso. Las toxicidades incluyen posibles reacciones inmunológicas, especialmente con el uso prolongado que puede requerirse para estados crónicos. Además de la respuesta de HAMA bien conocida (anticuerpo humano anti-ratón) asociada con anticuerpos quiméricos o humanizados, los mecanismos de citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC y mediada por el complemento) pueden conducir a efectos secundarios. Más recientemente, se descubrió que los anticuerpos, independientemente de su fuente o especificidad de antígeno, pueden convertir oxígeno molecular en peróxido de hidrógeno y ozono tal como se describe por P. Wentworth *et al.* Science 293, 1806-1811 (2001) y 298, 2195-2199 (2002). Esto podría conducir a daño celular y tisular que puede exacerbar el tratamiento de un estado autoinmunitario con el uso prolongado. Por ejemplo, se mostró que la producción de peróxido de hidrógeno y ozono

por anticuerpos podría estar vinculada con una respuesta inflamatoria en ratas: una denominada reacción de Arthus. La potente actividad anti-TNF α del anticuerpo Remicade ha conducido a un aumento del riesgo de infecciones oportunistas que incluyen tuberculosis, histoplasmosis, listeriosis y pneumocitosis.

- 5 Por tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar compuestos novedosos para su uso en el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria.

Sumario de la invención

10 La presente descripción se refiere a un método novedoso para el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria crónica, en particular artritis y LES, mediante la administración de un compuesto a un mamífero, preferiblemente un ser humano. Por tanto, según esta invención, se proporcionan determinados dímeros de triazina mono- o disustituida (en los que un monómero de triazina se conecta al otro mediante un grupo de unión orgánico) y sus composiciones farmacéuticas que pueden facilitar el aclaramiento de complejos inmunitarios o limitar su deposición dentro de
15 órganos corporales tales como riñón y/o inhibir las acciones proinflamatorias de TNF α . La invención se define en las reivindicaciones. En una realización preferida de esta invención, estos compuestos de triazina afectarán a ambos aspectos del proceso de inflamación: complejos inmunitarios y TNF α . El beneficio terapéutico que resulta de este mecanismo de acción doble se manifestará en cuanto a un perfil de toxicidad mejorado. Es decir, los compuestos de triazina descritos en esta descripción no son potentes inhibidores de TNF α ni eliminarán completamente complejos
20 inmunitarios. TNF α desempeña un papel en la protección frente a la infección mientras que los complejos inmunitarios desempeñan un papel en el mecanismo de retroalimentación que regula las respuestas inmunitarias (los denominados determinantes idiopáticos). La eficacia terapéutica puede resultar del efecto aditivo de los dos mecanismos de acción. Además, la toxicidad debida al tratamiento crónico y/u otros fármacos usados combinación puede al menos reducirse o evitarse.

25 En otra realización de la presente descripción, los compuestos de triazina sólo afectarán a un aspecto del proceso de inflamación. Es decir, estos compuestos afectarán o bien a complejos inmunitarios o bien a TNF α . En el caso en el que los compuestos de triazina influyen en la eliminación de complejos inmunitarios o previenen su deposición, se espera que tales compuestos sean particularmente útiles para el tratamiento de artritis, lupus eritematoso sistémico (LES), trombocitopenia idiopática (inmunitaria) (PTI), glomerulonefritis y vasculitis. En el caso en el que los
30 compuestos de triazina inhiben TNF α , se espera que tales compuestos sean particularmente útiles para el tratamiento de artritis reumatoide, artritis psoriásica, psoriasis, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, espondilitis anquilosante, síndrome de Sjögren, enfermedad de Still (síndrome de activación de macrófagos), uveítis, esclerodermia, miositis, síndrome de Reiter y síndrome de Wegener. Por supuesto, es posible que algunos compuestos de triazina de esta descripción afecten al proceso de inflamación mediante un mecanismo bioquímico que es adicional a y distinto de un efecto sobre complejos inmunitarios y/o TNF α . Pero
35 independientemente del/de los mecanismo(s) mediante el/los cual(es) los compuestos de triazina afectan a la enfermedad autoinmunitaria seleccionada como diana, un aspecto importante de esta descripción es que dichos compuestos no afectan de manera potente a ningún aspecto del proceso de inflamación de manera que resulte una toxicidad perjudicial.
40

Aspectos adicionales de la invención resultarán evidentes para un experto en la técnica a partir de la siguiente descripción y reivindicaciones, y generalizaciones a las mismas.

45 Breves descripciones de los dibujos

La figura 1 ilustra una curva de dosis-respuesta del compuesto 1 sobre la fagocitosis de complejos inmunitarios por células similares a macrófagos RAW 264.7.

- 50 Las figuras 2-3 ilustran el efecto del compuesto 1 sobre ratones NZBxNZW: mortalidad (figura 2) o proteinuria (figura 3). La figura 3A ilustra ratones con 5 g/l o más y la figura 3B ilustra ratones con mejora de la filtración renal.

La figura 4 ilustra el efecto de los compuestos 1 y 9 sobre la mortalidad de ratones NZBxNZW.

- 55 La figura 5 ilustra el efecto de los compuestos 1 y 20 sobre la mortalidad de ratones MRL/lpr.

La figura 6 ilustra el efecto de los compuestos 1, 5 y 19a-20 sobre la hipersensibilidad de tipo retardado (DTH).

La figura 7 ilustra el efecto de los compuestos 47, 51 y 49 sobre DTH.

- 60 La figura 8 ilustra el efecto de los compuestos 1 y 19a sobre DTH.

La figura 9 ilustra el efecto del compuesto 1 sobre la artritis inducida por colágeno.

- 65 La figura 10 ilustra el efecto de los compuestos 1 y 19a sobre la artritis inducida por adyuvante.

La figura 11 ilustra el efecto de la administración oral e intravenosa de los compuestos 1 y 19a sobre la artritis inducida por adyuvante.

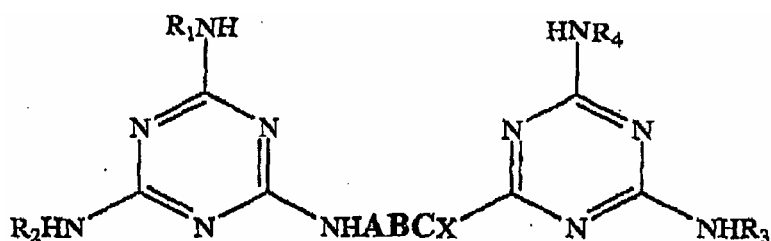
5 La figura 12 ilustra el efecto de la administración oral e intravenosa del compuesto 19a sobre la artritis inducida por adyuvante.

La figura 13 ilustra la electroforesis en gel de poliacril-5-amida desnaturalizante (dodecilsulfato de sodio o SDS) (PAGE) de IgG humana total unida y purificada mediante el compuesto 19b unido a la resina: carril 1, patrones preteñidos (intervalo amplio); carril 2, IgG humana total; carril 3, fracción no retenida; carril 4, fracción de lavado; y carril 5, fracción eluida.

10

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención incluye compuestos para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, de la siguiente fórmula general:

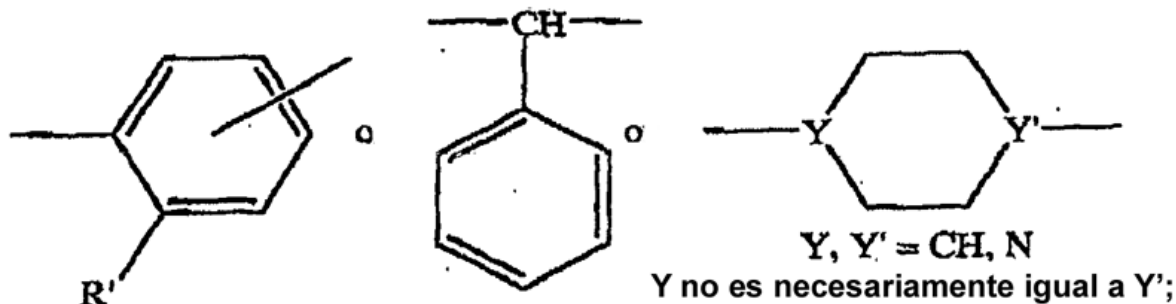


20 en la que A = -(CH2)_n, n = 0, 1, 2, 3 o

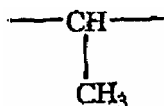


B = 0 o

25



C = -(CH2)_n, n = 0, 1, 2, 3 o



30

X = NH, O, S;

R' = hidrógeno o alquilo C₁₋₄, N-metilaminoalquilo C₁₋₄ o N,N-dimetilaminoalquilo;

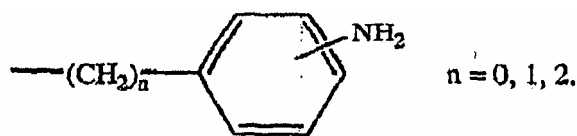
35

A no es necesariamente igual a C;

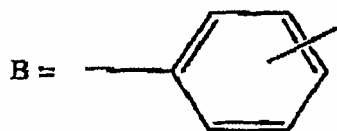
en la que R₁ y R₄ se seleccionan del grupo que consiste en hidroxietilo, hidroxipropilo, hidroxibutilo, amino, aminoetilo, aminopropilo, aminobutilo, fenilo, anilino, hidroxifenilo y aminofenetilo; y

40

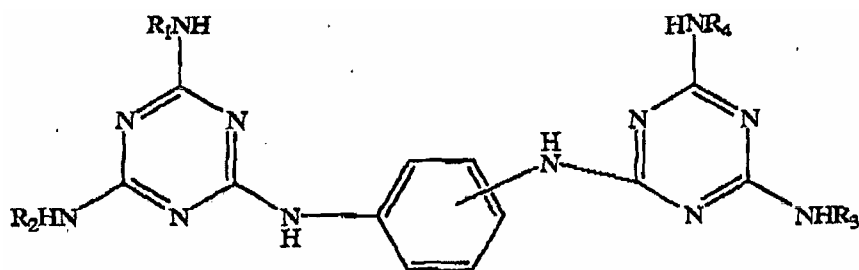
R₂ y R₃ se seleccionan del grupo que consiste en anilino, aminoanilino, fenetilo, hidroxifenetilo, y en la que uno, dos, tres o todos los sustituyentes R₁, R₂, R₃, R₄ son



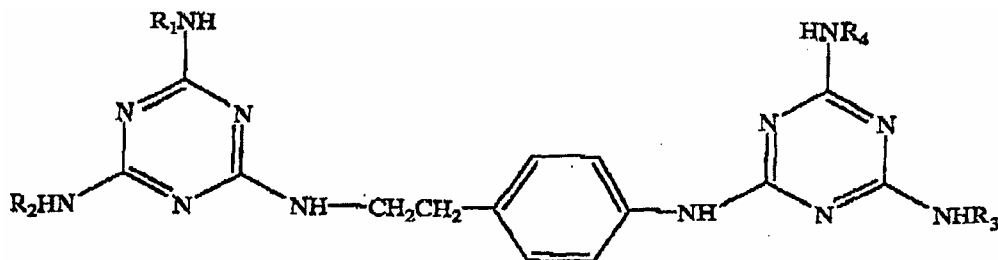
- 5 En un aspecto de la presente invención, se usan dímeros de triazina disustituida en los que cada monómero de triazina está conectado al otro por un grupo de unión orgánico en el que dicho grupo de unión contiene un grupo fenilo 1,3- o 1,4-sustituido. Es decir,



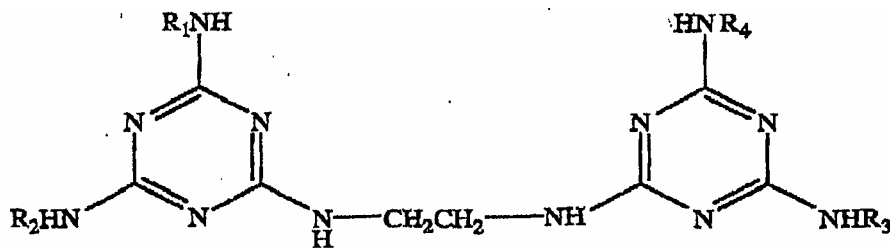
- 10 En tales casos, es posible que $A = C = 0$ y el grupo fenilo se convierte en el grupo de unión que conecta los dos monómeros de triazina. En un caso de este tipo, la fórmula general se convierte en:



- 15 Esto representa un aspecto preferido de esta invención cuando $A = C = 0$ pero se proporciona otra realización preferida cuando $A = \text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---}$, en el que $n = 1$ ó 2 mientras que $C = 0$, o $A = 0$ mientras que $C = \text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---}$ en el que $n = 1$ ó 2 , o $A = C = \text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---}$ en el que $n = 1$ ó 2 . Por tanto, por ejemplo, un aspecto preferido de esta invención es $A = \text{---}(\text{CH}_2)_2\text{---}$ y $C = 0$, o $A = 0$ y $C = \text{---}(\text{CH}_2)_2\text{---}$. En un caso preferido, la fórmula general se convierte en:



- 20 En una realización alternativa de la invención, no hay ningún grupo fenilo presente en el grupo de unión orgánico que conecta los dos anillos de triazina disustituida, o $B = 0$. Es decir, los dímeros de triazina se conectan mediante una cadena de alquilo. Por tanto, por ejemplo, otro aspecto preferido de esta invención es $A = C = \text{---}(\text{CH}_2)_2\text{---}$ y $B = 0$. Por tanto, el grupo de unión orgánico contiene un grupo $\text{---}(\text{CH}_2)_2\text{---}$ o etileno y la fórmula general se convierte en:



- 30 Independientemente del grupo de unión orgánico que conecta los dos anillos de triazina, una realización preferida de esta invención es que R_1 , R_2 , R_3 y R_4 se definan tal como sigue:

R_1 = hidroxietilo, hidroxipropilo, hidroxibutilo

= aminoetilo, aminopropilo, aminobutilo

= fenilo, anilino, hidroxifenilo

5 R₂ = fenetilo, hidroxifenetilo, aminofenetilo

= R₃

R₄ = fenilo, anilino, hidroxifenilo

10

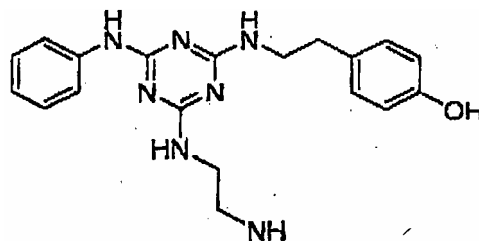
Compuestos según la presente invención son los siguientes.

Compuestos del grupo 1 en los que A = -CH₂-, B = 0, C = -CH₂- (grupo de unión de etileno):

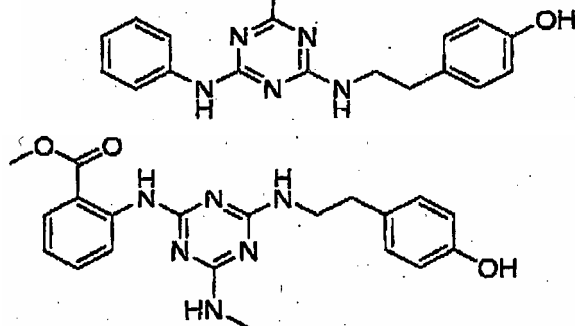
N.º de compuesto

Estructura

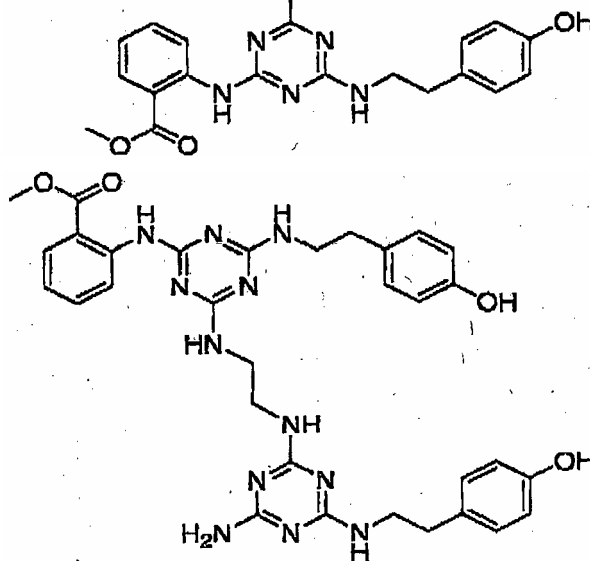
1



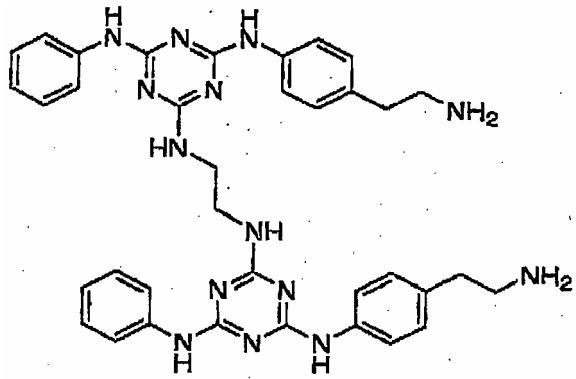
2



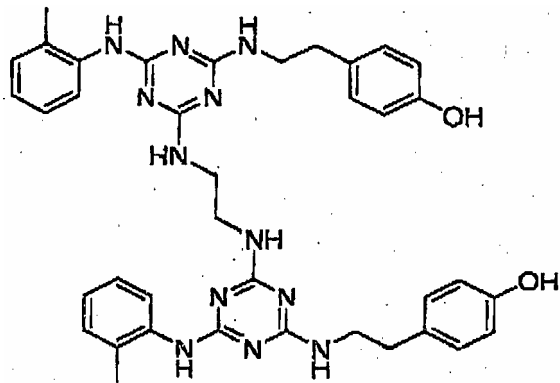
3



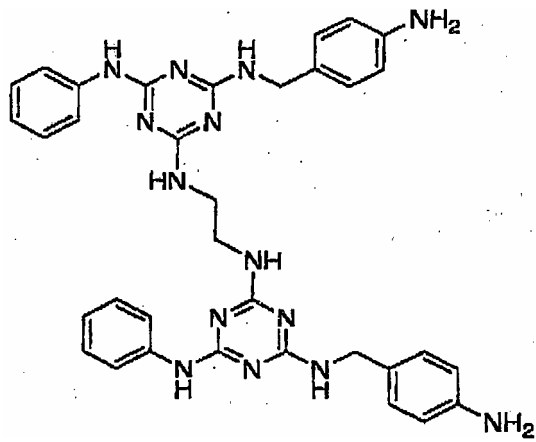
4



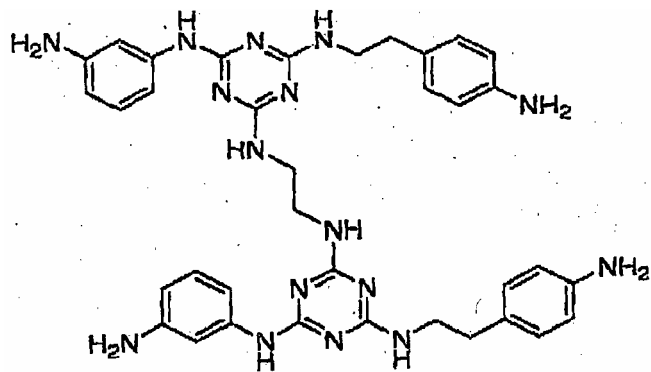
5



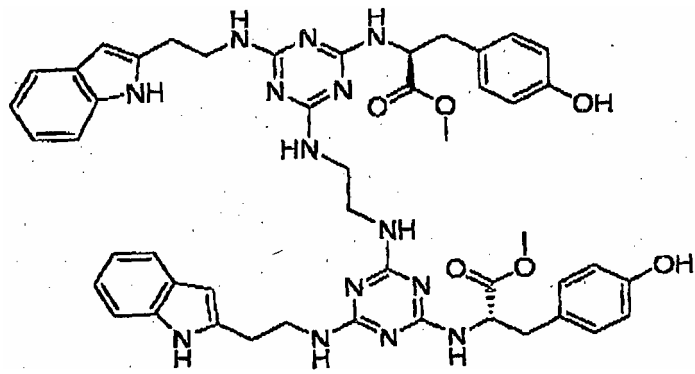
6



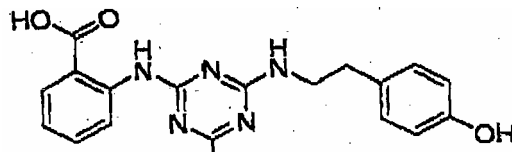
7



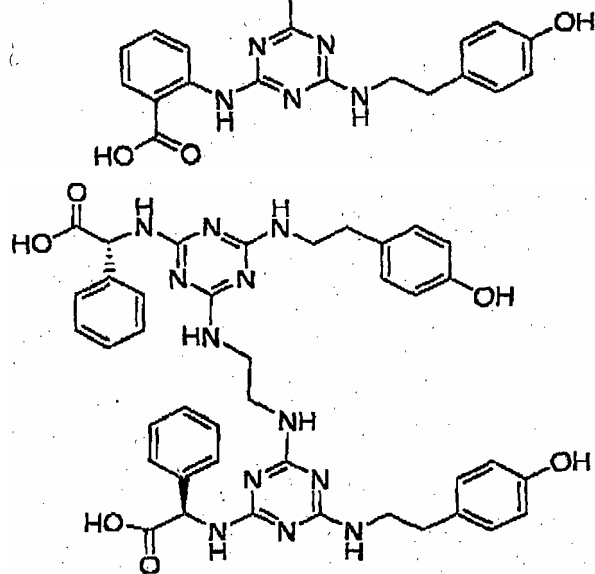
8



9

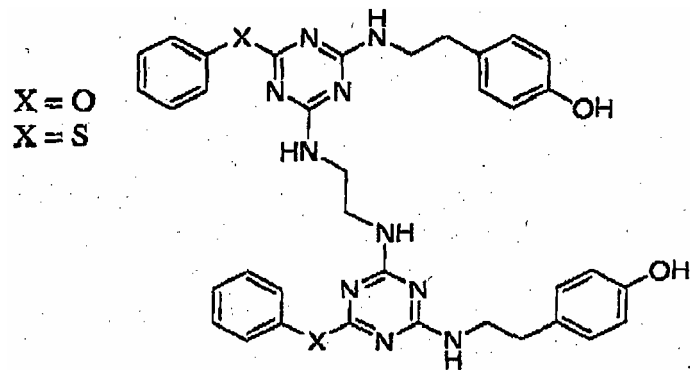


10

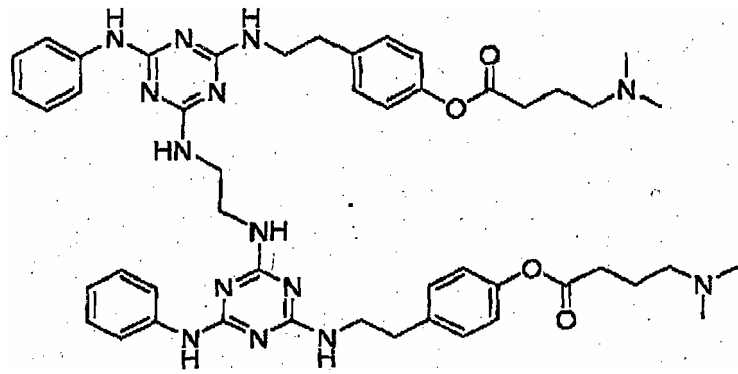


11a

11b



12



Compuestos del grupo 2 compuestos en los que A = $-(CH_2)_2-$, B =

5



C = 0 o A = 0, B =



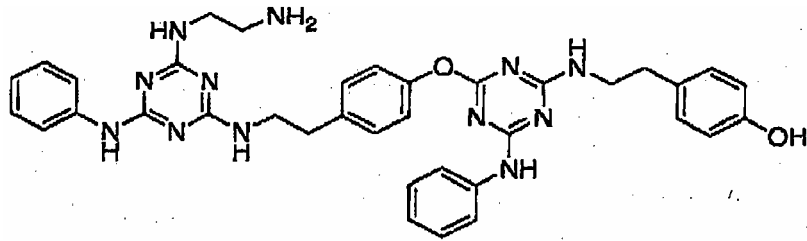
10

C = $-(CH_2)_2-$:

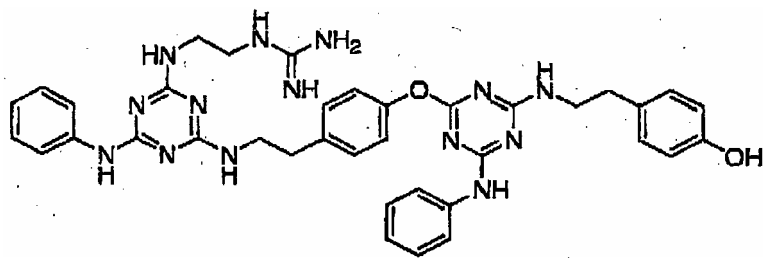
N.º de compuesto

Estructura

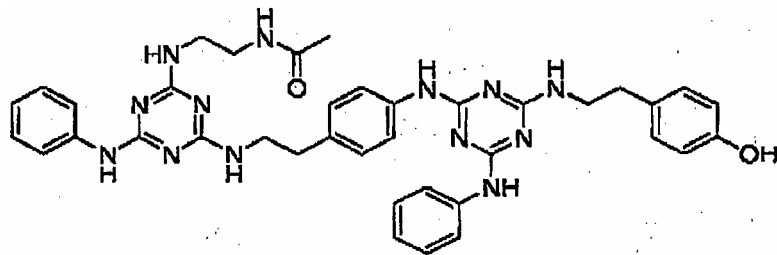
13



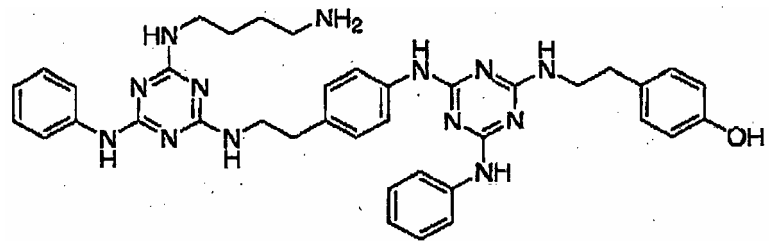
14



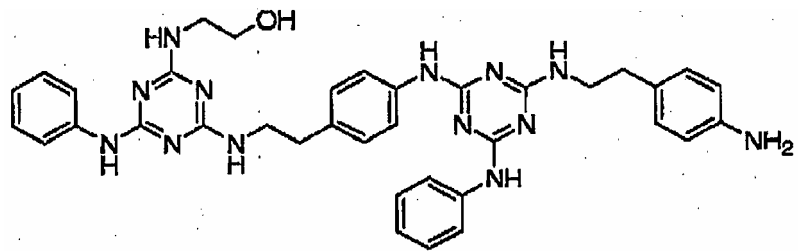
15



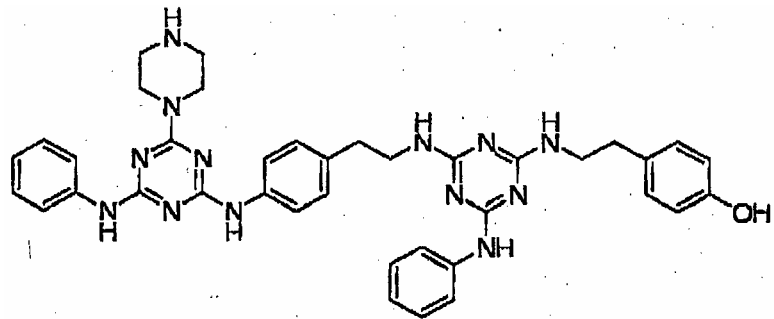
16



17



18

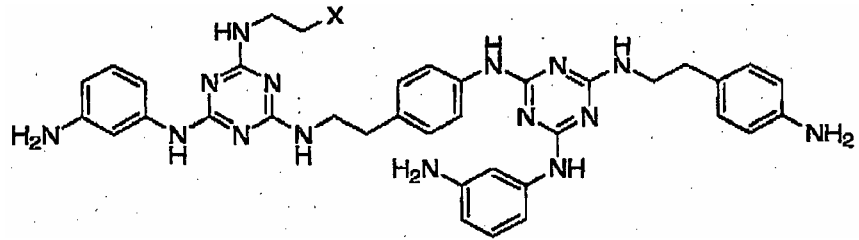


19a

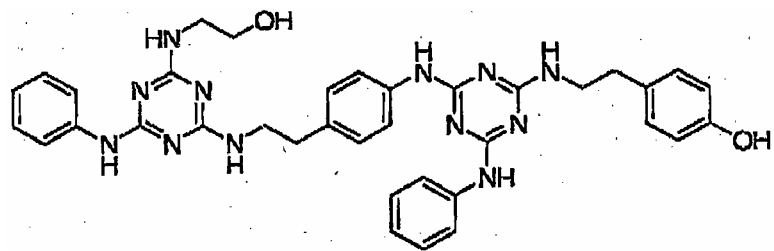
X = OH

19b

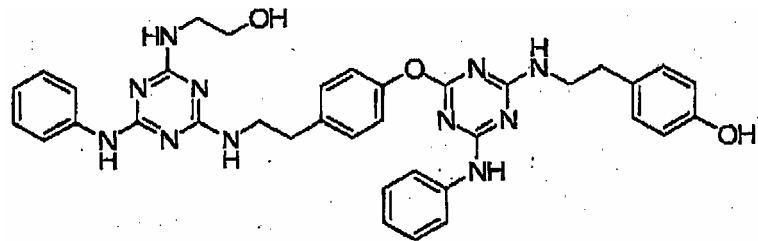
X = NH₂

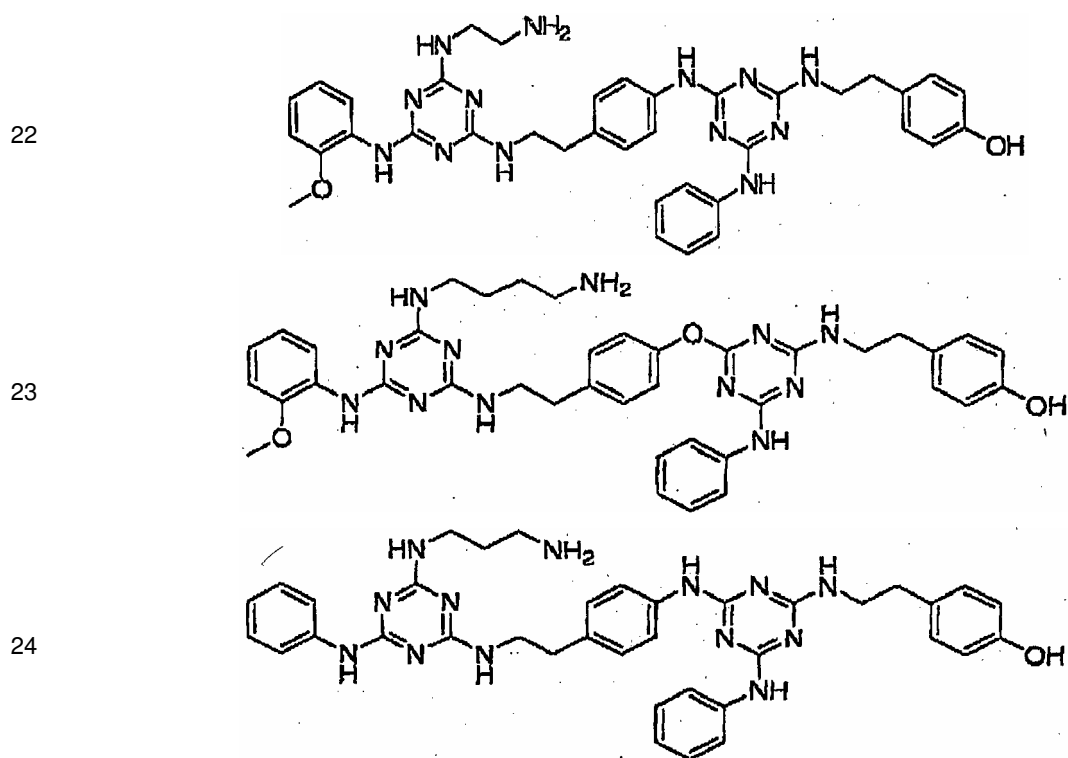


20



21

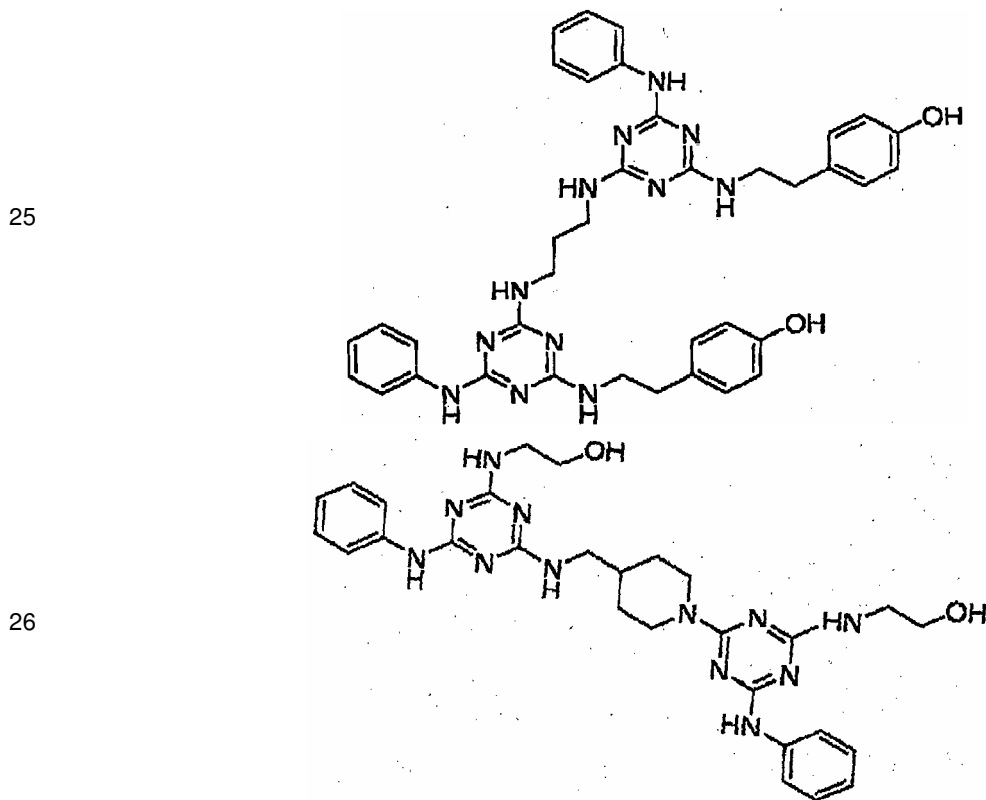




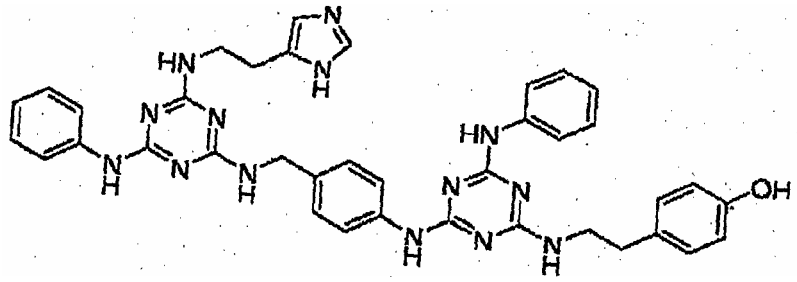
Sin embargo, esta invención no se limita a los dos grupos anteriores de compuestos, y otros compuestos particularmente preferidos incluyen los siguientes:

N.º de compuesto

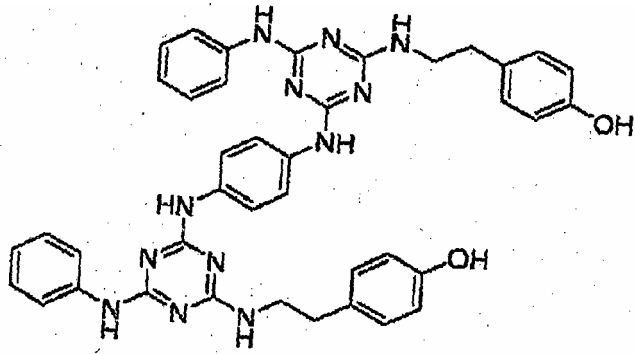
Estructura



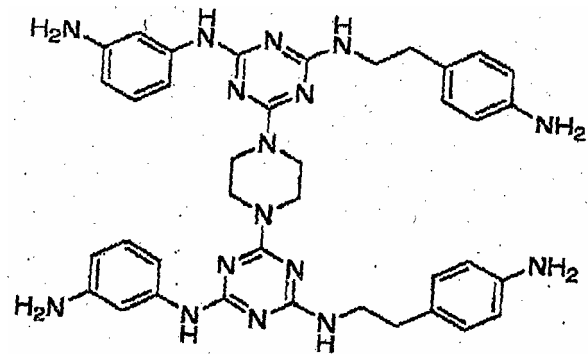
27



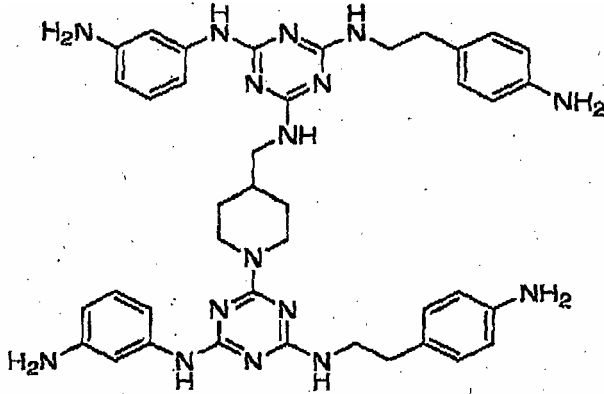
28



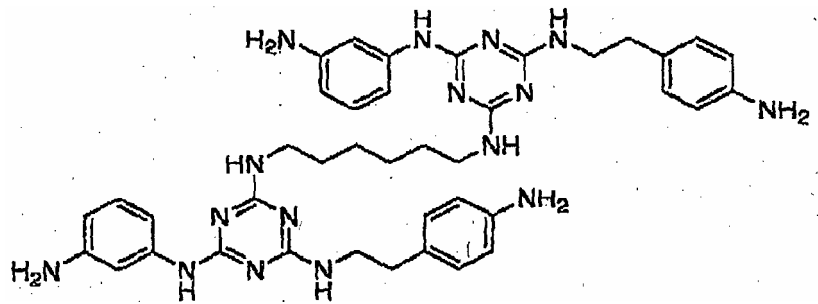
29



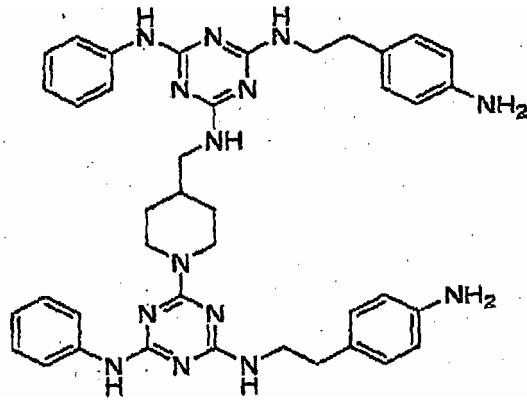
30



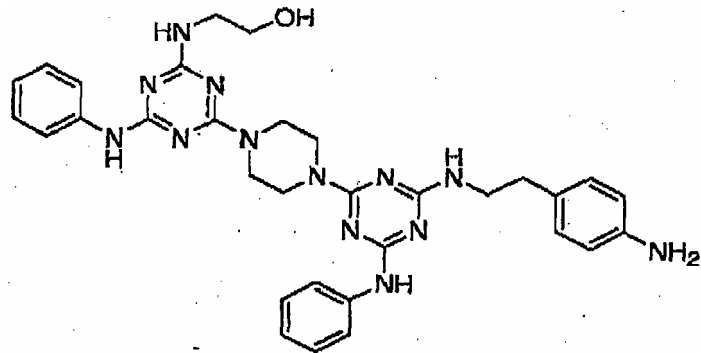
31



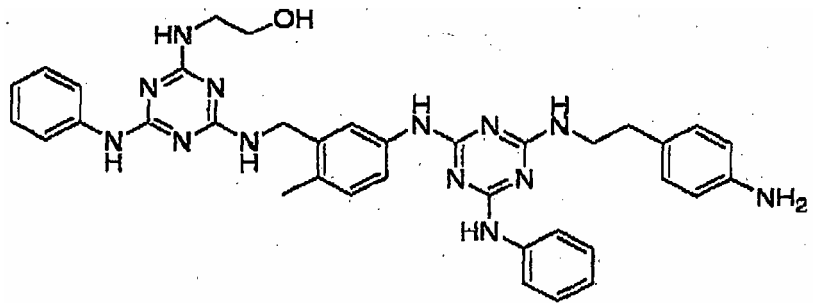
32



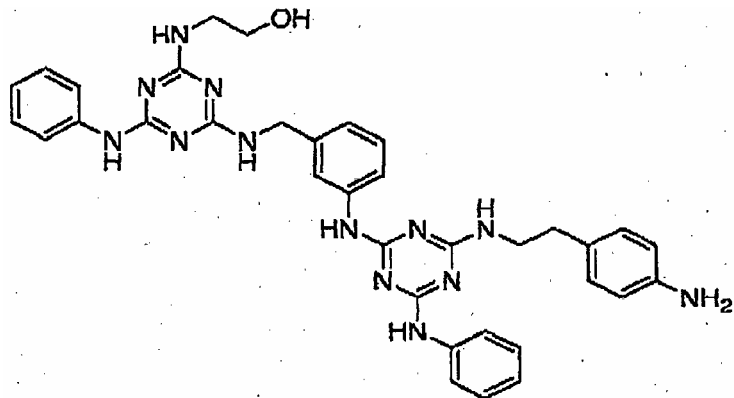
33

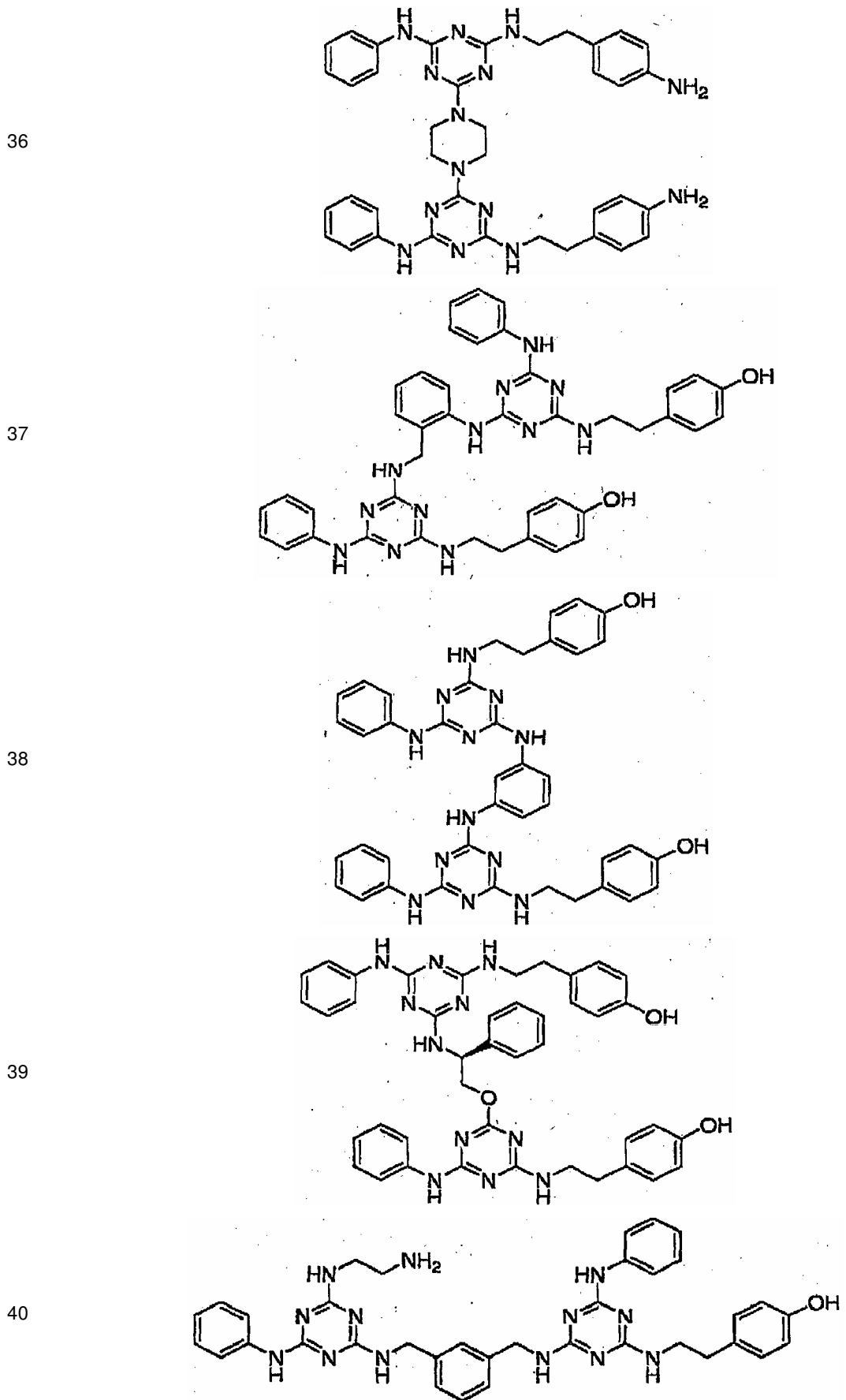


34

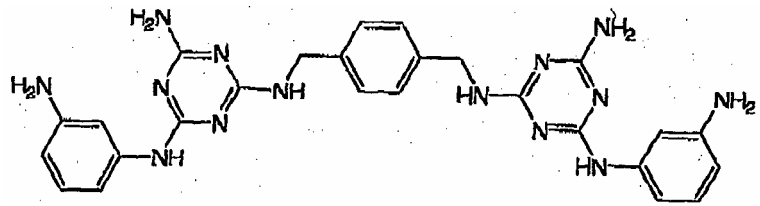


35

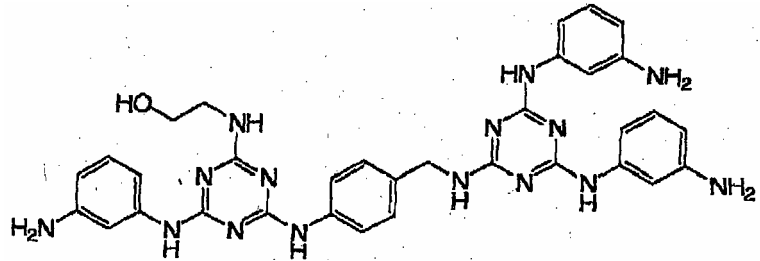




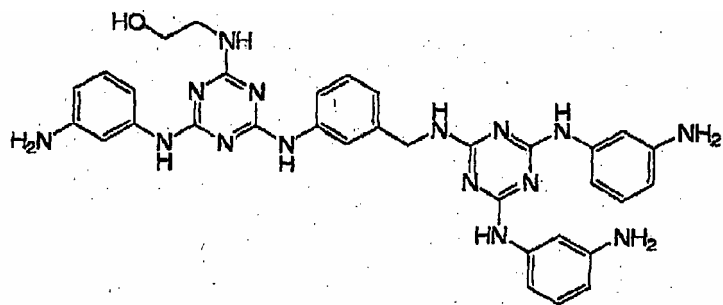
41



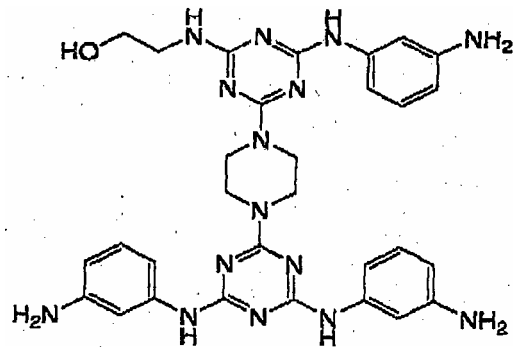
42



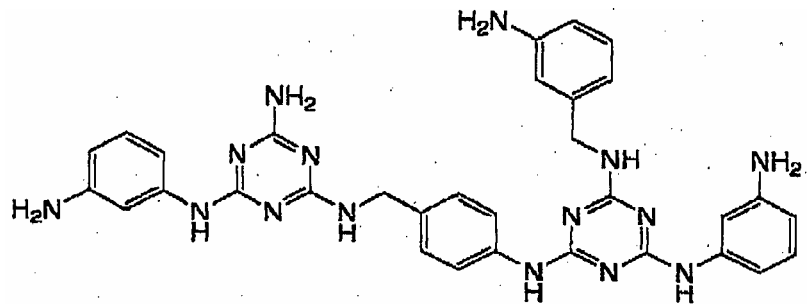
43



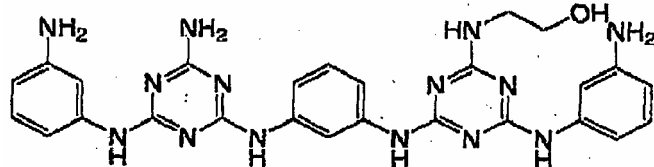
44

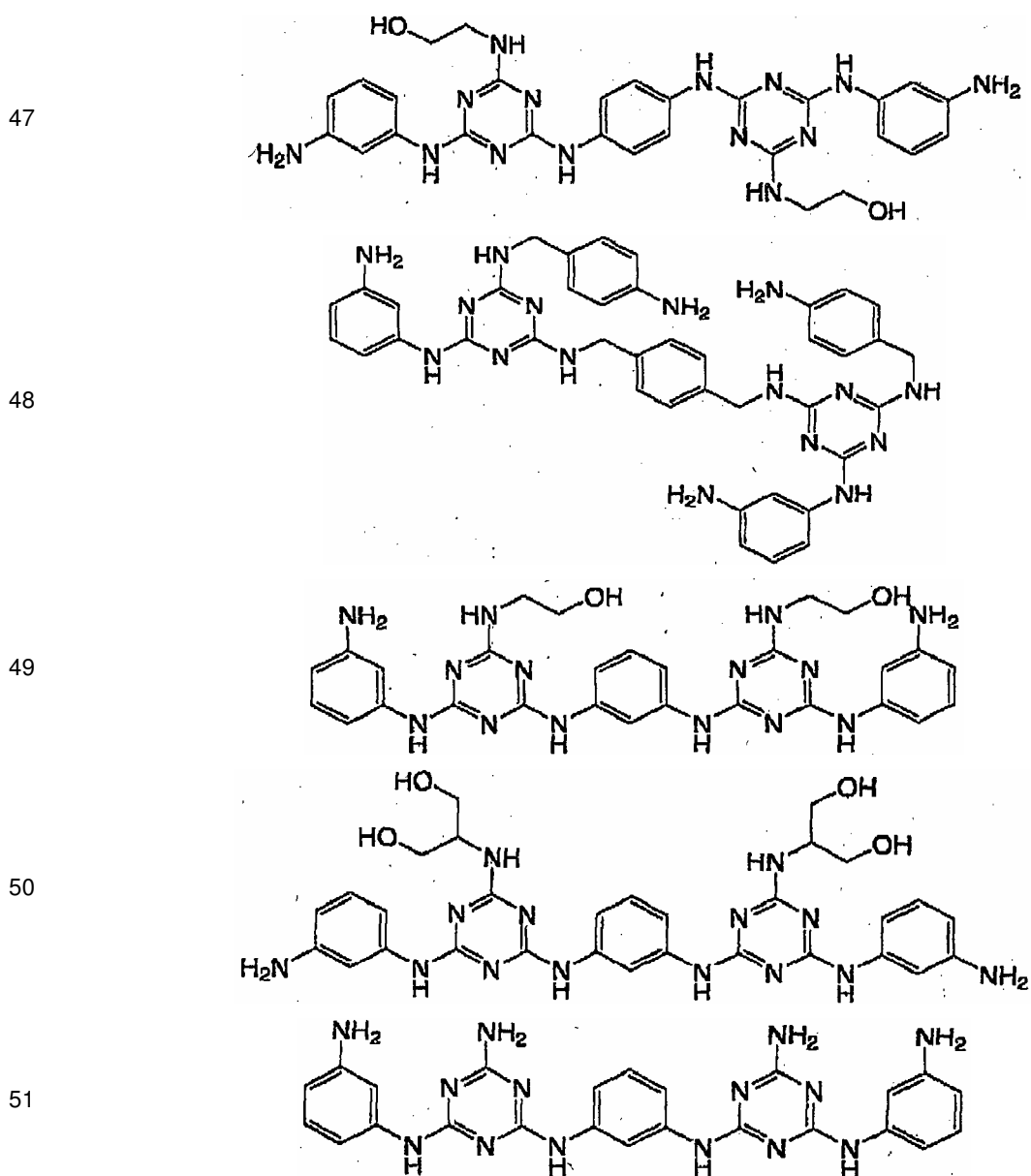


45



46





- Los compuestos de la presente descripción pueden facilitar el aclaramiento de complejos inmunitarios mediante fagocitosis o pueden limitar la deposición de complejos dentro de órganos corporales y tejidos mediante su capacidad para antagonizar la unión de complejos inmunitarios a superficies de órganos y tejidos. El mecanismo mediante el cual complejos inmunitarios se unen a diversas superficies puede implicar la unión a receptores de Fc de la superficie celular. Los receptores de Fc son glicoproteínas de leucocitos inflamatorios que se unen a la parte de Fc (cola) de inmunoglobulinas. Los receptores de Fc también están presentes en numerosos tejidos y proporcionan un sitio para la unión y posterior deposición de complejos inmunitarios sobre superficies de tejidos. Por ejemplo, se cree que la deposición sobre tejido renal de complejos que contienen autoanticuerpos mediante la unión a receptores de Fc desencadena una respuesta inflamatoria típica de LES que puede conducir a glomerulonefritis. Los receptores de Fc bien caracterizados incluyen: FcγRI, FcγRII y FcγRIII (receptores de IgG); FcεRI (el receptor de IgE) y FcαRI (el receptor de IgA). De manera interesante, la proteína A de estafilococos es una proteína bacteriana de la superficie celular que puede unirse a la parte de Fc (cola) de la mayoría de los anticuerpos. Por ejemplo, la proteína A se unirá a las inmunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgG4 humanas. De manera más importante, se ha sabido durante muchos años que la proteína A puede inhibir la unión de complejos inmunitarios que contienen anticuerpo de IgG a receptores de Fc. Por ejemplo, A. Sulica *et al.* Immunology 38, 173-179 (1979) notificaron que la proteína A inhibe la unión de complejos inmunitarios que contienen IgG a receptores de Fc pero la proteína A potencia la unión de IgG a linfocitos y macrófagos.
- Más recientemente, con la disponibilidad de ratones deficientes en receptor de Fc (cadena γ), se ha hecho posible establecer el papel primario de los receptores de Fc de IgG (FcγR) en la mediación de las respuestas efectoras

observadas en enfermedades autoinmunitarias tales como LES y artritis reumatoide, tal como se indica por M. Marino *et al.* Nature Biotechnology 18, 735-739 (2000). Más específicamente, estos autores mencionaron que agentes que pueden interferir con la unión de complejos inmunitarios a Fc γ R deben mejorar LES. Proporcionaron apoyo experimental para esta afirmación tratando una cepa especial de ratones (MRL/lpr) que desarrolla un síndrome que es similar a LES humano con un péptido que se une a la parte de Fc de IgG. La tasa de supervivencia de los animales tratados (80%) fue significativamente mayor que la de los animales no tratados (10%). En un artículo de revisión reciente por P.M. Hogarth Current Opinion in Immunology 14, 798-802 (2002), se menciona que Fc γ R actúa de manera temprana en el proceso de inflamación y el acoplamiento por complejos inmunitarios es una señal potente para la liberación de citocinas proinflamatorias tales como TNF α . En aquellos casos en los que los compuestos de la presente descripción afectan a algún aspecto del aclaramiento o la deposición de complejos inmunitarios, pueden hacerlo mediante su capacidad para imitar a la proteína A. Es decir, tales compuestos pueden unirse a la parte de Fc de IgG humana tal como se determina mediante su capacidad para inhibir la unión de proteína A a IgG humana, tal como se determina *in vitro* mediante ELISA competitivo. Mediante unión a la parte de Fc de IgG humana de un modo similar a la proteína A, tales compuestos que imitan a la proteína A pueden alterar la unión de complejos inmunitarios que contienen IgG a Fc γ R. Posteriormente, esto debe prevenir la deposición de complejos inmunitarios y de ese modo facilitar su aclaramiento así como disminuir la liberación de citocinas proinflamatorias.

Adicional o alternativamente, los compuestos de la presente descripción pueden inhibir la actividad proinflamatoria de TNF α . A diferencia de los anticuerpos monoclonales anti-TNF α recombinantes aprobados actualmente (Remicade, Humira) o receptor de TNF α soluble (Enbrel), los compuestos de la presente invención no inhiben la unión de TNF α al receptor de TNF α p55 (CD120a) o el receptor de TNF α p75 (CD120b). No obstante, los compuestos de la presente descripción pueden inhibir el efecto de TNF α tal como se determina mediante su capacidad para inhibir la apoptosis/citotoxicidad inducida por TNF α en la línea celular murina WEHI 164 (13var). Adicionalmente, los compuestos de la presente descripción pueden inhibir la producción de TNF α , tal como se determina mediante su capacidad para inhibir la producción inducida por LPS de TNF α en la línea celular murina J774A-1.

Se produce TNF α por muchos tipos de células que incluyen fibroblastos y numerosos subconjuntos de células inmunitarias. Los ejemplos de estos últimos incluyen macrófagos, monocitos, células B y T y mastocitos. Es una molécula pleiotrópica producida en respuesta a una variedad de estímulos y que puede ejercer efectos sobre la mayoría de los tipos de células. En circunstancias normales, niveles bajos de TNF α en suero confieren protección frente a patógenos, tumores y daño tisular. Por tanto, en cuanto al uso crónico o continuado de compuestos de la presente descripción como agentes terapéuticos, un aspecto de esta descripción puede ser que estos compuestos no son potentes inhibidores de los efectos o la producción de TNF α , ni inhiben de manera potente la unión de TNF α a su receptor. El potencial de uso a largo plazo de los compuestos de esta descripción se demuestra mediante el tratamiento de ratones NZBW/F1 (otro modelo para LES humano) con compuestos durante aproximadamente un año sin observación de ninguna toxicidad significativa.

De manera similar a los productos biológicos descritos anteriormente, otros inhibidores de TNF α presentan toxicidad que limita su uso a largo plazo o crónico. Por ejemplo, la talidomida (N-ftalimidoglutarimida) es un fármaco antiinflamatorio sintético que inhibe la síntesis de TNF α . Pero los ensayos clínicos para pacientes con artritis reumatoide han sido mayoritariamente insatisfactorios debido a una toxicidad inaceptable. Los efectos secundarios intensos incluían somnolencia, neuropatía periférica y exantema intenso. Muchos fármacos que se usan comúnmente como inmunosupresores tales como ciclosporina A y metotrexato muestran propiedades inhibitorias de TNF α pero tampoco pueden usarse de manera crónica debido a su toxicidad.

De hecho, el papel fundamental desempeñado por TNF α en muchas enfermedades autoinmunitarias, tal como se demuestra por el éxito terapéutico de productos biológicos aprobados recientemente junto con la falta de fármacos eficaces aunque no tóxicos disponibles para el tratamiento crónico, ha conducido a la investigación de varios enfoques para la inhibición de TNF α . Los enfoques han incluido la búsqueda de inhibidores de fosfodiesterasa IV, agonistas de adenosina, inhibidores de metaloproteinasas de la matriz (por ejemplo, inhibidores de TACE), inhibidores de la transducción de señales (por ejemplo, MAP cinasa p38) e inhibidores de factores de transcripción (por ejemplo, NF κ B). Claramente entonces, existe una necesidad de compuestos que puedan inhibir eficazmente los efectos de TNF α pero que puedan usarse a largo plazo para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias crónicas.

La presente descripción proporciona compuestos tal como se definen mediante la fórmula general anterior que son útiles para el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria crónica. Estos compuestos pueden facilitar el aclaramiento de complejos inmunitarios mediante fagocitosis o pueden limitar la deposición de complejos inmunitarios dentro de órganos corporales y tejidos mediante su capacidad para antagonizar la unión de complejos inmunitarios a superficies de órganos y tejidos. En este caso, tales compuestos pueden ser particularmente útiles para el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias en las que los complejos inmunitarios desempeñan un papel importante en la patología de la enfermedad: por ejemplo, artritis, LES, PTI, glomerulonefritis y vasculitis.

Alternativamente, los compuestos de esta descripción pueden inhibir las acciones proinflamatorias de $TNF\alpha$. En este caso, tales compuestos pueden ser particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias en la que la inhibición de la actividad biológica de $TNF\alpha$ es importante para la patología de la enfermedad: por ejemplo, artritis, artritis psoriásica, psoriasis, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, espondilitis anquilosante, síndrome de Sjögren, enfermedad de Still (síndrome de activación de macrófagos), uveítis, esclerodermia, miositis, síndrome de Reiter y síndrome de Wegener. En una realización preferida de esta descripción, estos compuestos pueden imitar la actividad de la proteína A bacteriana facilitando de ese modo el aclaramiento de complejos inmunitarios e inhibir la actividad biológica y el efecto posterior de $TNF\alpha$. En cualquier caso, no se pretende que el alcance de la presente descripción se limite por el mecanismo mediante el cual se produce una mejora en cualquier estado inflamatorio indicativo de una enfermedad autoinmunitaria. De hecho, puede producirse una mejora en un estado autoinmunitario mediante el uso de compuestos de esta descripción mediante un mecanismo desconocido o mal definido, pero determinándose dicha mejora por la actividad *in vivo* presentada en un modelo animal apropiado. Por tanto, el/los mecanismo(s) mediante el/los cual(es) se produce la eficacia de los compuestos no es/son un aspecto importante ni limitativo de esta invención. Sin embargo, es importante el hecho de que los compuestos de esta descripción presentan toxicidad limitada de manera que pueden administrarse por consiguiente para el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria crónica.

Los compuestos de la presente descripción incluyen todos los derivados farmacéuticamente aceptables, tales como sales y formas de profármacos de los mismos, y análogos así como cualquier isómero geométrico o enantiómero. Pueden prepararse formulaciones del compuesto activo para proporcionar una composición farmacéutica en una forma adecuada para administración enteral, mucosa (incluyendo sublingual, pulmonar y rectal), parenteral (incluyendo intramuscular, intradérmica, subcutánea e intravenosa) o tópica (incluyendo pomadas, cremas o lociones). En particular, los compuestos de la presente descripción pueden solubilizarse en un disolvente de alcohol o poliol (por ejemplo, solutol HS 15 (hidroxiestearato de polietilenglicol 660 de BASF), glicerol, etanol, etc.) o cualquier otro disolvente biocompatible tal como dimetilsulfóxido (DMSO) o cremophor EL (también de BASF). La formulación, cuando sea apropiado, puede presentarse convenientemente 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 para proporcionar la liberación sostenida del principio farmacéutico activo. Las formulaciones de liberación sostenida bien conocidas en la técnica incluyen el uso de inyección en bolo, infusión continua, polímeros biocompatibles o liposomas.

Pueden realizarse elecciones adecuadas en cuanto a las cantidades y los momentos de dosis, formulación y vías de administración 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 elecciones tales que implican la manipulación de rutina de condiciones para lograr un efecto deseado: por ejemplo, reducción o mejora de otra forma de la lesión tisular asociada con una respuesta inmunitaria frente a constituyentes corporales (órganos y tejidos como glándula suprarrenal, ojo, articulación, riñón, hígado, pulmón, páncreas, sistema nervioso, piel, tiroides, etc.); restauración del estado inmunológico o formalización de un trastorno/estado patológico del mamífero (título de anticuerpos, subconjuntos de células inmunitarias, señalización por citocinas o quimiocinas, complejos inmunitarios anticuerpo-antígeno, etc.); eliminación de anticuerpos libres y/o complejos inmunitarios anticuerpo-antígeno de la circulación; indicios de laboratorio de enfermedad autoinmunitaria (concentración o cantidad absoluta de mediadores de inflamación solubles, presencia de autoanticuerpos, proliferación celular, etc.); y combinaciones de los mismos. En particular, pueden evitarse efectos perjudiciales del tratamiento anti- $TNF\alpha$ convencional.

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 calendario de administración; y similares. También se entenderá que el nivel de dosis específico que va a lograrse para cualquier paciente particular puede depender de una variedad de factores, incluyendo la edad, la salud, el historial médico, el peso, la combinación con uno o más otros fármacos y la intensidad de la enfermedad.

El término "tratamiento" se refiere, entre otros, a reducir o aliviar uno o más síntomas de una enfermedad autoinmunitaria en un mamífero (por ejemplo, ser humano) afectado por una enfermedad o que corre el riesgo de desarrollar una enfermedad. Para un paciente dado, una mejora en un síntoma, su empeoramiento, regresión o progresión puede determinarse mediante una medida objetiva o subjetiva. El tratamiento también puede implicar la combinación con otros modos de tratamiento y agentes existentes (por ejemplo, fármacos antiinflamatorios, agentes que se unen a $TNF\alpha$ como anticuerpo o receptor soluble, AINE, corticosteroides, FAME). Por tanto, puede ponerse en práctica un tratamiento de combinación. En tales realizaciones, se prefiere que la toxicidad del tratamiento crónico o el agente adicional al menos se reduzca o se evite reduciendo la cantidad o concentración del agente adicional usado en comparación con el tratamiento sin un compuesto de la presente descripción.

Los expertos en la técnica apreciarán que la referencia en el presente documento a tratamiento se extiende a la profilaxis así como a la terapia de enfermedad autoinmunitaria crónica o establecida. Se apreciará además que la

cantidad de un compuesto de la descripción requerida para el tratamiento variará no sólo con el compuesto particular usado para el tratamiento sino también con la vía de administración, la naturaleza del estado autoinmunitario que está tratándose y la edad y la salud general del paciente. La dosis que va a administrarse estará en última instancia a la discreción del médico. Sin embargo, en general, la dosis estará en el intervalo de desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal al día. Preferiblemente, las dosis oscilarán entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día. Más preferiblemente, el intervalo será de entre 2 mg/kg y 50 mg/kg de peso corporal al día.

Por último, y cuando sea apropiado, los compuestos de la presente descripción pueden usarse en combinación con otros tratamientos para enfermedad autoinmunitaria bien conocidos en la técnica. Otros tratamientos de la técnica anterior incluyen los descritos anteriormente tal como se representan mediante fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (por ejemplo, ibuprofeno, aspirina, naproxeno, etodolaco y ketoprofeno); corticosteroides (por ejemplo, hidrocortisona, pregnisona y dexametasona); fármacos antiartríticos modificadores de la enfermedad (FAME) (por ejemplo, fármacos citotóxicos como metotrexato o azatioprina, inmunosupresores como ciclosporina o FK506, hidrocloroquina, sales de organo-oro) y productos biológicos. Los componentes individuales de tales combinaciones pueden administrarse o bien secuencialmente o bien simultáneamente en formulaciones farmacéuticas separadas o combinadas. Alternativamente, pueden crearse nuevas formulaciones farmacéuticas para adaptar la combinación de compuestos de esta descripción a tratamientos convencionales para la enfermedad autoinmunitaria.

También pueden usarse compuestos de la presente descripción como agentes de afinidad para unirse a un anticuerpo (por ejemplo, isotipos humanos como IgM, IgD, IgA1, IgA2, IgE, IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4) *in vitro* o *ex vivo*. Tales agentes de afinidad pueden unirse específicamente a anticuerpo libre (es decir, no unido a antígeno) y/o complejo inmunitario anticuerpo-antígeno. Pueden aislarse complejos de afinidad grandes mediante precipitación selectiva o centrifugación diferencial, o identificarse mediante ensayos de floculación. Pero se prefiere inmovilizar uno o más compuestos a un material de soporte insoluble (por ejemplo, agarosa, dextrano, celulosa, poliacrilamida, otros materiales poliméricos, sílice y vidrio) unidos covalentemente de manera preferible directa o indirectamente mediante un grupo de unión. Un compuesto de la presente descripción puede sintetizarse *en situ* sobre el soporte o a través de un grupo de unión orgánico activado. Opcionalmente, el grupo de unión puede ser escindible (por ejemplo, mediante un agente reductor o proteasa específica de sitio) de manera que el compuesto (con o sin anticuerpo unido) puede desprenderse del soporte. Por ejemplo, uno o más compuestos de la presente descripción pueden unirse covalentemente a un soporte en forma de un portaobjetos de vidrio, placa de múltiples pocillos, fibra óptica, chip de proteína o tubo de ensayo para ensayos y análisis; placa de cultivo tisular para incubar células o antígeno; y perlas magnéticas, o membrana porosa o medios cromatográficos para la separación. El anticuerpo u otro material que contiene Fc puede unirse a uno o más compuestos de la presente descripción (es decir, aislamiento), y luego separarse opcionalmente del material no unido (con o sin lavado y múltiples rondas de unión en diferentes condiciones) para purificar el material que contiene Fc. Por ejemplo, la fuerza iónica (por ejemplo, concentración de sal) o el pH pueden cambiar las condiciones de unión y usarse para liberar el material que contiene Fc.

Pueden aislarse anticuerpo libre y/o complejos inmunitarios para diagnóstico de laboratorio clínico. Puede usarse aféresis usando cromatografía en lecho fluidizado o convencional para eliminar anticuerpo libre y/o complejos inmunitarios de la circulación: se incuba un fluido fisiológico (por ejemplo, sangre) con material de soporte insoluble sobre el que se unen uno o más compuestos de la presente descripción, se une al menos algún material de anticuerpo al/a los compuesto(s) y se inmoviliza sobre el soporte, se separa el anticuerpo unido del resto del fluido fisiológico, y se devuelven al menos algunos de los componentes restantes (solubles) del fluido fisiológico al mamífero del que se obtuvieron. Es conveniente envasar el dispositivo que contiene uno o más compuestos de la descripción para la aféresis (por ejemplo, una columna) en condiciones asépticas y reemplazarlo tras cada uso.

Puede aislarse un anticuerpo de una composición y luego separarse opcionalmente hasta cualquier grado deseado de purificación. Se incuba una composición que contiene anticuerpos con material de soporte insoluble sobre el que están unidos uno o más compuestos de la presente descripción, y se une al menos parte del material de anticuerpo al/a los compuesto(s) y se inmoviliza sobre el soporte. El anticuerpo unido puede separarse del resto de la composición y el resto se agota de anticuerpo total o la fracción de anticuerpo que se une (por ejemplo, uno o más isotipos). El anticuerpo aislado sobre el soporte puede liberarse mediante lavado o escisión del grupo de unión. O bien anticuerpo enriquecido o bien los componentes de la composición agotada o bien ambos son el producto deseado. Es conveniente repetir la unión y el lavado en diferentes condiciones de incubación para aumentar la eficacia de aislamiento y separación.

Por tanto, en otra realización de la presente descripción, se proporciona un dispositivo o kit para su uso en los métodos descritos anteriormente. Por ejemplo, puede usarse para unir un anticuerpo, para el aislamiento de un anticuerpo, para eliminar un anticuerpo de una composición o la circulación, para la separación de un anticuerpo y para purificar un anticuerpo de un material de fuente u otra composición. El producto puede envasarse de manera aséptica en condiciones farmacéuticamente aceptables o almacenarse en condiciones estériles para el laboratorio clínico. Se unen uno o más compuestos de la presente descripción a un material de soporte insoluble y se envasan en un dispositivo (por ejemplo, columna) o kit con uno o más componentes opcionales: tampón de almacenamiento,

disoluciones de unión y lavado, y un agente para escindir compuestos del soporte.

Ejemplos:

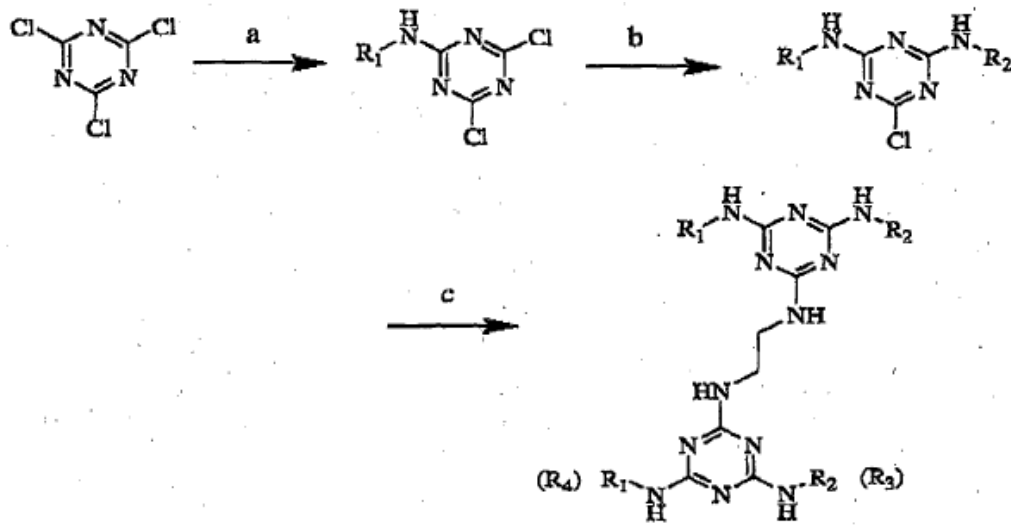
5 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la práctica de esta invención, pero no se pretende que limiten la misma.

10 La secuencia de síntesis general para la preparación de los compuestos útiles en la presente invención se muestra resumidamente en los esquemas I y II. El esquema I ilustra la ruta de síntesis empleada para compuestos descritos en esta descripción excepto por aquellos compuestos que pertenecen al grupo 2. Además, el esquema II demuestra el método de síntesis usado para compuestos descritos en esta descripción excepto por aquellos compuestos que pertenecen al grupo 1.

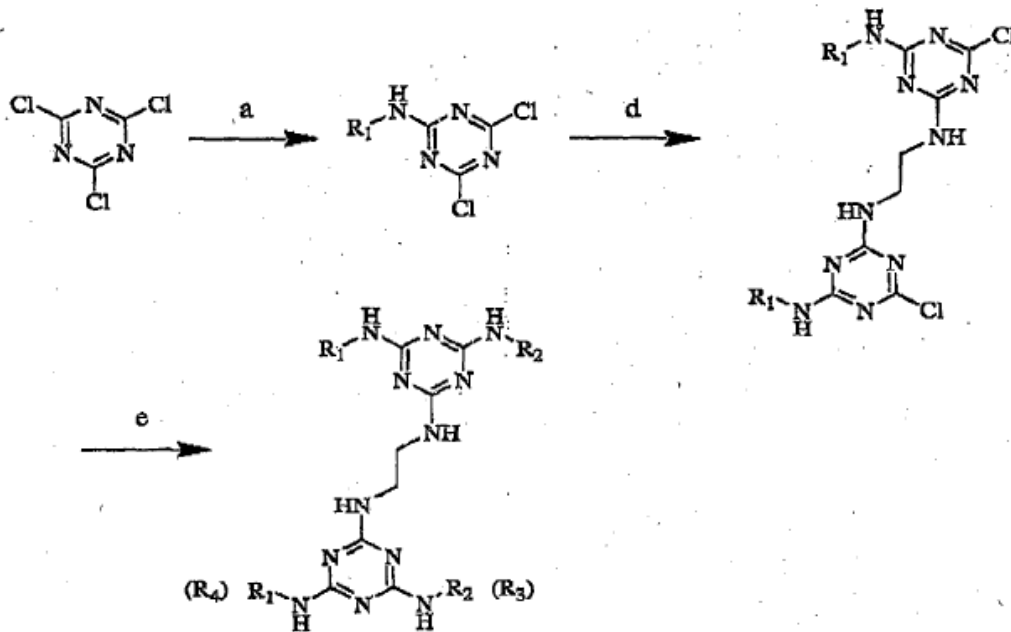
ESQUEMA 1

15

Método A



20 Método B

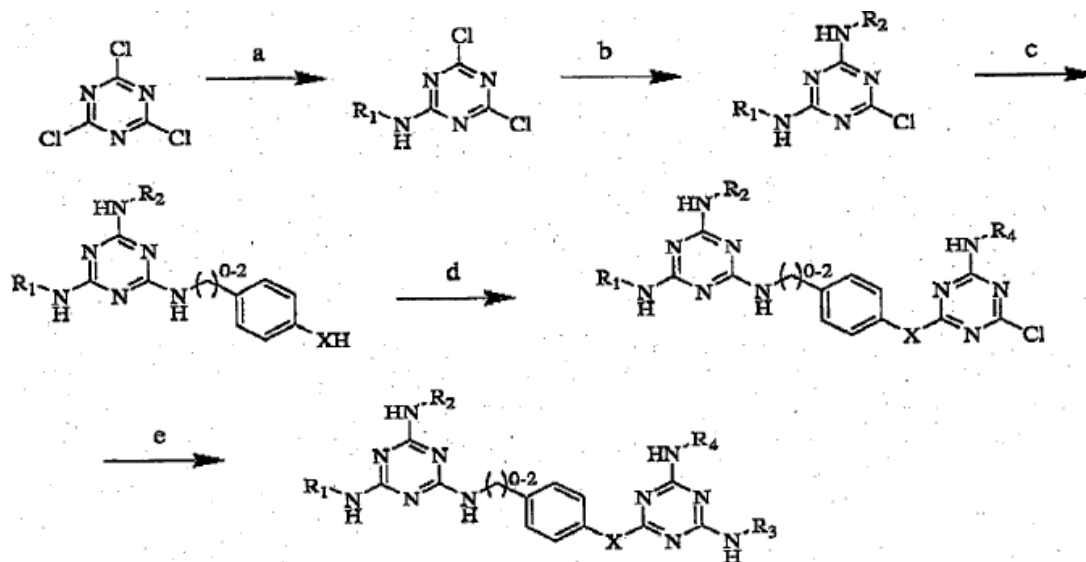


R₁, R₂, R₃ y R₄ se definen como anteriormente.

25

Reactivos: (a) anilina u otra arilamina, NaHCO_3 ac., acetona/ H_2O , 0°C ; (b) 2-(4-hidroxifenil)etilamina u otra aralquilamina, NaHCO_3 ac., THF/acetona/ H_2O , temperatura ambiente; (c) etilendiamina, DIEA, THF, 60°C ; (d) etilendiamina, NaHCO_3 ac., THF/acetona/ H_2O , temperatura ambiente; (e) 2-(4-hidroxifenil)etilamina o derivados de 2-(4-hidroxifenil)etilamina, Et_3N , THF, 60°C .

5

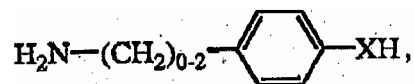
ESQUEMA 2Método A

10

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y X se definen como anteriormente.

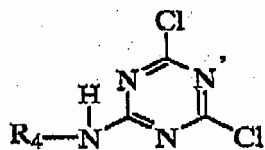
15

Reactivos: (a) anilina u otra arilamina, NaHCO_3 ac., acetona/ H_2O , 0°C ; (b) etanolamina u otra alcanolamina, o alquildiamina, NaHCO_3 ac., THF/acetona/ H_2O , temperatura ambiente; (c)



20

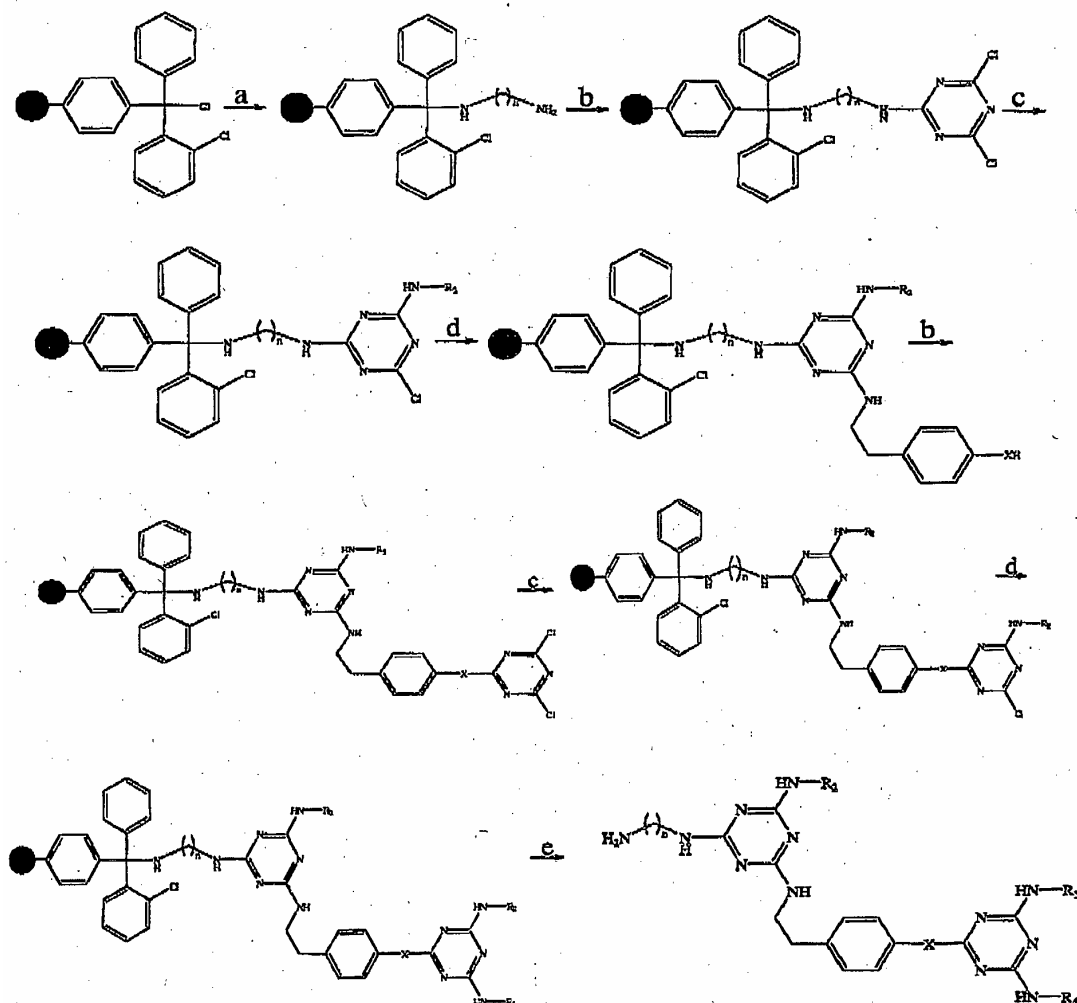
Et_3N , THF, 50°C ; (d)



NaHCO_3 , THF/acetona/ H_2O , temperatura ambiente o NaH/THF ; (e) R_3-NH_2 , Et_3N , THF, 50°C .

25

Método B (síntesis en fase sólida):



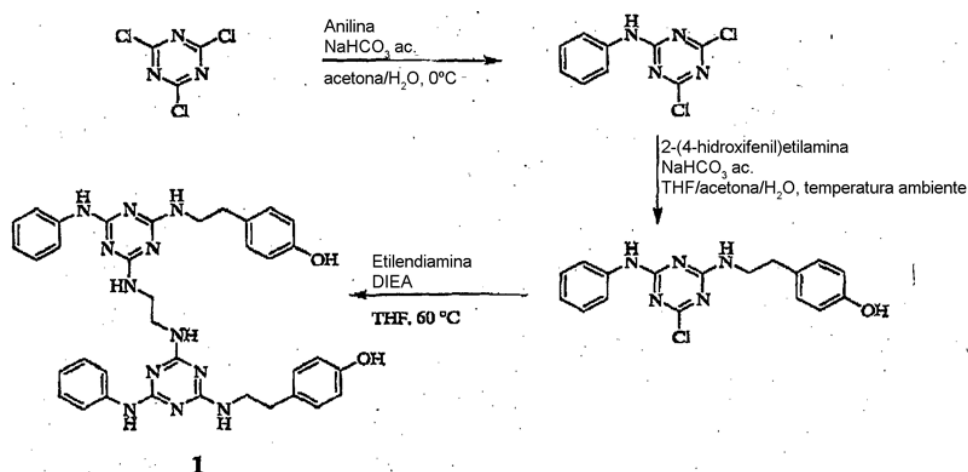
n = 2-6, X se define como anteriormente.

- 5 Reactivos: (a) 1) amina, DCE, TA, 17,5 h, 400 rpm; 2) metanol, DIEA, TA, 1 h, 400 rpm; (b) cloruro cianúrico, DIEA, THF, temperatura ambiente, 30 min, 400 rpm; (c) 1) para aminas alifáticas: amina, DIEA, NMP, temperatura ambiente, 20 h, 400 rpm; 2) para aminas aromáticas: amina, DIEA, NMP, 50°C, 24 h, 400 rpm; (d) amina, DIEA, NMP, 80°C, 20 h, 400 rpm; (e) ácido trifluoroacético al 5%/dicloroetano, temperatura ambiente, 1 h, 400 rpm.

10 Instrumentación:

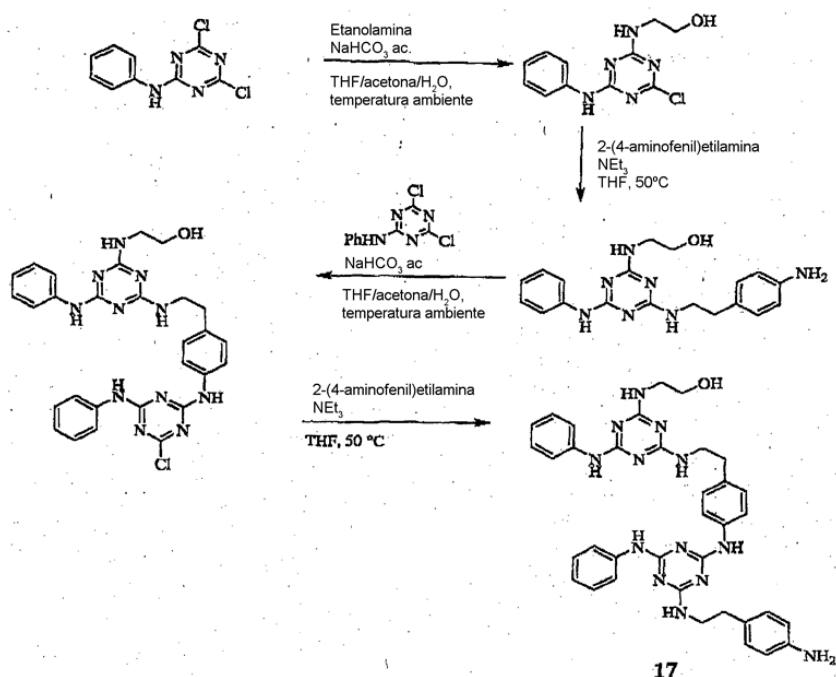
Se registraron todos los cromatogramas de HPLC y espectros de masas en un instrumento HP 1100 LC-MS Agilent usando un detector de red de diodos. Una columna C18 analítica (250 x 4,6 mm, 5 micrómetros) con un gradiente de acetonitrilo al 10-70%-agua que contiene el 0,01% de TFA en 10 min y un flujo de 1 ml/min (método 1) o una columna C18 analítica (75 x 4,6 mm, 5 micrómetros) con un gradiente de acetonitrilo a del 10 al 99%-agua que contiene el 0,01% de TFA en 10 min y un flujo de 1 ml/min (método 2) o una columna C18 analítica (75 x 4,6 mm, 5 micrómetros) con un gradiente de acetonitrilo al 15-99%-agua que contiene el 0,01% de TFA en 6 min y un flujo de 2 ml/min (método 3) o una columna C18 analítica (75 x 4,6 mm, 5 micrómetros) con un gradiente de acetonitrilo al 10-40%-agua que contiene el 0,01% de TFA en 6 min y un flujo de 2 ml/min (método 4) o una columna C18 analítica (75 x 4,6 mm, 5 micrómetros) con un gradiente de acetonitrilo al 1-20%-agua que contiene el 0,01% de TFA en 6 min y un flujo de 2 ml/min (método 5).

Ejemplo 1 (ejemplo representativo del esquema I, método A): Síntesis del compuesto 1



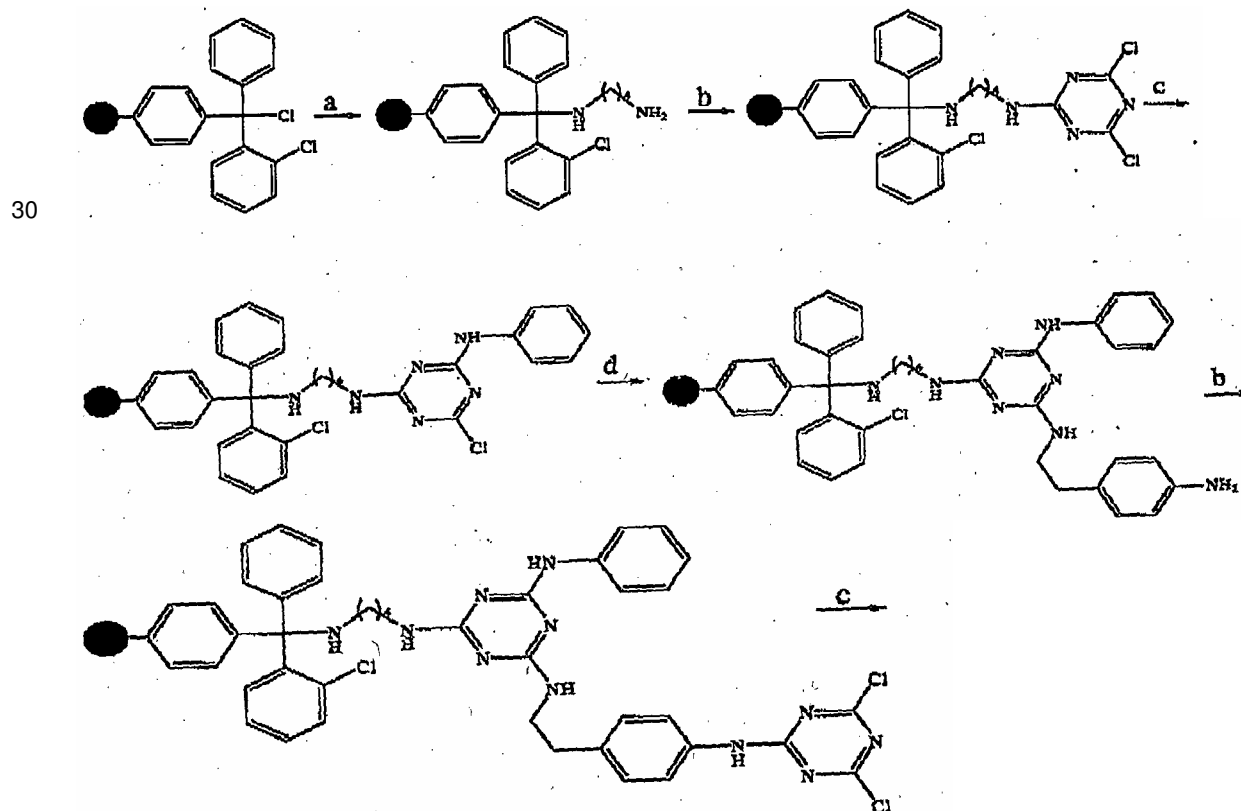
A una suspensión de cloruro cianúrico (20 g, 108 mmol) en acetona (120 ml) y hielo (50 ml) a 0°C se le añadió gota a gota una disolución de anilina (10 g, 107 mmol) en acetona (45 ml). Al final de la adición, se ajustó el pH de la disolución desde 1 hasta 7 con bicarbonato de sodio acuoso al 5% (150 ml). Se filtró el precipitado, se lavó varias veces con agua y se secó a vacío. Esto dio 2,4-dicloro-6-fenilamino-1,3,5-triazina como un sólido blanquecino (24,3 g, rendimiento del 93%). Se usó el producto en la siguiente etapa sin purificación adicional. A una disolución de la diclorotriazina (6,2 g, 25,7 mmol) en THF (300 ml) a temperatura ambiente se le añadió una disolución de 2-(4-hidroxifenil)etilamina (3,6 g, 25,9 mmol) en acetona (100 ml) y agua (100 ml), seguido por bicarbonato de sodio acuoso al 5% (50 ml). Tras 20 h de reacción a temperatura ambiente, se diluyó la disolución con agua (50 ml) y acetato de etilo (50 ml). Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (2 x 50 ml). Se lavaron las fases orgánicas con salmuera (150 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad. Esto dio 2-cloro-4-(2-[4-hidroxifenil]etilamino)-6-fenilamino-1,3,5-triazina como un sólido blanquecino (8,5 g, rendimiento del 97%). Se usó el producto para la siguiente etapa sin purificación adicional. Se disolvió este derivado de triazina (384 mg, 1,1 mmol) en THF (11 ml) a temperatura ambiente. A esta disolución se le añadió etilendiamina (68 μ l, 1,0 mmol) seguido por diisopropiletilamina (355 μ l, 2,0 mmol). Tras 20 h a 50°C, se diluyó la disolución con metanol (10 ml) y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo bruto en una columna Biotage™ 25S (sílice, hexano/AcOEt de 9:1 a 0:1) para proporcionar el compuesto 1 como un sólido blanco. Rendimiento del producto: 267 mg (78%); ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 7,63 (m, 4H), 7,21 (t, 4H, *J* = 7,6 Hz), 6,98 (m, 6H), 6,68 (d, 4H, *J* = 7,9 Hz), 3,48 (m, 8H), 2,84 (m, 4H); EMBR (FAB+): *m/z* 672,0 (MH⁺); EMAR: Calculado para MH⁺ C₃₆H₃₉N₁₂O₂, 671,33191; hallado 671,33060; HPLC (método 1): 8,0 min.

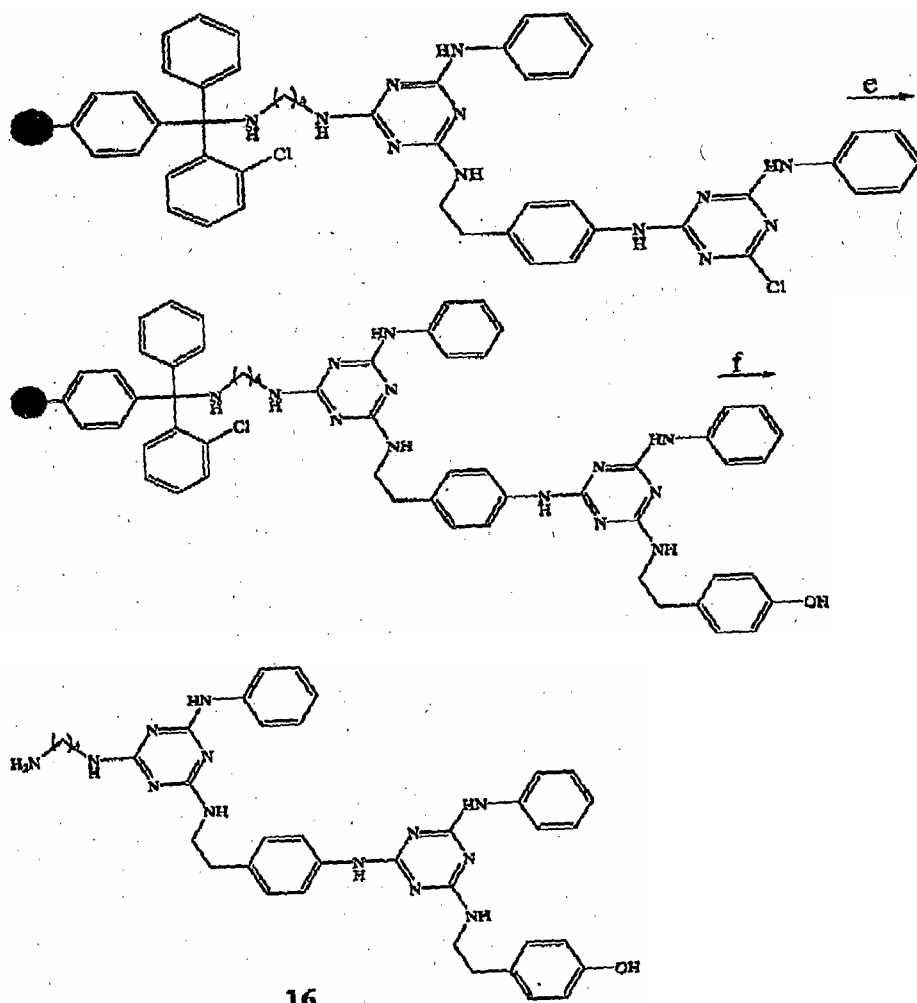
Ejemplo 2 (un ejemplo representativo del esquema II, método A): Síntesis del compuesto 17



A una disolución de 2,4-dicloro-6-aminofenil-1,3,5-triazina (1,6 g, 6,6 mmol) en THF (70 ml) a temperatura ambiente se le añadió una disolución de etanolamina (439 mg, 7,3 mmol) en acetona (24 ml) y agua (24 ml), seguido por bicarbonato de sodio acuoso al 5% (15 ml). Se agitó la reacción durante 20 h a temperatura ambiente. Entonces se diluyó la mezcla con agua (25 ml) y acetato de etilo (25 ml). Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (2 x 25 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera (50 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo bruto en una columna Biotage™ 40S (sílice, hexano/AcOEt de 9:1 a 0:1) para proporcionar 2-cloro-4-(2-hidroxiethylamino)-6-aminofenil-1,3,5-triazina como un sólido blanco (1,6 g, rendimiento del 91%). Se disolvió este compuesto (710 mg, 2,7 mmol) en THF (26 ml) y se añadió 2-(4-aminofenil)etilamina (1,1 ml, 8,0 mmol) seguido por trietilamina (1,1 ml, 8,0 mmol). Se agitó la reacción durante 20 h a 60°C y después se diluyó con metanol (20 ml). Se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el residuo bruto en una columna Biotage™ 40S (sílice, AcOEt/MeOH de 1:0 a 9:1) para proporcionar 2-[2-(4-aminofenil)etilamino]-4-(2-hidroxiethylamino)-6-fenilamino-1,3,5-triazina como un sólido blanquecino (916 mg, rendimiento del 91%). A una disolución de 2,4-dicloro-6-aminofenil-1,3,5-triazina (356 mg, 1,5 mmol) en THF (30 ml)/acetona (11 ml)/agua (11 ml) se le añadió una disolución del derivado de 1,3,5-triazina anterior (540 mg, 1,5 mmol) en THF (14 ml) seguido por disolución de bicarbonato de sodio al 5% (10 ml). Se agitó la reacción durante 20 h a temperatura ambiente y se diluyó la disolución con agua (30 ml) y acetato de etilo (30 ml). Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (30 ml). Se lavaron las fases orgánicas con salmuera (40 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se filtraron. Esto dio 2-{4-[2-(4-{4-cloro-6-fenilamino-[1,3,5]triazin-2-ilamino}-fenil)-etilamino]-6-fenilamino-[1,3,5]triazin-2-ilamino)-etanol como un sólido blanquecino (860 mg, rendimiento cuantitativo). Se usó el producto para la siguiente etapa sin purificación adicional. A una disolución de este compuesto (41 mg, 0,1 mmol) en THF (1 ml) se le añadió 2-(4-aminofenil)etilamina (28 µl, 0,2 mmol) seguido por trietilamina (30 µl, 0,2 mmol). Tras 20 h de reacción a 50°C, se diluyó la disolución con metanol (5 ml) y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo bruto en una columna Biotage™ 12M (sílice, AcOEt/MeOH de 1:0 a 9:1) para proporcionar el compuesto 17 como un sólido blanco. Rendimiento del producto: 30 mg (79%); ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 7,63-7,39 (m, 6H), 7,14 (m, 4H), 7,04 (d, 2H, J = 8,6 Hz), 6,86 (m, 4H), 6,56 (d, 2H, J = 7,8 Hz), 3,59 (m, 2H), 3,43 (m, 6H), 2,75 (m, 2H), 2,66 (t, 2H, J = 7,5 Hz); EMBR (ESI): m/z 670,2 (MH⁺); HPLC (método 2): 4,3 min.

Ejemplo 3 (un ejemplo representativo del esquema II, método B): Síntesis en fase sólida del compuesto 16





5

Reactivos: (a) 1) 1,4-diaminobutano, diclorometano, 17,5 h, 400 rpm; 2) MeOH, DIEA, 25°C, 1 h, 400 rpm; (b) cloruro cianúrico, DIEA, THF, 25°C, 30 min., 400 rpm; (c) anilina, DIEA, NMP, 50°C, 24 h, 400 rpm; (d) 2-(4-aminofenil)etilamina, NMP, 80°C, 20 h, 400 rpm; (e) 2-(4-hidroxifenil)etilamina, DIEA, NMP, 80°C, 20 h, 400 rpm; (f) ácido trifluoroacético al 5%/dicloroetano, 25°C, 1 h, 400 rpm.

10

Instrumentación

Se realizó la síntesis en fase sólida en un instrumento Bohdan Miniblocks. Se realizaron en equipos de dos, que presentaban cuarenta y ocho tubos de reacción de polipropileno. Cada tubo tenía una frita en el fondo para la filtración del soporte sólido. Un tornillo que actúa como válvula permite (o no) el flujo de líquidos. Se añadió un bloque de transferencia de calor que rodeaba a todos los tubos para proporcionar calentamiento apropiado de las reacciones. Se acoplaron los bloques de transferencia de calor a un circulador de calentamiento refrigerado Julabo FP 40. Se cubrieron los tubos con una lámina de teflón, septos de caucho y se cerraron con la parte superior del bloque que contiene pinzas para mantenerlos cerrados de manera estanca. Se agitaron los bloques en un agitador Innova modificado de New Brunswick Scientific. Para la evaporación, se usó un instrumento Genevac HT-4II.

20

Fijación de 1,4-diaminobutano a la resina de 2-clorotripto para la síntesis en fase sólida

En un vial (4,0 ml) se colocó resina (53,0 mg, 1,9 mmol) seguido por diclorometano (1,5 ml) y THF (0,5 ml). Se homogeneizó esta mezcla mediante el uso de una pipeta automática. A partir de esta mezcla, se colocaron 2,0 ml en el pocillo en un bloque. Abriendo la válvula, se filtró la resina del disolvente. Entonces se añadió diclorometano (1,0 ml) para lavar la resina en cada pocillo. Se cerró la válvula y se añadió 1,4-diaminobutano (41 mg, 0,47 mmol) en diclorometano (2,0 ml) y se tapó el bloque y se colocó en el agitador durante 17,5 h a temperatura ambiente y 400 rpm. Entonces se colocaron los bloques en el equipo de recogida de vacío, y se filtró la resina abriendo la válvula. Se lavó la resina con NMP (2 veces), metanol (2 veces), agua (3 veces), metanol (2 veces), diclorometano (2 veces) y THF (1 vez) respectivamente.

25

30

Primera adición de cloruro cianúrico

Se cerró la válvula y entonces se dispensaron en el pocillo 1,0 ml de una disolución de DIEA (68 μ l, 0,5 mmol) en THF (1 ml). A esta mezcla se le añadió 1 ml de una disolución de cloruro cianúrico (87 mg, 0,5 mmol) en THF (1,0 ml). Se taparon los bloques con una lámina de teflón y se colocó un septo de caucho en el agitador y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente, 400 rpm. Se retiró el bloque del agitador y se colocó en un equipo de base de recogida de vacío. Entonces se abrió la válvula para filtrar la resina. Se añadió THF (1,0 ml) para lavar la mezcla. Se cerró la válvula y se añadió más THF (1,0 ml). Se colocó el bloque en un agitador durante 5 min y se abrió la válvula para filtrar la resina. Tras tres lavados con THF, se emprendió un último lavado con NMP para la siguiente reacción.

Adición de anilina a dicloro-1,3,5-triazina

Se preparó una disolución de DIEA (82 μ l, 0,5 mmol) en NMP (1,0 ml) y se colocó en el pocillo con la válvula cerrada. A esta mezcla se le añadió una disolución de anilina (43 μ l, 0,5 mmol) en NMP (1,0 ml). Se distribuyeron 1,0 ml de esta disolución en cada pocillo. Se colocaron los bloques en el agitador y se agitaron durante 17,5 h a 50°C a 400 rpm. Se enfriaron los bloques hasta 25°C y se retiraron del agitador. Se filtraron las resinas y se lavaron con NMP (5 veces) usando el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Adición del grupo de unión a monocloro-1,3,5-triazina

Se preparó una disolución de DIEA (82 μ l, 0,5 mmol) en NMP (1,0 ml) y se colocó en el pocillo con la válvula cerrada. Se colocó 2-(4-aminofenil)etilamina (52 μ l, 0,4 mmol) en un vial (4,0 ml) y se añadió NMP (1,0 ml) para dar una disolución. Se colocaron los bloques en el agitador y se agitaron durante 18,5 h a 80°C a 400 rpm. Tras 18 h, se enfriaron los bloques hasta 25°C y se retiraron del agitador. Se filtraron las resinas y se lavaron con NMP (5 veces), diclorometano (1 vez), metanol (1 vez), diclorometano (1 vez), metanol (1 vez) y diclorometano (1 vez) según el mismo procedimiento que el descrito anteriormente. Cerrando la válvula, los bloques estaban listos para la siguiente etapa.

Segunda adición de cloruro cianúrico

El mismo procedimiento que el anterior.

Segunda adición de anilina a dicloro-1,3,5-triazina

Se preparó una disolución de DIEA (82 μ l, 0,5 mmol) en NMP (1,0 ml) y se colocó en el pocillo con la válvula cerrada. Se colocó anilina (43 μ l, 0,5 mmol) en un vial (4,0 ml) y se añadió NMP (1,0 ml). Se dispensó la disolución de anilina en el pocillo. Se colocaron los bloques en el agitador y se agitaron durante 19 h a 50°C a 400 rpm. Entonces se enfriaron los bloques hasta 25°C, se retiraron del agitador y se trataron según el mismo procedimiento que el descrito anteriormente. Se filtró la resina y se lavó con NMP (5 veces). Cerrando la válvula, los bloques estaban listos para la siguiente etapa.

Segunda adición de 2-(4-hidroxifenil)etilamina a monocloro-1,3,5-triazina

Se preparó una disolución de DIEA (82 μ l, 0,5 mmol) en NMP (1,0 ml) y se colocó en el pocillo con la válvula cerrada. Se colocó 2-(4-hidroxifenil)etilamina (65 mg, 0,5 mmol) en el vial (4 ml) y se añadió NMP (1,0 ml) para proporcionar una disolución. Se distribuyó la disolución de 2-(4-hidroxifenil)etilamina (1 ml) en el pocillo y se colocó el bloque en el agitador y se agitó durante 23 h a 80°C a 400 rpm. Se enfrió el bloque hasta 25°C, se retiró del agitador y se trató según el mismo procedimiento que el descrito anteriormente. Se filtró la resina y se lavó con NMP (5 veces), diclorometano (1 vez), metanol (1 vez), diclorometano (1 vez), metanol (1 vez) y diclorometano (1 vez) respectivamente. Cerrando la válvula, los bloques estaban listos para la siguiente etapa.

Escisión de la resina

Se preparó una disolución de ácido trifluoroacético al 5% en dicloroetano y se añadieron 2 ml al pocillo. Se taparon los bloques, se colocaron en el agitador y se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente a 400 rpm. Entonces, se colocaron los bloques en el equipo de base de recogida de vacío. Se filtró la resina en una placa de 96 pocillos profundos limpia n.º 1. Se colocó una nueva placa de 96 pocillos profundos limpia n.º 2 en el equipo de recogida de vacío. Entonces se añadió dicloroetano (1,0 ml) en el pocillo, se cerró la válvula y se añadió metanol (1,0 ml). Se agitaron los bloques en el agitador durante 5 min y se filtraron en la placa de pocillos profundos n.º 2. Se colocó una nueva placa de 96 pocillos profundos limpia n.º 3 en el equipo de recogida de vacío y se añadió metanol (1,0 ml) al pocillo. Entonces se evaporaron las placas de 96 pocillos profundos (1 y 2) en el aparato Genevac. Se analizó la placa n.º 1 mediante CL/EM. Se combinaron las placas y se colocaron en el aparato Genevac y se evaporaron de nuevo. Se colocaron las placas en el instrumento de HPLC/Gilson para la purificación. Sólido amarillo; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,64-6,67 (m, 18H), 3,65 (m, 4H), 3,48 (m, 2H), 2,99-2,79 (m, 6H), 1,72 (m, 4H); EMBR (ESI): m/z 698,2 (MH⁺), 720,2 (M+Na); HPLC (método 2): 4,4 min.

Ejemplo 4: Síntesis del compuesto 2

Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 1 partiendo de antranilato de metilo y 2-(4-hidroxifenil)etilamina. Sólido blanco; ¹H-RMN (4,00 MHz, CD₃OD): δ 8,82-6,69 (m, 16H), 3,86 (s, 6H), 3,63-3,49 (m, 8H), 2,73 (s, 4H); EMBR (ESI): m/z 787,2 (MH⁺); HPLC (método 1): 8,2 min.

Ejemplo 5: Síntesis del compuesto 3

Se preparó el compuesto anterior mediante modificación del procedimiento en el ejemplo 1. A una suspensión de cloruro cianúrico (4 g, 21,7 mmol) en acetona (25 ml) y hielo (10 ml) a 0°C se le añadió gota a gota una disolución de 2-(4-hidroxifenil)etilamina (2,9 g, 21,5 mmol) en THF (15 ml), acetona (10 ml) y agua (10 ml). Tras el final de la adición, se llevó el pH de la disolución desde 3 hasta 7 con una disolución al 5% de bicarbonato de sodio (40 ml). Tras 2 h de reacción a 0°C, se diluyó la disolución con agua (10 ml) y acetato de etilo (20 ml). Se separaron las dos fases y se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (25 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (25 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad para dar un sólido de color amarillo claro (5,3 g, 86%). Se usó el producto para la siguiente etapa sin purificación adicional. A una disolución de esta diclorotriazina (1,21 g, 4,2 mmol) en acetona (25 ml) a temperatura ambiente se le añadió una disolución de amoniaco 0,5 M en dioxano (25 ml, 12,7 mmol) y entonces se agitó la disolución a 50°C en un tubo sellado durante 60 h. Entonces se concentró la disolución a presión reducida. En primer lugar se purificó el residuo bruto en una columna Biotage™ 40M (sílice, hexano/AcOEt de 9:1 a 0:1) y después en una HPLC semipreparativa (columna C18 con dos extremos ocupados, 250 x 10 mm, 5 micrómetros, H₂O/CH₃CN que contiene el 0,05% de ácido trifluoroacético, de 7:3 a 1:9 a lo largo de 20 min) para proporcionar la clorotriazina como un sólido blanco (70 mg, 6%).

A una suspensión de cloruro cianúrico (3 g, 16,3 mmol) en acetona (30 ml) y hielo (15 ml) a 0°C se le añadió gota a gota una disolución de antranilato de metilo (2,46 g, 16,3 mmol) en acetona (10 ml). Al final de la adición, se llevó el pH de la disolución desde 1 hasta 8,5 con una disolución al 5% de bicarbonato de sodio. Tras 20 h de reacción a temperatura ambiente, se separó el precipitado por filtración, se lavó varias veces con agua y se secó a vacío para dar un sólido blanquecino (4,51 g, 93%). Se usó el producto para la siguiente etapa sin purificación adicional. A una disolución de esta diclorotriazina (2,0 g, 6,7 mmol) en THF (55 ml) a temperatura ambiente se le añadió una disolución de 2-(4-hidroxifenil)etilamina (918 mg, 6,7 mmol) en acetona (5 ml) y agua (2 ml), seguido por una disolución al 5% de bicarbonato de sodio. Tras 5 h de reacción a 50°C, se diluyó la disolución con agua y acetato de etilo. Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (3 x 20 ml). Se lavaron las fases orgánicas con salmuera (20 ml), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron. Se obtuvo un sólido blanquecino (2,45 g, 92%). Se usó el producto para la siguiente etapa sin purificación adicional. A una disolución de esta clorotriazina (350 mg, 0,9 mmol) en THF (9 ml) a temperatura ambiente se le añadió etilendiamina (584 µl, 8,7 mmol), seguido por trietilamina (1,22 µl, 8,7 mmol). Tras 20 h de reacción a 55°C, se diluyó la disolución con metanol (10 ml) y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo bruto en una columna Biotage™ 25S (sílice, de hexano/AcOEt 1:1 a AcOEt/MeOH 3:7) para proporcionar la amina primaria como un sólido blanco (227 mg, 62%). A una disolución de esta amina (37 mg, 87 µmol) en THF (1,5 ml) se le añadió una disolución de 2-amino-4-cloro-6-[2-(4-hidroxifenil)etilamino]-1,3,5-triazina (30 mg, 79 µmol) en THF (1,5 ml), seguido por diisopropiletilamina (50 µl, 280 µmol). Tras 48 h de reacción a 50°C, se diluyó la disolución con metanol (10 ml) y se concentró a presión reducida. En primer lugar se purificó el residuo bruto en una columna Biotage™ 12M (sílice, de hexano/AcOEt 8:2 a AcOEt/MeOH 9:1) y después en una HPLC semipreparativa (columna C18 con dos extremos ocupados, 250 x 10 µm, 5 micrómetros, H₂O/CH₃CN que contiene el 0,05% de ácido trifluoroacético, de 7:3 a 1:9 a lo largo de 20 min) para proporcionar el compuesto 3 como un sólido blanco. Rendimiento del producto: 17 mg, 33%; ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 8,60-6,55 (m, 12H), 3,90 (s, 3H), 3,70-3,39 (m, 8H), 2,78-2,66 (m, 4H); EMBR (ESI): m/z 653,2 (MH⁺); HPLC (método 1): 4,68 min.

Ejemplo 6: Síntesis del compuesto 4

Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 1 partiendo de anilina y N-1-terc-butiloxycarbonil-2-(4-aminofenil)etilamina. Se emprendió la eliminación del grupo Boc usando una mezcla de HCl/dioxano a temperatura ambiente durante 3 h. Sólido blanco; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,59-7,21 (m, 16H), 3,74-3,69 (m, 4H), 3,25-2,94 (m, 8H); EMBR (ESI): m/z 669,4 (MH⁺); HPLC (método 2): 4,2 min.

Ejemplo 7: Síntesis del compuesto 5

Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 1 partiendo de o-toluidina y 2-(4-hidroxifenil)etilamina. Sólido blanco; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,11 (m, 2H), 7,02 (m, 4H), 6,97 (m, 6H), 6,66 (d, J = 7 Hz, 4H), 3,47 (m, 8H), 2,70 (m, 4H), 2,24 (s, 6H); EMBR (ESI): m/z 699 (MH⁺), 721 (M+Na); HPLC (método 2): 4,8 min.

Ejemplo 8: Síntesis del compuesto 6

Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 1 partiendo de anilina y 4-aminobencilamina. Sólido de color rosa claro; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 7,72-6,61 (m, 18H), 4,39 (s, 4H), 3,55 (m, 4H); EMBR (ESI): m/z 663,2 (M+Na); HPLC (método 2): 3,6 min.

5 Ejemplo 9: Síntesis del compuesto 7

Se preparó el compuesto anterior mediante modificación del procedimiento del ejemplo 1. A una suspensión de 1,3-fenilendiamina (8,2 g; 75,3 mmol) en CH_2Cl_2 (21 ml) a 25°C se le añadió gota a gota a lo largo de 1 h una disolución de carbonato de di-terc-butilo (2,7 g, 12,6 mmol) en CH_2Cl_2 (130 ml). Entonces se agitó la disolución a temperatura ambiente durante la noche. Tras 18 h de reacción, se evaporó la disolución hasta sequedad a presión reducida. Se disolvió el aceite residual en acetato de etilo (50 ml) y se lavó con una disolución 2 N de carbonato de sodio (50 ml). Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (2 x 50 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (50 ml), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad. Se purificó el residuo bruto en una columna Biotage™ 40S (sílice, hexano/AcOEt de 95:5 a 1:1) para proporcionar N-1-terc-butiloxycarbonil-1,3-fenilendiamina como un sólido blanquecino (2,4 g, 93%). A una suspensión de cloruro cianúrico (2,2 g, 11,7 mmol) en acetona (15 ml) y hielo (6 ml) a 0°C se le añadió gota a gota a lo largo de 15 min, una disolución de N-1-terc-butiloxycarbonil-1,3-fenilendiamina (2,4 g, 11,6 mmol) en acetona (7 ml). Al final de la adición se ajustó el pH de la disolución desde 1 hasta 7 con una disolución al 5% de bicarbonato de sodio (25 ml). Se filtró el precipitado blanco y se lavó exhaustivamente con agua antes de secarse a alto vacío. Esto dio 2,4-dicloro-6-(3-N-1-terc-butiloxycarbonilaminofenil)amino-1,3,5-triazina pura como un sólido blanquecino (4,1 g, 99%). Se usa el producto en la siguiente etapa sin purificación adicional. A una disolución de este compuesto (400 mg, 1,12 mmol) en THF (5 ml) a temperatura ambiente se le añadió etilendiamina (38 μl , 0,562 mmol), seguido por diisopropiletilamina (345 μl , 1,97 mmol). Tras 20 h a 25°C, se diluyó la disolución con metanol (5 ml) y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo bruto en una columna Biotage™ 25M (sílice, hexano/AcOEt de 8:2 a 4:6) para proporcionar N,N'-etilendiamina-di[4-cloro-6-(3-N-1-terc-butiloxycarbonilaminofenil)-amino-1,3,5-triazina] como un sólido blanco (314 mg, 80%). Se disolvió este compuesto (85 mg, 0,1 mmol) en THF (3 ml) a temperatura ambiente y se añadió a una disolución de 2-(4-aminofenil)etilamina (100 mg, 0,7 mmol) en THF (1 ml) seguido por trietilamina (102 μl , 0,7 mmol). Tras 20 h a 60°C, se diluyó la disolución con metanol (2 ml) y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo bruto en una columna Biotage™ 25S (sílice, hexano/EtOAc de 8:2 a 2:8) para proporcionar N,N'-etilendiamina-di[4-(2-[4-aminofenil]etilamino)-5-(3-N-terc-butiloxycarbonilaminofenil)amino-1,3,5-triazina] como un sólido blanco (97 mg, 89%). A una disolución de este material (97 mg, 0,1 mmol) en CH_2Cl_2 (1,5 ml) a temperatura ambiente se le añadió una disolución de HCl 4 N en dioxano (1,5 ml). Tras 3 h a 25°C, se diluyó la disolución con 1,2-dicloroetano (10 ml), se concentró a presión reducida y se secó durante 20 h a alto vacío. Sólido amarillo (74 mg, cuantitativo); $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 8,10-7,10 (m, 16H), 3,80-3,60 (m, 8H), 2,99 (m, 4H); EMBR (ESI): m/z 699,2 (MH^+); HPLC (método 2): 2,8 min.

Ejemplo 10: Síntesis del compuesto 8

Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 1 partiendo de 2-(4-hidroxifenil)etilamina y éster metílico de L-tirosina. Sólido de color rosa claro; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 7,54-6,65 (m, 18H), 4,75 (m, 2H), 3,75-3,40 (m, 14H), 3,18-2,86 (m, 8H); EMBR (ESI): m/z 921,2 (MH^+); HPLC (método 2): 5,1 min.

Ejemplo 11: Síntesis del compuesto 9

Se preparó el compuesto anterior mediante saponificación del compuesto 2 usando hidróxido de litio en exceso en una mezcla de metanol/agua (4:1) a 50°C durante la noche. Sólido amarillo; $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 9,00-6,50 (m, 16H), 3,70-3,45 (m, 8H), 2,90-2,75 (m, 4H); EMBR (ESI): m/z 759,20 (MH^+); HPLC (método 2): 7,1 min.

Ejemplo 12: Síntesis del compuesto 10

Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 1 partiendo de éster metílico de (R)-2-fenilglicina y 2-(4-hidroxifenil)etilamina. Se emprendió la saponificación tal como se describió en el ejemplo 11. Sólido blanco; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 7,48-7,32 (m, 10H), 7,05-6,89 (m, 4H), 6,70 (m, 4H), 5,45 (m, 2H), 3,53 (m, 8H), 2,66 (m, 4H); EMBR (ESI): m/z 787,2 (MH^+), 785,2 (M-H); HPLC (método 1): 6,5 min.

Ejemplo 13: Síntesis del compuesto 11a

Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 1 excepto porque se sustituyó la anilina por fenol, el bicarbonato de sodio por hidruro de sodio y la diisopropilamina por carbonato de sodio. Sólido blanco; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 7,45-6,95 (m, 12H), 6,80-6,61 (m, 6H), 3,48 (m, 8H), 2,72 (m, 4H); EMBR (ESI): m/z 673,2 (MH^+); HPLC (método 1): 8,4 min.

Ejemplo 14: Síntesis del compuesto 11b

Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 1 partiendo de tiofenol y 2-(4-hidroxifenil)etilamina. Sólido de

color naranja pálido; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,10-7,64 (m, 10H), 6,40-7,00 (m, 8H), 2,92-3,50 (m, 8H), 2,29-2,70 (m, 10H). EMBR (ESI): m/z 705 (MH⁺), 727 (M+Na); HPLC (método 2): 7,9 min.

Ejemplo 15: Síntesis del compuesto 12

5 Se preparó el compuesto anterior mediante acoplamiento del compuesto 1 y clorhidrato del ácido 4-(dimetilamino)butírico usando un exceso de yoduro de 2-cloropiridinio y trietilamina en DMF a temperatura ambiente durante la noche. Se purificó el compuesto en una HPLC semipreparativa (columna C18 con dos extremos ocupados, 250 x 10 μm, 5 micrómetros, H₂O/CH₃CN que contiene el 0,05% de ácido trifluoroacético, de 4:2 a 3:2 a lo largo de 25 min). Sólido blanco; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,52-7,04 (m, 18H), 3,70-3,39 (m, 12H), 3,00-2,75 (m, 8H), 2,92 (s, 9H), 2,85 (s, 3H), 2,11 (m, 4H); ¹⁹F-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ -77,5; ¹⁹F-RMN cuantitativa (400 MHz, CD₃OD, trifluorotolueno de inserción coaxial): 8 TFA; EMBR (ESI): m/z 897 (MH⁺), 919 (M+Na); HPLC (método 2): 3,8 min.

15 Ejemplo 16: Síntesis del compuesto 13

Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 2 excepto porque en primer lugar se añadió 2-(4-hidroxifenil)etilamina a la 2,4-dicloro-6-fenilamino-1,3,5-triazina seguido por la adición del grupo de unión 2-(4-hidroxifenil)etilamina usando hidruro de sodio en vez de bicarbonato de sodio. Se sustituyó la etanolamina de cadena lateral por N-1-terc-butiloxycarboniletilendiamina. Se emprendió la eliminación del grupo Boc con ácido trifluoroacético al 5% en diclorometano (0°C). Polvo blanco; ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7,59 (m, 6H), 7,21 (m, 8H), 7,05 (d, 1H, J = 8 Hz), 6,91 (d, 1H, J = 8 Hz), 6,71 (d, 1H, J = 8 Hz), 6,67 (d, 1H, J = 8 Hz), 3,72 (m, 4H), 3,59 (t, 1H, J = 8 Hz), 3,39 (m, 1H), 3,22 (m, 2H), 2,97 (m, 2H), 2,80 (t, 1H, J = 7 Hz), 2,70 (t, 1H, J = 7 Hz); ¹⁹F-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ -74,8; ¹⁹F-RMN cuantitativa (300 MHz, CD₃OD, trifluorotolueno de inserción coaxial): 3 TFA; EMBR (ESI): m/z 671 (MH⁺), 654 (M-NH₂); HPLC (método 2): 4,5 min.

Ejemplo 17: Síntesis del compuesto 14

30 Se preparó el compuesto anterior haciendo reaccionar compuesto 13 con clorhidrato de 1-H-pirazol-1-carboxamidina. Se emprendió la eliminación del grupo Boc tal como se describió en el ejemplo 16. Sólido blanco; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,56 (m, 4H), 7,37 (m, 4H), 7,21 (m, 6H), 7,03 (d, 1 H, J = 8 Hz), 6,90 (d, 1 H, J = 8 Hz), 6,70 (d, 1H, J = 8 Hz), 6,65 (d, 1H, J = 8 Hz), 3,65 (m, 6H), 3,45 (m, 2H), 2,97 (m, 2H), 2,80 (t, 1H, J = 8 Hz), 2,68 (t, 1H, J = 8 Hz); ¹⁹F-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ -77,8; ¹⁹F-RMN cuantitativa (400 MHz, CD₃OD, trifluorotolueno de inserción coaxial): 2 TFA; EMBR (ESI): m/z 713 (MH⁺), 696 (M-NH₂); HPLC (método 2): 4,8 min.

35 Ejemplo 18: Síntesis del compuesto 15

40 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 2 excepto porque en primer lugar se añadió 2-(4-aminofenil)etilamina a la 2,4-dicloro-6-fenilamino-1,3,5-triazina seguido por la adición de la N-1-acetiletilendiamina de cadena lateral. Sólido blanco; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,77-7,49 (m, 6H), 7,24 (t, 4H, J = 7,9 Hz), 7,12 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,04 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 6,96 (m, 2H), 6,70 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 3,66-3,46 (m, 8H), 2,88-2,72 (m, 4H); EMBR (ESI): m/z 712,2 (MH⁺); HPLC (método 2): 5,0 min.

45 Ejemplo 19: Síntesis del compuesto 18

50 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 2 excepto porque en primer lugar se añadió 2-(4-hidroxifenil)etilamina a la 2,4-dicloro-6-fenilamino-1,3,5-triazina seguido por 2-(4-aminofenil)etilamina. Se logró la sustitución final en el anillo de triazina usando N-1-terc-butiloxycarbonilpiperazina y se emprendió la eliminación del grupo Boc tal como se describió en el ejemplo 16. Sólido amarillo; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,58 (m, 6H), 7,39-6,95 (m, 10H), 6,69 (m, 2H), 4,08 (m, 4H), 3,74-3,52 (m, 4H), 2,96-2,75 (m, 4H); EMBR (ESI): m/z 696,2 (MH⁺); HPLC (método 2): 4,7 min.

Ejemplo 20: Síntesis del compuesto 19a

55 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 2 excepto porque se sustituyó la anilina por N-1-terc-butiloxycarbonil-1,3-fenilendiamina. Se emprendió la eliminación del grupo Boc tal como se describió en el ejemplo 9. Sólido amarillo; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,05-7,11 (m, 16H), 3,94-3,48 (m, 8H), 3,00 (m, 4H); EMBR (ESI): m/z 700,2 (MH⁺); HPLC (método 2): 3,2 min.

60 Ejemplo 21: Síntesis del compuesto 19b

65 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 2 excepto porque se sustituyó la anilina por N-1-terc-butiloxycarbonil-1,3-fenilendiamina y la etanolamina por 1,2-diaminoetano. Se emprendió la eliminación del grupo Boc tal como se describió en el ejemplo 9. Sólido amarillo; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,00-7,60 (m, 16H), 3,40-3,70 (m, 6H), 3,00-3,20 (m, 2H), 2,70-2,90 (m, 4H); EMBR (ESI): m/z 700 (MH⁺); HPLC (método 3): 1,3 min.

Ejemplo 22: Síntesis del compuesto 20

5 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 2 partiendo de anilina y etanolamina. Se sustituyó la 2-(4-aminofenil)etilamina por 2-(4-hidroxifenil)etilamina. Sólido amarillo; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,61 (m, 6H), 7,25 (m, 4H), 7,14 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 7,07 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 6,98 (m, 2H), 6,70 (m, 2H), 3,69 (m, 2H), 3,55 (m, 6H), 2,83 (m, 4H); EMBR (ESI): *m/z* 671,2 (MH⁺); HPLC (método 2): 5,1 min.

Ejemplo 23: Síntesis del compuesto 21

10 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 16. Se sustituyó la etilendiamina de cadena lateral por etanolamina. Sólido blanco; ¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 7,58-6,61 (m, 18H), 4,51 (m, 2H), 3,84 (m, 2H), 3,63 (m, 4H), 2,82 (m, 4H); EMBR (ESI): *m/z* 673,2 (MH⁺), 695,2 (M+Na); HPLC (método 2): 9,7 min.

Ejemplo 24: Síntesis del compuesto 22

15 Se preparó el compuesto anterior usando el procedimiento en fase sólida descrito en el ejemplo 3 partiendo de etilendiamina y 2-metoxianilina. EMBR (ESI): *m/z* 701,2 (MH⁺), 722,4 (M+Na); HPLC (método 2): 4,2 min.

Ejemplo 25: Síntesis del compuesto 23

20 Se preparó el compuesto anterior usando el procedimiento en fase sólida descrito en el ejemplo 3 partiendo de 1,4-diaminobutano y 2-metoxianilina. EMBR (ESI): *m/z* 729,2 (MH⁺), 751,2 (M+Na); HPLC (método 2): 4,9 min.

Ejemplo 26: Síntesis del compuesto 24

25 Se preparó el compuesto anterior usando el procedimiento en fase sólida descrito en el ejemplo 3 partiendo de 1,3-diaminopropano y anilina. EMBR (ESI): *m/z* 684,4 (MH⁺), 706,2 (M+Na); HPLC (método 2): 4,4 min.

Ejemplo 27: Síntesis del compuesto 25

30 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 1 excepto porque se sustituyó el grupo de unión etilendiamina por 1,3-diaminopropano. Sólido blanco; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,72-7,48 (m, 4H), 7,20 (m, 4H), 7,08 (m, 6H), 6,66 (m, 4H), 3,46 (m, 8H), 2,71 (m, 4H), 1,74 (m, 2H); EMBR (ESI): *m/z* 685,2 (MH⁺); HPLC (método 2): 6,0 min.

35

Ejemplo 28: Síntesis del compuesto 26

40 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 1 excepto porque se sustituyó la 2-(4-hidroxifenil)etilamina por etanolamina y el grupo de unión etilendiamina por 4-aminometilpiperidina. Sólido blanco; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,60 (m, 4H), 7,24 (t, 4H, *J* = 7,9 Hz), 6,95 (m, 2H), 3,69 (t, 4H, *J* = 5,8 Hz), 3,50 (t, 4H, *J* = 5,8 Hz), 3,31 (m, 4H), 2,85 (t, 2H, *J* = 12,4 Hz), 1,95 (m, 1H), 1,81 (m, 2H), 1,20 (m, 2H); EMBR (ESI): *m/z* 573,2 (MH⁺); HPLC (método 2): 4,1 min.

Ejemplo 29: Síntesis del compuesto 27

45 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 22 excepto porque se sustituyó el grupo de unión 2-(4-aminofenil)etilamina por 4-aminobencilamina y se sustituyó la etanolamina de cadena lateral por histamina. Sólido blanco; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,66 (m, 7H), 7,22 (m, 6H), 7,08-6,65 (m, 7H), 4,53 (s, 2H), 3,63 (t, 2H, *J* = 7,1 Hz), 3,53 (m, 2H), 2,89 (t, 2H, *J* = 7,1 Hz), 2,77 (m, 2H); EMBR (ESI): *m/z* 707,2 (MH⁺); HPLC (método 2): 4,4 min.

50

Ejemplo 30: Síntesis del compuesto 28

55 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 9 excepto porque se sustituyó la N-1-terc-butiloxicarbonil-1,3-fenilendiamina por anilina, la 2-(4-hidroxifenil)etilamina por 2-(4-aminofenil)etilamina y el grupo de unión etilendiamina por 1,4-fenilendiamina. Sólido blanco; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,72-7,51 (m, 8H), 7,26 (t, 4H, *J* = 7,9 Hz), 7,06 (d, 4H, *J* = 7,1 Hz), 6,98 (t, 2H, *J* = 7,1 Hz), 6,71 (t, 4H, *J* = 8,2 Hz), 3,57 (t, 4H, *J* = 7,3 Hz), 2,82 (t, 4H, *J* = 7,3 Hz); EMBR (ESI): *m/z* 719,2 (MH⁺); HPLC (método 1): 9,0 min.

Ejemplo 31: Síntesis del compuesto 29

60 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 1 excepto porque se sustituyó la anilina por N-1-terc-butiloxicarbonil-1,3-fenilendiamina, la 2-[4-hidroxifenil]etilamina por 2-(4-aminofenil)etilamina y el grupo de unión etilendiamina por piperazina. Se emprendió la eliminación del grupo Boc tal como se describió en el ejemplo 9.

65 Sólido marrón; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,46-7,30 (m, 14H), 6,98 (m, 2H), 4,00-3,85 (m, 8H), 3,80-3,75 (m,

4H), 3,01 (m, 4H); EMBR (ESI): m/z 725,4 (MH⁺); HPLC (método 2): 3,4 min.

Ejemplo 32: Síntesis del compuesto 30

5 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 1 excepto porque se sustituyó la anilina por N-1-terc-butiloxycarbonil-1,3-fenilendiamina, la 2-(4-hidroxifenil)etilamina por 2-(4-aminofenil)etilamina y el grupo de unión etilendiamina por 4-aminometilpiperidina. Se empujó la eliminación del grupo Boc tal como se describió en el ejemplo 9. Sólido amarillo; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,78-7,07 (m, 16H), 3,83-3,56 (m, 6H), 3,14-2,92 (m, 8H), 2,17-1,75 (m, 5H); EMBR (ESI): m/z 753,4 (MH⁺); HPLC (método 2): 3,2 min.

10

Ejemplo 33: Síntesis del compuesto 31

15 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 1 excepto porque se sustituyó la anilina por N-1-terc-butiloxycarbonil-1,3-fenilendiamina, la 2-(4-hidroxifenil)etilamina por 2-(4-aminofenil)etilamina y el grupo de unión etilendiamina por 1,6-diaminohexano. Se empujó la eliminación del grupo Boc tal como se describió en el ejemplo 9. Sólido amarillo; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,85-7,06 (m, 16H), 3,74 (m, 4H), 3,48 (m, 4H), 3,01 (m, 4H), 1,68 (m, 4H), 1,47 (m, 2H); EMBR (ESI): m/z 755,2 (MH⁺), 777,2 (M+Na); HPLC (método 3): 1,4 min.

20

Ejemplo 34: Síntesis del compuesto 32

25 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 1 excepto porque se sustituyó la 2-(4-hidroxifenil)etilamina por 2-(4-aminofenil)etilamina y el grupo de unión etilendiamina por 4-aminometilpiperidina. Sólido amarillo; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,66-6,74 (m, 18H), 3,64 (m, 4H), 3,09-2,78 (m, 10H), 2,04 (m, 2H), 1,88 (m, 3H); EMBR (ESI): m/z 723,2 (MH⁺); HPLC (método 2): 4,1 min.

25

Ejemplo 35: Síntesis del compuesto 33

30 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 2 excepto porque se sustituyó el grupo de unión 2-(4-aminofenil)etilamina por N-1-terc-butiloxycarbonilpiperazina. Se empujó la eliminación del grupo Boc tal como se describió en el ejemplo 16. Sólido de color amarillo claro; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,60 (m, 4H), 7,25 (m, 4H), 6,98 (m, 4H), 6,68 (d, 2H, J = 8,2 Hz), 3,83 (m, 8H), 3,70 (t, 2H, J = 5,6 Hz), 3,52 (m, 6H), 2,76 (t, 4H, J = 6,3 Hz); EMBR (ESI): m/z 620,2 (MH⁺); HPLC (método 2): 4,3 min.

35

Ejemplo 36: Síntesis del compuesto 34

40 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 2 excepto porque se sustituyó el grupo de unión 2-(4-aminofenil)etilamina por 5-amino-2-metilbencilamina. Sólido de color amarillo claro. ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,75-6,92 (m, 15H), 6,64 (d, 2H, J = 8,0 Hz), 4,52 (s, 2H), 3,68-3,41 (m, 6H), 2,73 (m, 2H), 2,30 (s, 3H); EMBR (ESI): m/z 670,2 (MH⁺); HPLC (método 2): 4,4 min.

40

Ejemplo 37: Síntesis del compuesto 35

45 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 2 excepto porque se sustituyó el grupo de unión 2-(4-aminofenil)etilamina por 3-aminobencilamina. Sólido naranja; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,75-6,64 (m, 18H), 4,37 (s, 2H), 3,77-3,39 (m, 6H), 2,79 (m, 2H); EMBR (ESI): m/z 656,2 (MH⁺); HPLC (método 3): 2,4 min.

Ejemplo 38: Síntesis del compuesto 36

50 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 1 excepto porque se sustituyó la 2-(4-hidroxifenil)etilamina por 2-(4-aminofenil)etilamina y el grupo de unión etilendiamina por piperazina. Sólido rosa; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,75-6,68 (m, 18H), 3,98-3,65 (m, 16H), 2,77 (m, 4H); EMBR (ESI): m/z 695,2 (MH⁺); HPLC (método 3): 2,2 min.

Ejemplo 39: Síntesis del compuesto 37

55 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 2 excepto porque se sustituyó la etanolamina por 2-(4-hidroxifenil)etilamina y el grupo de unión 2-(4-aminofenil)etilamina por 2-aminobencilamina. Sólido blanco; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,62-6,60 (m, 22H), 4,44-4,38 (m, 2H), 3,53-3,47 (m, 4H), 2,80-2,72 (m, 4H); EMBR (ESI): m/z 733,2 (MH⁺); HPLC (método 2): 6,5 min.

60

Ejemplo 40: Síntesis del compuesto 38

65 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 9 excepto porque se sustituyó la N-1-terc-butiloxycarbonil-1,3-fenilendiamina por anilina, la 2-(4-aminofenil)etilamina por 2-(4-hidroxifenil)etilamina y el grupo de unión etilendiamina por 1,3-fenilendiamina. Sólido de color amarillo claro; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,61 (m, 4H), 7,29-6,92 (m, 14H), 6,69 (d, 4H, J = 7,4 Hz), 3,52 (t, 4H, J = 7,2 Hz), 2,79 (t, 4H, J = 7,2 Hz); EMBR (FAB+): m/z

719,4 (MH⁺); EMBR (ESI): m/z 719,2 (MH⁺); HPLC (método 1): 8,6 min.

Ejemplo 41: Síntesis del compuesto 39

5 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 1 excepto porque en primer lugar se trató la monoclorotriazina con (R)-fenilglicinol y trietilamina y se trató el producto obtenido con hidruro de sodio. Sólido blanco; ¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 7,69-6,61 (m, 23 H), 5,15 (m, 1H), 3,96-3,37 (m, 6H), 2,89 (m, 4H); EMBR (ESI): m/z 748,2 (MH⁺); HPLC (método 1): 8,8 min.

10 Ejemplo 42: Síntesis del compuesto 40

Se preparó el compuesto anterior usando el procedimiento en fase sólida descrito en el ejemplo 3 partiendo de anilina y etilendiamina. EMBR (ESI): m/z 670,4 (MH⁺), 692,2 (M+Na); HPLC (método 2): 4,2 min.

15 Ejemplo 43: Síntesis del compuesto 41

Se preparó el compuesto anterior mediante el método B (esquema 1) partiendo de N-1-terc-butiloxicarbonil-1,3-fenilendiamina y p-xilendiamina. Se sustituyó la 2-(4-hidroxifenil)etilamina por gas amoníaco. Sólido amarillo; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,83 (m, 2H), 7,69 (m, 2H), 7,41 (m, 6H), 7,12 (m, 2H), 4,63 (m, 4H); ¹⁹F-RMN (376 MHz, CD₃OD, trifluorotolueno de inserción coaxial): 2 TFA; EMBR (ESI): m/z 537,4 (MH⁺), 559,2 (M+Na); HPLC (método 5): 4,1 min.

Ejemplo 44: Síntesis del compuesto 42

25 Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 2 partiendo de N-1-terc-butiloxicarbonil-1,3-fenilendiamina. Se sustituyó la 2-(4-aminofenil)etilamina por etanolamina y el grupo de unión 2-(4-aminofenil)etilamina por 4-aminobencilamina. Sólido de color amarillo pálido; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,10-7,87 (m, 1H); 7,86-7,70 (m, 4H); 7,69-7,58 (m, 2H); 7,57-7,40 (m, 5H); 7,20-7,06 (m, 3H); 4,74 (s, 2H); 3,79-3,71 (m, 2H); 3,68-3,56 (m, 2H); EMBR (ESI) m/z 658 (MH⁺), 680 (M+Na); HPLC (método 5): 5,7 min.

30

Ejemplo 45: Síntesis del compuesto 43

Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 2 partiendo de N-1-terc-butiloxicarbonil-1,3-fenilendiamina. Se sustituyó la 2-(4-aminofenil)etilamina por etanolamina y el grupo de unión 2-(4-aminofenil)etilamina por 3-aminobencilamina. Sólido de color amarillo pálido; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,06-7,90 (m, 1H); 7,85-7,67 (m, 4H); 7,66-7,57 (m, 2H); 7,56-7,38 (m, 5H); 7,20-7,08 (m, 3H); 4,77 (s, 2H); 3,76-3,72 (m, 2H); 3,68-3,56 (m, 2H); EMBR (ESI) m/z 658 (MH⁺), 680 (M+Na); HPLC (método 5): 5,7 min.

35

Ejemplo 46: Síntesis del compuesto 44

40

Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 2 partiendo de N-1-terc-butiloxicarbonil-1,3-fenilendiamina. Se sustituyó la 2-(4-aminofenil)etilamina por etanolamina y el grupo de unión 2-(4-aminofenil)etilamina por piperazina. Sólido blanquecino; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,10-7,82 (m, 3H); 7,80-7,65 (m, 2H); 7,63-7,57 (m, 2H); 7,52 (t, J = 8,2 Hz, 2H); 7,31-7,19 (m, 1H); 7,11 (d, J = 8,0 Hz, 2H); 4,09 (s, 8H); 3,81-3,70 (m, 2H); 3,60-3,53 (m, 2H); EMBR (ESI) m/z 622 (MH⁺), 644 (M+Na); HPLC (método 5): 5,9 min.

45

Ejemplo 47: Síntesis del compuesto 45

Se preparó el compuesto anterior como en el ejemplo 2 partiendo de N-1-terc-butiloxicarbonil-1,3-fenilendiamina y amoníaco. Se sustituyó la 2-(4-aminofenil)etilamina por 3-aminobencilamina y el grupo de unión 2-(4-aminofenil)etilamina por 4-aminobencilamina. Sólido amarillo; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,85-7,24 (m, 14H), 7,14 (m, 2H), 4,72 (m, 4H); EMBR (ESI): m/z 628,4 (MH⁺), 651,2 (M+Na); HPLC (método 4): 2,7 min.

50

Ejemplo 48: Síntesis del compuesto 46

55

Se preparó el compuesto anterior mediante el método B (esquema 1) partiendo de N-1-terc-butiloxicarbonil-1,3-fenilendiamina y 1,3-fenilendiamina. Se sustituyó la 2-(4-hidroxifenil)etilamina por etanolamina y gas amoníaco. Sólido blanco; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,69 (m, 3H), 7,42 (m, 6H), 7,08 (m, 3H), 3,73 (m, 2H), 3,64 (m, 2H); EMBR (ESI): m/z 553,4 (MH⁺), 575,6 (M+Na); HPLC (método 4): 2,0 min.

60

Ejemplo 49: Síntesis del compuesto 47

Se preparó el compuesto anterior mediante el método B (esquema 1) partiendo de N-1-terc-butiloxicarbonil-1,3-fenilendiamina y 1,4-fenilendiamina. Se sustituyó la 2-(4-hidroxifenil)etilamina por etanolamina. Sólido blanco; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,74 (m, 2H), 7,69 (m, 6H), 7,53 (m, 2H), 7,19 (m, 2H), 3,77 (m, 4H), 3,64 (m, 4H);

65

EMBR (ESI): m/z 597,4 (MH⁺), 619,6 (M+Na); HPLC (método 4): 2,3 min.

Ejemplo 50: Síntesis del compuesto 48

5 Se preparó el compuesto anterior mediante el método B (esquema 1) partiendo de N-1-terc-butiloxycarbonil-1,3-fenilendiamina y p-xilendiamina. Se sustituyó la 2-(4-hidroxifenil)etilamina por 4-aminobencilamina. Sólido amarillo; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,75-7,23 (m, 18H), 7,38 (m, 2H), 4,71 (m, 8H); EMBR (ESI): m/z 747,4 (MH⁺); HPLC (método 4): 3,5 min.

10 Ejemplo 51: Síntesis del compuesto 49

Se preparó el compuesto anterior mediante el método B (esquema 1) partiendo de N-1-terc-butiloxycarbonil-1,3-fenilendiamina y 1,3-fenilendiamina. Se sustituyó la 2-(4-hidroxifenil)etilamina por etanolamina. Sólido blanco ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,71 (m, 3H), 7,48 (m, 6H), 7,11 (m, 3H), 3,74 (m, 4H), 3,65 (m, 4H); EMBR (ESI): m/z 597,2 (MH⁺); HPLC (método 4): 2,2 min.

15 Ejemplo 52: Síntesis del compuesto 50

Se preparó el compuesto anterior mediante el método B (esquema 1) partiendo de N-1-terc-butiloxycarbonil-1,3-fenilendiamina y 1,3-fenilendiamina. Se sustituyó la 2-(4-hidroxifenil)etilamina por serinol. Sólido marrón; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,20-7,00 (m, 12H), 3,75 (m, 8H), 3,64 (m, 2H); EMBR (ESI) : m/z 657,4 (MH⁺); HPLC (método 5) : 4,5 min.

20 Ejemplo 53: Síntesis del compuesto 51

Se preparó el compuesto anterior mediante el método B (esquema 1) partiendo de N-1-terc-butiloxycarbonil-1,3-fenilendiamina y 1,3-fenilendiamina. Se sustituyó la 2-(4-hidroxifenil)etilamina por gas amoníaco. Sólido blanquecino; ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,71 (m, 3H), 7,42 (m, 6H), 7,11 (m, 3H); EMBR (ESI): m/z 509,4 (MH⁺), 531,4 (M+Na); HPLC (método 4): 1,7 min.

25 Ejemplo 54: Capacidad de los compuestos para imitar a la proteína A según se determina mediante ELISA de unión a proteína A competitivo

Tal como se describió anteriormente, este ensayo evalúa la capacidad de los compuestos mostrados a modo de ejemplo para imitar a la proteína A. Tales compuestos pueden unirse a la parte de Fc de IgG humana tal como se determina mediante la inhibición de la unión de proteína A a IgG humana. Se realizó el ensayo ELISA de unión a proteína A competitivo en una superficie Maxisorp de placa de 96 pocillos para potenciar la unión de proteína A al fondo de la placa. Se recubrieron los pocillos con 100 µl de proteína A (0,8 µg) y se incubaron durante la noche a 4°C. Tras la incubación, se eliminó la proteína A no unida mediante tres lavados con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Entonces se incubó la placa con 100 µl/pocillo de una disolución al 2% de albúmina sérica bovina (BSA) durante 1 h a 37°C para bloquear la unión de proteína no específica. Tras la incubación, se lavó la placa tres veces con PBS. Se añadieron 50 µl del compuesto o la proteína A, diluidos en PBS o PBS-20% de DMSO a una concentración apropiada, a los pocillos seguido por la adición de 50 µl de IgG humana conjugada con peroxidasa (HRP-IgG). Tras 1 h de incubación a 37°C, se lavó la placa tres veces con PBS para eliminar la HRP-IgG no unida. Se detectó la HRP-IgG unida mediante incubación con 100 µl de disolución de cristales de sal de diamonio de 2,2'-azino-di[sulfonato de 3-etilbenzotiazolina] (ABTS) durante 20 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Entonces se leyó la placa a 405 nm en un lector de microplacas universal EL 800 (Bio-Tek). Se analizaron los datos en Microsoft Excel y se calculó la concentración de compuesto que inhibe el 50% de la unión de proteína A (CI₅₀) usando el software Prism.

La tabla 1 representa la CI₅₀ de compuestos sometidos a prueba en el ensayo ELISA de unión a proteína A competitivo, que consiste en un análisis lado a lado en PBS y PBS-20% de DMSO. Se usó DMSO para aumentar la solubilidad de algunos de los compuestos. Estos datos ilustran la capacidad de los compuestos de esta descripción para inhibir la unión de proteína A a la parte de Fc de IgG.

Tabla 1: CI₅₀ (µM) de compuestos que imitan a la proteína A según se determina mediante ELISA

N.º de compuesto	CI ₅₀ (µM): Ensayo en PBS	CI ₅₀ (µM): Ensayo en PBS-20% de DMSO
1		50
4	44	40
5		36
6	2,4	0,4

ES 2 501 169 T3

7	0,2	0,02
8		28
9		50
10	69	85
11b		45
12	23	39
13	33	70
14	33	63
15		35
16	36	55
17	53	12
18	26	43
19a	0,06	0,003
20		26
21		34
27		28
28		35
29	0,2	0,003
30	0,4	0,03
31	0,99	0,12
32	33	2
33	18	18
34	23	1
35	23	1
36		16
37		23
39		43
41	0,03	0,02
42	0,05	0,05
43	0,08	0,05
44	0,09	0,04
45	0,1	0,08
46	0,2	0,8
47	0,2	0,2
48	02	0,05
49	03	0,5
50	0,4	1
51	0,6	6

La tabla 2 resume la CI_{50} de cuatro compuestos que imitan a la proteína A potentes en comparación con proteína A soluble en el ensayo ELISA competitivo. Los resultados demuestran adicionalmente la capacidad de los compuestos que imitan a la proteína A para inhibir la unión de proteína A a IgG humana.

Tabla 2: CI_{50} (mM) de cuatro compuestos en comparación con proteína A en el ensayo ELISA competitivo

CI_{50} (n = 5 o 6)	Proteína A	Compuesto 19a	Compuesto 7	Compuesto 29	Compuesto 30
PBS	0,187 μ M	0,088 μ M	0,187 μ M	0,225 μ M	0,426 μ M
PBS-20% de DMSO	0,336 μ M	0,0035 μ M	0,0217 μ M	0,0029 μ M	0,033 μ M

Ejemplo 55: Efecto de los compuestos sobre la fagocitosis de complejos inmunitarios

- 5 Se realizó este ensayo para determinar la capacidad de los compuestos que imitan a la proteína A para estimular o inhibir la captación de FITC-complejo inmunitario (IC). Se preparó FITC-IC mezclando albúmina sérica humana (HSA)-isotiocianato de fluoresceína (FITC) con IgG de ratón anti-HSA a una razón de 1:4 (cuatro moléculas de anticuerpo por una molécula de antígeno) en un agitador rotatorio durante 1 h a temperatura ambiente. Entonces se incubó IC soluble con o sin compuestos o proteína A durante 10 min. Se añadió esta mezcla a células RAW 264.7 y se incubaron durante 2 h a 37°C para la fagocitosis de IC. Tras la incubación, se lavaron las células dos veces en PBS frío (5 min, 1200 rpm) y se fijaron con 500 μ l de PBS que contenía el 2% de formaldehído. Se determinó la señal de FITC captada por RAW 264.7, que es indicativa de la fagocitosis de IC, mediante análisis de citometría de flujo en un contador Becton Coulter con un láser de argón y se midió la señal a través de un filtro de 530/30 nm.
- 10
- 15 La figura 1 ilustra una curva de dosis-respuesta del compuesto 1 sobre la fagocitosis de IC con células RAW 264.7 (similar a macrófago). Los resultados muestran que la fagocitosis de IC es similar al control a una concentración inferior a 0,4 μ M del compuesto 1. Se observa un aumento de la fagocitosis de IC a concentraciones de 1, 2 y 4 μ M, seguido por una inhibición a 10 y 20 μ M (aproximadamente el 20%). También se emprendió la fagocitosis de IC con compuesto 14 y proteína A. La fagocitosis de IC se inhibe mediante el compuesto 14 (aproximadamente el 50% a 20 μ M) y proteína A (aproximadamente el 50% a 2 μ M y 20 μ M).
- 20

Ejemplo 56: Efecto de los compuestos sobre la apoptosis inducida por $TNF\alpha$ en la línea celular WEHI 13-VAR

- 25 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 actinomomicina D. Se incubaron 2×10^4 células WEHI-13VAR en RPMI complementado con el 1% de piruvato de sodio y el 10% de FBS, durante la noche a 37°C para la adherencia celular. Entonces se cultivaron las células en presencia de 1 μ g/ml de actinomomicina D (para inhibir la síntesis de proteínas) y $TNF\alpha$ 0,04 nM con o sin compuestos a 37°C. Tras 16-24 h, se añadieron 50 μ l de una disolución de 2 mg/ml de MTT a cada pocillo y entonces se incubó la placa durante 4 h a 37°C. Sólo 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 medio y células muertas. Se añadieron 150 μ l de DMSO a cada pocillo para detener la reacción y solubilizar la sal de formazán. Se leyó la densidad óptica en un lector de microplacas universal EL 800 (Bio-Tek). Una disminución de la densidad óptica es evidencia directa de apoptosis celular inducida por $TNF\alpha$. También se compararon los compuestos con la actividad de un anticuerpo neutralizante anti- $TNF\alpha$. Un valor negativo indica que los compuestos sometidos a prueba, a esa concentración particular, podían estimular la apoptosis.
- 30
- 35

- La tabla 3 representa el porcentaje de inhibición de $TNF\alpha$ (apoptosis) de los compuestos sometidos a prueba en el ensayo de proliferación de células WEHI-VAR13 sensibles a $TNF\alpha$ basado en células. Los compuestos demostraron una actividad inhibidora de $TNF\alpha$ en el intervalo del 30-50%. En comparación, el anticuerpo frente a $TNF\alpha$ demostró una actividad inhibidora de $TNF\alpha$ del 90-95%. Estos datos ilustran la capacidad de los compuestos de esta descripción para inhibir la actividad apoptótica de $TNF\alpha$ en células WEHI-VAR13 sensibles a $TNF\alpha$.
- 40

Tabla 3: Efecto de los compuestos sobre la inhibición de $TNF\alpha$.

N.º de compuesto	Ensayo en WEHI-13VAR, % de inhibición de la apoptosis			
	4×10^{-5} M	2×10^{-5} M	1×10^{-5} M	5×10^{-6} M
1	-3,8	17,7	36,8	14,3
2	48,3	48,4	43,7	37,3
3	33,9	44,6	32,7	0,5
4	44,0	25,3	11,2	2,4
5	35,4	38,7	35,1	28,9
12	-30	-28,4	-21,1	36,9
25	-17,8	-0,7	22,8	27,5
26	-11,5	38,0	27,3	9,7

42	30,4	0,5	-1,7	-3,1
45	32,9	4,1	2,9	-0,3

Ejemplo 57: Efecto de los compuestos sobre la unión de TNF α al receptor de TNF α p55 (CD120a) y el receptor de TNF α p75 (CD 120b)

5 Se sometieron a prueba compuestos para determinar su capacidad para unirse a TNF α o inhibir la interacción de TNF α con sus receptores respectivos; receptor de TNF α p55 y p75. Se emprendieron tres ensayos ELISA de unión tal como se describe por Mancini *et al.* Biochemical Pharmacology 58, 851-859 (1999). Se recubrió TNF α o receptor (1 μ g/ml) sobre una placa de 96 pocillos Maxisorp, durante la noche a 4°C. Tras la incubación, se eliminó TNF α o receptor de TNF α p55 o receptor de TNF α p75 no unidos y se lavó la placa tres veces con PBS. Entonces se incubó la placa con 100 μ l/pocillo de una disolución de BSA al 2% durante 1 h a 37°C para bloquear la unión de proteína no específica. Tras la incubación, se lavó la placa tres veces con PBS. Se añadió receptor de TNF α p55 o p75 humano recombinante biotinilado o TNF α humano recombinante biotinilado a los pocillos en presencia o ausencia de compuestos. Se incubó la placa durante 1 h a 37°C. Tras la incubación, se lavó la placa tres veces con PBS para eliminar receptor p55 o p75 marcado o TNF α humano recombinante no unidos. Se añadieron 100 μ l de avidina-HRP (diluida 1/2000 en PBS-0,1% de BSA) a cada pocillo y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se detectó receptor p55 o p75 o TNF α humano recombinante unidos mediante la adición de 200 μ l de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) por pocillo durante 15 min. Entonces se leyó la placa a 655 nm en un lector de microplacas universal EL 800 (Bio-Tek, Mississauga, Canadá). Se analizaron los datos en Microsoft Excel y se registraron como porcentaje de inhibición de la unión de p55 o p75 a TNF α o la unión de TNF α a RI (p55) o RII (p75).

20 La tabla 4 ilustra el efecto de los compuestos sobre la inhibición de la unión directa de RI y RII de TNF α a TNF α (recubierto sobre plástico) y TNF α con sus receptores (recubierto sobre plástico). Cuando se recubre TNF α sobre plástico, los compuestos no inhiben la unión de los receptores RI y RII a TNF α . Pero cuando se recubren los receptores sobre plástico, los compuestos inhiben la unión de TNF α a receptor RII y a receptor RI en menor grado. Los resultados sugieren que la inhibición parece no deberse a la unión directa del compuesto a receptor de TNF α sino, en vez de eso, a TNF α . Se consideró que una inhibición inferior al 20% no era significativa. Un porcentaje de inhibición negativo puede deberse a precipitación o a un aumento en la unión de TNF α a sus receptores respectivos.

Tabla 4. Efecto de los compuestos sobre la unión de RI o RII o TNF- α .

N.º de compuesto	Ensayo de unión de RI y RII a TNF				Ensayo de unión de TNF a receptores RI y RII de TNF			
	% de inhibición de la unión de sTNF-R1 a TNF- α		% de inhibición de la unión de sTNF-R2 a TNF- α		% de inhibición de la unión de TNF- α a TNF-R1		% de inhibición de la unión de TNF- α a TNF-R2	
	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M
1	2,7	0	0	0	46	28,9	63,3	38,4
4	2,19	4,5	5,26	2,06	-69,37	-47,43	-104,77	-86,7
5	1,54	2,95	2,68	4,31	15,4	4,6	38,5	21,2
7					32,6	10,4	36,9	43,3
12					-8,4	-35,7	3,8	-30,4
10a					13,3	-4	27,4	24,3
25	5,65	6,74	4,22	6,76	22,95	3,95	49,25	4,8

30 **Ejemplo 58: Efecto de los compuestos sobre la producción de TNF α inducida por LPS en la línea celular J774A-1 de ratón**

35 Se midió el efecto de los compuestos sobre la producción de TNF α mediante ELISA usando células J774-1 estimuladas mediante LPS. Se cultivaron células J774-1 en presencia o ausencia de LPS y compuesto. Se cultivaron las células a 37°C durante 24 h y posteriormente se recogieron los sobrenadantes para la determinación de la concentración de TNF α mediante ELISA tal como se recomienda por el fabricante (BD Biosciences). Se analizaron los datos en Microsoft Excel y se calculó la concentración de compuesto que inhibe el 50% de la producción de TNF α (CI₅₀) usando el software Prism.

40 La tabla 5 resume el efecto de los compuestos sobre la producción de TNF α inducida por LPS en células J774-1.

Tabla 5: Efecto de los compuestos sobre la inhibición de TNF α liberado mediante inducción por LPS a partir de células J774A.1.

N.º de compuesto	CI ₅₀ (µM)	N.º de compuesto	CI ₅₀ (µM)
1	9,2	18	10,2
3	28,0	19a	20,7
4	94,4	20	23,3
5	44,0	21	4,8
11a	45	22	62,1
11b	23,3	23	16,5
12	3,4	24	11,5
13	13,4	25	15,9
14	11,8	28	28,8
15	14,2	33	20,6
16	13,6	38	9,5
17	57,1	40	87,2

Ejemplo 59: efecto de los compuestos que imitan a la proteína A sobre la síntesis de proteínas, ARN, ADN y citotoxicidad celular de leucocitos mononucleares de sangre periférica (PBML).

Se obtuvieron PBML a partir de la sangre periférica de voluntarios sanos. Se sometió la sangre a centrifugación en gradiente con Lympholyte-poly (Cedarlane, Hornby, Canadá). Se recogió la capa que contiene los leucocitos mononucleares y se lavaron las células tres veces en PBS. Entonces se suspendieron las células en RPMI (Gibco, Burlington, Canadá) complementado con el 10% de FBS (Hyclone, Logan EE.UU.). La viabilidad fue superior al 99% según se determinó mediante exclusión con azul tripano.

Se resuspendieron PBML a 2×10^6 células/ml. Se incubaron 100 µl de PBML (2×10^5 células) en una placa de microtitulación de 96 pocillos durante 48 h en presencia o ausencia de compuesto o proteína A. Las células eran quiescentes o se estimularon con concanavalina A (ConA; células T) o mitógeno de fitolaca (PWM; células B). Tras la incubación, se trataron las células con MTT (citotoxicidad) o se sometieron a pulsos de 1 µCi 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 6 resume el efecto de los compuestos que imitan a la proteína A sobre la citotoxicidad celular, síntesis de proteínas, ARN y ADN en comparación con proteína A en PBML. La proteína A no tiene ningún efecto sobre la síntesis de proteínas, ARN y ADN. Además, no induce citotoxicidad celular. Sólo se observó citotoxicidad celular en PBML estimuladas con Con A, un mitógeno que estimula la proliferación de células T. No se observó ningún efecto citotóxico en PBML en reposo. La estimulación con PWM, un mitógeno que estimula la proliferación de células B, no se ve afectada por los compuestos que imitan a la proteína A. Además, los compuestos 1, 7 y 19a suprimen la síntesis de ADN y ARN en PBML tanto en reposo como estimulados (ConA y PWM). Sin embargo, sólo los compuestos 1 y 19a inhiben la síntesis de proteínas en PBML en reposo y estimulados. Estos resultados sugieren una supresión de células tanto T como B. Estas células están fuertemente implicadas en enfermedades autoinmunitarias. Tabla 6: Efecto de los compuestos que imitan a la proteína A sobre la síntesis de proteínas, ADN, ARN y citotoxicidad de PBML en reposo y estimulados.

N.º de compuesto	PBML (resultados de CI ₅₀ en µM)											
	Citotoxicidad			Síntesis de ADN			Síntesis de ARN			Síntesis de proteínas		
	En reposo	ConA	PWM	En reposo	ConA	PWM	En reposo	ConA	PWM	En reposo	ConA	PWM
	CI ₅₀			CI ₅₀			CI ₅₀			CI ₅₀		
Proteína A	>20	>20	>20	*	>20	>20	*	>20	>20	>20	*	*
1	>10	8,7	>10	2,49	1,42	0,77	1,1	0,92	0,66	6,48	2,44	2,96
7	>10	>10	>10	36	3,52	1,28	1,12	1,5	1,78	>10	>10	>10
19a	10	6,8	>10	1,9	1,57	4,38	0,399	0,693	0,398	9,9	3,91	4,88

* Aumento

Ejemplo 60: Efecto de los compuestos sobre lupus eritematoso sistémico (LES)-glomerulonefritis

5 Los ratones neozelandeses del cruce híbrido F1 NZBxNZW desarrollan la mayoría de las anomalías autoinmunitarias observadas en LES humano y mueren debido a glomerulonefritis mediada por complejo inmunitario (IC) similar a LES. Los ratones desarrollan altos títulos de anticuerpos anti-ADN (bicatenario y monocatenario) y frente a extracto nuclear (NE), así como manifestaciones clínicas relacionadas con LES incluyendo leucopenia, trombocitopenia, proteinuria y glomerulonefritis. Estos ratones desarrollan anticuerpos anti-ADN tras 3 meses de edad, produciéndose un máximo de respuesta de anticuerpos anti-ADN a los 7 meses. Posteriormente, la concentración en suero de anticuerpos anti-ADN disminuye, supuestamente como consecuencia de uremia progresiva. Las primeras manifestaciones serológicas de la enfermedad se producen aproximadamente a los 150 días (5 meses). Se evalúa su supervivencia aproximadamente a los 250 días.

15 La figura 2 ilustra el efecto del compuesto 1 sobre la mortalidad de los ratones NZBxNZW. Se emprendió la administración intravenosa de compuesto o vehículo una vez por semana desde la semana 18 hasta la semana 37. Se interrumpió el tratamiento durante 11 semanas y se reinició en la semana 48 para los grupos de control y compuesto 1. Los resultados indican que el compuesto 1 reduce la mortalidad de ratones NZBxNZW en la semana 37. También disminuye la aparición de síntomas y la mortalidad hasta la semana 45. La figura 3 ilustra la proteinuria en la semana 48 a 51. La cantidad de proteína superior a 5 g/litro en los ratones tratados con compuesto 1 fue superior al control debido a la cinética de la enfermedad (fase exponencial).

25 Pero con la continuación del tratamiento de la semana 48 a la semana 52 usando administración intravenosa semanal del vehículo o de compuesto, el compuesto 1 induce una disminución en la concentración de proteína (5 g/litro) en la orina en comparación con el vehículo solo (figura 3A). Además, se observa un aumento en la cantidad traza de proteína en orina en ratones tratados con compuesto 1 (figura 3B) que indica una mejora en la filtración renal.

30 En la figura 4 se presentan los resultados de un segundo LES. Los compuestos retrasan la mortalidad, tal como se observa mediante un aumento en la supervivencia de ratones NZBxNZW. Los compuestos 1 y 9 aumentan la supervivencia hasta el 35% en comparación con el grupo control. Además, el compuesto 1 prolongó la supervivencia hasta 89 semanas en comparación con 65 semanas para el control.

35 La figura 5 es un ejemplo del efecto de los compuestos sobre la supervivencia de ratones MRL/lpr. Estos ratones también desarrollan de manera espontánea un síndrome similar a LES. Los ratones MRL/lpr tienen una mutación fas homocigota, lo que acelera la autoinmunidad. Los compuestos retrasan la mortalidad tal como se observa mediante un aumento en la supervivencia de ratones MRL/lpr. Además, los compuestos 1 y 20 aumentan la supervivencia (40%) en comparación con el grupo control (10%).

40 **Ejemplo 61: Efecto de los compuestos sobre hipersensibilidad de tipo retardado inducida por oxazolona (DTH)**

45 Se sometieron a prueba compuestos para determinar su capacidad para tratar la hipersensibilidad de tipo retardado inducida por oxazolona (DTH) en ratones. En el día 0, se sensibilizaron ratones con 100 µl de oxazolona en acetona al 5%. En el día 0, 1 y 2, se trataron los ratones mediante administraciones intravenosas u orales del vehículo (control) o metotrexato (MTX; control positivo/i.v.) o hidrocortisona (control positivo/v.o.) o compuesto a de 50 mg/kg a 300 mg/kg de peso corporal. Se expusieron los ratones con una aplicación de 50 µl de oxazolona sobre la superficie de la oreja derecha (primera exposición, día 3; segunda exposición, día 10). Se midió el grosor de la oreja del día 4 al día 7, y del día 11 al 14. También se observaron el enrojecimiento y la formación de costra. Se sacrificaron los ratones en el día 14. Las células T_{DTH} (CD4) desempeñan un papel importante 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 esta inhibición de la activación de células T y la síntesis de ADN, ARN y/o proteínas.

55 Tal como se ilustra en las figuras 6 y 7, todos los compuestos inducen una reducción significativa de la inflamación tal como se observa por un grosor de oreja inferior. Además, el compuesto 19a solo es equipotente con respecto a metotrexato. Los compuestos también reducen el enrojecimiento, la formación de costra y el hinchamiento de la oreja.

60 Tal como se ilustra en la figura 8, cuando se administran por vía oral en el día 0, 1 y 2, los compuestos 1 y 19a inducen una reducción significativa de la inflamación tal como se observa por un grosor de oreja inferior. Además, los compuestos 1 y 19a solos son equipotentes con respecto a hidrocortisona a concentraciones de 150 mg/kg (compuesto 1) y 300 mg/kg (compuestos 1 y 19a) de peso corporal. Los compuestos también reducen el enrojecimiento, la formación de costra y el hinchamiento de la oreja.

65 **Ejemplo 62: Efecto de los compuestos sobre artritis inducida por colágeno**

Se indujo artritis inducida por colágeno (CIA) en ratas Lewis hembra mediante administración intradérmica de colágeno de tipo II heterólogo (bovino) (250 µg) solubilizado en ácido acético 0,1 M y emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA). Se trataron las ratas con el vehículo o metotrexato o compuesto 1 mediante inyecciones intravenosas en el día 8, 9, 12, 14 y 16. Normalmente se desarrolla sinovitis 12-15 días tras la inmunización en el 80-90% de los animales. Una vez que apareció la artritis, se examinó cada pata de dos a tres veces por semana. Se evaluaron tanto la incidencia como la intensidad de la artritis. La incidencia se define como el número de ratas con evidencias clínicas de inflamación de las articulaciones durante el periodo de estudio mientras que la intensidad se cuantificó puntuando diariamente cada pata con un número entero en una escala de 0 a 4 (0=normal, 4=máximo; tabla 7) basándose en niveles crecientes de hinchamiento, eritema periarticular y rigidez. Se calculó la suma de las puntuaciones para las cuatro patas como el índice artrítico con una puntuación máxima posible de 16 por rata. Dado que la CIA afecta principalmente a las extremidades traseras, puntuaciones de 6-8 representan artritis intensa.

Tabla 7: Definición de la puntuación de intensidad para modelos de artritis en ratas CIA y AIA

Puntuación de intensidad	Patología macroscópica
0	Sin evidencias de eritema ni hinchamiento
1	Eritema e hinchamiento leve confinado a la articulación del tobillo o mediopie (tarsianas)
2	Eritema e hinchamiento leve que se extiende desde el tobillo hasta el mediopie
3	Eritema e hinchamiento moderado que se extiende desde el tobillo hasta las articulaciones metatarsianas
4	Eritema e hinchamiento intenso que abarca el tobillo, el pie y los dedos

Tal como se ilustra en la figura 9, el 80-90% de los animales desarrollaron una sinovitis intensa tras 12-15 días tras la inmunización. La inflamación alcanza su máximo en el día 16. Se observó una reducción significativa (50%) en la intensidad de la artritis (índice artrítico) mediante inyección intravenosa de metotrexato (control positivo) en el día 14 y más allá. También se observó una reducción más débil pero significativa (20%) del índice artrítico con el compuesto 1 desde el día 16 hasta el día 21.

Ejemplo 63: Efecto de los compuestos sobre artritis inducida por adyuvante de Freund (AIA)

Se indujo AIA en ratas Lewis hembra mediante la inyección de *Mycobacterium butyricum* liofilizado suspendido en aceite mineral en la almohadilla plantar. Se monitorizó el desarrollo de artritis a lo largo de un periodo de 3 semanas tras la inyección de adyuvante. La inflamación presenta un máximo en el día 3 tras la administración de adyuvante. Aparece activación inmunitaria alrededor del día 14. Se administraron compuestos por vía oral o intravenosa a diferentes dosis en el día -3, -2 y -1 antes de la inyección de adyuvante y a un régimen diferente tal como se especifica en el experimento comenzando a partir del día 10 hasta el 21 tras la inyección de adyuvante o se trataron los animales con administración oral del compuesto 19a desde el día -3 hasta el día 21. Se registró el peso corporal. Se usó el índice de artritis, que es una medida de la inflamación (edema), enrojecimiento y 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. Entonces se calcula la circunferencia de la articulación usando una fórmula geométrica. Se evaluó tanto la incidencia como la intensidad de la artritis. La incidencia se define como el número de ratas con evidencias clínicas de inflamación de las articulaciones durante el periodo de estudio.

Tal como se ilustra en la figura 10, el 100% de los animales desarrollaron rápidamente sinovitis. La inflamación alcanza su máximo en el día 3 tras la inmunización. Se trataron los animales mediante administración intravenosa de compuestos en los días -3, -2, -1, 12, 13, 14, 18, 19 y 20. Se observó una reducción significativa (50%) en la intensidad de la artritis (índice inflamatorio) mediante inyección intravenosa de metotrexato (control positivo) en el día 19 y más allá. También se observó una reducción débil pero todavía significativa (20%) del índice inflamatorio con los compuestos 1 y 19a desde el día 3 hasta el día 5.

Además, en la figura 11, se observó una reducción significativa (hasta el 50%) en la intensidad de la artritis (índice inflamatorio) mediante inyecciones intravenosas (días -3, -2, -1, 11, 12 y 13) de los compuestos 1 y 19a sobre la inflamación aguda (días 1 a 6). Además, se observó una inhibición significativa de la inflamación tras la administración oral del compuesto 19a sobre la inflamación aguda en comparación con el control y metotrexato. También se observó una inhibición fuerte y significativa de la inflamación en la inflamación crónica (días 12 a 21) mediante el compuesto 19a (i.v.; días 12 a 19, v.o.; día 16) y metotrexato (días 15 a 21).

Cuando se administró el compuesto 19a por vía oral todos los días (días -3 a 21), se observó una inhibición significativa (hasta el 50%) de la inflamación desde el día 13 hasta el día 22 (figura 12).

Ejemplo 64: Uso de los compuestos para unirse a y purificar inmunoglobulinas

Tal como se indicó anteriormente, pueden usarse compuestos mostrados a modo de ejemplo como agentes de afinidad para unirse a anticuerpo y posteriormente aislar y purificar el anticuerpo a partir de una mezcla de proteínas. Tal purificación se logra convenientemente cuando el compuesto se une en primer lugar covalentemente, o bien directamente o bien mediante un grupo de unión, a un material de soporte insoluble. Por tanto, se trataron 101 g de perlas de agarosa al 6% reticuladas (con epíclorhidrina) activadas con epóxido con una disolución de ácido 6-aminohexanoico (8,0 g, 61 mmol) en agua (101 ml) y se ajustó la suspensión espesa a pH = 12 con NaOH 2 M. Se agitó la reacción en una placa balanceante durante 44 h. Se filtraron las perlas, se lavaron con agua (5 x 100 ml), después se resuspendieron en agua (100 ml) y se trataron con una disolución de borohidruro de sodio (202 mg, 5,34 mmol) en NaOH 10 M (20 ml). Se agitó la reacción en una placa balanceante durante 25 h. Se filtraron las perlas, se lavaron con agua (11 x 200 ml) hasta que el pH del filtrado fue neutro y se liofilizó una muestra del gel para el análisis elemental: C 47,366%; H 6,966%; N 0,990%. Basándose en un átomo de nitrógeno por molécula de ácido 6-aminohexanoico, esto corresponde a una carga de 707 micromol/g de gel liofilizado. Se trató el gel sedimentado (4 g) con una disolución del compuesto 19b (275 mg, 0,30 mmol) en agua ajustada a pH = 4,5 (3,0 ml). Se añadió una disolución de clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (400 mg, 2,09 mmol) en agua ajustada a pH = 4,5 (3,0 ml) a la reacción que entonces se agitó en una placa balanceante durante 21 h. Se filtró la suspensión espesa, se lavó con HCl 0,1 M (3 x 10 ml) y agua (10 x 8 ml) para proporcionar un gel de color marrón pálido. Se equilibró el gel empaquetado (200 µl en una columna de centrifugación) en PBS 20 mM (pH = 7). En este formato, puede usarse el compuesto mostrado a modo de ejemplo inmovilizado en un soporte sólido para la purificación de anticuerpo.

La unión a fase sólida evalúa los compuestos mostrados a modo de ejemplo por su capacidad para unirse a, eliminar y/o purificar inmunoglobulinas. Se unieron compuestos mostrados a modo de ejemplo o bien directamente o bien con un grupo de unión orgánico a un material de soporte insoluble (resina). Se empaquetó el gel (compuesto mostrado a modo de ejemplo unido a la resina) en una columna de centrifugación. Se equilibraron 200 µl de gel empaquetado en tampón fosfato de sodio 20 mM (pH = 7). Se introdujo IgG humana total (Sigma, St. Louis, EE.UU.; IgG humana purificada aislada a partir de suero humano normal combinado) (véase el carril 2 de la figura 13) a través del gel y se recogió la fracción no retenida (véase el carril 3 de la figura 13). Se lavó el gel con cinco volúmenes de columna de tampón fosfato de sodio 20 mM (pH = 7) más NaCl 0,25 M. Se recogieron las fracciones de lavado (véase el carril 4 de la figura 13). Se eluyeron las IgG unidas a pH bajo con ácido cítrico 0,1 M (pH = 3). Se recogió la IgG eluida (véase el carril 5 de la figura 13) y después se neutralizó con Tris HCl (pH = 8). Se realizó la SDS-PAGE (12%) de las fracciones recogidas y se visualizaron las proteínas usando tinción con azul de Coomassie. Tal como se representa en la figura 13, hasta el 80% de IgG humana total se unió y se purificó cuando se unió compuesto 19b a resina mediante un grupo de unión de ácido aminohehexanoico.

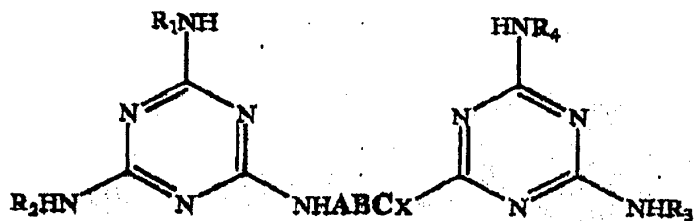
Todas las modificaciones y sustituciones que entren dentro del significado de las reivindicaciones y el alcance de sus equivalentes legales deben quedar abarcadas dentro de su alcance. Una reivindicación que usa la transición "que comprende" permite que la inclusión de otros elementos esté dentro del alcance de la reivindicación; la invención también se describe por tales reivindicaciones que usan la frase de transición "que consiste esencialmente en" (es decir, que permite que la inclusión de otros elementos esté dentro del alcance de la reivindicación si no afectan materialmente al funcionamiento de la invención) y la transición "que consiste en" (es decir, que sólo permite los elementos indicados en la reivindicación aparte de impurezas o actividades sin consecuencia que están habitualmente asociadas con la invención) en vez del término "que comprende". Cualquiera de las tres transiciones puede usarse para reivindicar la invención.

Debe entenderse que no debe interpretarse que un elemento descrito en esta memoria descriptiva es 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 a partir de la memoria descriptiva que se interprete que esté incluida en las reivindicaciones. En contraste, la técnica anterior se excluye explícitamente de la invención en la medida de realizaciones específicas que anticiparían la invención reivindicada o destruirían la novedad.

Además, no se pretende ninguna relación particular entre limitaciones de una reivindicación a menos que tal relación se mencione explícitamente en la reivindicación (por ejemplo, la disposición de componentes en una reivindicación de producto o el orden de etapas en una reivindicación de método no es una limitación de la reivindicación a menos que se mencione explícitamente que lo es).

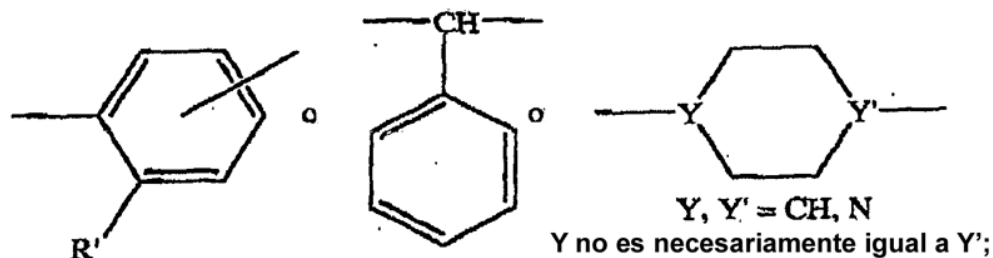
REIVINDICACIONES

1. Compuesto para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, de la siguiente fórmula:

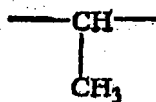


en la que A = $-(CH_2)_n-$, n = 0, 1, 2;

B = 0 o



C = $-(CH_2)_n-$, n = 0, 1, 2; o



X = NH, O, S;

R¹ = hidrógeno o alquilo C₁₋₄; y

A no es necesariamente igual a C;

en la que R₁ y R₄ se seleccionan del grupo que consiste en hidroxietilo, hidroxipropilo, hidroxibutilo, amino, aminoetil, aminopropilo, aminobutilo, fenilo, anilino, hidroxifenilo y aminofenetilo; y

R₂ y R₃ se seleccionan del grupo que consiste en anilino, aminoanilino, fenetilo, hidroxifenetilo, y

en la que uno, dos, tres o todos los sustituyentes R₁, R₂, R₃, R₄ son

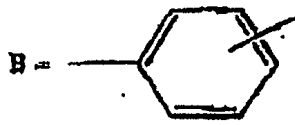


2. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que:

A = $-(CH_2)_n-$, n = 0, 1, 2;

C = $-(CH_2)_n-$, n = 0, 1, 2;

A no es necesariamente igual a C; y



3. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que:

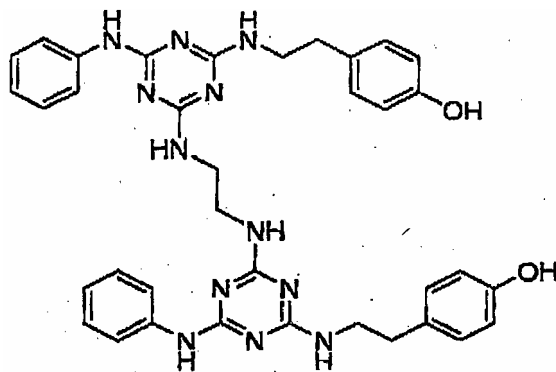
5 A = C = -CH₂- y B = 0.

4. Compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

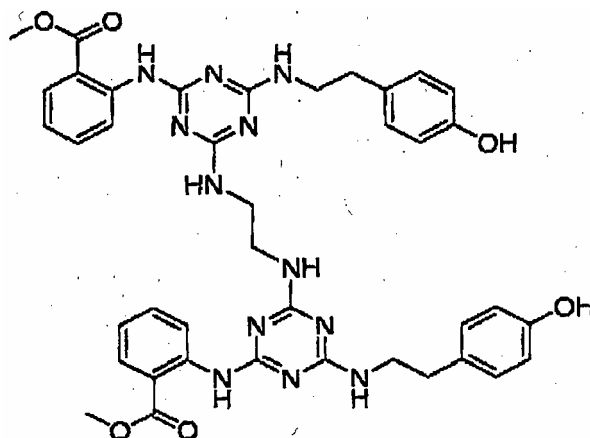
N.º de compuesto

Estructura

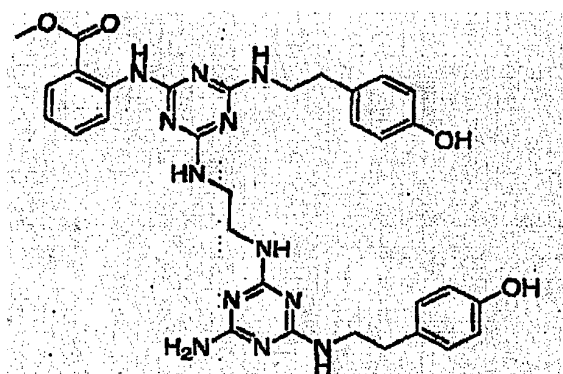
1



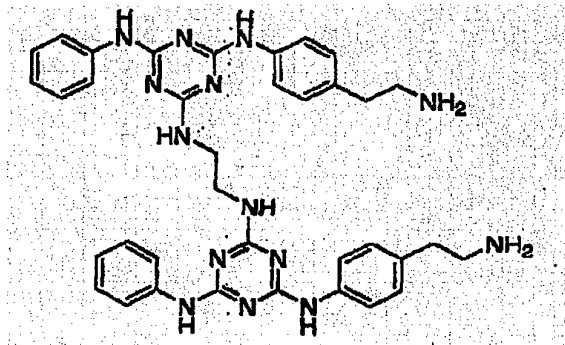
2



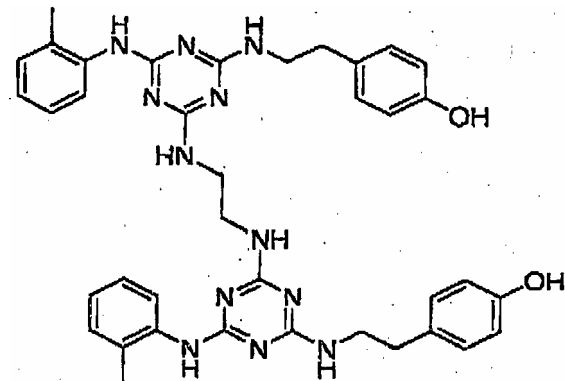
3



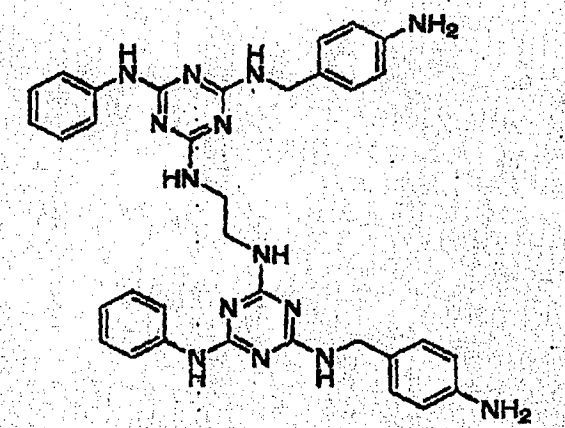
4



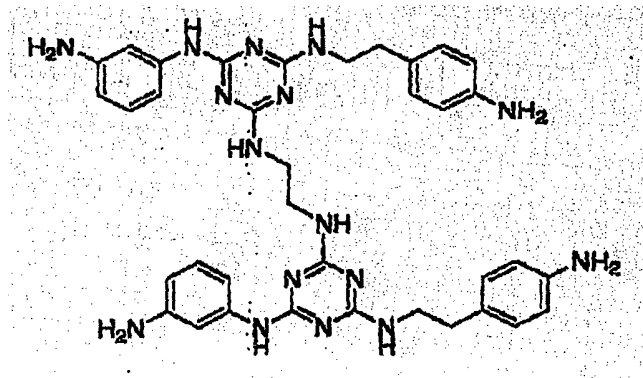
5



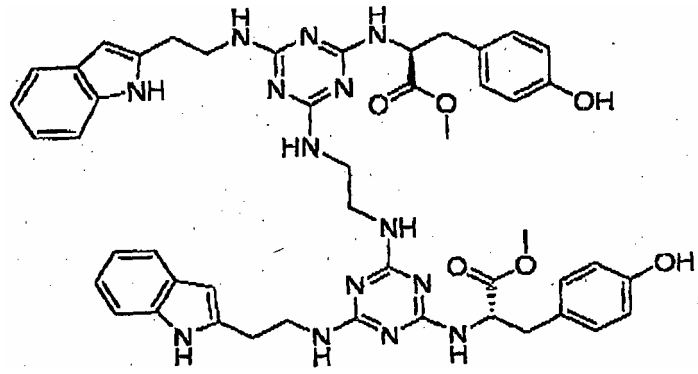
6



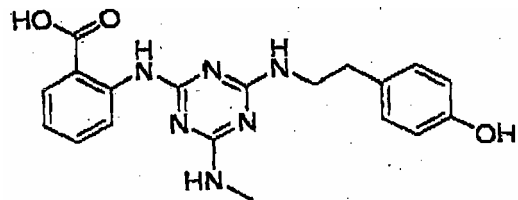
7



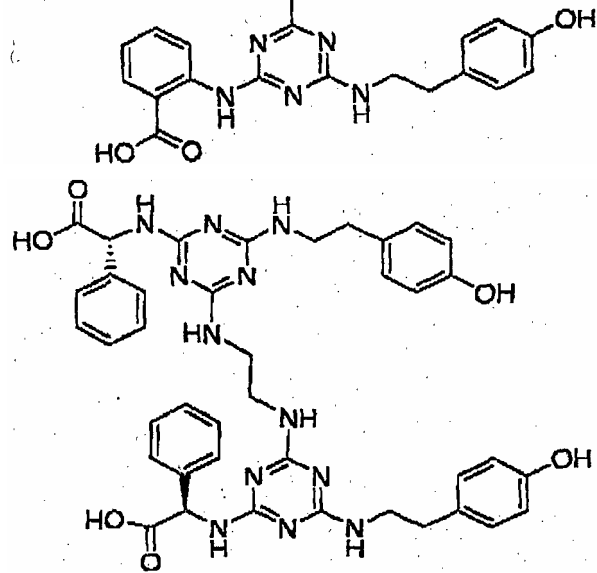
8



9



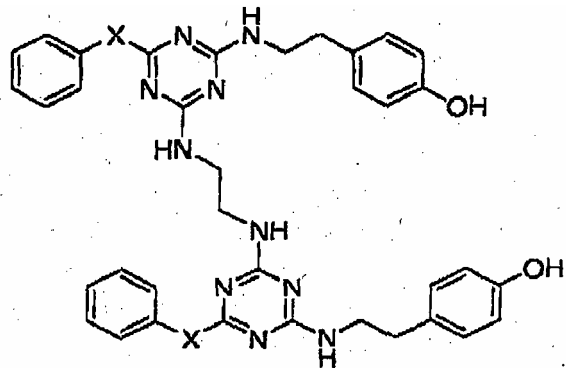
10



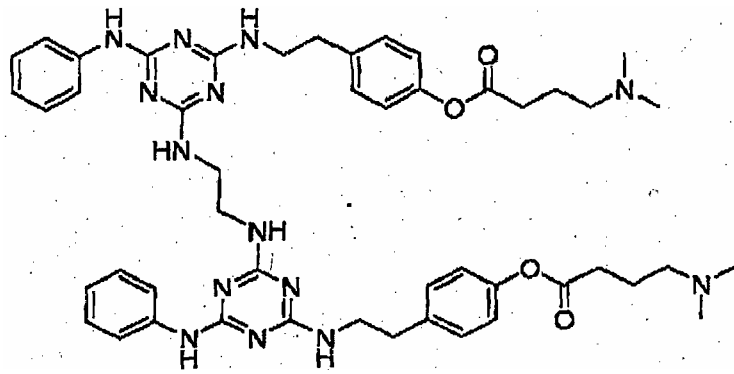
11a

11b

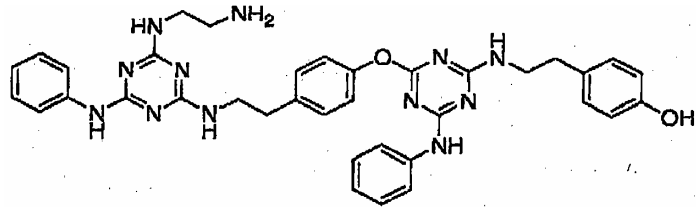
X = O
X = S



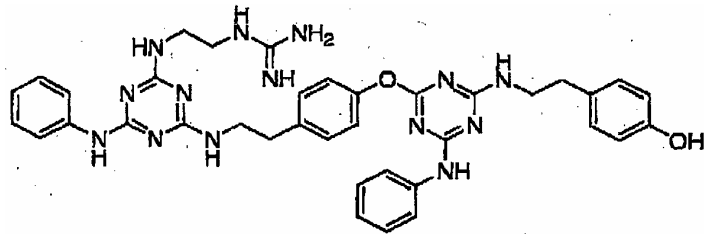
12



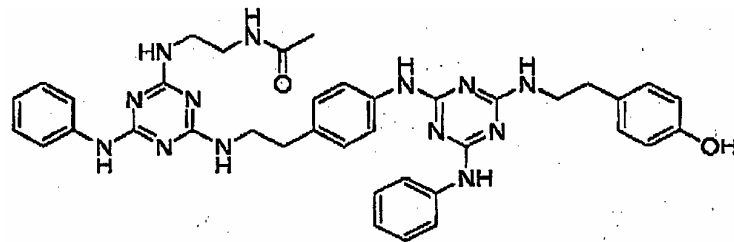
13



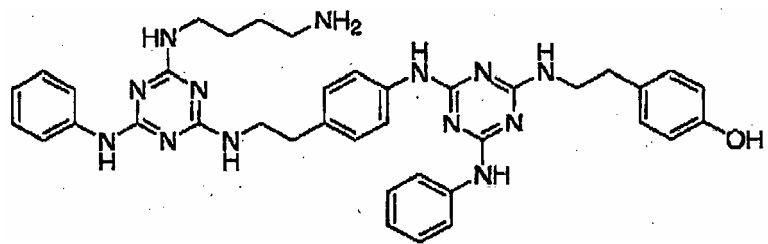
14



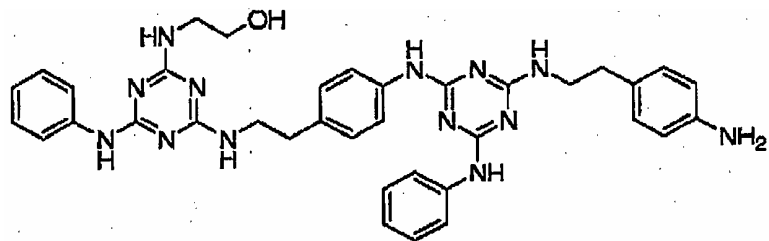
15



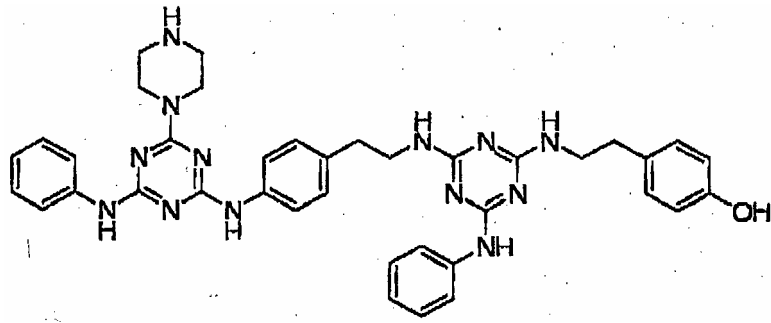
16



17



18

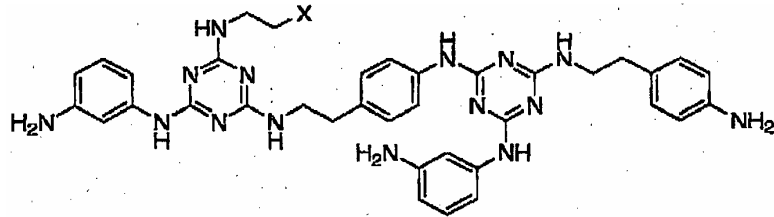


19a

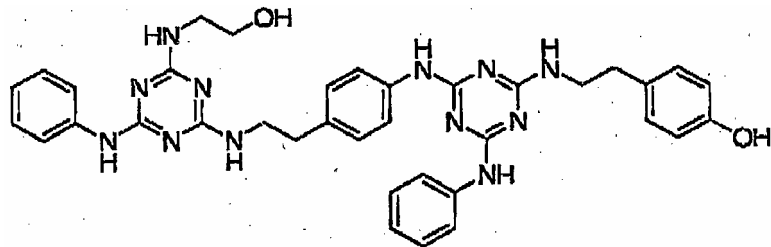
X = OH

19b

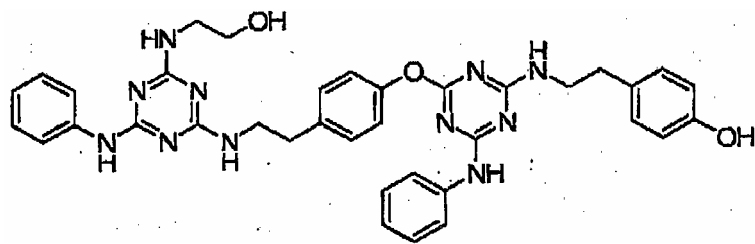
X = NH₂



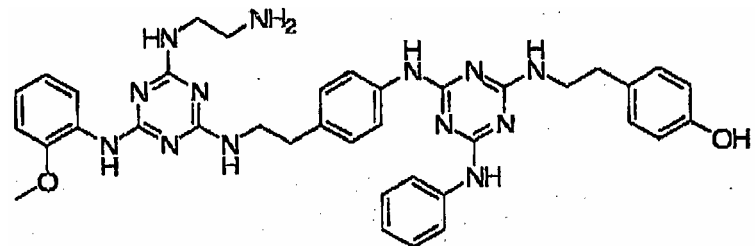
20



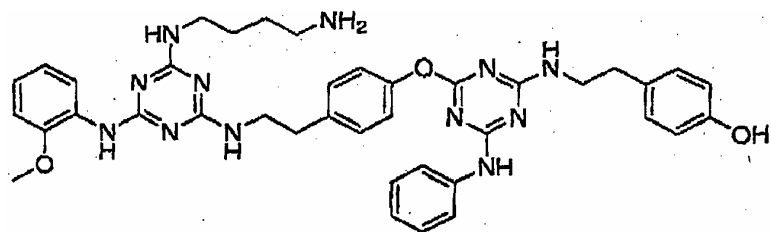
21



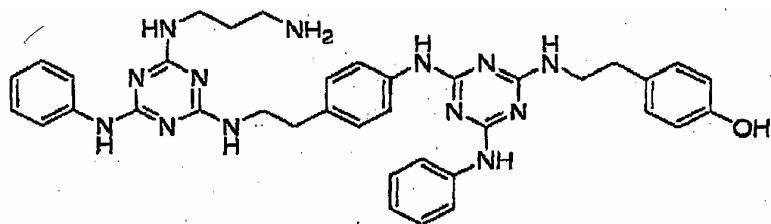
22



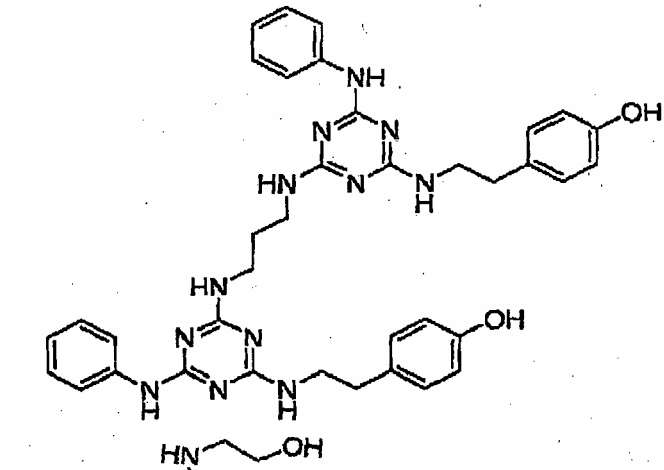
23



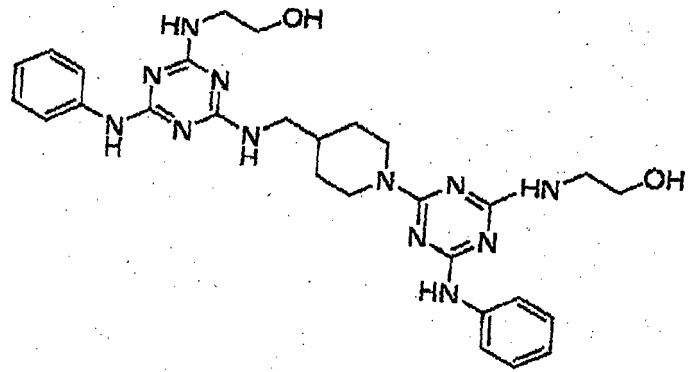
24



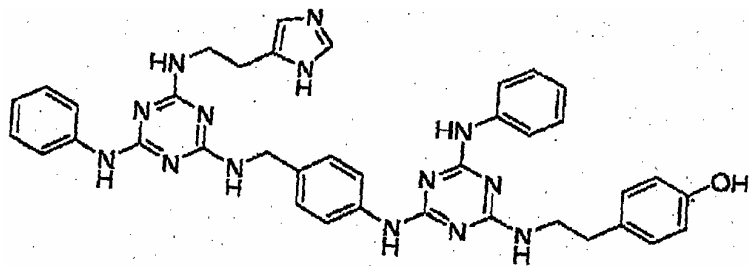
25



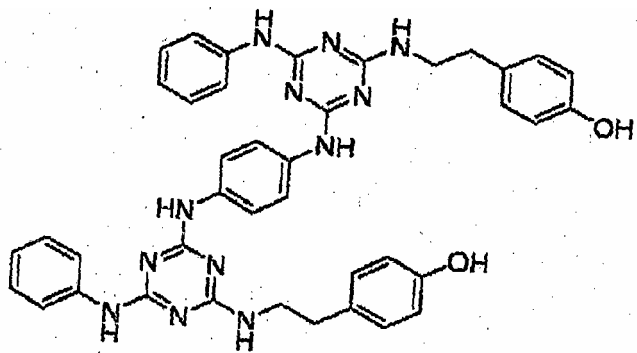
26



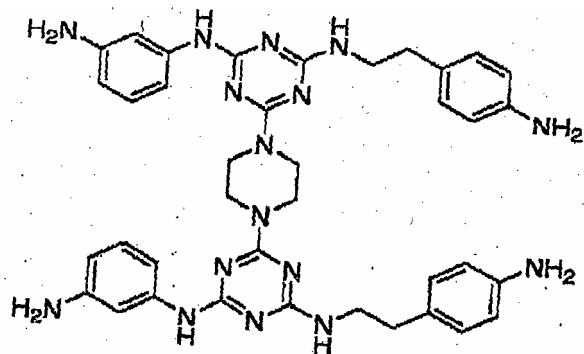
27



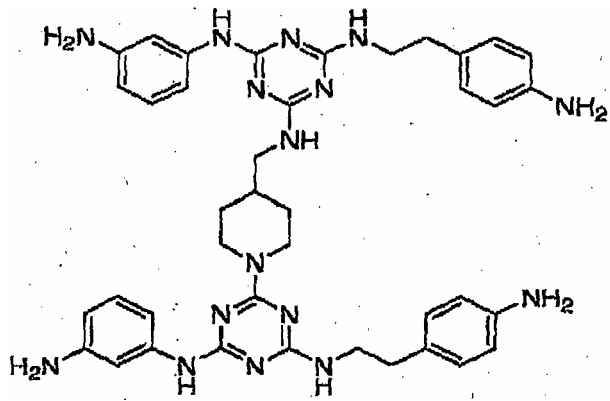
28



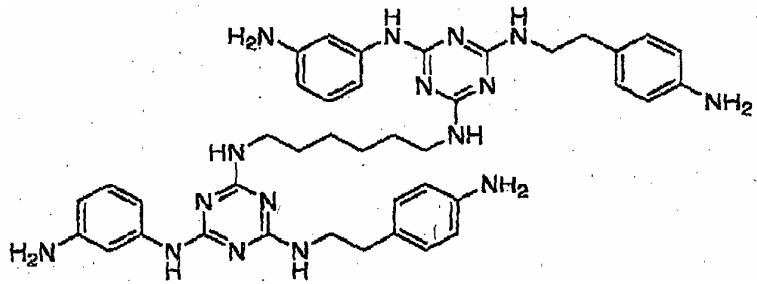
29



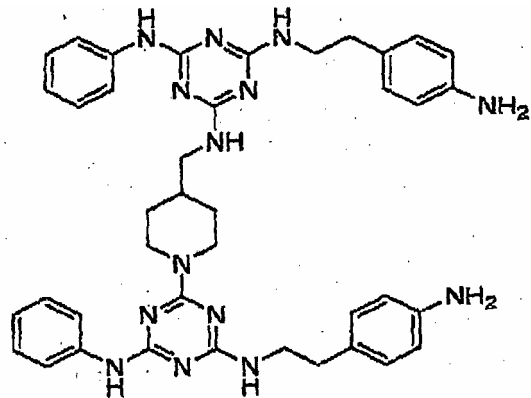
30



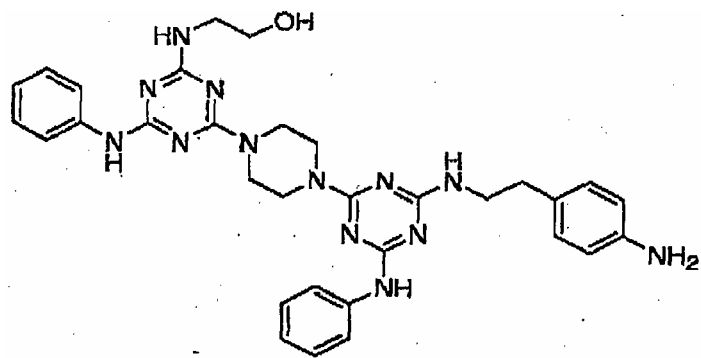
31



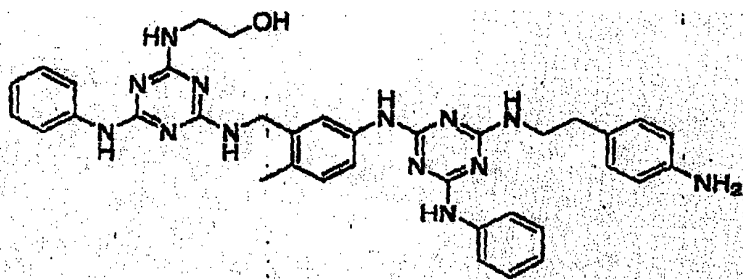
32



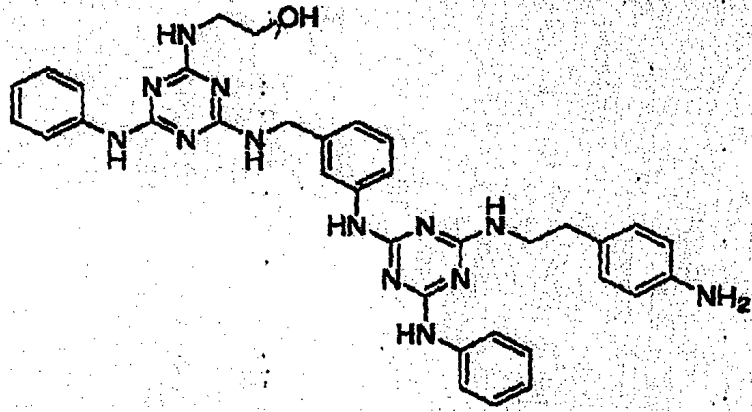
33



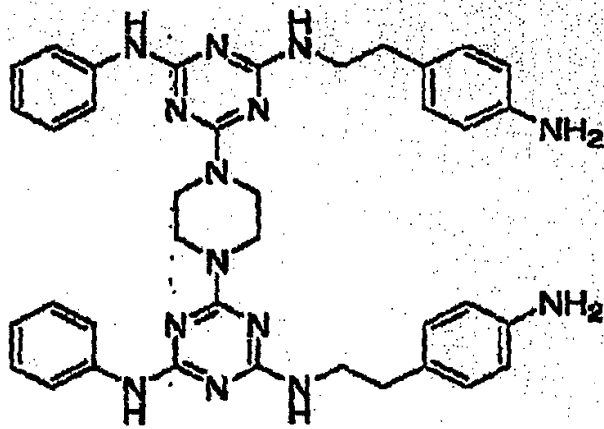
34



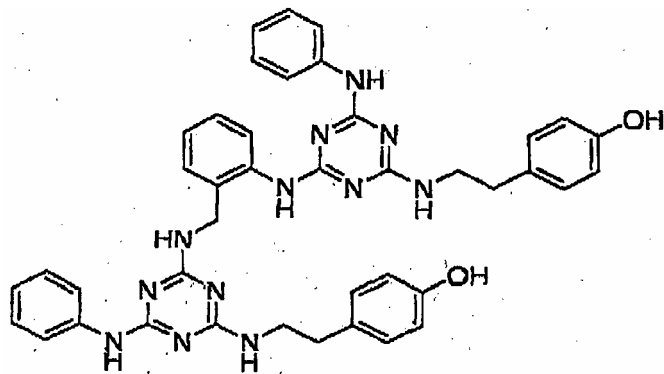
33



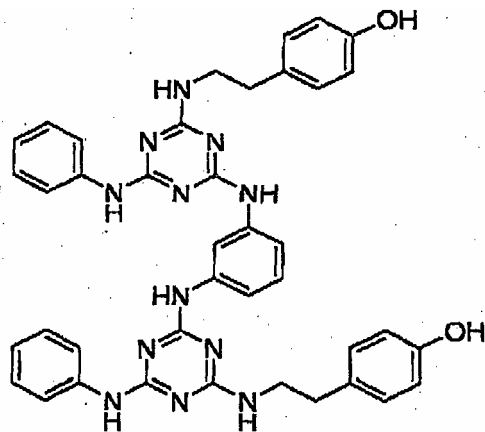
36



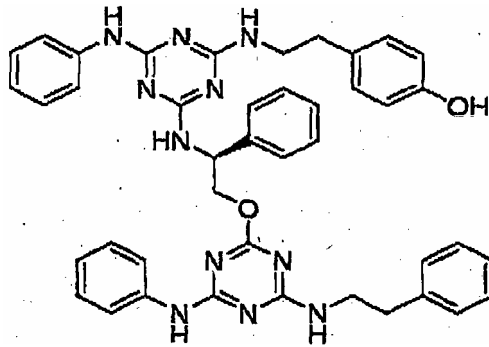
37



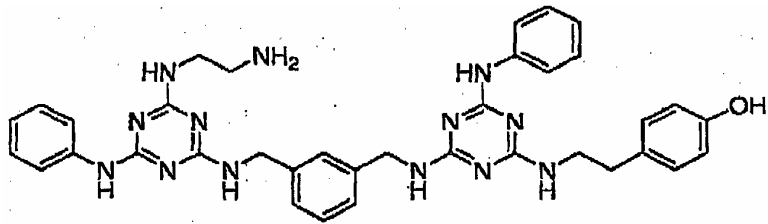
38



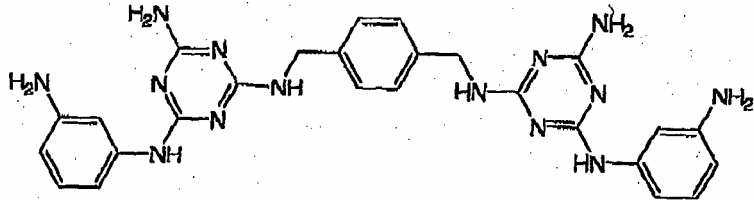
39



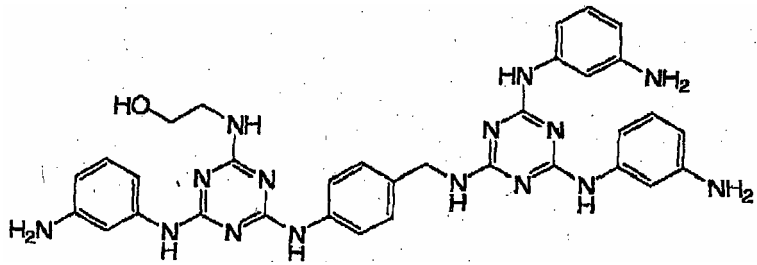
40



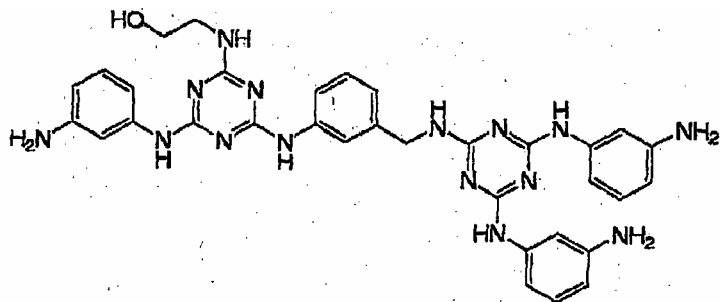
41



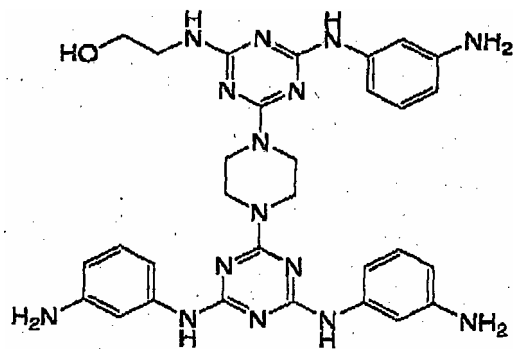
42

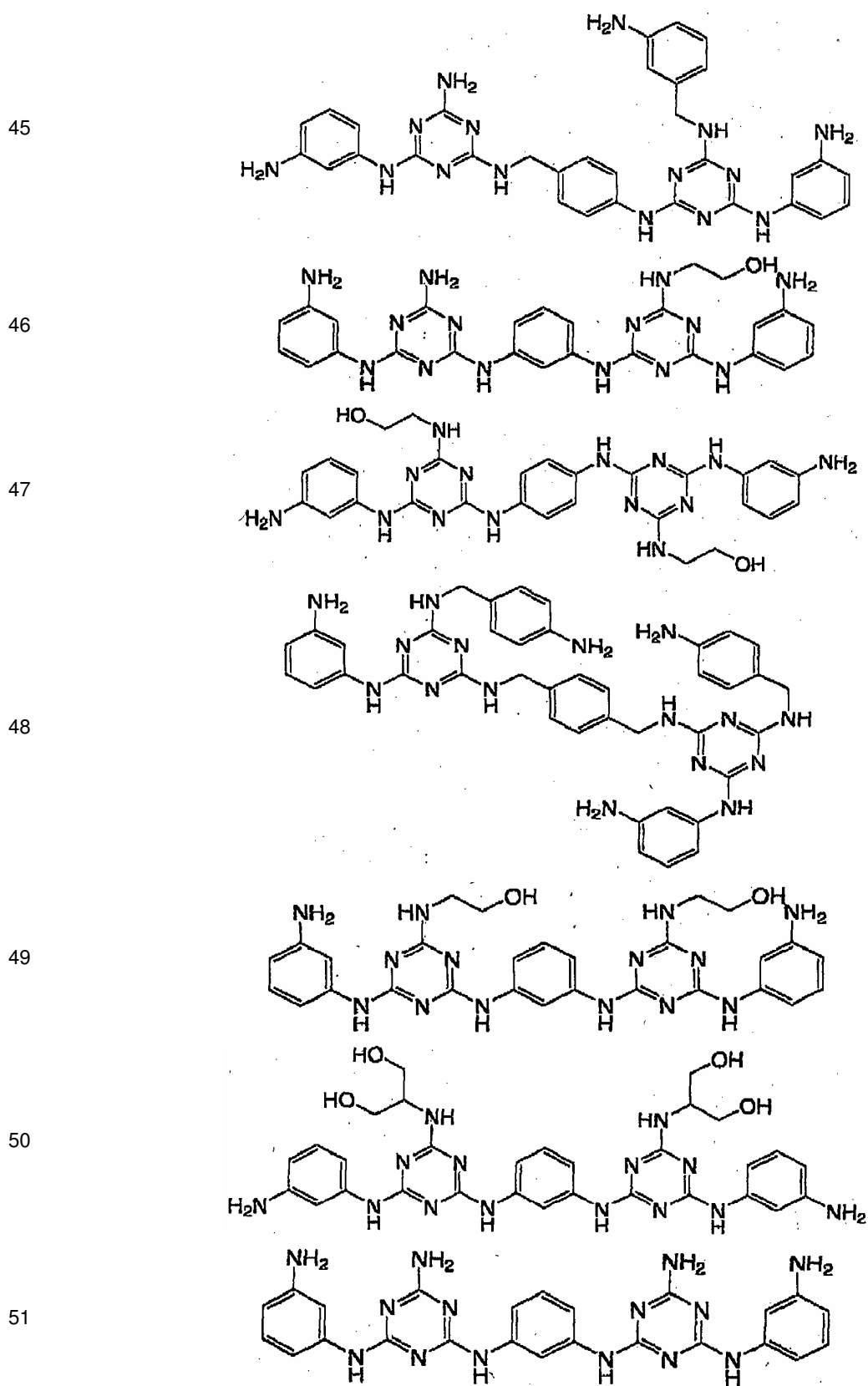


43



44





5. Compuesto según la reivindicación 2, independiente de su uso, en el que A y C no son iguales.

6. Composición compuesta por al menos un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, en la que dicho compuesto se combina con un portador farmacéuticamente aceptable.

7. Composición para su uso según la reivindicación 6, en el que dicho portador solubiliza dicho compuesto en un disolvente de alcohol o poliol.
- 5 8. Composición para su uso según la reivindicación 6, compuesta además por una proteína recombinante que puede unirse a TNF α humano.
9. Composición para su uso según la reivindicación 8, en la que dicha proteína recombinante es anticuerpo anti-TNF α o receptor de TNF α soluble.
- 10 10. Composición para su uso según la reivindicación 6, compuesta además por metotrexato.
11. Composición para su uso según la reivindicación 6, compuesta además por un corticosteroide inflamatorio.
- 15 12. Composición para su uso según la reivindicación 6, compuesta además por un fármaco antiinflamatorio no esteroideo.
- 20 13. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, trombocitopenia inmunitaria, glomerulonefritis, vasculitis y artritis.
- 25 14. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis psoriásica, psoriasis, enfermedades de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, espondilitis anquilosante, síndrome de Sjögren, enfermedad de Still (síndrome de activación de macrófagos), uveítis, esclerodermia, miositis, síndrome de Reiter y síndrome de Wegener.
- 30 15. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso con la administración simultánea de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína recombinante que puede unirse a TNF α humano, en el que dicha cantidad terapéuticamente eficaz de proteína recombinante se reduce en presencia de dicho compuesto.
- 35 16. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso con la administración separada de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína recombinante que puede unirse a TNF α humano antes y/o después de la administración de dicho compuesto, pero no administración simultánea.
- 40 17. Método de eliminación de anticuerpos humanos de la sangre u otro fluido fisiológico a través de una columna de aféresis, en el que se unen covalentemente uno o más compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o bien directamente o bien con un grupo de unión orgánico a un material de soporte insoluble que constituye parte de dicha columna de aféresis de manera que al menos algunos anticuerpos libres y/o complejos inmunitarios anticuerpo-antígeno se unen a la misma.
- 45 18. Método de purificación de anticuerpos compuesto por unir anticuerpos con uno o más compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 unidos covalentemente o bien directamente o bien con un grupo de unión orgánico a un material de soporte insoluble de manera que al menos algunos anticuerpos se unen de manera no covalente a dichos compuestos unidos al soporte insoluble y purificar dichos anticuerpos.

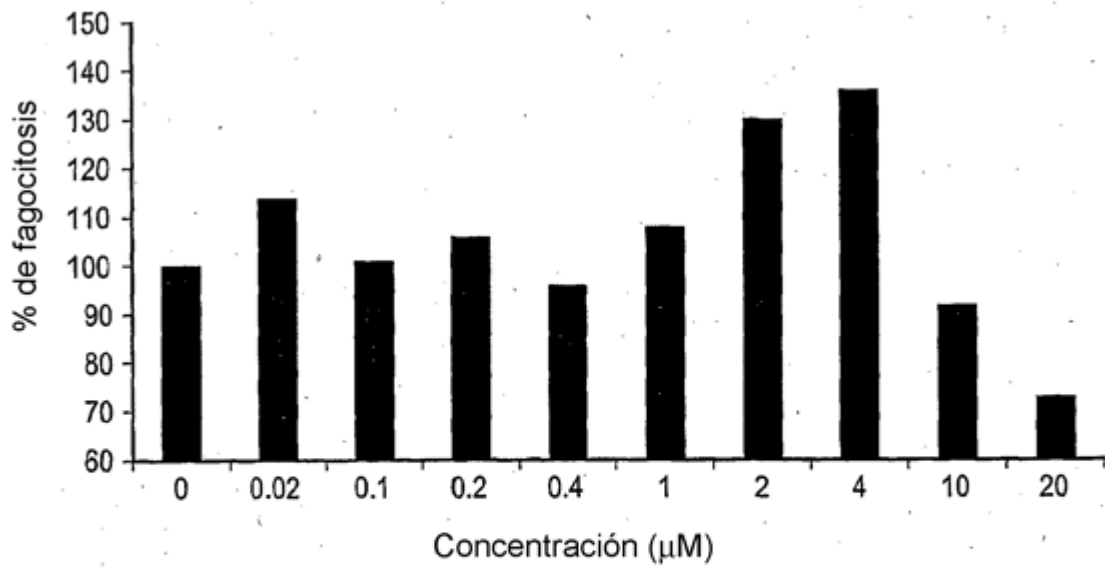


Fig. 1

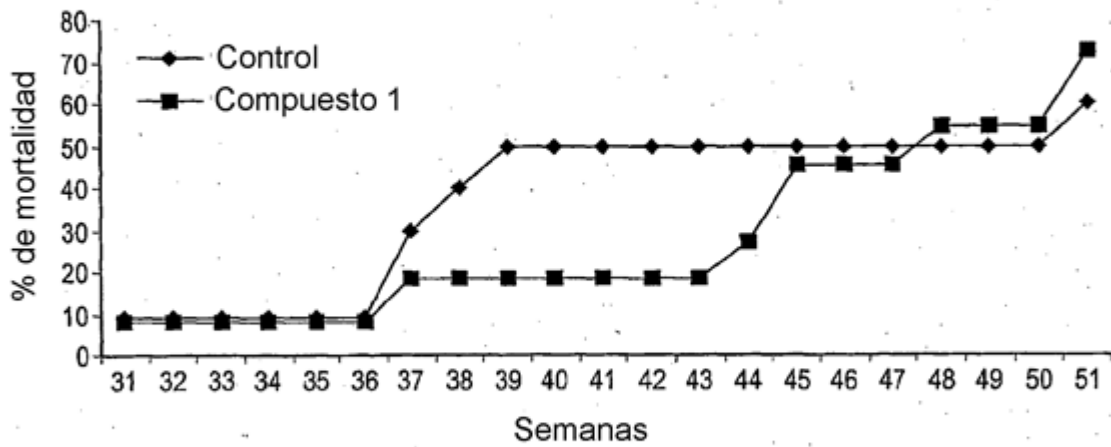


Fig. 2

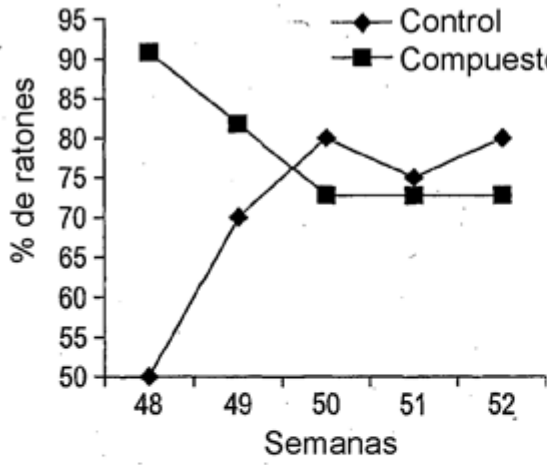


Fig. 3A

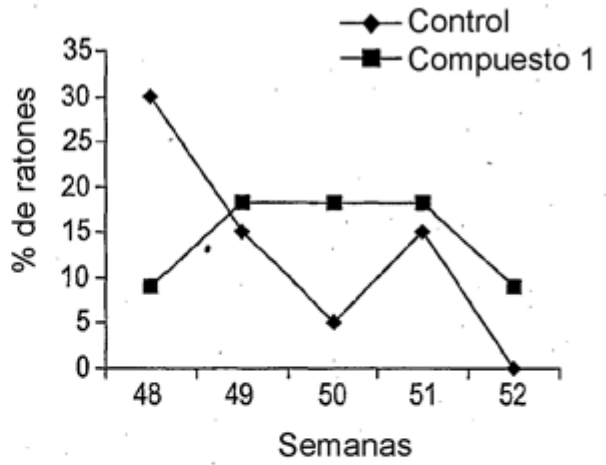


Fig. 3B

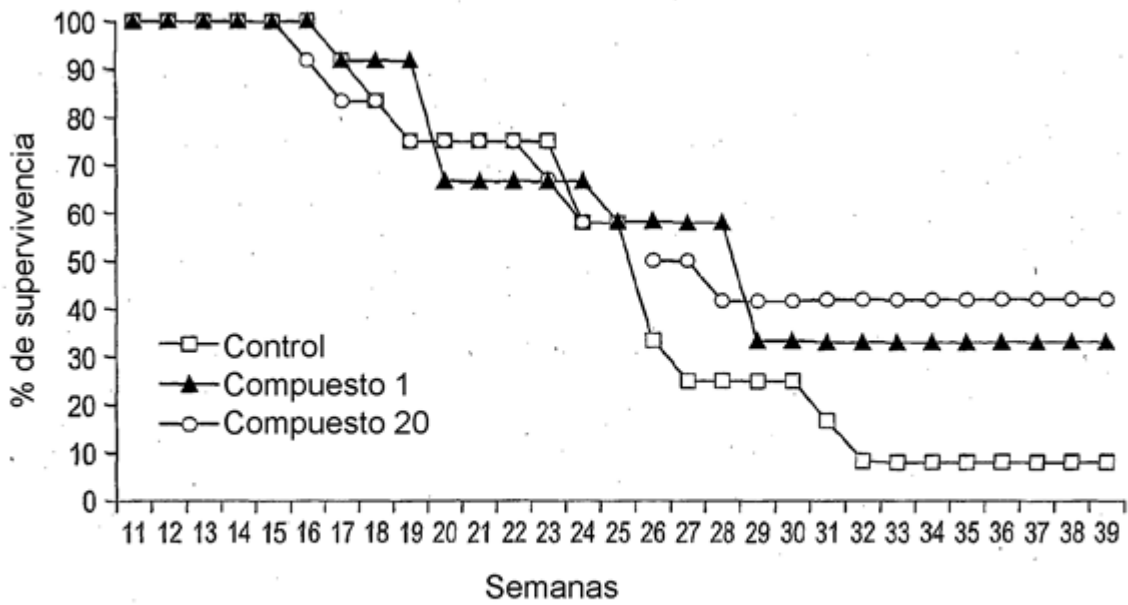


Fig. 5

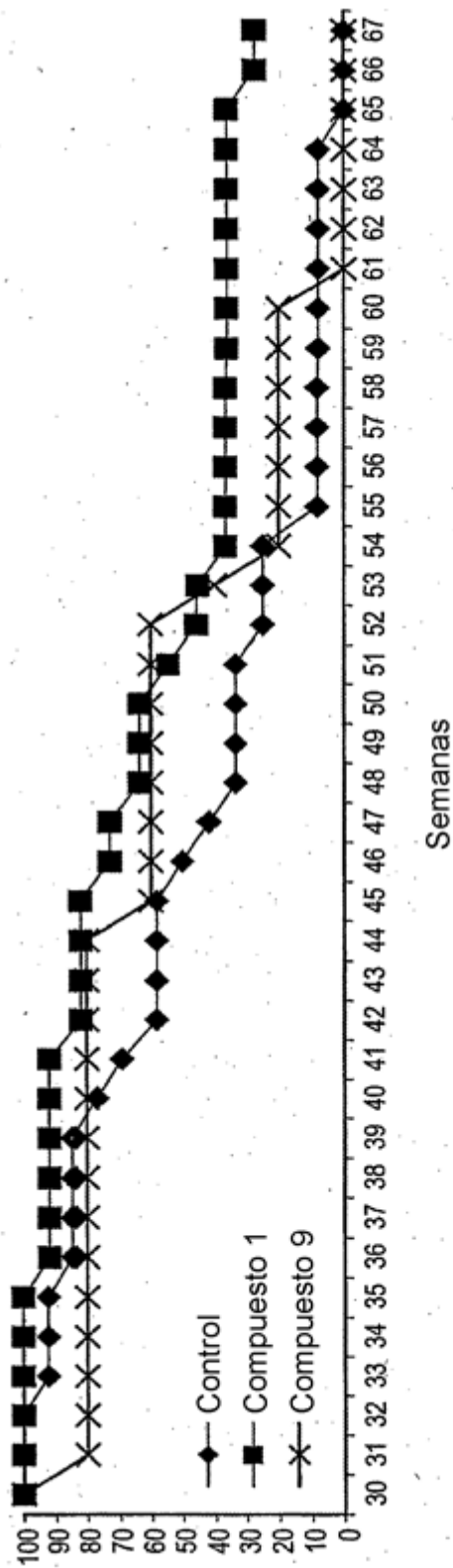


Fig. 4

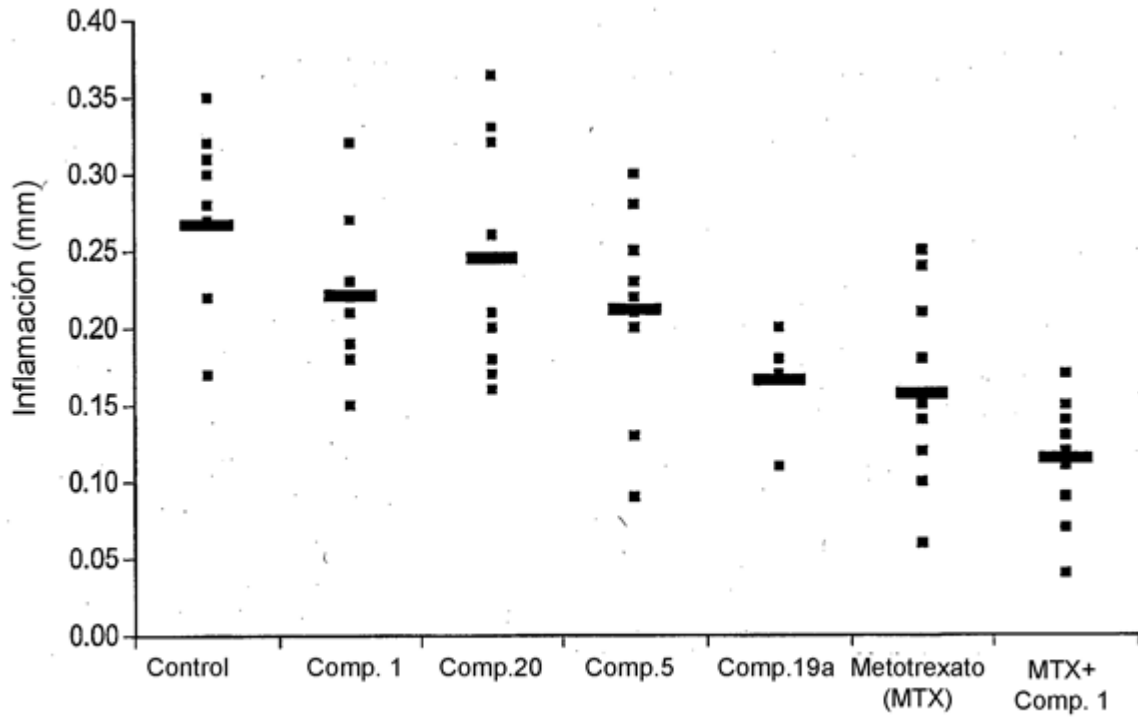


Fig. 6

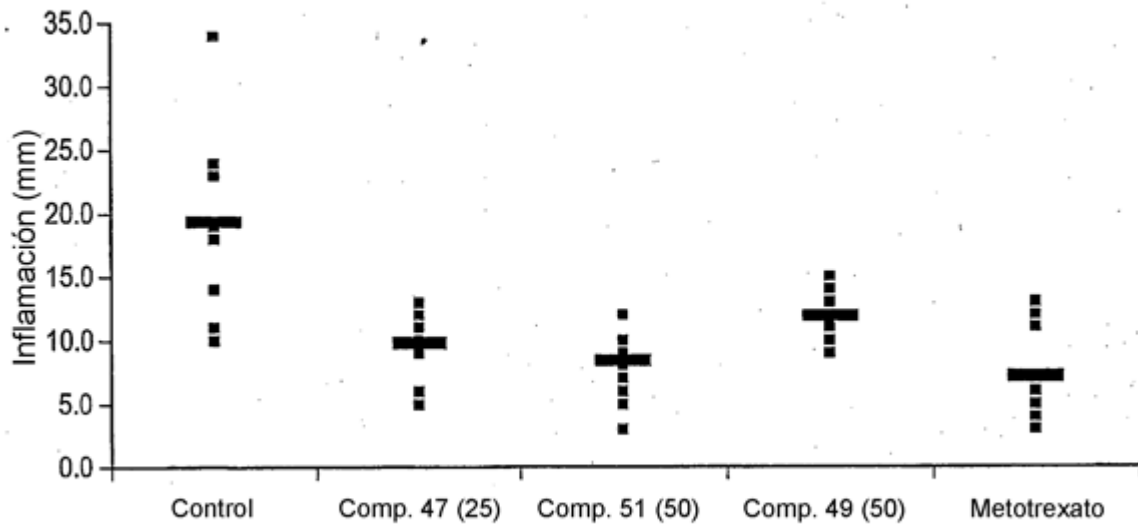


Fig. 7

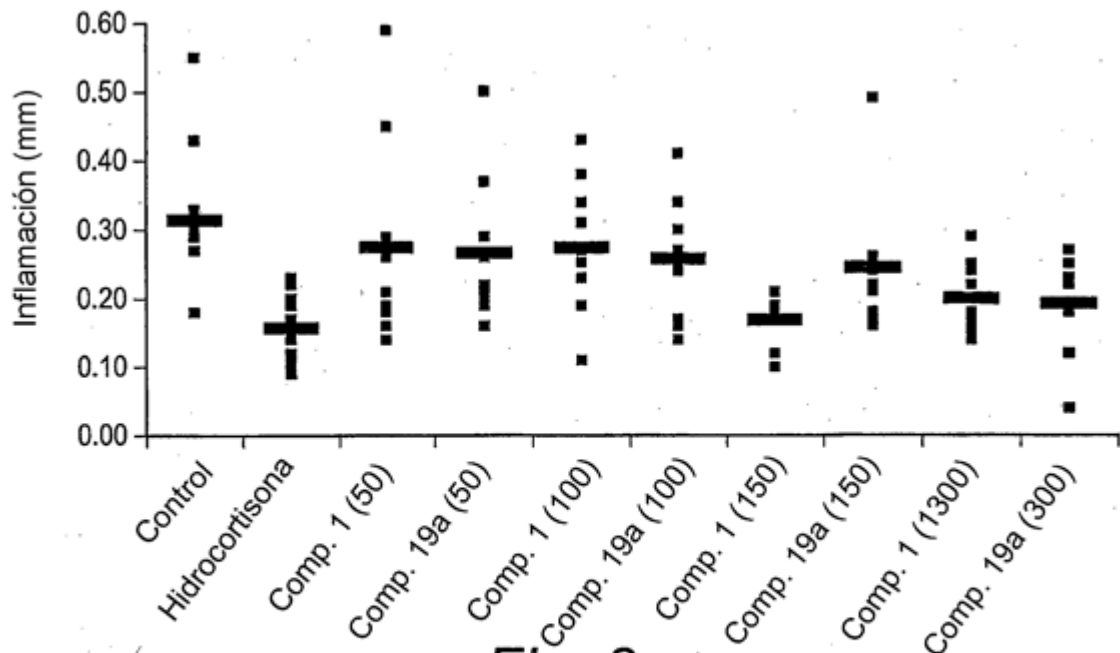
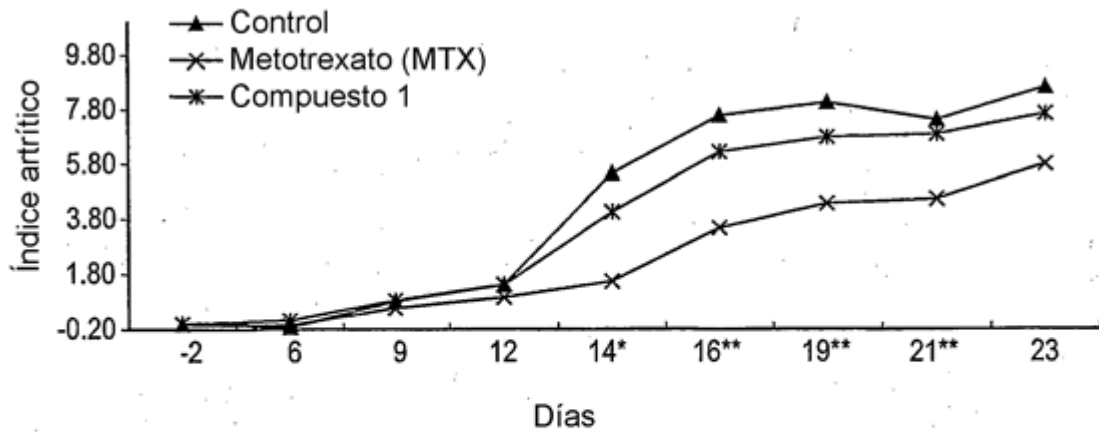


Fig. 8



* MTX es significativamente diferente del control para el resto del protocolo.

** El compuesto 1 es significativamente diferente del control

Fig. 9

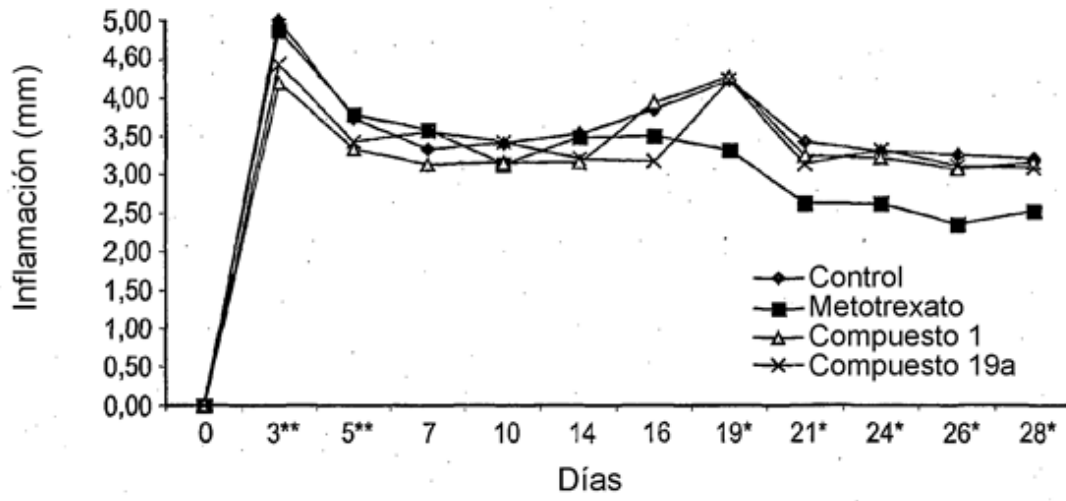
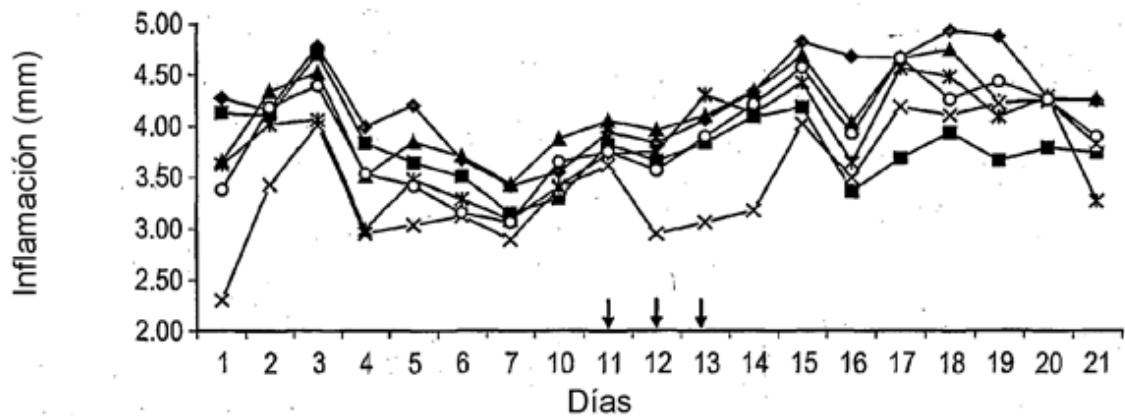


Fig. 10



Inflamación significativamente inferior al control

Compuesto 19a i.v.: días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 13, 14, 15, 16, 18 y 19

MTX: días 5, 15, 16, 17, 18, 19 y 21

Compuesto 19a v.o.: Días 1, 3, 5 y 6

Compuesto 1 v.o.: Días 4, 5 y 16

Compuesto 1 i.v.: Días 16 y 19

◆ Control

■ MTX

▲ Compuesto 1 - i.v.

■ Compuesto 19a - i.v.

* Compuesto 1 - v.o.

○ Compuesto 19a - v.o.

Fig. 11

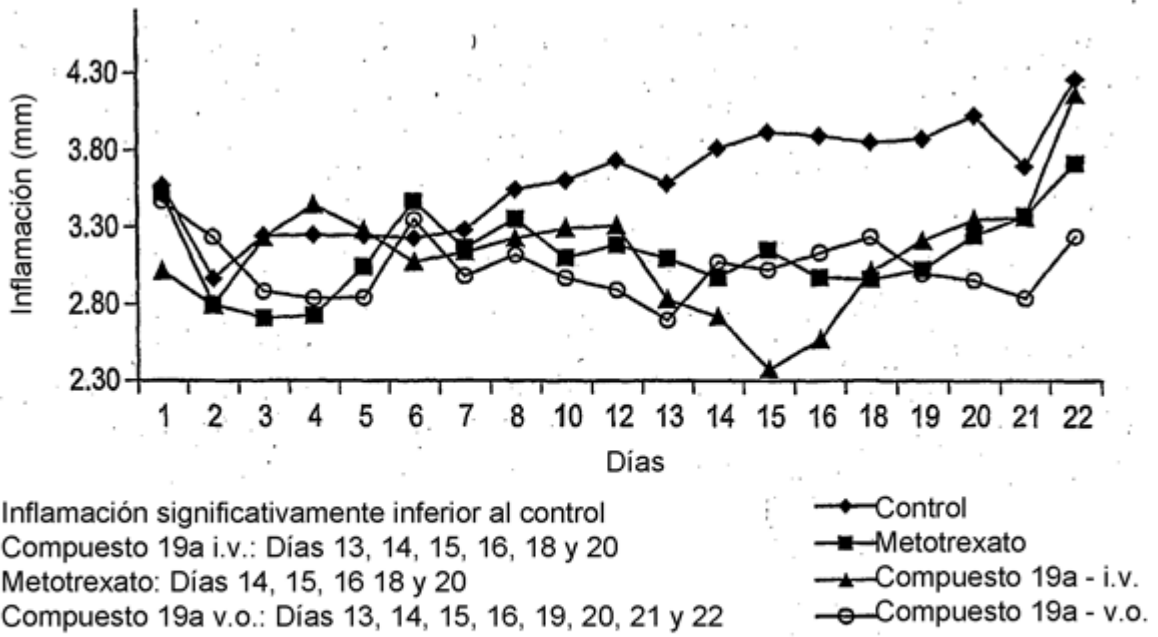


Fig. 12



Fig. 13