

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 803**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07D 263/56 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 31/423 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2003 E 10180989 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2325651**

54 Título: **Composiciones y métodos para estabilizar la transtiretina e inhibir el plegamiento anómalo de la transtiretina**

30 Prioridad:

19.12.2002 US 435079 P

24.04.2003 US 465435 P

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

12.12.2014

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
10550 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037 , US**

72 Inventor/es:

**KELLY, JEFFERY, W. y
SEKIJIMA, YOSHIKI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 524 803 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

Composiciones y métodos para estabilizar la transtiretina e inhibir el plegamiento anómalo de la transtiretina

La invención se refiere en general al plegamiento anómalo de proteínas. Más particularmente, esta invención proporciona un método de cribado para un compuesto que impide o reduce la disociación de un tetrámero de transtiretina.

La transtiretina (TTR) es una proteína homotetrámera de 55 kDa presente en el suero y en el líquido cefalorraquídeo. La función de la TTR es transportar L-tiroxina (T4) y proteína de unión a holo-retinol (abreviadamente RBP, por la expresión inglesa *Retinol Binding Protein*). La TTR es una de las mayores de 20 proteínas amiloidogénicas no homólogas que pueden transformarse en fibrillas y otros agregados que conducen a una patología morbosa en seres humanos. Estas enfermedades no parecen ser causadas por una pérdida de función debida a la agregación de proteínas. En lugar de ello, la agregación parece producir una disfunción neuronal/celular por un mecanismo que aún no está claro.

En condiciones desnaturalizantes, la disociación del tetrámero de TTR de tipo natural limitante de la velocidad y el rápido plegamiento anómalo de los monómeros facilita el ensamblaje anómalo formando el material amiloide, que produce supuestamente la amiloidosis sistémica senil (ASS). La disociación y plegamiento anómalo de una de las más de ochenta variantes de la TTR da como resultado la polineuropatía amiloide familiar (PAF) y la cardiomiopatía amiloide familiar (CAF).

El tetrámero de TTR tiene dos sitios de unión a T4 simétricos en C₂. Se sabe que la unión negativamente cooperativa de T4 estabiliza el tetrámero de TTR e inhibe la formación de fibrillas amiloides. Desafortunadamente, menos del 1% de TTR tiene T4 unida a ella en el suero humano, porque la globulina de unión al tiroides (TBG) tiene una afinidad con un orden de magnitud mayor por T4 en comparación con la TTR. Además, la concentración sérica de T4 es relativamente baja (0,1 μM) en comparación con la de TTR (3,6-7,2 μM).

La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la estabilización cinética del estado natural de la transtiretina inhibe el plegamiento anómalo de la proteína. Este descubrimiento es importante debido al papel que juega el plegamiento anómalo de la proteína en una diversidad de procesos morbosos, incluyendo enfermedades amiloides por transtiretina. Al inhibir el plegamiento anómalo de la transtiretina se puede intervenir en dicha enfermedad, mejorar los síntomas y/o en algunos casos, impedir o curar la enfermedad.

El descubrimiento de que la estabilización cinética del estado natural de la transtiretina inhibe eficazmente el plegamiento anómalo permite el desarrollo de composiciones terapéuticas con una especificidad potencialmente elevada y baja toxicidad. De esta manera, aunque en la presente memoria se describen reactivos de biarilo ilustrativos que tienen la capacidad de estabilizar la transtiretina, se pueden diseñar otros reactivos que estabilicen selectivamente la proteína. Por ejemplo, como se describe en la presente memoria, es posible diseñar y preparar bifenilos policlorados, análogos del diflunisal, o benzoxazoles que son muy selectivos para unirse a la transtiretina y que estabilizan el estado natural de la transtiretina.

En un aspecto, la invención se caracteriza por un método de cribado para un compuesto que impida o reduzca la disociación de un tetrámero de transtiretina. El método incluye las siguientes etapas: poner en contacto un tetrámero de transtiretina con un compuesto candidato; y determinar si el compuesto candidato aumenta la energía de activación asociada con la disociación del tetrámero de transtiretina, con lo cual impide o reduce la disociación del tetrámero de transtiretina. El método puede incluir opcionalmente una etapa adicional para medir la capacidad del compuesto candidato para inhibir la formación de fibrillas.

En una realización, el método incluye una etapa para determinar si el compuesto impide la disociación del tetrámero de transtiretina desestabilizando el estado de transición de disociación del tetrámero de transtiretina. En otra realización, el método incluye una etapa para determinar si el compuesto impide la disociación del tetrámero de transtiretina por estabilización del tetrámero de transtiretina más que el estado de transición disociativo.

El compuesto candidato usado en dicho método puede ser opcionalmente una molécula pequeña. Dicha molécula pequeña puede estabilizar el estado natural de la transtiretina a través de la unión al tetrámero, ralentizando de esta manera la disociación y la amiloidosis en condiciones desnaturalizantes y fisiológicas por un mecanismo de estabilización cinética. El compuesto presenta opcionalmente una estequiometría de unión a TTR que excede de 0,1 en sangre humana cuando se administra a una concentración de 10,6 μM.

Una molécula pequeña puede tener opcionalmente un peso molecular menor de 1500 y unirse a la transtiretina positivamente de forma cooperativa o no e impartir una energía de unión > 2,3 kcal/mol. La molécula pequeña puede presentar valores de K_{d1} y K_{d2} < 100 nM (por ejemplo < 10 nM) y/o una elevada concentración en plasma, contribuyendo ambas cosas a una estabilización de la proteína superior a 2,0 kcal/mol. La molécula pequeña puede disminuir también la producción de la amiloidosis y disminuir la tasa de amiloidogénesis mediada por ácidos o mediada por MeOH y/o disminuir la velocidad de disociación de la TTR mediada por urea.

En algunas realizaciones, la molécula pequeña incluye bifenil-aminas, bifenilos, éteres de oxima, benzoxazoles u

otras estructuras compuestas de dos anillos aromáticos, donde uno lleva grupos hidrófilos, tales como un ácido o un fenol, y el otro lleva grupos hidrófobos, tales como varios halógeno o alquilo.

5 En una realización, el compuesto candidato es un biarilo en donde un anillo lleva uno o más sustituyentes hidrófilos y el otro tiene sustituyentes hidrófobos, o un biarilo en donde los dos anillos llevan al menos un sustituyente hidrófilo. El grupo hidrófilo puede ser un fenol, un COOH, un alcohol bencílico, un ácido o un éster borónico, un tetrazol, un aldehído o un aldehído hidratado o un grupo funcional que sirve como donador o aceptor de enlaces de H para la proteína directamente o a través de un enlace de H mediado por agua. El biarilo puede ser un biarilo simétrico que
10 tenga los dos anillos sustituidos con funcionalidad hidrófila incluyendo fenoles, carboxilatos y alcoholes, y en algunos casos halógenos para rellenar las cavidades de unión a halógeno de la TTR, por ejemplo, un biarilo con la siguiente funcionalidad: 3-Cl, 4-OH, 5-Cl y 3'-Cl, 4'-OH, 5'-Cl. En una realización, al menos un anillo del biarilo está sustituido con sustituyentes 2,4-difluoro o 3,5-difluoro o 2,6-difluoro o 3,5-dicloro o 3-Cl, 4-OH, 5-Cl o 3-F, 4-OH, 5-F, 3-COOH, 4-OH o 3-OH o 3-COOH o 4-COOH o 3-CH₂OH o 4-CH₂OH. Un biarilo ilustrativo es un bifenilo policlorado, por ejemplo, un bifenilo policlorado hidroxilado, en donde al menos un anillo lleva sustituyentes OH y/o Cl incluyendo 3-Cl, 4-OH, 5-Cl o 2-Cl, 3-Cl, 4-OH, 5-Cl o 3,4-diCl o 2,3,4-tricloro o 2,3,4,5-tetracloro. En el compuesto candidato pueden usarse halógenos distintos de cloro. El compuesto candidato de la presente invención puede ser un benzoxazol.

15 En una realización, el compuesto candidato es un análogo de diflunisal. En la presente memoria se describe la estructura del diflunisal, así como una diversidad de análogos de diflunisal. El análogo de diflunisal puede tener opcionalmente una actividad de NSAID (fármaco anti-inflamatorio no esteroide) reducida o ausente en comparación con el diflunisal. Por ejemplo, el análogo de diflunisal puede tener una actividad inhibidora de la ciclooxigenasa reducida o ausente en comparación con el diflunisal.

20 En una realización, el método incluye una etapa adicional para determinar si el análogo de diflunisal presenta actividad de NSAID. Por ejemplo, el método puede incluir una etapa para determinar si el análogo de diflunisal presenta actividad inhibidora de la ciclooxigenasa.

25 La transtiretina usada en los métodos de cribado puede ser transtiretina de tipo natural o una transtiretina mutante, tal como una transtiretina mutante natural asociada causalmente con la incidencia de una enfermedad amiloide por transtiretina, tal como la polineuropatía amiloide familiar o la cardiomiopatía amiloide familiar. Las transtiretinas mutantes naturales ilustrativas incluyen, pero sin limitación, V122I, V30M, L55P (la nomenclatura de mutantes describe la sustitución en la posición de aminoácido mencionada con respecto al tipo natural; véase, por ejemplo Saraiva et al., (2001) *Hum. Mut.* 17-493-503).

30 La memoria también describe métodos para la estabilización de la transtiretina en un tejido o un fluido biológico, y de esta forma inhibe el plegamiento anómalo. En general, el método comprende administrar al tejido o fluido biológico una composición que comprende una cantidad estabilizadora de un compuesto descrito en la presente memoria que se une a transtiretina e impide la disociación del tetrámero de transtiretina por estabilización cinética del estado natural del tetrámero de transtiretina.

35 Por tanto, los métodos que estabilizan la transtiretina en un tejido enfermo mejoran el plegamiento anómalo y disminuyen los síntomas de una enfermedad asociada y, dependiendo de la enfermedad, pueden contribuir a la curación de la enfermedad. Se considera la inhibición del plegamiento anómalo de transtiretina en un tejido y/o dentro de una célula. La extensión del plegamiento anómalo y, por lo tanto, la extensión de inhibición conseguida por los métodos descritos pueden evaluarse por una diversidad de métodos, tales como los descritos en los Ejemplos.

40 Por consiguiente, la memoria describe también un método para tratar una enfermedad amiloide por transtiretina, comprendiendo el método administrar a un sujeto al que se le ha diagnosticado que tiene una enfermedad amiloide por transtiretina una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que impide la disociación de un tetrámero de transtiretina mediante la estabilización cinética del estado natural del tetrámero de transtiretina.

45 La memoria describe también un método para tratar una enfermedad amiloide por transtiretina, comprendiendo el método administrar a un sujeto al que se le ha diagnosticado una enfermedad amiloide por transtiretina una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de diflunisal (por ejemplo, un análogo de diflunisal que impide la disociación de un tetrámero de transtiretina) que impide la disociación de un tetrámero de transtiretina. El análogo de diflunisal puede tener opcionalmente una actividad de NSAID reducida o ausente (por ejemplo, una actividad inhibidora de ciclooxigenasa) en comparación con el diflunisal.

50 La memoria describe también un método para tratar una enfermedad amiloide por transtiretina, comprendiendo el método administrar a un sujeto al que se le ha diagnosticado una enfermedad amiloide por transtiretina una cantidad terapéuticamente eficaz de un bifenilo policlorado (por ejemplo, un bifenilo policlorado que impide la disociación de un tetrámero de transtiretina) que impide la disociación de un tetrámero de transtiretina. El bifenilo policlorado puede ser un bifenilo policlorado hidroxilado.

55 La memoria describe también un método para tratar una enfermedad amiloide por transtiretina, comprendiendo el método administrar a un sujeto al que se le ha diagnosticado una enfermedad amiloide por transtiretina una cantidad terapéuticamente eficaz de un benzoxazol (por ejemplo, un benzoxazol que impide la disociación de un tetrámero de transtiretina) que impide la disociación de un tetrámero de transtiretina

La enfermedad amiloide por transtiretina puede ser, por ejemplo, polineuropatía amiloide familiar, cardiomiopatía amiloide familiar o amiloidosis sistémica senil.

5 El sujeto tratado en los métodos descritos en la presente memoria puede ser un ser humano, aunque debe entenderse que los principios de la invención indican que la invención es eficaz con respecto a todos los mamíferos. En este contexto, se entiende que un "mamífero" incluye cualquier especie de mamífero en la que es deseable el tratamiento de enfermedades asociadas con el plegamiento anómalo de transtiretina, particularmente especies de mamíferos de ganado y domésticos.

10 Los compuestos descritos en la presente memoria (por ejemplo, compuestos de biarilo, tales como análogos de diflunisal, bifenilos policlorados o benzoxazoles) pueden formularse con un vehículo farmacéuticamente aceptable para preparar una composición farmacéutica que comprenda el compuesto. Como se usa en la presente memoria, las expresiones "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y sus variaciones gramaticales, cuando se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y significan que los materiales pueden administrarse a un mamífero sin la producción de efectos fisiológicos indeseables.

15 La memoria describe también el uso de cualquiera de los compuestos o composiciones farmacéuticas descritos en la presente memoria para el tratamiento de una enfermedad amiloide por transtiretina (por ejemplo, polineuropatía amiloide familiar, cardiomiopatía amiloide familiar o amiloidosis sistémica senil).

La memoria describe también el uso de cualquiera de los compuestos o composiciones farmacéuticas descritos en la presente memoria en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad amiloide por transtiretina (por ejemplo, polineuropatía amiloide familiar, cardiomiopatía amiloide familiar o amiloidosis sistémica senil).

20 Los compuestos y los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria proporcionan ventajas significativas con respecto a las opciones de tratamiento disponibles actualmente para la amiloidosis por TTR. La amiloidosis por TTR conduce típicamente a la muerte en diez años y hasta hace poco se consideraba incurable. El trasplante hepático es un medio eficaz para reemplazar el alelo asociado con la enfermedad por un alelo de tipo natural (abreviadamente en lo sucesivo WT por la expresión inglesa *Wild Type*) en los casos familiares, puesto que el hígado es típicamente la fuente de TTR amiloidogénica. Aunque el trasplante hepático es eficaz como forma de terapia génica, no carece de problemas. El trasplante se complica por la necesidad de una cirugía invasiva tanto para el receptor como para el donante, una terapia inmunosupresora a largo plazo después del trasplante, escasez de donantes, su alto coste y el gran número de pacientes con amiloidosis por TTR que no son buenos candidatos debido a la progresión de su enfermedad. Desafortunadamente, la amiloidosis cardíaca progresa en algunos pacientes familiares incluso después del trasplante hepático porque con frecuencia sigue depositándose la TTR WT. Tampoco se alivia la deposición de TTR en el sistema nervioso central (SNC) por medio de un trasplante, debido a que se sintetiza en el plexo cororoideo. El trasplante no es una opción viable para la enfermedad por TTR más prevalente, la amiloidosis sistémica senil (ASS), que afecta a aproximadamente 25% de los pacientes con más de 80 años, debido a la deposición de TTR WT.

35 A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que entienden comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, más adelante se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en la presente memoria se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, regirá la presente solicitud, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos y no han de entenderse como limitativos.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes tras la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

45 La Fig. 1 es un diagrama esquemático que representa el sitio de unión a T4 de la transtiretina.

Las Figs. 2A y 2B son gráficos que representan la evolución a lo largo del tiempo del desplegamiento de transtiretina en presencia de diferentes inhibidores.

Las Figs. 3A y 3B son gráficos que representan la evolución a lo largo del tiempo de la formación de fibrillas en presencia de diferentes inhibidores.

50 Las Figs. 4A y 4B son gráficos que representan la evolución a lo largo del tiempo de la formación de fibrillas en presencia de diferentes inhibidores.

La Fig. 5 representa las estructuras de bifenilos policlorados cribados para unión a la transtiretina en plasma sanguíneo.

55 La Fig. 6 representa las estructuras de bifenilos policlorados hidroxilados de los que se evaluó la unión a la transtiretina en plasma junto con sus propiedades de inhibición de fibrillas amiloides *in vitro*.

La Fig. 7 es un gráfico que representa la supresión de la formación de fibrillas de transtiretina por compuestos de benzoxazol. La posición del carboxilo en el benzoxazol se muestra en el lado izquierdo, mientras que el anillo de fenilo C(2) se muestra en la parte inferior. Las barras indican el porcentaje de formación de fibrillas (ff), es decir, la cantidad de fibrillas formadas a partir de la transtiretina ($3,6 \mu\text{M}$) en presencia del compuesto de benzoxazol ($7,2 \mu\text{M}$) con respecto a la cantidad formada por transtiretina en ausencia de inhibidor (que se define como 100%).

La Fig. 8 es un gráfico que representa la estequiometría (s) de benzoxazoles unidos a transtiretina después de la incubación en plasma sanguíneo humano. Se usó inmunoprecipitación con un anticuerpo unido a resina para capturar la transtiretina. Después de liberar la transtiretina de la resina, se cuantificaron las cantidades de transtiretina e inhibidor a partir de las áreas bajo sus picos en un cromatograma de HPLC. El valor máximo posible de s es 2. Los números de los compuestos se muestran a lo largo del eje inferior. Las líneas verticales finas indican el error de medición.

La Fig. 9 es un gráfico que representa la disociación en función del tiempo (t) para la transtiretina WT ($1,8 \mu\text{M}$) en urea 6 M sin inhibidor, o en presencia de una concentración $3,6 \mu\text{M}$ de compuestos **20**, **21** o **27**, o una concentración $1,8 \mu\text{M}$ de compuesto **20**.

La Fig. 10 representa la estructura co-cristalina de rayos X del compuesto **20** unido a transtiretina. Los restos equivalentes en diferentes subunidades se distinguen por medio de números de restos con comilla y sin comilla, así como los pares de cavidades de unión a halógeno.

Al menos algunas enfermedades amiloides parecen ser causadas por la deposición de una cualquiera de más de 20 proteínas o fragmentos proteicos no homólogos, que finalmente producen una estructura cuaternaria de lámina β cruzada fibrilar. La formación de fibrillas amiloides a partir de una proteína plegada normalmente, tal como la transtiretina, requiere un plegamiento anómalo de la proteína para producir un compuesto intermedio competente con el ensamblaje. El proceso de amiloidogénesis por transtiretina (TTR) parece producir tres enfermedades amiloides diferentes – amiloidosis sistémica senil (ASS), polineuropatía amiloide familiar (PAF) y cardiomiopatía amiloide familiar (CAF). La ASS está asociada con la deposición de TTR de tipo natural, mientras que la PAF y la CAF se producen por la amiloidogénesis de una de más de 80 variantes de TTR. Véanse, por ejemplo, Colon, W.; Kelly, J. W. *Biochemistry* **1992**, *31*, 8654-60; Kelly, J. W. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 11-7; Liu, K.; et al., *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 754-7; Westermark, P.; et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 2843-5; Saraiva, M. J., et al., *J. Clin. Invest.* **1985**, *76*, 2171-7; Jacobson, D. R.; et al. *N. Engl. J. Med.* **1997**, *336*, 466-73; Buxbaum, J. N.; Tagoe, C.E. *Ann. Rev. Med.* **2000**, *51*, 543-569; y Saraiva, M. J. *Hum. Mutat.* **1995**, *5*, 191-6, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

La TTR es un homotetrámero de 55 kDa caracterizado por simetría 2,2,2, que tiene dos sitios de unión con forma de embudo idénticos en la interfaz dímero-dímero, en donde puede unirse la hormona tiroidea (T4) en el plasma sanguíneo y el factor estimulante de colonias (abreviadamente en lo sucesivo CSF por su expresión en inglés). La TTR se une típicamente a menos de un equivalente de proteína de unión a holo-retinol. El plegamiento anómalo de la TTR incluyendo la disociación del tetrámero en monómeros seguido de cambios estructurales terciarios dentro del monómero hace que la proteína sea capaz de ensamblarse anómalamente, produciendo finalmente amiloide. El tratamiento disponible para la PAF emplea la terapia génica mediada por trasplante hepático para reemplazar la TTR variante en la sangre por la proteína de tipo natural (WT). Esta estrategia tiene poca probabilidad de ser eficaz en caso de la CAF debido a la deposición continua de TTR WT, y no sería útil para el tratamiento de la ASS, donde el proceso de deposición de TTR WT parece ser el causante de la enfermedad. La terapia de trasplante hepático también fallaría para aproximadamente 10 de las variantes de TTR que depositan fibrillas de amiloide en las leptomeninges produciendo la enfermedad en el SNC, ya que esta TTR se sintetiza por el plexo coroides. Por lo tanto, es deseable desarrollar una estrategia terapéutica no invasiva general basada en fármacos. Puede ser deseable que el fármaco no esté basado en proteínas, en péptidos ni en ácidos nucleicos. Véanse, por ejemplo, Blake, C. C.; et al., *J. Mol. Biol.*, **1978**, *121*, 339-56; Wojtczak, A.; et al., *Acta Crystallogr. Sect. D.* **1996**, 758-810; Monaco, H. L.; Rizzi, M.; Coda, A. *Science* **1995**, *268*, 1039-41; Lai, Z.; Colon, W.; Kelly, J. W. *Biochemistry* **1996**, *35*, 6470-82; Holmgren, G.; et al. *Lancet* **1993**, *341*, 1113-6; Suhr, O. B.; Ericzon, B. G.; Friman, S. *Liver Transpl.* **2002**, *8*, 787-94; Dubrey, S. W.; et al. *Transplantation* **1997**, *64*, 74-80; Yazaki, M.; et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *274*, 702-6; y Cornwell, G. G. III; et al. *Am. J. of Med.* **1983**, *75*, 618-623, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

Síntesis de análogos de diflunisal que inhiben la formación de fibrillas amiloides de transtiretina

El plegamiento anómalo de TTR que lleva a la formación de fibrillas amiloides puede prevenirse por medio de la estabilización del tetrámero mediada por T4. Varias familias estructuralmente diversas de estabilizadores del tetrámero se unen a uno o a los dos sitios de T4 dentro de TTR e impiden la amiloidosis sin los efectos secundarios probables de la hormona T4. Estos compuestos estabilizadores del tetrámero incluyen varios fármacos antiinflamatorios no esteroides (NSAIDS), tales como ácido flufenámico, diclofenaco, flurbiprofeno y diflunisal, que parecen actuar aumentando la barrera cinética asociada con la disociación del tetrámero a través de la unión y la estabilización del estado basal. Como TTR es el vehículo secundario de la T4 en el plasma sanguíneo, queda sin utilizarse más de 95% de la capacidad de unión a T4 de TTR, permitiendo la administración de un compuesto estabilizador del tetrámero que se dirija a estos sitios. Como el diflunisal es un inhibidor de la ciclooxigenasa-2, la administración a largo

plazo podría producir efectos secundarios gastrointestinales. Por lo tanto, son deseables análogos de diflunisal que tengan una actividad de NSAIDS reducida o ausente, pero que posean alta afinidad por TTR en el plasma sanguíneo. La primera etapa hacia este objetivo es el diseño y síntesis de análogos de diflunisal como inhibidores de la formación de fibrillas amiloides. Véanse, por ejemplo, Miroy, G. J.; *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 15051-6; Klabunde, T.; *et al.*, *Nat. Struct. Biol.*, **2000**, *7*, 312-21; Baures, P. W.; Peterson S.A.; Kelly, J. W., *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1389-401; Petrassi, H. M.; *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2178-2192; Baures, P. W.; *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1339-47; Sacchetti, J. C.; Kelly, J. W., *Nat. Rev. Drug. Disc.* **2002**, *1*, 267-275; Oza, V. B.; *et al.*, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 321-32; Bartalena, L.; Robbins, J. *Clin. Lab. Med.* **1993**, *13*, 583-98; Aldred, A. R.; Brack, C. M.; Schreiber, G., *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *111*, 1-15; y Mao, H. Y.; *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10429-10435, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

Las subunidades del tetrámero de TTR están relacionadas por tres ejes C₂ perpendiculares. La Fig. 1 es una representación esquemática del sitio de unión a T4 de TTR, que demuestra el modo de unión directo donde el carboxilato inhibidor participa en las interacciones electrostáticas con el ε-amonio de Lys 15 y 15'. Los dos sitios de unión a T4 equivalentes creados por la interfaz estructural cuaternaria se intercambian por los dos ejes C₂ que son perpendiculares al eje de simetría C₂ cristalográfico. Cada sitio de unión a T4 puede dividirse en una cavidad de unión interna y externa. Véase, por ejemplo, Blake, C. C.; Oatley, S. J. *Nature*, 1977, *268*, 115-20, que se incorpora como referencia en su totalidad. La cavidad de unión interna comprende un par de cavidades de unión a halógeno (abreviadamente HBP, por la expresión inglesa *Halogen Binding Pockets*), denominadas HBP3 y 3', formadas por las cadenas laterales de Leu 17, Ala 108, Val 121 y Thr 119. La convergencia de cuatro cadenas laterales de Ser 117 a partir de cada subunidad define la región más interna y la interfaz entre los dos sitios de unión idénticos. Los grupos hidroxilo de Ser 117 pueden servir como donadores o aceptores de enlaces de hidrógeno para la funcionalidad complementaria en el compuesto (por ejemplo, un inhibidor de la formación de amiloides) o mediar interacciones electrostáticas con el compuesto a través de moléculas de agua. El sitio de unión exterior se compone de HBP 1 y 1', mientras que HBP 2 y 2' se colocan en la interfaz de las cavidades de unión interna y externa. Los grupos ε-amonio de Lys 15 y 15' definen los límites más externos de la cavidad de unión externa, permitiendo interacciones electrostáticas con sustituyentes aniónicos en un compuesto. Muchos de los compuestos estabilizadores de tetrámeros de TTR se unen en el modo de unión directo, donde un sustituyente aniónico en el anillo de fenilo hidrófilo colocado en la cavidad de unión exterior encaja en una interacción electrostática con los grupos ε-amonio de Lys 15. En el modo de unión directo, un anillo de fenilo hidrófobo (frecuentemente sustituido con halógenos) puede ocupar la cavidad de unión interna. Sin embargo, también se han observado ejemplos de unión en la orientación opuesta (el modo de unión inversa). En el modo de unión inversa, un anillo aromático hidrófilo puede colocarse en la cavidad interna, permitiendo que un carboxilato forme un enlace de hidrógeno con Ser 117 y Ser 117'. En el modo de unión inversa, en la cavidad exterior puede colocarse un anillo hidrófobo sustituido con halógeno.

El diflunisal puede reducir la amiloidogénesis por TTR mediada por ácido. La estructura del diflunisal (véase el Ejemplo 2) puede usarse como base para diseñar nuevos compuestos que puedan inhibir la amiloidogénesis por TTR. Véanse, por ejemplo, Verdeek, R. K.; *et al.*, *Biochem. Pharm.* **1980**, *29*, 571-576; y Nuernberg, B.; Koehler, G.; Brune, K., *Clin. Pharmacokin.* **1991**, *20*, 81-89.

El compuesto puede tener la fórmula:



en la que Ar¹ es un grupo arilo o heteroarilo, estando Ar¹ opcionalmente sustituido con uno o más de: halo, -R¹, -OR¹, -OC(=O)R¹, -OC(=O)OR¹, -OC(=O)NHR¹, -SR¹, -S(=O)R¹, -S(=O)₂R¹, -C(=O)R¹, -CO₂R¹, -C(=O)NHR¹, -NR¹R², -NHC(=O)R¹, -NHC(=O)NHR¹, -NHC(=O)OR¹ o -NHS(=O)₂R¹.

Ar² es un grupo arilo o heteroarilo, estando Ar² opcionalmente sustituido con uno o más de: halo, -R¹, -OR¹, -OC(=O)R¹, -OC(=O)OR¹, -OC(=O)NHR¹, -SR¹, -S(=O)R¹, -S(=O)₂R¹, -C(=O)R¹, -CO₂R¹, -C(=O)NHR¹, -NR¹R², -NHC(=O)R¹, -NHC(=O)NHR¹, -NHC(=O)OR¹ o -NHS(=O)₂R¹.

Cada R¹ es, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, heterocicloalqueno, alquino, arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido.

Cada R² es, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, heterocicloalqueno, alquino, arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido.

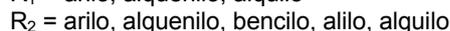
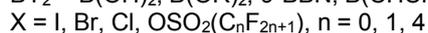
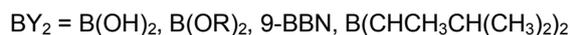
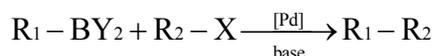
En algunas circunstancias, Ar¹ puede ser fenilo sustituido o no sustituido. Ar² puede ser independientemente fenilo sustituido o no sustituido. Ar¹ y Ar² pueden ser simultáneamente fenilo sustituido o no sustituido. Los sustituyentes pueden ser flúor, cloro, hidroxilo, -CO₂H, -CO₂Me, -OMe, -CH₂OH o formilo. R¹ puede ser alquilo inferior.

Los compuestos se pueden usar en forma de sales farmacéuticamente aceptables obtenidas a partir de ácidos y

bases inorgánicos u orgánicos. Entre estas sales de ácidos se incluyen las siguientes: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, benzenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, alcanforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidrocloreto, hidrobromuro, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenil-propionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Las sales de bases incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos, tales como sales sódicas y potásicas, sales de metales alcalino-térreos, tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas, tales como sales de diciclohexilamina, N-metil-D-glucamina, y sales con aminoácidos, tales como arginina, lisina y similares. Además, los grupos básicos que contienen nitrógeno pueden estar cuaternizados con agentes, tales como haluros de alquilo inferior, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo, tales como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo, haluros de cadena larga, tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo, tales como bromuros de bencilo y fenetilo y otros. De esta manera, se obtienen productos solubles o dispersables en agua o aceite.

Los compuestos pueden estabilizar los tetrámeros de TTR e inhibir la formación de amiloide de TTR. Los compuestos pueden ser análogos de diflunisal caracterizados por pequeños cambios estructurales. Los compuestos pueden usarse para evaluar relaciones de estructura-actividad, ya que están relacionados con la inhibición de amiloides de TTR. Los patrones de sustitución y el número de sustituyentes incluyendo halógenos, carboxilatos, acilo, alcoxi e hidroxilo pueden ser variados. Los datos de estructura-actividad de otras clases de compuestos revelan que un sustituyente carboxilato o un grupo aniónico análogo o que forma enlaces de hidrógeno parece ser importante, participando posiblemente en interacciones electrostáticas con los grupos ϵ -amonio de Lys 15 y 15' o en las interacciones de enlaces de hidrógeno con Ser 117 y 117', mientras que el anillo hidrófobo sustituido con halógeno rellena las cavidades de unión a halógeno de la TTR. Pueden evaluarse anillos sustituidos tanto con flúor como con cloro, incluyendo 2-fluoro-, 4-fluoro-, 3,5-difluoro-, 2,4-difluoro- y 2,6-difluoro-. Los grupos arilo sustituidos con yodo pueden ser menos deseables debido a su susceptibilidad y potencial para actuar como agonistas de tiroxina. El sustituyente carboxilato (aniónico) puede estar ausente en algunos análogos para evaluar su influencia sobre la inhibición de las fibrillas y su selectividad de unión al plasma. Pueden sintetizarse compuestos que contienen una funcionalidad de aldehído o alcohol para evaluar la influencia de un aceptor o donador de enlaces de hidrógeno no cargado sobre la selectividad de unión e inhibición de las fibrillas de amiloide. La forma gem-diol del aldehído puede ser la especie de unión principal.

En general, los compuestos se pueden sintetizar por métodos conocidos en la técnica. Un método para preparar los compuestos es un acoplamiento de Suzuki:



Por ejemplo, un compuesto de bifenilo puede formarse por un acoplamiento de Suzuki de un ácido fenilborónico con un bromobenceno o un yodobenceno. Se pueden necesitar grupos protectores apropiados para evitar la formación de productos secundarios durante la preparación de un compuesto. Por ejemplo, un sustituyente amino se puede proteger por un grupo protector de amino adecuado, tal como trifluoroacetilo o terc-butoxicarbonilo. Se pueden encontrar otros grupos protectores y otras condiciones de reacción en T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, (3rd, 1999, John Wiley & Sons, New York, N.Y.).

Composiciones farmacéuticas

Los compuestos descritos en la presente memoria (por ejemplo, análogos de diflunisal, bifenilos policlorados o benzoxazoles) se pueden formular en composiciones farmacéuticas que se pueden administrar por vía oral, parenteral, por una pulverización por inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o por un reservorio implantado. El término "parenteral", como se usa en la presente memoria, incluye técnicas de infusión o inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracranial.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir cualquiera de los compuestos, o sus derivados farmacéuticamente aceptables, junto con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo", como se usa en la presente memoria, incluye adyuvantes y vehículos aceptables. Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas incluyen, aunque sin limitación, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como seroalbúmina humana, sustancias tampón, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en

celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloques de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo una suspensión acuosa u oleaginoso inyectable estéril. Esta suspensión puede ser formulada de acuerdo con técnicas conocidas en este campo usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de puesta en suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable para la vía parenteral, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como disolvente o medio de puesta en suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo insípido, incluyendo mono- o di-glicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, como lo son los aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones en aceite también pueden contener un diluyente o dispersante alcohólico de cadena larga.

15 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía oral en cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral incluyendo, aunque sin limitación, cápsulas, comprimidos y suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan habitualmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden típicamente agentes lubricantes, tal como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de una cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo se combina con agentes emulsionantes y de puesta en suspensión. Si se desea, también se pueden añadir algunos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

20 Alternativamente, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en forma de supositorios para administración rectal. Éstas pueden prepararse mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperatura ambiente, pero líquido a la temperatura rectal, y por lo tanto se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales incluyen manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

25 Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar por vía tópica, especialmente cuando la diana de tratamiento incluye zonas u órganos a los que se puede acceder fácilmente por aplicación tópica, incluyendo enfermedades del ojo, la piel o el tracto intestinal inferior. Para cada una de estas zonas u órganos se preparan fácilmente formulaciones tópicas adecuadas.

30 La aplicación tópica para el tracto intestinal inferior se puede realizar en una formulación de supositorio rectal (véase anteriormente) o en una formulación de enema adecuada. También se pueden usar parches transdérmicos para la vía tópica.

35 Para aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una pomada adecuada que contiene el componente activo en suspensión o disuelto en uno o más vehículos. Los vehículos para administración tópica de los compuestos incluyen, aunque sin limitación, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una loción o crema adecuada que contiene los componentes activos en suspensión o disueltos en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados incluyen, aunque sin limitación, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

40 Para uso oftálmico, las composiciones farmacéuticas se pueden formular como suspensiones micronizadas en solución salina isotónica de pH ajustado o, preferiblemente, como soluciones en solución salina estéril isotónica de pH ajustado, con o sin un conservante, tal como cloruro de bencalconio. Alternativamente, para usos oftálmicos, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una pomada, tal como vaselina.

45 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar también por un aerosol nasal o por inhalación por medio del uso de un nebulizador, un inhalador de polvo seco o un inhalador de dosis medidas. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en este campo de la formulación farmacéutica y se pueden preparar en forma de soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

50 La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales vehículos para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del hospedante tratado y del modo de administración particular. Sin embargo, debe entenderse que una dosificación y un régimen de tratamiento específicos para cualquier paciente particular dependerán de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo, dieta, momento de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos y el criterio del médico a cargo del caso y la gravedad de la enfermedad particular que se esté tratando. La cantidad de ingrediente activo también puede depender del agente terapéutico o profiláctico, si lo hay, con el que se co-administra el ingrediente.

Una cantidad eficaz de una composición farmacéutica es la cantidad que se requiere para conferir un efecto terapéutico al paciente tratado y dependerá de una diversidad de factores, tales como la naturaleza del inhibidor, el tamaño del paciente, el objetivo del tratamiento, la naturaleza de la patología que se ha de tratar, la composición farmacéutica específica usada y el criterio del médico a cargo del caso. Como referencia, véanse Freireich *et al.*, *Cancer Chemother. Rep.* 1966, 50, 219 y *Scientific Tables*, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, New York, 1970, 537. Pueden ser útiles niveles de dosificación comprendidos entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día y entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal al día del compuesto ingrediente activo.

Los siguientes son ejemplos de la práctica de la invención. Dichos ejemplos no han de entenderse, de ningún modo como limitativos del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Prevención de la enfermedad amiloide por transtiretina cambiando la energía de plegamiento anómalo de la proteína

Cientos de enfermedades humanas, incluyendo las amiloidosis, están asociadas con un plegamiento anómalo de las proteínas. Las 80 mutaciones familiares que exacerban [por ejemplo, Val30 → Met30 (V30M) y Leu55 → Pro55 (L55P)] o mejoran [Thr119 → Met119 (T119M)] la patología amiloide por transtiretina (TTR) proporcionan perspectivas valiosas en relación con el mecanismo. Todas las mutaciones asociadas con la enfermedad caracterizadas hasta ahora desestabilizan el tetrámero de TTR y pueden influir en la velocidad de disociación del tetrámero limitante de la velocidad, acelerando las velocidades rápidas y ralentizando las velocidades lentas la amiloidosis. Los inventores aprovecharon el mecanismo por medio del cual T119M impide la enfermedad en heterocigotos de compuesto V30M para desarrollar inhibidores de amiloide de TTR de molécula pequeña que ralentizan espectacularmente el evento de plegamiento anómalo inicial (disociación del tetrámero) necesario para la desnaturalización parcial del monómero, que permite un ensamblaje anómalo en amiloide y otros agregados.

Se aislaron tetrámeros híbridos para entender mejor el mecanismo de trans-supresión. El aumento de la estequiometría de la subunidad T119M con respecto a V30M [o L55P] desplazó el máximo para la formación de fibrillas mediada por ácido a un menor pH, disminuyó la producción total de amiloide a valores de pH fisiológicamente accesibles (> 4,0) y disminuyó la velocidad de amiloidogénesis inducida por ácido (pH 4,4) y mediada por metanol. Se han descubierto varios inhibidores de fibrillas de amiloide de TTR de molécula pequeña, de las que se estudió en la presente memoria descriptiva un subconjunto, incluyendo dos fármacos aprobados por The U.S. Food and Drug Administration (FDA) (inhibidores 8 y 10) (Sacchettini *et al.*, *Nature Rev. Drug Discovery* 1, 267 (2002)). La influencia de la unión al inhibidor de molécula pequeña sobre la producción y velocidad de formación de fibrillas de TTR de tipo natural (WT) fue similar a la de la incorporación de subunidades de T119M. Sin embargo, no se observó el cambio a un valor óptimo de pH inferior para la formación de fibrillas con ninguno de los inhibidores. Estos inhibidores funcionan por medio de la unión a los dos sitios de tiroxina (T4) equivalentes dentro del tetrámero de TTR, no el monómero.

Las velocidades de disociación del tetrámero se midieron asociando cambios estructurales cuaternarios lentos con la transición de desplegamiento, con una velocidad de 5×10^5 veces la de disociación (Hammarström *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16472 (2002)). La disociación detectada por desnaturalización es irreversible porque la concentración de urea usada (> 6,0 M) no puede soportar el replegamiento. El aumento de la estequiometría de la subunidad T119M con respecto a las subunidades V30M [o L55P] reveló una disminución muy acusada de la velocidad de disociación del tetrámero de TTR (1,8 μ M) (limitante de la velocidad para la amiloidogénesis) en tres medios de desnaturalización diferentes (pH ácido, metanol acuoso o urea), explicando el origen de la prevención de la enfermedad.

Las mediciones de la velocidad de disociación del tetrámero de TTR WT (1,8 μ M) en presencia de los inhibidores 6 a 10 (1,8 y 3,6 μ M) mostraron una ralentización dependiente de la dosis para todos los complejos inhibidores de TTR. La velocidad inicial de disociación del tetrámero fue casi inversamente proporcional a la fracción molar del tetrámero unido a dos inhibidores ($T \cdot I_2$). En el caso de los inhibidores 6, 7 y 9 (1,8 μ M), la amplitud del exponencial sencillo se correlacionaba principalmente con la disociación del tetrámero sin ligando (y en un menor grado, $T \cdot I$), lo cual implicaba que $T \cdot I_2$ prevenía la disociación del tetrámero en urea 6 M. Por el contrario, la formación de $T \cdot I$ y $T \cdot I_2$ para los inhibidores 8 y 10 no protegía al tetrámero sustancialmente de la disociación en urea, revelando que la unión sola era insuficiente. La inhibición eficaz observada en el caso de 6, 7 y 9 (3,6 μ M) fue el resultado de la energía de unión que estabilizaba el complejo $T \cdot I_2$ por energías libres que excedían de 2,3 kcal/mol ($\Delta G_1 = RT \ln([T \cdot I]/[T]) = RT \ln([I]/Kd_1)$ y $\Delta G_2 = RT \ln([T \cdot I_2]/[T]) = RT \ln\{[I]^2/(Kd_1 \cdot Kd_2)\}$). La estabilización de $T \cdot I_2$ con respecto a T por 2,7 kcal/mol se traduciría en una disminución de dos órdenes de magnitud en la velocidad de disociación del tetrámero de TTR. La fuerte unión negativamente cooperativa de los inhibidores 8 y 10 (3,6 μ M) indica que la unión al segundo sitio ($T \cdot I_2$, constantes de disociación μ M) no estabilizaría adicionalmente TTR con respecto a la unión al primer sitio ($T \cdot I$). Las constantes de disociación nM (Kd_1 y Kd_2) de los inhibidores 6, 7 y 9 asegurarían que la estabilización en estado basal (> 2,3 kcal/mol) sería suficiente para aumentar sustancialmente la barrera de activación para la disociación del tetrámero de TTR, siempre que los inhibidores no se unan y estabilicen similarmente el estado de transición de disociación. Las velocidades de disociación del inhibidor del complejo $T \cdot I_2$ y $T \cdot I$ también podrían participar

en la eficacia de los inhibidores 6, 7 y 9. La TTR saturada con inhibidor se inmovilizó por una resina con anticuerpo, sobre la que se pasó tampón acuoso a 5,0 mL/min para evaluar velocidades de disociación eficaces de 6 a 10. Los mejores inhibidores fueron los que tenían las menores velocidades de disociación aparentes.

Aunque generalmente hay una correlación muy buena entre las tasas de amiloidogénesis (condiciones ácidas) y las velocidades de disociación de tetrámeros (en urea) en presencia de inhibidores, esto no ocurre necesariamente. La amiloidogénesis requiere un ensamblaje anómalo dependiente de la concentración después de la disociación. De esta manera, las moléculas pequeñas serán generalmente más eficaces para prevenir la formación de fibrillas que la disociación del tetrámero, especialmente cuando el inhibidor puede mantener baja ($< 3,6 \mu\text{M}$) la concentración del intermedio amiloidogénico monomérico, cuando la formación de fibrillas es muy ineficaz. Ocasionalmente, las velocidades de disociación de tetrámero medidas en urea no predecirán de forma precisa el orden de clasificación de eficacias de inhibidor en condiciones ácidas. Por ejemplo, el fármaco diflunisal (8) aprobado por la FDA era un inhibidor de amiloides mucho mejor que un inhibidor de disociación del tetrámero. Una explicación probable de esta observación es que los valores de K_{d1} y/o K_{d2} son menores en ácido que en urea (18). Además, algunos inhibidores se comportan mucho mejor en condiciones de desnaturalización que lo que sugerirían sus constantes de unión determinadas en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, el compuesto (9) era más o igual de eficaz para prevenir la disociación de tetrámeros (urea) y la formación de fibrillas (ácido) que el inhibidor 7, a pesar de que el inhibidor 9 tenía valores de K_{d1} y K_{d2} que eran 10 y 83 veces el de 7, respectivamente (medidos en condiciones fisiológicas). De esta manera, es importante juzgar la eficacia de los inhibidores de plegamiento anómalo en una diversidad de condiciones de desnaturalización y no sólo en condiciones fisiológicas.

La inclusión de subunidades de trans-supresor T119M en tetrámeros compuestos por otra parte de subunidades asociadas con la enfermedad podría reducir la velocidad de disociación del tetrámero estabilizando el estado basal tetramérico en mayor medida que el estado de transición (como ocurre con los inhibidores de molécula pequeña) y/o desestabilizando el estado de transición de disociación. Para distinguir entre estas posibilidades, se compararon las cinéticas de reconstitución de homotetrámeros WT y T119M. El replegamiento de monómeros de T119M fue rápido y dentro del error de la velocidad de plegamiento de los monómeros de TTR WT. Sin embargo, el re-ensamblaje de monómeros plegados de T119M fue dos órdenes de magnitud más lento que la tetramerización de monómeros de TTR WT iniciada por dilución con urea. El proceso de re-ensamblaje es bifásico, lo cual puede explicarse por la presencia de un intermedio observable en la ruta de ensamblaje (probablemente un dímero). En la dirección opuesta, el tetrámero de T119M se disocia a $1/37$ la velocidad presentada por el tetrámero de TTR WT. Estos efectos cinéticos no pueden atribuirse a las diferencias en la estabilidad estructural terciaria y/o estabilidad del tetrámero. Una comparación directa de la estabilidad termodinámica de monómeros WT y T119M (empleando una construcción de TTR monomérica modificada por ingeniería genética (M-TTR)) reveló una diferencia en la energía libre Delta Delta G para el desplegamiento de solo 0,4 kcal/mol, mucho menor que las 2,1 y 2,7 kcal/mol requeridas para explicar las diferencias de la velocidad de disociación y ensamblaje, respectivamente. Un análisis de ciclo termodinámico de T119M y TTR WT reveló que T119M impide la disociación del tetrámero desestabilizando el estado de transición de disociación en aproximadamente 3,1 kcal/mol, no por estabilización del tetrámero. De acuerdo con este análisis, el tetrámero de T119M se desestabiliza realmente en 0,9 kcal/mol con respecto a WT, lo que confirma adicionalmente un mecanismo de estabilización cinético. La diferencia de energía libre entre la disociación del tetrámero WT y T119M no puede medirse por medio de un desplegamiento mediado por urea porque la desnaturalización de T119M en urea requiere periodos de incubación muy largos (varias semanas), durante los cuales la TTR se modifica. Las comparaciones de curvas de desnaturalización por cloruro de guanidinio (GdmCl) y tiocianato de guanidinio (GdmSCN) revelaron que TTR WT era más resistente a la desnaturalización por GdmCl que T119M, mientras que en GdmSCN ocurría lo contrario. Estas diferencias en los puntos medios de desnaturalización pueden atribuirse a la estabilización diferencial de aniones, lo que sugiere que las verdaderas estabilidades termodinámicas de estas proteínas son muy similares, aunque no es posible un análisis cuantitativo en estos caóticos.

La trans-supresión de T119M está mediada principalmente por la desestabilización del estado de transición de disociación, coherente con la colocación de T119M en la interfaz dímero-dímero. Al aumentar la energía del estado de transición disociativo en 3,1 kcal/mol se impide eficazmente la disociación del tetrámero porque la barrera de activación se convierte en insuperable (la semivida de disociación $t_{1/2}$ aumenta desde aproximadamente 42 horas hasta > 1500 horas). La unión de moléculas pequeñas aumenta similarmente la barrera de activación asociada con la disociación de tetrámeros de manera dependiente de la dosis, aunque esto está mediado por la estabilización del tetrámero (con respecto a la estabilización del estado de transición). El grado de estabilización es máximo cuando las constantes de disociación de molécula pequeña K_{d1} y K_{d2} tienen el mínimo valor posible y la concentración del inhibidor es la máxima posible. Las concentraciones usadas en los experimentos realizados por los inventores para la estabilización en estado basal son comparables a las observadas en plasma para numerosos fármacos disponibles por vía oral.

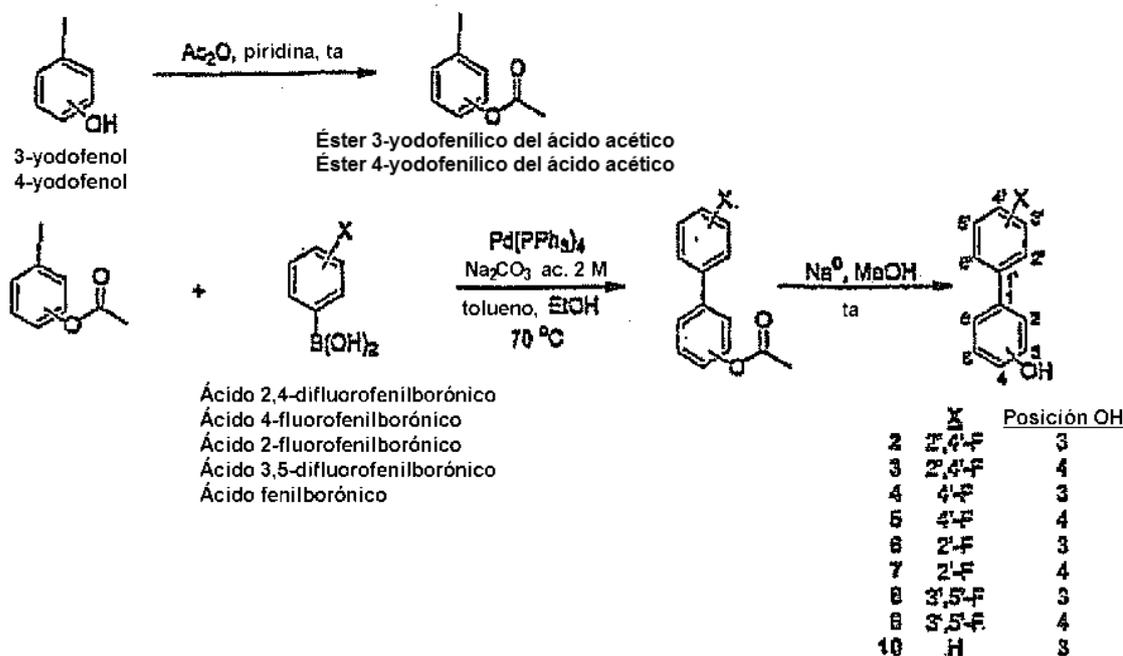
La unión de moléculas pequeñas y la trans-supresión aumentan la energía de activación asociada con la disociación del tetrámero, la etapa limitante de la velocidad de la formación de fibrillas de TTR. El establecimiento de esta analogía es importante porque se sabe que la trans-supresión impide la enfermedad en heterocigotos para el compuesto V30M. La estabilización cinética del estado natural es una estrategia particularmente atractiva, considerando las pruebas que están apareciendo que los oligómeros con plegamiento anómalo pequeños son neurotóxicos. Ahora debería considerarse el descubrimiento de agentes de unión de molécula pequeña o el desarrollo de una estrategia

de trans-supresión para ajustar el marco de energía de otras proteínas patológicamente relevantes con una predilección por el plegamiento anómalo.

Ejemplo 2: Los análogos de diflunisal estabilizan el estado natural de la transtiretina y son inhibidores de la formación de fibrillas de amiloides de transtiretina

- 5 El diflunisal (1) puede reducir la amiloidogénesis por transtiretina (TTR). Por ejemplo, en ciertas condiciones (por ejemplo, TTR 3,6 μ M, diflunisal 3,6 μ M, pH 4,4, 72 h, 37°C), el diflunisal reduce la amiloidogénesis por TTR en 63%. En estas condiciones, al doblar la concentración de diflunisal (hasta 7,2 μ M) se reduce la amiloidogénesis en 97%. El diflunisal es uno de los mejores inhibidores de fibrillas de amiloide descritos hasta la fecha y el diflunisal administrado por vía oral presenta una alta biodisponibilidad, produciendo una concentración plasmática sostenida que excede de 100 μ M a dosis de 250 mg dos veces al día. Como el diflunisal es un inhibidor de la ciclooxigenasa-2, la administración a largo plazo produciría efectos secundarios gastrointestinales. Por lo tanto, podrían ser deseables análogos de diflunisal que tengan una actividad de NSAID reducida o ausente, pero posean alta afinidad por TTR en plasma sanguíneo. Por tanto, la estructura del diflunisal se puede usar como base para diseñar nuevos compuestos que puedan inhibir la amiloidogénesis por TTR. Véanse, por ejemplo, Verbeeck, R. K.; *et al. Biochem. Pharm.* **1980**, 29, 571-576; y Nuernberg, B.; Koehler, G.; Brune, K., *Clin. Pharmacokin.* **1991**, 20, 81-89.

Se sintetizaron análogos de diflunisal usando un acoplamiento de Suzuki mediado por Pd entre un haluro de arilo y un ácido aril-borónico. La síntesis de los análogos **2-10** se consiguió por acetilación de 3- o 4-yodofenol con anhídrido acético y piridina, seguido por acoplamiento de Suzuki con el ácido fluorofenil-borónico apropiado en condiciones de reacción de acoplamiento de Suzuki estándares, como se muestra en el Esquema I. La eliminación del éster con Na⁰ y MeOH (condiciones de Zemplén) proporcionó los fenoles **2-10**. Véanse, por ejemplo, Miyaura, N.; Yanagi, T.; Suzuki, A., *Synth. Commun.* **1981**, 11, 513-519; Sharp, M. J.; Snieckus, V., *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 5997-6000; Sharp, M. J.; Cheng, W.; Snieckus, V., *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 5093-5096; Pozsgay, V.; Nanasi, P.; Neszmelyi, A., *Carbohydr. Res.* **1981**, 90, 215-231; Jendralla, H.; Chen, L. J. *Synthesis* **1990**, 827-833; y Kelm, J.; Strauss, K., *Spectrochim. Acta, Part A.* **1981**, 37, 689-692, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

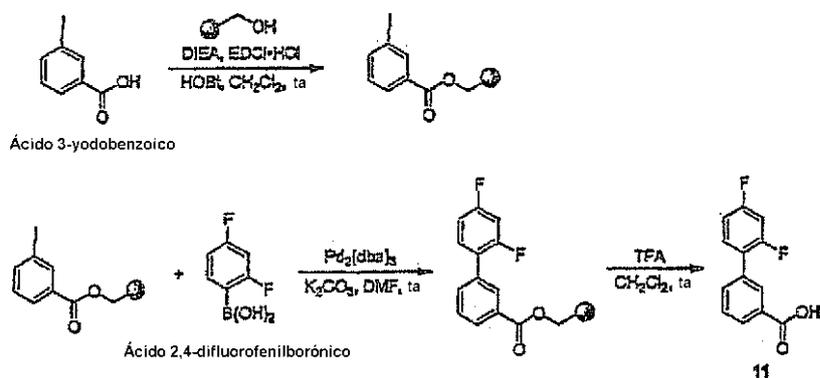


25

Esquema 1

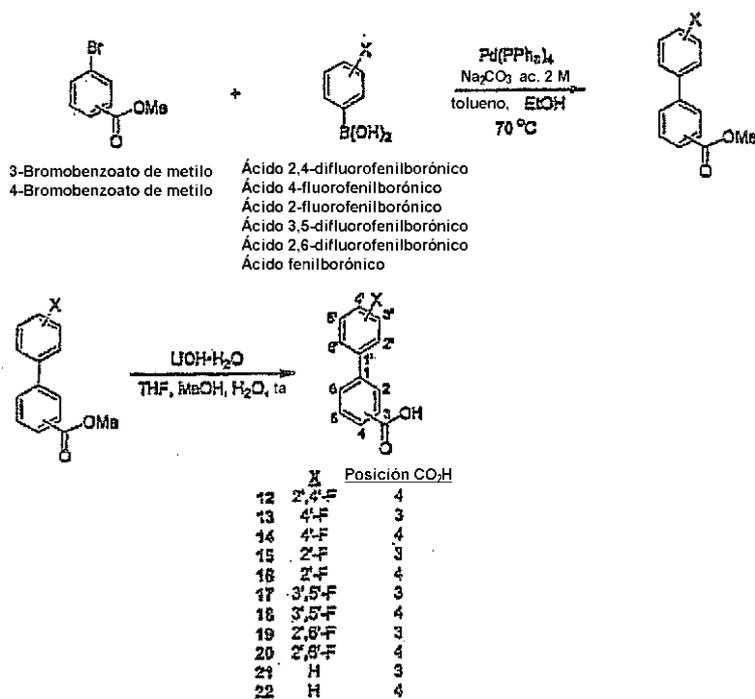
El análogo de diflunisal **11** se sintetizó usando métodos de fase sólida, como se muestra en el Esquema 2. Se acopló ácido 3-yodobenzoico a resina de Wang mediante un enlace éster, produciendo el yoduro de fenilo unido a resina, que después se acopló con el ácido 2,4-difluorofenil-borónico y se escindió de la resina con una mezcla 1:1 de TFA:CH₂Cl₂. Véase, por ejemplo, Guiles, J. W.; Johnson, S. G.; Murray, W. V., *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 5169-5171, que se incorpora como referencia en su totalidad.

30



Esquema 2

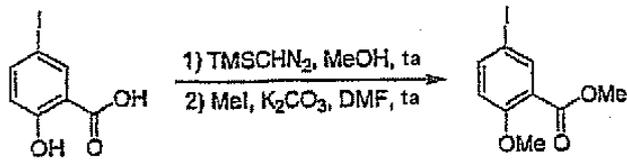
5 Los sustratos que contienen el carboxilato **12-22** se ensamblaron por acoplamiento de 3-bromobenzoato de metilo o 4-bromobenzoato de metilo (ambos comercialmente disponibles) con el ácido fluorofenil-borónico apropiado utilizando condiciones de acoplamiento de Suzuki (véase anteriormente), como se muestra en el Esquema 3. Después, el éster se saponificó con LiOH-H₂O para proporcionar el carboxilato correspondiente. Véanse, por ejemplo, Burnagin, N. A.; Bykov, V. V., *Tetrahedron* **1997**, *53*, 14437-14450; Ananthakrishnanadar, P.; Kannan, N., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1982**, 1305-1308; Homsí, F.; Nozaki, K.; Hiyama, T., *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5869-5872; y Hajduk, P. J.; *et al.*, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3144-3150, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.



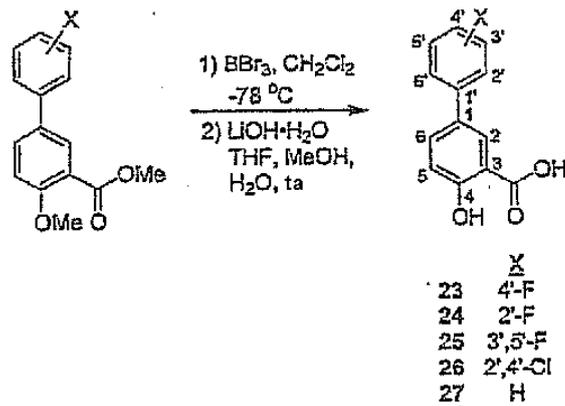
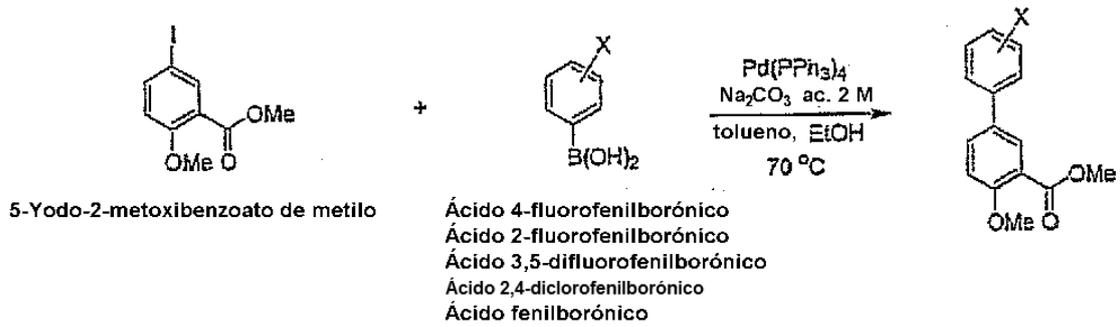
Esquema 3

10 Se esterificó ácido 5-yodosalicílico usando TMS-CH₂N₂ y el fenol se convirtió en un éter metílico empleando MeI. El ácido salicílico protegido se acopló con los diversos ácidos fluorofenilborónicos y posteriormente se desprotegió por saponificación con LiOH-H₂O y desmetilación con BBr₃ para proporcionar los derivados de ácido salicílico **23-27**, como se muestra en el Esquema 4. Véanse, por ejemplo, Nicolaou, K. C.; *et al.*, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2602-2621; y Chu-Moyer, M. Y.; *et al.*, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 511-528.

15

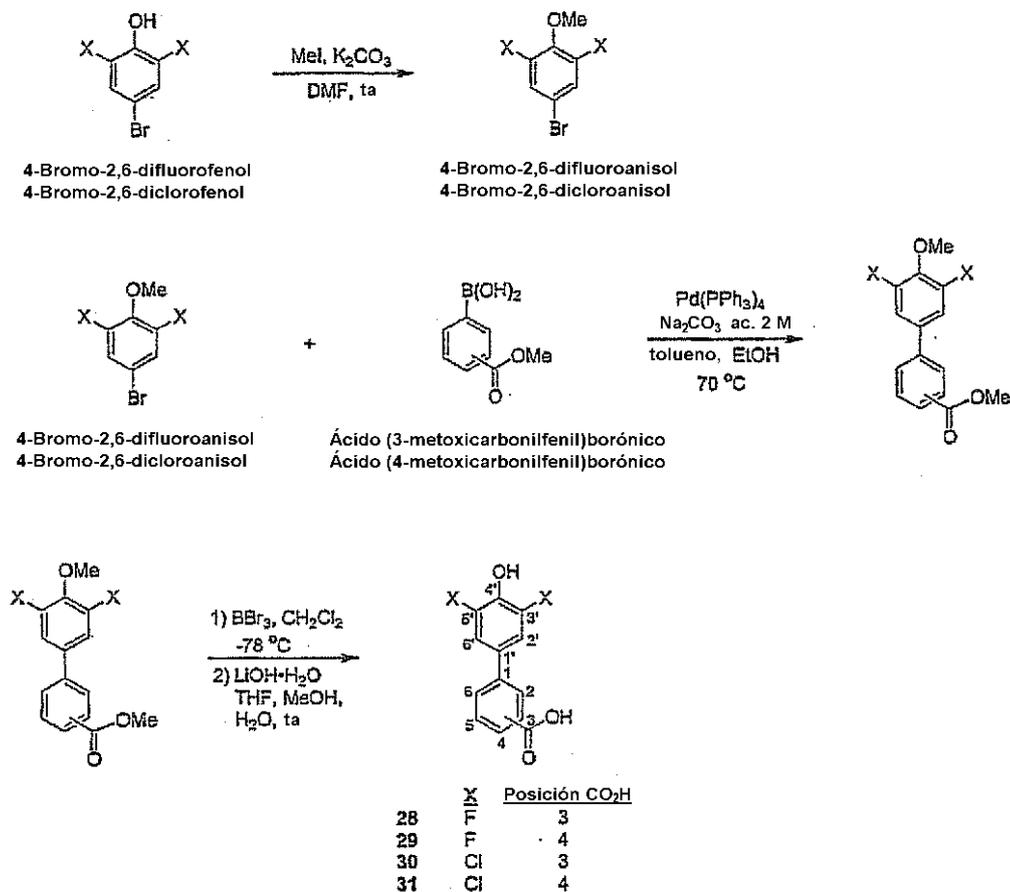


5-Yodo-2-metoxibenzoato de metilo



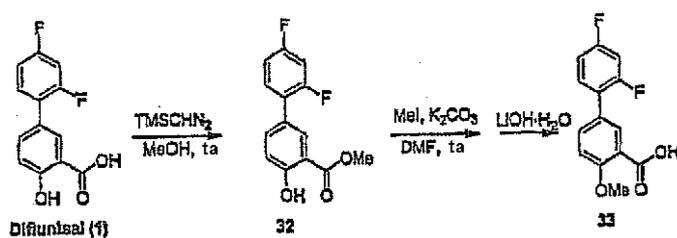
Esquema 4

5 Los análogos que contienen 3',5'-dihalo-4'-hidroxilo **28-31** se sintetizaron protegiendo primero el bromofenol comercialmente disponible en forma del éter metílico (MeI y K_2CO_3). El acoplamiento de Suzuki con un ácido (metoxycarbonilfenil)borónico dio como resultado la formación de los sustratos de bifenilo totalmente protegidos. La escisión del éter metílico mediada por BBr_3 y la saponificación con $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ proporcionaron los análogos de diflunisal totalmente funcionalizados **28-31**, como se muestra en el Esquema 5.



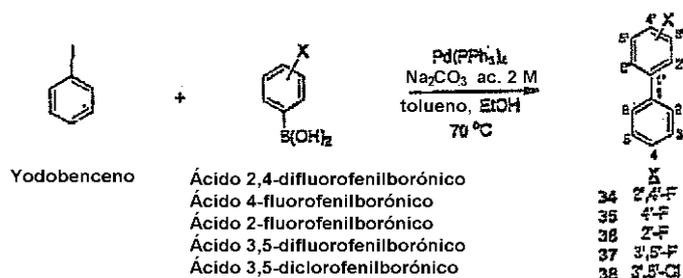
Esquema 5

Los análogos de éter metílico y éster metílico de diflunisal se sintetizaron por esterificación del ácido carboxílico con TMS-diazometano para proporcionar **32**, seguido opcionalmente por eterificación con MeI y K_2CO_3 e hidrólisis del éster con $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ para producir **33**. Véase el Esquema 6.



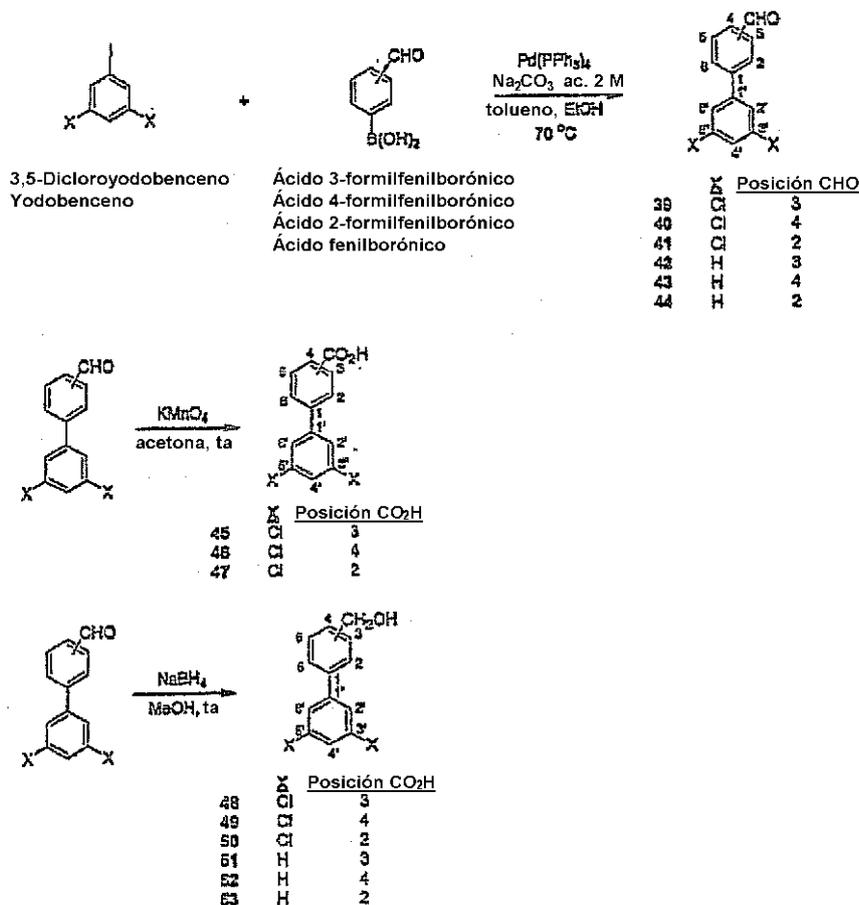
Esquema 6

Una serie de bifenilos halogenados **34-38** se ensamblaron por acoplamiento de Suzuki de yodobenceno con una serie de ácidos borónicos que contienen halógeno, como se muestra en el Esquema 7. Véanse, por ejemplo, Patrick, T. B.; Willaredt, R. P.; DeGonia, D. J., *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2232-2235; Kuchar, M.; *et al.*, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1988**, *53*, 1862-1872; Allen, K. J.; Bolton, R.; Williams, G. H., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1983**, 691-695; Nakada, M.; *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 3122-3126; y Weingarten, H., *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 730-733, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.



Esquema 7

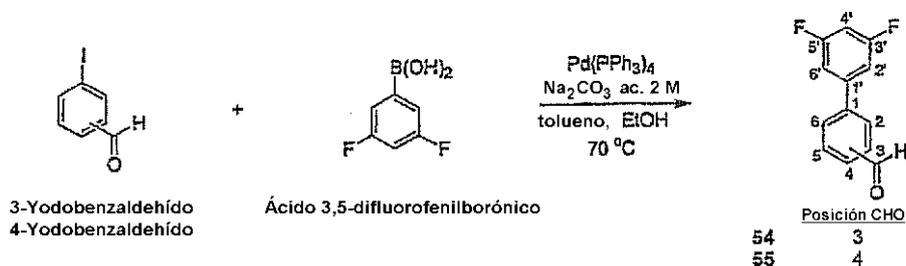
Los aldehídos biarílicos clorados se ensamblaron usando 3,5-dicloroyodobenceno y ácido 2-, 3- o 4-formilfenilborónico, como se muestra en el Esquema 8. Los aldehídos **42-44**, que carecían de sustitución con halógeno, se prepararon análogamente. Los aldehídos **39-41** se oxidaron con KMnO_4 en acetona/agua para proporcionar los ácidos carboxílicos correspondientes **45-47** o se redujeron con NaBH_4 en MeOH para proporcionar los alcoholes bencílicos correspondientes **51-53**. Véanse, por ejemplo, Song, X. P.; He, H. T.; Siahaan, T., *J. Org. Lett.* **2002**, *4*, 549-552; y Nicolaou, K. C.; et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9313-9323; Hashizume, H.; et al., *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 512-520; Indolese, A. F., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3513-3516; Pridgen, L. N.; Snyder, L.; Prol, J., *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1523-1526; Huang, C. G.; Beveridge, K. A.; Wan, P., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7676-7684; Wendeborn, S.; et al., *Synlett.* **1998**, *6*, 671-675; Stevens, C. V.; Peristeropoulou, M.; De Kimpe, N., *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7865-7870; Tanaka, K.; Kishigami, S.; Toda, F., *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2981-2983; y Clive, D. L. J.; Kang, S. Z., *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6083-6091, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.



Esquema 8

Los bifenilos funcionalizados con 3',5'-difluoroformilo **54** y **55** se sintetizaron por acoplamiento de Suzuki de ácido 3,5-difluorofenilborónico con 2- o 3-yodobenzaldehído, como se muestra en el Esquema 9. Todos los demás inhibi-

dores se sintetizaron por métodos similares y se describieron previamente. Los compuestos **10**, **21**, **35**, **36** y **43** están comercialmente disponibles.



Esquema 9

5 Los reactivos y disolventes se adquirieron a Aldrich Lancaster, Acros, Combi-Blocks, Matrix and Pfaltz-Bauer. El THF y el CH_2Cl_2 se secaron haciéndolos pasar por Al_2O_3 . A menos que se indique otra cosa, se obtuvieron otros disolventes y reactivos de proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional. Las reacciones se controlaron por cromatografía analítica de capa fina (TLC) sobre placas recubiertas previamente de gel de sílice 60 F_{254} con indicador fluorescente adquirido a EM Science. La visualización de las placas de TLC se realizó por iluminación con UV, tratamiento con ácido fosfomolibdico seguido por calor o tratamiento con molibdato de amonio y cerio seguido por calor. La cromatografía de desarrollo rápido se realizó usando gel de sílice 60 (malla 230-400) de EM Science. La pureza de los nuevos compuestos que eran esenciales para las conclusiones extraídas en el texto se determinó por HPLC. La HPLC en fase normal se realizó con una bomba/controlador Waters 600, un detector de matriz de fotodiodos Waters 996 y una columna de sílice Waters NovaPak. El sistema de disolventes empleado fue hexanos y acetato de etilo y los gradientes se realizaron desde hexanos:acetato de etilo 50:50 hasta hexanos:acetato de etilo 0:100 durante 30 min. La HPLC en fase inversa se realizó con una bomba/controlador Waters 600, un detector de longitud de onda dual Waters 2487 y una proteína Vydac y una columna de péptidos C18. El sistema de disolvente A fue agua:acetonitrilo 95:5 con ácido trifluoroacético al 0,5% y el disolvente B fue agua:acetonitrilo 5:95 con ácido trifluoroacético al 0,5%. Los gradientes se realizaron desde A:B 100:0 hasta A:B 0:100 durante 20 min con un mantenimiento en B al 100% durante 10 min más. La espectroscopía de dicroísmo circular se realizó en un espectrómetro AVIV Instruments, modelo 202SF. Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro de RMN Varian FT a una frecuencia de protones de 400 MHz. Los desplazamientos químicos de protones se expresan en partes por millón (ppm) con respecto a CHCl_3 como patrón interno de desplazamientos químicos (7,26 ppm) a menos que se indique otra cosa. Las constantes de acoplamiento se expresan en hertzios (Hz). Los desplazamientos químicos de carbono se expresan en partes por millón (ppm) con respecto a CDCl_3 como patrón de desplazamientos químicos (77,23 ppm) a menos que se indique otra cosa. Todos los espectros de masas se obtuvieron en The Scripps Research Institute Center for Mass Spectrometry o el University of Illinois Mass Spectrometry Laboratory.

Los compuestos **2-10** se prepararon de acuerdo con el Esquema 1. A una solución apropiada del éster yodofenílico del ácido acético (1,0 equiv.) disuelto en suficiente cantidad de tolueno para dar una concentración de 0,05 M, se añadió una solución de ácido fenilborónico (1,1 equiv.) disuelto en EtOH para dar una solución 0,6 M con respecto al ácido borónico. Se añadió una solución acuosa 2 M de Na_2CO_3 para dar una concentración final en la mezcla de reacción de 0,03 M con respecto al éster yodofenílico del ácido acético, seguido por la adición de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (al 4,0% en moles). La mezcla de reacción se calentó a reflujo en una atmósfera de Ar durante 20 h y, después que se completó la reacción, se enfrió hasta la temperatura ambiente (ta) y se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x), se lavó con salmuera (1 x), se secó sobre MgSO_4 y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía de desarrollo rápido (hexano:acetato de etilo 10:1) para producir el bifenilo acetilado.

Se añadió una cantidad catalítica de Na^0 a una solución del bifenilo acetilado en MeOH para proporcionar una concentración final en la mezcla de reacción de 0,3 M. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente (ta) en una atmósfera de Ar durante 12 h, después de lo cual se añadió resina de intercambio catiónico Dowex 50W-X8 para neutralizar la mezcla de reacción. La resina se filtró y el filtrado se concentró a vacío y se sometió a cromatografía de desarrollo rápido (hexano:acetato de etilo 3:1) para obtener los productos de hidroxibifenilo en forma de sólidos blancos con rendimientos de 22-75%.

2',4'-Difluorobifenil-3-ol (2). ^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 9,63 (s ancho, 1H), 7,54 (td, 1H, $J = 8,9, 6,7$ Hz), 7,34 (ddd, 1H, $J = 11,1, 9,2, 2,6$ Hz), 7,27 (m, 1H), 7,17 (tdd, 1H, $J = 8,3, 2,6, 1,2$ Hz), 6,92 (m, 2H), 6,81 (ddd, 1H, $J = 8,1, 2,5, 1,0$ Hz). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 162,8, 160,3, 157,4, 135,4, 131,8, 129,7, 119,4, 115,6, 114,9, 111,9, 104,4. Espectro de masas, con ionización por electropulverización, de alta resolución (HRESIMS) calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}$ (M-H) 205,0466, encontrado 205,0465. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 10,5 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 1,3 min. >99% de pureza.

2',4'-Difluorobifenil-4-ol (3). ^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7,49 (td, 1H, $J = 9,4, 8,6$ Hz), 7,34 (AA'XX', 2H, $J_{AA'} = J_{XX'} = 2,5$ Hz, $J_{XA} = 8,7$ Hz, $J_{XA'} = 8,5$ Hz, $J_{X'A} = 0,3$ Hz, $J_{X'A'} = 0,3$ Hz, $\nu_A = \nu_{A'} = 2934,1$ Hz, $\nu_X = \nu_{X'} = 2746,2$ Hz), 7,28

(ddd, 2H, $J = 11,3, 9,4, 2,6$ Hz), 7,13 (dddd, 1H, $J = 8,3, 7,5, 2,8, 1,0$ Hz), 6,87 (AA'XX', 2H, como antes). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 162,3, 160,0, 157,2, 131,4, 129,9, 124,8, 115,4, 111,8, 104,3. HRESIMS calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}$ (M-H) 205,0464, encontrado 205,0465. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 11,2 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 12,6 min. >98% de pureza.

5 **3',5'-Difluorobifenil-3-ol (8)**. ^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 9,65 (s ancho, 1H), 7,34 (m, 2H), 7,28 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz), 7,19 (tt, 1H, $J = 9,1, 2,2$ Hz), 7,13 (ddd, 1H, $J = 7,8, 1,8, 1,0$ Hz), 7,08 (t, 1H, $J = 2,1$ Hz), 6,86 (ddd, 1H, $J = 8,0, 2,4, 1,0$ Hz). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 162,9, 158,0, 144,1, 139,1, 130,1, 117,6, 115,7, 109,7, 102,6. HRESIMS calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}$ (M-H) 205,0465, encontrado 205,0468. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 11,4 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 12,9 min. >99% de pureza.

10 **3',5'-Difluorobifenil-4-ol (9)**. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,44 (AA'XX', 2H, $J_{AA'} = J_{XX'} = 3,0$ Hz, $J_{XA} = 8,0$ Hz, $J_{XA'} = 8,5$ Hz, $J_{XA} = 0,7$ Hz, $J_{XA'} = 0,5$ Hz, $\nu_A = \nu_{A'} = 2973,8$ Hz, $\nu_X = \nu_{X'} = 2766,0$ Hz), 7,05 (dtd, 2H, $J = 6,6, 2,4, 0,7$ Hz), 6,92 (AA'XX', 2H, como antes), 6,74 (tt, 1H, $J = 8,9, 2,4$ Hz), 5,11 (s, 1H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 164,7, 156,1, 144,2, 131,8, 128,6, 116,1, 109,6, 102,1. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_2$ (M-H) 205,0465, encontrado 205,0465. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 10,8 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 12,9 min. >99% de pureza.

15 **Ácido 2',4'-difluorobifenil-3-carboxílico (11)**. El compuesto **11** se preparó de acuerdo con el Esquema 2. Se añadieron ácido 3-yodobenzoico (200 mg, 0,81 mmol), DIEA (140 μL , 0,81 mmol), EDCI-HCl y HOBt a una solución de resina de Wang (265 mg, 0,67 mmol, 2,53 mmol/g) hinchada en CH_2Cl_2 (10 mL). Después de agitación vigorosa en un agitador de péptidos durante 22 h a temperatura ambiente (ta), el disolvente se retiró y la resina se lavó con DMF (3 x 10 mL) y CH_2Cl_2 (3 x 10 mL) y se secó exhaustivamente a vacío.

Se añadieron ácido 2,4-difluorofenil-borónico (112 mg, 0,71 mmol), K_2CO_3 (98 mg, 0,71 mmol) y $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (4 mg, 0,01 mmol) a una solución de resina de Wang funcionalizada (140 mg, 0,35 mmol) hinchada en DMF (2 mL). Después de agitar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró y la resina se lavó con DMF (3 x), H_2O (3 x), CH_2Cl_2 (3 x) y MeOH (3 x) y se secó exhaustivamente a vacío.

25 A la resina funcionalizada se añadió una solución de TFA: CH_2Cl_2 (3 mL, 1:1) (140 mg, 0,35 mmol) y se agitó vigorosamente en un agitador de péptidos durante 13 h a temperatura ambiente. Después que se completó la reacción, la mezcla se filtró, la resina se lavó con CH_2Cl_2 (3 x) y el filtrado se concentró a vacío y se purificó por cromatografía de desarrollo rápido (hexano:acetato de etilo 2:1, ácido acético al 0,5%), para producir el compuesto **11** (81 mg, 100%) en forma de un sólido blanco. ^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 13,19 (s ancho, 1H), 8,07 (q, 1H, $J = 1,7$ Hz), 7,99 (dt, 1H, $J = 7,9, 1,6$ Hz), 7,78 (dq, 1H, $J = 7,8, 1,3$ Hz), 7,64 (m, 2H), 7,40 (ddd, 1H, $J = 11,1, 8,8, 2,5$ Hz), 7,22 (tdd, 1H, $J = 8,4, 2,8, 1,0$ Hz). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 167,0, 160,7, 160,4, 134,5, 133,0, 132,0, 131,3, 129,4, 129,1, 128,7, 123,9, 112,2, 104,6. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_2$ (M-H) 233,0414, encontrado 233,0426. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 13,7 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 12,5 min. >99% de pureza.

35 Los compuestos **12-22** se prepararon de acuerdo con el Esquema 3. A una solución apropiada de bromobenzoato de metilo (1,0 equiv.) disuelto en suficiente cantidad de tolueno para dar una concentración de 0,1 M se añadió una solución de ácido fenilborónico (2,0 equiv.) disuelto en EtOH para dar una solución 1,0 M de ácido borónico. Se añadió una solución acuosa 2 M de Na_2CO_3 para dar una concentración final en la mezcla de reacción de 0,06 M con respecto al bromobenzoato, seguido por la adición de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (al 10,0% en moles). La mezcla de reacción se agitó a 70°C en una atmósfera de Ar durante 25 h y, después que se completó la reacción, se enfrió a temperatura ambiente y se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x), se lavó con salmuera (1 x), se secó sobre MgSO_4 y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía de desarrollo rápido (hexano:acetato de etilo 10:1) para producir el éster metílico.

45 A una solución de éster metílico (1,0 equiv.) en THF:MeOH: H_2O (1:1:1) a una concentración de 0,06 M se añadió LiOH- H_2O (3,0 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y, después que se completó la reacción, se acidificó con HCl al 30%, se extrajo con acetato de etilo (3 x 5 mL), se secó sobre MgSO_4 y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía de desarrollo rápido (CH_2Cl_2 , MeOH al 1%, ácido acético al 0,2%) para producir los ácidos bifenilcarboxílicos en forma de sólidos blancos con rendimientos de 6 - 93%.

50 **Ácido 2',4'-difluorobifenil-4-carboxílico (12)**. ^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 13,09 (s ancho, 1H), 8,04 (AA'XX', 2H, $J_{AA'} = J_{XX'} = 2,0$ Hz, $J_{XA} = J_{XA'} = 8,0$ Hz, $J_{XA} = J_{XA'} = 0,7$ Hz, $\nu_A = \nu_{A'} = 3213,3$ Hz, $\nu_X = \nu_{X'} = 3056,2$ Hz), 7,65 (AA'XX', 2H, como antes), 7,63 (m, 1H), 7,38 (ddd, 1H, $J = 11,2, 9,0, 2,8$ Hz), 7,21 (td, 1H, $J = 8,4, 2,2$ Hz). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 167,1, 160,8, 158,0, 138,6, 132,1, 130,1, 129,6, 129,0, 123,9, 112,2, 104,7. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_2$ (M-H) 233,0414, encontrado 233,0407. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 13,3 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 12,6 min. >99% de pureza.

55 **Ácido 2'-fluorobifenil-3-carboxílico (15)**. ^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ 8,18 (q, 1H, $J = 1,4$ Hz), 8,03 (dt, 1H, $J = 7,8, 1,3$ Hz), 7,76 (dq, 1H, $J = 7,7, 1,5$ Hz), 7,55 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz), 7,48 (td, 1H, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,38 (dddd, 1H, $J = 8,3, 7,5, 5,1, 1,8$ Hz), 7,26 (td, 1H, $J = 7,6, 1,3$ Hz), 7,20 (ddd, 1H, $J = 11,0, 8,2, 1,2$ Hz). ^{13}C RMN (CD_3OD , 100 MHz) δ 169,7, 161,2, 137,5, 134,6, 132,4, 132,0, 131,3, 130,1, 129,9, 129,5, 126,0, 117,2. HRESIMS calculado para

$C_{13}H_9FO_2$ (M-H) 215,0508, encontrado 215,0498. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 10,6 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 12,1 min. >99% de pureza.

5 **Ácido 2'-fluorobifenil-4-carboxílico (16).** 1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 13,10 (s ancho, 1H), 8,05 (AA'XX', 2H, $J_{AA'} = J_{XX'} = 1,7$ Hz, $J_{XA} = J_{XA'} = 8,5$ Hz, $J_{XA} = J_{XA'} = 0,3$ Hz, $\nu_A = \nu_{A'} = 3217,9$ Hz, $\nu_X = \nu_{X'} = 3070,0$ Hz), 7,67 (AA'XX', 2H, como antes), 7,58 (td, 1H, $J = 8,0, 1,8$ Hz), 7,34 (m, 1H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 167,1, 159,1, 139,4, 130,8, 130,3, 130,2, 129,6, 129,0, 127,3, 125,1, 116,2. HRESIMS calculado para $C_{13}H_9FO_2$ (M-H) 215,0508, encontrado 215,0515. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 12,3 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 12,2 min. >99% de pureza.

10 **Ácido 3',5'-difluorobifenil-3-carboxílico (17).** 1H RMN (acetona- d_6 , 400 MHz) δ 8,30 (td, 1H, $J = 2, 0,5$ Hz), 8,10 (dtd, 1H, $J = 7,6, 1,1, 0,5$ Hz), 7,97 (ddd, 1H, $J = 7,8, 2,0, 1,1$ Hz), 7,64 (td, 1H, $J = 7,8, 0,6$ Hz), 7,39 (m, 2H), 7,06 (tt, 1H, $J = 9,3, 2,4$ Hz). ^{13}C RMN (acetona- d_6 , 100 MHz) δ 167,4, 165,6, 163,2, 144,6, 139,8, 132,5, 132,4, 130,6, 130,3, 128,9, 111,0, 103,7. HRESIMS calculado para $C_{13}H_8F_2O_2$ (M-H) 233,0414, encontrado 233,0425. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 13,5 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 12,7 min. >99% de pureza.

15 **Ácido 3',5'-difluorobifenil-4-carboxílico (18).** 1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 13,15 (s ancho, 1H), 8,02 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz), 7,85 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 7,49 (m, 2H), 7,26 (tt, 1H, $J = 9,4, 2,4$ Hz). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 166,4, 164,1, 161,7, 142,6, 141,6, 130,9, 130,0, 127,1, 110,2, 103,5. HRESIMS calculado para $C_{13}H_8F_2O_2$ (M-H) 233,0414, encontrado 233,0423. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 13,0 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 12,8 min. >99% de pureza.

20 **Ácido 2',6'-difluorobifenil-3-carboxílico (19).** 1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 8,03 (dt, 1H, $J = 7,8, 1,6$ Hz), 8,00 (m, 1H), 7,72 (dt, 1H, $J = 7,8, 1,4$ Hz), 7,64 (t, 1H, $J = 7,7$ Hz), 7,53 (m, 1H), 7,26 (t, 2H, $J = 8,3$ Hz). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 167,7, 158,7, 135,0, 132,2, 131,4, 131,1, 129,9, 129,5, 129,5, 112,8, 110,9. HRESIMS calculado para $C_{13}H_8F_2O_2$ (M-H) 233,0414, encontrado 233,0410. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 12,1 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 12,1 min. >97% de pureza.

25 **Ácido 2',6'-difluorobifenil-4-carboxílico (20).** 1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 8,06 (AA'XX', 2H, $J_{AA'} = J_{XX'} = 2,0$ Hz, $J_{XA} = J_{XA'} = 8,0$ Hz, $J_{XA} = J_{XA'} = 0,7$ Hz, $\nu_A = \nu_{A'} = 3243,6$ Hz, $\nu_X = \nu_{X'} = 3018,6$ Hz), 7,60 (AA'XX', 2H, como antes), 7,54 (m, 1H), 7,27 (t, 2H, $J = 8,3$ Hz). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 171,0, 164,0, 134,1, 125,7, 122,0, 121,9, 121,1, 103,4. HRESIMS calculado para $C_{13}H_8F_2O_2$ (M-H) 233,0414, encontrado 233,0425. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 14,5 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 12,1 min. >99% de pureza.

30 **Ácido bifenil-4-carboxílico (22).** 1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 13,07 (s ancho, 1H), 8,03 (AA'XX', 2H, $J_{AA'} = J_{XX'} = 1,8$ Hz, $J_{XA} = J_{XA'} = 8,3$ Hz, $J_{XA} = J_{XA'} = 0,3$ Hz, $\nu_A = \nu_{A'} = 3210,7$ Hz, $\nu_X = \nu_{X'} = 3122,0$ Hz), 7,81 (AA'XX', 2H, como antes), 7,75 (m, 2H), 7,51 (tt, 2H, $J = 7,2, 1,1$ Hz), 7,43 (tt, 1H, $J = 7,4, 1,2$ Hz). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 167,2, 144,2, 139,0, 130,0, 129,8, 129,1, 128,3, 127,0, 126,8. HREIMS calculado para $C_{13}H_{10}O_2$ (M+) 198,0683, encontrado 198,0683. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 13,8 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 12,2 min. >99% de pureza.

35 **5-Yodo-2-metoxibenzoato de metilo.** Se añadió TMS-diazometano (19,25 mL, 38,50 mmol, solución 2 M en hexano) a una solución de ácido 5-yodosalicílico (5,08 g, 19,24 mmol) en MeOH (20 mL) y se agitó a temperatura ambiente (ta) durante 11 horas. Después que se completó la reacción, la mezcla se concentró a vacío y el residuo se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.

40 Se añadieron yoduro de metilo (2,40 mL, 38,48 mmol) y K_2CO_3 (10,60 g, 76,96 mmol) a una solución de 5-yodo-2-metoxibenzoato (5,37 g, 19,24 mmol) en DMF (20 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente (ta) en una atmósfera de Ar durante 24 horas. Después que se completó la reacción, se añadió acetato de etilo y la mezcla de reacción se lavó con HCl al 1% (2 x 20 mL) y salmuera (1 x), se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía de desarrollo rápido (hexano:acetato de etilo 3:1) para producir 5-yodo-2-metoxibenzoato de metilo (4,93 g, 88%) en forma de un sólido blanco. Véase, por ejemplo, Corey, E. J.; Myers, A. G., *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5574-5576, que se incorpora como referencia en su totalidad. 1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7,90 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz), 7,80 (dd, 1H, $J = 8,8, 2,4$ Hz), 6,96 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 3,81 (s, 3H), 3,79 (s, 3H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 164,7, 158,0, 141,6, 138,5, 122,2, 115,2, 82,1, 55,9, 52,0. HREIMS calculado para $C_9H_9IO_3$ (M+) 291,9608, encontrado 291,9596.

50 Los compuestos **23-27** se prepararon de acuerdo con el Esquema 4. A una solución de 5-yodo-2-metoxibenzoato de metilo (1,0 equiv.) disuelto en suficiente cantidad de tolueno para dar una concentración de 0,08 M se añadió una solución de ácido fenilborónico (2,0 equiv.) disuelto en EtOH para dar una solución 0,8 M de ácido borónico. Se añadió una solución acuosa 2 M de Na_2CO_3 para dar una concentración en la mezcla de reacción final de 0,06 M con respecto al metoxibenzoato, seguido por la adición de $Pd(PPh_3)_4$ (10,0% en moles). La mezcla de reacción se agitó a 60°C en una atmósfera de Ar durante 15 horas y, después que se completó la reacción, se enfrió hasta la temperatura ambiente (ta) y se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x), se lavó con salmuera (1 x), se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía de desarrollo rápido (hexano:acetato de etilo 3:1) para producir los

salicilatos metilados.

A una solución del salicilato metilado (1,0 equiv.) en suficiente cantidad de CH_2Cl_2 para dar una concentración de 0,06 M se añadió BBr_3 (2,0 equiv., solución 1 M en CH_2Cl_2). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente (ta) en una atmósfera de Ar durante 4 horas y, después que se completó la reacción, se detuvo con H_2O (10 mL), se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x), se lavó con salmuera (1 x), se secó sobre MgSO_4 y se concentró a vacío. El residuo se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.

A una solución de éster metílico (1,0 equiv.) en $\text{THF}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:1) a una concentración de 0,06 M se añadió $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (3,0 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente (ta) durante 4 h y, después que se completó la reacción, se acidificó con HCl al 30%, se extrajo con acetato de etilo (3 x 5 mL), se secó sobre MgSO_4 y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía de desarrollo rápido (CH_2Cl_2 , MeOH al 1%, ácido acético al 0,2%) para producir los salicilatos de bifenilo en forma de sólidos blancos con rendimientos de 12 - 42%.

Ácido 4'-fluoro-4-hidroxi-bifenil-3-carboxílico (23). ^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ 8,01 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz), 7,65 (dd, 1H, $J = 8,7, 2,5$ Hz), 7,51 (m, 2H), 7,11 (tt, 2H, $J = 10,0, 3,0$ Hz), 6,97 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz). ^{13}C RMN (CD_3OD , 100 MHz) δ 173,5, 165,0, 162,7, 137,7, 135,1, 132,6, 129,6, 129,3, 118,9, 116,7, 116,6, 114,2. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{FO}_3$ (M-H) 231,0459, encontrado 231,0457. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 14,2 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 12,8 min. >99% de pureza.

Ácido 2'-fluoro-4-hidroxi-bifenil-3-carboxílico (24). ^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ 7,98 (dd, 1H, $J = 2,2, 1,4$ Hz), 7,59 (ddd, 1H, $J = 8,7, 2,4, 1,7$ Hz), 7,36 (td, 1H, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,26 (dddd, 1H, $J = 9,9, 7,4, 4,9, 1,7$ Hz), 7,16 (td, 1H, $J = 7,5, 1,2$ Hz), 7,10 (ddd, 1H, $J = 11,1, 8,2, 1,3$ Hz), 6,95 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz). ^{13}C RMN (CD_3OD , 100 MHz) δ 173,5, 162,9, 162,4, 137,2, 131,8, 130,2, 130,1, 129,1, 128,1, 125,1, 118,5, 117,1, 114,0. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{FO}_3$ (M-H) 231,0457, encontrado 231,0446. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 13,8 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 12,7 min. >99% de pureza.

Ácido 3',5'-difluoro-4-hidroxi-bifenil-3-carboxílico (25). ^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ 8,07 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz), 7,73 (dd, 1H, $J = 8,5, 2,7$ Hz), 7,15 (m, 2H), 7,01 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz), 6,86 (tt, 1H, $J = 9,0, 2,5$ Hz). ^{13}C RMN (CD_3OD , 100 MHz) δ 173,3, 166,3, 163,8, 145,1, 135,2, 131,0, 129,8, 119,2, 114,4, 110,4, 103,0. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_3$ (M-H) 249,0363, encontrado 249,0356. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 14,5 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 13,3 min. >99% de pureza.

Ácido 2',4'-dicloro-4-hidroxi-bifenil-3-carboxílico (26). ^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ 7,83 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz), 7,70 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz), 7,58 (dd, 1H, $J = 8,6, 2,4$ Hz), 7,48 (ABX, 1H, $J_{\text{AB}} = 8,4$ Hz, $J_{\text{AX}} = 2,2$ Hz, $J_{\text{BX}} = 0,0$ Hz, $\nu_{\text{A}} = 2989,4$ Hz, $\nu_{\text{B}} = 2973,0$ Hz), 7,44 (ABX, 1H, como antes), 7,06 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz). ^{13}C RMN (CD_3OD , 100 MHz) δ 171,6, 160,8, 137,5, 136,4, 132,8, 132,6, 132,4, 130,8, 129,2, 128,5, 127,7, 117,2, 112,9. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_3$ (M-H) 280,9772, encontrado 280,9782. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 13,1 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 14,4 min. >93% de pureza.

Ácido 4-hidroxi-bifenil-3-carboxílico (27). ^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ 8,08 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz), 7,73 (dd, 1H, $J = 8,7, 2,3$ Hz), 7,54 (m, 2H), 7,41 (tt, 2H, $J = 7,3, 1,8$ Hz), 7,29 (tt, 1H, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,38 (dddd, 1H, $J = 8,8, 6,4$ Hz), 7,05 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz), 6,93 (m, 1H), 6,90 (ddd, 1H, $J = 7,3, 1,9$ Hz), 7,00 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz). ^{13}C RMN (CD_3OD , 100 MHz) δ 161,5, 140,1, 134,0, 132,4, 128,7, 128,3, 126,9, 126,3, 117,5, 112,9. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_3$ (M-H) 213,0552, encontrado 213,0545. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 12,9 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 12,6 min. >99% de pureza.

4-Bromo-2,6-difluoroanisol. Se añadieron yoduro de metilo (580 μL , 10,06 mmol) y K_2CO_3 (2,80 g, 20,12 mmol) a una solución de 4-bromo-2,6-difluorofenol (1,05 g, 5,03 mmol) en DMF (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente (ta) en una atmósfera de Ar durante 24 horas. Después que se completó la reacción, se añadió acetato de etilo y la mezcla de reacción se lavó con HCl al 1% (2 x 20 mL) y salmuera (1 x), se secó sobre MgSO_4 y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía de desarrollo rápido (hexano) para producir 4-bromo-2,6-difluoroanisol (747 mg, 67%) en forma de un sólido blanco. Véase, por ejemplo, Chambers, R. D.; *et al.*, *J. Fluorine Chem.* **2000**, 102, 169-174 que se incorpora como referencia en su totalidad. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,06 (m, 2H), 3,97 (q, 3H, $J = 1,1$ Hz). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 155,8, 136,3, 116,2, 113,8, 61,9. Espectro de masas con impacto de electrones de baja resolución (LREIMS) encontrado para $\text{C}_7\text{H}_8\text{F}_2\text{OBr}$ (M+) 223,0.

4-Bromo-2,6-dicloroanisol. Se añadieron yoduro de metilo (467 μL , 8,12 mmol) y K_2CO_3 (2,24 g, 16,24 mmol) a una solución de 4-bromo-2,6-diclorofenol (982 mg, 4,06 mmol) en DMF (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente (ta) en una atmósfera de Ar durante 40 minutos. Después que se completó la reacción, se añadió acetato de etilo y la mezcla de reacción se lavó con HCl al 1% (2 x 20 mL) y salmuera (1 x), se secó sobre MgSO_4 y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía de desarrollo rápido (hexano) para producir 4-bromo-2,6-dicloroanisol (768 mg, 74%) en forma de un sólido blanco. Véase, por ejemplo, Li, J.; *et al.*, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1846-1856, que se incorpora como referencia en su totalidad. ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 7,75 (s, 2H), 3,81 (s, 3H). ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ 151,3, 131,5, 129,6, 116,5, 60,6. HREIMS calculado para $\text{C}_7\text{H}_5\text{BrCl}_2\text{O}$ (M+) 253,8905, encontrado 253,8901.

- Los compuestos **28-31** se prepararon de acuerdo con el Esquema 5. A una solución del halo-anisol apropiada (1,0 equiv.) disuelto en tolueno suficiente para dar una concentración de 0,25 M, se añadió una solución de ácido fenilborónico (2,0 equiv.) disuelto en EtOH para dar una solución 1,5 M de ácido borónico. Se añadió una solución acuosa 2 M de Na₂CO₃ para dar una concentración de reacción final de 0,08 M con respecto al halo-anisol, seguido por la
- 5 adición de Pd(PPh₃)₄ (10,0% en moles). La mezcla de reacción se agitó a 65°C durante 17 h y, después que se completó la reacción, la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente (ta) y se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x), se lavó con salmuera (1 x), se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía de desarrollo rápido (hexano:acetato de etilo 20:1) para producir el bifenilo metilado en forma de un sólido blanco.
- A una solución del bifenilo metilado (1,0 equiv.) en suficiente cantidad de CH₂Cl₂ para dar una concentración de 0,20 M se añadió BBr₃ (2,0 equiv., solución 1 M en CH₂Cl₂). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente (ta) en una atmósfera de Ar durante 3 horas y, después que se completó la reacción, se detuvo con H₂O (10 mL), se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x), se lavó con salmuera (1 x), se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío. El residuo se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.
- 10 A una solución de éster metílico (1,0 equiv.) en THF:MeOH:H₂O (1:1:1) a una concentración de 0,04 M se añadió LiOH·H₂O (3,0 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente (ta) durante 5 horas y, después que se completó la reacción, se acidificó con HCl al 30%, se extrajo con acetato de etilo (3 x 5 mL), se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía de desarrollo rápido (CH₂Cl₂, MeOH al 1%, ácido acético al 0,2%) para proporcionar los productos de bifenilo en forma de sólidos blancos con un rendimiento de 14 - 39%.
- 15 **Ácido 3',5'-difluoro-4'-hidroxibifenil-3-carboxílico (28).** ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 10,60 (s ancho, 1H), 8,14 (t, 1H, J = 1,7 Hz), 7,91 (dt, 1H, J = 7,7, 1,1 Hz), 7,88 (ddd, 1H, J = 8,0, 2,0, 1,1 Hz), 7,55 (t, 1H, J = 7,9 Hz), 7,41 (m, 2H). ¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 167,3, 154,0, 151,5, 138,4, 133,6, 131,6, 130,8, 129,9, 129,4, 128,4, 127,1, 110,3. HRESIMS calculado para C₁₃H₈F₂O₃ (M-H) 249,0363, encontrado 249,0358. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 18,3 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 10,5 min. >98% de pureza.
- 20 **Ácido 3',5'-difluoro-4'-hidroxibifenil-4-carboxílico (29).** ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 7,98 (AA'XX', 2H, J_{AA'} = J_{XX'} = 1,7 Hz, J_{XA} = J_{X'A'} = 8,2 Hz, J_{X'A} = J_{X'A'} = 0,5 Hz, ν_A = ν_{A'} = 3189,9 Hz, ν_X = ν_{X'} = 3122,0 Hz), 7,81 (AA'XX', 2H, como antes), 7,51 (m, 2H). ¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 167,7, 154,5, 142,5, 136,0, 130,5, 130,5, 130,4, 126,9, 111,0. HRESIMS calculado para C₁₃H₈F₂O₃ (M-H) 249,0363, encontrado 249,0375. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 18,9 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 10,2 min. >99% de pureza.
- 25 **Ácido 3',5'-dicloro-4'-hidroxibifenil-3-carboxílico (30).** ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 8,13 (t, 1H, J = 1,6 Hz), 7,91 (m, 2H), 7,70 (s, 2H), 7,56 (t, 1H, J = 7,8 Hz). ¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 167,2, 149,0, 137,9, 132,2, 131,6, 130,8, 129,3, 128,4, 127,1, 126,8, 122,9, 123,0. HRESIMS calculado para C₁₃H₈Cl₂O₃ (M-H) 280,9772, encontrado 280,9767. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 16,2 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 11,6 min. >99% de pureza.
- 30 **Ácido 3',5'-dicloro-4'-hidroxibifenil-4-carboxílico (31).** ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 7,98 (AA'XX', 2H, J_{AA'} = J_{XX'} = 1,7 Hz, J_{XA} = J_{X'A'} = 8,1 Hz, J_{X'A} = J_{X'A'} = 0,5 Hz, ν_A = ν_{A'} = 3189,9 Hz, ν_X = ν_{X'} = 3110,0 Hz), 7,81 (AA'XX', 2H, como antes), 7,78 (s, 2H). ¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 167,2, 141,8, 141,7, 134,7, 129,9, 129,7, 126,9, 126,4, 123,0. HRESIMS calculado para C₁₃H₈Cl₂O₃ (M-H) 280,9772, encontrado 280,9785. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 15,9 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 11,4 min. >97% de pureza.
- 35 **2',4'-Difluoro-4-hidroxibifenil-3-carboxilato de metilo (32).** Los compuestos **32** y **33** se prepararon de acuerdo con el Esquema 6. Se añadió TMS-diazometano (5,87 mL, 11,75 mmol, solución 2 M en hexano) a una solución de diflunisal (1,03 g, 4,11 mmol) en MeOH (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente (ta) durante 5 horas. Después que se completó la reacción, la mezcla se concentró a vacío y el residuo se purificó por cromatografía de desarrollo rápido (hexano:acetato de etilo 10:1) para producir el compuesto **32** (774 mg, 71%) en forma de un sólido blanco. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,97 (dd, 1H, J = 2,2, 1,3 Hz), 7,59 (dt, 1H, J = 8,8, 2,1 Hz), 7,36 (dq, 1H, J = 7,7, 1,5 Hz), 7,48 (td, 1H, J = 7,8, 1,7 Hz), 7,38 (dddd, 1H, J = 8,8, 6,4 Hz), 7,05 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 6,93 (m, 1H), 6,90 (ddd, 1H, J = 10,6, 8,9, 2,5 Hz), 3,96 (s, 3H). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 170,6, 163,6, 161,3, 158,5, 136,4, 131,2, 130,3, 126,2, 124,2, 118,0, 112,6, 111,8, 104,6, 52,6, 124,2. Espectro de masas con bombardeo de átomos rápidos de alta resolución (HRFABMS) calculado para C₁₄H₁₀F₂O₃ (M+) 264,0596, encontrado 264,0598. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 6,9 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 14,7 min. >99% de pureza.
- 40 **Ácido 2',4'-difluoro-4-metoxibifenil-3-carboxílico (33).** Se añadieron yoduro de metilo (350 μL, 1,16 mmol) y K₂CO₃ (320 mg, 2,32 mmol) a una solución del compuesto **32** (152 mg, 0,58 mmol) en DMF (4 mL) y se agitó a temperatura ambiente (ta) en una atmósfera de Ar durante 14 horas. Después que se completó la reacción, se añadió acetato de etilo y la mezcla se lavó con HCl al 1% (2 x 20 mL) y salmuera (1 x), se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío y se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.
- 45 **Ácido 2',4'-difluoro-4-metoxibifenil-3-carboxílico (33).** Se añadieron yoduro de metilo (350 μL, 1,16 mmol) y K₂CO₃ (320 mg, 2,32 mmol) a una solución del compuesto **32** (152 mg, 0,58 mmol) en DMF (4 mL) y se agitó a temperatura ambiente (ta) en una atmósfera de Ar durante 14 horas. Después que se completó la reacción, se añadió acetato de etilo y la mezcla se lavó con HCl al 1% (2 x 20 mL) y salmuera (1 x), se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío y se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.
- 50 Se añadió LiOH·H₂O (60 mg, 1,43 mmol) a una solución de diflunisal totalmente metilado (140 mg, 0,50 mmol) en MeOH:THF:H₂O (4,5 mL, 1:1:1) y se agitó a temperatura ambiente (ta) durante 4 h. Después que se completó la reacción, la mezcla se acidificó con HCl al 30%, se extrajo con acetato de etilo (3 x 5 mL), se secó sobre MgSO₄ y se

concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía de desarrollo rápido (acetato de etilo:hexano 2:1, ácido acético al 1%) para producir **33** (122 mg, 93%) en forma de un sólido blanco. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 10,77 (s ancho, 1H), 8,31 (dd, 1H, $J = 2,5, 0,9$ Hz), 7,75 (dt, 1H, $J = 8,6, 2,1$ Hz), 7,41 (dt, 1H, $J = 8,9, 6,6$ Hz), 7,15 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 6,94 (m, 1H), 4,13 (s, 3H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 177,7, 161,4, 158,2, 135,7, 133,9, 131,4, 129,0, 123,5, 118,1, 112,2, 112,0, 104,6, 56,9. HRESIMS calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}_3$ (M-H) 263,0520, encontrado 263,0514. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 21,6 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 11,9 min. >99% de pureza.

Los compuestos **34-38** se prepararon de acuerdo con el Esquema 7. Los compuestos **39-44** se prepararon de acuerdo con el Esquema 8. A una solución de yoduro de arilo (1,0 equiv.) en suficiente cantidad de tolueno para dar una concentración de 0,07 M, se añadió un ácido formil-fenilborónico apropiado disuelto en suficiente cantidad de EtOH para proporcionar una concentración de 0,4 M de ácido borónico. Se añadió una solución acuosa 2 M de Na_2CO_3 para dar una concentración en la mezcla de reacción final de 0,04 M con respecto al yoduro de arilo, seguido por la adición de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (3,0% en moles). La mezcla de reacción se calentó a reflujo en una atmósfera de Ar durante 18 horas y, después que se completó la reacción, se enfrió hasta la temperatura ambiente (ta) y se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x), se lavó con salmuera (1 x), se secó sobre MgSO_4 y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía de desarrollo rápido (hexano:acetato de etilo 40:1) para producir los aldehídos de bifenilo en forma de sólidos blancos con rendimientos de 40 - 91%.

3',5'-Dicloro-3-formilbifenilo (39). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 10,09 (s, 1H), 8,04 (t, 1H, $J = 1,8$ Hz), 7,91 (dt, 1H, $J = 7,6, 1,3$ Hz), 7,80 (ddd, 1H, $J = 7,8, 2,0, 1,3$ Hz), 7,64 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz), 7,49 (d, 2H, $J = 1,8$ Hz), 7,38 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 192,0, 142,8, 139,7, 137,2, 135,8, 133,0, 130,1, 130,0, 128,1, 128,0, 125,9. HRFABMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}$ (M+H) 251,0027, encontrado 251,0027. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 8,0 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 15,2 min. >99% de pureza.

3',5'-Dicloro-4-formilbifenilo (40). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,99 (AA'XX', 2H, $J_{AA'} = J_{XX'} = 2,1$ Hz, $J_{XA} = J_{XA'} = 8,5$ Hz, $J_{XA} = J_{XA'} = 0,7$ Hz, $\nu_A = \nu_{A'} = 3193,7$ Hz, $\nu_X = \nu_{X'} = 3077,8$ Hz), 7,70 (AA'XX', 2H, como antes), 7,47 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz), 7,39 (d, 2H, $J = 1,9$ Hz). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 191,8, 144,4, 142,9, 136,2, 135,8, 130,6, 128,5, 127,9, 126,1. HREIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}$ (M-H) 248,9873, encontrado 248,9874. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 7,9 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 15,2 min. >99% de pureza.

3',5'-Dicloro-2-formilbifenilo (41). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 9,98 (s, 1H), 8,03 (dd, 1H, $J = 7,8, 1,3$ Hz), 7,66 (td, 1H, $J = 7,6, 1,5$ Hz), 7,55 (tt, 1H, $J = 7,6, 1,0$ Hz), 7,44 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz), 7,39 (dd, 1H, $J = 7,7, 1,0$ Hz), 7,27 (d, 2H, $J = 1,9$ Hz). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 191,4, 142,9, 141,0, 135,3, 134,0, 133,7, 130,7, 129,0, 128,5, 128,4, 128,4. HRFABMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}$ (M+H) 251,0030, encontrado 251,0029. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 7,0 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 14,9 min. >99% de pureza.

Los compuestos **45-47** se prepararon de acuerdo con el Esquema 8. A una solución del aldehído de bifenilo (1,0 equiv.) en suficiente cantidad de acetona para dar una concentración de 0,07 M, se añadió KMnO_4 (2,0 equiv.) en suficiente cantidad de H_2O para dar una concentración de 0,2 M de permanganato. La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente (ta) y después que se completó la reacción, la mezcla se concentró a vacío y el residuo resultante se disolvió de nuevo en CH_2Cl_2 :MeOH 10:1 y se filtró a través de un lecho de lana de vidrio. El producto en bruto se purificó por cromatografía de desarrollo rápido (CH_2Cl_2 :MeOH 10:1) para producir los ácidos carboxílicos (58 mg, 100%) en forma de sólidos blancos con rendimientos de 82 -100%.

Ácido 2',4'-diclorobifenil-3-carboxílico (45). ^1H RMN (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ 8,22 (s ancho, 1H), 8,00 (s ancho, 1H), 7,94 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 7,76 (s, 2H), 7,63 (s, 1H), 7,60 (s ancho, 1H). ^{13}C RMN (DMSO-d_6 , 100 MHz) δ 168,0, 143,7, 138,1, 135,4, 131,6, 129,9, 126,2. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_2$ (M-H) 264,9823, encontrado 264,9810. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 12,3 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 14,2 min. >99% de pureza.

Ácido 2',4'-diclorobifenil-4-carboxílico (46). ^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ 8,11 (s ancho, 2H), 7,72 (m, 2H), 7,64 (d, 2H, $J = 1,9$ Hz), 7,46 (t, 1H, $J = 1,7$ Hz). ^{13}C RMN (DMSO-d_6 , 100 MHz) δ 170,3, 140,6, 135,2, 127,2, 126,4, 119,3, 118,6, 117,4. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_2$ (M-H) 264,9830, encontrado 264,9823. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 12,5 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 14,4 min. >99% de pureza.

Ácido 2',4'-diclorobifenil-2-carboxílico (47). ^1H RMN (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ 7,75 (s ancho, 1H), 7,56 (s, 2H), 7,48 (m, 2H), 7,36 (m, 2H). ^{13}C RMN (DMSO-d_6 , 100 MHz) δ 170,1, 152,5, 145,2, 133,3, 130,0, 129,6, 128,0, 127,2, 126,3. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_2$ (M-H) 264,9823, encontrado 264,9834. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 11,4 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 13,6 min. >99% de pureza.

Los compuestos **48-53** se prepararon de acuerdo con el Esquema 8. A una solución de aldehído de bifenilo (1,0 equiv.) en suficiente cantidad de MeOH para dar una concentración de 0,1 M, se añadió NaBH_4 (2,0 equiv.) en suficiente cantidad de MeOH para dar una concentración de 0,3 M de borohidruro. La mezcla de reacción se agitó a 0°C , se calentó lentamente hasta la temperatura ambiente (ta), después se agitó durante 16 horas, se concentró a vacío y se purificó por cromatografía de desarrollo rápido (hexano:acetato de etilo 3:1) para producir los alcoholes

bifenílicos en forma de sólidos blancos con rendimientos de 94 -100%.

3',5'-Diclorobifenil-3-il-metanol (48). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,54 (m, 1H), 7,46 (d, 2H, $J = 1,8$ Hz), 7,45 (m, 2H), 7,39 (m, 1H), 7,34 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz), 4,77 (s, 2H), 1,90 (s ancho, 1H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 144,1, 141,9, 139,0, 135,5, 129,5, 127,4, 127,1, 126,5, 125,8, 125,7, 65,3. HREIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}$ (M+) 252,0103, encontrado 252,0109. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 13,9 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 14,0 min. >99% de pureza.

3',5'-Diclorobifenil-4-il-metanol (49). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,53 ($\text{AA}'\text{XX}'$, 2H, $J_{\text{AA}'} = 1,9$ Hz, $J_{\text{XX}'} = 3,1$ Hz, $J_{\text{XA}'} = 8,7$ Hz, $J_{\text{XA}'} = 6,4$ Hz, $J_{\text{XA}'} = J_{\text{XA}'} = 0,5$ Hz, $\nu_{\text{A}} = \nu_{\text{A}'} = 3009,8$ Hz, $\nu_{\text{X}} = \nu_{\text{X}'} = 2977,8$ Hz), 7,45 ($\text{AA}'\text{XX}'$, 2H, como antes), 7,45 (d, 2H, $J = 1,9$ Hz), 7,33 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz), 4,75 (d ancho, 2H, $J = 4,8$ Hz), 1,81 (t ancho, 1H, $J = 5,2$ Hz). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 144,0, 141,4, 138,0, 135,5, 127,8, 127,4, 127,4, 125,8, 65,1. HREIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}$ (M+) 251,0110, encontrado 252,0109. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 15,4 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 14,0 min. >97% de pureza.

3',5'-Diclorobifenil-2-il-metanol (50). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,55 (dd, 1H, $J = 7,5, 1,3$ Hz), 7,43 (td, 2H, $J = 7,5, 1,4$ Hz), 7,38 (m, 2H), 7,29 (d, 2H, $J = 1,9$ Hz), 7,24 (dd, 1H, $J = 7,4, 1,4$ Hz), 4,58 (s, 2H), 1,79 (s, 1H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 143,7, 138,9, 137,9, 134,9, 130,0, 129,0, 128,9, 128,2, 127,9, 127,6, 63,0. HREIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}$ (M+) 252,0110, encontrado 252,0109. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 11,5 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 14,0 min. >99% de pureza.

Los compuestos **54** y **55** se prepararon de acuerdo con el Esquema 9. A una solución del yodobenzaldehído apropiado (1,0 equiv.) en suficiente cantidad de tolueno para dar una concentración de 0,07 M, se añadió ácido 3,5-difluorofenil-borónico (2,0 equiv.) disuelto en suficiente cantidad de EtOH para proporcionar una concentración 1,0 M de ácido borónico. Se añadió una solución acuosa 2 M de Na_2CO_3 para dar una concentración de reacción final de 0,04 M con respecto al yodobenzaldehído, seguido por la adición de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (4,0% en moles). La mezcla de reacción se agitó a 60°C durante 17 horas y, después que se completó la reacción, se enfrió hasta la temperatura ambiente (ta) y se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x), se lavó con salmuera (1 x), se secó sobre MgSO_4 y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía de desarrollo rápido (hexano:acetato de etilo 10:1) para producir los aldehídos bifenílicos en forma de sólidos blancos con rendimientos de 78 - 80%.

3',5'-Difluoro-3-formilbifenilo (54). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 10,06 (s, 1H), 8,02 (t, 1H, $J = 1,4$ Hz), 7,88 (dt, 1H, $J = 7,8, 1,4$ Hz), 7,78 (ddd, 2H, $J = 7,8, 2,0, 1,2$ Hz), 7,61 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz), 7,10 (m, 2H), 6,80 (tt, 1H, $J = 8,8, 2,3$ Hz). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 192,0, 164,8, 162,3, 143,0, 139,8, 137,1, 132,9, 129,9, 127,9, 110,4, 103,5. HRFABMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}$ (M+H) 219,0620, encontrado 219,0621. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 8,9 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 13,7 min. >99% de pureza.

3',5'-Difluoro-4-formilbifenilo (55). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 9,98 (s, 1H), 8,02 (dd, 1H, $J = 7,8, 1,5$ Hz), 7,65 (td, 1H, $J = 7,3, 1,4$ Hz), 7,54 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz), 7,40 (dd, 1H, $J = 7,6, 1,2$ Hz), 6,90 (m, 3H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 191,5, 164,1, 161,6, 143,4, 141,3, 134,0, 133,7, 130,6, 129,0, 128,3, 113,3, 103,8. HRFABMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}$ (M+H) 219,0620, encontrado 219,0621. Tiempo de retención en HPLC en fase normal: 7,0 min. Tiempo de retención en HPLC en fase inversa: 13,4 min. >99% de pureza.

Se pueden realizar varios ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad de los compuestos para estabilizar los tetrámeros de transtiretina o prevenir la formación de fibrillas. Los ensayos pueden incluir un ensayo de formación de fibrillas, un ensayo de selectividad en plasma, la determinación de la estructura tridimensional de un complejo de transtiretina:compuesto (por ejemplo, por cristalografía de rayos X), las cinéticas de disociación de tetrámeros de transtiretina o formaciones de fibrillas y la determinación de la estequiometría y aspectos energéticos de las interacciones de transtiretina:compuesto, por ejemplo, por centrifugación o calorimetría. Más adelante se presentan detalles de los ensayos ilustrativos *in vitro*.

Cada compuesto se sometió a un ensayo de formación de fibrillas inmovilizadas. Los compuestos se secaron sobre P_2O_5 durante una noche y se disolvieron en DMSO hasta una concentración final de 7,2 mM para proporcionar una solución madre primaria (solución madre 10x). Se preparó una solución madre secundaria por dilución 5 veces de la solución madre primaria con DMSO hasta una concentración final de 1,44 mM (solución madre 2x). La amiloidogenicidad mediada por ácido de TTR (3,6 μM) en presencia de inhibidores (1,44 mM) se midió como se indica a continuación: en un cubeta desechable para UV se añadieron 495 μL de una solución de proteína TTR WT de 0,4 mg/mL en fosfato sódico 10 mM, KCl 100 mM y EDTA 1 mM (pH 7,6) y 5 μL de la solución madre secundaria de inhibidor 1,44 mM en DMSO (solución madre 2x). La mezcla se sometió a agitación vorticial y se incubó durante 30 minutos (25°C), después de lo cual el pH se redujo hasta 4,4 con 500 μL de acetato 200 mM, KCl 100 mM y EDTA 1 mM (pH 4,2). Se agitó vorticialmente 1 mL de solución final y se incubó durante 72 horas a 37°C sin agitación. Después de 72 horas, las cubetas se sometieron a agitación vorticial para suspender cualquier fibrilla presente y se midió la turbidez de la suspensión a 350 y 400 nm usando un espectrómetro UV-vis. El porcentaje de formación de fibrillas se obtuvo por la relación de las turbideces observadas para cada TTR más muestra de inhibidor con respecto a la de una muestra preparada de la misma manera pero sin inhibidor, multiplicada por 100. Se realizó un ensayo de formación de fibrillas empleando concentraciones equimolares de inhibidor y TTR (3,6 μM) como se ha indicado anteriormente

usando una solución madre secundaria 1x. La solución madre 1x se preparó diluyendo 10 veces la solución madre primaria 10 x 7,2 mM con DMSO hasta una concentración final de 0,72 mM y se usó en el ensayo de formación de fibrillas descrito anteriormente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y todos los compuestos se ensayaron usando TTR de tipo natural. Se encontró que todos los compuestos eran solubles en todo el curso del experimento ensayando la turbidez de las soluciones en ausencia de TTR WT, lo que asegura que la turbidez era el resultado de la formación de amiloides de TTR.

Las estequiometrías de unión de los inhibidores potenciales a TTR en plasma sanguíneo se evaluaron por un método de captura de anticuerpo/HPLC. Un tubo Eppendorf de 1,5 mL se cargó con 1,0 mL de plasma sanguíneo humano y 7,5 μ L de una solución en DMSO 1,4 mM del inhibidor en evaluación. La solución se incubó y se agitó por balanceo suavemente a 37°C durante 24 horas. A la solución se añadió una suspensión de gel:TSA (solución salina Tris) 1:1 de (125 μ L) de Sepharose inactivada y se agitó por balanceo suavemente a 4°C durante una hora. La solución se centrifugó (16.000 x g) y el líquido sobrenadante se dividió en dos partes alícuotas de 400 μ L, que después se añadieron a diferentes muestras de 200 μ L de una suspensión de gel:TSA 1:1 de la Sepharose conjugada con anticuerpo anti-TTR. Las soluciones se agitaron por balanceo suavemente a 4°C durante 20 minutos, se centrifugaron (16.000 x g) y el líquido sobrenadante se retiró. El gel se lavó con 1 mL de TSA/saponina al 0,05% (3x, 10 minutos cada vez) a 4°C, seguido por 1 mL de TSA (2x, 10 minutos cada vez) a 4°C. Las muestras se centrifugaron (16.000 x g), se retiró el líquido de lavado final y se añadieron 155 μ L de trietilamina 100 mM, pH 11,5 para eluir la TTR y los inhibidores unidos de los anticuerpos. Después de una agitación por balanceo suave a 4°C durante 30 minutos, la muestra de elución se centrifugó (16.000 x g) y se retiraron 145 μ L del líquido sobrenadante que contenía TTR e inhibidor. Después, el líquido sobrenadante se analizó por HPLC en fase inversa como se ha descrito previamente. Véase, por ejemplo, Purkey, H.E.; Dorrell, M.L.; Kelly, J.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 5566-71, que se incorpora como referencia en su totalidad.

Se obtuvieron cristales de TTR WT a partir de soluciones de proteína a 7 mg/mL (en KCl 100 mM, EDTA 1 mM; fosfato sódico 10 mM, pH 7,0, sulfato amónico 0,35-0,50 M) equilibrado frente a sulfato amónico 2 M en gotas colgantes. Los complejos de TTR-ligando se prepararon a partir de cristales empapados durante más de 3 semanas con un exceso 10 veces molar del ligando. Se usó un detector CCD-PXL-L600 (Bruker Instruments) acoplado a un generador de rayos X de ánodo giratorio RU200 para recoger los datos de los cristales impregnados con **20** o **26**. Para recoger los datos de los cristales impregnados con **1** o **18** se usó el detector Quantum-4 con la fuente de alta energía monocromática de 14-BM-C, BIOCARs, Advance Photon Source. Los cristales se pusieron en aceite Paratone como crioprotector y se enfriaron para los experimentos de difracción (120 K para **20** y **26** y 100 K para **1** y **18**). Los cristales de las estructuras complejas de TTR-ligando son isomorfos con la forma de cristal apo con dimensiones de celdas unitarias próximas a $a = 43$ Å, $b = 85$ Å y $c = 66$ Å; grupo espacial $P2_12_12$ con dos monómeros en la unidad asimétrica. Las series de datos de **1** y **18** se redujeron con DENZO y SCALEPACK. Véase Otwinowski, Z.; Minor, W. *Macromolecular Crystallography*, Part A, in *Methods in Enzymology*, Carter, C.W., Sweet, R. M. Eds.; Academic Press: 1997; Vol. 276, pp. 307-326, que se incorpora como referencia en su totalidad. Las series de datos de **20** y **26** se redujeron con SAINT y PROSCALE (Bruker AXS, Inc.).

Las coordenadas atómicas de la proteína para TTR del banco de datos de proteínas (número de acceso 1BMZ) se usaron como modelo de partida durante la búsqueda de reemplazo molecular por EPMR. Las mejores soluciones para EPMR se refinaron por protocolos de dinámica molecular y minimización de energía de CNS. Los mapas de Fourier de diferencias resultantes revelaron la unión de los ligandos (en dos conformaciones para **18**, **20** y **26**, y cuatro conformaciones para **1**) en cada cavidad de unión del tetrámero de TTR. Usando estos mapas, el ligando podía ser ubicado inequívocamente de acuerdo con la densidad y fue incluido en el refinamiento cristalográfico. Después de varios ciclos de asociación simulada y el posterior refinamiento del factor de temperatura y posicional, se pusieron moléculas de agua en los mapas de Fourier de diferencias. El ciclo final de ajuste de mapas se realizó usando el mapa de densidad de electrones ponderado no sesgado calculado por el protocolo de eliminación del sesgo *shake/warp*. Todas las conformaciones de unión del ligando estaban de acuerdo con los mapas de omisión asociados no sesgados así como con los mapas ponderados no sesgados *shake/warp* con fases en ausencia del inhibidor. Los ciclos finales del refinamiento se realizaron por el protocolo de refinamiento restringido de Refmac. Debido a la ausencia de densidades electrónicas interpretables en el mapa final, en el modelo final no se incluyeron los nueve restos N-terminales y los tres restos C-terminales. En la Tabla 2 se presenta un resumen del análisis cristalográfico. Véanse, por ejemplo, Kissinger, C.R.; Gehlhaar, D.K.; Fogel, D.B., *Acta Crystallogr., Sect. D* **1999**, *55*, 484-491; Brunger, A.T.; *et al.*, *Acta Crystallogr., Sect. D* **1998**, *54*, 905-921; Kantardjiev, K.; *et al.*, *Acta Crystallogr., Sect. D* **2002**, *58*, 735-743; Bailey, S., *Acta Crystallogr., Sect. D* **1994**, *50*, 760-763; y Murshudov, G.N.; Vagin, A.A.; Dodson, E.J., *Acta Crystallogr., Sect. D* **1997**, *53*, 240-255, que se incorporan como referencia en su totalidad.

La cinética de disociación del tetrámero de TTR se evaluó por desplegamiento en urea del monómero unido. Una disociación lenta del tetrámero no se puede detectar por espectroscopia UV lejano CD, pero está asociada a la rápida etapa de desplegamiento (500.000 veces más rápida) que puede detectarse fácilmente usando UV lejano CD como se ha descrito previamente. Se evaluó la cinética de disociación del tetrámero de TTR (3,6 μ M) en función del inhibidor (3,6 μ M) añadiendo 3,6 μ L de una solución 1 mM (en etanol) del inhibidor de interés a 69 μ L de TTR WT (2,90 mg/mL, fosfato sódico 10 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0) a la que se habían añadido 127,4 μ L de tampón de fosfato. Para una concentración de inhibidor (7,2 μ M) dos veces mayor que la concentración de TTR (3,6 μ M) se añadieron 7,2 μ L de una solución 1 mM (en etanol) del inhibidor de interés a 69 μ L de TTR WT (2,90 mg/mL,

fosfato sódico 10 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0) a la que se habían añadido 123,8 μL de tampón de fosfato. Se añadieron 100 μL de la solución de proteína-inhibidor de interés a una solución de 600 μL de urea 10,3 M y 300 μL de tampón de fosfato, para producir una concentración final de urea de 6,5 M. Las soluciones se agitaron vorticialmente y se recogieron los espectros de dicroísmo circular a los siguientes intervalos: 0, 5, 8, 23, 46, 71, 95, 118, 144 y 168 horas. Se preparó una muestra de control que contenía 7,2 μL de etanol en lugar de inhibidor para la comparación y los espectros se recogieron en los mismos puntos de tiempo identificados anteriormente. Los espectros de CD se recogieron entre 220 y 213 nm, con exploración cada 0,5 nm y un tiempo de promediado de 10 segundos. Cada longitud de onda se exploró una vez. Los valores para la amplitud se promediaron entre 220 y 213 nm para determinar el grado de pérdida de lamina β a lo largo del experimento.

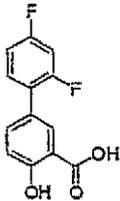
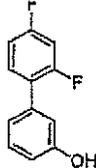
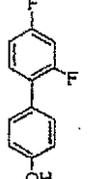
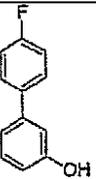
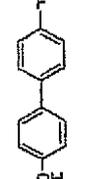
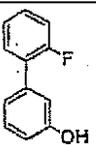
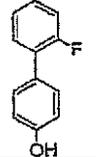
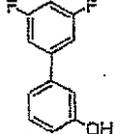
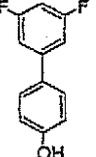
La velocidad de formación de fibrillas mediada por ácidos se siguió a pH 4,4 por la turbidez. Los compuestos se secaron sobre P_2O_5 durante una noche y se disolvieron en DMSO hasta una concentración final de 7,2 mM para proporcionar una solución madre primaria (solución madre 10x). Se preparó una solución madre secundaria diluyendo en DMSO 5 veces la solución madre primaria para producir una concentración final de 1,44 mM (solución madre 2x). El ensayo de formación de fibrillas empleando una concentración del inhibidor de 7,2 μM con respecto a TTR (tetrámero) 3,6 μM se realizó como se indica a continuación: a una cubeta desechable para UV se añadieron 495 μL de una solución de proteína TTR WT a 0,4 mg/mL en fosfato sódico 10 mM, KCl 100 mM y EDTA 1 mM (pH 7,6) y 5 μL de la solución madre secundaria del inhibidor 1,44 mM (solución madre 2x). La mezcla se sometió a agitación vorticial y se incubó durante 30 minutos (25°C). Después de 30 minutos, el pH se disminuyó hasta 4,4 con 500 μL de acetato 200 mM, KCl 100 mM y EDTA 1 mM (pH 4,2). La solución final de 1 mL se agitó vorticialmente y se incubó a 37°C sin agitación. Las soluciones se agitaron vorticialmente y se midió la turbidez a 350 y 400 nm. Los espectros UV se recogieron a los siguientes intervalos: 0, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 horas después de la acidificación. Se preparó una muestra de control que contenía 5 μL de DMSO para comparación y los espectros se recogieron en los momentos de tiempo anteriores. Cada solución de inhibidor se preparó en grupos de 10 para impedir la alteración de las cubetas antes de tomar una lectura. Después de obtener una absorbancia UV, se desecharon las cubetas correspondientes a ese momento de tiempo. El ensayo de formación de fibrillas empleando concentraciones equimolares (3,6 μM) de TTR e inhibidor se realizó como se ha indicado anteriormente usando una solución madre secundaria de inhibidor 1x preparada como se indica a continuación. Se preparó una solución madre diluyendo 10 veces la solución madre primaria 10 x 7,2 mM con DMSO hasta una concentración final de 0,72 mM y se usó en el ensayo de formación de fibrillas como se ha descrito anteriormente. Se descubrió que todos los compuestos eran solubles a lo largo de todo el experimento, asegurando que la turbidez era el resultado de la formación de amiloides de TTR.

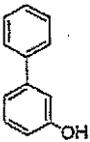
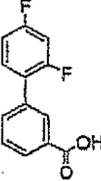
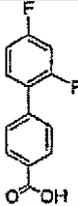
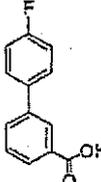
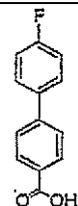
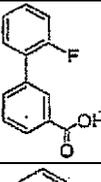
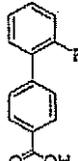
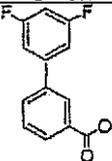
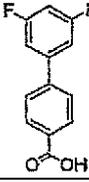
Se analizó la estructura cuaternaria de TTR en presencia de inhibidores a pH 4,4. El mecanismo por el cual **18** y **20** estabilizan TTR se evaluó incubando la proteína (3,6 μM) durante 72 horas en las condiciones del ensayo de formación de fibrillas inmovilizadas en presencia de inhibidor a una concentración de 3,6 μM o 7,2 μM . Después de 72 horas, las muestras se centrifugaron (14.000 x g) y el líquido sobrenadante se retiró de cualquier sólido que se formara en el ensayo. El análisis del equilibrio y la velocidad de ultracentrifugación se consiguió con una ultracentrifuga analítica Beckman XL-I. La adquisición y análisis de los datos se realizó como se ha descrito previamente. Véanse, por ejemplo, Lashuel, H.A.; Lai, Z.; Kelly, J.W., *Biochemistry* **1998**, *37*, 17851-64; y Lashuel, H.A.; *et al.*, *Biochemistry* **1999**, *38*, 13560-73, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

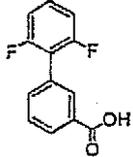
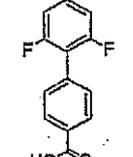
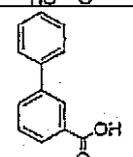
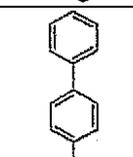
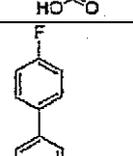
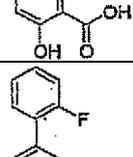
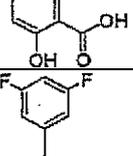
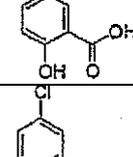
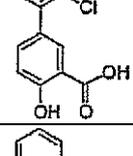
Las constantes de disociación que caracterizan la unión de **18** y **20** a TTR WT se determinaron por calorimetría isotérmica de valoración usando un instrumento Microcal (Microcal Inc., Northampton, MD). Se preparó una solución de inhibidor (300 μM o 500 μM en tampón Tris 25 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, EtOH al 12%, pH 8,0) y se tituló en una celda ITC que contenía TTR WT (15 μM o 25 μM en tampón Tris 25 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, EtOH al 12%, pH 8,0). La inyección inicial de 2,5 μL se continuó con 50 inyecciones de 5,0 μL cada una (25°C). La integración del termograma después de restar los blancos produjo una isoterma de unión que se ajustaba mejor a un modelo de dos sitios de unión secuenciales con cooperatividad negativa. Los datos se ajustaron por una estrategia de mínimos cuadrados no lineal con cuatro parámetros ajustables, a saber K_1 , ΔH_1 , K_2 y ΔH_2 usando el módulo de análisis de datos de ITC en ORIGIN versión 2.9 proporcionada por Microcal.

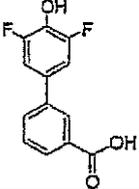
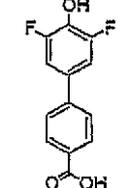
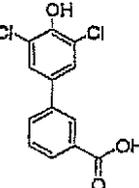
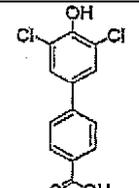
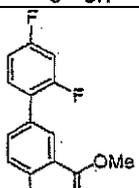
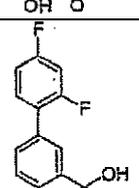
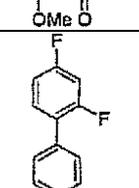
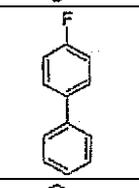
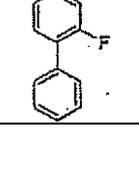
Los compuestos descritos se evaluaron como inhibidores de fibrillas de amiloides de TTR usando un ensayo de turbidez. La amiloidosis por TTR WT se inició por acidificación de TTR preincubada con inhibidor (25°C, 30 minutos), empleando adición de tampón para elevar el pH hasta un valor final de 4,4. Después de la incubación de cada mezcla durante 72 horas (37°C), se midió la turbidez a 350 y 400 nm usando un espectrómetro UV-vis. Todos los datos de formación de fibrillas de amiloide se normalizaron para la amiloidogénesis por TTR WT en ausencia de inhibidor, a la que se asignó una formación de fibrillas de 100%. Por lo tanto, una formación de fibrillas de 5% corresponde a un compuesto que inhibe 95% de la formación de fibrillas de TTR WT después de 72 horas. Cada inhibidor potencial se evaluó primeramente a una concentración de 7,2 μM con respecto a la concentración de tetrámero de TTR de 3,6 μM . Los compuestos que permitieron una formación de fibrillas menor de 15% se volvieron a evaluar a una concentración igual a la concentración de TTR (3,6 μM) para seleccionar los inhibidores con la mayor eficacia. Una formación de fibrillas menor de 40% en estas condiciones es característica de un inhibidor muy bueno, mientras que una inhibición de 40-70% indica un compuesto modesto. En la Tabla 1 se presentan los datos de formación de fibrillas.

Tabla 1: Efectos de los compuestos sobre la formación de fibrillas

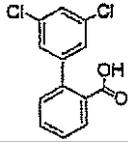
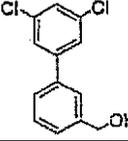
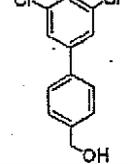
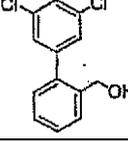
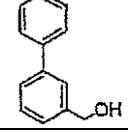
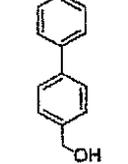
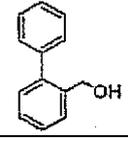
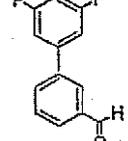
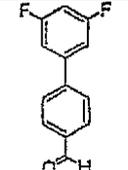
| Número del compuesto | Estructura | % de formación de fibrillas (Inhibidor 3,6 μ M) | % de formación de fibrillas (Inhibidor 7,2 μ M) | Selectividad de plasma (unión de equiv.) |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Diflunisal (1) |  | 37,0 | 3,4 | 0,13 \pm 0,02 |
| 2 |  | | 31,5 | |
| 3 |  | | 32,4 | |
| 4 |  | | 46,3 | |
| 5 |  | | 53,1 | |
| 6 |  | | 19,5 | |
| 7 |  | | 19,6 | |
| 8 |  | 40,9 | 10,2 | 0,18 \pm 0,05 |
| 9 |  | | 16,4 | |

| Número del compuesto | Estructura | % de formación de fibrillas (Inhibidor 3,6 μM) | % de formación de fibrillas (Inhibidor 7,2 μM) | Selectividad de plasma (unión de equiv.) |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 10 |  | | 61,2 | |
| 11 |  | 39,4 | 9,1 | no observada |
| 12 |  | 32,6 | 2,6 | 0,20 \pm 0,05 |
| 13 |  | | 15,7 | |
| 14 |  | | 13,3 | |
| 15 |  | 39,4 | 9,8 | no observada |
| 16 |  | 32,4 | 4,8 | 0,08 \pm 0,00 |
| 17 |  | 35,7 | 5,6 | 0,23 \pm 0,00 |
| 18 |  | 35,7 | 3,7 | 1,27 \pm 0,12 |

| Número del compuesto | Estructura | % de formación de fibrillas (Inhibidor 3,6 μ M) | % de formación de fibrillas (Inhibidor 7,2 μ M) | Selectividad de plasma (unión de equiv.) |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 19 |  | 35,1 | 6,7 | 0,29 \pm 0,12 |
| 20 |  | 28,5 | 4,5 | 0,50 \pm 0,05 |
| 21 |  | | 30,8 | |
| 22 |  | 51,5 | 14,3 | 0,08 \pm 0,01 |
| 23 |  | 38,7 | 2,6 | 0,09 \pm 0,00 |
| 24 |  | 38,7 | 2,5 | 0,07 \pm 0,02 |
| 25 |  | 35,5 | 1,0 | no observada |
| 26 |  | 29,9 | 3,6 | 0,27 \pm 0,02 |
| 27 |  | 47,4 | 15,4 | no observada |

| Número del compuesto | Estructura | % de formación de fibrillas (Inhibidor 3,6 μM) | % de formación de fibrillas (Inhibidor 7,2 μM) | Selectividad de plasma (unión de equiv.) |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 28 |  | 38,5 | 3,5 | no observada |
| 29 |  | 31,7 | 3,4 | 0,07 \pm 0,02 |
| 30 |  | 25,5 | 4,4 | 0,12 \pm 0,02 |
| 31 |  | 25,8 | 3,8 | 0,26 \pm 0,04 |
| 32 |  | | 69,9 | |
| 33 |  | | 38,5 | |
| 34 |  | | 100,0 | |
| 35 |  | | 100,0 | |
| 36 |  | | 99,4 | |

| Número del compuesto | Estructura | % de formación de fibrillas (Inhibidor 3,6 μM) | % de formación de fibrillas (Inhibidor 7,2 μM) | Selectividad de plasma (unión de equiv.) |
|----------------------|------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 37 | | | 100,0 | |
| 38 | | | 52,2 | |
| 39 | | 30,6 | 4,4 | 1,30 \pm 0,15 |
| 40 | | | 25,4 | |
| 41 | | 34,5 | 7,1 | 1,96 \pm 0,11 |
| 42 | | | 35,4 | |
| 43 | | | 93,5 | |
| 44 | | | 72,5 | |
| 45 | | 32,7 | 3,0 | 0,80 \pm 0,08 |
| 46 | | 41,2 | 4,9 | 1,56 \pm 0,01 |

| Número del compuesto | Estructura | % de formación de fibrillas (Inhibidor 3,6 μ M) | % de formación de fibrillas (Inhibidor 7,2 μ M) | Selectividad de plasma (unión de equiv.) |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 47 |  | | 45,4 | |
| 48 |  | 30,0 | 3,3 | 0,89 \pm 0,09 |
| 49 |  | 38,9 | 5,9 | 0,54 \pm 0,10 |
| 50 |  | 33,6 | 7,7 | no observada |
| 51 |  | | 85,5 | |
| 52 |  | | 100,0 | |
| 53 |  | | 81,0 | |
| 54 |  | | 64,3 | |
| 55 |  | | 69,6 | |

Basándose en la eficacia del inhibidor para los compuestos 2-55, parece que un anillo hidrófilo sustituido con carboxilato unido directamente a un anillo hidrófobo funcionalizado con di-halógeno es suficiente para una excelente actividad (Tabla 1). Un sustituyente fenólico en lugar de un carboxilato (2-10) produce considerablemente menos inhibidores activos, muy inferior al compuesto precursor 1. Los inhibidores que tienen un halógeno en la posición orto o meta del anillo hidrófobo son superiores a los compuestos que carecen de halógenos o los que tienen un solo halógeno en posición para. Esto sugiere que los halógenos en posición para no cumplimentan las HBP de la misma manera que los biarilos halogenados en posición meta y orto. La completa eliminación de todos los halógenos puede dar como resultado un inhibidor deficiente, presumiblemente debido a la falta de complementariedad estérica para rellenar las cavidades de unión de halógenos (por ejemplo, los compuestos 10, 21-22, 27, 42-44 y 51-53). En las condiciones de ensayo, el mejor compuesto fenólico (8) es inferior a 1, que lleva tanto una funcionalidad fenólica

5

10

como carboxílica en el anillo hidrófilo. Los compuestos de biarilo estabilizados con un solo carboxilato (tales como **11-22**) pueden ser excelentes inhibidores de fibrillas de amiloide, por ejemplo, los compuestos **11**, **12**, **15-20**. Estos rivalizan con el diflunisal para la inhibición, siendo la excepción los que contienen únicamente un halógeno en posición para (por ejemplo, los compuestos **13** y **14**). Un aril-carboxilato sustituido en posición meta o para puede ser suficiente para proporcionar excelentes propiedades de inhibición, lo que sugiere que el sustituyente hidroxilo en **1** no es necesario para una buena actividad inhibidora. Además, la colocación en la posición para del carboxilato parece proporcionar inhibidores superiores, lo que sugiere que un carboxilato en la posición para es más capaz de aprovechar las interacciones electrostáticas con los grupos ϵ -amónio de las Lys 15 y 15' (modo de unión directa), como ocurre en el caso de **20**, o las interacciones de enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo de las Ser 117 y 117' (modo de unión inversa) como en el caso de **18**. Los biarilos donde el anillo hidrófobo está sustituido con halógenos en posiciones distintas de la posición para y el anillo hidrófilo con carboxilatos en la posición meta y particularmente en la posición para producen inhibidores de la formación de fibrillas de amiloide de TTR altamente eficaces.

La adición de un sustituyente hidroxilo al anillo que contiene un sustituyente carboxilato (la sustitución de ácido salicílico, por ejemplo, **23-27**) también puede producir inhibidores con alta actividad similar al diflunisal. En los biarilos con el núcleo de ácido salicílico, la colocación exacta de los halógenos no parece ser tan vital como en los casos previos, lo que sugiere que este anillo contribuye de manera desproporcionada a la energía de unión. El hidroxilo en posición para puede participar en la formación de enlaces de hidrógeno con los grupos ϵ -amónio de las Lys 15 y 15' (modo de unión directa) o con los hidroxilos de las Ser 117 y 117' (modo de unión inversa). La sustitución de flúor en **1** por cloro (**26**) puede dar como resultado un inhibidor con una actividad igual o superior, mientras que la eliminación completa de los halógenos (**27**) puede producir un inhibidor modesto. Se debe tener en cuenta que **27** es sólo ligeramente superior que un carboxilato en posición para, **22**, *in vitro*, y los dos son superiores a los inhibidores sin halógeno con el carboxilato en la posición meta, **21**, y el análogo que contiene hidroxilo **10**.

La inclusión de un sustituyente 3',5'-dihalo-4'-hidroxilo en el anillo que contiene halógeno, con carboxilatos en las posiciones para o meta (**28-31**), puede producir una actividad inhibidora elevada, similar a la del diflunisal. La sustitución 4-hidroxilo se incluyó para conseguir un mayor parecido con la tiroxina, el ligando natural de la TTR. Estos inhibidores también pueden imitar la actividad hormonal de la tiroxina y, por lo tanto, pueden actuar como agonistas o antagonistas del tiroides, un efecto que puede ser indeseable.

La protección del carboxilato como un éster metílico o del hidroxilo como un éter metílico (**32** y **33**) puede producir inhibidores inferiores en comparación con **1**. Probablemente, una combinación de la pérdida de carga y el aumento del volumen estérico explica estas observaciones. La eliminación de todos los sustituyentes hidrófilos (por ejemplo, **34-38**) puede dar como resultado inhibidores deficientes. Un compuesto de biarilo que contiene solo sustitución de cloro en posición meta (por ejemplo, **38**) puede ser un inhibidor modesto, lo que sugiere que los cloros hacen mejores contactos en las cavidades de unión a halógeno en comparación con los biarilos que contienen flúor (**37**).

Se sintetizaron varios inhibidores que contenían cloro y se evaluó su actividad de inhibición de fibrillas de TTR. Cuando miembros de esta clase de inhibidores contienen carboxilatos en las posiciones meta o para (por ejemplo, **45** y **46**) pueden poseer una alta actividad, mientras que los que tienen un carboxilato en posición orto (tal como **47**) pueden ser inhibidores inferiores. Esta observación sugiere que el carboxilato en posición orto puede estar demasiado lejos de los grupos ϵ -amónio de las Lys 15 y 15' para realizar interacciones electrostáticas favorables (modo de unión directa) o de los grupos hidroxilo de las Ser 117 y 117' para experimentar interacciones de enlaces de hidrógeno (modo de unión inversa). Los alcoholes bencílicos **48-50** demostraron sorprendentemente ser excelentes inhibidores de la formación de fibrillas. La sustitución dicloro en posición meta en el anillo parece estar complementada por la funcionalidad alcohol del bencilo en la posición orto, meta o para, debido potencialmente a la formación de enlaces de hidrógeno o enlaces de hidrógeno mediados por agua. Una serie de análogos de aldehído (**39-41**) donde los grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$ se reemplazaron por una funcionalidad aldehído, mostraron una buena inhibición excepto en el caso del aldehído **41** en posición para, posiblemente debido a la hidratación del aldehído para dar un gem-diol. Es posible que los aldehídos, los alcoholes bencílicos y los carboxilatos se unan a la cavidad a través de un mecanismo diferente. En ausencia de información estructural, sin embargo, no puede descartarse un modo de unión similar. También es posible que los aldehídos se unan covalentemente a la Ser 117 (117') a través de un hemiacetal o a la Lys 15 (15') a través de un enlace imina. La sustitución de los cloros por átomos de flúor (**54** y **55**) en el caso de los aldehídos puede dar como resultado inhibidores bastante deficientes (**39** y **41**). Como se ha indicado anteriormente, la eliminación completa de los halógenos puede producir inhibidores con mala actividad (**42** y **44**), excepto en el caso del aldehído meta **43** donde la actividad es modesta. Esta actividad modesta puede deberse a un alto grado de hidratación. Es sorprendente que el 3',5'-difluoro-meta-aldehído (**54**), sea inferior a los compuestos con halógenos que carecen de aldehído (**42**).

Se evaluaron adicionalmente inhibidores que mantenían la formación de fibrillas de TTR por debajo del 50% a una concentración igual a la de la TTR (3,6 μM) con respecto a su capacidad de unirse selectivamente a TTR en relación con las demás proteínas del plasma sanguíneo. La concentración de diflunisal en sangre puede exceder de 30 μM 20 horas después de una sola dosis de 500 mg, o de 300 μM 4 horas después de la misma dosis. Aunque este alto nivel de concentración plasmática sostenida sugiere una excelente biodisponibilidad, los inhibidores más selectivos permitirán una menor dosificación y efectos secundarios potencialmente menores; por lo tanto, se incubó plasma humano con este subconjunto de inhibidores a una concentración final de 10,8 μM (la concentración media de TTR

en plasma humano es aproximadamente 5 μ M). Después se capturó la TTR usando un anticuerpo unido a resina, y la TTR inmovilizada se lavó tres veces con una solución de TSA (solución tris salina)/saponina al 0,05%, seguido por dos lavados con TSA. El complejo de TTR-inhibidor se liberó de la resina con trietilamina 100 mM (pH 11,5) y se determinó la estequiometría del inhibidor presente con respecto a la TTR por análisis de HPLC en fase inversa. Se puede unir un máximo de 2 equivalentes de inhibidor por tetrámero de TTR. En la Tabla 1 se resumen las estequiometrías de unión al plasma después del lavado, que representan los límites inferiores debido a las pérdidas asociadas al lavado.

Los bifenilos que contienen cloro pueden ser selectivos para la unión a TTR en plasma sanguíneo humano (estequiometría media de 0,8, con una estequiometría máxima teórica de 2,0, véase la Tabla 1). La estequiometría media observada fue 0,4 para todos los inhibidores ensayados. De los inhibidores que contenían flúor, **18** y **20** presentaron una selectividad de unión muy buena y aceptable para TTR, respectivamente, superior a la estequiometría de 0,13 presentada por **1** en condiciones similares. Los valores de estequiometría presentados en la Tabla 1 pueden representar un límite inferior debido a las pérdidas asociadas con el lavado del inhibidor con respecto a la TTR secuestrada en una resina con anticuerpo policlonal. Los resultados de selectividad de unión a la TTR para **39** y **41** deben considerarse con precaución, porque estos compuestos pueden unirse covalentemente a TTR como se ha descrito anteriormente.

Los inhibidores que presentan excelentes datos de inhibición de fibrillas de amiloide de TTR *in vitro*, aunque presentan una mala selectividad en plasma, pueden unirse preferiblemente a los sitios de unión del fármaco en albúmina y/o a sitios similares en otras proteínas encontradas en el plasma. Es poco probable que estos inhibidores impidan el plegamiento anómalo de TTR y la amiloidosis en un entorno complejo como el del plasma sanguíneo o del CSF.

Se obtuvieron estructuras co-cristalinas por rayos X de alta resolución de **1** y de tres de sus análogos: **26**, **18** y **20** unidos a TTR impregnando cristales de TTR con un exceso 10 veces molar de inhibidor durante más de tres semanas. En la Tabla 2 se resumen los parámetros estadísticos cristalográficos.

Tabla 2: Parámetros estadísticos cristalográficos

| Recogida de Datos | TTR-1 | TTR-18 | TTR-20 | TTR-26 |
|--------------------------------------------|------------|------------|-----------|-----------|
| Resolución (Å) | 35,58-1,85 | 42,18-1,54 | 64,5-1,7 | 51,30-1,7 |
| Nº de reflexiones únicas | 20.478 | 33.741 | 25.634 | 25.486 |
| Finalización (%) (Total/cubierta exterior) | 98,4/99,0 | 95,0/98,0 | 98,0/99,0 | 99,0/98,0 |
| R _{sim} (Total/cubierta exterior) | 0,09/0,31 | 0,03/0,32 | 0,08/0,39 | 0,07/0,40 |
| Refino | | | | |
| Resolución (Å) | 35,58-1,85 | 42,18-1,50 | 64,5-1,7 | 51,30-1,7 |
| Factor-R/Sin R (%) | 21,2/23,6 | 22,2/24,5 | 22,5/24,0 | 21,5/24,2 |
| Longitud de enlace Rmsd (Å) | 0,03 | 0,06 | 0,02 | 0,02 |
| Ángulos de enlace Rmsd (°) | 2,3 | 2,7 | 1,9 | 1,9 |

El diflunisal (**1**) se une a TTR tanto en modo directo como en modo inverso. En cada sitio de unión a hormonas de la TTR, se encontraron cuatro conformaciones de unión diferentes de diflunisal con una ocupación aproximadamente igual - un modo de unión directa e inversa, cada uno con dos modos de unión simétricamente equivalentes. El sistema biarílico de diflunisal se desplazó del centro de la cavidad de unión a hormonas y ocupa dos posiciones distintas para formar un cono con forma en "V" de densidad electrónica en la cavidad de unión a hormonas de la TTR. Este modo de unión mejora tanto las interacciones hidrófobas como las interacciones de van der Waals entre el inhibidor y la cavidad hidrófoba de la TTR formada por Leu 17, Ala 108, Leu 110, Thr 119 y Val 121. El modo de unión inversa de diflunisal se aumentó por la interacción de enlaces de hidrógeno entre el grupo carboxilo y el oxígeno de la cadena lateral de Thr 119 y el oxígeno de la cadena principal de Ala 108 en la cavidad de unión interna. Sorprendentemente, la Ser 117 ni adopta múltiples conformaciones ni forma ninguna interacción electrostática con el inhibidor. En el modo de unión inversa, uno de los sustituyentes flúor del diflunisal estaba dentro de la distancia de los enlaces de hidrógeno entre el oxígeno de la cadena lateral de Thr 119 (3,3 Å). En la cavidad de unión externa, la densidad electrónica para los átomos de la cadena lateral de Lys 15' sólo era visible a un bajo nivel sigma, indicando que puede estar en más de una conformación. La mejor conformación posible para el resto de Lys 15 estaba modelada a una distancia de enlaces de hidrógeno del grupo carboxilo del diflunisal en el modo de unión directa.

El compuesto **20** se une a la TTR en el modo de unión directa, con el anillo hidrófilo sustituido con carboxilato orientado en la cavidad de unión externa para interactuar electrostáticamente con las Lys 15 y 15'. El anillo de arilo fluorado está colocado en la cavidad de unión interna donde los halógenos están situados en las HBP 2 y 2'. Interesantemente, una inspección cuidadosa de los dos sitios de unión revela una diferencia significativa en la orientación de los anillos de bifenilo. Los ángulos entre los planos de los anillos de fenilo varían de 32,6 grados en un sitio de unión a 63,8 grados en el otro. Esta observación puede ser el resultado de la unión negativamente cooperativa de **20** con TTR.

El compuesto **18** se une a TTR en el modo inverso con el anillo de arilo hidrófilo sustituido con carboxilato orientado en la cavidad interna, dentro de una distancia de enlaces de hidrógeno de Ser 117 y Ser 117'. Los anillos de arilo están girados 34 grados entre sí para aprovechar las interacciones hidrófobas con Leu 17, Ala 108, Val 121 y Thr

119. Los átomos de flúor están colocados en las cavidades de unión a halógenos 1 y 1'. No se esperaba el modo de unión inversa, en su lugar, se preveía que el carboxilato se colocara en la cavidad externa para aprovechar las interacciones electrostáticas con Lys 15 y 15', con los átomos de flúor secuestrados en las cavidades de unión a halógeno 2 y 2'. Sin embargo, el modo de unión inversa no era una sorpresa total, ya que se había observado previamente para el diclofenaco (una biaril-amina) y varios análogos de diclofenaco.

La sustitución con átomos de cloro en lugar de átomos de flúor en el diflunisal induce diferencias significativas en la unión de **26** a TTR. El compuesto **26** se une a TTR en el modo de unión inversa con el anillo de arilo sustituido con carboxilo orientado en la cavidad de unión interna y los cloros secuestrados en las cavidades de unión a halógeno 2 y 2'. Al igual que **18** y **20**, el compuesto **26** también ocupa el centro de la cavidad de unión a hormonas. Los restos Ala 108, Lys 15, Leu 17, Leu 110, Lys 17 y Thr 119 de los protómeros de TTR forman interacciones de van der Waals e hidrófobas con el inhibidor. En la cavidad de unión interna, la cadena lateral de Ser 117 existe en dos conformaciones para interactuar con la sustitución carboxilo de **26** y la Ser 117 de los otros monómeros. El mismo oxígeno de carboxilo de **26** también forma una interacción de enlace de hidrógeno con el oxígeno de la cadena principal de Ser 117. El otro oxígeno de carboxilo de **26** forma un enlace de hidrógeno con el oxígeno de la cadena principal de Ala 108. En contraste con el diflunisal, el resto Thr 119 se orienta para alejarse del inhibidor, contribuyendo a la hidrofobia de la cavidad de unión en lugar de a la formación de enlaces de hidrógeno con el inhibidor.

Para explorar adicionalmente el mecanismo de acción de estos inhibidores, se evaluó su capacidad de estabilizar a la TTR frente a la disociación inducida por urea en función del tiempo. La velocidad de disociación del tetrámero se asoció irreversiblemente al desplegamiento rápido de los monómeros, monitorizado fácilmente, empleando concentraciones de urea superiores a las que permiten el replegamiento de los monómeros. La disociación monitorizada por el desplegamiento se exploró por ultra UV-CD en urea 6,5 M, revelando que los buenos inhibidores de la amiloidogénesis mediada por ácido ralentizaban la velocidad de disociación del tetrámero dependientemente de la dosis (FIGS. 2A y 2B). Varios inhibidores, incluyendo **20**, **46** y **48**, muestran un efecto sorprendente sobre la disociación del tetrámero de TTR, la etapa limitante de la velocidad de la amiloidogénesis. Véase, por ejemplo, Hammarstrom, P.; *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 25, 16427-32, que se incorpora como referencia en su totalidad.

Como se sospecha que el modo de inhibición de la formación de fibrillas de TTR por estos compuestos es un ajuste dependiente de la dosis de la barrera de disociación del tetrámero por medio de la estabilización del estado basal, los mejores inhibidores deben ser los que más ralenticen la disociación del tetrámero. La velocidad de formación de fibrillas se monitorizó por la turbidez a un pH final de 4,4 durante 192 h. Véanse las FIGS. 3A, 3B, 4A y 4B. Los inhibidores que poseen la capacidad de estabilizar la TTR tetramérica a un bajo pH impedirán la disociación del tetrámero, el plegamiento anómalo y el ensamblaje anómalo para dar amiloide. Los mejores inhibidores de la formación de fibrillas de amiloide son los que más ralentizan la disociación del tetrámero (FIGS. 2A y 2B). Sin embargo, la correlación no es perfecta, ya que algunos inhibidores se unen mejor en urea que en condiciones ácidas y viceversa.

Para asegurar que los inhibidores estabilizan la forma tetramérica de la TTR (3,6 μ M), la estructura cuaternaria de TTR se exploró con estudios de ultracentrifugación analíticos de velocidad y equilibrio. Se determinó la estructura cuaternaria de la proteína después de 72 horas de incubación con **18** y **20** (3,6 μ M o 7,2 μ M) a pH 4,4. El tetrámero era la especie dominante, tanto a una concentración de inhibidor de 3,6 μ M como de 7,2 μ M en los estudios de AUC en equilibrio así como en los estudios de velocidad.

Se empleó calorimetría isotérmica de valoración (ITC) para determinar las constantes de unión de **18** y **20** a la TTR a pH 8,0 (25°C). El diflunisal y los dos análogos se unen a la TTR con cooperatividad negativa, una característica presentada por muchos otros ligandos. La unión al primer sitio es 15 veces más fuerte que la unión al segundo sitio en el caso del diflunisal y **20**. El biarilo **18** posee una K_{d1} aproximadamente 120 veces menor que la K_{d2} (Tabla 3). La Tabla 3 resume la primera y segunda constantes de disociación para la unión de **1**, **18** y **20** a la TTR de tipo natural determinada por ITC. Las constantes de unión para **1** se notificaron previamente y se proporcionan en la tabla siguiente con fines comparativos. Véase el Ejemplo 1.

Tabla 3: Constantes de disociación para compuestos que se unen a la TTR de tipo natural

| Inhibidor | K_{d1} | K_{d2} |
|-----------|----------|----------|
| 1 | 75 nM | 1100 nM |
| 18 | 9 nM | 1100 nM |
| 20 | 80 nM | 1300 nM |

La TTR WT tetramérica se disocia con una $t_{1/2}$ de 42 h y se despliega 500.000 veces más rápido. Por lo tanto, su velocidad de disociación puede explorarse relacionándola con el desplegamiento, que es irreversible en urea 6,5 M. Como la disociación del tetrámero es limitante de la velocidad para la amiloidogénesis, todos los inhibidores que presentan una excelente actividad *in vitro* y una estequiometría de unión que exceda de 0,50 en plasma deberían ralentizar la disociación del tetrámero si es correcto el mecanismo de acción supuesto, la estabilización cinética por la unión selectiva al estado natural (véanse las FIGS. 2A y 2B).

Las velocidades de disociación del tetrámero de TTR se midieron en función de la concentración de inhibidor durante un periodo de 168 horas en urea 6,5 M. La selección de inhibidores, específicamente **18**, **20**, **39**, **41**, **45**, **46**, **48** y **49**

demuestra una reducción global en la extensión de disociación del tetrámero durante 160 horas como se refleja en los cambios de amplitud con respecto a TTR sin inhibidor. La velocidad de disociación del tetrámero también se ralentiza espectacularmente en presencia de inhibidor, como se refleja en la disminución de la pendiente del curso del tiempo. Los inhibidores **20**, **45**, **46** y **48** son superiores, presumiblemente porque el inhibidor se disocia muy lentamente de TTR·I y TTR·I₂ debido a su alta afinidad de unión en urea. La formación de TTR·I y TTR·I₂ puede estabilizar significativamente el estado natural debido a los bajos valores de K_d de estos complejos y eleva la barrera cinética para la disociación del tetrámero, sustancialmente en el caso de **20**, **45**, **46** y **48**. Aunque **16** y **18** se unen a TTR, parece ser que su afinidad es insuficiente para afectar a la estabilización cinética. Probablemente es significativo que el orden de clasificación de eficacia del inhibidor en urea a una concentración de inhibidor de 3,6 μM (proteína 3,6 μM) sea **20** ≈ **45** > **46** ≈ **48**, que es diferente que una concentración de inhibidor de 7,2 μM (**20** ≈ **46** > **45** ≈ **48**). Esto refleja probablemente una diferencia en los valores de K_d en urea.

La estabilización cinética del estado natural es una estrategia terapéutica atractiva debido a las pruebas que están apareciendo de que los oligómeros plegados anómalamente, tanto si están en la ruta amiloide o fuera de ella, son neurotóxicos. La obtención de una estabilización cinética con inhibidores puede proporcionar un tratamiento no invasivo para ASS, PAF y CAF.

Las velocidades de disociación del tetrámero en urea en presencia de un inhibidor dado no siempre predicen la capacidad del inhibidor de impedir la amiloidosis a bajo pH. Como no está claro todavía cómo y cuándo se forma el amiloide en un ser humano, son deseables estabilizadores del tetrámero de TTR que funcionen bien en una diversidad de medios desnaturizantes. Se exploró la velocidad de formación de fibrillas de TTR en función de la concentración de inhibidor en condiciones ácidas (FIGS. 3A, 3B, 4A y 4B). Los inhibidores **20**, **45** y **48** se comportan así mismo excepcionalmente bien en este entorno. El inhibidor **46** es un estabilizador del tetrámero mejor en urea que en ácido, mientras que **1** es mucho mejor en ácido que en urea. La energía libre de estabilización asociada con la formación de los complejos TTR·I y TTR·I₂ en un medio dado determina la extensión de estabilización del estado basal y el aumento asociado en la energía libre de activación para la disociación del tetrámero. Estos datos sugieren que los inhibidores ralentizan la amiloidosis por TTR a bajo pH mucho más eficazmente que la disociación del tetrámero de TTR en urea 6,5 M. Esto puede deberse a que la amiloidogénesis requiere un reensamblaje dependiente de la concentración después de la disociación. Los inhibidores más eficaces son los que pueden mantener la concentración del compuesto intermedio amiloidogénico monomérico de TTR a niveles suficientemente bajos como para hacer que la formación de fibrillas sea muy ineficaz. Como se observa en la desnaturización por urea de TTR en presencia de inhibidores, el orden de clasificación de eficacia de inhibidor a bajo pH difiere significativamente desde una concentración de inhibidor de 3,6 μM (FIGS. 3A y 3B) hasta una concentración de inhibidor de 7,2 μM (FIGS. 4A y 4B). Esta observación refleja probablemente las diferencias en los valores de K_{d2} de cada uno de los inhibidores a bajo pH. El ejemplo más espectacular es el del diflunisal - uno de los inhibidores más eficaces de la formación de fibrillas a 3,6 μM, pero uno de los menos eficaces a 7,2 μM, debido a su K_{d2} relativamente elevada.

Los análogos de diflunisal representan una clase prometedora de compuestos para el tratamiento de la amiloidosis por TTR. Aunque varios análogos de diclofenaco son muy buenos inhibidores de la formación de fibrillas, los análogos de diflunisal ofrecen una clase adicional de estabilizadores del tetrámero de TTR muy eficaces. Varios análogos de diclofenaco ofrecen la capacidad de inhibir la formación de fibrillas resultante de la disociación y plegamiento anómalo de dos mutantes de TTR - Val30Met y Leu55Pro. Las estructuras co-cristalinas por rayos X demuestran que los análogos de diclofenaco se unen principalmente en el modo de unión inversa, sin embargo, pequeñas perturbaciones en las estructuras de los análogos de diflunisal permiten una unión inversa o directa. Además, el diflunisal se puede unir en el modo de unión directo o inverso, con una ocupación casi igual en los dos modos. Las constantes de disociación obtenidas para el diclofenaco (60 nM para K_{d1} y 1.200 nM para K_{d2}) fueron comparables a las obtenidas para el diflunisal y **20**, demostrando **18** una unión casi 10 veces más fuerte para el primer evento de unión como se ilustra por su valor de K_{d1}. Además, las dos clases de inhibidores presentaron una unión negativamente cooperativa. Lo más destacable es que varios análogos de diflunisal fueron muy selectivos para la TTR en plasma sanguíneo humano, ofreciendo la posibilidad de disminuir la toxicidad y los efectos secundarios. Véase, Oza, V. B.; *et al.*, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 321-32.

Veintiocho de los compuestos sintetizados pueden inhibir sustancialmente la amiloidogénesis por TTR. De éstos, varios mostraron una estequiometría de unión superior a 0,50 equivalentes en plasma sanguíneo humano. Las subestructuras de arilo clorado y fluorado de los mejores inhibidores se encuentran en fármacos conocidos, por lo tanto, hay buenas razones para creer que estos compuestos o sus análogos podrían evolucionar para dar fármacos que no presenten la actividad de NSAID de **1**. Los compuestos fluorados **18** y **20** se pueden unir a la TTR tetramérica en urea 6,5 M y estabilizarla, ralentizando espectacularmente la primera etapa del plegamiento anómalo y la amiloidogénesis, disociación del tetrámero de TTR. Estos compuestos y otros ralentizan también espectacularmente la amiloidogénesis por TTR mediada por ácido. De los compuestos ensayados, **18**, **20**, **39**, **41**, **45**, **46**, **48** y **49** fueron los que mejor se comportaron en la estabilización del tetrámero de TTR en urea y en condiciones ácidas. Estos compuestos de biarilo parecen aumentar la barrera de activación asociada con la disociación del tetrámero, la etapa limitante de la velocidad para la formación de amiloides, por estabilización del estado basal.

Ejemplo 3: El diflunisal administrado por vía oral estabiliza la transtiretina frente a la desnaturización

La transtiretina (TTR) es una proteína homotetramérica que transporta tiroxina y proteína de unión a holo-retinol. En

condiciones desnaturalizantes, la disociación del tetrámero limitante de la velocidad y el plegamiento anómalo rápido del monómero permite un ensamblaje anómalo para dar amiloide, produciéndose amiloidosis sistémica senil, poli-neuropatía amiloide familiar y cardiomiopatía amiloide familiar. Se sabe que la unión del diflunisal al menos a uno de los dos sitios de unión a tiroxina no ocupados en la TTR estabiliza el tetrámero de TTR aumentando también la barrera de activación de disociación *in vitro*. Se investigó la posibilidad de usar diflunisal para el tratamiento de la amiloidosis por TTR.

Métodos

Se incluyeron 30 voluntarios sanos (25 hombres, 5 mujeres) después de dar el consentimiento informado. Los sujetos tenían de 23 a 53 años (edad media, $37,6 \pm 8,8$) con un peso corporal medio de $78,0 \pm 12,1$ kg. Cada sujeto se trató con diflunisal (Dolobid®) a una dosis de 125, 250 o 500 mg dos veces al día (cada 12 horas) durante 7 días (13 dosis en total). Se recogió sangre el día 1 antes del tratamiento y el día 8, 4 y 12 h después de tomar diflunisal. El diseño de este estudio fue aprobado por *The Human Subjects Committee of Scripps Clinic, Scripps Green Hospital, The Scripps Research Institute and The Scripps General Clinical Research Center*.

Se midieron los niveles séricos de diflunisal. Se añadieron 100 μ L de suero a 900 μ L de acetonitrilo para precipitar las proteínas. Después de centrifugación, se añadieron 100 μ L de líquido sobrenadante a 900 μ L de trietilamina acuosa 100 mM, pH 11,5. Después de filtración, se inyectaron 100 μ L de cada muestra en una columna de fase inversa C18 Keystone de 3 cm usando un gradiente de 40-100% de solución B durante 10 min (solución A: 94,8% de agua/5% de acetonitrilo/0,2% de ácido trifluoroacético; solución B: 94,8% de acetonitrilo/5% de agua/0,2% de ácido trifluoroacético), con control por un sistema de suministro multidisolvente Waters 600E. La detección se realizó a 280 nm con un detector de absorbancia ajustable Waters 486 y los picos se integraron para dar la concentración de diflunisal a partir de curvas patrón.

Se analizó la estequiometría de la unión del diflunisal a TTR en suero humano. Se añadió una suspensión 1:1 de gel/Tris-HCl 10 mM, pH 8,0/NaCl 140 mM/NaN₃(TSA) al 0,025% (62,5 μ L) de Sepharose a 500 μ L de suero y la mezcla se incubó a 4°C durante 1 h. Después de centrifugación se añadieron 400 μ L de líquido sobrenadante a 200 μ L de una suspensión 1:1 de gel/TSA de la Sepharose conjugada con anticuerpo anti-TTR y se agitó por balanceo lentamente a 4°C durante 20 minutos. Después de centrifugación, el gel se lavó con 1 mL de TSA/saponina al 0,05% (Fisher Scientific) (dos veces, 10 min cada vez) y además con 1 mL de TSA (una vez, 10 min) a 4°C. Después se añadieron 155 μ L de trietilamina acuosa 100 mM, pH 11,5, para eluir la TTR y el diflunisal unido de los anticuerpos. Después de una agitación por balanceo suave a 4°C durante 30 min, la muestra se centrifugó y se retiraron 145 μ L del líquido sobrenadante. Se extrajo una inyección de 135 μ L de muestra y se analizó como se ha descrito previamente (Purkey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**; 98: 5566-71).

Se evaluó la estabilidad del tetrámero de TTR en suero frente a la desnaturalización con urea. Se incubaron muestras de 10 μ L de suero (25°C) en 90 μ L de diversas concentraciones de urea en tampón de fosfato 50 mM (pH 7,0; KCl, 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM). Las soluciones de urea se comprobaron por el índice de refracción para verificar las concentraciones preparadas en peso. Se realizó la reticulación de la proteína por glutaraldehído añadiendo 10 μ L de glutaraldehído (25%). Se dejó que la reacción de reticulación continuara durante 4 min antes de ser inactivada por la adición de 10 μ L de NaBH₄ (al 7% en NaOH 0,1 M). Las muestras se mezclaron con 120 μ L de cóctel de carga de gel reductor de SDS (concentración final de SDS = 2,5%) y se llevaron a ebullición durante 5 min. Las muestras se separaron usando SDS-PAGE al 12% y los geles se analizaron por inmunotransferencia usando anti-suero anti-TTR (Purkey *et al.*, *supra*).

Se evaluó la estabilidad del tetrámero de TTR en suero frente a la desnaturalización con ácido. Se incubaron muestras de 10 μ L de suero (37°C) en 90 μ L de tampón de acidificación 100 mM. Se usó tampón de citrato cuando se deseaba un pH final $\leq 3,8$; y se empleó tampón de acetato cuando el intervalo de pH a evaluar era 4,2-5,4. Después de la reticulación, las muestras se analizaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia como se ha descrito anteriormente.

Se expresaron TTR WT recombinante y variantes en BL21/DE3 *Epicurian gold Escherichia coli* (Stratagene) transformada con el plásmido pmmH α que contenía los genes de TTR y de resistencia a la ampicilina. La expresión y purificación se realizaron como se ha descrito previamente (Lashuel *et al.*, *Biochemistry* 1999; 38: 13560-73).

La velocidad de disociación del tetrámero de TTR se midió por espectroscopía de dicroísmo circular. La evaluación de las velocidades de disociación del tetrámero se realizó usando muestras de TTR recombinante (3,6 μ M) en urea 6,5 M, una concentración en la región pos-transicional para el cambio estructural terciario (Hammarström *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 16427-32). Se midió el espectro ultra UV CD de TTR (210 - 220 nm) en función del tiempo para evaluar la ralentización de la velocidad de disociación del tetrámero con relación a cambios estructurales terciarios rápidos.

El ensayo de formación de fibrillas se realizó como se indica a continuación. Una solución madre de TTR recombinante (7,2 μ M) se diluyó 1:1 con tampón de acidificación 100 mM. Se usó tampón de citrato cuando se deseaba un pH final de $\leq 3,8$; se empleó tampón de acetato cuando el intervalo de pH a evaluar era 4,2 - 6,0, y se utilizó tampón

de fosfato para evaluar la amiloidogénesis a pH 6,5. Las muestras se incubaron a 37°C durante 72 h sin agitación después de la acidificación. El grado de formación de fibrillas se exploró por mediciones de turbidez a 400 nm.

5 La cinética de formación de fibrillas se midió como se indica a continuación. Se mezclaron soluciones de TTR recombinante (7,2 μM) con un volumen igual de tampón de acetato 100 mM para producir un pH final de 4,4. Las muestras se incubaron a 37°C y se monitorizó la turbidez a 400 nm durante el transcurso de 168 h. Se obtuvo una muestra separada para cada momento de tiempo.

El efecto del diflunisal sobre la disociación de tetrámeros mediada por urea y la formación de fibrillas mediada por el pH se evaluó añadiendo diflunisal a una solución de TTR que se incubó durante 3 h (37°C) antes de someter la proteína a desnaturalización con urea o amiloidosis mediada por el pH.

10 Resultados

15 Las concentraciones medias de diflunisal en suero, medidas por HPLC, 4 y 12 h después de tomar la 13ª dosis fueron $20,1 \pm 7,1$ y $6,9 \pm 3,0$ μM en el grupo de 125 mg dos veces al día, $233,5 \pm 76,0$ y $145,8 \pm 38,9$ μM en el grupo de 250 mg dos veces al día y $517,0 \pm 79,5$ y $421,9 \pm 78,1$ μM en el grupo de 500 mg dos veces al día. Más del 99% de diflunisal está unido a proteínas. Estas concentraciones observadas en el grupo de 250 mg dos veces al día y 500 mg dos veces al día son muy elevadas con respecto a la concentración de TTR en suero (3,6 - 7,2 μM) y deberían producir una estequiometría de unión a diflunisal que se aproxime al máximo de 2 si la unión a proteínas competidoras, tales como TBG (0,3 - 0,5 μM) y/o albúmina (580 - 725 μM), que tienen múltiples sitios de unión para moléculas pequeñas, no es de alta afinidad.

20 El diflunisal se une preferiblemente a la TTR tetramérica en la sangre con una estequiometría de al menos 1 e idealmente de 2 para observar una estabilización cinética máxima. Para poner un límite inferior a la estequiometría de diflunisal en cada sujeto, los inventores inmunoprecipitaron transtiretina en suero con anticuerpos policlonales unidos a una resina en fase sólida como se ha descrito previamente (Purkey *et al.*, *supra*). Después de lavar 3 veces la TTR inmovilizada para eliminar la unión no específica, el complejo de TTR-diflunisal se disoció de la resina y la estequiometría del diflunisal se determinó por HPLC empleando curvas patrón. La estequiometría del diflunisal unido a TTR en suero 4 y 12 h después de la toma fue $0,45 \pm 0,11$ y $0,31 \pm 0,12$ en el grupo de 125 mg dos veces al día, $1,12 \pm 0,08$ y $0,95 \pm 0,13$ en el grupo de 250 mg dos veces al día y $1,51 \pm 0,09$ y $1,48 \pm 0,08$ en el grupo de 500 mg dos veces al día. La estequiometría del diflunisal aumentó con su concentración sérica hasta ≈ 300 μM . La estequiometría máxima de 1,5, menor de la esperada, a una concentración sérica de 300 μM se debe a una limitación del método (pérdidas asociadas al lavado) y/o a la unión del diflunisal a otras proteínas plasmáticas, por lo tanto los inventores realizaron un estudio de estequiometría de unión de diflunisal a TTR recombinante. Las pérdidas asociadas al lavado explican la máxima estequiometría de unión de 1,5, debido principalmente a la disociación del sitio de baja afinidad. El diflunisal se une a TTR con cooperatividad negativa, por lo tanto, la disociación del sitio de baja afinidad es espectacularmente más rápida. La estequiometría de unión esperada en tampón se calculó basándose en las constantes de disociación determinadas por calorimetría isotérmica de valoración (K_{d1} , 75 nM; K_{d2} , 1,1 μM). La representación conjunta de la estequiometría calculada y determinada experimentalmente, obteniéndose esta última por inmunoprecipitación (3 lavados) y análisis por HPLC, permite estimar la verdadera estequiometría a 1,75 - 1,91 a 250 mg dos veces al día, lo que sugiere que podría utilizarse esta dosis.

40 Una comparación de la estequiometría de unión del diflunisal (100 μM) en sujetos (0,8 - 1) a la TTR recombinante (1,5) revela una unión significativa a proteínas séricas además de a la TTR, proporcionando el incentivo de desarrollar análogos de diflunisal que se unan más selectivamente a la TTR. Se aumentó el nivel sérico de TTR y los niveles séricos de T_4 total y RBP se disminuyeron después de la administración de diflunisal en todos los grupos. Estos hallazgos sugieren que el diflunisal influye en el metabolismo de TTR. No se observaron efectos secundarios evidentes durante o después del estudio. Sin embargo, el nivel sérico de albúmina disminuyó significativamente y los niveles de BUN y creatinina aumentaron ligeramente en el grupo de 500 mg dos veces al día. En el grupo de 250 mg dos veces al día, el nivel sérico de albúmina disminuyó moderadamente y el nivel de BUN aumentó ligeramente.

50 Se desarrolló un nuevo método para demostrar que el diflunisal administrado por vía oral estabiliza a la TTR sérica frente a las tensiones de desnaturalización incluyendo la amiloidosis. Este método sirve como un marcador sustituto para identificar compuestos que deben prevenir enfermedades por plegamiento anómalo de TTR. El suero entero de los sujetos se sometió a desnaturalización añadiendo urea (0 - 9 M) o añadiendo ácido (pH 3,8 - 5,4). Como la TTR debe disociarse para desnaturalizarse, se pueden usar cambios estructurales cuaternarios para monitorizar el grado de desplegamiento (Hammarström *et al.*, *supra*). Se añadió glutaraldehído para reticular todas las proteínas en suero después de ser sometidas a tensiones de desnaturalización y de establecer la fracción de TTR que se pliega normalmente (tetrámero o dímero) frente a la que se desnaturaliza (monómero). La SDS-PAGE de suero entero separa el tetrámero y el dímero de TTR reticulados (representando éstos la TTR plegada) del monómero. La inmunotransferencia permite comparaciones cuantitativas de la cantidad de TTR plegada. Los anticuerpos policlonales no se unen al monómero de TTR no plegado ni mucho menos a la TTR plegada, por lo tanto, lo más útil es comparar la intensidad de las bandas de tetrámero y dímero en ausencia y presencia de diflunisal. Por este método también puede evaluarse la dependencia del tiempo de la inhibición por diflunisal de la desnaturalización de TTR. La dependencia del tiempo apenas detectable de este proceso en presencia de diflunisal confirma claramente el mecanismo de estabili-

zación cinética (véase el Ejemplo 1) donde la estabilización del estado basal por el diflunisal hace que la barrera de disociación del tetrámero sea insuperable. La eficacia del diflunisal (250 mg dos veces al día) en estos cursos de tiempo de desnaturalización es mejor que la que se predeciría por la estequiometría medida (0,8 - 1,2), proporcionando pruebas adicionales de que el método de inmunoprecipitación subestima la estequiometría de unión real, especialmente cuando excede de 1.

El conocimiento del intervalo de las estequiometrías de unión de diflunisal en seres humanos y de la concentración de diflunisal necesario para simular esas estequiometrías en un tubo de ensayo permite la realización de estudios biofísicos relevantes *in vitro* para explorar el mecanismo por medio del cual los complejos de TTR-diflunisal y TTR-diflunisal₂ impiden la disociación y la amiloidosis. La velocidad de disociación mediada por urea (6,5 M) y la velocidad de formación de fibrillas amiloides mediada por ácido (pH 4,4) se estudiaron en función de la concentración de diflunisal (5, 10, 20 y 60 μ M), revelando una ralentización dependiente de la dosis. Como la disociación del tetrámero es limitante de la velocidad para la formación de fibrillas de amiloide, se deduce que las velocidades de disociación del tetrámero en urea deben ser predictivas del grado de formación de fibrillas de amiloide mediada por acidificación. El diflunisal es mejor para inhibir la amiloidosis que para inhibir la disociación mediada por urea porque también se requiere el reensamblaje dependiente de la concentración para la amiloidosis. También es posible que los valores de K_{d1} y K_{d2} asociados con la unión de diflunisal a la TTR sean menores en ácido que en urea.

Más de 80 mutaciones de TTR predisponen a los individuos a una amiloidosis hereditaria por alteraciones dependientes de la secuencia del panorama de la energía de desnaturalización. De éstas, la deposición de amiloide de V122I produce una cardiomiopatía amiloide familiar (CAF) en 3-4% de los afroamericanos, mientras que V30M es la mutación principal de la polineuropatía amiloide familiar (PAF). El diflunisal inhibe tanto la amiloidogénesis por V122I como por V30M dependientemente de la dosis, lo que demuestra la generalidad de este enfoque.

Es muy deseable desarrollar una estrategia terapéutica general no invasiva para mejorar la amiloidosis por TTR. Los resultados obtenidos en la presente memoria indican que la administración oral de diflunisal puede ralentizar la disociación del tetrámero por unión y estabilización del estado natural no amiloidogénico. La estabilización del estado natural es una estrategia particularmente atractiva dados los informes recientes de que los oligómeros mal plegados y no las fibrillas de amiloide producen neurodegeneración. El uso clínico del diflunisal (250 - 500 mg dos veces al día) para la artritis reumatoide y la osteoartritis demuestra su baja toxicidad para usos a largo plazo. La semi-vida sérica de la TTR es 12-15 h, por lo tanto la dosificación dos veces al día parece óptima dada la semi-vida de 8-10 h del diflunisal. El diflunisal debe ser eficaz contra ASS, CAF y PAF, porque se une tanto a la TTR WT como a la TTR variante imponiendo una estabilización cinética, de una forma análoga al mecanismo utilizado por la inclusión de subunidades de trans-supresores en tetrámeros de TTR compuestos de otra manera de subunidades asociadas a la enfermedad, lo que se sabe que mejora la enfermedad humana. El diflunisal puede ser menos eficaz contra la amiloidosis del SNC porque no puede atravesar la barrera hematoencefálica, aunque ciertos análogos de diflunisal (por ejemplo, un análogo descrito en la presente memoria) pueden tener dicha capacidad.

Ejemplo 4: Los bifenilos policlorados hidroxilados se unen selectivamente a la transtiretina en sangre e inhiben la amiloidogénesis

Los bifenilos policlorados (PCB) son conocidos contaminantes ambientales persistentes que se ha descrito que son tóxicos para roedores y posiblemente para los seres humanos. La durabilidad de estos compuestos en el medio ambiente se debe a su lenta degradación y alta lipofilia, que permite que se bioacumulen y concentren a medida que ascienden en la cadena alimentaria. Los PCB hidroxilados (OH-PCB) son metabolitos formados por oxidación de PCB por las monooxigenasas P450. Es difícil encontrar datos definitivos sobre la toxicidad de los compuestos PCB individuales en seres humanos, debido al hecho de que los PCB disponibles en el mercado son generalmente mezclas que contienen muchos isómeros diferentes, así como cantidades trazas de toxinas conocidas, por ejemplo, dibenzofuranos clorados. Sin embargo, se ha demostrado en animales de laboratorio la toxicidad de varios PCB purificados. Con la administración de estos compuestos está asociada pérdida ósea, toxicidad inmunológica, neurotoxicidad y disminución de los niveles de hormonas tiroideas, además de la estrogenicidad de los OH-PCB.

Numerosos estudios demuestran que los PCB y OH-PCB se unen a la transtiretina (TTR) *in vitro*. Se ha sugerido que la TTR es la proteína diana en la sangre humana que contribuye a la persistencia de los OH-PCB en individuos expuestos. Aunque numerosos informes sugieren que la TTR es una proteína de unión a PCB *in vivo*, no hay pruebas definitivas de que los PCB se unan a la transtiretina en plasma. Los inventores han desarrollado un método de inmunoprecipitación que puede usarse para poner un límite inferior a la estequiometría de unión de moléculas pequeñas a TTR en fluidos biológicos. En la presente memoria se evaluó la estequiometría de unión a TTR en plasma humano de los PCB y OH-PCB.

La amiloidogénesis pos-secreción de la TTR plasmática que requiere la disociación del tetrámero limitante de la velocidad, el plegamiento anómalo del monómero y el ensamblaje anómalo, produce supuestamente amiloidosis sistémica senil, cardiomiopatía amiloide familiar y las polineuropatías amiloides familiares. En la presente memoria se demuestra que varios OH-PCB se unen selectivamente a la TTR en plasma humano e inhiben la formación de fibrillas de amiloide por estabilización del tetrámero conduciendo a una estabilización cinética parcial o completa del estado natural. Se caracterizaron cuatro complejos de TTR·(OH-PCB)₂ representativos por cristalografía de rayos X para entender mejor la base molecular de la unión y proporcionar la base para el diseño de inhibidores optimizados

de la amiloidogénesis por TTR.

Selectividad de unión de los PCB y los OH-PCB para transtiretina en plasma de sangre humana

- 5 Se evaluó la selectividad de unión de ocho PCB (compuestos **1-8**, FIG. 5) para los que se ha descrito que desplazan la hormona tiroidea de la TTR con un valor de Cl_{50} menor de 50 nM y catorce OH-PCB (compuestos **9-22**, FIG. 6), metabolitos de PCB conocidos para los que se ha descrito que se unen a TTR o disminuyen los niveles de tiroxina en ratones o ratas. Se establecieron los límites inferiores de la estequiometría de unión de PCB a TTR en plasma usando anticuerpos policlonales contra TTR unidos covalentemente a una resina de Sepharose que se mezcló con plasma sanguíneo humano pretratado con PCB u OH-PCB (10,8 μ M). Después del lavado, se evaluó la estequiometría de unión de PCB u OH-PCB a TTR (\approx 5 μ M) por HPLC en fase inversa.
- 10 Hasta dos PCB se pueden unir a los dos sitios de unión de hormona tiroidea idénticos en un tetrámero de TTR. Con la excepción de los PCB **1** y **3**, los PCB no hidroxilados restantes presentaron una selectividad de unión relativamente baja para la TTR plasmática (Tabla 4). Por el contrario, los OH-PCB mostraron una selectividad de unión de buena a excelente para la TTR plasmática (Tabla 5). Varios de los PCB hidroxilados (por ejemplo, **16** y **22**) se aproximan a una estequiometría de unión de 2. La selectividad de unión de los OH-PCB en sangre entera es muy similar a la observada en plasma, por lo tanto, las membranas de eritrocitos no secuestran significativamente los OH-PCB estudiados.
- 15

Tabla 4: Estequiometría de unión de los PCB a TTR en plasma sanguíneo humano

| Compuesto | Equivalentes unidos |
|-----------|---------------------|
| 3 | 1,50 \pm 0,42 |
| 1 | 0,62 \pm 0,12 |
| 6 | 0,19 \pm 0,11 |
| 2 | 0,18 \pm 0,03 |
| 5 | 0,06 \pm 0,04 |
| 4 | 0,05 \pm 0,04 |
| 7 | Sin unión |
| 8 | Sin unión |

Tabla 5: Estequiometría de unión de los PCB hidroxilados a TTR en plasma sanguíneo humano

| Compuesto | Equivalentes unidos (plasma) | Equivalentes unidos (sangre) |
|-----------|------------------------------|------------------------------|
| 16 | 1,86 \pm 0,14 | ND |
| 22 | 1,67 \pm 0,40 | 1,69 |
| 17 | 1,63 \pm 0,05 | ND |
| 19 | 1,48 \pm 0,16 | 1,55 |
| 21 | 1,40 \pm 0,22 | 1,33 |
| 18 | 1,36 \pm 0,21 | ND |
| 12 | 1,23 \pm 0,24 | 1,47 |
| 11 | 1,12 \pm 0,22 | 1,20 |
| 20 | 1,02 \pm 0,09 | 0,86 |
| 10 | 0,96 \pm 0,09 | 0,93 |
| 13 | 0,84 \pm 0,24 | 0,86 |
| 9 | 0,83 \pm 0,19 | 0,57 |
| 14 | 0,81 \pm 0,29 | 0,73 |
| 15 | 0,70 \pm 0,17 | 0,56 |

- 20 La captura por anticuerpos del complejo de TTR:PCB tendría el potencial de subestimar la estequiometría de unión de PCB debido a la disociación de PCB de la TTR durante las 5 etapas de lavado. Se incubaron los PCB y los OH-PCB (10,8 μ M) con TTR recombinante (3,6 μ M) para evaluar la estequiometría de moléculas pequeñas unidas a la TTR inmovilizada después de cada etapa de lavado. La estequiometría disminuyó en 10-17% para PCB **2** y OH-PCB **18** después de 5 lavados, mientras que la del PCB **4** disminuyó en 45%. La cuantificación de pérdidas asociadas con el lavado permite estimar la verdadera estequiometría de unión de los PCB y los OH-PCB en plasma. Además, una
- 25 buena correlación entre la estequiometría final del OH-PCB unido a TTR recombinante y la cantidad unida a TTR en plasma indica que el compuesto es un agente de unión a TTR muy selectivo en plasma, por ejemplo, OH-PCB **18**. Por el contrario, los PCB **2** y **4** presentan una estequiometría de unión a TTR mayor en tampón que en plasma, lo que sugiere claramente que se unen a proteína(s) competidora(s), así como a la TTR en plasma.

Inhibición de fibrillas de amiloide de TTR por los PCB hidroxilados

Se evaluó la capacidad de los OH-PCB y del PCB **3** para inhibir la formación de fibrillas de TTR *in vitro* porque estos compuestos presentan una buena selectividad de unión a TTR en sangre. La TTR secretada en sangre procedente del hígado parece ser la fuente de amiloide de TTR sistémico. Aunque no está claro todavía dónde o cómo se forma el amiloide en los seres humanos, el desnaturalizante típico en las células es ácido, lo cual es eficaz para convertir casi todos los péptidos y proteínas amiloidogénicos en agregados amiloides y/o relacionados. Por lo tanto, se empleó la formación de fibrillas mediada por ácido (pH 4,4) controlada por la turbidez para controlar la eficacia de los PCB como inhibidores. Los PCB hidroxilados y el PCB **3** fueron muy eficaces como inhibidores de las fibrillas de TTR. A una concentración de inhibidor igual a la concentración de TTR WT (3,6 μ M), sólo se observó 12-50% de la cantidad normal de formación de fibrillas después de un período de incubación de 72 h. Esta actividad es equivalente a la presentada por los mejores inhibidores de fibrillas descubiertos hasta la fecha, tales como el ácido flufenámico (Flu), que se incluyó como control positivo.

Unión del OH-PCB **18** a TTR

Los experimentos previos de espectrometría de masas sugieren que el OH-PCB **18** presenta una cooperatividad de unión positiva con dos sitios de unión a hormona tiroidea relacionados con C₂ de la TTR. Cuando se añaden cantidades subestequiométricas (<1:1) de **18** a TTR, las especies predominantes observadas en el espectrómetro de masas son apo-TTR y el complejo TTR·**18**₂, lo cual es coherente con la unión positivamente cooperativa. Las características de unión a TTR de **18** están en contraste con las presentadas con otros numerosos inhibidores de fibrillas de amiloide de TTR que se unen con cooperatividad negativa.

Los estudios de calorimetría isotérmica de valoración realizados en condiciones fisiológicas revelan que la unión de OH-PCB **18** a TTR WT se ajusta mejor a un modelo en el que las constantes de disociación son K_d idénticas (3,2 \pm 1,8 nM). Este resultado no rebate la unión positivamente cooperativa, ya que no se puede conseguir una concentración suficientemente baja de TTR para explorar la cooperatividad positiva debido al insuficiente calor liberado. Los intentos de ajustar los datos recogidos a modelos de unión positiva o negativamente cooperativa produjeron malos ajustes.

Estructuras co-cristalinas de los OH-PCB **12**, **16**, **17** y **18**

Se obtuvieron cristales de los OH-PCB **12**, **16**, **17** y **18** unidos a TTR WT humedeciendo los cristales de TTR con un exceso de 10 veces de inhibidor durante cuatro semanas. Después se resolvieron las estructuras de rayos X para cada uno de los complejos. El dímero de TTR dentro de la unidad asimétrica cristalográfica forma la mitad de las dos cavidades de unión al ligando. Como los dos sitios de unión se dividen en dos partes por los mismos ejes dobles de simetría, se observan típicamente dos modos de unión equivalentes de simetría de los inhibidores. Cada sitio de unión a TTR se puede subdividir en cavidades interna y externa. Estas cavidades comprenden tres de las denominadas cavidades de unión a halógeno (HBP) porque están ocupadas por los yodos de los dos anillos aromáticos de la tiroxina. Las HBP 3 y 3' están localizadas profundas dentro de la cavidad de unión interna, las HBP 2 y 2' definen el límite entre la cavidad de unión interna y externa, mientras que las HBP 1 y 1' están localizadas cerca de la periferia de la cavidad de unión externa. Las estructuras co-cristalinas revelan que el enlace C-C que conecta los dos anillos aromáticos del OH-PCB está casi centrado en el eje de simetría doble, proporcionando el aspecto de una sola conformación de unión. El ángulo diédrico entre dos anillos de fenilo es 59° para **12**, 37° para **16** y 44° para **18**. Todos los OH-PCB ocupan posiciones similares en las cavidades de unión interna y externa. La complementariedad de van der Waals del sistema de anillo de biarilo facilita varias interacciones entre subunidades en las que están implicados los restos X, Y y Z de una subunidad y los restos n' y m' y o' en la otra subunidad que constituyen cada sitio de unión. Varios de los sustituyentes en los anillos de fenilo están fuera del eje y pueden modelarse en múltiples posiciones dentro de la densidad electrónica observada.

OH-PCB **18** unido a TTR

La estructura de rayos X de 1,8 Å del complejo TTR·**18**₂ demuestra que el inhibidor tiene una excelente complementariedad estérica con el sitio de unión a TTR. La mecánica molecular (Insight II, Accelrys) indica que la conformación no unida de **18** está próxima a su estructura unida. La estructura refinada define interacciones electrostáticas directas y mediadas por agua que contribuyen a la unión de alta afinidad de **18**. Uno de los anillos aromáticos sustituidos idénticamente con 3-Cl, 4-OH, 5-Cl ocupa la cavidad de unión interna, sobresaliendo sus sustituyentes de cloro en las HBP 3 y 3'. Las cadenas laterales de la Ser 117 y la Thr 119 adoptan una conformación alternativa por rotación alrededor de sus enlaces C α -C β como se aprecia por los mapas de densidad electrónica no sesgados. La cadena lateral de la Ser 117 adopta las tres conformaciones de rotámero como se aprecia por la distribución de la densidad electrónica. Interesantemente, dos moléculas de agua están localizadas entre los restos de la Ser 117 adyacentes en el eje doble con 50% de ocupación, facilitando un retículo de enlaces de hidrógeno que conectan los restos de la Ser 117, las moléculas de agua próximas y la funcionalidad fenol de **18**. Basándose en la inspección de la estructura no está clara la razón de que **18** se una con un comportamiento positivamente cooperativo o no. El otro anillo sustituido idénticamente ocupa la cavidad de unión a TTR exterior sobresaliendo sus halógenos hacia el interior de las HBP 1 y 1'.

Compuesto **16** unido a TTR

El anillo fenólico tri-sustituido con 3-Cl, 4-OH, 5-Cl de **16** está orientado hacia el interior del sitio de unión interno de TTR formando las mismas interacciones electrostáticas e hidrófobas con TTR que forma este anillo en la estructura de TTR-**18**₂ descrita anteriormente. El anillo aromático 3,4-diclorado ocupa la cavidad de unión exterior, estando el halógeno dirigido hacia el interior de las HBP 1 o 1' dependiendo del modo de unión equivalente de simetría que se considere. La densidad electrónica de **16**, al igual que la de OH-PCB **18**, es simétrica y, por lo tanto, no es posible colocar el OH en posición para y el Cl en posición para de forma no ambigua basándose en el mapa de densidad electrónica. El mapa de densidad electrónica no sesgado es coherente con tres conformaciones de rotámero de la Ser 117 y contiene dos moléculas de agua entre los restos de la Ser 117, análogamente a la estructura de TTR-**18**₂.

10 OH-PCB **17** unido a TTR

El inhibidor **17** se une al anillo arilo sustituido con 3-Cl, 4-OH, 5-Cl orientado hacia el interior de la cavidad de unión interno utilizando las mismas interacciones que usa este anillo en las estructuras TTR-**16**₂ y TTR-**18**₂ descritas anteriormente. El anillo 2,3,4-tri-clorado ocupa la cavidad de unión externa utilizando interacciones con HPB-1, HBP-1', HBP-2 y HBP-2' en los dos modos de unión equivalentes de simetría. Las múltiples conformaciones de la Ser 117 y las dos moléculas de agua conservadas son también características de la estructura TTR-**17**₂. Según los mapas de densidad electrónica no sesgados fue evidente un cambio conformacional de la cadena lateral de la Thr 119.

Compuesto **12** unido a TTR

El biarilo **12** coloca su anillo arilo sustituido con 3-Cl, 4-OH en la cavidad de unión externa, interaccionando sus dos cloros con las HBP-1 y 1'. Esto contrasta con las estructuras de TTR-**16**₂ y TTR-**17**₂ donde el fenol está localizado en la cavidad de unión interna. El grupo hidroxilo (probablemente en forma ionizada) está dentro de la distancia de enlace de hidrógeno de las cadenas laterales de la Lys 15. El anillo tetra-clorado se sitúa en la cavidad de unión interna donde los halógenos están orientados en las HBP 2 y 2' así como 3 y 3'. Las cadenas laterales de Ser 117 y Thr 119 adoptan conformaciones que son idénticas a las encontradas en la estructura de apo-TTR, a diferencia de la situación en **16**, **17** y **18**.

En la presente memoria, de los 8 PCB descritos previamente que desplazan T4 con un valor de Cl_{50} menor de 50 nM, sólo **1** y **3** mostraron unión a TTR con una estequiometría apreciable en plasma humano. Por el contrario, los catorce OH-PCB descritos previamente que se unían a TTR presentaban una selectividad de unión significativa a TTR en plasma. Esto es coherente con la observación de que los OH-PCB se observan principalmente en plasma y parecen ser retenidos selectivamente allí, en oposición a la retención en lípidos y en otros tejidos en los que típicamente se acumulan los PCB. Los OH-PCB también se unen selectivamente a TTR en sangre entera, lo cual es coherente con la idea de que no se dividen dentro de las membranas lipídicas.

La cantidad de PCB (u OH-PCB) que se retira por lavado del complejo anticuerpo-TTR-PCB durante las etapas de lavado se evaluó usando TTR WT recombinante. El grado de disociación de PCB asociado con el lavado es específico de la molécula. Algunos compuestos presentan una alta estequiometría de unión después de los lavados, lo cual es coherente con una unión inicial significativa y bajas pérdidas asociadas con el lavado, lo cual implica una lenta velocidad de disociación. Los compuestos que presentan una baja estequiometría de unión se clasifican en al menos dos categorías: una alta estequiometría de unión inicial con pérdidas significativas asociadas con el lavado o una baja estequiometría de unión inicial sin pérdidas significativas asociadas con el lavado, siendo este último escenario aplicable a compuestos que se unen con alta afinidad a TTR, pero con una afinidad incluso mayor a otras proteínas plasmáticas. Los PCB **2** y **4** presentan una baja estequiometría después del lavado a TTR recombinante. Se perdió 45% de PCB **4** debido a los lavados, mientras que PCB **2** presenta simplemente una baja estequiometría de unión inicial con pérdidas mínimas asociadas con el lavado (10%). Los valores de selectividad después del lavado reflejan un límite inferior de la cantidad de PCB que se une inicialmente en plasma. Los compuestos tales como PCB **18** que se caracterizan por una elevada estequiometría de unión después del lavado, deben tener una alta afinidad de unión y selectividad, lo cual es coherente con la baja velocidad de disociación observada.

Además de su alta selectividad de unión a la TTR plasmática, los OH-PCB y el PCB **3** presentan también una excelente inhibición de la formación de fibrillas de TTR *in vitro*. La eficacia de los inhibidores **14**, **15** y **18** se encuentra entre la mayor observada hasta la fecha a la concentración de inhibidor y TTR equimolar (3,6 μ M). Probablemente esto se pueda atribuir a su alta afinidad de unión (también coherente con su baja velocidad de disociación) y a sus propiedades de unión a TTR positivamente cooperativas o no, que son poco habituales. Las K_d en nM presentadas por el mejor inhibidor, OH-PCB **18**, indican que el estado natural de la TTR se estabilizará en >3 kcal/mol. La estabilización del estado basal eleva sustancialmente la barrera de disociación del tetrámero (etapa limitante de la velocidad en la amiloidogénesis por TTR), de tal forma que el tetrámero no puede disociarse en una escala de tiempo biológicamente relevante. La estabilización cinética del estado no amiloidogénico natural mediada por la unión de **18** al estado basal se confirmó por una disociación del tetrámero ralentizada espectacularmente en urea 6 M y una amiloidogénesis muy lenta a pH 4,4. Se cree que OH-PCB **18** (3,6 μ M) es un impresionante inhibidor de amiloide porque es un excelente estabilizador cinético de la TTR tetramérica, es decir, impide que 2/3 de una muestra de TTR 3,6 μ M sea amiloidogénica a pH 4,4, porque TTR-**18** y TTR-**18**₂ son incompetentes para formar amiloide, el resto de TTR (1,18 μ M) forma amiloide muy ineficazmente debido a su baja concentración. Las velocidades de disociación de los

mejores inhibidores de OH-PCB pueden también ser menores que las esperadas debido a la asociación estructural de TTR alrededor del OH-PCB, pero esto aún no se ha evaluado tan cuidadosamente como se necesita. Como mínimo, estos compuestos proporcionan directrices para la síntesis de inhibidores excepcionales o pueden resultar útiles por sí mismos como inhibidores dependiendo de su perfil de toxicidad.

- 5 La información estructural sobre la TTR unida a los OH-PCB **12**, **16**, **17** y **18** revela que estos biarilos se unen generalmente a lo largo del eje de simetría doble cristalográfico. El ángulo diédrico entre los dos anillos varía desde ~ 40-60°, permitiendo que las cavidades de unión a halógeno (HBP) en dos subunidades vecinas encajen simultáneamente, lo cual conduce a la estabilización de la interfaz estructural cuaternaria tetramérica. El PCB **18** hidroxilado tiene una complementaridad estructural óptima con TTR ya que sus cloros pueden unirse a las HBP 1 y 1', así como a 3 y 3' simultáneamente. Esto no ocurre con **16** y **17**, que requieren la consideración de los dos modos de unión equivalentes de simetría para extender los cloros al interior de las HBP 1, 1', 3 y 3'.

15 La orientación del anillo fenólico hacia el interior de la cavidad de unión interna parece desempeñar un papel importante, ya que permite que se forme un retículo de enlaces de hidrógeno mediados por agua entre él y las subunidades de TTR vecinas, que estabiliza supuestamente además la estructura cuaternaria natural de TTR. Un retículo de enlaces de H en el que están implicadas las tres conformaciones escalonadas de Ser 117, el grupo fenólico del inhibidor y las dos moléculas de agua conservadas, crea un retículo electrostático que interconecta las dos subunidades que forman el sitio de unión de PCB. En las tres estructuras, Thr 119 ocupa también múltiples conformaciones de rotámero. Por el contrario, este retículo de interacciones electrostáticas está ausente en el complejo **12**₂-TTR en el que el anillo de fenilo sustituido con hidroxilo está orientado en la cavidad de unión exterior y donde la Ser 117 y la Thr 119 adoptan conformaciones de cadenas laterales apo.

25 La toxicidad de los OH-PCB no está bien establecida en la bibliografía. En una diversidad de estudios *in vitro* y en animales, los OH-PCB parecen ser moderadamente estrogénicos o anti-estrogénicos. Se han sugerido otros mecanismos de toxicidad y también hay informes de una reducción de los niveles de hormonas tiroideas en animales expuestos a estos compuestos. La sugerencia de que la unión de OH-PCB a TTR disminuye los niveles de T4 y que la disminución de los niveles de T4 refleja la unión de TTR a moléculas pequeñas es difícil de confirmar directamente. Como aproximadamente la mitad de la T4 es transportada por albúmina, el desplazamiento de la T4 desde los sitios de unión a albúmina parece ser la causa más probable de la disminución de los niveles de T4 en individuos expuestos a los PCB. La globulina de unión al tiroides tiene la máxima afinidad por la tiroxina y es un transportador importante en seres humanos, pero no está presente en muchos mamíferos inferiores, incluyendo ratas y ratones donde se han estudiado muchos de los perfiles toxicológicos de estos compuestos. Por tanto, en estas especies es más probable que los compuestos que se unen a TTR tengan un efecto sobre la unión y el transporte global de T4. Los datos que muestran la unión de los PCB a TBG sugieren poca interacción, con la excepción de uno o dos compuestos de unión débil. Por lo tanto, el efecto de los OH-PCB sobre los niveles tiroideos humanos debe ser mínimo a menos que se unan a la albúmina. También hay informes que indican que estos compuestos pueden interferir con la activación de hormonas tiroideas o aumentar la velocidad de sulfatación y, por lo tanto, la inactivación de la T4. Los OH-PCB también podrían unirse a otras hormonas tiroideas diana incluyendo receptores de hormonas tiroideas, lo cual parece razonable dada la analogía estructural con la T4.

40 Está claro que hay poca documentación con relación a la toxicidad de los PCB hidroxilados, especialmente en seres humanos. Es de esperar que la toxicología en roedores sea más severa debido al papel de la TTR como transportador principal de hormonas tiroideas. Lo que está claro es que los PCB hidroxilados presentan una excelente actividad como inhibidores de la formación de fibrillas de transtiretina, lo que sugiere que esta clase de compuestos tiene una utilidad potencial para la inhibición de la formación de fibrillas de amiloide.

Materiales y métodos

Purificación de anticuerpos contra la transtiretina y conjugación con Sepharose

- 45 Se produjeron anticuerpos, se purificaron y se acoplaron a Sepharose. La resina se conservó como una suspensión 1:1 en TSA (Tris 10 mM, pH 8,0/NaCl 140 mM/NaN₃ al 0,025%). Además se preparó Sepharose inactivada por acoplamiento de Tris 200 mM, pH 8,0, a la resina en lugar del anticuerpo.

Preparación de plasma humano

- 50 Se extrajo sangre entera de voluntarios sanos del Scripps General Clinical Research Center's Normal Blood-Drawing Program y se transfirió a tubos cónicos de 50 mL. Los tubos se centrifugaron a 3.000 rpm (1730 x g) en una centrifuga de sobremesa Sorvall RT7 equipada con un rotor de cubeta basculante durante 10 min a 25°C. Se extrajo el líquido sobrenadante del plasma y se centrifugó de nuevo a 3000 rpm durante 10 min para retirar las células remanentes. Se añadió azida sódica para dar una solución al 0,05%. El plasma se conservó a 4°C hasta su uso.

Inmunoprecipitación de transtiretina y los PCB unidos

- 55 Se cargó un tubo Eppendorf de 2 mL con 1,5 mL de plasma sanguíneo humano y 7,5 µL de una solución en DMSO 2,16 mM de PCB bajo evaluación. Esta solución se incubó a 37°C durante 24 h. Se añadió a la solución una suspensión 1:1 de resina/TSA (187 µL) de Sepharose inactivada y se agitó por balanceo suavemente a 4°C durante 1 h. La

solución se centrifugó (16.000 x g) y el líquido sobrenadante se dividió en 3 partes alícuotas de 400 μL cada una. Cada una de éstas se añadió a 200 μL de una suspensión 1:1 de resina/TSA de la Sepharose conjugada con anticuerpo anti-transtiretina y se agitó por balanceo lentamente a 4°C durante 20 min. Las muestras se centrifugaron (16.000 x g) y se retiró el líquido sobrenadante. La resina se lavó con 1 mL de TSA/Saponina al 0,05% (Acros) (3 x 10 min) a 4°C y además con 1 mL de TSA (2 x 10 min) a 4°C. Las muestras se centrifugaron (16.000 x g), se retiró el lavado final y se añadieron 155 μL de trietilamina 100 mM, pH 11,5, para eluir la TTR y las moléculas pequeñas unidas de los anticuerpos. Después de una agitación por balanceo suave a 4°C durante 30 min, las muestras se centrifugaron (16.000 x g) y se retiraron 145 μL del líquido sobrenadante, que contenía TTR e inhibidor.

Análisis por HPLC y cuantificación de transtiretina y los PCB unidos

Las muestras de elución del líquido sobrenadante de las perlas de anticuerpo contra TTR (145 μL) se cargaron en un automuestreador Waters 71P. Se extrajo una inyección de 135 μL de cada muestra y se introdujo en una columna de fase inversa C18 Keystone de 3 cm utilizando un gradiente de 40-100% de B durante 8 min (A: 94,8% de H_2O /5% de acetonitrilo/0,2% de TFA; B: 94,8% de acetonitrilo/5% de H_2O /0,2% de TFA), controlado por un sistema de suministro de multidisolvente Waters 600E. La detección se realizó a 280 nm con un detector de absorbancia ajustable Waters 486 y los picos se integraron para dar el área de TTR y de la molécula pequeña. Para determinar la cantidad de cada especie, se inyectaron cantidades conocidas de TTR tetramérica o PCB en la HPLC. Los picos se integraron para crear curvas de calibración a partir de regresiones lineales de los datos usando Kaleidagraph (Synergy Software). Las curvas de calibración se usaron para determinar el número de moles de cada especie presentes en las muestras de plasma. Se calculó la relación entre la molécula pequeña y la proteína para producir la estequiometría de la molécula pequeña unida a TTR en plasma.

Ensayo de formación de fibrillas de amiloide de transtiretina

Los compuestos se disolvieron en DMSO a una concentración de 720 μM . Se añadieron 5 μL de una solución del compuesto que se evaluaba a 0,5 mL de una solución de TTR 7,2 μM en fosfato 10 mM, pH 7,6, KCl 100 mM y tampón de EDTA 1 mM, y se dejó incubar el compuesto con TTR durante 30 min. Se añadieron 495 μL de acetato 0,2 mM, pH 4,2, KCl 100 mM y EDTA 1 mM para producir concentraciones finales de proteína e inhibidor de 3,6 μM y un pH de 4,4. Posteriormente, la mezcla se incubó a 37°C durante 72 h, después de lo cual los tubos se agitaron vorticialmente durante 3 segundos y se midió la densidad óptica a 400 nm. Se determinó el grado de formación de fibrillas normalizando cada densidad óptica por la de la TTR sin inhibidor, definida como una formación de fibrillas del 100%. También se ensayaron soluciones de control de cada compuesto en ausencia de TTR y ninguno absorbió apreciablemente a 400 nm.

Calorimetría isotérmica de valoración de PCB 18 y TTR

Una solución 25 μM de compuesto 18 (en fosfato 10 mM, pH 7,6, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DMSO al 8%) se valoró en una solución 1,2 μM de TTR en un tampón idéntico, usando un calorímetro de valoración isotérmica Microcal MCS (Microcal, Northampton, MA). Una inyección inicial de 2 μL fue seguida por 25 inyecciones de 10 μL a 25°C. El termograma se integró y se restó un blanco para producir una isoterma de unión que se ajustaba mejor a un modelo de dos sitios de unión idénticos usando el paquete de análisis de datos ITC en ORIGIN 5.0 (Microcal).

Cristalización y recogida de datos de rayos X

Se obtuvieron cristales de TTR recombinante a partir de soluciones de proteína a 5 mg/mL (en KCl 100 mM, fosfato 100 mM, pH 7,4, sulfato amónico 1 M) equilibradas frente a sulfato amónico 2 M en experimentos de gotas colgantes. Los complejos TTR-ligando se prepararon a partir de cristales humedecidos durante 2 semanas con un exceso 10 veces molar del ligando para asegurar una saturación completa de los dos sitios de unión. Como agente para humedecer se usó una solución 1:1 de acetona:agua. Para recoger los datos se usó un sistema de placas de imágenes DIP2030b (MAC Science, Yokohama, Japan) acoplado a un generador de rayos X de ánodo giratorio RU200. Los cristales se pusieron en aceite Paratone como crioprotector y se enfriaron a 120 K para los experimentos de difracción. Los cristales de todos los complejos TTR-ligando son isomorfos, conteniendo la forma de cristal apo dimensiones de celda unitaria $a=43 \text{ \AA}$, $b=86 \text{ \AA}$ y $c=65 \text{ \AA}$. Pertenecen al grupo espacial $P2_12_12$ y contienen la mitad del homotetrámero en la unidad asimétrica. Los datos se redujeron con DENZO y SCALEPACK.

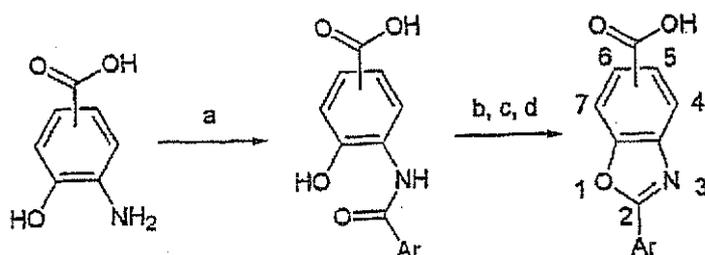
Determinación de la estructura y refinamiento

Las coordenadas atómicas de la proteína para TTR procedentes del Banco de Datos de Proteínas (número de acceso 1BMZ) se usaron como modelo de partida para el refinamiento de la TTR natural y los complejos TTR-ligando por dinámica molecular y minimización de energía usando el programa CNS. Se calcularon mapas a partir de datos de difracción recogidos sobre cristales de TTR humedecidos con los PCB o co-cristalizados simultáneamente. Para los complejos de TTR con los PCB, los mapas resultantes revelaron posiciones aproximadas del ligando en las dos cavidades de unión del tetrámero de TTR, con alturas de picos por encima de 5-9 r.m.s. Para mejorar adicionalmente la densidad electrónica de moléculas pequeñas y eliminar los sesgos del modelo, el modelo se sometió a varios ciclos del protocolo de *warp/shake*, lo cual dio como resultado una notable mejora en el mapa, especialmente alrededor del inhibidor. Posteriormente se realizó un ajuste de modelos usando estos mapas y la molécula de ligando fue

ubicada de acuerdo con la densidad. En los tres casos, la conformación de mínima energía del inhibidor calculada por el programa InsightII (Accelrys) estaba de acuerdo con el mapa. Debido al eje de simetría cristalográfico doble a lo largo del canal de unión se debe aplicar un modelo de trastorno estadístico, que da lugar a dos modos de unión de ligando en cada uno de los dos sitios de unión de la TTR tetramérica. Se añadieron moléculas de agua basándose en el mapa de densidad electrónica no sesgado. Debido a la falta de densidades electrónicas interpretables en el mapa final, en el modelo final no se incluyeron los nueve restos N-terminales y los tres restos C-terminales.

Ejemplo 5: Benzoxazoles como inhibidores de fibrillas de amiloide de transtiretina

Se crean dos sitios de unión a tiroxina de transtiretina por su interfaz estructural cuaternaria. El tetrámero puede ser estabilizado por unión de moléculas pequeñas a esos sitios, proporcionando potencialmente un medio para tratar la enfermedad amiloide por TTR con fármacos de molécula pequeña. Se han descubierto muchas familias de compuestos cuya unión estabiliza el estado basal tetramérico en un grado proporcional a las constantes de disociación de moléculas pequeñas K_{d1} y K_{d2} . Esto también aumenta eficazmente la barrera de activación disociativa e inhibe la amiloidosis por estabilización cinética. Estos inhibidores están compuestos típicamente de dos anillos aromáticos, llevando un anillo sustituyentes halógeno y llevando el otro anillo sustituyentes hidrófilos. Los benzoxazoles sustituidos con un ácido carboxílico en C(4)-C(7) y un anillo de fenilo halogenado en C(2) parecían también complementar el sitio de unión a tiroxina de la TTR. Por lo tanto, se preparó una quimioteca pequeña de estos compuestos por deshidrociclación de ácidos N-acil-amino-hidroxi-benzoicos como se ilustra en el Esquema 1.



Esquema 1: Síntesis general de benzoxazoles

Reactivos: (a) ArCOCl , THF, piridina (Ar = fenilo, 3,5-difluorofenilo, 2,6-difluorofenilo, 3,5-diclorofenilo, 2,6-diclorofenilo, 2-(trifluorometil)fenilo y 3-(trifluorometil)fenilo); (b) $\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, xilenos a la temperatura de reflujo; (c) TMSCHN_2 , benceno, MeOH; (d) LiOH, THF, MeOH, H_2O (rendimiento 8-27% en las 4 etapas).

Los benzoxazoles se evaluaron usando una serie de análisis de rigor creciente. Se incubaron TTR WT ($3,6 \mu\text{M}$) durante 30 min (pH 7, 37°C) con un compuesto de ensayo ($7,2 \mu\text{M}$). Aunque al menos una molécula del compuesto de ensayo se debe unir a cada molécula de tetrámero de TTR para conseguir estabilizarlo, una concentración de compuesto de ensayo de $7,2 \mu\text{M}$ es sólo dos veces la concentración mínima eficaz. Después, el pH se ajustó a 4,4, el pH óptimo para la fibrilización. La cantidad de amiloide formado después de 72 h (37°C) en presencia del compuesto de ensayo se determinó por turbidez a 400 nm y se expresó como porcentaje de formación de fibrillas (ff), siendo el 100% la cantidad formada por TTR sola. De los 28 compuestos ensayados, 11 redujeron la formación de fibrillas a niveles despreciables ($ff < 10\%$; FIG. 7).

Después se evaluaron los 11 compuestos más activos para determinar su capacidad de unirse selectivamente a TTR sobre todas las demás proteínas en la sangre. Se incubó plasma de sangre humana (concentración de TTR $3,6 - 5,4 \mu\text{M}$) durante 24 horas con el compuesto de ensayo ($10,8 \mu\text{M}$) a 37°C . La TTR y cualquier inhibidor unido se inmunoprecipitaron usando un anticuerpo de TTR policlonal unido a Sepharose. La TTR con o sin inhibidor unido se liberó de la resina a un pH alto y la estequiometría inhibidor:TTR se determinó por análisis de HPLC (FIG. 8). Los benzoxazoles con ácidos carboxílicos en la posición 5 ó 6 y los sustituyentes 2,6-diclorofenilo (**13**, **20**) o 2-trifluorometilfenilo (**11**, **18**) en la posición 2 mostraron las mayores estequiometrías de unión. En particular, el compuesto **20** presentó excelentes actividad inhibitora y selectividad de unión. Por lo tanto, su mecanismo de acción se caracterizó posteriormente.

Para confirmar que **20** inhibe la formación de fibrillas de TTR uniéndose fuertemente al tetrámero, se realizaron experimentos de calorimetría isotérmica de valoración (ITC) y velocidad de sedimentación con TTR WT. La ITC demostró que los dos equivalentes de **20** se unen con constantes de disociación medias de $K_{d1}=K_{d2}=55 (\pm 10) \text{ nM}$ en condiciones fisiológicas. Estos valores son comparables a las constantes de disociación de muchos otros inhibidores de la amiloidogénesis por TTR altamente eficaces. Para los experimentos de la velocidad de sedimentación, se incubó TTR ($3,6 \mu\text{M}$) con **20** ($3,6 \mu\text{M}$, $7,2 \mu\text{M}$, $36 \mu\text{M}$) en condiciones óptimas para la formación de fibrillas (72 horas, pH 4,4, 37°C). El tetrámero (55 kDa) fue la única especie detectable en solución con **20** a $7,2$ o $36 \mu\text{M}$. Se formaron algunos agregados grandes con **20** a $3,6 \mu\text{M}$, pero la TTR que quedaba en solución era tetramérica.

La inclusión de subunidades de T119M y la unión de moléculas pequeñas previenen la formación de amiloides de

TTR elevando la barrera de activación para la disociación del tetrámero. La capacidad de un inhibidor para hacer esto se ensaya de forma más rigurosa midiendo su eficacia para ralentizar la disociación del tetrámero en urea 6 M, un fuerte agente de tensión desnaturalizante. De esta forma, se compararon las velocidades de disociación del tetrámero de TTR en urea 6 M en presencia y ausencia de **20**, **21** o **27** (FIG. 9). La TTR (1,8 μM) se desnaturalizó completamente después de 168 horas en urea 6 M. En contraste, **20** a 3,6 μM impidió la disociación del tetrámero durante al menos 168 horas ($> 3x$ la semi-vida de TTR en plasma humano). Con una cantidad equimolar de **20**, solo 27% de TTR se desnaturalizó en 168 horas. El compuesto **27** (3,6 μM) tenía mucha menos capacidad para impedir la disociación del tetrámero (90% de desplegamiento después de 168 horas) aunque era activo en el ensayo de formación de fibrillas. El compuesto **21** no impedía en absoluto la disociación de TTR. Estos resultados demuestran que el inhibidor que se une a TTR es necesario pero no suficiente para estabilizar cinéticamente al tetrámero de TTR en condiciones fuertemente desnaturalizantes; también es importante que las constantes de disociación sean muy bajas (o que las velocidades de inactivación sean muy lentas). Además, la presentación de grupos funcionales en **20** aparentemente es óptima para estabilizar el tetrámero de TTR; al mover el ácido carboxílico de C(6) a C(7), como en **27**, o retirar los cloros, como en **21**, disminuye fuertemente su actividad.

El papel de los sustituyentes en **20** es evidente por su estructura co-cristalina con TTR (FIG. 10). El compuesto **20** orienta sus dos átomos de cloro cerca de las cavidades de unión a halógeno 2 y 2' (así denominadas porque están ocupadas por yodos cuando la tiroxina se une a TTR). El patrón de sustitución 2,6 en los anillos de fenilo fuerza a los anillos de benzoxazol y fenilo a salir de la planaridad, colocándose óptimamente el ácido carboxílico del benzoxazol para formar enlaces de hidrógeno con los grupos $\epsilon\text{-NH}_3^+$ de Lys 15/15'. Las interacciones hidrófobas entre los anillos aromáticos de **20** y las cadenas laterales de Leu 17, Leu 110, Ser 117 y Val 121 contribuyen a la energía de unión adicional.

Métodos

A continuación se detalla el procedimiento general para la síntesis de benzoxazol y la caracterización de los productos (espectros de ^1H - y ^{13}C -RMN y espectros de masas de alta resolución).

25 Ultracentrifugación analítica

Se observó la estructura cuaternaria de TTR en presencia de **20** usando ultracentrifugación analítica de la velocidad de sedimentación. Las muestras se incubaron con **20** a concentraciones de 3,6, 7,2 o 36 μM durante 72 horas. Los datos se recogieron en una ultracentrífuga analítica Beckman XL-I de temperatura controlada (equipada con un rotor An60Ti y un escaner fotoeléctrico). Una celda de doble sector, equipada con una pieza central Epon de 12 mm y ventanas de zafiro, se cargó con 400-420 μL de muestra usando una jeringa. Los datos se recogieron a velocidades del rotor de 3000 y 50000 rpm en un modo continuo a 25°C, con un tamaño de paso de 0,005 cm empleando una media de una exploración por punto. La detección se realizó a 280 nm. Los datos se sometieron a un análisis de derivada en el tiempo usando el programa DCDT+ desarrollado por Philo (Philo, 2000; Stafford, 1992). El análisis demostró la distribución de especies en solución representadas por un intervalo de valores s . Esta distribución se ajustó después a diversos modelos para determinar los coeficientes de sedimentación y difusión para especies en el sistema. El peso molecular de cada especie se determinó por métodos descritos previamente (Pettrassi, *et al.*, 2000). Los valores de s encontrados para TTR demostraron que seguía siendo tetramérica en presencia de concentraciones 7,2 y 36 μM de **20**, mientras que a 3,6 μM , la TTR que quedaba en solución era tetramérica a pesar de la formación de algunos agregados.

40 Cristalización y recogida de datos de rayos-X

Se obtuvieron cristales de TTR WT a partir de soluciones de proteína a 12 mg/mL (en KCl 100 mM, EDTA 1 mM, fosfato sódico 10 mM y sulfato amónico 0,35 M, pH 7,0) equilibrado frente a sulfato amónico 2 M en experimentos de gota colgante. El complejo TTR·**20** se preparó a partir de cristales humedecidos durante 3 semanas con un exceso 10 veces molar del ligando para asegurar la saturación completa de los dos sitios de unión. El cristal humedecido con ligando tuvo una difracción de hasta 1,55 Å en un detector Quantum-4 en la fuente de alta energía monocromática de 14-BM-C, BIOCARs, Advanced Photon Source (Argonne National Laboratory). Los cristales se humedecieron con aceite Paratone y se enfriaron súbitamente hasta 100 K para los experimentos de difracción. Los cristales del complejo TTR·**20** son isomorfos con la forma de cristal apo con dimensiones de celda unitaria $a = 43,1$ Å, $b = 84,7$ Å y $c = 64,7$ Å, grupo espacial $P2_12_12$ con dos subunidades de TTR en la unidad asimétrica. Los datos se redujeron con DENZO y SCALEPACK del grupo HKL2000 (Otwinowski, 1997).

Determinación y refinamiento de la estructura

Como modelo de partida para las búsquedas de reemplazo molecular se usaron las coordenadas atómicas de proteínas para TTR del Protein Data Bank (número de acceso 1BMZ). El refinamiento de la estructura del complejo TTR·**20** se realizó usando los protocolos de dinámica molecular y de minimización de energía de CNS. Los mapas de Fourier de diferencias resultantes revelaron la unión del ligando en las dos cavidades de unión del tetrámero de TTR. Usando estos mapas, el ligando podía colocarse de forma no ambigua en la densidad y se incluyó en el refinamiento cristalográfico. Como modelo inicial para el refinamiento cristalográfico se usó la conformación de energía mínima del inhibidor calculada por el programa Insight II (Accelrys Inc.). Como el eje de simetría cristalográfico duplicado está a lo largo del canal

de unión, tuvo que aplicarse un modelo de trastorno estadístico, dando lugar a dos modos de unión de ligando por cavidad de unión de TTR. Después de varios ciclos de asociación simulada y del posterior refinado con el factor de temperatura y posicional, se pusieron moléculas de agua en los mapas de Fourier de diferencias. El ciclo final del ajuste de mapas se realizó usando el mapa de densidad electrónica ponderado no sesgado calculado por el protocolo de eliminación de sesgo de *shake n'warp*. La conformaciones de unión del ligando relacionadas con la simetría estaban de acuerdo con los mapas de omisión asociados no sesgados así como con los mapas ponderados no sesgados *shake n'warp* con fases en ausencia del inhibidor. Debido a la falta de densidades electrónicas interpretables en el mapa final, en el modelo final no se incluyeron los nueve restos N-terminales y los tres restos C-terminales. En la Tabla 6 se presenta un resumen del análisis cristalográfico.

10 **Tabla 6: Parámetros estadísticos para la estructura cristalina por rayos-X**

| | |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Finalización (%) (cubierta global/externo) | 86/90 |
| R _{sim} (cubierta global/externo) | 0,05/0,33 |
| Parámetros estadísticos del refinado | |
| Resolución (Å) | 33,02-1,55 |
| Factor R/Sin R (%) | 21,1/24,3 |
| Longitud de enlace Rmsd (Å) | 0,03 |
| Ángulos de enlace Rmsd (°) | 2,5 |
| Otros parámetros estadísticos | |
| Dimensiones del cristal (mm) | 0,3 x 0,2 x 0,15 |
| Sistema cristalino | Ortorrómbico |
| Dimensiones de la celdilla unidad (a, b, c en Å) | 43,1, 84,7, 64,7 |
| Volumen de la celdilla unidad (Å ³) | 236123 |
| Resolución máxima (Å) | 1,54 |
| Modo de exploración | Phi |
| Temperatura de medición | 100 K |
| Número de reflexiones independientes | 30705 |
| Método de solución de estructuras | Reemplazo molecular por EPMP (Kissinger, 1999) |
| Refinado contra | F _{obs} |
| Diana de refinado | Probabilidad máxima |
| Programa usado para el refinado | CNS-Solve (Brunger, 1998) |
| Base de datos | Protein Data Bank |

Síntesis de benzoxazoles - Métodos generales

A menos que se indique otra cosa, todas las reacciones se realizaron en artículos de vidrio secados al horno en una atmósfera seca de argón usando un FirstMate Organic Synthesizer (Argonaut Technologies). Todos los disolventes (anhídros) y reactivos se adquirieron a Aldrich y se usaron sin purificación adicional. Los espectros de ¹H RMN se midieron a 500 MHz en un espectrómetro Bruker DRX-500 o a 600 MHz en un espectrómetro Bruker DRX-600, y usaron como referencia el patrón interno CHD₂-S(O)-CD₃ (2,49 ppm). Los espectros de ¹³C se realizaron a 125 MHz en un instrumento Bruker DRX-500 o a 150 MHz en un Bruker DRX-600 y utilizaron como referencia (CD₃)₂SO (39,5 ppm). Los análisis por cromatografía en capa fina se realizaron en placas analíticas de capa fina con soporte de vidrio (Kieselgel 60 F₂₅₄, 0,25 mm, EM Science n° 5715-7). La visualización se realizó usando absorbancia en el UV o ácido fosfomolibdico al 10% en etanol. La cromatografía se realizó en un cromatotrón (Harrison Research, Modelo 7924T, placa de 2 mm) o en una placa de gel de sílice preparativa (Kieselgel 60 F₂₅₄, 1 mm, EM Science n° 13895-7).

Procedimiento general para la síntesis de benzoxazoles

Una mezcla de ácido aminohidroxibenzoico (0,2 mmol) en THF (3 mL) se trató secuencialmente con piridina (500 µL, 0,6 mmol) y el cloruro de ácido deseado (0,2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 h, se calentó a reflujo durante 1 h, se concentró a vacío y se usó en la siguiente etapa sin purificación.

A la mezcla de reacción en bruto se añadió ácido *p*-toluenosulfónico monohidratado (380,4 mg, 2,0 mmol) en xilenos (5 mL) y la mezcla resultante se agitó a la temperatura de reflujo durante una noche. Después de 12 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se inactivó la reacción con NaOH (2 mL, 1 N) y se separaron las fases. La capa acuosa se acidificó con HCl (1 N) a pH 2 y se extrajo con EtOAc (4 x 3 mL). Las capas orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a vacío. El residuo resultante se disolvió en una mezcla de MeOH:benzoceno (2 mL; 1:4), se trató con TMS-CHN₂ (200 µL de una solución 2,0 M en hexanos, 0,4 mmol) a 25°C y el progreso de la reacción se controló por TLC (normalmente se completó después de 0,5 h). La mezcla de reacción se concentró a vacío y el residuo se cromatografió (gradiente de EtOAc del 10 al 25%/hexanos) para producir el éster metílico del benzoxazol deseado.

El éster metílico del benzoxazol se disolvió en una mezcla de THF:MeOH:H₂O (3:1:1, 0,07 M) y se trató con LiOH·H₂O (4 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y se controló por TLC. Después que se completó la reacción, la mezcla se acidificó a pH 2 con HCl 1 N y se extrajo con EtOAc (4 x). Las capas orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en capa fina preparativa (4,9% de MeOH, 95% de CH₂Cl₂, 0,1% de HOAc) para dar el producto en forma de un sólido blanco.

4-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol (1). Se preparó a partir de ácido 3-hidroxiantranílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **1** en forma de un sólido blanco (7,0 mg, 13%). Datos para **1**: ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13,70-12,50 (s ancho, 1H, CO₂H), 8,04 (AMX, 1H, J = 8,1 Hz, Ar), 7,94 (AMX, 1H, J = 7,3 Hz, Ar), 7,84 (d ancho, 2H, J = 5,6 Hz, Ar), 7,62-7,58 (m, 1H, Ar), 7,56 (AMX, 1H, J = 7,3, 8,1 Hz, Ar); ¹³C RMN (125 MHz, DMSO-d₆) δ 165,8, 162,7 (d, J = 248 Hz), 162,6 (d, J = 248 Hz), 161,1, 151,0, 140,3, 129,3, 127,0, 125,8, 123,6, 115,2, 110,8 (d, J = 28 Hz), 107,8 (t, J = 26 Hz); HRMS (MALDI-FTMS) calculado para C₁₄H₇F₂NO₃ (MH⁺) 276,0467, encontrado 276,0463.

4-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol (2). Se preparó a partir de ácido 3-hidroxiantranílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **2** en forma de un sólido blanco (8,2 mg, 15%). Datos para **2**: ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13,00 (s ancho, 1H, CO₂H), 8,06 (AMX, 1H, J = 8,1 Hz, Ar), 7,94 (AMX, 1H, J = 7,6 Hz, Ar), 7,80-7,74 (m, 1H, Ar), 7,57 (AMX, 1H, J = 7,6, 8,1 Hz, Ar), 7,40-7,38 (m, 2H, Ar); ¹³C RMN (125 MHz, DMSO-d₆) δ 166,1, 160,4 (d, J = 256 Hz), 160,3 (d, J = 256 Hz), 154,9, 150,6, 139,6, 134,7 (t, J = 10 Hz), 126,8, 125,8, 114,8, 112,8 (d, J = 22 Hz), 105,2 (t, J = 16 Hz); HRMS (MALDI-FTMS) calculado para C₁₄H₇F₂NO₃ (MH⁺) 276,0467, encontrado 276,0461.

4-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol (3). Se preparó a partir de ácido 3-hidroxiantranílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **3** en forma de un sólido blanco (9,5 mg, 15%). Datos para **3**: ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13,70-12,80 (s ancho, 1H, CO₂H), 8,50 (ABX, 1H, J = 7,8 Hz, Ar), 8,43 (s, 1H, Ar), 8,06 (AMX, 1H, J = 8,1 Hz, Ar), 8,03 (ABX, 1H, J = 8,1 Hz, Ar), 7,94 (AMX, 1H, J = 7,8 Hz, Ar), 7,88 (ABX, 1H, J = 7,8 Hz, Ar), 7,54 (AMX, 1H, J = 8,1 Hz, Ar); ¹³C RMN (125 MHz, DMSO-d₆) δ 165,8, 161,9, 151,0, 140,6, 131,4, 130,8, 130,0 (q, J = 33 Hz), 128,7 (d, J = 4 Hz), 127,2, 127,0, 125,5, 123,8, 123,7 (q, J = 273 Hz), 123,2, 115,2; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para C₁₅H₈F₃NO₃ (MH⁺) 308,0529, encontrado 308,0535.

4-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol (4). Se preparó a partir de ácido 3-hidroxiantranílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **4** en forma de un sólido blanco (15,2 mg, 25%). Datos para **4**: ¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,15 (s ancho, 1H, CO₂H), 8,18 (d, 1H, J = 7,6 Hz, Ar), 8,06 (AMX, 1H, J = 0,9, 8,2 Hz, Ar), 8,02 (d, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 7,96 (AMX, 1H, J = 0,9, 7,9 Hz, Ar), 7,94-7,87 (m, 2H, Ar), 7,58 (AMX, 1H, J = 8,2 Hz, Ar); ¹³C RMN (150 MHz, DMSO-d₆) δ 165,8, 161,6, 151,2, 140,0, 133,0, 132,6, 132,3, 127,6 (q, J = 32 Hz), 127,2 (q, J = 6 Hz), 127,0, 125,6, 124,9, 123,5, 123,4 (q, J = 273 Hz), 115,2; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para C₁₅H₈F₃NO₃ (MH⁺) 308,0529, encontrado 308,0531.

4-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol (5). Se preparó a partir de ácido 3-hidroxiantranílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **5** en forma de un sólido blanco (8,0 mg, 13%). Datos para **5**: ¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,60-12,60 (s ancho, 1H, CO₂H), 8,16 (A₂M, 2H, J = 2,0 Hz, Ar), 8,05 (AMX, 1H, J = 0,9, 8,2 Hz, Ar), 7,96 (A₂M, 1H, J = 2,0 Hz, Ar), 7,94 (AMX, 1H, J = 0,9, 7,6 Hz, Ar), 7,56 (AMX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar); ¹³C RMN (150 MHz, DMSO-d₆) δ 165,8, 160,8, 151,0, 140,4, 135,2, 131,5, 129,4, 127,0, 126,3, 125,9, 125,8, 123,6, 115,2; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para C₁₄H₇Cl₂NO₃ (MH⁺) 307,9876, encontrado 307,9876.

4-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol (6). Se preparó a partir de ácido 3-hidroxiantranílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **6** en forma de un sólido blanco (5,2 mg, 8%). Datos para **6**: ¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,80-12,50 (s ancho, 1H, CO₂H), 8,07 (AMX, 1H, J = 8,2 Hz, Ar), 7,95 (AMX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 7,77-7,71 (m, 3H, Ar), 7,59 (AMX, 1H, J = 7,9, 8,2 Hz, Ar); ¹³C RMN (150 MHz, DMSO-d₆) δ 165,8, 158,2, 150,8, 139,3, 134,8, 134,0, 128,7, 126,8, 126,7, 125,9, 122,4; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para C₁₄H₇Cl₂NO₃ (MH⁺) 307,9876, encontrado 307,9880.

4-Carboxi-2-fenil-benzoxazol (7). Se preparó a partir de ácido 3-hidroxiantranílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **7** en forma de un sólido blanco (10,2 mg, 21%). Datos para **7**: ¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,50-12,60 (s ancho, 1H, CO₂H), 8,24-8,22 (m, 2H, Ar), 8,03 (AMX, 1H, J = 0,9, 8,2 Hz, Ar), 7,91 (AMX, 1H, J = 0,9, 7,9 Hz, Ar), 7,68-7,61 (m, 3H, Ar), 7,51 (AMX, 1H, J = 7,9, 8,2 Hz, Ar); ¹³C RMN (150 MHz, DMSO-d₆) δ 166,0, 163,4, 151,0, 140,8, 132,4, 129,4, 127,6, 126,7, 126,1, 125,0, 123,0, 115,0; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para C₁₄H₉NO₃ (MH⁺) 240,0655, encontrado 240,0656.

5-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol (8). Se preparó a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **8** en forma de un sólido blanco (10,2 mg, 19%). Datos para **8**: ¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,60-12,80 (s ancho, 1H, CO₂H), 8,32 (ABM, 1H, J = 1,5 Hz, Ar), 8,07 (ABM, 1H, J = 1,5, 8,5 Hz, Ar), 7,90 (ABM, 1H, J = 8,5 Hz, Ar), 7,86-7,85 (m, 2H, Ar), 7,60 (tt, 1H, J = 2,4, 9,2 Hz, Ar); ¹³C RMN (150 MHz, DMSO-d₆) δ 166,8, 162,8 (d, J = 248 Hz), 162,7 (d, J = 248 Hz), 161,5, 153,0, 141,2, 129,1 (t, J = 11 Hz), 128,2, 127,7, 121,4, 111,2, 110,8 (d, J = 23 Hz), 110,7 (d, J = 22 Hz), 107,8 (t, J = 26 Hz); HRMS (MALDI-FTMS) calculado para C₁₄H₇F₂NO₃ (MH⁺) 276,0467, encontrado 276,0469.

- 5 **5-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol (9).** Se preparó a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **9** en forma de un sólido blanco (6,8 mg, 12%). Datos para **9**: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,50-12,80 (s ancho, 1H, CO_2H); 8,39 (ABM, 1H, $J = 0,7, 1,6$ Hz, Ar), 8,10 (ABM, 1H, $J = 1,6, 8,7$ Hz, Ar), 7,95 (ABM, 1H, $J = 0,7, 8,7$ Hz, Ar), 7,77 (m, 1H, Ar), 7,40 (t, 2H, $J = 8,8$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,8,160,4 (d, $J = 257$ Hz), 160,3 (d, $J = 257$ Hz), 155,4, 152,6, 140,8, 134,8 (t, $J = 11$ Hz), 128,2, 127,7, 121,6, 113,0 (d, $J = 22$ Hz), 112,9 (d, $J = 22$ Hz), 111,2, 104,9; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 276,0467, encontrado 276,0467.
- 10 **5-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol (10).** Se preparó a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **10** en forma de un sólido blanco (6,7 mg, 11%). Datos para **10**: ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,30-12,80 (s ancho, 1H, CO_2H), 8,51 (ABX, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar), 8,45 (s, 1H, Ar), 8,35 (ABM, 1H, $J = 1,7$ Hz, Ar), 8,08 (ABM, 1H, $J = 1,7, 8,6$ Hz, Ar), 8,04 (ABX, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar), 7,93 (ABM, 1H, $J = 8,6$ Hz, Ar), 7,89 (ABX, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ 166,8, 162,2, 153,1, 141,4, 131,4, 130,9, 130,1 (q, $J = 33$ Hz), 128,8, 128,2, 127,5, 127,1, 123,8 (q, $J = 4$ Hz), 123,7 (q, $J = 273$ Hz), 121,3, 111,2; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3$ (MH^+) 308,0529, encontrado 308,0530.
- 15 **5-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol (11).** Se preparó a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **11** en forma de un sólido blanco (10,3 mg, 17%). Datos para **11**: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,19 (s ancho, 1H, CO_2H), 8,38 (m, 1H, Ar), 8,19 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, Ar), 8,09 (dd, 1H, $J = 1,8, 8,5$ Hz, Ar), 8,03 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 7,94-7,88 (m, 3H, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,8, 161,6, 153,2, 141,1, 133,1, 132,5, 132,4, 128,2, 127,6, 127,5 (q, $J = 32$ Hz), 127,2 (q, $J = 6$ Hz), 124,7, 123,4 (q, $J = 274$ Hz), 121,6, 111,2; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3$ (MH^+) 308,0529, encontrado 308,0531.
- 20 **5-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol (12).** Se preparó a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **12** en forma de un sólido blanco (7,3 mg, 12%). Datos para **12**: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,14 (s ancho, 1H, CO_2H), 8,33 (AMX, 1H, $J = 0,6, 1,8$ Hz, Ar), 8,16 (AM, 2H, $J = 1,8$ Hz, Ar), 8,08 (AMX, 1H, $J = 1,8, 8,5$ Hz, Ar), 7,95 (AM, 1H, $J = 1,8$ Hz, Ar), 7,91 (AMX, 1H, $J = 0,6, 8,5$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,7, 161,1, 153,0, 141,3, 135,2, 131,6, 129,2, 128,2, 127,7, 125,9, 121,4, 111,3; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 307,9876, encontrado 307,9879.
- 25 **5-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol (13).** Se preparó a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **13** en forma de un sólido blanco (10,8 mg, 18%). Datos para **13**: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,08 (s ancho, 1H, CO_2H), 8,43 (AMX, 1H, $J = 0,6, 1,8$ Hz, Ar), 8,13 (AMX, 1H, $J = 1,8, 8,5$ Hz, Ar), 7,98 (AMX, 1H, $J = 0,6, 8,5$ Hz, Ar), 7,77-7,72 (m, 3H, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,7, 158,6, 152,8, 140,4, 134,8, 134,2, 128,8, 128,4, 127,8, 126,2, 121,8, 111,5; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 307,9876, encontrado 307,9879.
- 30 **5-Carboxi-2-fenil-benzoxazol (14).** Se preparó a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **14** en forma de un sólido blanco (11,5 mg, 24%). Datos para **14**: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,12 (s ancho, 1H, CO_2H), 8,30 (ABX, 1H, $J = 1,8$ Hz, Ar), 8,20 (dt, 2H, $J = 1,5, 6,7$ Hz, Ar), 8,03 (ABX, 1H, $J = 1,8, 8,5$ Hz, Ar), 7,87 (ABX, 1H, $J = 8,5$ Hz, Ar), 7,67-7,60 (m, 3H, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,9, 163,6, 153,0, 141,6, 132,4, 129,4, 127,9, 127,5, 127,0, 126,0, 121,0, 111,0; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_3$ (MH^+) 240,0655, encontrado 240,0656.
- 35 **6-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol (15).** Se preparó a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **15** en forma de un sólido blanco (10,3 mg, 19%). Datos para **15**: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,22 (s ancho, 1H, CO_2H), 8,20 (ABM, 1H, $J = 1,5$ Hz, Ar), 7,98 (ABM, 1H, $J = 1,5, 8,2$ Hz, Ar), 7,86 (ABM, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar), 7,79-7,78 (m, 2H, Ar), 7,57 (tt, 1H, $J = 2,4, 9,4$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,7, 162,7 (d, $J = 248$ Hz), 162,6 (d, $J = 248$ Hz), 162,4, 150,0, 144,7, 129,0 (t, $J = 11$ Hz), 128,7, 126,5, 120,0, 112,1, 110,9 (d, $J = 23$ Hz), 110,8 (d, $J = 22$ Hz), 108,0 (t, $J = 26$ Hz); HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 276,0467, encontrado 276,0468.
- 40 **6-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol (16).** Se preparó a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **16** en forma de un sólido blanco (8,5 mg, 15%). Datos para **16**: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,25 (s ancho, 1H, CO_2H), 8,30 (ABM, 1H, $J = 0,6, 1,5$ Hz, Ar), 8,04 (ABM, 1H, $J = 1,5, 8,2$ Hz, Ar), 7,96 (ABM, 1H, $J = 0,6, 8,2$ Hz, Ar), 7,76 (m, 1H, Ar), 7,39 (t, 2H, $J = 8,8$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,7, 160,4 (d, $J = 257$ Hz), 160,3 (d, $J = 257$ Hz), 156,6, 149,7, 144,2, 134,9 (t, $J = 11$ Hz), 128,8, 126,4, 120,1, 113,1, 112,9, 112,2 (d, $J = 5$ Hz), 105,0 (t, $J = 16$ Hz); HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 276,0467, encontrado 276,0466.
- 45 **6-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol (17).** Se preparó a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **17** en forma de un sólido blanco (7,4 mg, 12%). Datos para **17**: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,20 (s ancho, 1H, CO_2H), 8,48 (ABX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 8,41 (s, 1H, Ar), 8,28 (ABM, 1H, $J = 1,5$ Hz, Ar), 8,03 (ABX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 8,02 (ABM, 1H, $J = 1,5, 8,2$ Hz, Ar), 7,90 (ABM, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar), 7,86 (ABX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 168,0, 164,6, 151,4, 146,2, 132,8, 132,2, 131,4 (q, $J = 32$ Hz), 130,2, 129,8, 128,4, 127,8, 125,2, 125,0 (q, $J = 272$ Hz), 121,2, 113,6; HRMS (MALDI-FTMS)

calculado para $C_{15}H_8F_3NO_3$ (MH^+) 308,0529, encontrado 308,0530. HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $C_{15}H_8F_3NO_3$ (MH^+) 308,0529, encontrado 308,0531.

5 **6-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol (18)**. Se preparó a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **18** en forma de un sólido blanco (6,6 mg, 11%). Datos para **18**: 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,22 (s ancho, 1H, CO_2H), 8,30 (ABX, 1H, $J = 0,6, 1,5$ Hz, Ar), 8,20 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz, Ar), 8,06 (ABX, 1H, $J = 1,5, 8,2$ Hz, Ar), 8,04 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 7,98 (ABX, 1H, $J = 0,6, 8,2$ Hz, Ar), 7,94 (t, 1H, $J = 7,3$ Hz, Ar), 7,90 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 168,0, 164,0, 151,6, 145,9, 133,8, 130,0, 129,0 (q, $J = 32$ Hz), 128,6 (q, $J = 6$ Hz), 127,7, 126,0, 124,7 (q, $J = 273$ Hz), 121,6, 113,6; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $C_{15}H_8F_3NO_3$ (MH^+) 308,0529, encontrado 308,0530.

10 **6-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol (19)**. Se preparó a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **19** en forma de un sólido blanco (6,0 mg, 10%). Datos para **19**: 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,20 (s ancho, 1H, CO_2H), 8,17 (ABX, 1H, $J = 0,6, 1,5$ Hz, Ar), 8,00 (AB, 1H, $J = 2,0$ Hz, Ar), 7,96 (ABX, 1H, $J = 1,5, 8,5$ Hz, Ar), 7,83 (AB, 1H, $J = 2,0$ Hz, Ar), 7,82 (ABX, 1H, $J = 0,6, 8,5$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,6, 161,9, 150,0, 144,6, 135,1, 131,6, 129,0, 128,7, 126,4, 125,8, 119,9, 112,1; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $C_{14}H_7Cl_2NO_3$ (MH^+) 307,9876, encontrado 307,9879.

15 **6-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol (20)**. Se preparó a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **20** en forma de un sólido blanco (12,7 mg, 21%). Datos para **20**: 1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,27 (s ancho, 1H, CO_2H), 8,38 (ABX, 1H, $J = 0,5, 1,5$ Hz, Ar), 8,09 (ABX, 1H, $J = 1,5, 8,3$ Hz, Ar), 8,02 (ABX, 1H, $J = 8,3, 0,5$ Hz, Ar), 7,78-7,71 (m, 3H, Ar); ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ 166,6, 159,8, 150,0, 143,8, 134,8, 134,2, 129,1, 128,8, 126,4, 126,3, 120,4, 112,6; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $C_{14}H_7Cl_2NO_3$ (MH^+) 307,9876, encontrado 307,9877.

20 **6-Carboxi-2-fenil-benzoxazol (21)**. Se preparó a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **21** en forma de un sólido blanco (7,0 mg, 15%). Datos para **21**: 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,16 (s ancho, 1H, CO_2H), 8,27 (d, 1H, $J = 0,9$ Hz, Ar), 8,25-8,22 (m, 2H, Ar), 8,01 (dd, 1H, $J = 1,5, 8,5$ Hz, Ar), 7,89 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, Ar), 7,69-7,62 (m, 3H, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,8, 164,7, 150,0, 145,2, 132,6, 129,4, 128,0, 127,6, 126,3, 126,0, 119,6, 112,0; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $C_{14}H_9NO_3$ (MH^+) 240,0655, encontrado 240,0655.

25 **7-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol (22)**. Se preparó a partir de ácido 3-aminosalicílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **22** en forma de un sólido blanco (8,8 mg, 16%). Datos para **22**: 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,55 (s ancho, CO_2H), 8,10 (AMX, 1H, $J = 1,2, 7,9$ Hz, Ar), 7,97 (AMX, 1H, $J = 1,2, 7,9$ Hz, Ar), 7,80-7,79 (m, 2H, Ar), 7,63 (tt, 1H, $J = 2,4, 9,2$ Hz, Ar), 7,55 (AMX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,5, 162,8 (d, $J = 248$ Hz), 162,6 (d, $J = 248$ Hz), 160,9, 149,2, 142,6, 129,2, 128,0, 125,2, 124,9, 116,1, 110,6 (d, $J = 28$ Hz), 107,7 (q, $J = 25$ Hz); HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $C_{14}H_7F_2NO_3$ (MH^+) 276,0467, encontrado 276,0469.

30 **7-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol (23)**. Se preparó a partir de ácido 3-aminosalicílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **23** en forma de un sólido blanco (7,3 mg, 13%). Datos para **23**: 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,48 (s ancho, 1H, CO_2H), 8,16 (ABX, 1H, $J = 1,2, 8,2$ Hz, Ar), 8,00 (ABX, 1H, $J = 1,2, 7,6$ Hz, Ar), 7,78 (m, 1H, Ar), 7,57 (ABX, 1H, $J = 7,6, 8,2$ Hz, Ar), 7,40 (t, 2H, $J = 8,5$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,5, 160,4 (d, $J = 256$ Hz), 160,3 (d, $J = 257$ Hz), 154,9, 148,9, 142,1, 134,8 (t, $J = 10$ Hz), 128,0, 125,1, 125,0, 116,0, 113,0 (d, $J = 22$ Hz), 112,9 (q, $J = 21$ Hz), 105,1 (t, $J = 17$ Hz); HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $C_{14}H_7F_2NO_3$ (MH^+) 276,0467, encontrado 276,0467.

35 **7-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol (24)**. Se preparó a partir de ácido 3-aminosalicílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **24** en forma de un sólido blanco (7,9 mg, 13%). Datos para **24**: 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,51 (s ancho, CO_2H), 8,48 (ABX, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar), 8,40 (s, 1H, Ar), 8,10 (AMX, 1H, $J = 1,2, 7,9$ Hz, Ar), 8,05 (ABX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 7,96 (AMX, 1H, $J = 1,2, 7,6$ Hz, Ar), 7,94 (ABX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 7,54 (AMX, 1H, $J = 7,9, 7,6$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,6, 161,7, 149,3, 142,7, 131,3, 131,0, 130,0 (q, $J = 32$ Hz), 128,6 (d, $J = 3$ Hz), 127,7, 127,2, 125,0, 124,8, 123,7 (q, $J = 272$ Hz), 123,5, 116,0; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $C_{15}H_8F_3NO_3$ (MH^+) 308,0529, encontrado 308,0532.

40 **7-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol (25)**. Se preparó a partir de ácido 3-aminosalicílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **25** en forma de un sólido blanco (13,8 mg, 22%). Datos para **25**: 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,46 (s ancho, 1H, CO_2H), 8,18 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, Ar), 8,14 (AMX, 1H, $J = 1,2, 7,9$ Hz, Ar), 8,03 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 7,98 (AMX, 1H, $J = 1,2, 7,6$ Hz, Ar), 7,94 (t, 1H, $J = 7,3$ Hz, Ar), 7,89 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, Ar), 7,56 (AMX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,6, 161,1, 149,3, 142,4, 133,0, 132,4, 132,2, 127,8, 127,6, 127,2 (q, $J = 6$ Hz), 125,0, 124,9, 123,4 (q, $J = 273$ Hz), 116,2; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $C_{15}H_8F_3NO_3$ (MH^+) 308,0529, encontrado 308,0534.

45 **7-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol (26)**. Se preparó a partir de ácido 3-aminosalicílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **26** en forma de un sólido blanco (7,0 mg, 11%). Datos para **26**: 1H RMN (600

MHz, DMSO-d₆) δ 14,00-12,80 (s ancho, CO₂H), 8,10-8,08 (m, 3H, Ar), 7,98-7,96 (m, 2H, Ar), 7,55 (t, 1H, J = 7,8 Hz, Ar); ¹³C RMN (150 MHz, DMSO-d₆) δ 164,5, 160,5, 149,2, 142,6, 135,2, 131,5, 129,4, 128,0, 125,6, 125,2, 124,8, 116,2; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para C₁₄H₇Cl₂NO₃ (MH⁺) 307,9876, encontrado 307,9874.

5 **7-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol (27)**. Se preparó a partir de ácido 3-aminosalicílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **27** en forma de un sólido blanco (10,3 mg, 17%). Datos para **27**: ¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,90-13,10 (s ancho, CO₂H), 8,16 (AMX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 8,02 (AMX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 7,78-7,72 (m, 3H, Ar), 7,60 (AMX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar); ¹³C RMN (150 MHz, DMSO-d₆) δ 164,4, 158,3, 149,1, 141,7, 134,9, 134,2, 128,8, 128,2, 126,5, 125,3, 125,2, 116,2; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para C₁₄H₇Cl₂NO₃ (MH⁺) 307,9876, encontrado 307,9875.

10 **7-Carboxi-2-fenil-benzoxazol (28)**. Se preparó a partir de ácido 3-aminosalicílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir **28** en forma de un sólido blanco (13,1 mg, 27%). Datos para **28**: ¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,48 (s ancho, 1H, CO₂H), 8,20-8,19 (m, 2H, Ar), 8,05 (AMX, 1H, J = 1,2, 7,9 Hz, Ar), 7,92 (AMX, 1H, J = 1,2, 7,6 Hz, Ar), 7,66-7,62 (m, 3H, Ar), 7,50 (AMX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar); ¹³C RMN (150 MHz, DMSO-d₆) δ 164,8, 163,1, 149,2, 142,9, 132,2, 129,4, 127,4, 127,2, 126,0, 124,7, 124,4, 115,8; HRMS (MALDI-FTMS) calculado para C₁₄H₉NO₃ (MH⁺) 240,0655, encontrado 240,0656.

REIVINDICACIONES

1. Un método de cribar un compuesto que impide o reduce la disociación de un tetrámero de transtiretina, comprendiendo dicho método:
- poner en contacto un tetrámero de transtiretina con un compuesto candidato; y
- 5 determinar si el compuesto candidato aumenta la energía de activación asociada con la disociación del tetrámero de transtiretina, impidiendo o reduciendo de este modo la disociación del tetrámero de transtiretina.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende determinar si el compuesto impide la disociación del tetrámero de transtiretina desestabilizando el estado de transición de la disociación del tetrámero de transtiretina.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende determinar si el compuesto impide la disociación del tetrámero de transtiretina por estabilización del tetrámero de transtiretina.
- 10 4. El método de la reivindicación 1, que comprende además medir la capacidad del compuesto candidato para inhibir la formación de fibrillas.
5. El método de la reivindicación 1, en donde el tetrámero de transtiretina comprende transtiretina de tipo natural.
6. El método de la reivindicación 1, en donde el tetrámero de transtiretina comprende transtiretina mutante natural.
- 15 7. El método de la reivindicación 1, en donde el tetrámero de transtiretina comprende una transtiretina mutante natural asociada causalmente con la incidencia de polineuropatía amiloide familiar o de cardiomiopatía amiloide familiar.
8. El método de la reivindicación 1, en donde el tetrámero de transtiretina comprende la transtiretina mutante V122I, la transtiretina mutante V30M o la transtiretina mutante L55P.
9. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto candidato es un análogo de diflunisal.
- 20 10. El método de la reivindicación 9, en donde el análogo de diflunisal tiene una actividad de NSAID reducida o ausente o actividad inhibidora de ciclooxigenasa en comparación con el diflunisal.
11. El método de la reivindicación 1, que comprende además determinar si el análogo de diflunisal exhibe actividad de NSAID o el análogo de diflunisal exhibe actividad inhibidora de ciclooxigenasa.
12. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto candidato es un bifenilo policlorado.
- 25 13. El método de la reivindicación 12, en donde el bifenilo policlorado es un bifenilo policlorado hidroxilado.

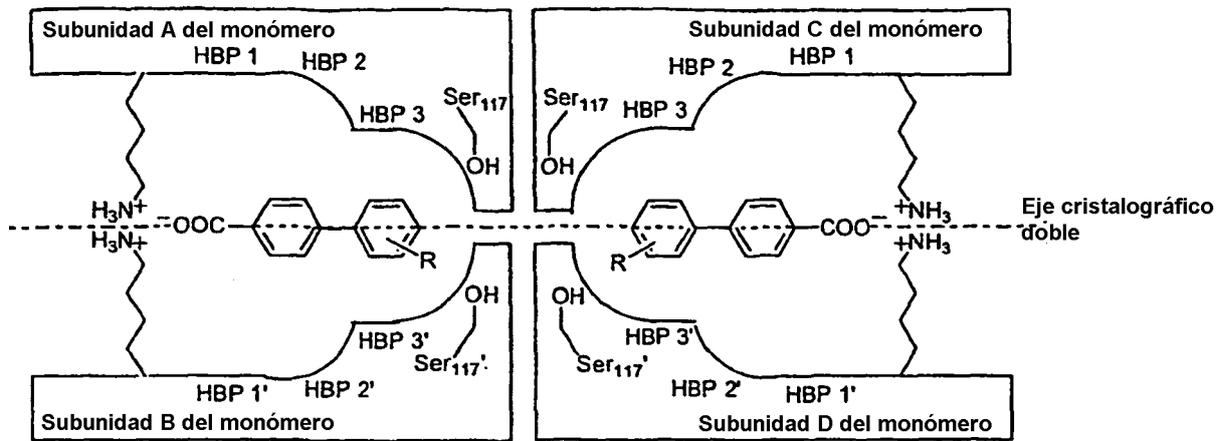


FIG. 1

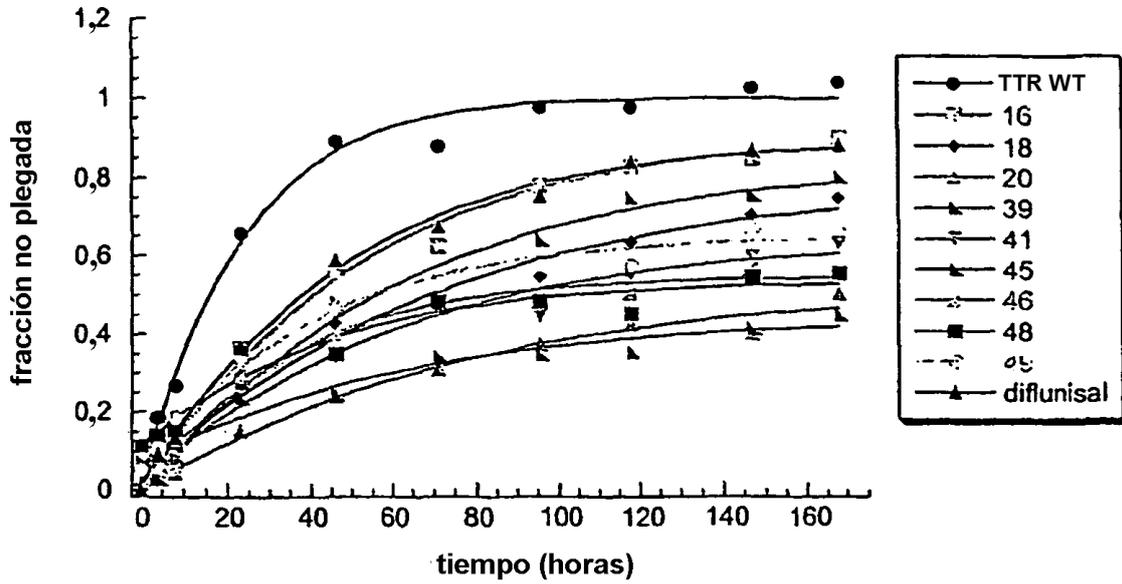


FIG. 2A

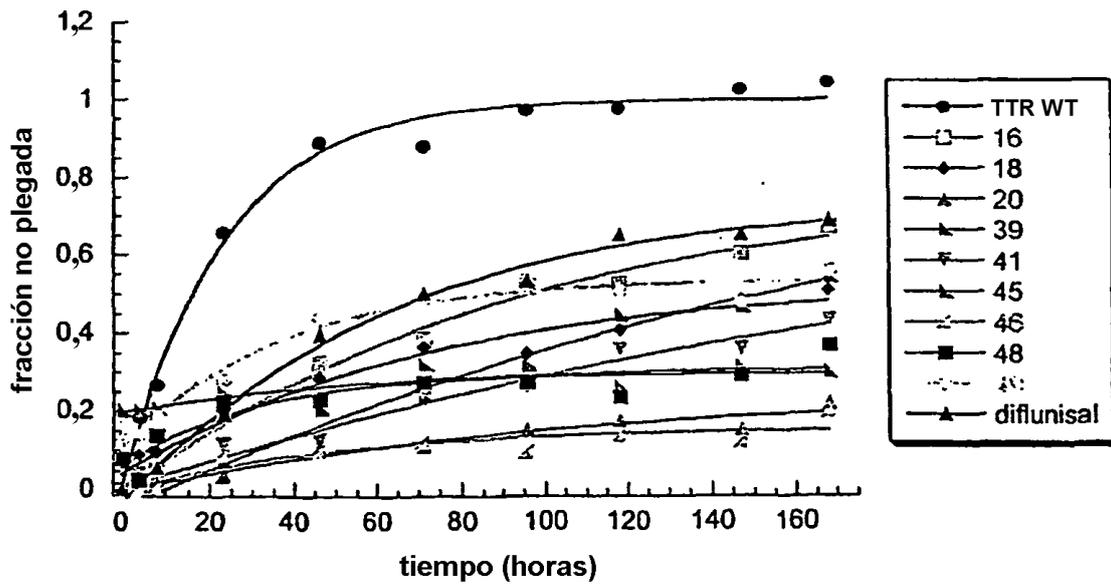


FIG. 2B

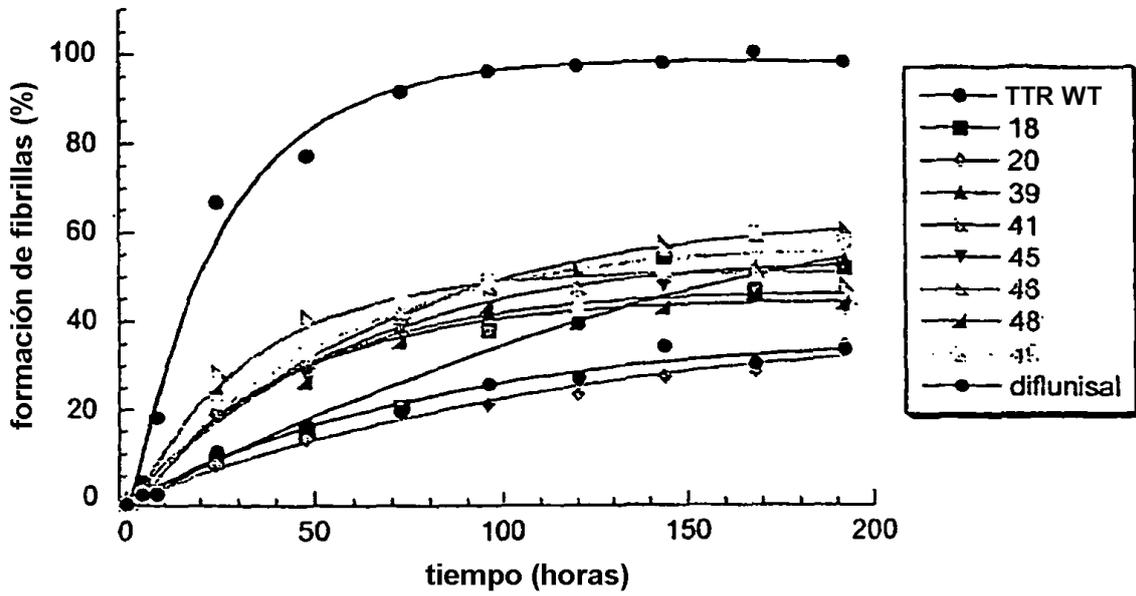


FIG. 3A

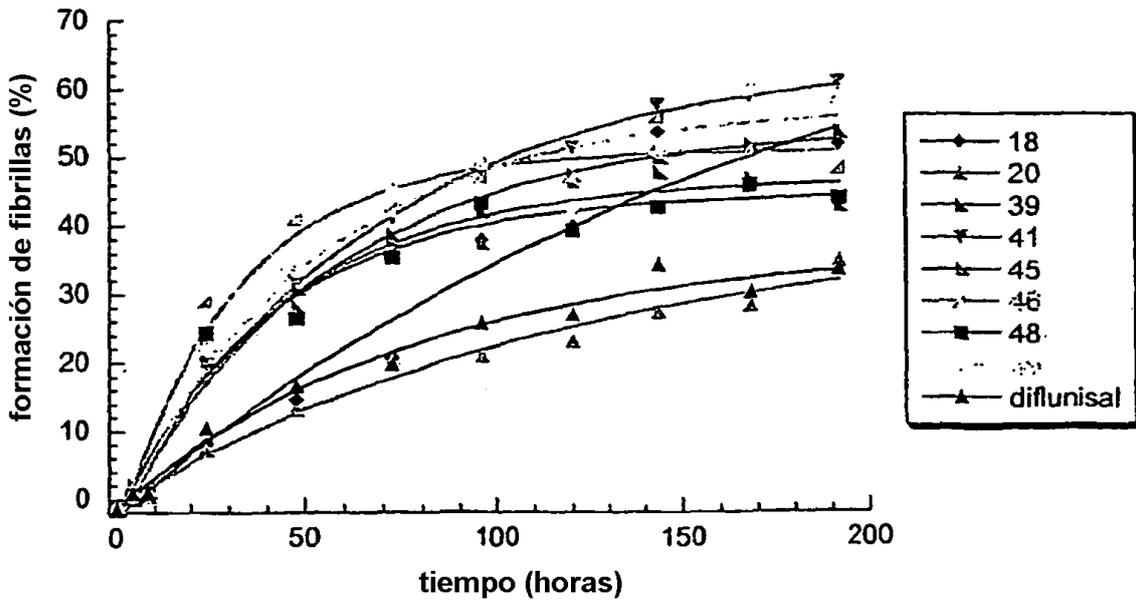


FIG. 3B

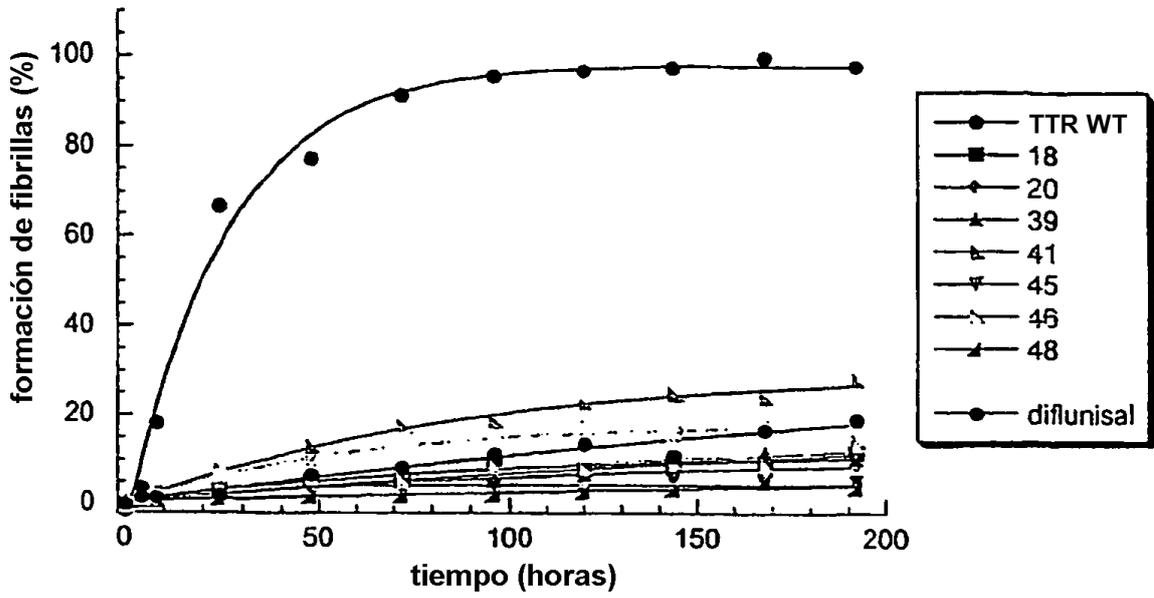


FIG. 4A

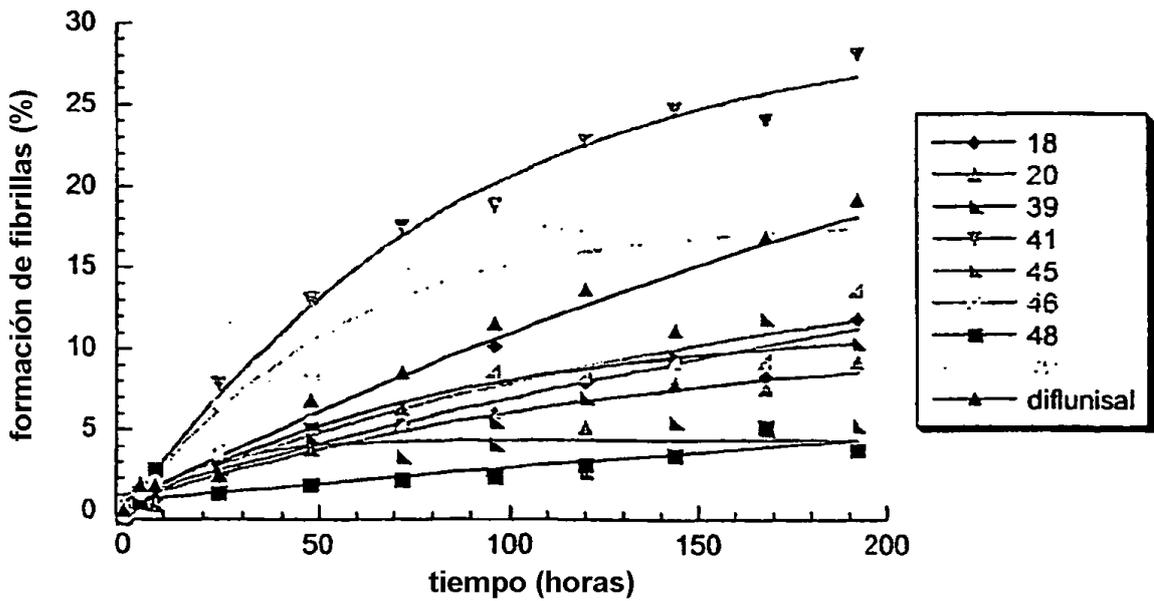


FIG. 4B

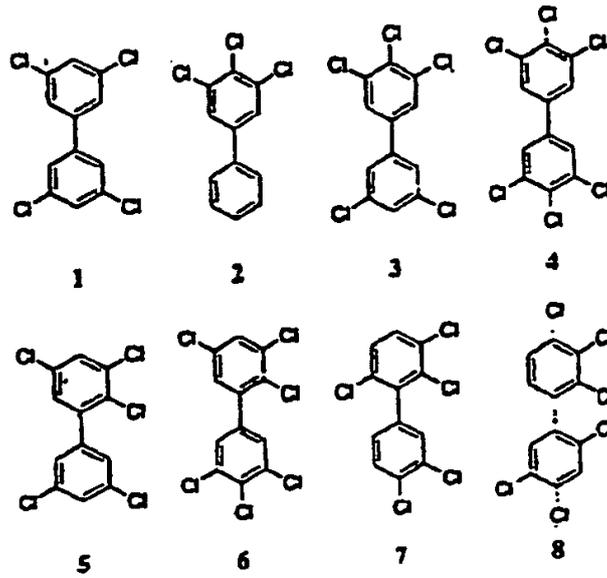


FIG. 5

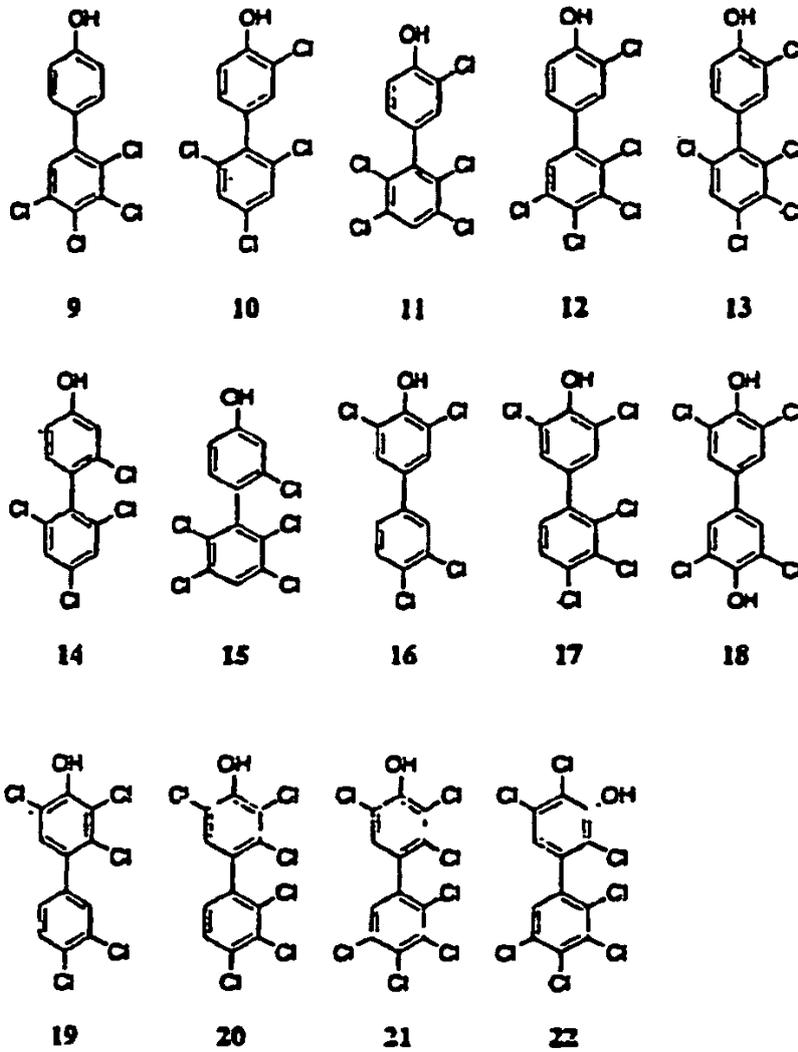


FIG. 6

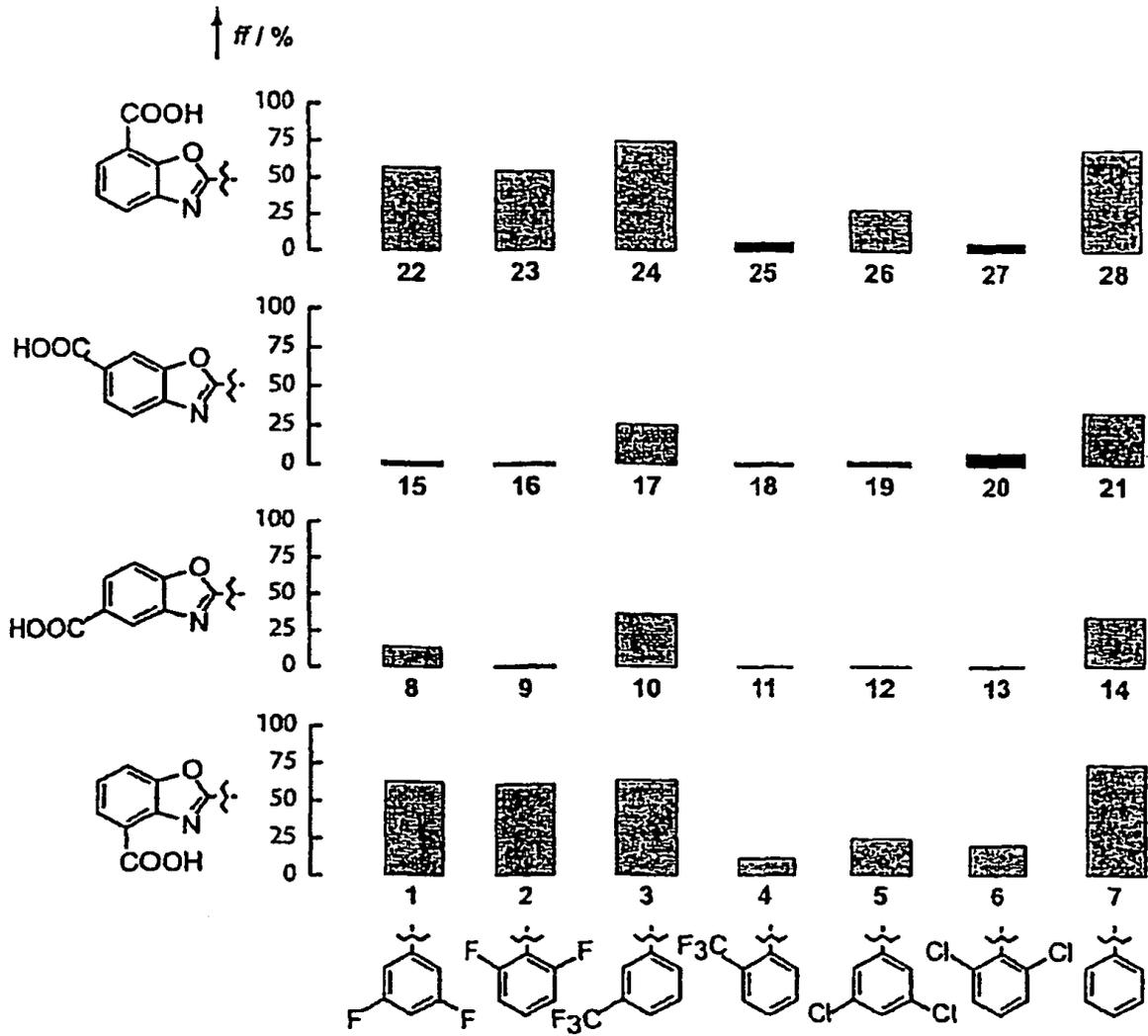


FIG. 7

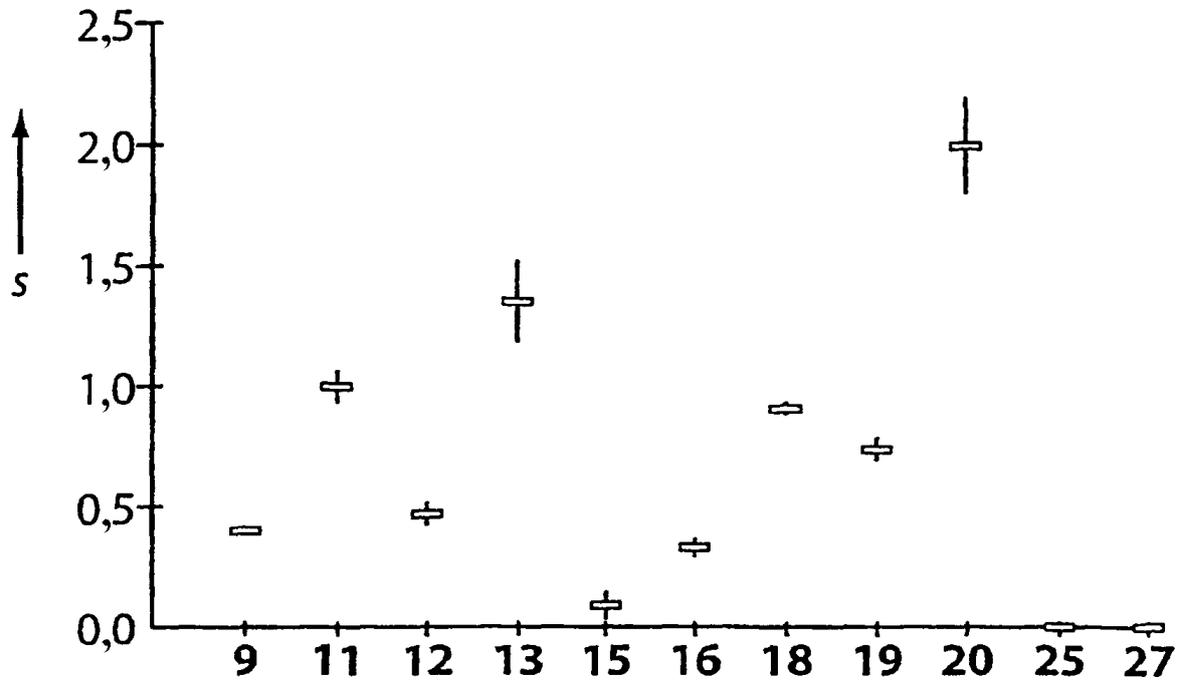


FIG. 8

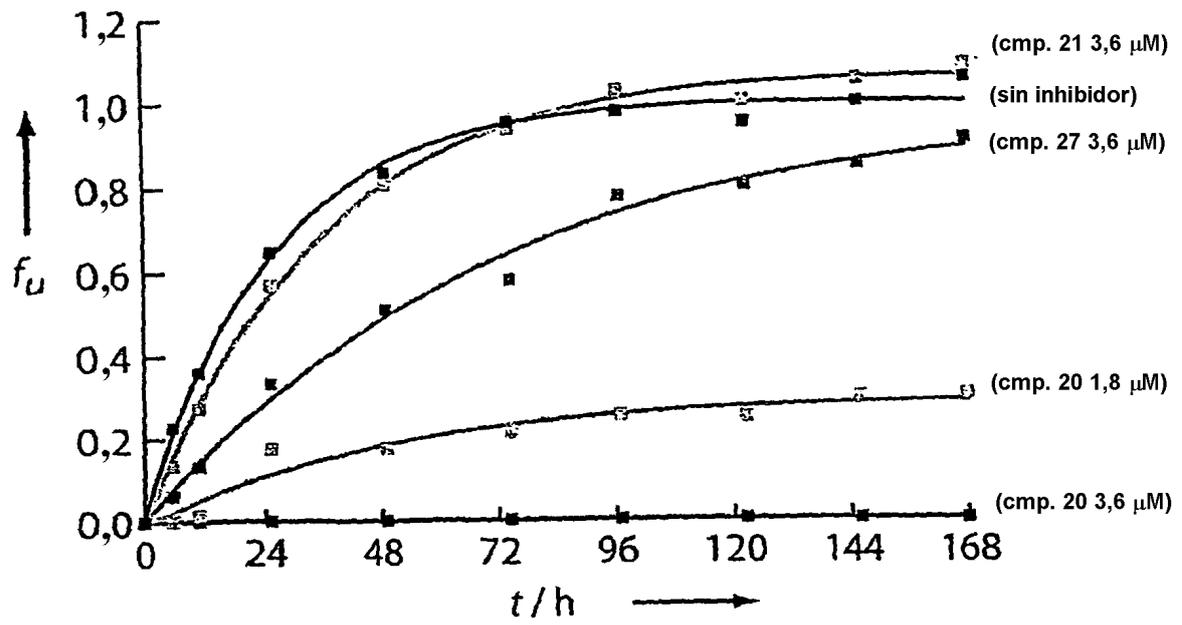


FIG. 9

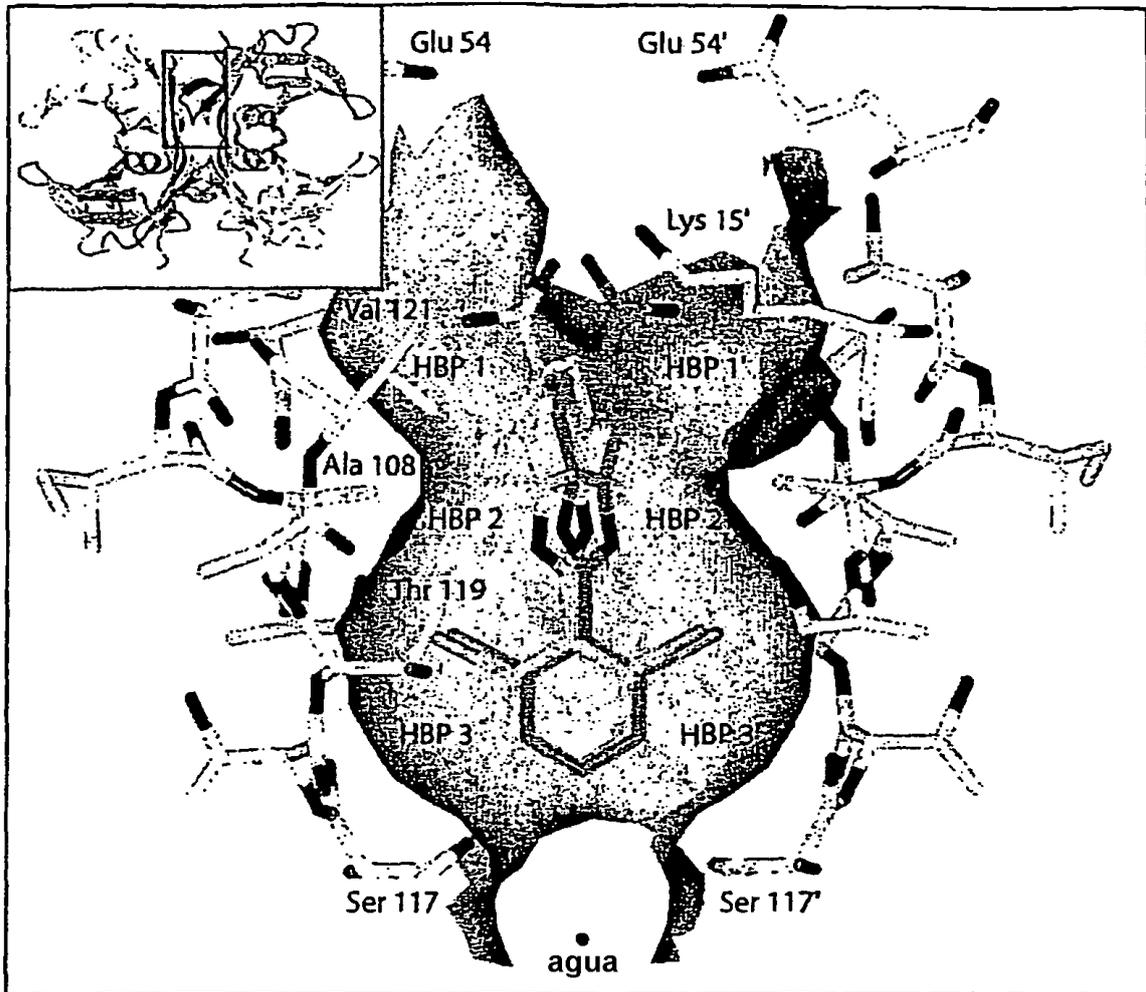


FIG. 10