



No. 13-135212- -00000-0000

Fecha: 2013-06-04 15:55:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 68



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. 13-135212

DERIVADOS DE DIFENILAMINA USOS. PROCEDIMIENTO DE SINTESIS

54. TITULO COMPOSICIONES FARMACEUTICAS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE FAES FARMA, S.A

DOMICILIO LEJUNA VIZCAYA, ESPAÑA

74. APODERADO ALF. PABLO CADENA SARMIENTO

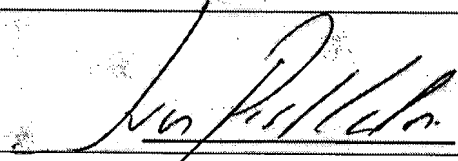
22. BOGOTÁ, D.C. _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-135212- -00000-0000 Fecha: 2013-06-04 15:55:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 68 Radicación
---	--

AS. 124.834

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/EP2011/070620	Fecha 22.11.2011
Publicación Internacional No.		WO 2012/069442	Fecha 31.05.2012
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
DERIVADOS DE DIFENILAMINA: USOS, PROCEDIMIENTO DE SÍNTESIS Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
1. FAES FARMA, S.A.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako	No. TELÉFONO
CIUDAD		Lejona	CORREO ELECTRÓNICO
DEPARTAMENTO/ESTADO		Vizcaya	NACIONALIDAD O
PAÍS DE RESIDENCIA		ES	LUGAR DE CONSTITUCIÓN
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. RODES SOLANES		Rosa	ES
2. GARCÍA DOMÍNGUEZ		Neftali	ES
3. LÓPEZ ORTEGA		Beatriz	ES
4. ÁLVAREZ DE MON SOTO		Melchor	ES
5. DE LA HERA MARTÍNEZ		Antonio	ES
6. MUÑOZ MUÑOZ		Ana	ES
7. LEDO GÓMEZ		Francisco	ES
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. ES	Vizcaya	Lejona	Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako
2. ES	Vizcaya	Lejona	Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako
3. ES	Vizcaya	Lejona	Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako
4. ES	Vizcaya	Lejona	Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako
5. ES	Vizcaya	Lejona	Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako
6. ES	Vizcaya	Lejona	Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako
7. ES	Vizcaya	Lejona	Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de información complementaria.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
CADENA SARMIENTO		JUAN PABLO	C.C. 80.410.337 T.P. 57492
DIRECCIÓN		Calle 70A 4 41	No. TELÉFONO 7442200
CIUDAD		Bogotá, D.C.	CORREO ELECTRÓNICO
PAÍS		CO	No. RADICACIÓN O PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
1. EP		EP	10382314.2
2.			(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
			2010/11/23

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. 13-41750, 13-46922	Fecha: 27.05.2013
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 4-50		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 15		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 59-65		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar:	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(10) International Publication Number
WO 2012/069442 A1

(43) International Publication Date
31 May 2012 (31.05.2012)

(51) International Patent Classification:

A61K 31/137 (2006.01) C07C 211/29 (2006.01)
A61K 31/341 (2006.01) C07C 217/58 (2006.01)
A61K 31/381 (2006.01) C07C 255/58 (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01) C07D 233/58 (2006.01)
A61K 31/4402 (2006.01) C07D 235/08 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) C07D 473/16 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01) C07D 473/34 (2006.01)
C07C 211/27 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2011/070620

(22) International Filing Date:

22 November 2011 (22.11.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

10382314.2 23 November 2010 (23.11.2010) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): **FAES FARMA, S.A.** [ES/ES]; Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako (Lejona) - Vizcaya (ES).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **RODES SOLANES, Rosa** [ES/ES]; Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako (Lejona) - Vizcaya (ES). **GARCÍA DOMÍNGUEZ, Neftalí** [ES/ES]; Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako (Lejona) - Vizcaya (ES). **LÓPEZ ORTEGA, Beatriz** [ES/ES]; Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako (Lejona) - Vizcaya (ES). **ÁLVAREZ DE MON SOTO, Melchor** [ES/ES]; Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako (Lejona) - Vizcaya (ES). **DE LA HERA MARTÍNEZ, Antonio** [ES/ES]; Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako (Lejona) - Vizcaya (ES).

imo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako (Lejona) - Vizcaya (ES). **MUÑOZ MUÑOZ, Ana** [ES/ES]; Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako (Lejona) - Vizcaya (ES). **LEDO GÓMEZ, Francisco** [ES/ES]; Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako (Lejona) - Vizcaya (ES).

(74) Agent: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L., Avenida de Burgos, nº16, Edificio Euromor, E-280036 Madrid (ES).

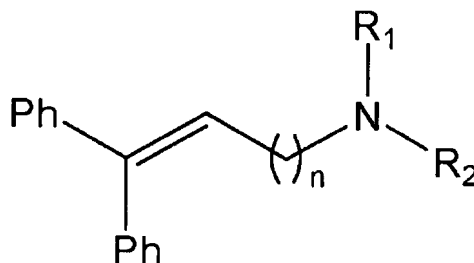
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: DIPHENYL-AMINE DERIVATIVES: USES, PROCESS OF SYNTHESIS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS



(I)

(57) Abstract: The invention relates to compounds of formula (I); or a pharmaceutically acceptable salt, prodrug or solvate thereof, a method of synthesis of said compounds, pharmaceutical compositions comprising them and their use as a medicament for treating inflammatory diseases.

WO 2012/069442 A1

DERIVADOS DE DIFENILAMINA: USOS, PROCEDIMIENTO DE SÍNTESIS Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a derivados de difenilo, a un método de síntesis, a composiciones que los comprenden y a su uso en la preparación de un medicamento para terapia inmunomoduladora (por ejemplo, enfermedades inmunitarias o ciertos tipos de cáncer).

ESTADO DE LA TÉCNICA

La inflamación es una reacción compleja del sistema inmunitario innato en los tejidos vascularizados, que consiste en la acumulación y la activación de leucocitos y de proteínas plasmáticas en un sitio de infección, exposición a toxinas o lesión celular.

La inflamación se inicia por cambios en los vasos sanguíneos, que promueven el reclutamiento de leucocitos.

Las respuestas inmunitarias adaptativas locales pueden estimular la inflamación. Aunque ésta tiene una función protectora en el control de las infecciones y la potenciación de la reparación tisular, también puede causar lesión tisular y enfermedad.

La llamada inflamación inmunitaria es consecuencia de una respuesta de inmunidad adaptativa al antígeno. El infiltrado celular en el sitio de la inflamación puede contener células del sistema de inmunidad innata, como neutrófilos y macrófagos, que son reclutados a consecuencia de las acciones de las citoquinas producidas por las células T.

Las citoquinas son una familia de proteínas que median muchas de las respuestas de la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Las mismas citoquinas pueden ser producidas por muchos tipos celulares, y una misma citoquina a menudo actúa sobre distintos tipos celulares.

Las citoquinas se sintetizan como respuesta a estímulos inflamatorios o antigénicos y suelen actuar localmente, de forma autocrina o paracrina, uniéndose a receptores de alta afinidad presentes en las células diana. Ciertas citoquinas pueden producirse en cantidad suficiente para que circulen y ejerzan acciones endocrinas. Además, las citoquinas actúan como factores de crecimiento para muchos tipos celulares.

Las citoquinas median sus acciones mediante una unión de alta afinidad a receptores que pertenecen a un número limitado de familias estructurales. Diversas citoquinas utilizan vías de señalización especializadas, como la vía de JAK/STAT.

Las citoquinas que median la inmunidad innata son producidas principalmente por macrófagos activados e incluyen: el TNF y la IL-1, como mediadores de las reacciones inflamatorias agudas frente a los microorganismos; las quimioquinas, como reclutadoras de leucocitos en los focos de inflamación; la IL-12, como estimulante de la producción de la citoquina activadora de los macrófagos (IFN-gamma); los interferones tipo I, como citoquinas antivirales, y la IL-10, como inhibidora de macrófagos.

Las citoquinas que median y regulan las fases de activación y efectora de la inmunidad adaptativa son producidas principalmente por linfocitos T estimulados por el antígeno, e incluyen: la IL-2, como principal factor de crecimiento de las células T; la IL-4, como estimulante de la síntesis de IgE y el desarrollo de las células Th2 a partir de células T colaboradoras vírgenes; la IL-5, como activadora de los eosinófilos; el IFN gamma como activador de los macrófagos, y el TGF-beta, como inhibidor de la proliferación de los linfocitos T y la activación de los leucocitos.

Las células T colaboradoras CD4⁺ pueden diferenciarse en células efectoras especializadas Th1, que secretan IFN-gamma, el cual favorece la inmunidad mediada por fagocitos, o en células Th2, que secretan IL-4 e IL-5, las cuales favorecen la inmunidad mediada por IgE, eosinófilos y mastocitos.

En resumen, las citoquinas realizan muchas funciones que son críticas para la defensa del huésped frente a patógenos y proporcionan un nexo de unión entre la inmunidad innata y la adaptativa. Las citoquinas también regulan la magnitud y la naturaleza de las respuestas inmunitarias, influyendo en el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos. Finalmente, las citoquinas proporcionan importantes mecanismos de amplificación que permiten que un pequeño número de linfocitos específicos para un antígeno cualquiera, active diversos mecanismos efectores para eliminar el antígeno. Un exceso en la producción o acción de las citoquinas puede tener consecuencias patológicas.

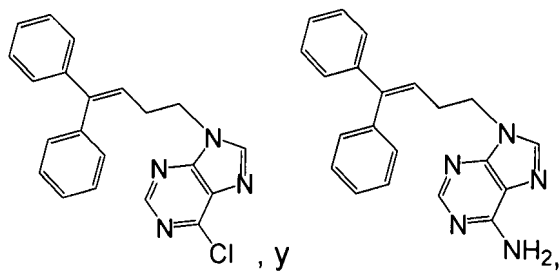
La administración de citoquinas, receptores solubles o inhibidores de citoquinas se ha convertido, en el momento presente, en un novedoso y eficaz enfoque para modificar las respuestas biológicas asociadas a las enfermedades inmunitarias e inflamatorias, tanto agudas como crónicas, y también para el

tratamiento de muchos tipos de cáncer. La posibilidad de tratar a los pacientes con cáncer mediante estrategias inmunitarias ha supuesto una gran esperanza para los inmunólogos y los biólogos del cáncer. La principal razón de este interés radica en el hecho de que las terapias actuales contra el cáncer dependen de fármacos que destruyen las células en división o bloquean la división celular, y estos tratamientos tienen graves efectos sobre las células normales en proliferación de los pacientes con cáncer. Como consecuencia de ello, el tratamiento del cáncer causa una importante morbilidad. Al contrario que estos tratamientos, la terapia inmunomoduladora tienen el potencial de ser el tratamiento con mayor especificidad y menor toxicidad que pueda imaginarse.

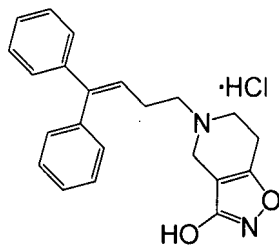
Sin embargo, la práctica totalidad de estas nuevas herramientas terapéuticas son de origen biológico y altamente específicas para una sola citoquina. Ello conlleva una serie de riesgos de tolerancia y generación de reacciones inmunitarias y de inducción de reacciones que implican un grave desequilibrio en el complejo sistema inmunitario.

La serie de compuestos presentada en esta invención presentan la particularidad, además de tratarse de pequeñas moléculas y no de compuestos biológicos, de actuar claramente sobre más de una citoquina relacionada pero no sobre otras, comportándose potencialmente como moduladores más que como inhibidores estrictos, sin modificar la viabilidad celular y la fisiología celular normal, pero con capacidad para favorecer la vuelta a la normalidad de los propios mecanismos inmunológicos del huésped que sufre una enfermedad inflamatoria aguda o crónica, o incluso algunos tipos de cáncer.

Eur. J. Med. Chem. 2008, 43, 2404 da a conocer bencil-(4,4-difenil-but-3-enil)-amina, 2-[(4,4-difenil-but-3-enilamino)-metil]-fenol, 3-[(4,4-difenil-but-3-enilamino)-metil]-fenol, 5-[(4,4-difenil-but-3-enilamino)-metil]-2-metoxifenol y 4-[(4,4-difenil-but-3-enilamino)-metil]-2,6-difluorofenol como inhibidores de los transportadores de GABA murinos. *Eur. J. Med. Chem.* 1993, 28, 555, 727 y 783 da a conocer bencil-(4,4-difenil-but-3-enil)-amina y vasodilatación como supuesta aplicación terapéutica de dicho compuesto. *Org. Lett.* 1999, 1, 849 da a conocer bencil-(5,5-difenil-pent-4-enil)-etilamina pero no se notifica ninguna actividad biológica del compuesto. El documento US 5.795.756 describe 6-cloro-9-(4,4-difenil-but-3-enil)-9H-purina y 9-(4,4-difenil-but-3-enil)-9H-purin-6-ilamina, es decir



como inhibidores de la adenilciclasa. También, Falch, E. *et al* en Drug Dev. Res., 1990, 21, 169-188, describe 5-(4,4-difenil-but-3-enil)-4,5,6,7-tetrahidroisoxazol[4,5-c]piridin-3-ol

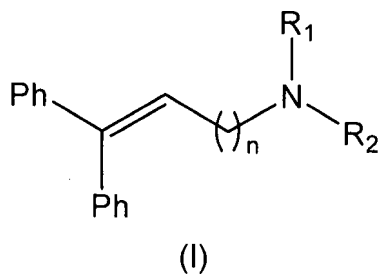


como inhibidor de la capacitación de GABA.

SUMARIO DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que los compuestos de fórmula (I) muestran una actividad interesante para la terapia inmunomoduladora.

Por tanto, según un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato del mismo:



en la que:

Ph es fenilo;

n es 2, 3 ó 4;

R₁ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆;

R₂ es un radical de fórmula -[[CH(R₃)]_m-R₄], en la que

m es 1;

R₃, cuando sea apropiado, se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, fenilo y alquilo C₁-C₆;

R₄ se selecciona del grupo que consiste en un radical heteroarilo no sustituido, un radical heteroarilo sustituido y un radical arilo sustituido,

seleccionándose dichos sustituyentes del grupo que consiste en alquilo C_1 - C_6 , arilalquilo C_7 - C_{11} , fenilo, heteroarilo de 5 ó 6 miembros, F, Cl, Br, I, trifluorometilo, ciano, $-N(R_a)(R_b)$, $-OR_c$, $-SR_d$ o $-C(O)R_e$; en los que R_a , R_b , R_c , R_d y R_e se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C_1 - C_6 , fenilo y trifluorometilo;

o

si R_1 y/o R_3 son distintos de hidrógeno, entonces R_4 también puede ser fenilo no sustituido;

o

R_1 y R_2 , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un grupo heteroarilo sustituido o no sustituido, en el que dichos sustituyentes son tal como se definieron anteriormente;

con la condición de que:

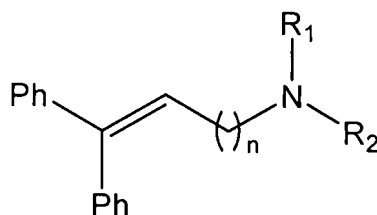
2-[(4,4-difenil-but-3-enilamino)-metil]-fenol,
 3-[(4,4-difenil-but-3-enilamino)-metil]-fenol,
 5-[(4,4-difenil-but-3-enilamino)-metil]-2-metoxifenol,
 4-[(4,4-difenil-but-3-enilamino)-metil]-2,6-difluorofenol,
 bencil-(5,5-difenil-pent-4-enil)-etilamina,
 6-cloro-9-(4,4-difenil-but-3-enil)-9H-purina,
 9-(4,4-difenil-but-3-enil)-9H-purin-6-ilamina, y
 5-(4,4-difenil-but-3-enil)-4,5,6,7-tetrahidroisoxazol[4,5-c]piridin-3-ol

no estén incluidos en la fórmula (I).

Según un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como medicamento.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a los compuestos de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos,



(I)

en la que:

Ph es fenilo;

n es 2, 3 ó 4;

R₁ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆;

R₂ es un radical de fórmula $-[[CH(R_3)]_m-R_4]$, en la que

m es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 0 ó 2;

cada R₃, cuando sea apropiado, se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆;

R₄ se selecciona del grupo que consiste en un radical heteroarilo no sustituido, un radical heteroarilo sustituido, radical arilo no sustituido y un radical arilo sustituido,

seleccionándose dichos sustituyentes del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆, arilalquilo C₇-C₁₁, fenilo, heteroarilo de 5 ó 6 miembros, F, Cl, Br, I, trifluorometilo, ciano, -N(R_a)(R_b), -OR_c, -SR_d o -C(O)R_e; en los que R_a, R_b, R_c, R_d y R_e se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₆, fenilo y trifluorometilo;

o

R₁ y R₂, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un grupo heteroarilo sustituido o no sustituido, en el que dichos sustituyentes son tal como se definieron anteriormente;

para su uso como medicamento para tratar enfermedades inflamatorias.

Según un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de tratamiento de enfermedades inflamatorias, comprendiendo dicho método administrar a un paciente que necesita un tratamiento de este tipo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de fórmula (I) tal como se describió anteriormente, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Según un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para la síntesis de los compuestos de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: inhibición de la leucemia linfocítica crónica (LLC) del compuesto 3 en un modelo animal de xenoinjerto en comparación con un grupo control tratado con vehículo.

Figura 2: inhibición del mieloma múltiple (MM) del compuesto 3 en un modelo animal de xenoinjerto en comparación con un grupo control tratado con vehículo.

Figura 3: viabilidad de células de pacientes con leucemia linfocítica crónica.

Figura 4: inhibición del cáncer de colon del compuesto 3 en un modelo animal de xenoinjerto. A: fotografías que muestran el efecto del compuesto 3, 5-F uracilo (5-FU) y Oxaliplatino (OXA) en la reducción del volumen del tumor en comparación con un grupo control tratado con vehículo. B: gráfica que muestra el peso del tumor de cáncer colorectal humano en ratones tratados con compuesto 3, Oxaliplatino (OXA), 5-F uracilo (5-FU) y combinaciones de los mismos.

Figura 5: inhibición de melanoma del compuesto 3 en un modelo animal de xenoinjerto en comparación con un grupo control tratado con vehículo. A: imagen PET de la actividad in vivo de luciferasa en tumor de melanoma. B: tumores de melanoma ex vivo de animales al final del tratamiento. C: peso del tumor melanoma después del tratamiento control o con el compuesto 3 (n=4).

Figura 6: inhibición del cáncer de ovario del compuesto 3 en un modelo animal de xenoinjerto en comparación con un grupo control tratado con vehículo. A: imagen PET de la actividad in vivo de luciferasa en tumor. B: cuantificación de la señal de luciferasa en animales tratados con control y con compuesto 3.

Figura 7: células EHEB (leucemia linfocítica crónica de células B) tratadas con compuesto 3 (10 μ M). A: histogramas que muestran la inducción de apoptosis del compuesto 3 en células EHEB. B: expresión de diferentes proteínas en células EHEB tratadas con compuesto 3.

Figura 8: células HCT-116 (carcinoma de colon) tratadas con compuesto 3 (10 μ M). A: histogramas que muestran la inducción de apoptosis del compuesto 3 en la línea celular de cáncer de colon humana HCT-116. B: expresión de diferentes proteínas relacionadas con apoptosis durante el tratamiento con compuesto 3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En el contexto de la presente invención, los siguientes términos tienen el significado detallado a continuación:

La expresión "alquilo C₁-C₆" se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturación, que tiene entre 1 y 6, preferiblemente entre 1 y 3 ("alquilo C₁-C₃"), átomos de carbono y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, incluyendo por ejemplo y en un sentido no limitativo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, etc.

El término "arilo" se refiere a un grupo aromático que tiene, a menos que se proporcione otra cosa, entre 6 y 18, preferiblemente entre 6 y 10, incluso más preferiblemente 6 ó 10 átomos de carbono, que comprende 1, 2 ó 3 núcleos aromáticos, unidos por medio de un enlace carbono-carbono o condensados, incluyendo por ejemplo y en un sentido no limitativo, fenilo, naftilo, difenilo, indenilo, fenantrilo, etc. Preferiblemente "arilo" se refiere a fenilo.

"Heteroarilo" se refiere a un radical de anillo aromático de 3 a 10 miembros estable, preferiblemente un anillo aromático de 5 ó 6 miembros, que consiste en átomos de carbono y desde uno hasta cinco heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. Para los fines de esta invención, el heteroarilo puede ser un sistema de anillos monocíclico, bicíclico o tricíclico, que puede incluir sistemas de anillos condensados, siendo cada uno de ellos un radical de anillo aromático de 3 a 10 miembros, preferiblemente un anillo aromático de 5 ó 6 miembros, que consiste en átomos de carbono y desde uno hasta cinco heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. Los átomos de nitrógeno, carbono o azufre en el radical heteroarilo pueden estar opcionalmente oxidados; y el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Los ejemplos de tal heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, bencimidazol, benzotiazol, furano, pirrol, tiofeno, piridina, pirimidina, isotiazol, imidazol, indol, purina, quinolina, tiadiazol. Preferiblemente, "heteroarilo" se refiere a furano, tiofeno, piridina y bencimidazol.

"Aralquilo" se refiere a un grupo arilo unido al resto de la molécula mediante un grupo alquilo tal como bencilo y fenetilo.

El término "halógeno" se refiere a bromo, cloro, yodo o flúor.

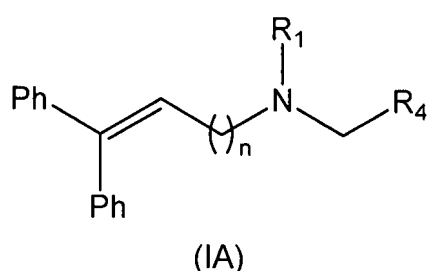
Compuestos de fórmula (I)

Según una realización preferida, "sustituido" se refiere a un radical seleccionado del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆, arilalquilo C₇-C₁₁, fenilo, heteroarilo de 5 ó 6 miembros, F, Br, I, trifluorometilo, ciano, -N(R_a)(R_b), -OR_c, -SR_d o -C(O)R_e; en los que R_a, R_b, R_d y R_e se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₆, fenilo y trifluorometilo; y R_c se selecciona del grupo que

consiste en alquilo C_1 - C_6 , fenilo y trifluorometilo, siempre que $-N(R_a)(R_b)$ no sea $-NH_2$. Los radicales sustituidos, por ejemplo arilo o heteroarilo, pueden estar por tanto en cualquiera de sus posiciones libres. En una realización de la invención, los radicales sustituidos están sustituidos en 1, 2, 3 ó 4 de sus posiciones, preferiblemente en 1 ó 2.

Según una realización de la invención los sustituyentes se seleccionan del grupo que consiste en metilo, isopropilo, fenilmetilo, fenilo, tiofeno, piridina, F, Br, I, trifluorometilo, ciano, amino, metoxilo, trifluorometoxilo y tiometoxilo.

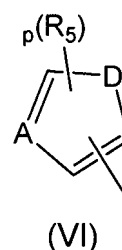
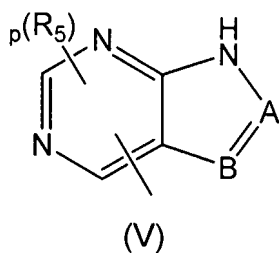
Una realización de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (IA), o una sal, profármaco o solvato del mismo,



en la que Ph, n, R_1 y R_4 son tal como se definieron anteriormente.

Según una realización de la invención, R_4 es un heteroarilo seleccionado del grupo que consiste en tienilo, furilo, piridilo, 1H-bencimidazol, 9H-purina, 1H-imidazol y 1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina, en los que cada grupo puede estar sustituido tal como se definió anteriormente.

Una realización adicional de la invención es un compuesto de fórmula (I) o (IA) o las sales, profármacos o solvatos del mismo, en la que R_4 es un grupo de fórmula (V) o (VI)



en las que,

A y B se seleccionan independientemente de $-CH-$ y $-N-$;

D se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-O-$, $-S-$ y $-NH-$;

p es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 0, 1, 2 ó 3;

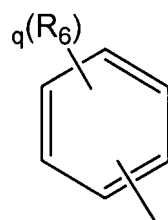
cada R_5 se selecciona del grupo que consiste en alquilo C_1 - C_3 , fenilo, fenilmetilo, heteroarilo de 5 ó 6 miembros, F, Cl, Br, I, trifluorometilo, $-N(R_a)(R_b)$, $-SR_d$ o $-C(O)R_e$; en los que R_a , R_b , R_d y R_e se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C_1 - C_3 , fenilo y trifluorometilo, siempre que en un compuesto de

fórmula (V) $-N(R_a)(R_b)$ no sea $-NH_2$;

estando dicho grupo de fórmula (V) o (VI) unido al resto de la molécula a través de cualquiera de las posiciones libres.

Según una realización de la invención, cada R_5 , si hay alguno, se selecciona independientemente del grupo que consiste en metilo, isopropilo, fenilmetilo, fenilo, tiofeno, piridina, F, Cl, Br, I, trifluorometilo, ciano, amino, metoxilo, trifluorometoxilo y tiometoxilo. Según una realización adicional, p es 1 ó 2.

Según una realización de la invención R_4 es un grupo de fórmula (VII)



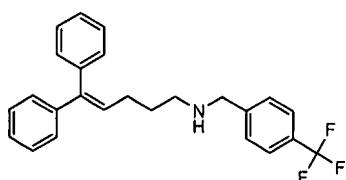
(VII)

en la que R_6 se selecciona del grupo que consiste en $-OCF_3$, O-alquilo $C_1.C_3$, F, Cl, Br, I y $-CN$; y q es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 0, 1, 2 ó 3, y dicho grupo de fórmula (VII) está unido al resto de la molécula a través de cualquiera de las posiciones libres.

Según una realización de la invención, R_1 y R_2 , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un radical seleccionado del grupo que consiste en 1H-bencimidazol, 9H-purina, 1H-imidazol y 1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina.

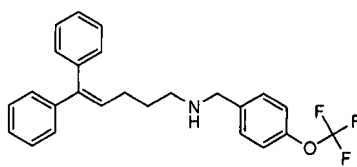
Según una realización de la invención R_1 es hidrógeno o metilo.

En una realización de la invención, el compuesto de fórmula (I) se selecciona del grupo que consiste en:



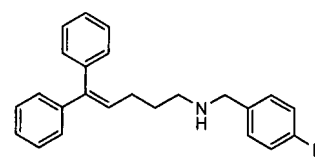
Compuesto 1

(sal de clorhidrato)



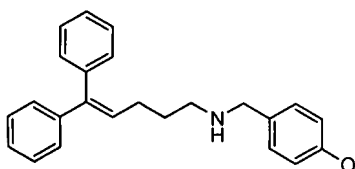
Compuesto 2

(sal de clorhidrato)



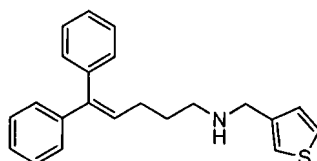
Compuesto 3

(sal de clorhidrato)

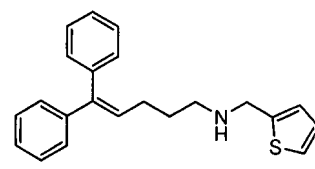


Compuesto 4

(sal de clorhidrato)



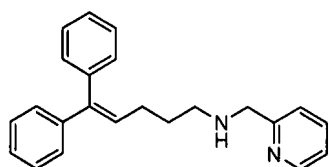
Compuesto 5



Compuesto 6

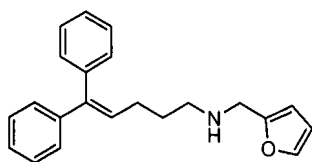
(sal de clorhidrato)

(sal de clorhidrato)



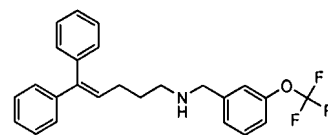
Compuesto 7

(sal de clorhidrato)



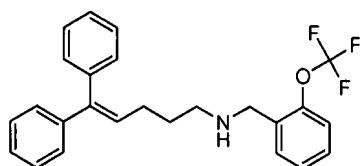
Compuesto 8

(sal de clorhidrato)



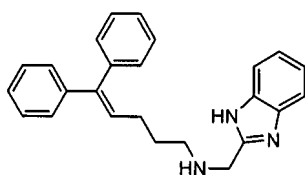
Compuesto 9

(sal de clorhidrato)



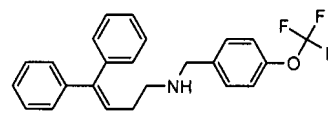
Compuesto 10

(sal de clorhidrato)



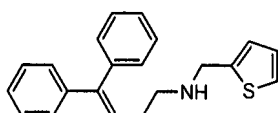
Compuesto 11

(sal de clorhidrato)



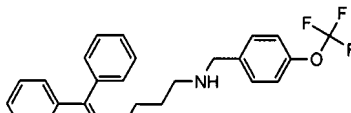
Compuesto 12

(sal de clorhidrato)



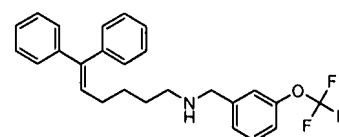
Compuesto 13

(sal de clorhidrato)



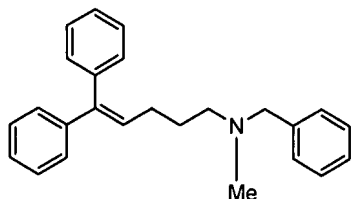
Compuesto 14

(sal de clorhidrato)



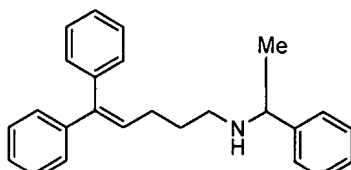
Compuesto 15

(sal de clorhidrato)



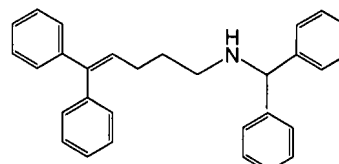
Compuesto 16

(sal de clorhidrato)



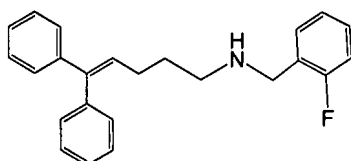
Compuesto 17

(sal de clorhidrato)



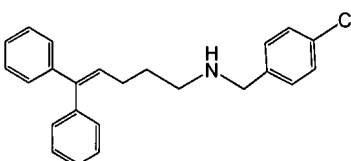
Compuesto 18

(sal de clorhidrato)



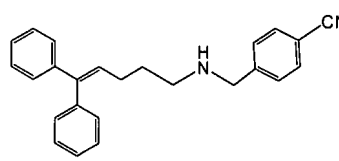
Compuesto 19

(sal de clorhidrato)



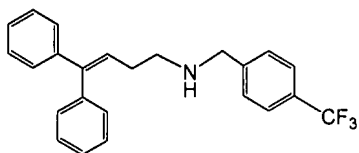
Compuesto 20

(sal de clorhidrato)



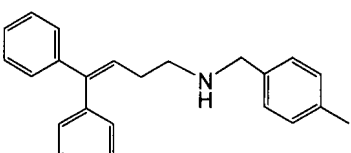
Compuesto 21

(sal de clorhidrato)



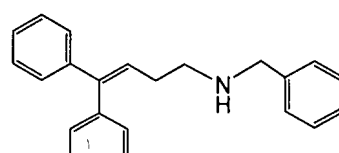
Compuesto 22

(sal de clorhidrato)



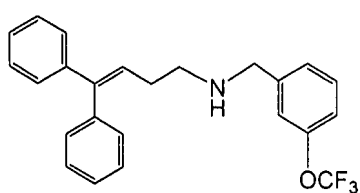
Compuesto 23

(sal de clorhidrato)

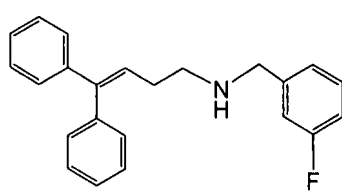


Compuesto 24

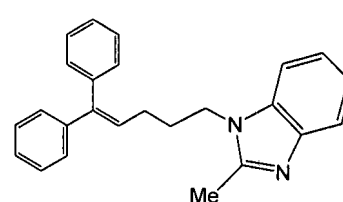
(sal de clorhidrato)



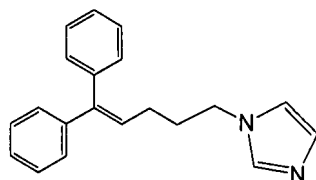
Compuesto 25
(sal de clorhidrato)



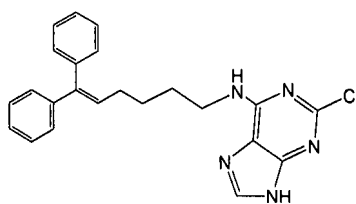
Compuesto 26
(sal de clorhidrato)



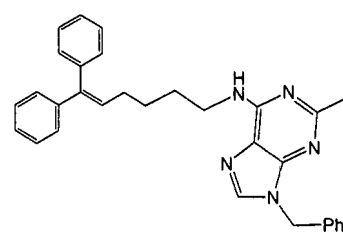
Compuesto 27



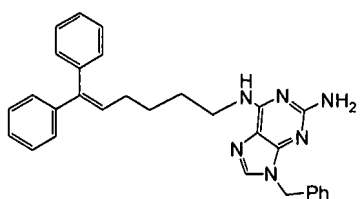
Compuesto 28



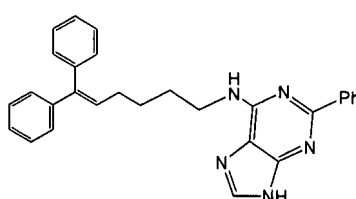
Compuesto 29



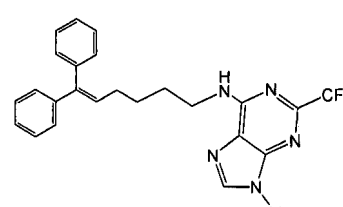
Compuesto 30
(sal de clorhidrato)



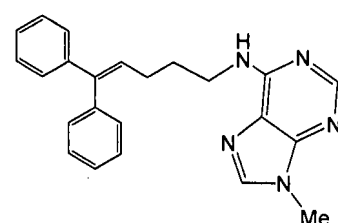
Compuesto 31



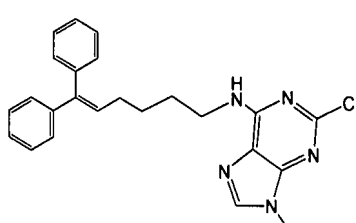
Compuesto 32



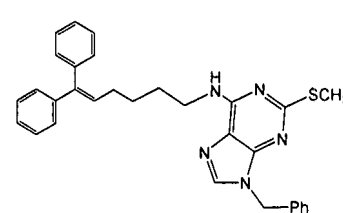
Compuesto 33



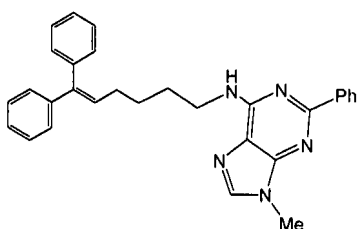
Compuesto 34



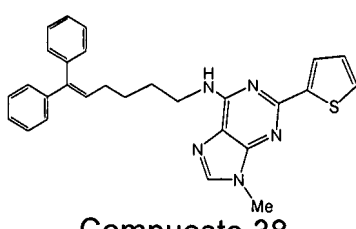
Compuesto 35



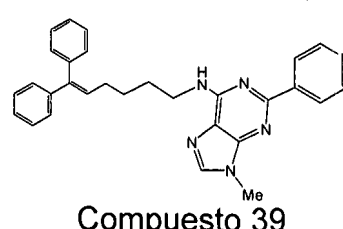
Compuesto 36
(sal de clorhidrato)



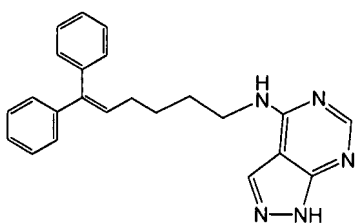
Compuesto 37



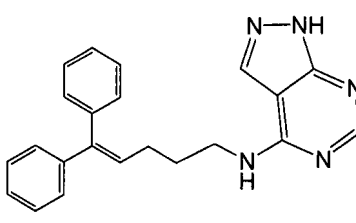
Compuesto 38



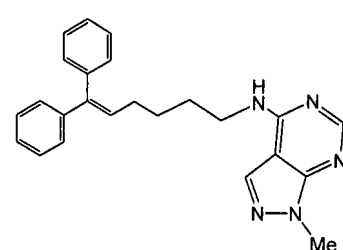
Compuesto 39



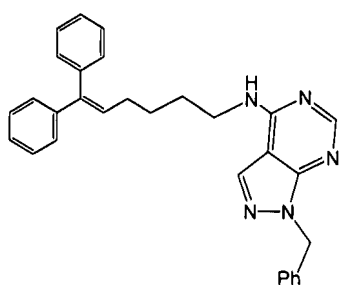
Compuesto 40



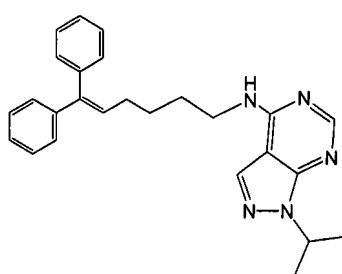
Compuesto 41



Compuesto 42
(sal de clorhidrato)



Compuesto 43
(sal de clorhidrato)



Compuesto 44.
(sal de clorhidrato)

o una sal, profármaco y/o solvato del mismo.

Los compuestos de fórmula (I) pueden estar en forma de sales, preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables, en forma de solvatos o en forma de profármacos. La expresión “sales, solvatos o profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo” se refiere a sales, solvatos o profármacos que, cuando se administran al receptor, pueden proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto tal como el descrito en el presente documento. No obstante, se observará que sales farmacéuticamente inaceptables están también dentro del alcance de la invención porque pueden ser útiles para preparar sales farmacéuticamente aceptables. Pueden prepararse sales, profármacos y derivados por medio de métodos conocidos en el estado de la técnica. “Farmacéuticamente aceptable” se refiere preferiblemente a composiciones y entidades moleculares que pueden tolerarse fisiológicamente y que no provocan normalmente una reacción alérgica o una reacción desfavorable similar, tales como trastornos gástricos, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano o animal. La expresión “farmacéuticamente aceptable” significa que está aprobado por una agencia reguladora de un gobierno estatal o federal o que está incluido en la farmacopea estadounidense u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

El término “solvato” según esta invención debe entenderse que significa cualquier forma del compuesto activo según la invención que tiene otra molécula (lo más probablemente un disolvente polar) unida al mismo mediante enlaces no covalentes. Los ejemplos de solvatos incluyen hidratos y alcoholatos, por ejemplo metanolato. Preferiblemente, los solvatos son solvatos farmacéuticamente aceptables.

La preparación de sales y solvatos puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se sintetizan sales

farmacéuticamente aceptables de compuestos proporcionados en el presente documento a partir del compuesto original, que contiene uno o más restos básicos, mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de base libre de estos compuestos con la base o el ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Los ejemplos de las sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácido mineral tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato, y sales de adición de ácido orgánico tales como, por ejemplo, acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato. En una realización preferida, la sal es la sal de clorhidrato o fumarato.

Una forma farmacéuticamente aceptable preferida es la forma cristalina, incluyendo tal forma en una composición farmacéutica. En el caso de sales y solvatos, los restos de disolvente e iónicos adicionales deben ser también no tóxicos. Los compuestos de la invención pueden presentar diferentes formas polimórficas, se pretende que la invención abarque todas las formas de este tipo.

Cualquier compuesto que sea un profármaco de un compuesto de fórmula (I) está dentro del alcance de la invención. El término "profármaco" se usa en su sentido más amplio y abarca aquellos derivados que se convierten *in vivo* en los compuestos de la invención. Los expertos en la técnica conocen ejemplos de métodos bien conocidos de producción de un profármaco de un compuesto activo dado y pueden encontrarse por ejemplo en Krogsgaard-Larsen *et al.*, Textbook of Drug design and Discovery, Taylor & Francis (abril de 2002). Tales derivados se les ocurrirían fácilmente a los expertos en la técnica e incluyen, dependiendo de los grupos funcionales presentes en la molécula y sin limitación, los siguientes derivados de los presentes compuestos: ésteres, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales de metales, carbamatos y amidas.

Se pretende también que los compuestos de la invención incluyan compuestos que difieren sólo en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, compuestos que tienen las presentes estructuras excepto por el reemplazo de un hidrógeno por un deuterio o tritio o el reemplazo de un carbono por un carbono enriquecido en ^{13}C o ^{14}C o un nitrógeno por nitrógeno enriquecido en ^{15}N están dentro del alcance de esta invención.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) descrita anteriormente pueden incluir enantiómeros dependiendo de la presencia de centros quirales o isómeros dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo Z, E). Los isómeros, enantiómeros o diastereómeros individuales y mezclas de los mismos se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

Usos de compuestos de fórmula (I)

Según una realización preferida, la enfermedad inflamatoria se selecciona de enfermedad inflamatoria del intestino (EII), artritis reumatoide (AR), hiperplasia prostática benigna, enfermedad de Barret, asma, reparación de tendones y músculo esquelético, colitis ulcerosa, leishmaniosis y enfermedades autoinmunitarias, preferiblemente enfermedad de Crohn. Según una realización adicional, la enfermedad es cáncer, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en metástasis, cáncer de mama, cáncer esofágico, cáncer de colon, carcinomas de colon, cáncer de estómago, leucemias, melanoma, carcinomas del útero, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer ovárico, carcinomas ováricos, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de hígado, carcinomas del páncreas, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de hueso, cáncer de piel, sarcoma, sarcomas de Kaposi, tumores cerebrales, miosarcomas, neuroblastomas, linfomas y mieloma múltiple.

El término “tratamiento” o “tratar” o “que trata” en el contexto de esta memoria descriptiva significa la administración de un compuesto o una formulación según la invención para prevenir, mejorar o eliminar la enfermedad o uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad. “Tratamiento” también abarca prevenir, mejorar o eliminar las secuelas psicológicas de la enfermedad.

El término “mejorar” en el contexto de esta invención se entiende que significa cualquier mejora en la situación del paciente tratado, o bien subjetivamente (sensación de o en el paciente) o bien objetivamente (parámetros medidos).

Composiciones farmacéuticas

Según un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente, o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

El término “portador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el principio activo. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos que tienen un origen sintético, vegetal, animal o del petróleo, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se emplean preferiblemente como portadores agua o disolución acuosa, soluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para disoluciones inyectables. Se describen portadores farmacéuticos adecuados en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” por E.W. Martin, 21ª edición, 2005; o “Handbook of Pharmaceutical Excipients”, Rowe C. R.; Paul J. S.; Marian E. Q., sexta edición. Preferiblemente, los portadores de la invención están aprobados por una agencia reguladora del gobierno estatal o federal y se enumeran en la farmacopea estadounidense u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

Los portadores y las sustancias auxiliares necesarios para fabricar la forma farmacéutica deseada de administración de la composición farmacéutica dependerán, entre otros factores, de la forma farmacéutica de administración elegida. Dichas formas farmacéuticas de administración de la composición farmacéutica se fabricarán según métodos convencionales conocidos por el experto en la técnica. Puede encontrarse una revisión de diferentes métodos de administración de principios activos, excipientes que van a usarse y procedimientos para producirlos en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” por E.W. Martin, 21ª edición, 2005; o “Handbook of Pharmaceutical Excipients”, Rowe C. R.; Paul J. S.; Marian E. Q., sexta edición.

Los ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (disoluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral.

En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas están en forma oral. Formas de dosis adecuadas para administración oral pueden ser comprimidos y cápsulas y pueden contener excipientes convencionales conocidos en la técnica tales como agentes aglutinantes, por ejemplo almíbar, goma arábica, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes de preparación de comprimidos, por ejemplo estearato de magnesio; disgregantes, por ejemplo almidón, polivinilpirrolidona, glicolato sódico de almidón o celulosa

microcristalina; o agentes humectantes farmacéuticamente aceptables tales como laurilsulfato de sodio.

Las composiciones orales sólidas pueden prepararse mediante métodos convencionales de combinación, llenado o preparación de comprimidos. Pueden usarse operaciones de combinación repetidas para distribuir el agente activo por todas partes en las composiciones empleando grandes cantidades de cargas. Tales operaciones son convencionales en la técnica. Los comprimidos pueden prepararse, por ejemplo, mediante granulación en húmedo o en seco y recubrirse opcionalmente según métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal, en particular con un recubrimiento entérico.

Las composiciones farmacéuticas también pueden adaptarse para administración parenteral, tales como disoluciones, suspensiones o productos liofilizados estériles en la forma farmacéutica unitaria apropiada. Pueden usarse excipientes adecuados, tales como agentes de carga, agentes tamponantes o tensioactivos.

Las formulaciones mencionadas se prepararán usando métodos convencionales tales como los descritos o a los que se hace referencia en las farmacopeas española y estadounidense y textos de referencia similares.

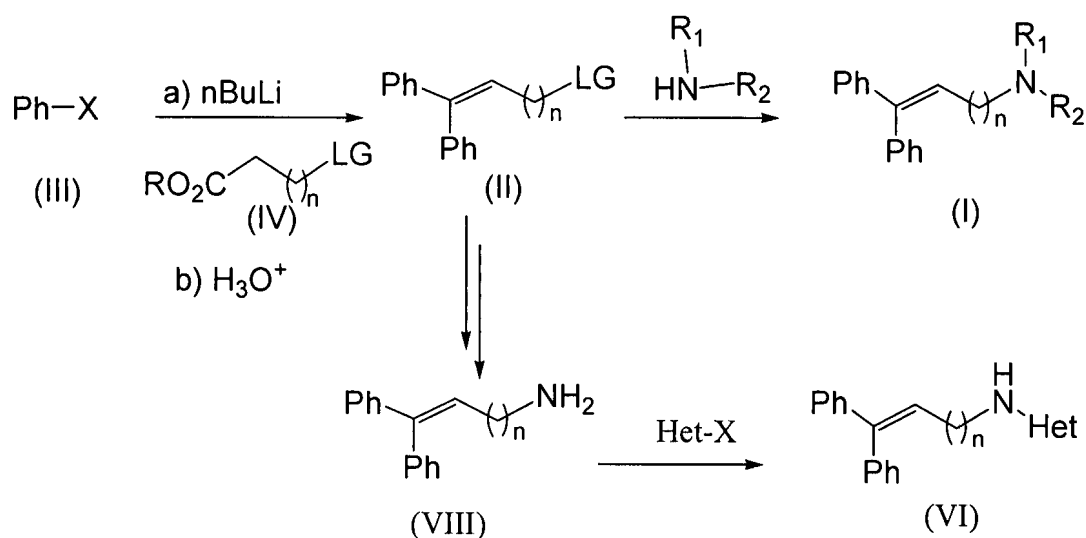
Generalmente, una cantidad administrada eficaz de un compuesto de la invención dependerá de la eficacia relativa del compuesto elegido, la gravedad del trastorno que está tratándose y el peso del paciente. Sin embargo, se administrarán normalmente compuestos activos una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 veces al día, con dosis diarias totales típicas en el intervalo de desde 0,01 hasta 1000 mg/kg/día.

Estas composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse en combinación con otros principios activos, tales como compuestos adicionales para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Dichas composiciones pueden usarse, como preparaciones de cada componente (un compuesto según la fórmula (I) o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo y un principio activo adicional), para su administración de un modo simultáneo, por separado o secuencial.

Síntesis de compuestos de fórmula (I)

Los compuestos de la presente invención pueden sintetizarse en una secuencia de múltiples etapas mediante procedimientos sintéticos disponibles. Por

ejemplo, pueden prepararse mediante el procedimiento resumido en el esquema general I mostrado a continuación:



Esquema 1

En una realización particular, los compuestos de fórmula (I) pueden prepararse mediante una reacción de sustitución del derivado (II) con una amina que porta los radicales R₁ y R₂ en presencia de una base y un disolvente orgánico. Según una realización preferida, se usan como base diisopropiletilamina o carbonato de potasio. Según otra realización preferida, el disolvente orgánico es acetonitrilo o etanol. El grupo saliente (LG) presente en los compuestos (II) se selecciona preferiblemente de haluro y sulfonato. Más preferiblemente, es bromuro.

Adicionalmente, cuando la amina es una amina primaria (R₁ = H), el compuesto (I) resultante puede alquilarse adicionalmente mediante tratamiento con un haluro de alquilo (R₁-X; en el que R₁ es alquilo C₁.C₆ o aralquilo C₇-C₁₅) en presencia de una base.

En una realización particular, los compuestos de fórmula (II) pueden prepararse mediante la adición del haluro de fenil-litio a un éster de fórmula (IV) y una reacción de deshidratación adicional. Según una realización preferida, el compuesto de organolitio se prepara mediante la adición de n-butillitio al haluro de fenilo. Según otra realización preferida, la etapa de deshidratación se realiza en presencia de un ácido. En una realización preferida, el ácido es H₂SO₄. Preferiblemente, la síntesis de los compuestos (II) se realiza en presencia de un disolvente etéreo. Más preferiblemente, se selecciona de dietil éter y tetrahidrofurano.

En una realización particular, los compuestos de fórmula (VI), es decir un compuesto de fórmula (I) en el que R₁ es hidrógeno, R₂ es -[[CH(R₃)]_m-R₄]-,

siendo m 0 y siendo R_4 un heteroarilo sustituido o no sustituido tal como se define en el presente documento, pueden prepararse mediante reacción de una amina de fórmula (VIII) con el correspondiente derivado de heteroarilo halogenado sustituido o no sustituido (Het-X; siendo X F, Br, Cl o I) en presencia de una base y un disolvente orgánico. Según una realización preferida, se usan diisopropiletilamina o carbonato de potasio como base. Según otra realización preferida, el disolvente orgánico es etanol. El experto en la técnica conoce condiciones adicionales para la alquilación de aminas.

En una realización particular, los compuestos de fórmula (VIII) pueden prepararse mediante la reacción de un compuesto (III) con azida de sodio en DMF y la posterior reducción de estas azidas con trifenilfosfina en THF.

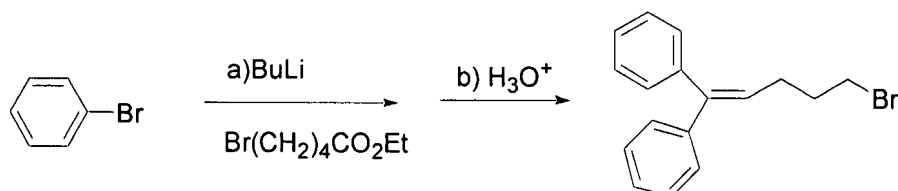
La presente invención se explica adicionalmente a continuación por medio de ejemplos. Esta explicación no debe interpretarse de ningún modo como una limitación del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Se prepararon compuestos de fórmula (I) según la presente invención siguiendo la estrategia de preparación general detallada a continuación. La preparación detallada de algunos de los compuestos se describe más adelante en el presente documento. Todos los reactivos usados están comercialmente disponibles.

Ejemplo 1: Síntesis de clorhidrato de (5,5-difenil-pent-4-enil)-(4-fluorobencil)-amina (compuesto 3)

Etapas 1. Síntesis de 5-bromo-1,1-bisfenilpenteno

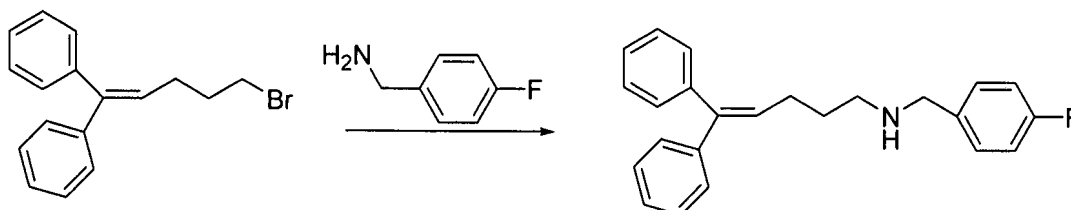


Se añadió una disolución de bromobenceno (20,86 ml, 0,225 moles) en Et₂O anhidro (60 ml), bajo atmósfera de argón, a una mezcla de n-butilitio 2,5 M (100 ml, 0,250 moles) en Et₂O anhidro (100 ml) mientras que se mantenía la temperatura a 5-10°C. Se continuó agitando a 10°C durante otros 15 min. antes de que se enfriase la mezcla hasta -70°C. Se añadió una disolución de 5-bromovalerato de etilo (14,54 ml, 0,090 moles) en Et₂O anhidro (60 ml) mientras

que se mantenía la temperatura por debajo de -65°C . Cuando se completó la adición se agitó la mezcla a -70°C durante 2,5 h. Se añadieron sucesivamente agua fría (75 ml) y HCl 1 N acuoso frío (35 ml) mientras que se mantuvo la temperatura por debajo de 0°C . Se agitó la mezcla de reacción durante 15 min. para permitir que la temperatura subiese a $>0^{\circ}\text{C}$, y se separaron las fases. Se extrajo la fase acuosa con Et_2O (75 ml), y se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua (60 ml) y salmuera (60 ml). Se secó la disolución sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente a vacío dando 46,5 g de un sólido, que se disolvió en 2-propanol (225 ml). Se añadió una disolución de H_2SO_4 acuosa al 20% (25 ml), y se agitó la mezcla a reflujo durante 1 h. Se evaporaron los disolventes a vacío dando un residuo que se repartió entre CH_2Cl_2 (400 ml) y una disolución de NaHCO_3 saturada (75 ml). Se separaron las fases, y se extrajo la fase acuosa adicionalmente con CH_2Cl_2 (75 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua (75 ml), salmuera (75 ml) y se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. Se evaporó el disolvente a vacío dando 5-bromo-1-1-bisfenilpenteno (20,0 g, 73,7%) como un aceite amarillo. ^1H RMN (CDCl_3), δ (ppm): 7,2-7,4 (m, 10 H); 6,2 (t, 1H); 3,3 (t, 2H); 2,3 (q, 2H); 1,9 (q, 2H).

Compuestos adicionales

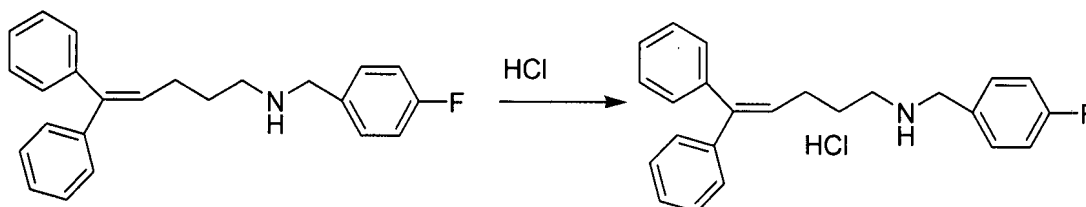
Etapas 2. Síntesis de (5,5-difenil-pent-4-enil)-(4-fluoro-bencil)-amina



Se añadieron 4-fluoro-bencilamina (0,62 g, 5 mmoles) y K_2CO_3 (0,7 g, 5 mmoles) a una disolución de 5-bromo-1-1-bisfenilpenteno (0,75 g, 2,5 mmoles) en 25 ml de acetonitrilo. Se calentó la reacción hasta reflujo con agitación durante 16 horas. Se eliminó el disolvente a presión reducida, se añadió agua y se extrajo la mezcla con CH_2Cl_2 (3 x 50 ml). Se secaron las fases orgánicas sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente a vacío dando un aceite que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (AcOEt /heptano/TEA 45:55:1) dando 0,58 g (rendimiento del 67,1%) de (5,5-difenil-pent-4-enil)-(4-fluoro-bencil)-amina como un aceite amarillo. ^1H RMN (CDCl_3), δ (ppm): 7,2-7,5 (m, 12H); 7,0-7,1 (m, 2H); 6,2 (t, 1H); 3,8 (s, 2H); 2,7 (t, 2H); 2,3 (c, 2H); 1,7 (q, 2H). ^{13}C RMN (CDCl_3), δ (ppm):

163,2; 143,4; 141,9; 139,5; 132,5; 132,3; 129,6; 128,3; 128,1; 127,1; 126,6; 125,7; 116,3; 115,9; 49,6; 45,3; 26,7; 25,8.

Etapla 3. Síntesis de clorhidrato de (5,5-difenil-pent-4-enil)-(4-fluoro-bencil)-amina (compuesto 3)



Se añadió una disolución de HCl 1 M en Et₂O anhidro (3 ml, 3 mmoles) en el plazo de 10 min. a una disolución de (5,5-difenil-pent-4-enil)-(4-fluoro-bencil)-amina (1 g, 3 mmoles) en 100 ml de Et₂O anhidro. Se agitó la reacción durante 30 min. Se filtró el sólido, se transfirió a una placa de cristalización y se secó a 50°C en un horno de vacío (0,9 g, rendimiento del 84,7%). P.f. = 128,0-130,1°C. ¹H RMN (CDCl₃), □(ppm): 9,9 (sa, 2H); 7,6-7,5 (m, 2H); 7,3-7,0 (m, 12H); 5,9 (t, 1H); 4,0 (sa, 2H); 2,7 (t, 2H); 2,2-1,9 (m, 4H). ¹³C RMN (CDCl₃), □(ppm): 163,2; 143,4; 141,9; 139,5; 132,5; 132,3; 129,6; 128,3; 128,1; 127,1; 126,6; 125,7; 116,3; 115,9; 49,6; 45,3; 26,7; 25,8.

Se obtuvieron los siguientes compuestos siguiendo el procedimiento sintético general descrito anteriormente para compuestos de fórmula (I), concretamente mediante la reacción de 5-bromo-1-1-bisfenilpenteno con arilbencilaminas correspondientes:

Ejemplo 2: Clorhidrato de (5,5-difenil-pent-4-enil)-(4-trifluorometoxibencil)amina (compuesto 2) ¹H-RMN (CDCl₃), □ (ppm): 7,2 (m, 14H); 6,1 (t, 1H); 3,8 (s, 2H); 2,7 (t, 2H); 2,2 (q, 2H); 1,7 (m, 2H).

Ejemplo 3: Clorhidrato de (5,5-difenil-pent-4-enil)-(4-trifluorometilbencil)amina (compuesto 1). P.f.: 121,4-122,7°C.

¹H-RMN (CDCl₃), □ (ppm): 10,1 (s, 2H); 7,7-7,6 (m, 4H); 7,0-6,8 (m, 10H); 5,9 (t, 2H); 4,0 (s, 2H); 2,6 (sa 2H); 2,1-1,9 (m, 4H).

Ejemplo 4: Clorhidrato de (5,5-difenil-pent-4-enil)-(4-metoxibencil)amina (compuesto 4) P.f.: 69,2-73,8°C.

¹H-RMN (CDCl₃), □ (ppm): 9,7 (sa, 2H); 7,4 (d, 2H); 7,3-7,0 (m, 10H); 6,8 (d, 2H); 5,9 (t, 1H); 3,9 (sa 2H); 3,7 (s, 3H); 2,6 (sa, 2H); 2,1-1,9 (m, 4H).

Ejemplo 5: Clorhidrato de (5,5-difenil-pent-4-enil)-tiofen-3-ilmetilamina (compuesto 5). P.f.: 108,0-109,7°C. ¹H-RMN (CDCl₃) □ (ppm): 9,8 (sa, 2H); 7,5-

7,4 (m, 1H); 7,3-7,0 (m, 12H); 5,9 (t, 1H); 4,0 (sa, 2H); 2,7 (sa, 2H); 2,1-1,9 (m, 4H).

Ejemplo 6: Clorhidrato de (5,5-difenil-pent-4-enil)-tiofen-2-ilmetilamina (compuesto 6). P.f.: 161,0-161,6°C. ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 7,4-7,1 (m, 11H); 6,9 (m, 2H); 6,1 (t, 1H); 4,0 (s, 2H); 2,7 (t, 2H); 2,2 (q, 2H); 1,6 (m, 2H).

Ejemplo 7: Clorhidrato de (5,5-difenil-pent-4-enil)piridin-2-ilmetilamina (compuesto 7). P.f.: 125,0-126,9°C. ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 8,5 (m, 1H); 7,8 (m, 2H); 7,4-7,0 (m, 11H); 5,9 (t, 1H); 4,4 (s, 2H); 2,9 (t, 2H); 2,2-2,0 (m, 4H).

Ejemplo 8: Clorhidrato (5,5-difenil-pent-4-enil)furan-2-ilmetilamina (compuesto 8). P.f.: 139,0-141,3°C. ^1H -RMN (DMSO-d_6), $\square$ (ppm): 9,5 (sa, 2H); 7,7 (m, 1H); 7,5-7,0 (m, 10H); 6,6(m, 1H); 6,5 (m, 1H); 6,0 (t, 1H); 4,1 (sa, 2H); 2,8 (sa, 2H);); 2,1-2,0 (m, 2H); 1,8-1,7 (m, 2H).

Ejemplo 9: Clorhidrato de (5,5-difenil-pent-4-enil)-(3-trifluorometoxibencil)amina (compuesto 9). P.f.: 102,4-104,0°C. ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 10,0 (sa 2H); 7,6-7,0 (m, 14H); 5,9 (t, 1H); 4,0 (s, 2H); 2,7 (sa, 2H); 2,1-1,9 (m, 4H).

Ejemplo 10: Clorhidrato de (5,5-difenil-pent-4-enil)-(2-trifluorometoxibencil)amina (compuesto 10). P.f.: 109,0-110,7°C. ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 10,0 (sa, 2H), 8,0 (m, 1H); 7,4-7,0 (m, 13H); 5,9 (t, 1H); 4,2 (s, 2H); 2,7 (sa, 2H); 2,1-2,0 (m, 4H).

Ejemplo 11: Clorhidrato de (1H-benzoimidazol-2-ilmetil)-(5,5-difenil-pent-4-enil)amina (compuesto 11). P.f.: 251,0-253,8°C. ^1H -RMN (DMSO-d_6), $\square$ (ppm): 10,1 (sa, 2H); 7,8-7,1 (m, 14H); 6,2 (sa 2H); 6,1 (t, 1H); 4,6 (s, 2H); 3,0 (sa, 2H); 2,1-2,0 (m, 2H); 1,8-1,0 (m, 2H).

Ejemplo 12: Clorhidrato de (4,4-difenil-but-3-enil)-(4-trifluorometoxibencil)amina (compuesto 12). P.f.: 126-128°C. ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 10,1 (s, 1H); 6,1 (t, 1H); 7,5 (d, 2H); 7,3-7,0 (m, 12H); 3,9 (s, 2H); 2,8 (m, 2H); 2,6 (m, 2H).

Ejemplo 13: Clorhidrato de (4,4-difenil-but-3-enil)-tiofen-2-ilmetilamina (compuesto 13). P.f.: 163-165,5°C. ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 2,3 (q, 2H); 2,8 (t, 2H); 4,0 (s, 2H); 6,1 (t, 1H); 6,9 (m, 2H); 7,0 (m, 8H); 7,4 (m, 3H).

Ejemplo 14: Clorhidrato de (6,6-difenil-hex-5-enil)-(4-trifluorometoxibencil)amina (compuesto 14). P.f.: 109-110,5°C. ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 10,0 (m, 2H); 7,6 (d, 2H); 7,4-7,0 (m, 14H); 6,0 (t, 1H); 3,9 (s, 2H); 2,7 (s, 2H); 2,1 (q, 2H); 1,8 (m, 2H); 1,5 (m, 2H).

Ejemplo 15: Clorhidrato de (6,6-difenil-hex-5-enil)-(3-trifluorometoxibencil)amina (compuesto 15). P.f.: 96,6-98,5°C. ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 7,4-7,0 (m, 13H); 6,1 (t, 1H); 3,8 (s, 2H); 2,6 (t, 2H), 2,2 (q, 2H); 1,6 (m, 4H).

Ejemplo 16: Clorhidrato de bencil-(5,5-difenil-pent-4-enil)-metilamina (compuesto 16). ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 12,5 (s, 1H); 7,0-7,6 (m, 15H); 5,9 (t, 1H); 4,1 (s, 2H); 2,9-2,6 (m, 2H); 2,6 (s, 3H); 2,2-1,8 (m, 4H).

Ejemplo 17: Clorhidrato de (5,5-difenil-pent-4-enil)-(1-fenil-etil)-amina (compuesto 17). ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 10,1 (sa 1H); 9,8 (sa, 1H); 7,6-7,0 (m, 15 H); 5,9 (t, 1H); 4,16 (t, 1H); 2,6 (sa, 2H); 2,0 (m, 4H); 1,9 (d, 3H).

Ejemplo 18: Clorhidrato de benzhidril-(5,5-difenil-pent-4-enil)-amina (compuesto 18). ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 10,3 (sa, 2H); 7,6-7,0 (m, 20H); 5,8 (t, 1H); 5,1 (sa, 1H); 2,5 (sa 2H); 1,9-1,7 (m, 4H).

Ejemplo 19: Clorhidrato de (5,5-difenil-pent-4-enil)-(2-fluorobencil)amina (compuesto 19). ^1H -RMN (CDCl_3) $\square$ (ppm): 10,0 (s, 2H); 7,4-6,9 (m, 15H); 6,0 (t, 1H); 4,0 (s, 2H); 2,7 (m, 2H); 2,2-2,0 (m, 4H).

Ejemplo 20: Clorhidrato de (4-clorobencil)-(5,5-difenil-pent-4-enil)amina. (Compuesto 20). ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 1,7 (m, 2H); 2,2 (m, 2H); 2,7 (m, 2H); 4,0 (s, 2H); 6,1 (t, 1H); 7,5-7,0 (m, 14H); 10,0 (sa, 2H).

Ejemplo 21: Clorhidrato de 4-[(5,5-difenil-pent-4-enilamino)-metil]benzonitrilo ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 10,2 (s, 2H); 7,8-7,6 (m, 4H); 7,4-7,0 (m, 10H); 5,9 (t, 1H); 4,1 (s, 2H); 2,7 (m, 2H); 2,2 (m, 2H); 2,0 (m, 2H).

Ejemplo 22: Clorhidrato de (4,4-difenil-but-3-enil)-(4-trifluorometilbencil)amina. ^1H -RMN (CDCl_3) $\square$ (ppm): 11,0 (sa, 2H); 7,6 (m, 4H); 7,4-7,2 (m, 8H); 7,1(m, 2H); 6,1 (t, 1H); 4,0 (s, 2H); 2,9 (t, 2H); 2,6 (m, 2H).

Ejemplo 23: Clorhidrato de (4,4-difenil-but-3-enil)-(4-fluor-bencil)-amina. ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 10,0 (s, 2H); 7,6-7,4 (m, 10H); 7,0-6,8 (m, 4H); 6,1 (t, 1H); 3,9 (m, 2H); 2,8 (m, 2H); 2,5 (m, 2H).

Ejemplo 24: Clorhidrato de bencil-(4,4-difenil-but-3-enil)amina. ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 10,0 (sa, 2H); 7,5-7,2 (m, 13H); 7,0 (m, 2H); 6,1 (t, 1H); 3,9 (s 2H); 2,9 (m, 2H); 2,6 (m, 2H).

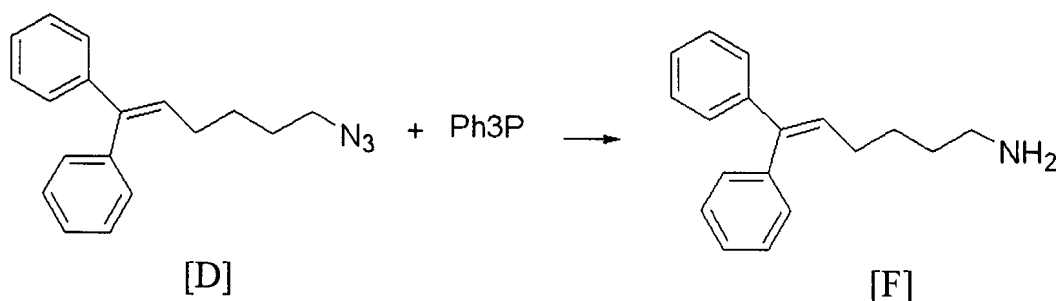
Ejemplo 25: Clorhidrato de (4,4-difenil-but-3-enil)-(3-trifluorometoxibencil)amina. ^1H -RMN (CDCl_3 , $\square$ (ppm): 10,2 (sa, 2H); 7,8 (d, 1H); 7,6 (m, 2H); 7,5 (m, 1H); 7,7-7,4 (m, 10H); 6,1 (t, 1H); 4,0 (s, 2H); 2,9 (m, 2H); 2,6 (m, 2H).

durante 16 h. Se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo (400 ml) y se lavó con una disolución acuosa saturada de NH_4Cl (3 x 100 ml). Se lavó el extracto orgánico con salmuera (1x 60 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se eliminó el disolvente a baja presión, obteniendo 41 g (148 mmoles, 96,68%) de un aceite incoloro, identificado como 6-azida-1,1-difenil-1-hexeno. ^1H -RMN (CDCl_3), δ (ppm): 7,4-7,1 (m, 10H); 6,1 (t, 1H); 3,2 (t, 2H); 2,1 (m, 2H); 1,5 (m, 4H).

Se preparó el siguiente compuesto intermedio mediante la reacción del producto intermedio [A] (véase el ejemplo 27) con azida de sodio de un modo análogo:

Producto intermedio [E] **5-Azida-1,1-difenil-1-penteno** ^1H -RMN (CDCl_3), δ (ppm): 7,4-7,0 (m, 10H); 6,1 (t, 1H); 3,3 (t, 2H); 2,1 (m, 2H); 1,6 (m, 2H).

Etapas 2. Síntesis de 6,6-difenil-hex-5-enilamina. Producto intermedio [F]

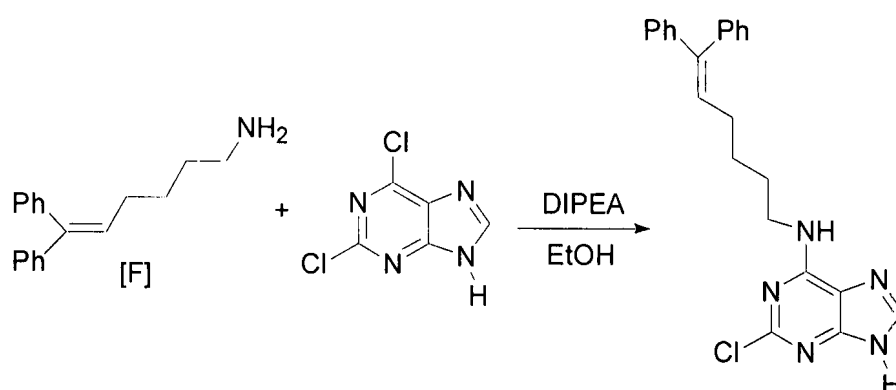


Se agitó una mezcla de 6-azida-1,1-difenil-1-hexeno (2,7 g, 9,7 mmoles) y trifenilfosfina (3,1 g, 12 mmoles) en THF (50 ml) y agua (2,5 ml), a temperatura ambiente durante 20 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida dando un aceite, que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida ($\text{DCM}/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$ 95:5:5) produciendo 6,6-difenil-hex-5-enilamina como un aceite amarillo (2,4 g, rendimiento del 98%) ^1H -RMN (CDCl_3), δ (ppm): 1,4 (m, 4H); 7,3 (m, 10H); 6,1 (t, 1H); 2,6 (m, 2H); 2,2 (q, 2H); 1,6 (s, 2H).

Se preparó el siguiente compuesto intermedio de un modo análogo:

Producto intermedio [G] **5,5-difenil-pent-4-enilamina** ^1H -RMN (CDCl_3), δ (ppm): 7,4-7,2 (m, 10H); 6,1 (t, 1H); 2,7 (t, 2H); 2,2 (q, 2H); 1,9 (s, 2H); 1,6 (m, 2H).

Etapas 3. (2-Cloro-9H-purin-6-il)-(6,6-difenil-hex-5-enil)-amina



A una disolución de 6,6-difenil-hex-5-enilamina (25,6 g, 103 mmoles) en etanol (500 ml), se le añadieron purina (17,0 g, 90 mmoles) y DIPEA (15,7 ml, 90 mmoles). Se calentó la mezcla resultante hasta reflujo durante 3 h. Una vez que pasó este tiempo, se eliminó el disolvente a baja presión, se añadió agua (150 ml) y se filtró el precipitado y se lavó con metanol obteniendo (2-cloro-9H-purin-6-il)-(6,6-difenil-hex-5-enil)-amina (31,76 g, (78,6 mmoles, rendimiento del 87,3%) como un sólido blanco (p.f.: 205,7°-207,0°C ^1H -RMN (CDCl_3), δ (ppm): 8,1 (s, 2H); 7,5-7,0 (m, 10H); 6,1 (t, 1H); 2,5 (m, 2H); 2,1 (m, 2H); 1,7-1,4 (m, 4H).

Se prepararon los siguientes compuestos de un modo análogo, mediante la reacción de 6,6-difenil-hex-5-enilamina con los correspondientes derivados de 6-cloropurina o derivados de 4-cloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina comerciales. Se prepararon compuestos no comerciales mediante métodos conocidos en la bibliografía tales como los descritos en el documento US6936713; Eur. J. Med. Chem, 2003, 38, 199-214; documento WO2005/009348; Synthesis, 1994, 1401; J. Am. Chem. Soc. 1956, 78, 784-790; J. Med. Chem. 2005, 6887; J. Med. Chem. 2006, 1549; y/o Eur. J. Med. Chem, 2004, 939.

Ejemplo 30: Sal clorhídrica de (9-bencil-2-yodo-9H-purin-6-il)-(6,6-difenil-hex-5-enil)amina (compuesto 30). La reacción con 6-cloro-2-yodo-9H-purina produjo el compuesto del título. ^1H -RMN (CDCl_3), δ (ppm): 7,5 (s, 1H); 7,4-7,0 (m, 15H); 6,1 (t, 1H); 5,7 (s, 1H); 5,3 (s, 2H); 3,6 (s, 2H); 2,1 (q, 2H); 1,6 (m, 5H).

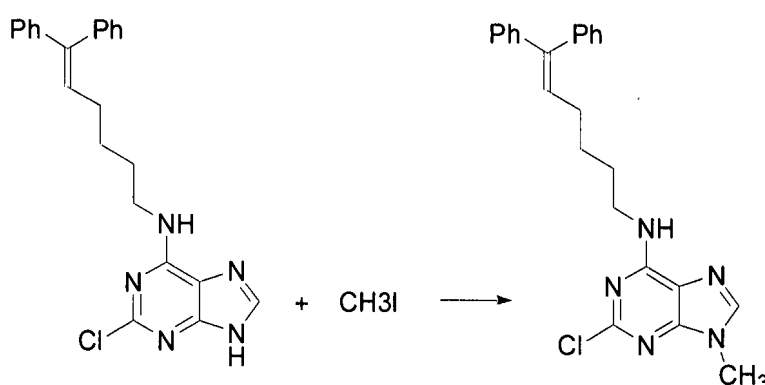
Ejemplo 31: 9-Bencil-N-(6,6-difenil-hex-5-enil)-9H-purina-2,6-diamina (compuesto 31) La reacción con 9-bencil-6-cloro-9H-purin-2-ilamina produjo el compuesto del título. ^1H -RMN (CDCl_3), δ (ppm): 7,4-7,1 (m, 15H), 6,1 (t, 1H), 5,5 (m, 1H, NH); 5,2 (s, 2H); 4,7 (s, 2H, NH_2); 3,5 (m, 2H); 2,2 (m, 2H); 1,6 (m, 4H).

Ejemplo 32: (6,6-Difenil-hex-5-enil)-(2-fenil-9H-purin-6-il)amina (compuesto 32) La reacción con 6-cloro-2-fenil-9H-purina produjo el compuesto del título. ^1H -RMN ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 8,2 (m, 2H); 7,7 (s, 1H); 7,4-7,0 (m, 14H); 6,9 (sa, 1H); 6,0 (t, 1H); 3,6 (m, 2H); 2,1 (q, 2H); 1,8- 1,4 (m, 4H).

Ejemplo 33: (6,6-Difenil-hex-5-enil)-(9-metil-2-trifluorometil-9H-purin-6-il)amina (compuesto 33) La reacción con 6-cloro-9-metil-2-trifluorometil-9H-purina produjo el compuesto del título. ^1H -RMN (CDCl_3), δ (ppm): 7,8 (s, 1H); 7,4-7,0 (m, 10H); 6,1 (t, 1H); 5,8 (sa, 1H); 3,9 (s, 3H); 3,6 (sa, 2H); 2,2 (q, 2H); 1,8-1,5 (m, 4H).

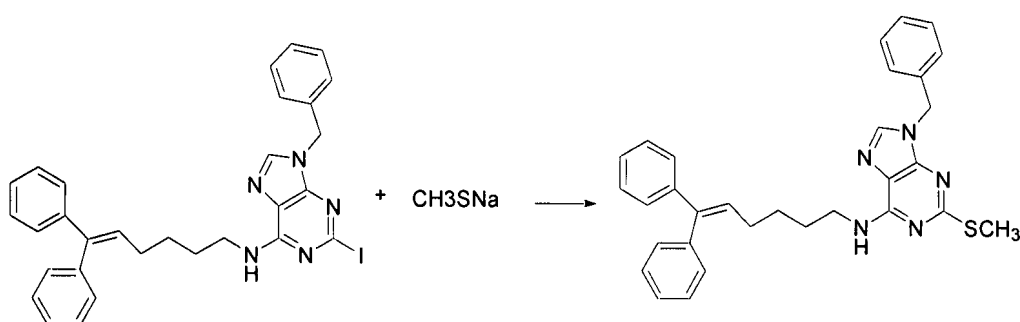
Ejemplo 34: (5,5-Difenil-pent-4-enil)-(9-metil-9H-purin-6-il)amina (compuesto 34) La reacción con 6-cloro-9-metil-9H-purina produjo el compuesto del título. ^1H -RMN (CDCl_3), δ (ppm): 8,4 (s, 1H); 7,7 (s, 1H); 7,4-7,0 (m, 10H); 6,1 (t, 1H); 5,7 (s, 1H, NH); 3,9 (s, 3H); 3,6 (m, 2H); 2,3 (q, 2H); 1,9 (m, 2H).

Ejemplo 35: Síntesis de (2-cloro-9-metil-9H-purin-6-il)-(6,6-difenil-hex-5-enil)amina (compuesto 35)



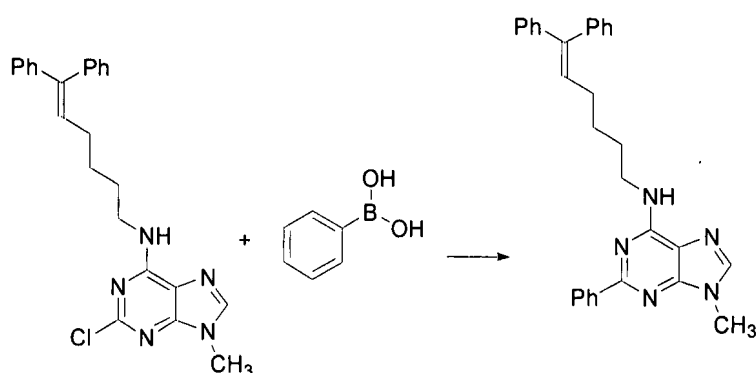
A una disolución de (2-cloro-9H-purin-6-il)-(6,6-difenil-hex-5-enil)-amina (2,0 g, 5,0 mmoles) en DMF (50 ml), se le añadió carbonato de potasio (1,4 g, 10 mmoles), y se trató la suspensión resultante con yoduro de metilo (0,5 ml, 7,92 mmoles). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 72 h. Se añadió agua (250 ml) y se extrajo la mezcla resultante con acetato de etilo (3 x 50 ml). Se lavó el extracto orgánico con salmuera (1 x 25 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se eliminó el disolvente a baja presión, obteniendo un residuo sólido (2,30 g), que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (EtOAc/heptano 60:30) dando 2-cloro-9-metil-9H-purin-6-il)-(6,6-difenil-hex-5-enil)amina (1,45 g, rendimiento del 70%) como un sólido blanco ^1H -RMN (CDCl_3), δ (ppm): 7,7 (s, 1H); 7,4-7,0 (m, 10H); 6,1 (t, 1H); 5,9 (sa, 1H); 3,8 (s, 3H); 3,6 (sa, 2H); 2,2 (q, 2H); 1,7-1,5 (2q, 4H).

Ejemplo 36: Síntesis de (9-bencil-2-metilsulfanil-9H-purin-6-il)-(6,6-difenil-hex-5-enil)amina (compuesto 36)



En un reactor a alta presión de 250 ml, se trató una disolución de (9-bencil-2-yodo-9H-purin-6-il)-(6,6-difenil-hex-5-enil)-amina (compuesto 30) (2,4 g, 4,1 mmoles en una mezcla de etanol (30 ml) y agua (30 ml), con tiometóxido de sodio (1,4 g, 20,5 mmoles). Se cerró el recipiente del reactor y se calentó la mezcla a 130°C durante 6 h. (Presión interna máxima: 2 bares). Una vez que pasó este tiempo, se eliminó el disolvente a baja presión, se añadió agua (120 ml) y se extrajo la mezcla resultante con acetato de etilo (3 x 50 ml). Se secaron las fases orgánicas sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente a vacío dando un residuo, que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (EtOAc/heptano 1:1) dando (9-bencil-2-metilsulfanil-9H-purin-6-il)-(6,6-difenil-hex-5-enil)amina (1,68 g, 3,3 mmoles, 81%) como un sólido amarillo. ^1H -RMN (CDCl_3), δ (ppm): 7,55 (s, 1H); 7,45-7,12 (m, 15H); 6,07 (1H, t); 5,65 (sa, 1H); 5,29 (s, 2H); 3,58 (sa, 2H); 2,55 (s, 3H); 2,16 (q, 2H); 1,79-1,51 (m, 4H).

Ejemplo 37: (6,6-Difenil-hex-5-enil)-(9-metil-2-fenil-9H-purin-6-il)amina (compuesto 37)



Se agitó a 100°C durante 40 h bajo Ar una suspensión de 2-cloro-9-metil-9H-purin-6-il)-(6,6-difenil-hex-5-enil)amina (3,0 g, 7,0 mmoles), carbonato de sodio (1,3 g, 12,28 mmoles), ácido fenilborónico (1,05 g, 8,6 mmoles) y tetrakis(trifenilfosfina-paladio (0) (1,21 g, 1,05 mmoles, 15% en moles) en DME (50 ml).

Una vez que pasó este tiempo, se eliminó el disolvente a baja presión y se añadió agua (34 ml). Se agitó la mezcla resultante durante 10 min. y se filtró el precipitado y se lavó con agua (2 x 20 ml) y éter (2 x 20 ml). Se secó el material

así obtenido a vacío produciendo 2-cloro-9-metil-9H-purin-6-il)-(6,6-difenil-hex-5-enil)amina (2,6 g, 5,7 mmoles, rendimiento del 81%) como un sólido amarillo. ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 8,5 (d, 2H); 7,7 (s, 1H); 7,5-7,1 (m, 13H); 6,1 (t, 1H); 5,7 (m, 1H, NH); 3,9 (s, 3H); 3,7 (m, 2H); 2,3 (q, 2H); 1,8 (m, 2H); 1,6 (q, 2H).

Se prepararon los siguientes compuestos de un modo análogo, mediante la reacción de 2-cloro-9-metil-9H-purin-6-il)-(6,6-difenil-hex-5-enil)amina con los correspondientes derivados de ácidos heteroarilborónicos:

Ejemplo 38: (6,6-Difenil-hex-5-enil)-(9-metil-2-tiofen-2-il-9H-purin-6-il)amina (compuesto 38) ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 7,7-7,5 (m, 2H); 7,5-7,0 (m, 11H); 6,1 (t, 1H); 5,4 (sa, 1H); 3,7 (s, 3H); 3,6 (sa, 2H); 2,1(q, 2H); 1,8-1,5 (2q, 4H).

Ejemplo 39: (6,6-Difenil-hex-5-enil)-(9-metil-2-piridin-4-il-9H-purin-6-il)amina (compuesto 39) ^1H -RMN (CDCl_3 , $\square$ (ppm): 8,7 (d, 2H); 8,3 (d, 2H); 7,7 (s, 1H); 7,3-7,0 (m, 10H); 6,1 (t, 1H); 5,5 (sa, 1H); 3,9 (s, 3H); 3,7 (sa, 2H); 2,2 (q, 2H); 1,8-1,5 (2q, 4H).

Ejemplo 40: (6,6-Difenil-hex-5-enil)-(1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)amina. (Compuesto 40) ^1H -RMN (CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$), $\square$ (ppm): 12,81 (sa, 1H); 8,22 (s, 1H); 7,92 (s, 1H); 7,02-7,26 (m, 10H); 6,80 (sa, 1H); 5,95 (t, 1H); 3,41-3,45 (m, 2H); 2,45-2,58 (m, 2H); 2,03-2,10 (m, 2H); 1,42-1,62 (m, 4H).

Ejemplo 41: (5,5-Difenil-pent-4-enil)-(1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)amina (compuesto 41)

^1H -RMN ($\text{DMSO}-d_6$), $\square$ (ppm): 13,35 (sa, 1H); 8,11 (sa, 1H); 8,04 (s, 1H); 7,05-7,33 (m, 10H); 6,16 (t, 1H); 3,42-3,49 (m, 2H); 2,08-2,15 (m, 2H); 1,72-1,77 (m, 2H);

Se prepararon los siguientes compuestos de un modo análogo al compuesto 35, mediante la reacción del compuesto 41 con los correspondientes derivados de haluros de alquilbencilo.

Ejemplo 42: Sal clorhídrica de (6,6-difenil-hex-5-enil)-(1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)amina. (Compuesto 42) ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 8,35 (sa, 1H); 7,83 (s, 1H); 7,14-7,39 (m, 10H); 6,07 (t, 1H); 4,04 (s, 3H); 3,5-3,6 (m, 2H); 2,19 (q, 2H); 1,67-1,75 (m, 2H); 1,56-1,63 (m, 2H).

Ejemplo 43: Sal clorhídrica de (1-bencil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)-(6,6-difenil-hex-5-enil)amina (compuesto 43) ^1H -RMN (CDCl_3), $\square$ (ppm): 8,4 (sa, 1H); 7,9 (s, 1H); 7,4-7,2 (m, 16H); 6,1 (t, 1H); 5,6 (s, 2H); 3,6-3,5 (m, 2H); 2,2 (q, 2H); 1,9-1,8 (m, 2H); 1,6-1,5 (m, 2H).

Ejemplo 44: Sal clorhídrica de (6,6-difenil-hex-5-enil)-(1-isopropil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)amina. (Compuesto 44) ^1H -RMN (DMSO- d_6), δ (ppm): 11,0 (sa, 1H); 8,8 (s, 1H); 8,4 (s, 1H); 7,3-7,1 (m, 10H); 6,1 (t, 1H); 5,0 (hept, 1H); 3,7-3,4 (m, 2H); 2,1-1,9 (m, 2H); 1,7-1,6 (m, 2H); 1,6-1,40 (m, 2H); 1,39 (d, 6H).

ENSAYOS BIOLÓGICOS

Generación de transfectantes.

Todos los transfectantes tenían una base celular común carente de los receptores clave de las rutas en estudio. Se usó la fosfatasa sPase secretada como indicador de su capacidad para procesar los sustratos luminiscentes o colorimétricos del cultivo basándose en la hidrólisis de sustratos químicamente similares a fosfato de nitrofenol. Se desarrollaron cinco generaciones de transfectantes tal como se describe:

1. IL-4R. Se transfectaron cadenas de IL-4r de tipo II, que es el común dentro de células no hematopoyéticas, así como STAT6 que es la molécula clave en la ruta de señalización nuclear mediante IL-4r, y finalmente se introdujo un gen indicador para medir la respuesta a STAT6. Endógenamente, las células tenían la cinasa 1 asociada a Janus (JAK1) que se sabía previamente que estaba asociada con STAT6 a través de p62/aPKC.
2. IL-6R. Se transfectaron cadenas de IL-6R y se introdujo un gen indicador que podía medir la respuesta a STAT3. Tal como se sabe bien, STAT3 es una molécula de transducción y un factor nuclear producido fisiológicamente en las respuestas convencionales IL-6/IL-6R.
3. TNF-R. En este caso, se introdujo un gen indicador que podía medir la respuesta a NF- κ B, ya que esta es la molécula de transducción y el factor nuclear producido fisiológicamente en respuesta a TNF-alfa. Los transfectantes de TNF-alfa no respondieron a activadores potentes de NF κ B como LPS.
4. Complejo LPS-receptor representado por TLR4/MD2/CD14. Se usaron genes indicadores con elementos de respuesta a NF κ B como en el caso anterior, pero se logró la selectividad mediante la cotransfección de componentes del complejo LPS-R. El LPS se captura del suero a través de la unión a una proteína plasmática conocida como LBP, que transfiere el LPS a la proteína de membrana CD14. La inclusión de LBP representa un aumento de 1000 veces en la sensibilidad frente a medios o cultivos libres

de LBP. La molécula CD14 no es un receptor de LPS, sino un módulo del complejo de receptor que captura LBP, permitiendo la transferencia de LPS en la superficie celular a MD2. CD14 no tiene una cola citoplasmática y no puede ser un transductor de señales aunque aumenta sustancialmente la sensibilidad del sistema. De un modo similar, MD2 no es un transductor de señales aunque la combinación de CD14 y MD2 permite el aumento de la sensibilidad en 10000 veces.

5 IL-1R. Se usaron genes indicadores con elementos de respuesta a NFkB como en el caso anterior, pero se logró la selectividad mediante la expresión de componentes que pertenecían al complejo de receptor IL-1R. IL-1R pertenece a una superfamilia de receptores que usa dominios de transducción TIR (IL-1R tipo Toll). Se sabe que la ruta de IL-1R activa proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) de tipo JNK que a su vez generan factores nucleares transcripcionalmente activos como AP-1. El gen indicador incluye sitios NFkB y AP-1 encadenados con el fin de estimular la situación fisiológica.

Compuesto	Resultados
Compuesto 28	Inhibición de TNFr 25% Inhibición de IL6r muy baja (*) Inhibición de IL4r 75%
Compuesto 27	Inhibición de TNFr total Inhibición de IL6r baja-75% Inhibición de IL4r total
Compuesto 13	Inhibición de TNFr total Inhibición de IL6r total Inhibición de IL4r total
Compuesto 11	Inhibición de TNFr total Inhibición de IL6r total Inhibición de IL4r total
Compuesto 10	Inhibición de TNFr por encima del 30% Inhibición de IL6r por debajo del 5% Inhibición de IL4r total
Compuesto 8	Inhibición de TNFr total Inhibición de IL6r total

	Inhibición de IL4r total
Compuesto 6	Inhibición de TNFr total
	Inhibición de IL6r total
	Inhibición de IL4r total

Endotoxemia murina: Actividad del compuesto 11 y el compuesto 8 sobre los niveles séricos sanguíneos de TNF- α .

MATERIAL Y MÉTODOS: Se usaron ratones CD1 macho, que pesaban entre 30 y 35 g y que se alojaron en condiciones convencionales controladas. Estos animales ayunaron (durante 14-16 horas; 12 por grupo; 6 por jaula $\cong$ 500 cm²), con una solución nutritiva hecha de sacarosa (8%) y NaCl (0,2%), a voluntad. Se administraron tratamientos de prueba orales en suspensiones (vehículo: Tween 80 al 0,1% - NaCl al 0,9%), en una razón en volumen de 10 ml/kg. Una hora después, se indujo la endotoxemia murina mediante inyección intraperitoneal de lipopolisacáridos de *Escherichia coli* serotipo 055:B5 (Sigma L-2880), a una dosis de 1 mg/kg y en una razón en volumen de 10 ml/kg, disueltos en solución salina estéril. Noventa minutos tras la inyección de LPS (i.p.), bajo anestesia de isoflurano, se extrajeron 0,5-0,8 ml de de sangre mediante punción cardiaca; se centrifugó la muestra de sangre (6000 rpm; 10 minutos; 4°C) y se tomaron 2 muestras de suero y se mantuvieron congeladas a -70°C hasta que se midieron las concentraciones séricas de TNF- α (EIA: Mouse TNF/TNFSF1A Quantikine de R&D Systems).

Los compuestos 11 y 8, administrados por vía oral a dosis de 100 mg/kg/10 ml, muestran actividad en este modelo experimental de endotoxemia murina inducida por LPS de *E. coli* (i.p.); reducen un 35,42% y un 37,7% respectivamente, de un modo estadísticamente significativo, los niveles séricos sanguíneos de TNF- α , en relación con su grupo de vehículo.

Niveles séricos sanguíneos de IL6 en ratones tratados con hormona paratiroidea. Actividad del compuesto 15.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se usaron ratones CD1 machos, de entre 5 y 7 semanas y que se alojaron en condiciones convencionales controladas. Estos animales ayunaron (durante 14-16 horas; 12 por grupo; 6 por jaula $\cong$ 1100 cm²), con alimento sólido y líquido a voluntad.

Durante 5 días, se trataron los animales con 8 administraciones i.p. de pTH-rp (1-34, humana), 15 microgramos/0,1 ml/inyección

Se administraron tratamientos de prueba orales en suspensiones (vehículo: Tween 80 al 0,1% - NaCl al 0,9%), en una razón en volumen de 10 ml/kg, una hora después de la inyección de pTH.

Dos horas después de la última administración de pTH y bajo anestesia de isoflurano, se extrajeron 0,5-0,8 ml de sangre mediante punción cardiaca; se centrifugó la muestra de sangre (6000 rpm; 10 minutos; 4°C) y se tomaron 2 muestras de suero y se mantuvieron congeladas a -70°C hasta que se midieron las concentraciones séricas de IL6 (EIA: número de referencia 555240. BD Bioscience).

El compuesto 15, administrado por vía oral a dosis de 25 mg/kg/10 ml, muestra actividad en este modelo experimental; reduce un 64,58%, de un modo estadísticamente significativo, los niveles séricos sanguíneos de IL6, en relación con su grupo de vehículo.

ACTIVIDAD ANTITUMORAL.

PANEL NCI DE LÍNEAS CELULARES (SELECCIÓN PRIMARIA)

Se obtuvieron las distintas líneas celulares humanas usadas en este estudio de la Colección Americana de Cultivos Tipo, y se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (v/v), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml a 37°C en un 95% de aire humidificado y un 5% de CO₂.

Se sembraron distintas cantidades de líneas celulares humanas en crecimiento de manera exponencial en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos en un volumen final de 100 µl, y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada del 5% de CO₂/95% de aire durante 24 h para permitir que las células se uniesen a las placas. Entonces, se incubaron las células con diferentes concentraciones del compuesto sometido a ensayo a 37°C bajo la atmósfera del 5% de CO₂/95% de aire durante 72 h. Se cuantificó la proliferación celular usando el kit de proliferación celular XTT (sal de sodio del ácido 3'-[1-(fenilamino)carbonil]-3,4-tetrazolio-bis(4-metoxi-6-nitro)bencenosulfónico hidratada) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se añadió a cada pocillo una disolución de mezcla recién preparada (50 µl) de reactivo de marcaje XTT y reactivo de acoplamiento electrónico PMS

(metilsulfato de N-metildibenzopirazina). Se incubaron adicionalmente las mezclas resultantes durante 4 h en una atmósfera humidificada (37°C, 5% de CO₂), y se midió la absorbancia del producto de formazán generado con un lector de placas de microtitulación a una longitud de onda de prueba de 490 nm y una longitud de onda de referencia de 655 nm. Se calculó entonces la CI₅₀ (concentración inhibitoria del 50%) como la concentración de fármaco que provocaba un 50% de inhibición de la proliferación celular. Se muestran los datos como valores medios (± D.E.) de cuatro experimentos independientes realizados cada uno por triplicado. La tabla 1 muestra algunas de las concentraciones CI₅₀ para los compuestos sometidos a prueba tras la selección en paneles de tanto 3 como 60 líneas celulares.

Tabla 1. CI50 (micromolar) en la selección de líneas celulares

Línea celular	Tejido	CI50 (Molar)	
		Compuesto 3	Compuesto 6
BT-549	Mama	1,6 ± 0,01 E-05	2.1 ± 0.16 E-05
HS 578T	Mama	1,1 ± 0,08 E-05	1.5 ± 0.12 E-05
MCF-7	Mama	1,3 ± 0,08 E-05	2.1 ± 0.58 E-05
MDA-MB-231	Mama	1,3 ± 0,11 E-05	2.1 ± 0.09 E-05
MDA-MB-435	Mama	1,5 ± 0,41 E-05	5.8 ± 0.63 E-06
MDA-MB-468	Mama	8,7 ± 0,01 E-06	1.4 ± 0.04 E-05
NCI/ADR-RES	Mama	1,4 ± 0,08 E-05	1.9 ± 0.05 E-05
SK-BR-3	Mama	1,2 ± 0,25 E-05	1.3 ± 0.11 E-05
T-47D	Mama	1,1 ± 0,29 E-05	1.4 ± 0.08 E-05
SF-268	SNC	8,9 ± 0,42 E-06	2.9 ± 0.27 E-05
SF-295	SNC	8,1 ± 0,15 E-06	1.5 ± 0.25 E-05
SF-539	SNC	6,6 ± 0,32 E-06	1.3 ± 0.18 E-05
SNB-19	SNC	1,5 ± 0,05 E-05	1.5 ± 0.01 E-05
SNB-75	SNC	1,5 ± 0,08 E-05	1.5 ± 0.05 E-05
U251	SNC	1,6 ± 0,01 E-05	1.6 ± 0.01 E-05

COLO-205	Colon	$1,3 \pm 0,11 \text{ E-05}$	$1.4 \pm 0.05 \text{ E-05}$
HCT-15	Colon	$4,8 \pm 2,10 \text{ E-06}$	$1.3 \pm 0.11 \text{ E-05}$
HCT-116	Colon	$6,0 \pm 1,10 \text{ E-06}$	$8.1 \pm 1.60 \text{ E-06}$
HT-29	Colon	$1,5 \pm 0,12 \text{ E-05}$	$2.7 \pm 0.52 \text{ E-05}$
KM12	Colon	$1,6 \pm 0,05 \text{ E-05}$	$1.5 \pm 0.04 \text{ E-05}$
SW-620	Colon	$8,8 \pm 0,74 \text{ E-06}$	$1.3 \pm 0.21 \text{ E-05}$
CCRF-CEM	Leucemia	$6,1 \pm 0,04 \text{ E-06}$	$1.8 \pm 1.1 \text{ E-05}$
HL-60	Leucemia	$1,2 \pm 0,05 \text{ E-05}$	$1.4 \pm 0.28 \text{ E-05}$
K-562	Leucemia	$4,6 \pm 1,60 \text{ E-06}$	$1.4 \pm 0.24 \text{ E-05}$
MOLT-4	Leucemia	$1,5 \pm 0,07 \text{ E-05}$	$1.7 \pm 0.34 \text{ E-05}$
LOX IMVI	Melanoma	$1,1 \pm 0,04 \text{ E-05}$	$8.7 \pm 0.33 \text{ E-06}$
M14	Melanoma	$7,5 \pm 0,30 \text{ E-06}$	$7.0 \pm 0.18 \text{ E-06}$
MALME-3M	Melanoma	$8,7 \pm 0,33 \text{ E-06}$	$1.3 \pm 0.20 \text{ E-05}$
SK-MEL-2	Melanoma	$1,4 \pm 0,04 \text{ E-05}$	$1.6 \pm 0.01 \text{ E-05}$
SK-MEL-5	Melanoma	$1,4 \pm 0,20 \text{ E-05}$	$1.6 \pm 0.05 \text{ E-05}$
SK-MEL-28	Melanoma	$1,2 \pm 0,11 \text{ E-05}$	$1.5 \pm 0.08 \text{ E-05}$
UACC-62	Melanoma	$1,6 \pm 0,05 \text{ E-05}$	$1.6 \pm 0.04 \text{ E-05}$
UACC-257	Melanoma	$3,7 \pm 0,07 \text{ E-06}$	$6.1 \pm 0.14 \text{ E-06}$
RPMI-8226	MM	$5,9 \pm 0,67 \text{ E-06}$	$2.9 \pm 0.19 \text{ E-06}$
A549	Células no pequeñas de pulmón	$1,3 \pm 0,18 \text{ E-05}$	$2.0 \pm 0.41 \text{ E-05}$
EKVX	Células no pequeñas de pulmón	$1,6 \pm 0,04 \text{ E-05}$	$1.7 \pm 0.08 \text{ E-05}$
HOP-62	Células no pequeñas de pulmón	$1,3 \pm 0,11 \text{ E-05}$	$1.6 \pm 0.05 \text{ E-05}$
HOP-92	Células no pequeñas de pulmón	$6,2 \pm 0,55 \text{ E-06}$	$1.5 \pm 0.04 \text{ E-05}$
NCI-H23	Células no pequeñas de pulmón	$8,8 \pm 0,56 \text{ E-06}$	$1.4 \pm 0.07 \text{ E-05}$
NCI-H322M	Células no pequeñas de pulmón	$1,1 \pm 0,04 \text{ E-05}$	$2.9 \pm 0.18 \text{ E-05}$
NCI-H226	Células no pequeñas de pulmón	$8,7 \pm 0,27 \text{ E-06}$	$1.7 \pm 0.05 \text{ E-05}$
NCI-H460	Células no pequeñas	$1,3 \pm 0,15 \text{ E-05}$	$1.7 \pm 0.32 \text{ E-05}$

	de pulmón		
NCI-H522	Células no pequeñas de pulmón	$1,1 \pm 0,08 \text{ E-05}$	$1.5 \pm 0.17 \text{ E-05}$
IGR-OV1	Ovarios	$6,2 \pm 0,19 \text{ E-06}$	$1.1 \pm 0.04 \text{ E-05}$
OVCAR-3	Ovarios	$1,2 \pm 0,17 \text{ E-05}$	$1.8 \pm 0.21 \text{ E-05}$
OVCAR-5	Ovarios	$6,5 \pm 0,27 \text{ E-06}$	$8.2 \pm 0.20 \text{ E-06}$
OVCAR-8	Ovarios	$1,5 \pm 0,08 \text{ E-05}$	$1.6 \pm 0.18 \text{ E-05}$
SK-OV-3	Ovarios	$1,2 \pm 0,12 \text{ E-05}$	$1.8 \pm 0.16 \text{ E-05}$
DU-145	Próstata	$1,3 \pm 0,16 \text{ E-05}$	$2.9 \pm 0.11 \text{ E-05}$
PC-3	Próstata	$1,4 \pm 0,08 \text{ E-05}$	$1.6 \pm 0.05 \text{ E-05}$
786-0	Renal	$2,6 \pm 0,22 \text{ E-05}$	$1.7 \pm 0.12 \text{ E-05}$
A498	Renal	$3,3 \pm 0,11 \text{ E-05}$	$3.1 \pm 0.18 \text{ E-05}$
ACHN	Renal	$1,5 \pm 0,01 \text{ E-05}$	$3.5 \pm 0.0 \text{ E-05}$
CAKI-1	Renal	$1,2 \pm 0,12 \text{ E-05}$	$3.3 \pm 0.19 \text{ E-05}$
SN12C	Renal	$6,7 \pm 0,17 \text{ E-06}$	$1.1 \pm 0.08 \text{ E-05}$
TK-10	Renal	$1,5 \pm 0,04 \text{ E-05}$	$1.4 \pm 0.07 \text{ E-05}$
UO-31	Renal	$1,3 \pm 0,15 \text{ E-05}$	$1.6 \pm 0.05 \text{ E-05}$
DMS 114	Células pequeñas de pulmón	$1,5 \pm 0,13 \text{ E-05}$	$8.8 \pm 0.49 \text{ E-06}$
SHP-77	Células pequeñas de pulmón	$8,1 \pm 0,88 \text{ E-06}$	$1.3 \pm 0.19 \text{ E-05}$

CITOTOXICIDAD IN VITRO DE LOS COMPUESTOS 6, 8, 40, 41 Y 44 EN LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA (B16-F1, MALM-3M), CÁNCER DE COLON (HCT-116, SW260), HEPATOMA (HepG2), GLIOBLASTOMA (SF268) Y CÁNCER DE PULMÓN (NCI-H460).

Se siguió el método SRB (Wieland, V., *et al.* Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity. Chemosensitivity, volumen 1, In Vitro Assays. Methods in Molecular Medicine. Editado por Rosalyn D. Blumenthal. Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, 2005).

Se sembraron células en microplacas de 96 pocillos. En cada pocillo, según el tipo de célula, se sembró un número específico de células en 200 microlitros. En estas condiciones, se cultivaron las células durante 3 días, con el objetivo de alcanzar su fase de crecimiento exponencial para someter a ensayo la citotoxicidad del

producto. Se prepararon concentraciones del producto justo el día de los tratamientos, tras descongelar las disoluciones madre. (10 mM). Tras recoger la microplaca con las células sembradas durante 3 días, se desechó el medio de cultivo y se reemplazó por 150 µl de medio de medio nuevo en cada pocillo. A esto le siguió la adición de 50 µl de la dilución del producto correspondiente de modo que la concentración final en el volumen final de 200 microlitros en cada pocillo fuese la programada. Los productos, a las concentraciones sometidas a ensayo, estuvieron en contacto con la monocapa en crecimiento de células durante 72 y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂. Finalmente, se detuvo el crecimiento de las células añadiendo 50 µl de TCA frío (ácido tricloroacético) al 50%, (concentración final del 10% en el pocillo). Entonces se mantuvo la microplaca a 4°C durante más de 60 min. para fijar las proteínas celulares hasta la iniciación del lavado y la tinción con SRB.

Viabilidad celular (%) = (población de células del pocillo tratado / población de células máxima de la curva patrón) x 100.

Se calcularon valores de viabilidad medios para cada concentración a partir de los valores obtenidos para cada pocillo en el que se sometió a ensayo esa concentración.

Se muestran en la tabla 2 las concentraciones CI50 para los compuestos sometidos a prueba en los siete tipos de células diferentes.

Tabla 2. CI50 (micromolar) en la selección de líneas celulares

Líneas celulare s	Compuesto 8	Compuesto 6	Compuesto 40	Compuesto 44	Compuesto 41
B16-F1	CI ₅₀ =14 µM	CI ₅₀ =16 µM	CI ₅₀ =9 µM	CI ₅₀ =8 µM	CI ₅₀ =6 µM
HepG2	50µM>CI ₅₀ >5 µM	50µM>CI ₅₀ >5 M	50µM>CI ₅₀ >5 µM	50µM>CI ₅₀ >5 µM	50µM>CI ₅₀ >5 µM
Malm- 3M	CI ₅₀ =16 µM	CI ₅₀ =13 µM	CI ₅₀ =30 µM	CI ₅₀ =40 µM	CI ₅₀ =44 µM
SF268	50µM>CI ₅₀ >5 µM	CI ₅₀ =29 µM	CI ₅₀ =33 µM	CI ₅₀ =31 µM	CI ₅₀ =17 µM
SW260	50µM>CI ₅₀ >5 µM	CI ₅₀ =13 µM	CI ₅₀ >50 µM	CI ₅₀ >50 µM	50µM>CI ₅₀ >5 µM
HCT116	50µM>CI ₅₀ >5 µM	CI ₅₀ =8.1 µM	50µM>CI ₅₀ >5 µM	50µM>CI ₅₀ >5 µM	50µM>CI ₅₀ >5 µM

NCI- H460	50µM>CI ₅₀ >5 µM	CI ₅₀ =17 µM	CI ₅₀ =8,1 µM	CI ₅₀ =9,4 µM	CI ₅₀ =2 µM
--------------	--------------------------------	-------------------------	--------------------------	--------------------------	------------------------

CÉLULAS NO TUMORALES HUMANAS (SELECCIÓN SECUNDARIA)

Se estudió la citotoxicidad de los compuestos para células no tumorales humanas en fibroblastos, células HUVEC y PBL (linfocitos de sangre periférica). Los compuestos sometidos a prueba muestran cierta citotoxicidad frente a HUVEC y fibroblastos en el intervalo de 10⁻⁵ M. Con respecto a otros PBL, los compuestos apenas afectan a PBL incluso a 10⁻⁴ M. Debido a que los compuestos inducen apoptosis en líneas celulares de cáncer hematológico al intervalo de concentración 10⁻⁵-10⁻⁶ M, estos datos muestran una ventana terapéutica para cánceres hematológicos en comparación con células sanguíneas normales.

Se obtuvieron células HUVEC tratando cordones umbilicales humanos con colagenasa tipo I, al 0,1% en medio de Hank incubando 20 minutos a 37°C. Se recogieron las células después de eso y se cultivaron en medio M199 con complementos de FBS al 20%, P/S al 1% y 25 mg/500 ml de medio ECGF. Se hicieron crecer las células sobre una matriz de gelatina al 0,2%.

Se sembraron distintas cantidades de células en crecimiento exponencial en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos en un volumen final de 100 µl, y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂/95% de aire durante 24 h para permitir que las células se adhiriesen a las placas. Entonces, se incubaron las células con diferentes concentraciones del compuesto sometido a ensayo a 37°C bajo la atmósfera de 5% de CO₂/95% de aire durante 72 h. Se cuantificó la proliferación celular usando el kit de proliferación celular XTT (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se añadió a cada pocillo una disolución de mezcla recién preparada (50 µl) de reactivo de marcaje XTT y reactivo de acoplamiento electrónico PMS (metilsulfato de *N*-metildibenzopirazina). Se incubaron adicionalmente las mezclas resultantes durante 4 h en una atmósfera humidificada (37°C, 5% de CO₂), y se midió la absorbancia del producto de formazán generado con un lector de placas de microtitulación a una longitud de onda de prueba de 490 nm y una longitud de onda de referencia de 655 nm. Se calculó entonces la CI₅₀ (concentración inhibidora del 50%) como la concentración de fármaco que provocaba una inhibición del 50% de la proliferación celular. Los datos se

muestran como valores medios de cuatro experimentos independientes realizados cada uno por triplicado. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. CI50 para células no tumorales humanas

Compuesto	CI ₅₀ (M)	
	HUVEC	Fibroblastos
Compuesto 3	1.6 ± 0.1 x 10 ⁻⁵	1.9 ± 0.3 x 10 ⁻⁵
Compuesto 40	3.6 ± 0.3 x 10 ⁻⁵	---
Compuesto 44	55 ± 0.4 x 10 ⁻⁵	---
Compuesto 41	52 ± 0.1 x 10 ⁻⁵	---
Compuesto 6	2.7 ± 0.1 x 10 ⁻⁵	2.4 ± 0.3 x 10 ⁻⁵
Doxorubicina	2.3 ± 0.1 x 10 ⁻⁷	---
Taxol	4.7 ± 0.7 x 10 ⁻¹⁰	7.5 ± 0.5 x 10 ⁻¹⁰

Para aislar linfocitos de sangre periférica normales (PBL), se obtuvieron células mononucleares a partir de sangre periférica humana reciente de voluntarios sanos mediante centrifugación en gradientes de densidad de Ficoll-Hypaque, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se resuspendieron en medio RPMI-1640 que contenía FBS inactivado con calor al 10% (v/v), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml tal como se describe (Cabaner *et al. Br. J. Pharmacol* 127:813-825.1999). Se eliminaron los monocitos mediante adherencia a disco de cultivo tras incubación durante la noche. Se lavaron las células no adherentes (linfocitos) con PBS se recogieron. Las preparaciones de PBL contenían normalmente el 70-75% de CD3⁺, el 24-29% de CD19⁺ y menos del 0,4% de CD14⁺.

Tabla 4. Efecto de los compuestos 3 y 6 sobre PBL humanos en reposo.

Compuesto	% Apoptosis PBLs	
	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M
Compuesto 3	7.5	1.3
Compuesto 6	7.2	4.1
Doxorubicina	21.7	13.2

El compuesto 3 apenas afecta a los PBL incluso a 10⁻⁴ M, mostrando de nuevo menos citotoxicidad que la doxorubicina. Debido a que este compuesto induce la

apoptosis en líneas celulares de cáncer hematológico al intervalo de concentración de 10^{-6} M, estos datos muestran una ventana terapéutica para cánceres hematológicos en comparación con células sanguíneas normales.

ACTIVIDAD ANTITUMORAL *IN VIVO* DEL COMPUESTO 3 EN UN MODELO ANIMAL DE XENOINJERTO DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA.

Se cultivó la línea celular EHEB de leucemia linfocítica crónica (LLC) en medio RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (v/v), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 μ g/ml a 37°C en un 95% de aire humidificado y un 5% de CO₂. Se sometieron a prueba periódicamente las células para detectar infección por *Mycoplasma* y se encontró que eran negativas. Ratones CB17 con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) (Charles River laboratories, Lyon, Francia), mantenidos y manejados según directrices institucionales, cumpliendo la legislación española bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h a una temperatura de 22°C, recibieron una dieta convencional y agua acidificada a voluntad. Se inoculó a los ratones CB17-SCID por vía subcutánea en la parte inferior de su espalda $1,5 \times 10^7$ células EHEB en 100 μ l de PBS y 100 μ l de matriz de membrana basal Matrigel (Becton Dickinson). Cuando eran palpables tumores, se asignaron aleatoriamente los ratones en cohortes de 10 ratones cada una, recibiendo la administración i.v. (3 veces/semana) del compuesto en la cola. El volumen usado para cada administración i.v. fue de 200 μ l, que producían una concentración de fármaco final de 2,5 mg/kg (peso corporal). Se procesaron en paralelo ratones a los que se les administró por vía i.v. un volumen igual de vehículo. Se midieron el diámetro más corto y más largo del tumor con calibres, y se calculó el volumen tumoral (10^{-3} cm³) usando la siguiente fórmula convencional: (el diámetro más corto)² × (el diámetro más largo) × 0,5. Se sacrificaron los animales, según directrices institucionales, cuando el diámetro de sus tumores alcanzó 3 cm o cuando se observó toxicidad significativa. Se monitorizaron el peso corporal del animal y cualquier signo de morbilidad. El tratamiento farmacológico duró 41 días. Entonces, se aislaron xenoinjertos de tumor, se midieron y pesaron, y se llevó a cabo un análisis de necropsia que implicaba tumores y distintos órganos. Todos los valores se expresaron como medias $\pm$ DE. Se sometieron a ensayo las diferencias estadísticas entre grupos usando la prueba de Mann-Whitney o la prueba de la t de Student. Un valor de p inferior a 0,05 se consideró

estadísticamente significativo. Los resultados se representan en la figura 1. El compuesto 3 inhibió significativamente (**, $p < 0,01$) el crecimiento tumoral de LLC en comparación con el grupo control (tratado con vehículo).

Tras la finalización del ensayo *in vivo*, se sacrificaron los ratones control y tratados con compuesto 3, se aislaron xenoinjertos de tumores y se midieron el peso y el volumen tumorales, mostrando una reducción notable y significativa ($p < 0,01$) en el peso y tamaño tumorales en ratones tratados con compuesto 3 en comparación con ratones no tratados control.

	CLL xenoinjerto de ratón		
	Control	Compuesto 3	Inhibición (%)
Tumor Volumen (cm ³)	1.939	0.487	74.88**
Tumor Peso (g)	1.89	0.932	50.69**

** $p < 0.01$ (test de Student)

Una vez que se sacrificaron los animales, se llevó a cabo un análisis de necropsia que implicaba tumores y distintos órganos. No se detectaron acontecimientos ni cambios significativos en los distintos órganos analizados tras el análisis de necropsia. El peso de los ratones era similar tanto en ratones tratados como en ratones control no tratados. Estos datos sugieren la falta de efectos secundarios significativos en el tratamiento de ratones con el compuesto 3. Los tumores aislados de ratones tratados con compuesto 3 mostraron muy poca vascularización en comparación con ratones control que llevaban el tumor libres de fármaco, lo que sugiere que el compuesto 3 puede tener actividades antiangiogénicas que podrían potenciar sus actividades citotóxicas antitumorales. Estos resultados indican que el compuesto 3 presenta una actividad antitumoral *in vivo* significativa y potente en un modelo de ratón de xenoinjerto de LLC. Además, el tratamiento de ambos fármacos se toleraba bien y no se detectó toxicidad aparente en estudios de necropsia.

Para todos los días de medición, la diferencia del compuesto 3 con respecto al control fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

ACTIVIDAD ANTITUMORAL IN VIVO DEL COMPUESTO 3 ES UN MODELO ANIMAL DE XENOINJERTO DE MIELOMA MÚLTIPLE

Se cultivó la línea celular MM1S de mieloma múltiple (MM) en medio RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (v/v), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml a 37°C en un 95% de aire humidificado y un 5% de CO₂. Se sometieron a prueba periódicamente las células para detectar infección por *Mycoplasma* y se encontró que eran negativas.

Ratones CB17 con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) (Charles River laboratories, Lyon, Francia), mantenidos y manejados según directrices institucionales, cumpliendo la legislación española bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h a una temperatura de 22°C, recibieron una dieta convencional y agua acidificada a voluntad. Se inoculó a los ratones CB17-SCID por vía subcutánea en la parte inferior de su espalda 3 x 10⁷ células MM1S en 100 µl de PBS y 100 µl de matriz de membrana basal Matrigel (Becton Dickinson). Cuando eran palpables tumores, se asignaron aleatoriamente los ratones en cohortes de 10 ratones cada una, recibiendo la administración i.v. (3 veces/semana) del compuesto en la cola. El volumen usado para cada administración i.v. fue de 200 µl, que producían una concentración de fármaco final de 2,5 mg/kg (peso corporal). Se procesaron en paralelo ratones a los que se les administró por vía i.v. un volumen igual de vehículo. Se midieron el diámetro más corto y más largo del tumor con calibres, y se calculó el volumen tumoral (10⁻³ cm³) usando la siguiente fórmula convencional: (el diámetro más corto)² × (el diámetro más largo) × 0,5. Se sacrificaron los animales, según directrices institucionales, cuando el diámetro de sus tumores alcanzó 3 cm o cuando se observó toxicidad significativa. Se monitorizaron el peso corporal del animal y cualquier signo de morbilidad. El tratamiento farmacológico duró 1 mes. Entonces, se aislaron tumores, se midieron y pesaron, y se llevó a cabo un análisis de necropsia que implicaba tumores y distintos órganos. Para todos los días de medición, la diferencia del compuesto 3 con respecto al control fue estadísticamente significativa (p<0,05). Los resultados se muestran en la figura 2. La siguiente tabla muestra los datos de tumor ex vivo al final del tratamiento.

	MM1S xenoinjerto de ratón		
	Control	Compuesto 3	Inhibición (%)
Tumor Volumen (cm ³)	3.722	0.288	92.26**

Tumor			
Peso (g)	4.569	0.647	85.84*

* p<0.05 , ** p<0.01 (test de Student)

ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL COMPUESTO 3 SOBRE CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA DE PACIENTES

Se eligió un panel de 6 células de leucemia linfocítica crónica de pacientes humanos que mostraban diferentes patrones de expresión de ZAP70 (véanse los cambios citogenéticos indicados en la tabla 5). Se incubaron las células en presencia de compuesto 3. Los resultados de este estudio, que muestran la viabilidad, se representan en la figura 3.

Tabla 5.

Código de paciente	Edad de diagnóstico	sex	Estadi	% de CD19/C D5	% de ZAP7 0	Alteraciones citogenéticas (FISH)
CLL 07/86	69	M	B/C	95	70	normal
CLL 07/133	46	F	B/C	94	> 20	delección 13q
CLL 07/151	54	M	A	95	19	normal

La disminución de la viabilidad era más significativa en células con una baja expresión de ZAP70, de un modo dependiente de la dosis.

ACTIVIDAD ANTITUMORAL IN VIVO DEL COMPUESTO 3 EN UN MODELO ANIMAL ORTOTÓPICO DE CÁNCER DE COLON CON MUTACIÓN KRAS.

Usando un modelo animal basado en células de cáncer colorrectal de pacientes con mutación Kras, implantadas en ratones en la zona del colon (Yao, M. Cyclooxygenase-2 selective inhibition with NS-398 suppresses proliferation and invasiveness and delays liver metastasis in colorectal cancer. Br. J. Cancer, 2004 Feb 9;90(3):712-9), se sometieron a prueba los efectos del compuesto 3.

Las fotografías de la figura 4A muestran un claro efecto de reducción del volumen tumoral de un cáncer colorrectal humano. Se muestra el efecto comparativo directo del compuesto 3 y dos fármacos antitumorales ampliamente usados diferentes: 5-FU y oxaliplatino (OXA).

El peso tumoral del cáncer de colon humano de ratones tratados con compuesto 3 (NF), oxaliplatino (OXA), 5-F uracilo (5-FU) y combinaciones de los mismos se muestra en la figura 4B.

ACTIVIDAD ANTITUMORAL *IN VIVO* DEL COMPUESTO 3 EN UN MODELO ANIMAL ORTOTÓPICO DE MELANOMA.

Usando un modelo animal basado en células de ratón de melanoma B16 (Szende, B., *et al*, Effect of a novel somatostatin analogue combined with cytotoxic drugs on human tumour xenografts and metastasis of B16 melanoma. British Journal of Cancer (2003) 88, 132 – 136), el compuesto 3 presentó una potente actividad antitumoral *in vivo* en el modelo de ratón ortotópico de melanoma. La dosis de compuesto 3 fue de 30 mg/kg por vía intraperitoneal en todos estos experimentos. Los resultados se muestran en la figura 5.

La figura 5A representa una fotografía de PET de la actividad luciferasa de tumor de melanoma *in vivo*. La intensidad de la señal es superior en tumores con más células proliferativas. La figura 5B muestra tumores de melanoma *ex vivo* de animales al final del tratamiento. La figura 5C es un gráfico que muestra el peso tumoral de melanoma tras tratamiento con compuesto 3 o control. Se llevaron a cabo 4 experimentos diferentes e independientes con n=4 animales por grupo.

ACTIVIDAD ANTITUMORAL *IN VIVO* DEL COMPUESTO 3 EN UN MODELO ANIMAL ORTOTÓPICO DE TUMOR DE OVARIO.

El compuesto 3 presentaba una potente actividad antitumoral *in vivo* reduciendo el área tumoral. Se realizaron experimentos usando células MOSEC ID8 (células epiteliales superficiales de ovario de ratón) con indicadores de luciferasa clonados y células implantadas en la región ovárica de ratones (Yu-Hung Huang *et al*, Claudin-3 gene silencing with siRNA suppresses ovarian tumor growth and metastasis. 3426–3430 PNAS 2009. vol. 106, n.º 9). Los resultados se muestran en la figura 6.

La figura 6A representa una fotografía de Pet de la actividad luciferasa *in vivo* del tumor (ratones tratados con compuesto 3: 30 mg/Kg i.p. 5 días a la semana durante 2 semanas). La figura 6B muestra la cuantificación de la señal de luciferasa a partir de animales tratados con compuesto 3 y control.

MECANISMO DE ACCIÓN

LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER HEMATOLÓGICO.

La incubación del compuesto 3 con diferentes líneas celulares de cáncer hematológico, incluyendo líneas celulares de CLL, MM, leucemia mieloide aguda y de células T aguda, indujo apoptosis, tal como se evaluó por la aparición de células con un contenido en ADN inferior a G1, característico de apoptosis temprana (pico sub-G1; tras 6-9 h de tratamiento). Se indujo más del 20% de apoptosis tras 24 h de tratamiento de compuesto 3 10 μ M con células EHEB (CLL), RPMI-8226 (MM), Jurkat (leucemia de células T aguda) y HL-60 (leucemia mieloide aguda).

La inducción de muerte celular por apoptosis se vio apoyada adicionalmente por la rápida escisión de PARP, un sustrato de la caspasa-3, así como por la activación de la caspasa-3. Cuando se trataron células EHEB con compuesto 3, también se activó la caspasa-9, lo que sugiere la implicación de señalización mediada por mitocondrias intrínseca en la acción farmacológica. La caspasa-4 resultó activada, lo que sugiere una supuesta implicación en el estrés del retículo endoplasmático. De manera interesante, se observó una inducción muy rápida y potente de la autofagia tras el tratamiento con compuesto 3, tal como se evaluó por una fuerte formación de la cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulos lipidada (LC3-II) a lo largo del tiempo de incubación.

Inducción de apoptosis en la línea celular HCT-116 de cáncer de colon humano por el compuesto 3 (Figura 7A): Se incubaron células EHEB durante los tiempos indicados con compuesto 3 10 μ M, y entonces se cuantificó la apoptosis como el porcentaje de células en la región sub-G₁ en el análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. La posición del pico sub-G₁ (hipodiploidia), integrado por células apoptóticas, así como los picos G₀/G₁ y G₂/M, se indican mediante flechas. Se procesaron células control sin tratar en paralelo. Se indica el porcentaje de células con un contenido en ADN inferior a G₁ (sub-G₁) en cada histograma. El experimento mostrado es representativo de tres realizados. En resumen, se centrifugaron las células (5×10^5) y se fijaron durante la noche en etanol al 70% a 4°C. Se lavaron las células 3 veces con PBS, se incubaron durante 1 h con ARNasa A 1 mg/ml y yoduro de propidio 20 μ g/ml a temperatura ambiente, y entonces se analizaron para determinar el ciclo celular con un citómetro de flujo FACS Calibur de Becton Dickinson (San Jose, CA). Se calculó la cuantificación de células apoptóticas como el porcentaje de células en la región sub-G₁ (hipodiploidia) en el análisis del ciclo celular.

Expresión de diferentes proteínas en células EHEB tratadas con compuesto 3 (Figura 7B). Se trataron las células con compuesto 3 $10\ \mu\text{M}$ durante los tiempos indicados y se analizaron mediante inmunotransferencia con anticuerpos específicos para las proteínas indicadas. Se indican las posiciones de migración de las diferentes proteínas. Se usó β -actina como control de carga. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos realizados.

CÉLULAS DE CARCINOMA DE COLON.

Los resultados obtenidos indican que el compuesto 3 induce apoptosis en líneas celulares de carcinoma de colon humano (SW620, HCT-116), tal como se evalúa por la aparición de un pico sub-G₁ (hipodiploidia) en el análisis del ciclo celular y por la activación de caspasas. Se sugiere una supuesta implicación de la señalización apoptótica intrínseca mediada por mitocondrias en la apoptosis mediada por el compuesto 3 mediante la inducción de la caspasa-9. Además, el compuesto 3 indujo la expresión del producto génico más corto cortado y empalmado de manera alternativa de la leucemia de células mieloides 1 (Mcl-1), denominado Mcl-1S (corto), que es un promotor de la apoptosis. El nivel de proteína de p53 también aumentó con el tratamiento con compuesto 3. Resumiendo, estos datos indican que el compuesto 3 promueve la regulación por incremento de Mcl-1S y p53, lo que podría estar implicado en la destrucción de células de cáncer de colon.

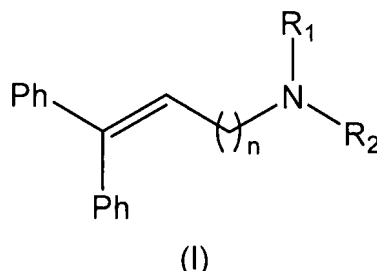
Inducción de apoptosis en la línea celular HCT-116 de cáncer de colon humano por el 3 (Figura 8A). Se cuantificó la inducción de apoptosis como el porcentaje de células en la región sub-G₁ (hipodiploidia) del análisis del ciclo celular. En resumen, se centrifugaron las células (5×10^5) y se fijaron durante la noche en etanol al 70% a 4°C . Se lavaron las células 3 veces con PBS, se incubaron durante 1 h con ARNasa 1 mg/ml y yoduro de propidio $20\ \mu\text{g/ml}$ a temperatura ambiente, y entonces se analizaron para determinar el ciclo celular con un citómetro de flujo FACSCalibur de Becton Dickinson (San Jose, CA). Se incubaron células HCT-116 durante los tiempos indicados con el compuesto 3, y entonces se cuantificó la apoptosis como el porcentaje de células en la región sub-G₁ en el análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo (hipodiploidia), integrado por células apoptóticas, así como los picos G₀/G₁ y G₂/M, se indican mediante flechas. Se procesaron células control sin tratar en paralelo. Se indica el

porcentaje de células con un contenido en ADN inferior a G1 (sub-G1) en cada histograma. El experimento mostrado es representativo de tres realizados

Expresión de diferentes proteínas relacionadas con la apoptosis durante el tratamiento con compuesto 3 (Figura 8B). Se trataron células HCT-116 y SW620 con compuesto 3 10 μ M durante los tiempos indicados y se analizaron mediante inmunotransferencia con anticuerpos específicos para las proteínas indicadas. Se indican las posiciones de migración de las diferentes proteínas. Se usó β -actina como control de carga. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos realizados. Se sedimentaron aproximadamente 10^7 células mediante centrifugación, se lavaron con PBS y se lisaron. Se procesaron las proteínas (20 μ g) sobre geles de dodecilsulfato de sodio (SDS)-poliacrilamida, se transfirieron a filtros de nitrocelulosa, se bloquearon con leche desnatada al 5% (p/v) en TBST (Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.1%) durante 90 min. a temperatura ambiente, y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C con anticuerpos específicos: anticuerpo monoclonal de ratón anti-poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) (dilución 1:1000) (BD Biosciences Pharmingen); anticuerpo policlonal de conejo anti-Bcl-X_L (dilución 1:500) (BD Biosciences Pharmingen); anticuerpo monoclonal de ratón anti-Bcl-2 (dilución 1:250) (BD Biosciences Pharmingen); anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa-3 (dilución 1:500) (BD Biosciences Pharmingen); anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa-9 (dilución 1:1000) (Oncogene); anticuerpo policlonal de conejo anti-Mcl-1 (dilución 1:1000) (BD Biosciences Pharmingen); anticuerpo monoclonal de ratón anti-p53 (dilución 1:500) (Santa Cruz Biotechnology); anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -actina (dilución 1:5000) (Sigma). Se incubaron anticuerpos-HRP secundarios de ratón, conejo (GE Healthcare) y cabra (Santa Cruz Biotechnology) a dilución 1:5000 en leche desnatada al 5% (p/v) en TBST durante 1 h a temperatura ambiente. Se desarrollaron las señales usando un kit de detección de quimioluminiscencia potenciada (Amersham).

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato del mismo:



en la que:

Ph es fenilo;

n es 2, 3 ó 4;

R₁ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆;

R₂ es un radical de fórmula -[[CH(R₃)]_m-R₄], en la que

m es 1;

R₃, cuando sea apropiado, se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, fenilo y alquilo C₁-C₆;

R₄ se selecciona del grupo que consiste en un radical heteroarilo no sustituido, un radical heteroarilo sustituido y un radical arilo sustituido,

seleccionándose dichos sustituyentes del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆, arialquilo C₇-C₁₁, fenilo, heteroarilo de 5 ó 6 miembros, F, Cl, Br, I, trifluorometilo, ciano, -N(R_a)(R_b), -OR_c, -SR_d o -C(O)R_e; en los que R_a, R_b, R_c, R_d y R_e se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₆, fenilo y trifluorometilo;

o

si R₁ y/o R₃ son distintos de hidrógeno, entonces R₄ también puede ser fenilo no sustituido;

o

R₁ y R₂, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un grupo heteroarilo sustituido o no sustituido, en el que dichos sustituyentes son tal como se definieron anteriormente

con la condición de que:

2-[(4,4-difenil-but-3-enilamino)-metil]-fenol,

3-[(4,4-difenil-but-3-enilamino)-metil]-fenol,

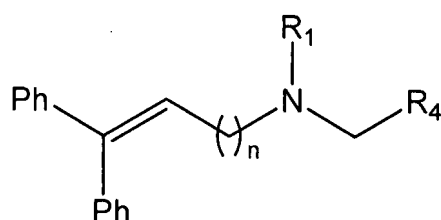
5-[(4,4-difenil-but-3-enilamino)-metil]-2-metoxifenol,

4-[(4,4-difenil-but-3-enilamino)-metil]-2,6-difluoro-fenol,

bencil-(5,5-difenil-pent-4-enil)-etil-amina,
 6-cloro-9-(4,4-difenil-but-3-enil)-9H-purina,
 9-(4,4-difenil-but-3-enil)-9H-purin-6-ilamina, y
 5-(4,4-difenil-but-3-enil)-4,5,6,7-tetrahidro-isoxazolo[4,5-c]piridin-3-ol

no estén incluidos en la fórmula (I).

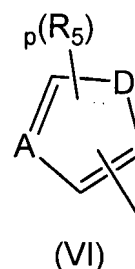
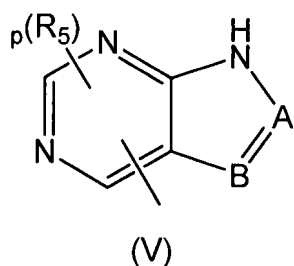
2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que cada uno de dichos sustituyentes se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆, arialquilo C₇-C₁₁, fenilo, heteroarilo de 5 ó 6 miembros, F, Br, I, trifluorometilo, ciano, -N(R_a)(R_b), -OR_c, -SR_d o -C(O)R_e; en los que R_a, R_b, R_d, y R_e se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₆, fenilo y trifluorometilo; y R_c se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆, fenilo y trifluorometilo, siempre que -N(R_a)(R_b) no sea -NH₂.
3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores de fórmula (IA), o una sal, profármaco y/o solvato del mismo



(IA)

en la que Ph, n, R₁ y R₄ son tal como se definieron en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R₄ es un heteroarilo no sustituido o un heteroarilo sustituido seleccionado del grupo que consiste en tienilo, furilo, piridilo, 1H-bencimidazol, 9H-purina, 1H-imidazol y 1H-pirazol[3,4-d]pirimidina.
5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R₄ es un grupo de fórmula (V) o (VI)



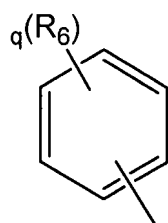
en las que,

A y B se seleccionan independientemente de -CH- y -N-;

D se selecciona independientemente del grupo que consiste en -O-, -S- y -NH-;

p es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 0, 1, 2 ó 3; cada R_5 se selecciona del grupo que consiste en alquilo C_1-C_3 , fenilo, fenilmetilo, heteroarilo de 5 ó 6 miembros, F, Br, I, trifluorometilo, $-N(R_a)(R_b)$, $-SR_d$ o $-C(O)R_e$; en los que R_a , R_b , R_d y R_e se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C_1-C_3 , fenilo y trifluorometilo, siempre que en un compuesto de fórmula (V) $-N(R_a)(R_b)$ no sea $-NH_2$; estando dicho grupo de fórmula (V) o (VI) unido al resto de la molécula a través de cualquiera de las posiciones libres.

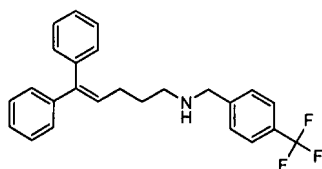
6. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R_1 y R_2 , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un radical seleccionado del grupo que consiste en 1H-bencimidazol, 9H-purina, 1H-imidazol y 1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina.
7. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R_4 es un grupo de fórmula (VII)



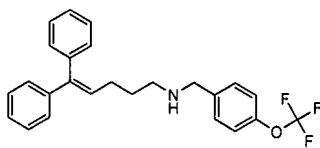
(VII)

en la que R_6 se selecciona del grupo que consiste en $-OCF_3$, O-alquilo C_1-C_3 , F, Cl, Br, I y $-CN$; y q es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 2 ó 3, y dicho grupo de fórmula (VII) está unido al resto de la molécula a través de cualquiera de las posiciones libres.

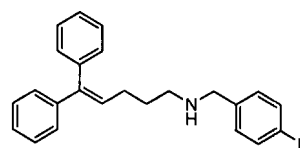
8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R_1 es hidrógeno o metilo.
9. Compuesto según la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en:



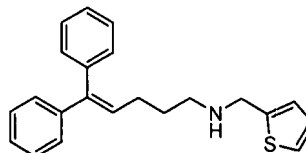
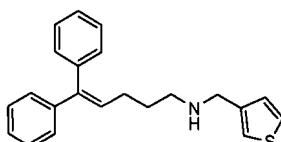
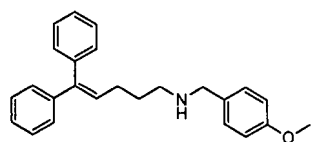
Compuesto 1
(sal de clorhidrato)



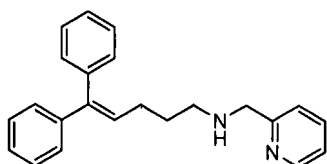
Compuesto 2
(sal de clorhidrato)



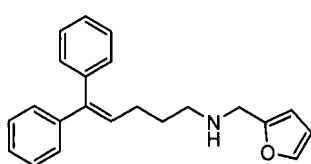
Compuesto 3
(sal de clorhidrato)



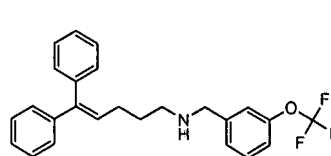
Compuesto 4
(sal de clorhidrato)



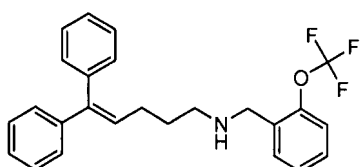
Compuesto 5
(sal de clorhidrato)



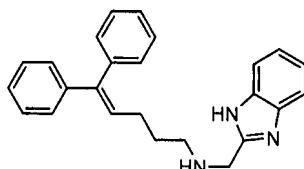
Compuesto 6
(sal de clorhidrato)



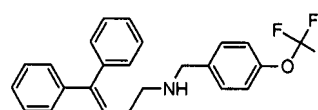
Compuesto 7
(sal de clorhidrato)



Compuesto 8
(sal de clorhidrato)



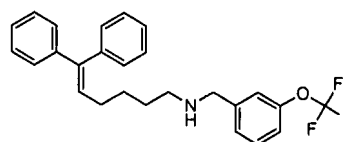
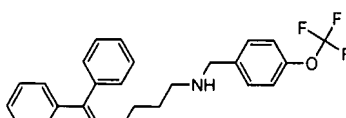
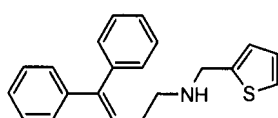
Compuesto 9
(sal de clorhidrato)



Compuesto 10
(sal de clorhidrato)

Compuesto 11
(sal de clorhidrato)

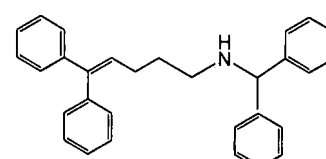
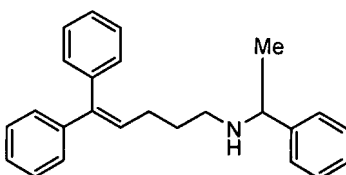
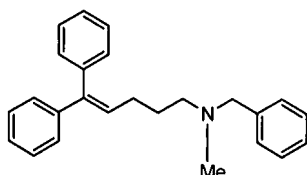
Compuesto 12
(sal de clorhidrato)



Compuesto 13
(sal de clorhidrato)

Compuesto 14
(sal de clorhidrato)

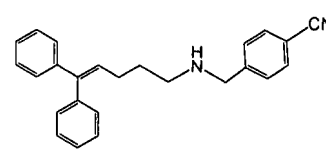
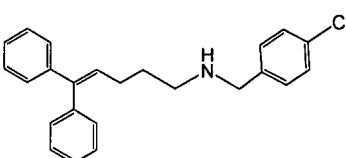
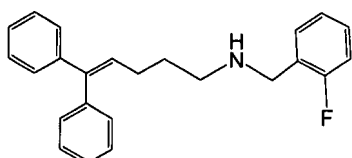
Compuesto 15
(sal de clorhidrato)



Compuesto 16
(sal de clorhidrato)

Compuesto 17
(sal de clorhidrato)

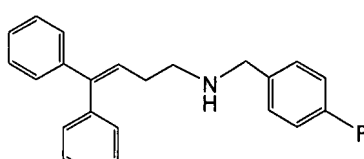
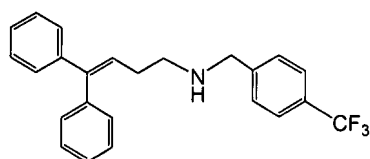
Compuesto 18
(sal de clorhidrato)



Compuesto 19
(sal de clorhidrato)

Compuesto 20
(sal de clorhidrato)

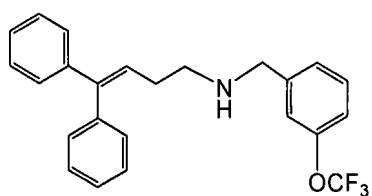
Compuesto 21
(sal de clorhidrato)



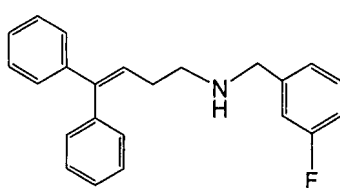
Compuesto 22
(sal de clorhidrato)

Compuesto 23
(sal de clorhidrato)

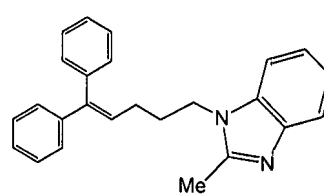




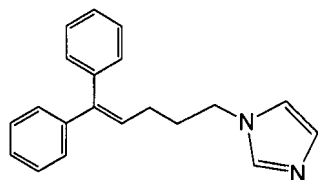
Compuesto 25
(sal de clorhidrato)



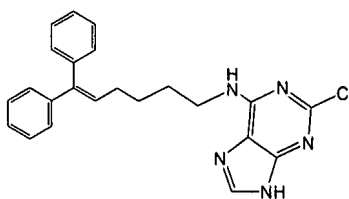
Compuesto 26
(sal de clorhidrato)



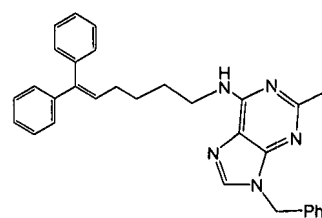
Compuesto 27



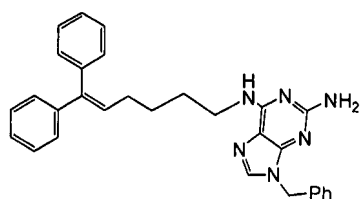
Compuesto 28



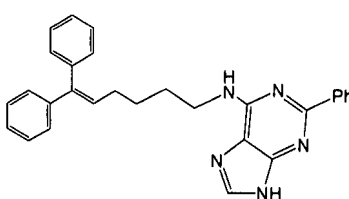
Compuesto 29



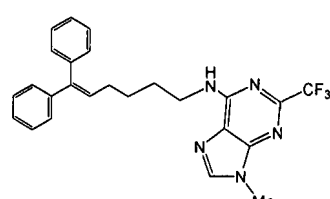
Compuesto 30
(sal de clorhidrato)



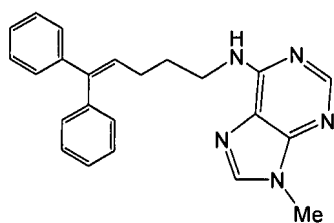
Compuesto 31



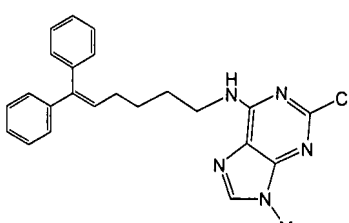
Compuesto 32



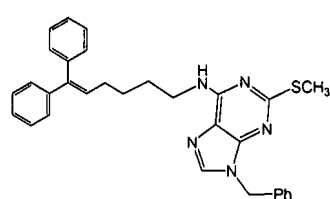
Compuesto 33



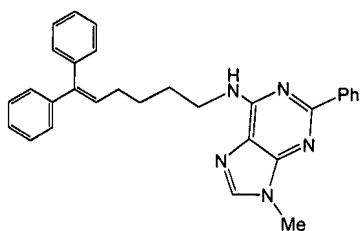
Compuesto 34



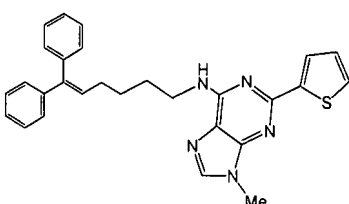
Compuesto 35



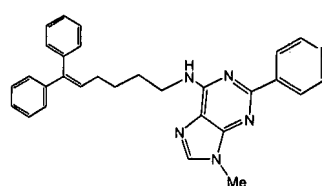
Compuesto 36
(sal de clorhidrato)



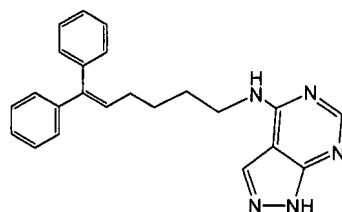
Compuesto 37



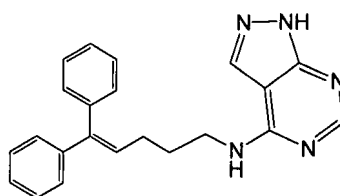
Compuesto 38



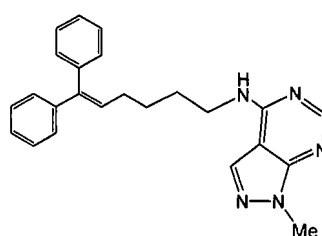
Compuesto 39



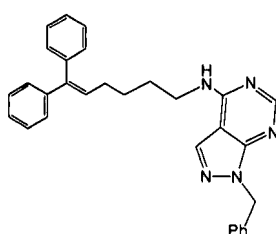
Compuesto 40



Compuesto 41

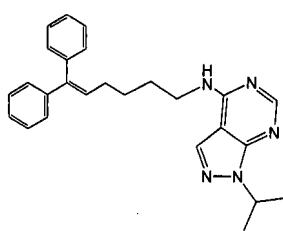


Compuesto 42
(sal de clorhidrato)



Compuesto 43

(sal de clorhidrato)

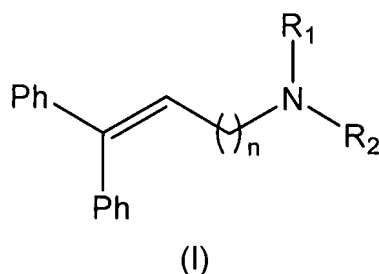


Compuesto 44

(sal de clorhidrato)

o una sal, profármaco y/o solvato del mismo.

10. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.
11. Compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso como medicamento.
12. Compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo:



en la que:

Ph es fenilo;

n es 2, 3 ó 4;

 R_1 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C_1 - C_6 ; R_2 es un radical de fórmula $-[CH(R_3)]_m \cdot R_4$, en la que

m es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 0 ó 2;

cada R_3 , cuando sea apropiado, se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C_1 - C_6 ; R_4 se selecciona del grupo que consiste en un radical heteroarilo no sustituido, un radical heteroarilo sustituido, radical arilo no sustituido y un radical arilo sustituido,seleccionándose dichos sustituyentes del grupo que consiste en alquilo C_1 - C_6 , arialquilo C_7 - C_{11} , fenilo, heteroarilo de 5 ó 6 miembros,

F, Cl, Br, I, trifluorometilo, ciano, $-N(R_a)(R_b)$, $-OR_c$, $-SR_d$ o $-C(O)R_e$; en los que R_a , R_b , R_c , R_d y R_e se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C_1-C_6 , fenilo y trifluorometilo;

o

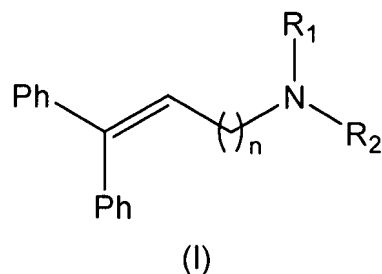
R_1 y R_2 , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un grupo heteroarilo sustituido o no sustituido, en el que dichos sustituyentes son tal como se definieron anteriormente;

para su uso como medicamento para tratar enfermedades inflamatorias.

13. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 12, en el que la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria del intestino (EII), artritis reumatoide (AR), hiperplasia prostática benigna, enfermedad de Barret, asma, reparación de tendones y músculo esquelético, colitis ulcerosa, leishmaniosis y enfermedades autoinmunitarias, preferiblemente enfermedad de Crohn.
14. Compuesto de fórmula (I) según reivindicación 12, para uso en el tratamiento de cáncer.
15. Compuesto según la reivindicación 14, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en metástasis, cáncer de mama, cáncer esofágico, cáncer de colon, carcinomas de colon, cáncer de estómago, leucemias, melanoma, carcinomas del útero, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer ovárico, carcinomas ováricos, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de hígado, carcinomas del páncreas, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de hueso, cáncer de piel, sarcoma, sarcomas de Kaposi, tumores cerebrales, miosarcomas, neuroblastomas, linfomas y mieloma múltiple.

RESUMEN

La invención se refiere a compuestos de fórmula (I):



o una sal, profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, a un método de síntesis de dichos compuestos, a composiciones farmacéuticas que los comprenden y a su uso como medicamento para tratar enfermedades inflamatorias.

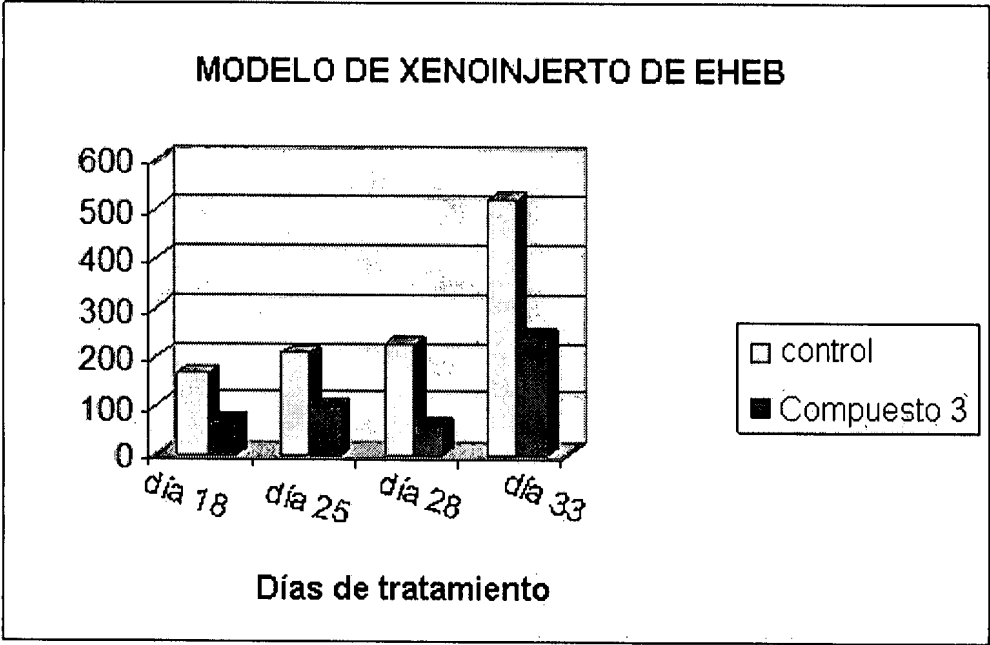


Figura 1

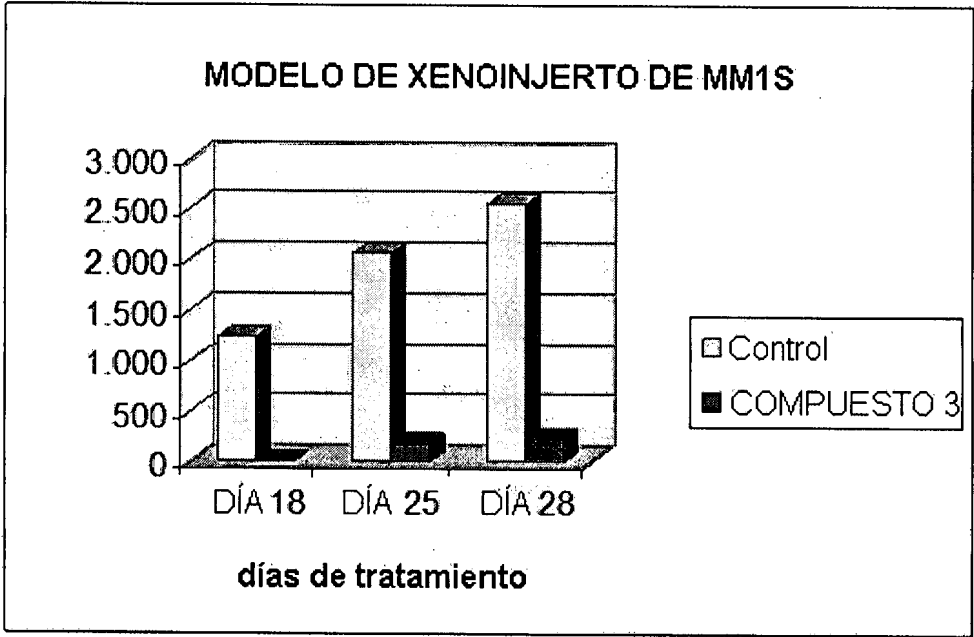


Figura 2

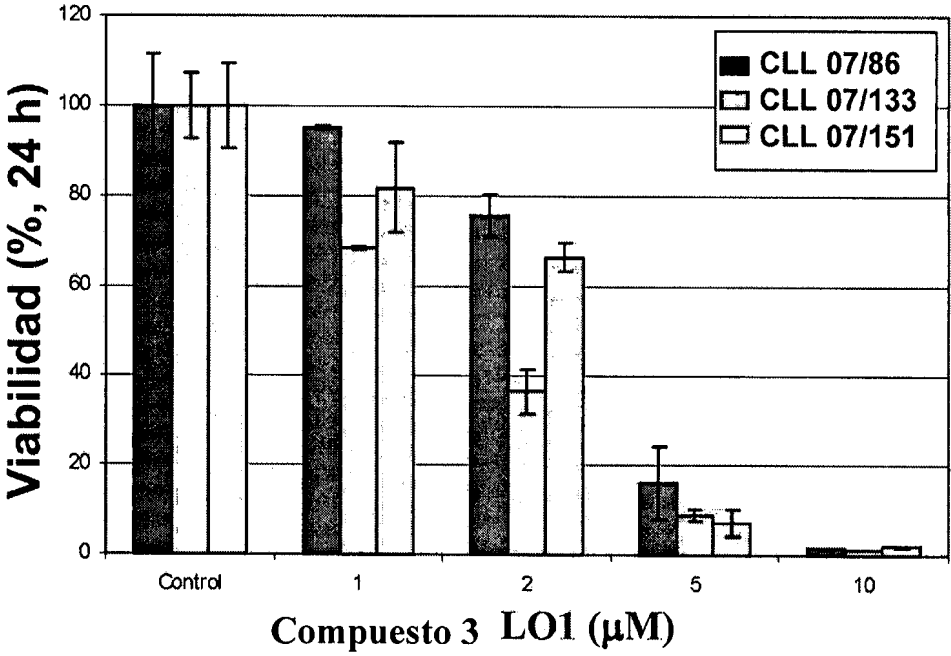
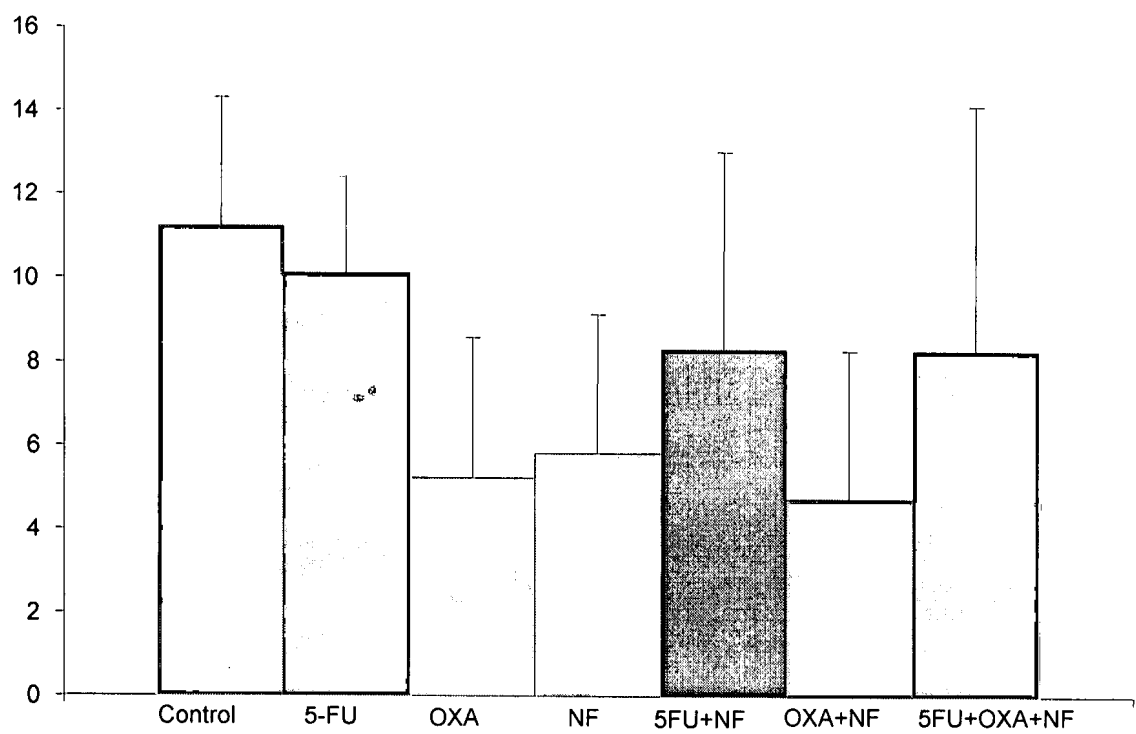
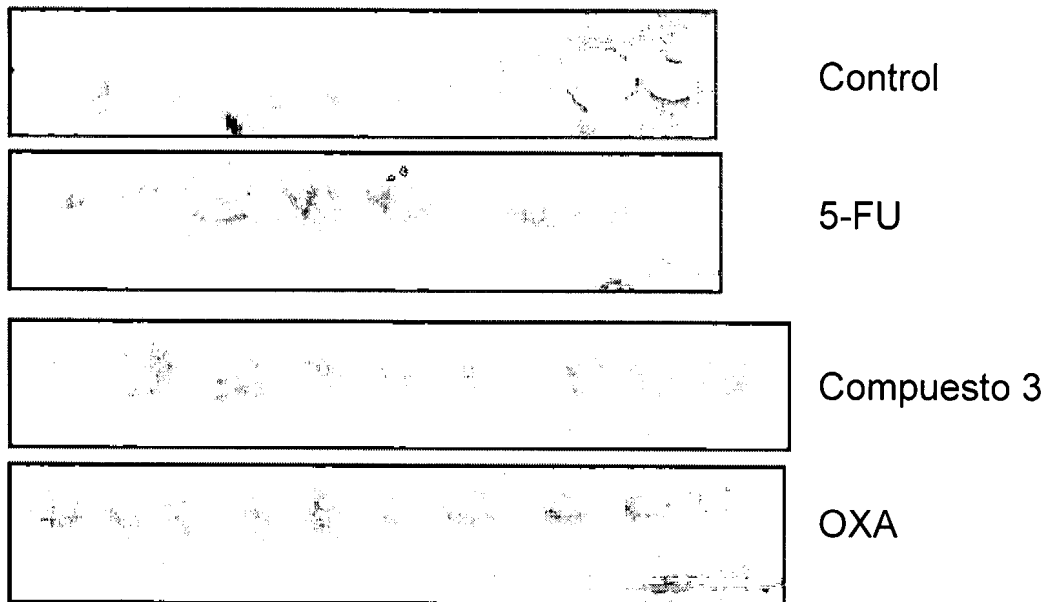


Figura 3

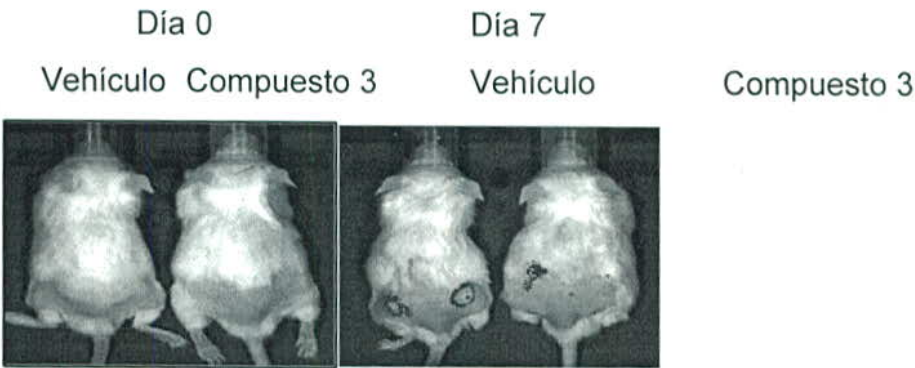
A



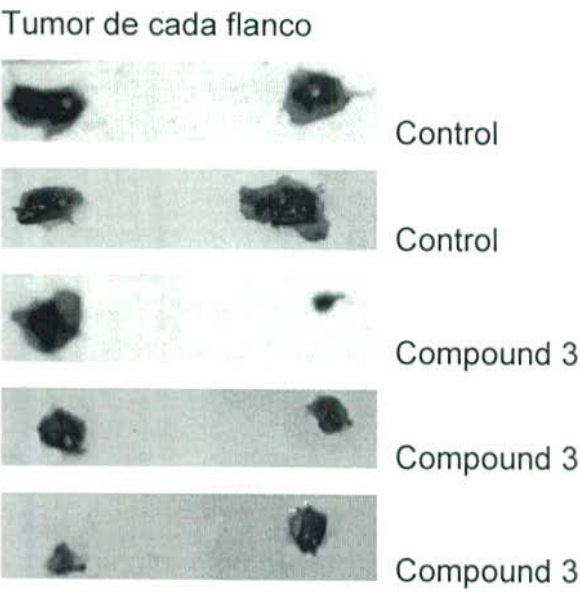
B

Figura 4

A



B



C

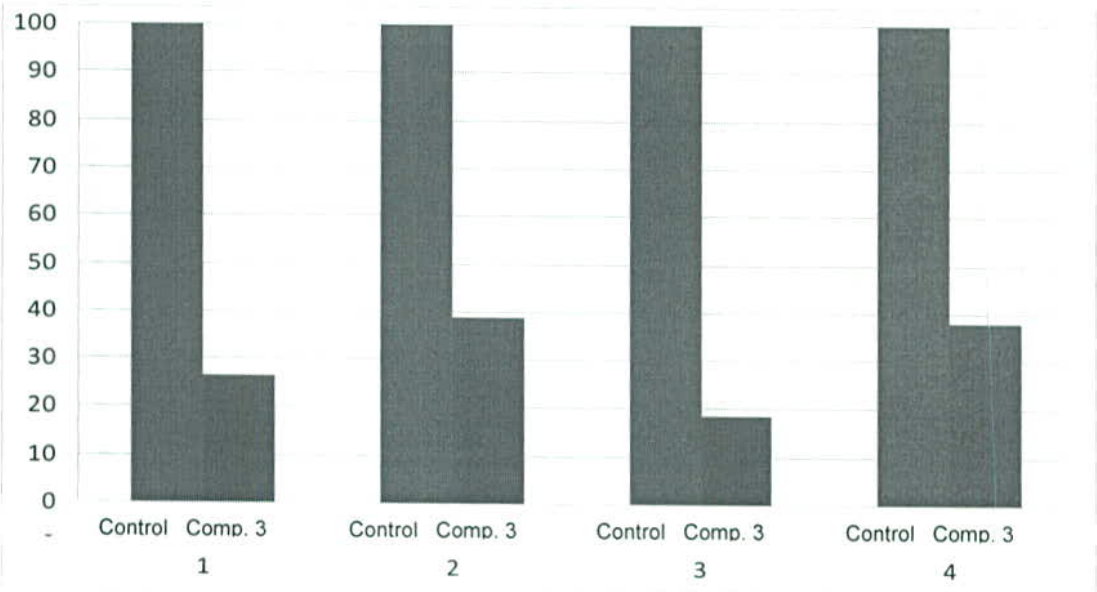
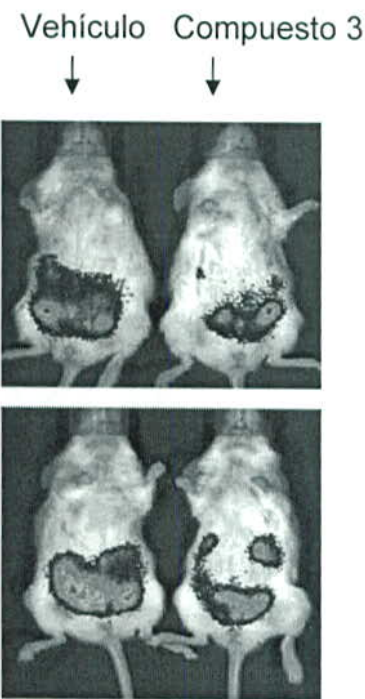


Figura 5

A



B

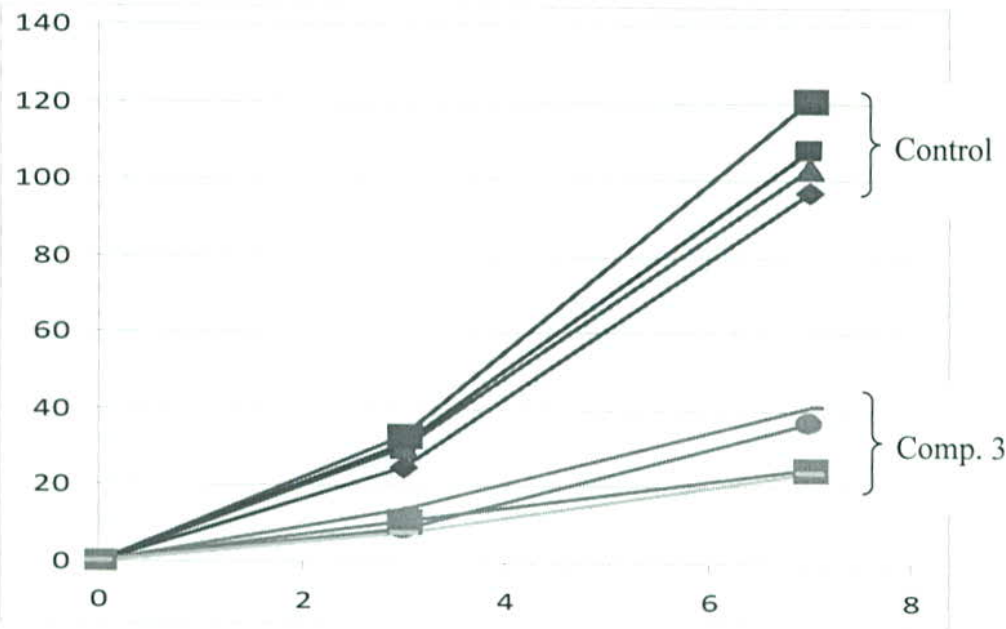


Figura 6

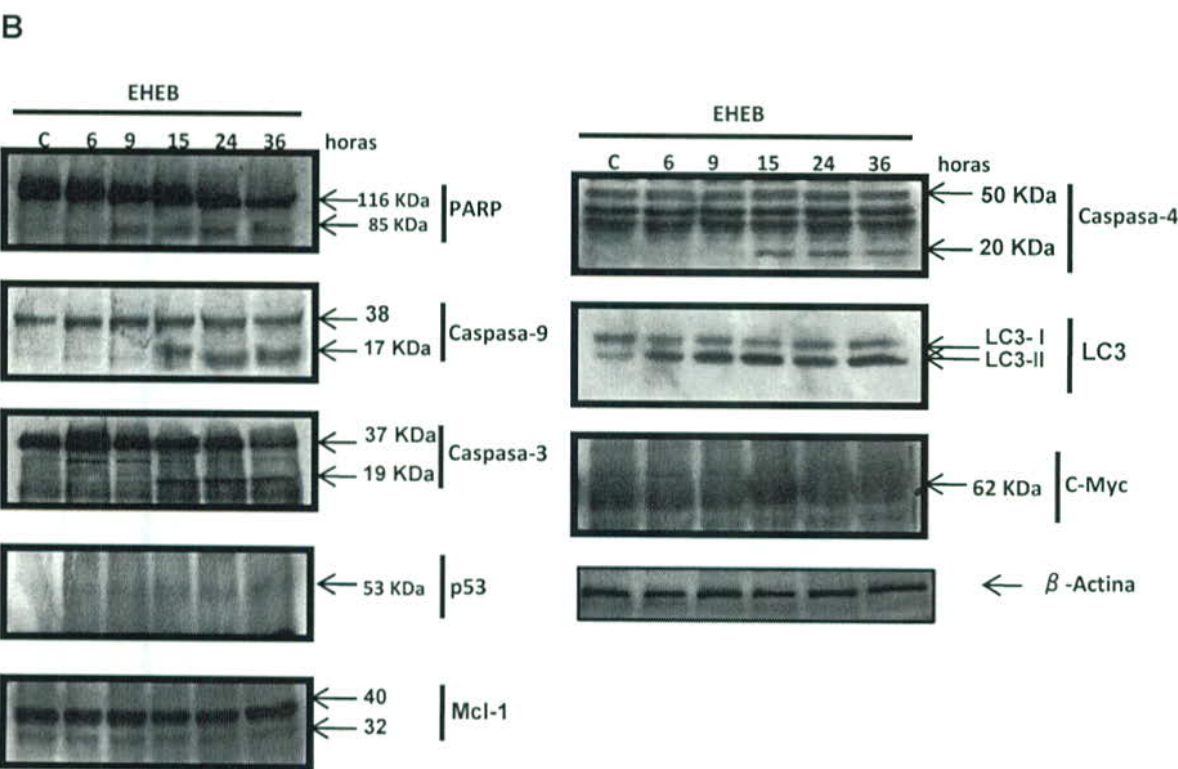
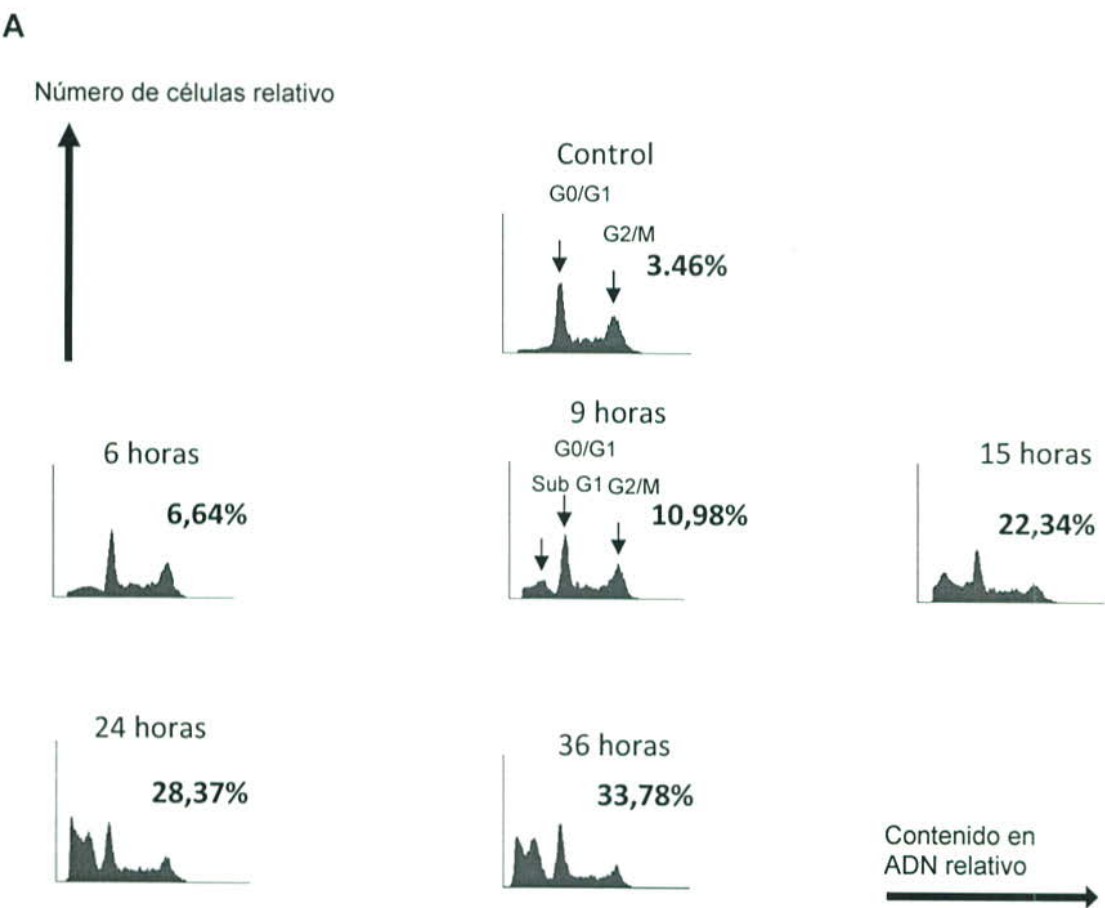
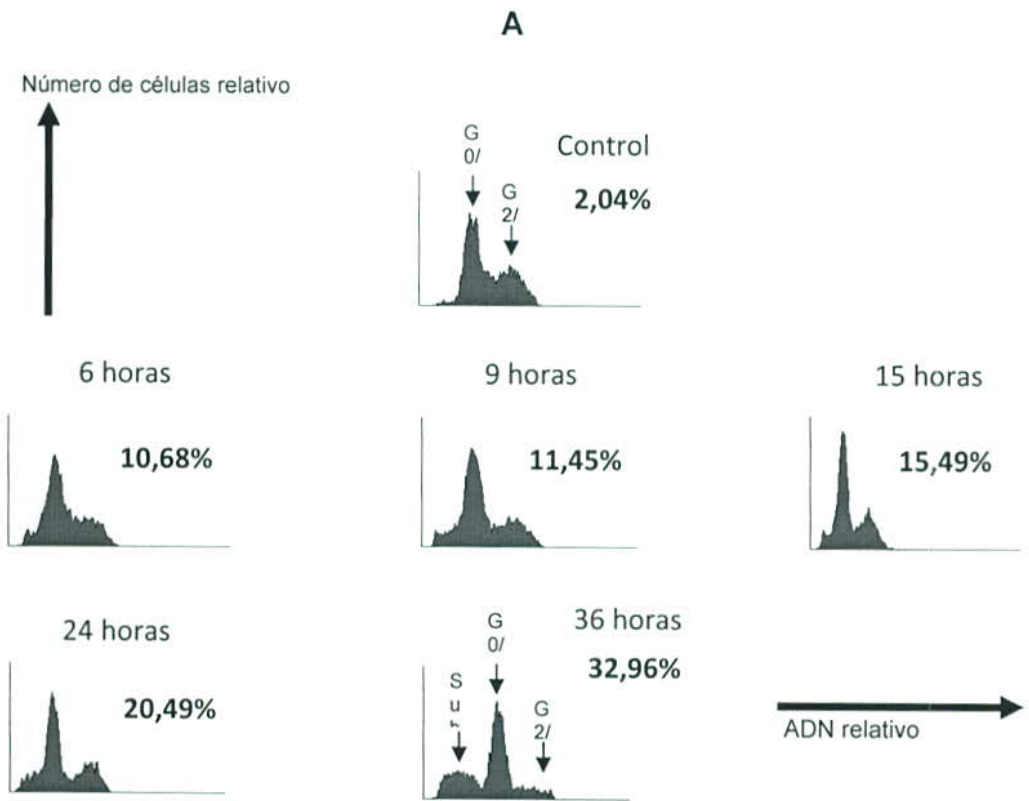


Figura 7



B

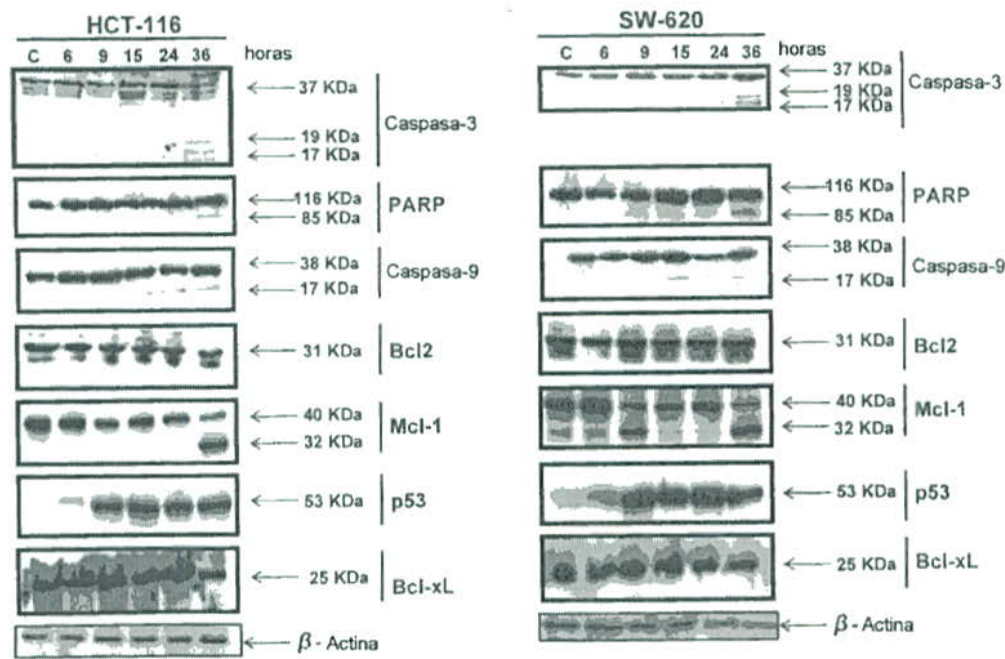


Figura 8

15541

Brigard & Castro
BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros), FAES FARMA, S.A.
domiciliado(s), Máximo Aguirre, 14 E-48940 Lamiako
(Leioa) - Vizcaya, España.

I (We), FAES FARMA, S.A.
domiciled Máximo Aguirre, 14 E-48940 Lamiako (Leioa) -
Vizcaya, Spain.

Nombro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO
y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO, de Bogotá, Colombia,
apoderados verdaderos y legales con poder especial,
amplo y suficiente, para recabar de las oficinas y
autoridades colombianas administrativas, judiciales y de
policia, en cualquier instancia o recurso, la obtención de
patentes de invención, registros de marcas, diseños
industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres
comerciales y enseñanzas, lemas comerciales, nombres
comerciales, registros de derechos de autor y contratos
sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de
variedades vegetales, así como sus prórrogas,
renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre
y/o domicilio y/o dirección; elaborar, tramitar y registrar
contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases;
intervenir como demandante o como demandado en
cualquier instancia y recurso ante cualquier juez,
corporación, funcionario público o autoridad en acciones
judiciales, administrativas y de policía tales como:
oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad,
cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones
derivadas de la obtención o explotación de licencias;
acciones de competencia desleal; demandas penales;
acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y
observaciones a solicitudes de patentes, diseños
industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas
cautelares y en otras acciones o medidas similares.

Hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO
and/or MARTIN E. TORRES CARDOZO, of Bogotá,
Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special,
ample and sufficient power to obtain from the Colombian
administrative, judicial and police offices and authorities, in
any instance, privileges of patents of invention, registration
of trademarks, industrial designs and utility models;
registration of commercial names, slogans and emblems,
registration of copyright and contracts related thereto,
certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as
extensions, renewals and recordal of assignments and
changes of name, domicile and address related to the
above; to prepare, prosecute and register licenses of any
kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or
recourse, and before any judge, corporation, public official
or authority in judicial, administrative and police actions,
such as: oppositions to the registration of trademarks;
caducity, cancellation and nullity actions; claim actions
derived from the obtaining or exploitation of licenses, action
of unfair competition; criminal proceedings, actions for
payment of damages; claims or observations on patent
applications, models, industrial designs and utility models;
in the exercise of preventive measures and in other actions
or similar proceedings.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes,
formular descripciones, enmiendas, protestas,
declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades,
apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y
gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistirse a
derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda
clase de documentos y valores, dando el descargo
respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades
todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas
las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis
(nuestros intereses), con todas las demás facultades
legales necesarias.

To that effect they hereby empowered to file applications,
formulate descriptions, amendments, protests,
declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals
and claims; to pay taxes, quotas and assessments
prescribed by law, renounce or waive the rights granted or
in the process of granting; to receive all kinds of documents
and valuables, giving the respective release of receipt, and,
in general, to take before said authorities the necessary
steps to such effect, and any measures that they may
deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s)
with all the other necessary legal powers.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en
mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de
desistirse, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o
en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos)
a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o MARTIN E.
TORRES CARDOZO, domiciliado(s) en la Calle 70A No. 4-
41, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con
facultades para recibir notificaciones y designar apoderados
judiciales o extrajudiciales.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist,
settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute
this power in whole or in part and to revoke substitutions.
At the same time I (We) hereby appoint JUAN PABLO
CADENA SARMIENTO and/or MARTIN E. TORRES
CARDOZO, domiciled in Calle 70A No. 4-41, my (our)
attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and
to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Otorgado y firmado en
hoy de de 200_
Firma
Nombre
Cargo

Granted and signed in Madrid
this day of 200_ 16 DIC. 2010
Signature

Name Francisco Quintanilla
Title General Manager


67

124834

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0041750
		Bogotá D.C., Mayo 03 de 2013 - 12:33:21

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426513231	02/05/2013	11.213.400.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	7 TTLOS-TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	
			Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
			500.000.00 500.000.00
			\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-135212- -00000-0000

Fecha: 2013-06-04 15:55:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 68

124834

68

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0046922

Bogotá D.C., Mayo 15 de 2013 - 16:51:49

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426513242	15/05/2013	57.807.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
5 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	150.000.00
			\$150.000.00

SON: **CIENTO CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-135212- -00000-0000

Fecha: 2013-06-04 15:55:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 68

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 15 de 2013 - 16:52:05

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-135212- -00000-0000

Fecha: 2013-06-04 15:55:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 68

PI02-F08 (2009-11-18)