

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 945 062**

51 Int. Cl.:

C07D 239/62 (2006.01)

A61K 31/515 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2018** **PCT/IL2018/050961**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2019** **WO19043706**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2018** **E 18851005 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2023** **EP 3676256**

54 Título: **Derivados de ácido barbitúrico novedosos, su preparación y uso de los mismos como inhibidores de la trans migración de leucocitos y para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias y cáncer**

30 Prioridad:

31.08.2017 US 201762552491 P

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

28.06.2023

73 Titular/es:

BAR ILAN UNIVERSITY (33.3%)
5290002 Ramat Gan, IL;
UNIVERSITY OF GENEVA (33.3%) y
GENEVA UNIVERSITY HOSPITALS (33.3%)

72 Inventor/es:

GRUZMAN, ARIE LEV;
BRADFIELD, PAUL;
GETTER, TAMAR;
IMHOF, BEAT;
MATTHES, THOMAS y
SENDEROWITZ, HANOCH

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 945 062 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de ácido barbitúrico novedosos, su preparación y uso de los mismos como inhibidores de la trans migración de leucocitos y para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias y cáncer

5

La invención se refiere al uso de compuestos orgánicos pequeños para bloquear la trans migración de leucocitos para el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con la inflamación como respuesta autoinmunitaria. La invención se refiere además al uso de compuestos orgánicos pequeños para bloquear la trans migración de leucocitos para el tratamiento del linfoma. La invención también se refiere al uso de compuestos orgánicos pequeños para

10 bloquear la trans migración de leucocitos para el tratamiento de la formación de tumores. En particular, la presente invención se refiere a los compuestos de Fórmula general (I) para el tratamiento de enfermedades y trastornos inflamatorios y enfermedades y trastornos autoinmunitarios. La presente invención también se refiere a los compuestos de Fórmula general (I) para el tratamiento de enfermedades y trastornos, donde se produce la trans migración de leucocitos de la sangre a los tejidos, por ejemplo, cánceres, tales como linfomas. Sorprendentemente, los inventores han encontrado que los compuestos de Fórmula general (I) son útiles para el tratamiento de células de linfoma que circulan a través de los sitios linfáticos; y el tratamiento del cáncer donde la circulación de las células desde la vasculatura (incluidos los eventos metastásicos secundarios) conduce a la expansión y/o vascularización de los tumores. La presente invención también abarca composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos, incluyendo los estereoisómeros, enantiómeros y tautómeros de los mismos, mezclas de los mismos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y métodos para usar los compuestos y sus composiciones farmacéuticas.

10

15

20

Las enfermedades inflamatorias, autoinmunitarias y cancerosas constituyen una parte importante de la carga total de enfermedades que afectan a los seres humanos. Se usan docenas de fármacos para tratar estos trastornos. Sin embargo, en muchos casos no se consigue una recuperación completa y la mayoría de los fármacos tienen efectos secundarios muy graves. Varias enfermedades autoinmunitarias, tales como, por ejemplo, la enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, artritis, esteatosis hepática (incluyendo esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) y esteatohepatitis no alcohólica (ENA)), espondilitis anquilosante, psoriasis y lupus eritematoso, son mortales o no tratables, o tienen muy malas opciones de tratamiento.

25

30

Los leucocitos son células dominantes en la gestión de un amplio espectro de reacciones inmunitarias tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Además de su capacidad para regular la respuesta inmunitaria mediante estímulos humorales, su ubicación física en tejidos específicos es fundamental para una respuesta inmunitaria destacada. Los leucocitos pueden salir de los compartimentos sanguíneo y linfático y llegar a los tejidos periféricos en un período de tiempo muy corto debido a su citoesqueleto flexible único, la capacidad de ejercer la polarización celular y la penetración en la pared vascular a través de un movimiento de tipo ameboso.

35

La adhesión, el rodamiento, la trans migración y la migración dirigida de los leucocitos están mediados por diversas moléculas diferentes. El sistema inmunitario también tiene la capacidad de activar la trans migración de leucocitos a través de interacciones reguladas entre la respuesta humoral sistémica y la maquinaria inmunitaria celular específica. También los componentes celulares del sistema inmunitario tales como mastocitos, macrófagos y células dendríticas son capaces de mediar en la migración dirigida de leucocitos en áreas lesionadas o infectadas en los tejidos periféricos mediante la secreción de mediadores moleculares.

40

El reclutamiento de leucocitos en estas áreas es rápido, expandiéndose a partir de interacciones de baja afinidad con células endoteliales activadas asociadas con inmunovigilancia y contacto físico con células endoteliales poscapilares distales. Estas interacciones débiles con las células endoteliales activadas son capaces de acelerar una cascada de eventos que conducen a la detención de los leucocitos y una fuerte adhesión, seguida de un rastreo en las superficies lumenales vasculares. A esto le sigue la migración trans endotelial a través de la pared vascular (trans migración) del leucocito hacia el tejido adyacente y la migración hacia el tejido diana periférico.

45

50

La trans migración de leucocitos dirigida se identificó como una diana potencial para el desarrollo de fármacos antiinflamatorios ya en la década de 1990. El direccionamiento de las interacciones entre los leucocitos y el endotelio se considera hasta ahora un eje importante en el desarrollo de fármacos, particularmente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias relacionadas y el linfoma (Rychly J. y Nebe B., Curr Pharm Des. 2006;12(29):3799-806; Hua S. y Cabot P.J. Trends Pharmacol Sci. 2010: 31(9):427-33).

55

Las integrinas han sido el foco principal para el diseño de estos nuevos agentes terapéuticos. Los bloqueadores de integrinas han mostrado beneficios significativos en la clínica con muchos pacientes, lo que ha generado un interés médico continuo en el desarrollo de inhibidores de integrinas novedosos. En la actualidad, casi todas las integrinas humanas se han usado como dianas para el desarrollo de antagonistas eficaces. Algunas de estas moléculas se han convertido en fármacos disponibles comercialmente; y algunos de ellos están bajo ensayos clínicos.

60

El ácido barbitúrico se sintetizó por primera vez por el químico alemán Adolf von Baeyer en 1864. Basándose en este armazón se desarrollaron varios fármacos en el siglo pasado y se usaron ampliamente como anticonvulsivos, iniciadores de la narcosis, agentes ansiolíticos e hipnóticos. En la medicina moderna, los barbitúricos se reemplazaron

65

por compuestos menos tóxicos. Actualmente, los barbitúricos se usan solo en áreas médicas muy restringidas, tales como el tratamiento de la migraña y la medicina veterinaria.

Los barbitúricos como antagonistas de la integrina y su uso para tratar enfermedades inflamatorias se desvelaron en la publicación de solicitud de patente PCT N.º WO2002068057 y en Harriman G., *et al.* (Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2008, 18: 2509-2512). Recientemente, Xu C. *et al.* (International Immunopharmacology, 2016, 38: 223-232) describieron derivados de ácido barbitúrico como inhibidores de la fosfodiesterasa 7 (PDE7) novedosos que exhibieron acciones inmunosupresoras e inmunomoduladoras inusualmente potentes sobre la función de los linfocitos T, incluyendo la inhibición de la proliferación de linfocitos T y la producción de citocinas IL-2. Se desvelaron barbitúricos y su uso para prevenir o tratar infecciones víricas en la publicación de solicitud de patente PCT N.º WO2000013708.

Se describieron derivados de ácido barbitúrico supuestamente útiles contra la esteatosis hepática no alcohólica por Ma L. *et al.* (Synthesis and biological activity of novel barbituric and thiobarbituric acid derivatives against non-alcoholic fatty liver disease, 2011, European Journal of Medicinal Chemistry, Volumen 46, Edición 6, junio de 2011, páginas 2003-2010) y por Zheng H. *et al.* (A novel agonist of PPAR-γ based on barbituric acid alleviates the development of non-alcoholic fatty liver disease by regulating adipocytokine expression and preventing insulin resistance, 2011, European Journal of Pharmacology, Volumen 659, Ediciones 2-3, 1 de junio de 2011, páginas 244-251). Se describieron derivados de ácido barbitúrico supuestamente útiles en el tratamiento de la esteatosis hepática no alcohólica relacionada con la obesidad por Ma L. *et al.* (Synthesis and Biological Evaluation of 5-Benzylidenepyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione Derivatives for the Treatment of Obesity-Related Nonalcoholic Fatty Liver Disease, 2012, Journal of Medicinal Chemistry, 26 de noviembre de 2012; 55(22):9958-72).

Cada año en los EE.UU., alrededor de 80.000 personas son diagnosticadas con 23 tipos diferentes de linfomas de linfocitos B. Estos van desde tipos agresivos no tratables hasta el linfoma de Hodgkin clásico, que se puede tratar. El porcentaje de supervivencia a los 5 años ronda el 70 %. Sin embargo, las personas con varios linfomas muy agresivos, tales como los linfomas de linfocitos B pequeños, el linfoma de células del manto o el linfoma de Burkitt, suelen tener un pronóstico muy malo, a pesar de la quimioterapia intensiva. Recientemente, se introdujo un anticuerpo monoclonal (Rituximab) como fármaco contra el linfoma de linfocitos B (Imhof BA, Matthes T. Swiss Med Wkly. 25 de septiembre de 2017; 147).

El direccionamiento de los leucocitos como de la barrera endotelial a través de moléculas receptoras comunes en el cáncer ha sido objeto de una serie de estrategias. Se ha demostrado que un anticuerpo terapéutico que se dirige a la molécula CLEVER-1 (Clevegen FP-1305, Faron Pharmaceuticals) bloquea esta molécula en el endotelio tumoral y los macrófagos asociados a tumores (MAT), y actualmente se encuentra en ensayos clínicos.

La función que desempeñan los receptores comunes tales como PECAM-1 tanto en la inflamación como en el cáncer ha puesto de manifiesto una serie de oportunidades en el desarrollo de fármacos. Se ha demostrado que esta molécula desempeña un papel en la progresión del estadio tardío del cáncer, lo que destaca un mecanismo potencial en la estratificación de la enfermedad que depende de la etapa del tratamiento (DeLisser H, Proc Natl Acad Sci USA. 2010, 107(43): 18616-21). También se sabe que PECAM-1 regula el tráfico de linfocitos T en el SNC durante patologías críticas, lo que demuestra que dirigirse a este receptor puede bloquear múltiples poblaciones de células tanto en la inflamación como en el cáncer (Qing Z., *et al.* Inhibition of antigen-specific T cell trafficking into the central nervous system via blocking PECAM1/CD31 molecule. J Neuropathol Exp Neurol. 2001, 60(8):798-807). PECAM-1 no solo reside en la unión, sino que es un componente de un compartimiento de reciclaje en las células endoteliales, denominado compartimiento de reciclaje del borde lateral (LBRC, por sus siglas en inglés) que modula la trans migración de leucocitos a través de la unión célula endotelial-célula (Mamdouh *et al.*, Nature, 2003;421:748-753).

El documento WO 02/068057 se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de barbitúrico específico y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, se refiere a un método para tratar a un individuo que padece una enfermedad asociada con la infiltración de leucocitos en tejidos que expresan la molécula MAdCAM-1, en donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto barbitúrico específico.

El materia objeto para la que se solicita la protección es como se define en las reivindicaciones. Cualquier referencia a una "divulgación" o una "realización" que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones está presente únicamente con fines explicativos y no forma parte de la invención. Cualquier referencia a métodos de tratamiento o uso de compuestos para el tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

La presente invención se refiere al uso de compuestos orgánicos pequeños para bloquear la trans migración de leucocitos para el tratamiento de enfermedades asociadas con la trans migración de leucocitos. En particular, la presente invención proporciona los compuestos de Fórmula general (Ib) como se define en la reivindicación 1.

Además, en el presente documento se describen procesos para preparar un compuesto de Fórmula general (Ib) de acuerdo con la invención, y estereoisómeros, enantiómeros y tautómeros del mismo, mezclas del mismo y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

- En un aspecto adicional, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de Fórmula general (Ib) de acuerdo con la invención, incluyendo los estereoisómeros, enantiómeros y tautómeros del mismo, mezclas del mismo y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención opcionalmente comprenden además al menos un agente terapéutico que incluye, pero sin limitación, agentes antiinflamatorios, antisépticos, antibióticos, antivíricos, bactericidas, antifúngicos, antineoplásicos, compuestos anticancerosos y/u otros agentes bioactivos o terapéuticos que son aptos para uso humano.
- En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso del compuesto de Fórmula general (Ib), incluyendo los estereoisómeros, enantiómeros y tautómeros del mismo, sales farmacéuticamente aceptables del mismo y mezclas del mismo, o el uso de composiciones farmacéuticas del mismo, para el tratamiento de enfermedades y trastornos. Especialmente enfermedades y trastornos donde se produce la transmigración de leucocitos de la sangre a los tejidos, tales como, sin limitación, enfermedades y trastornos inflamatorios y autoinmunitarios, por ejemplo: miocarditis, síndrome posinfarto de miocardio, síndrome de pospericardiotomía, endocarditis bacteriana subaguda (EBS), nefritis de la membrana basal antiglomerular, cistitis intersticial, colangitis esclerosante primaria, síndrome antisintetasa, alopecia areata, angioedema autoinmune, dermatitis autoinmune por progesterona, urticaria autoinmune, penfigoide ampolloso, penfigoide cicatricial, dermatitis herpetiforme, lupus eritematoso discoide, epidermolisis ampollosa adquirida, eritema nudoso, penfigoide gestacional, hidradenitis supurativa, liquen plano, liquen escleroso, enfermedad de IgA lineal (EAL), morfea, pénfigo vulgar, pitiriasis liquenoide y varioliforme aguda, enfermedad de Mucha-Habermann, enfermedad de Addison, síndrome poliendocrino autoinmune (SPA) de tipo 1, síndrome poliendocrino autoinmune (SPA) de tipo 2, síndrome poliendocrino autoinmune (SPA) de tipo 3, pancreatitis autoinmune, diabetes mellitus de tipo 1, tiroiditis autoinmune, tiroiditis de Ord, enfermedad de Graves, ooforitis autoinmune, endometriosis, enteropatía autoinmune, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, síndrome antifosfolípido (SAP, SAPL), anemia aplásica, anemia hemolítica autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune, enfermedad por crioaglutininas, crioglobulinemia mixta esencial, síndrome de Evans, hemoglobinuria paroxística nocturna, anemia perniciosa, aplasia pura de glóbulos rojos, trombocitopenia, adiposis dolorosa, enfermedad de Still de inicio en el adulto, espondilitis anquilosante, fascitis eosinófila, síndrome de Felty, enfermedad relacionada con IgG4, artritis juvenil, enfermedad de Lyme (crónica), enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), reumatismo palindrómico, síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonnage-Turner, artritis psoriásica, artritis reactiva, policondritis recidivante, fibrosis retroperitoneal, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, síndrome de Schnitzler, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad indiferenciada del tejido conjuntivo, dermatomiositis, fibromialgia, miositis por cuerpos de inclusión, miositis, miastenia grave, neuromiotonía, degeneración cerebelosa paraneoplásica, polimiositis, encefalomiелitis aguda diseminada (EMAD), neuropatía axonal motora aguda, encefalitis anti receptor de N-metil-D-aspartato (Anti NMDA), esclerosis concéntrica de Baló, encefalitis de Bickerstaff, polineuropatía inflamatoria crónica desmielinizante, síndrome de Guillain-Barre, esclerosis múltiple, síndrome de Oshtoran, trastorno neuropsiquiátrico pediátrico autoinmunitario asociado a *Streptococcus* (TNPAAS), neuropatía inflamatoria progresiva, síndrome de las piernas inquietas, síndrome de la persona rígida, corea de Sydenham, mielitis transversa, retinopatía autoinmune, uveítis autoinmune, síndrome de Cogan, oftalmopatía de Graves, uveítis intermedia, conjuntivitis leñosa, úlcera de Mooren, neuromielitis óptica, síndrome de opsoclono-mioclono, neuritis óptica, escleritis, síndrome de Susac, oftalmía simpática, síndrome de Tolosa-Hunt, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (EAOI), enfermedad de Meniere, enfermedad de Behçet, granulomatosis eosinófila con poliangiitis (GEPa), arteritis de células gigantes, granulomatosis con poliangiitis (GPA), vasculitis por IgA (VIGa), enfermedad de Kawasaki, vasculitis leucocitoclástica, vasculitis lúpica, vasculitis reumatoide, poliangiitis microscópica (PAM), poliarteritis nodosa (PAN), polimialgia reumática, vasculitis urticaria, vasculitis, inmunodeficiencia primaria, encefalopatía de Hashimoto, enfermedades desmielinizantes inflamatorias idiopáticas, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, síndrome CREST, lupus inducido por fármacos, artritis relacionada con entesitis, neutropenia autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, colitis microscópica, colitis ulcerosa, orquitis autoinmune, síndrome de Sjögren, psoriasis, esclerodermia sistémica, vitíligo, nefritis lúpica, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria (CBP) y cánceres, tales como linfomas, especialmente linfomas de linfocitos tipo B. Otros aspectos y realizaciones de la presente invención resultarán evidentes para el experto en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

- La **figura 1** muestra la estructura de una cámara de flujo que se usó en el ensayo biológico descrito en el Ejemplo 4. Se sembraron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, por sus siglas en inglés) en la cámara de flujo y se cultivaron durante 48-72 horas. A continuación, los leucocitos se hicieron fluir sobre las células endoteliales cultivadas usando una bomba calibrada. Los eventos de captura, adhesión y migración de leucocitos se registraron usando equipos de microscopía y bioimagen.
- La **figura 2** muestra un perfil de seguimiento de un monocito humano capturado en una superficie luminal de HUVEC activadas (cronología, posición e imágenes).
- La **figura 3** proporciona los resultados del estudio biológico descrito en el Ejemplo 4. Transmigración de monocitos en la superficie de HUVEC activadas bajo flujo. Monocitos humanos primarios cocultivados en HUVEC activadas con TNF-alfa. A las células se les añadieron compuestos de Fórmula general (I) a razón de 30 μ M durante

45 minutos. Los cocultivos se mantuvieron bajo flujo a 0,05 Pa. El control positivo son células tratadas con DMSO.

Las **figuras 4A y 4B** muestran el patrón de adhesión (4A) y trans migración (4B) de monocitos humanos cocultivados en HUVEC activadas con TNF-alfa bajo flujo en presencia de los compuestos de las Fórmulas **2, 9 y 10**. El cocultivo se mantuvo bajo flujo (0,05 Pa) durante 30 minutos. Todos los compuestos se introdujeron en las células en concentraciones de 30 μ M. n = 3; el control positivo recibió DMSO.

Las **figuras 5A y 5B** muestran el efecto de respuesta a la dosis del compuesto de Fórmula **2 (5A)** y Fórmula **10 (5B)** sobre la trans migración de monocitos en la superficie de HUVEC bajo un flujo de 0,05 Pa. Las células de control recibieron DMSO. n = 3.

Las **figuras 6A - 6D** muestran una CI_{50} y un efecto de inhibición máxima dependiente del tiempo del compuesto de Fórmula **2** a los 10, 15, 20

y 25 minutos. La trans migración de monocitos en la superficie de HUVEC bajo un flujo de 0,05 Pa se ensayó como se describe en el Ejemplo 4 a continuación en el presente documento. n = 3.

Las **figuras 7A - 7D** muestran una CI_{50} y un efecto de inhibición máxima dependiente del tiempo del compuesto de Fórmula **10** a los 10, 15, 20 y 25 minutos. La trans migración de monocitos en la superficie de HUVEC bajo un flujo de 0,05 Pa se ensayó como se describe en el Ejemplo 4 a continuación. Las células de control recibieron DMSO. n = 3.

Figura 8. Se redujeron los recuentos de glóbulos blancos (WBC) de los fluidos peritoneales mediante la aplicación del compuesto de Fórmula **2**, en un modelo de peritonitis aséptica en ratones (Ejemplo 5 a continuación). Se usó una solución al 4 % de tioglicolato en agua (1 ml) para inducir la inflamación peritoneal mediante inyección IP. La solución se inyectó dos veces durante 48 horas. El compuesto de Fórmula **2** (30 μ M) se inyectó una vez al tercer día. Los ratones se sacrificaron, los fluidos peritoneales se recogieron y se centrifugaron. El sedimento de células se suspendió de nuevo y las células se contaron y se analizaron mediante el contador de células automatizado. n = 6.

La **figura 9** muestra el análisis de citometría de flujo de diez colores de la expresión de CD115 en monocitos de ratón seguido del tratamiento con el compuesto de Fórmula **2**. Se tiñeron monocitos de ratón C57BL/6 con anticuerpo anti CD115 de ratón de rata PE que se hizo reaccionar con anticuerpos fluorescentes F4/80 de diez colores contra CD115. Se analizaron fracciones separadas de células de acuerdo con las características de dispersión de luz lateral. Los monocitos tratados con el compuesto de Fórmula **2** mostraron un fenotipo distinto asociado con diferenciación reducida, exhibido por un cambio en el patrón de las selecciones 1-4.

Las figuras 10A

- **10G** no muestran ningún efecto del compuesto de Fórmula **2** administrado con 3 dosis por sonda nasogástrica (PO) o con 3 dosis por inyección intraperitoneal (IP) sobre diferentes subtipos de glóbulos rojos, plaquetas y hematocrito. Los datos mostraron la media $\pm$ EEM, n = 5.

Las figuras 11A

- **11F** no muestran ningún efecto del compuesto de Fórmula **2** administrado con 3 dosis por sonda nasogástrica (PO) o con 3 dosis por inyección intraperitoneal (IP) sobre diferentes subtipos de glóbulos blancos. Los datos mostraron la media $\pm$ EEM, n = 5.

Las figuras 12A

- **12F** no muestran ningún efecto del compuesto de Fórmula **2** administrado con 3 dosis por sonda nasogástrica (PO) o con 3 dosis por inyección intraperitoneal (IP) sobre los niveles en sangre de creatinina, urea, proteína total, albúmina, globulina, glucosa. Los datos mostraron la media $\pm$ EEM, n = 5.

Las figuras 13A

- **13E** no muestran ningún efecto del compuesto de Fórmula **2** administrado con 3 dosis por sonda nasogástrica (PO) o con 3 dosis por inyección intraperitoneal (IP) sobre los niveles en sangre de bilirrubina total, fosfatasa alcalina, transaminasa glutámico oxaloacética sérica (SGOT), transaminasa glutámica pirúvica sérica (SGPT) y colesterol. Los datos mostraron la media $\pm$ EEM, n = 5.

Las figuras 14A

- **14F** no muestran ningún efecto del compuesto de Fórmula **2** administrado con 3 dosis por sonda nasogástrica (PO) o con 3 dosis por inyección intraperitoneal (IP) sobre los niveles en sangre de calcio, fósforo, sodio, potasio,

cloruro ni sobre el índice hemolítico. Los datos mostraron la media $\pm$ EEM, $n = 5$.

La **figura 15** no muestra ningún efecto del compuesto de Fórmula **2** administrado con 3 dosis por inyección intraperitoneal (IP) sobre la microestructura de los tejidos de pulmón, corazón, hígado, bazo y riñón. Los datos mostraron la media $\pm$ EEM, $n = 5$.

La **figura 16** no muestra ningún efecto del compuesto de Fórmula **2** administrado con 3 dosis por sonda nasogástrica (PO) sobre la microestructura de los tejidos de pulmón, corazón, hígado, bazo y riñón. Los datos mostraron la media $\pm$ EEM, $n = 5$.

La **figura 17** muestra que el compuesto de Fórmula **2** bloqueó significativamente la migración dirigida de las células cancerosas leucémicas en el bazo y el hígado (Ejemplo 7 a continuación).

La **figura 18** muestra el efecto terapéutico del compuesto de Fórmula **2** en el modelo de colitis aguda inducida por sulfato sódico de dextrano (DSS) en ratones C57BL/6 en la puntuación del índice de actividad de la enfermedad (DAI, por sus siglas en inglés) administrado en 2 dosis por inyección intravenosa (IV), sonda nasogástrica (PO), inyección intraperitoneal (IP) o inyección subcutánea (SC) (Ejemplo 8 a continuación). Los datos mostraron la media $\pm$ EEM, $n = 10$.

Las **figuras 19A - 19C** muestran el efecto terapéutico del compuesto de Fórmula **2** en el modelo de colitis aguda inducida por sulfato sódico de dextrano (DSS) en ratones C57BL/6 sobre la longitud del colon (**19A** y **19B**) y la puntuación histológica del intestino grueso de los ratones (**19C**). Los datos mostraron la media $\pm$ EEM, $n = 10$.

Las **figuras 20A y 20B** muestran el efecto terapéutico del compuesto de Fórmula **2** sobre el peso corporal de los ratones (**20A**) y la puntuación clínica de parálisis (**20B**) en modo de tratamiento en encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) directa inducida por MOG₃₅₋₅₅/CFA en C57BL/6 ratones administrado a una dosis de 15 mg/kg mediante inyecciones subcutáneas (SC) (Ejemplo 9 a continuación). Los datos mostraron la media $\pm$ EEM, $n = 8$.

Las **figuras 21A - 21E** muestran el efecto terapéutico del compuesto de Fórmula **2** en la esteatosis hepática inducida por una dieta alta en grasas en el modelo C57BL/6 en ratones administrado en 2 dosis por sonda nasogástrica (PO), inyección intraperitoneal (IP) o inyección subcutánea (SC), esteatohepatitis y sobre la acumulación de grasa (Ejemplo 10 a continuación). Se muestran los resultados histológicos: hígado (**21A**) y grasa mesentérica (**21B**). El compuesto de Fórmula **2** mostró un efecto terapéutico sobre la esteatohepatitis (puntuación de actividad de la EHNA) (**21C**). El compuesto de Fórmula **2** también disminuyó el peso húmedo del hígado (**21D**) y el peso húmedo de la grasa mesentérica (**21E**). Los datos mostraron la media $\pm$ EEM, $n = 8$.

La **figura 22** muestra el efecto terapéutico del compuesto de Fórmula **2** sobre el peso corporal de ratones en la esteatosis hepática inducida por una dieta rica en grasas en el modelo C57BL/6 administrado en 2 dosis por sonda nasogástrica (PO), inyección intraperitoneal (IP) o inyección subcutánea (SC). Los datos mostraron la media $\pm$ EEM, $n = 8$.

La **figura 23** muestra el efecto terapéutico del compuesto de Fórmula **2** en el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC) en ratones DBA/1 (puntuación de la AIC) administrado a razón de 15 mg/kg por inyección subcutánea (SC) (Ejemplo 11 a continuación). Los datos mostraron la media $\pm$ EEM, $n = 8$.

Las **figuras 24A - 24C** muestran el efecto terapéutico del compuesto de Fórmula **2** en el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC) en ratones DBA/1 (grosor de las extremidades y puntuación histológica). Los datos mostraron la media $\pm$ EEM, $n = 8$.

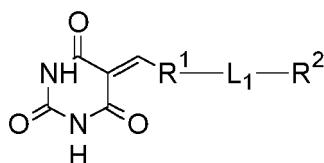
Las **figuras 25A - 25J** muestran el efecto terapéutico del compuesto de Fórmula **2** en el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC) en ratones DBA/1 (evaluación histológica). Secciones representativas a través de la articulación del astrágalo y el calcáneo de ratón sin tratar (**25A**) y tratado (**25B**). Los tejidos blandos que rodeaban las articulaciones de los ratones de control parecían normales. Las superficies de los huesos están cubiertas con cartilago hialino liso de grosor uniforme. Secciones representativas a través de la articulación del astrágalo y el calcáneo de razón no tratado con AIC (**25C**, **25E**, **25G**, **25I**) y tratado con vehículo (**25D**, **25F**, **25H**, **25J**). Los datos mostraron la media $\pm$ EEM, $n = 8$.

La **figura 26** muestra diferentes modos de efecto del compuesto de Fórmula **2** y Tysabri® sobre la adhesión y transigración de linfocitos B (Ejemplo 12 a continuación). $n = 3$.

La **figura 27** muestra manifestaciones fenotípicas, denominadas "aleteo", de un movimiento distintivo dentro de las uniones intercelulares de HUVEC observadas después del tratamiento con el compuesto de Fórmula **2** (Ejemplo 13 a continuación).

La **figura 28** muestra un posible modo de unión entre el compuesto de Fórmula **2** y la interfase del dímero PECAM-1. Resultados obtenidos informáticamente (Ejemplo 14 a continuación).

En el presente documento se describe un compuesto de Fórmula general (I):



Fórmula (I)

en donde

R¹ es un resto cíclico o heterocíclico aromático o no aromático, seleccionado de fenilo, naftilo, antraceno, fenantreno, tetraceno, criseno, fenantreno, trifenileno, pireno, tetrahidrofurano, furano, tiofeno, pirrol, 2H-pirrol, 2,5-dihidro-1H-pirrol, pirrolidina, oxazol, tiazol, imidazol, 4,5-dihidro-1H-imidazol, imidazolina, pirazol, 4,5-dihidro-1H-pirazol, pirazolina, isoxazol, isotiazol, 1,2,3-oxadiazol, 1,3,4-oxadiazol, 1,2,4-oxadiazol, 1,2,3-tiadiazol, 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, tetrazol, 1,2,3,4-oxatriazol, 2H-piran, 3,4-dihidro-2H-pirano, 1,4-dioxano, morfolina, piperidina, piperazina, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, benzofurano, benzotiofeno, benzoxazol, benzotiazol, indol, indolina, benzoimidazol indazol, benzotriazol, 1H-pirrol-[3,2-b]pirazina, 1H-pirrol-[3,2-c]piridina, 1,3,5-triazina, pirrolo-[2,3-c]piridina, pirrolo-[2,3-b]piridina, 7H-pirrol-[2,3-d]pirimidina, 5H-pirrol-[3,2-d]pirimidina, 7H-purina, indolizina, pirrolo-[1,2-a]pirimidina, pirrolo-[1,2-a]pirazina, pirrolo-[1,2-c]pirimidina, pirrolo-[1,2-b]piridazina, imidazol[4,5-b]piridina, pirazol[1,5-a]piridina, imidazo[1,5-a]piridina, imidazo[1,5-b]piridazina, imidazo[1,2-a]piridina, imidazo[1,2-b]piridazina, imidazo[1,2-c]pirimidina, imidazo[1,2-a]pirazina, imidazo[1,2-a]pirimidina, [1,2,3]triazolo[4,3-a]piridina, [1,2,3]triazolo[1,5-a]piridina, quinolina, isoquinolina, cinolina, quinazolina, quinoxalina, ftalazina, pirido[2,3-b]pirazina, pteridina, pirido[3,4-d]piridazina, 1,6-naftiridina, 1,8-naftiridina, 9H-carbazol, dibenzofurano y dibenzotiofeno, y en donde R¹ está sin sustituir o R¹ está sustituido por uno o más de Z;

Z es independientemente uno o más de grupos funcionales seleccionados de lineales o ramificados: S-alquilo, N-alquilo, O-alquilo, alquilo, alqueno y arilo, cada uno de los cuales puede estar sin sustituir o sustituido por uno o más de halo, haloalquilo, ciano, nitro, hidroxilo, alqueno, arilo, alcoxi, ariloxi, aralcoxi, alquilcarbamido, arilcarbamido, amino, alquilamino, arilamino, dialquilamino, diarilamino, arilalquilamino, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, carboxilo, éster carboxílico, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, sulfo, alquilsulfonilamido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo; en donde Z también representa sustituciones directas en cualquier posición aromática de cada uno de R¹ y/o R² por S-alquilo, N-alquilo, O-alquilo, alquilo, alqueno, arilo, halo, haloalquilo, ciano, nitro, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, aralcoxi, alquilcarbamido, arilcarbamido, amino, alquilamino, arilamino, dialquilamino, diarilamino, arilalquilamino, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, carboxilo, éster carboxílico, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, sulfo, alquilsulfonilamido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, sulfonilamida, sulfona; y en donde cada uno de Z es igual o diferente en cada aparición del mismo en R¹ y/o R²;

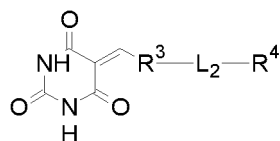
L₁ es un grupo de unión bivalente, que puede estar ausente o presente, pero si está presente se selecciona de alcoxi y alquilo, en donde cada uno del alcoxi y alquilo están sin sustituir o sustituidos por uno o varios hidroxilo, amino, ciano, tiol, grupo oxo, tioxo, tioéter lineal, amida, ariloxi, aralcoxi, alquilcarbamido, arilcarbamido, alquilamino, arilamino, dialquilamino, diarilamino, arilalquilamino, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, carboxilo, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, sulfo, alquilsulfonilamido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, alqueno o alquino;

R² puede estar ausente o presente, pero si está presente es fenilo sustituido por un grupo seleccionado de un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo de éster carboxílico (-CO(=O)R⁵), en donde el grupo carboxilo o el grupo de éster carboxílico está presente en la posición *para*, *orto* o *meta* con respecto a L₁, y en donde R² está opcionalmente sustituido adicionalmente por uno o más de Z;

R⁵ es hidrógeno, alquilo lineal, alquilo ramificado, alqueno lineal o alqueno ramificado, en donde cada uno del alquilo y el alqueno puede estar sin sustituir o sustituido por uno, dos o tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, nitro, ciano y amino; y estereoisómeros, enantiómeros y tautómeros de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y mezclas de los mismos.

En los compuestos de Fórmula general (I) cada uno de R¹, L₁ y R² está presente; R¹ es fenilo sin sustituir o fenilo sustituido por uno o más de Z, y cuando R¹ está sin sustituir, al menos uno de Z es alquilo lineal o alquilo ramificado; Z es igual o diferente en cada aparición del mismo en R¹ y/o R²; y L₁ es un grupo de unión alcoxi bivalente.

En el presente documento se describe un compuesto de la Fórmula general (Ia):



Fórmula (Ia)

en donde

5 R^3 es un grupo aromático cíclico, seleccionado de fenilo, naftilo, antracenilo, fenantrenilo, tetracenilo, criseno, fenantreno, trifenileno, pireno; en donde R^3 está sin sustituir o R^3 está sustituido con uno o más de Z; preferentemente R^3 es fenilo sin sustituir o fenilo sustituido por uno o más de Z;

10 Z es independientemente uno o más de grupos funcionales seleccionados de lineales o ramificados: S-alquilo, N-alquilo, O-alquilo, alquilo, alquenilo y arilo, cada uno de los cuales puede estar sin sustituir o sustituido por uno o más de halo, haloalquilo, ciano, nitro, hidroxilo, alquenilo, arilo, alcoxi, ariloxi, aralcoxi, alquilcarbamido, arilcarbamido, amino, alquilamino, arilamino, dialquilamino, diarilamino, arilalquilamino, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, carboxilo, éster carboxílico, alcoxicarbonilo, ariloxicarbonilo, sulfo, alquilsulfonilamido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfino, arilsulfino; en
15 donde Z también representa sustituciones directas en cualquier posición aromática de cada uno de R^3 y/o R^4 por S-alquilo, N-alquilo, O-alquilo, alquilo, alquenilo, arilo, halo, haloalquilo, ciano, nitro, hidroxilo, ariloxilo, aralcoxi, alquilcarbamido, arilcarbamido, amino, alquilamino, arilamino, dialquilamino, diarilamino, arilalquilamino, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, carboxilo, éster carboxílico, alcoxicarbonilo, ariloxicarbonilo, sulfo, alquilsulfonilamido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfino, arilsulfino; en
20 R^3 y/o R^4 ;

L_2 es un grupo de unión alcoxi bivalente, que está sin sustituir o sustituido por uno o más de un grupo hidroxilo, amino, ciano, tiol, oxo o tioxo, preferentemente L_2 es

25 -O-alquileo C_{1-4} -, mucho más preferentemente L_2 es -O-CH₂-;

R^4 es fenilo sustituido por un grupo seleccionado de un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo de éster carboxílico (-CO(=O) R^5), en donde el grupo carboxilo o el grupo de éster carboxílico está presente en la posición *para*, *orto* o *meta* con respecto a L_2 , y en donde R^4 está opcionalmente sustituido adicionalmente por uno o más de Z;

R^5 es hidrógeno, alquilo lineal, alquilo ramificado, alquenilo lineal o alquenilo ramificado, en donde cada uno del alquilo y el alquenilo puede estar sin sustituir o sustituido por uno, dos o tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, nitro, ciano y amino; y

35 estereoisómeros, enantiómeros y tautómeros de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y mezclas de los mismos.

40 En el compuesto de Fórmula general (Ia), R^3 es fenilo sin sustituir o fenilo sustituido por uno o más de Z.

En el compuesto de Fórmula general (Ia), R^3 es fenilo sin sustituir o fenilo sustituido por uno o más de Z; L_2 es un grupo de unión bivalente sin sustituir, preferentemente L_2 es -O-alquileo C_{1-4} --; cada uno de Z es igual o diferente en cada aparición del mismo en R^3 y/o R^4 ; los enlaces al resto de ácido barbitúrico y a L_2 en R^3 están situados en posición *orto* entre ellos, y el enlace al grupo de ácido carboxílico o al grupo de éster del ácido carboxílico de R^4 está situado en posición *para* con respecto al grupo de unión (L_2).

Por otra parte, en el compuesto de Fórmula general (Ia), R^3 es fenilo sin sustituir o fenilo sustituido por uno o más de Z; L_2 es un grupo de unión bivalente sin sustituir, preferentemente L_2 es -O-alquileo C_{1-4} --; cada uno de Z es igual o diferente en cada aparición del mismo en R^3 y/o R^4 ; los enlaces al resto de ácido barbitúrico y a L_2 en R^3 están situados en posición *meta* entre ellos, y el enlace al grupo de ácido carboxílico o al grupo de éster del ácido carboxílico de R^4 está situado en posición *para* con respecto al grupo de unión (L_2).

En el compuesto de Fórmula general (Ia), R^3 es fenilo sin sustituir o fenilo sustituido por uno o más de Z; L_2 es un grupo de unión bivalente sin sustituir, preferentemente L_2 es -O-alquileo C_{1-4} --; cada uno de Z es igual o diferente en cada aparición del mismo en R^3 y/o R^4 ; los enlaces al resto de barbitúrico y a L_2 en R^3 están situados en posición *para* entre ellos, y el enlace al grupo de ácido carboxílico o al grupo de éster del ácido carboxílico de R^4 está situado en posición *para* con respecto al grupo de unión (L_2).

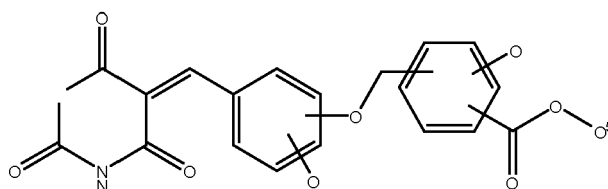
En el compuesto de Fórmula general (Ia), R^3 es fenilo sin sustituir o fenilo sustituido por uno o más de Z; L_2 es un grupo de unión bivalente sin sustituir, preferentemente L_2 es -O-alquileo C_{1-4} --; cada uno de Z es igual o diferente en

cada aparición del mismo en R³ y/o R⁴; los enlaces al resto de ácido barbitúrico y a L₂ en R³ están situados en posición *orto* entre ellos, y el enlace al grupo de ácido carboxílico o al grupo de éster del ácido carboxílico de R⁴ está situado en posición *meta* con respecto al grupo de unión (L₂).

En el compuesto de Fórmula general (Ia), R³ es fenilo sin sustituir o fenilo sustituido por uno o más de Z; L₂ es un grupo de unión bivalente sin sustituir, preferentemente L₂ es -O-alkileno C₁₋₄-; cada uno de Z es igual o diferente en cada aparición del mismo en R³ y/o R⁴; los enlaces al resto de ácido barbitúrico y a L₂ en R³ están situados en posición *para* entre ellos, y el enlace al grupo de ácido carboxílico o al grupo de éster del ácido carboxílico de R⁴ está situado en posición *meta* con respecto al grupo de unión (L₂).

En el compuesto de Fórmula general (Ia), R³ es fenilo sin sustituir o fenilo sustituido por uno o más de Z; L₂ es un grupo de unión bivalente sin sustituir, preferentemente L₂ es -O-alkileno C₁₋₄-; cada uno de Z es igual o diferente en cada aparición del mismo en R³ y/o R⁴; los enlaces al resto de ácido barbitúrico y a L₂ en R³ están situados en posición *meta* entre ellos, y el enlace al grupo de ácido carboxílico o al grupo de éster del ácido carboxílico de R⁴ está situado en posición *meta* con respecto al grupo de unión (L₂).

De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula general (Ib):



Fórmula (Ib)

en donde

uno o dos Z están presentes en un anillo y Z está ausente en el otro anillo, y cada Z se selecciona independientemente de alquilo lineal sin sustituir o alquilo ramificado sin sustituir que tiene de 1 a 6 átomos de carbono (alquilo C₁₋₆); y

R⁵ es alquilo seleccionado de alquilo lineal o alquilo ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono (alquilo C₁₋₆), en donde cada alquilo puede estar sin sustituir o sustituido por uno, dos o tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, nitro, ciano y amino; y

estereoisómeros, enantiómeros y tautómeros del mismo, sales farmacéuticamente aceptables del mismo y mezclas del mismo.

En diversas realizaciones del compuesto de Fórmula general (Ib), cada Z está unido a cualquier átomo de carbono disponible del anillo en el que está presente y, en cada aparición, Z se selecciona independientemente como se ha definido de forma inmediata anteriormente.

En el presente documento se describe un compuesto de Fórmula general (Ib), en donde Z está ausente.

En el compuesto de Fórmula general (Ib), uno o dos Z están presentes.

En algunas realizaciones preferidas del compuesto de Fórmula general (Ib), un Z está presente.

En el compuesto de Fórmula general (Ib), uno o dos Z están presentes, y cada Z se selecciona independientemente de alquilo lineal sin sustituir o alquilo ramificado sin sustituir que tiene de 1 a 6 átomos de carbono (alquilo C₁₋₆). En algunas realizaciones del compuesto de Fórmula general (Ib), un Z está presente, y se selecciona de alquilo lineal sin sustituir o alquilo ramificado sin sustituir que tiene de 1 a 6 átomos de carbono (alquilo C₁₋₆).

En el presente documento se describe un compuesto de Fórmula general (Ib), en donde uno o varios Z están presentes en un anillo y Z está ausente en el otro anillo.

En el compuesto de Fórmula general (Ib), uno o dos Z están presentes en un anillo y Z está ausente en el otro anillo.

En el presente documento se describe un compuesto de Fórmula general (Ib), en donde uno o varios Z están presentes en ambos anillos. En el presente documento se describe un compuesto de Fórmula general (Ib), en donde uno o dos Z están presentes en ambos anillos.

En el presente documento se describe un compuesto de Fórmula general (Ib), en donde uno o varios Z están presentes en el anillo de fenilo conectado al resto de barbitúrico y Z está ausente en el otro anillo.

En algunas realizaciones del compuesto de Fórmula general (Ib) uno o dos Z están presentes en el anillo de fenilo conectado al resto de barbitúrico y Z está ausente en el otro anillo.

- 5 En el presente documento se describe un compuesto de Fórmula general (Ib), en donde al menos dos Z están presentes y ambos se seleccionan independientemente de alquilo lineal sin sustituir o alquilo ramificado sin sustituir.

En algunas realizaciones del compuesto de Fórmula general (Ib), dos Z están presentes y ambos se seleccionan independientemente de alquilo lineal sin sustituir o alquilo ramificado sin sustituir que tiene de 1 a 6 átomos de carbono (alquilo C₁₋₆).

En el presente documento se describe un compuesto de Fórmula general (Ib), en donde al menos dos Z están presentes en el mismo anillo de fenilo y ambos se seleccionan independientemente de alquilo lineal sin sustituir o alquilo ramificado sin sustituir.

En algunas realizaciones del compuesto de Fórmula general (Ib), dos Z están presentes en el mismo anillo de fenilo y ambos se seleccionan independientemente de alquilo lineal sin sustituir o alquilo ramificado sin sustituir que tiene de 1 a 6 átomos de carbono (alquilo C₁₋₆).

En el compuesto de Fórmula general (Ib), cada Z se selecciona independientemente de alquilo lineal sin sustituir o alquilo ramificado sin sustituir, que tiene de 1 a 6 átomos de carbono (alquilo C₁₋₆), seleccionado de metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, *terc*-butilo, n-pentilo, isopentilo, neo-pentilo, *terc*-pentilo, n-hexilo e isohexilo. En algunas realizaciones preferidas, cada Z se selecciona independientemente de alquilo lineal sin sustituir o alquilo ramificado sin sustituir, que tiene de 1 a 4 átomos de carbono (alquilo C₁₋₄), seleccionado de metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, *terc*-butilo.

En algunas realizaciones del compuesto de Fórmula general (Ib), uno o varios Z están presentes en el anillo conectado al resto de barbitúrico y Z está ausente en el otro anillo; y cada Z se selecciona independientemente de alquilo lineal sin sustituir o alquilo ramificado sin sustituir, que tiene de 1 a 6 átomos de carbono (alquilo C₁₋₆), seleccionado de metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, *terc*-butilo, n-pentilo, isopentilo, neo-pentilo, *terc*-pentilo, n-hexilo e isohexilo. Más preferentemente, cada Z se selecciona independientemente de alquilo lineal sin sustituir o alquilo ramificado sin sustituir, que tiene de 1 a 4 átomos de carbono (alquilo C₁₋₄), seleccionado de metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, *terc*-butilo.

En algunas realizaciones del compuesto de Fórmula general (Ib), Z está ausente en el anillo conectado al resto de barbitúrico y uno o varios Z están presentes en el otro anillo; y cada Z se selecciona independientemente de alquilo lineal sin sustituir o alquilo ramificado sin sustituir, que tiene de 1 a 6 átomos de carbono (alquilo C₁₋₆), seleccionado de metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, *terc*-butilo, n-pentilo, isopentilo, neo-pentilo, *terc*-pentilo, n-hexilo e isohexilo. Más preferentemente, cada Z se selecciona independientemente de alquilo lineal sin sustituir o alquilo ramificado sin sustituir, que tiene de 1 a 4 átomos de carbono (alquilo C₁₋₄), seleccionado de metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, *terc*-butilo.

En el presente documento se describe un compuesto de Fórmula general (Ib), en donde R⁵ es hidrógeno.

En el compuesto de Fórmula general (Ib), R⁵ es alquilo, seleccionado de alquilo lineal o alquilo ramificado, que tiene de 1 a 6 átomos de carbono (alquilo C₁₋₆), en donde el alquilo está sin sustituir o en donde el alquilo está sustituido con uno, dos o tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, nitro, ciano y amino. En algunas realizaciones preferidas, R⁵ se selecciona de alquilo lineal o alquilo ramificado, que tiene de 1 a 6 átomos de carbono (alquilo C₁₋₆), tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, *terc*-butilo, n-pentilo, isopentilo, neo-pentilo, *terc*-pentilo, n-hexilo e iso-hexilo. En algunas realizaciones preferidas, R⁵ se selecciona de alquilo lineal sin sustituir o alquilo ramificado sin sustituir, que tiene de 1 a 4 átomos de carbono (alquilo C₁₋₄), seleccionado de metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, *terc*-butilo.

En diversas realizaciones del compuesto de Fórmula general (Ib), el grupo carboxílico -CO(=O)R⁵ está presente en la posición *para*, *meta* u *orto* con respecto al grupo de unión -O-CH₂-.

En diversas realizaciones del compuesto de Fórmula general (Ib), los enlaces al resto de ácido barbitúrico y al grupo de unión -O-CH₂- están situados en posición *para*, *meta* u *orto* entre ellos.

En algunas realizaciones del compuesto de Fórmula general (Ib), los enlaces al resto de ácido barbitúrico y al grupo de unión -O-CH₂- están situados en posición *orto* entre ellos, y el enlace al grupo carboxílico -CO(=O)R⁵ está situado en posición *para* con respecto al enlace al grupo de unión

-O-CH₂-.

En algunas realizaciones del compuesto de Fórmula general (Ib), los enlaces al resto de ácido barbitúrico y al grupo

de unión -O-CH₂- están situados en posición *meta* entre ellos, y el enlace al grupo carboxílico -CO(=O)R⁵ está situado en posición *para* con respecto al enlace al grupo de unión

-O-CH₂-.

5

En algunas realizaciones del compuesto de Fórmula general (Ib), los enlaces al resto de ácido barbitúrico y al grupo de unión -O-CH₂- están situados en posición *para* entre ellos, y el enlace al grupo carboxílico -CO(=O)R⁵ está situado en posición *para* con respecto al enlace al grupo de unión

10

-O-CH₂-.

En algunas realizaciones del compuesto de Fórmula general (Ib), los enlaces al resto de ácido barbitúrico y al grupo de unión -O-CH₂- están situados en posición *orto* entre ellos, y el enlace al grupo carboxílico -CO(=O)R⁵ está situado en posición *meta* con respecto al enlace al grupo de unión

15

-O-CH₂-.

En algunas realizaciones del compuesto de Fórmula general (Ib), los enlaces al resto de ácido barbitúrico y al grupo de unión -O-CH₂- están situados en posición *para* entre ellos, y el enlace al grupo carboxílico -CO(=O)R⁵ está situado en posición *meta* con respecto al enlace al grupo de unión

20

-O-CH₂-.

En algunas realizaciones del compuesto de Fórmula general (Ib), los enlaces al resto de ácido barbitúrico y al grupo de unión -O-CH₂- están situados en posición *meta* entre ellos, y el enlace al grupo carboxílico -CO(=O)R⁵ está situado en posición *meta* con respecto al enlace al grupo de unión

25

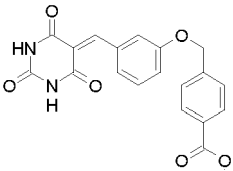
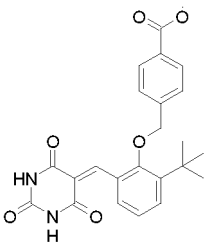
-O-CH₂-.

30 La Tabla 1 proporciona ejemplos no limitantes de compuestos de Fórmula general (Ib). Incluye compuestos de la siguiente manera: 4-((3-((2,4,6-Trioxo-tetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo (Fórmula 1), 4-((2-(*tert*-butil)-6-((2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo (Fórmula 2), 4-((2-((2,4,6-trioxo-tetrahidropirimidin-5(6H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo (Fórmula 3),

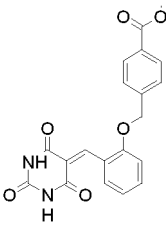
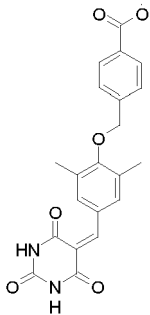
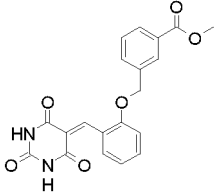
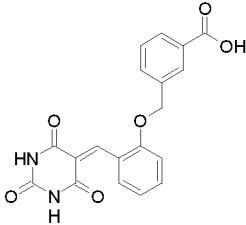
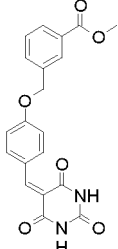
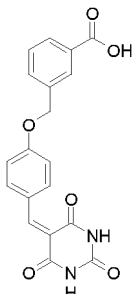
35 4-((2,6-dimetil-4-((2,4,6-trioxotetrahidro-pirimidin-5(2H)ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo (Fórmula 4), 3-((2-((2,4,6-trioxo-tetrahidropirimidin-5(6H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo (Fórmula 5), ácido 3-((2-((2,4,6-trioxo-tetrahidropirimidin-5(6H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoico (Fórmula 6), 3-((4-((2,4,6-trioxotetra-hidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo (Fórmula 7), ácido 3-((4-((2,4,6-trioxotetrahidro-pirimidin-5(2H)ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoico (Fórmula 8), y 3-((3-((2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo (Fórmula 9).

40

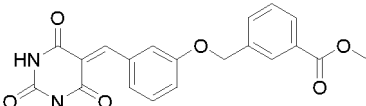
Tabla 1

N.º de Fórmula	Estructura	Nombre
Referencia 1		4-((3-((2,4,6-Trioxo-tetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil) fenoxi)metil)benzoato de metilo
2		4-((2-(<i>tert</i> -Butil)-6-((2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo

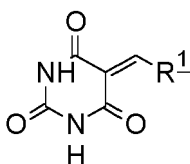
(continuación)

N.º de Fórmula	Estructura	Nombre
Referencia 3		4-((2-((2,4,6-Trioxo-tetrahidropirimidin-5(6H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo
4		4-((2,6-Dimetil-4-((2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(2H)ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo
Referencia 5		3-((2-((2,4,6-Trioxo-tetrahidropirimidin-5(6H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo
Referencia 6		Ácido 3-((2-((2,4,6-trioxo-tetrahidropirimidin-5(6H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoico
Referencia 7		3-((4-((2,4,6-Trioxotetra-hidropirimidin-5 (2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo
Referencia 8		Ácido 3-((4-((2,4,6-trioxotetra-hidro-pirimidin-5(2H)ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoico

(continuación)

N.º de Fórmula	Estructura	Nombre
Referencia 9		3-((3-((2,4,6-Trioxo-tetrahydropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo

En el presente documento se describe un compuesto de Fórmula general (I) en la que R¹ está presente y cada uno de L₁ y R² está ausente, que tiene la Fórmula general (Ic):



Fórmula (Ic)

en donde,

R¹ se selecciona de naftilo, fenantrenilo, tetraceno, crisen, fenantreno, trifenileno, pireno, tetrahydrofurano, furano, tiofeno, pirrol, 2H-pirrol, 2,5-dihidro-1H-pirrol, pirrolidina, oxazol, tiazol, imidazol, 4,5-dihidro-1H-imidazol, imidazolina, pirazol, 4,5-dihidro-1H-pirazol, pirazolina, isoxazol, isotiazol, 1,2,3-oxadiazol, 1,3,4-oxadiazol, 1,2,4-oxadiazol, 1,2,3-tiadiazol, 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, tetrazol, 1,2,3,4-oxatriazol, 2H-pirano, 3,4-dihidro-2H-pirano, 1,4-dioxano, morfolina, piperidina, piperazina, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, benzofurano, benzotiofeno, benzoxazol, benzotiazol, indol, indolina, benzoimidazol indazol, benzotriazol, 1H-pirrol-[3,2-b]pirazina, 1H-pirrol-[3,2-c]piridina, 1,3,5-triazina, pirrolo-[2,3-c]piridina, pirrolo-[2,3-b]piridina, 7H-pirrol-[2,3-d]pirimidina, 5H-pirrol-[3,2-d]pirimidina, 7H-purina, indolizina, pirrolo-[1,2-a]pirimidina, pirrolo-[1,2-a]pirazina, pirrolo-[1,2-c]pirimidina, pirrolo-[1,2-b]piridazina, imidazol[4,5-b]piridina, pirazolo[1,5-a]piridina, imidazo[1,5-a]piridina, imidazo[1,5-b]piridazina, imidazo[1,2-a]piridina, imidazo[1,2-b]piridazina, imidazo[1,2-c]pirimidina, imidazo[1,2-a]pirazina, imidazo[1,2-a]pirimidina, [1,2,3]triazolo[4,3-a]piridina, [1,2,3]triazolo[1,5-a]piridina, quinolina, isoquinolina, cinolina, quinazolina, quinoxalina, ftalazina, pirido[2,3-b]pirazina, pteridina, pirido[3,4-d]piridazina, 1,6-naftiridina, 1,8-naftiridina, 9H-carbazol, dibenzofurano y dibenzotiofeno, y en donde R¹ está sin sustituir o sustituido con uno o más de Z; o en donde R¹ es antraceno sustituido con uno o más de Z; y

en donde Z es independientemente uno o más de grupos funcionales seleccionados de lineales o ramificados: S-alquilo, N-alquilo, O-alquilo, alquilo, alqueno y arilo, cada uno de los cuales puede estar sin sustituir o sustituido por uno o más de halo, haloalquilo, ciano, nitro, hidroxilo, alqueno, arilo, alcoxi, ariloxi, aralcoxi, alquilcarbamido, arilcarbamido, amino, alquilamino, arilamino, dialquilamino, diarilamino, arilalquilamino, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, carboxilo, éster carboxílico, alcóxicarbonilo, ariloxicarbonilo, sulfo, alquilsulfonilamido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfino, arilsulfino; en donde Z también representa sustituciones directas en cualquier posición aromática de cada uno de R¹ por S-alquilo, N-alquilo, O-alquilo, alquilo, alqueno, arilo, halo, haloalquilo, ciano, nitro, hidroxilo, ariloxi, aralcoxi, alquilcarbamido, arilcarbamido, amino, alquilamino, arilamino, dialquilamino, diarilamino, arilalquilamino, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, carboxilo, éster carboxílico, alcóxicarbonilo, ariloxicarbonilo, sulfo, alquilsulfonilamido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfino, arilsulfino, sulfonilamida y sulfona; y

estereoisómeros, enantiómeros y tautómeros de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y mezclas de los mismos.

La invención también se refiere a los estereoisómeros, enantiómeros, mezclas de los mismos, y sales, particularmente las sales fisiológicamente aceptables, del compuesto de Fórmula general (Ib) de acuerdo con la invención, tal como, por ejemplo, los compuestos de las Fórmulas estructurales 2 y 4.

Algunos términos usados en el presente documento para describir los compuestos de acuerdo con la invención se definen más específicamente a continuación.

El término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo saturado, ramificado o no ramificado (cadena lineal) con 1 a 12 átomos de carbono (C) (alquilo C₁, alquilo C₂, alquilo C₃, alquilo C₄, alquilo C₅, alquilo C₆, alquilo C₇, alquilo C₈, alquilo C₉, alquilo C₁₀, alquilo C₁₁ o alquilo C₁₂). Los ejemplos no limitantes de dichos grupos incluyen metilo (alquilo C₁), etilo (alquilo C₂), n-propilo (alquilo C₃), isopropilo (alquilo C₃), butilo (alquilo C₄), iso-butilo (alquilo C₄), sec-butilo (alquilo

C₄), *terc*-butilo (alquilo C₄), n-pentilo (alquilo C₅), isopentilo (alquilo C₅), neo-pentilo (alquilo C₅), *terc*-pentilo (alquilo C₅), n-hexilo (alquilo C₆), iso-hexilo (alquilo C₆), etc.

De manera similar, los términos "alquenilo" y "alquinilo" representan grupos hidrocarburo insaturados, ramificados o no ramificados con 2 a 12 (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12) átomos de carbono (C) que contienen al menos un doble enlace carbono-carbono y un triple enlace carbono-carbono, respectivamente. Los grupos alquenilo de 2 a 6 átomos de carbono y que tienen un doble enlace son los más preferidos. Los grupos alquinilo de 2 a 6 átomos de carbono y que tienen un triple enlace son los más preferidos.

El término "alcoxi", se refiere a un grupo alquilo o alquilo sustituido como se ha definido anteriormente en el presente documento, que tiene uno, dos o tres átomos de oxígeno (-O-) en la cadena de alquilo. Los grupos alcoxi de 1 a 6 (1, 2, 3, 4, 5 o 6) átomos de carbono y que tienen un átomo de oxígeno en la cadena de alquilo son los más preferidos.

Los grupos alquilo, alqueno o alcoxi pueden ser monovalentes o bivalentes, representando la valencia la capacidad de combinarse con otro grupo. Por lo tanto, por "monovalente" se entiende que el grupo tiene una valencia de uno, y por "bivalente" se quiere decir que el grupo tiene una valencia de dos. Los ejemplos no limitantes de grupos alcoxi monovalentes incluyen: -O-alquilo C₁, -O-alquilo C₂, -O-alquilo C₃, -O-alquilo C₄, -O-alquilo C₅, -O-alquilo C₆, -O-alquilo C₇, -O-alquilo C₈, -O-alquilo C₉, -O-alquilo C₁₀, -O-alquilo C₁₁ o -O-alquilo C₁₂. Los ejemplos no limitantes de un alcoxi bivalente incluyen grupos tales como -O-alquilenos C₁- (por ejemplo, -O-CH₂-), -O-alquilenos C₂- (por ejemplo, -O-C₂H₄-), -O-alquilenos C₃-, -O-alquilenos C₄-, -O-alquilenos C₅-, -O-alquilenos C₆-, -O-alquilenos C₇-, -O-alquilenos C₈-, -O-alquilenos C₉-, -O-alquilenos C₁₀-, -O-alquilenos C₁₁ o -O-alquilenos C₁₂-.

El término "halo", como se usa en el presente documento, se refiere a un átomo seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo (F, Cl, Br e I), preferentemente Cl y Br.

El término "haloalquilo" se refiere a un alquilo sustituido que tiene uno o más sustituyentes halo. Por ejemplo, "haloalquilo" incluye mono, bi y trifluorometilo.

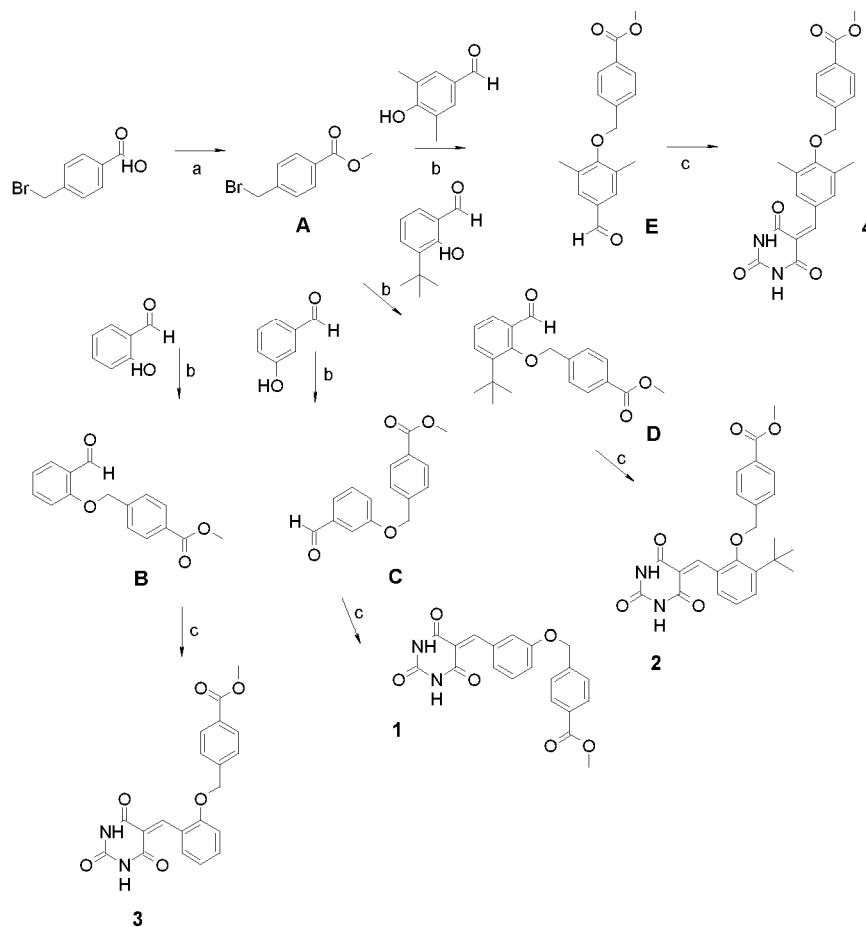
En el presente documento se describe un proceso para la preparación de compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic). Los compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic) pueden obtenerse usando métodos de síntesis conocidos, como se describe en la bibliografía, utilizando condiciones de reacción que son conocidas y adecuadas para dichas reacciones. Los compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic) pueden obtenerse mediante métodos de preparación que se describen más detalladamente a continuación.

Determinados compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic) se pueden preparar como se muestra en el **Esquema 1**. Por ejemplo, puede hacerse reaccionar ácido 4-bromometilbenzoico con alcohol metílico en presencia de una cantidad catalítica de H₂SO₄ para obtener el éster correspondiente: 4-(bromometil)benzoato de metilo (como se describe, por ejemplo, en Vassiliou, S., *et al.*, A synthetic method for diversification of the P1' substituent in phosphinic dipeptides as a tool for exploration of the specificity of the S1' binding pockets of leucine aminopeptidases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007. 15(9): pág. 3187-3200). La reacción se realiza en un disolvente adecuado, tal como un disolvente polar o anfífilo, por ejemplo, metanol (MeOH), en presencia de un ácido fuerte, tal como, por ejemplo, ácido sulfúrico (H₂SO₄), a reflujo durante varias horas, preferentemente durante aproximadamente 5 horas.

El benzoato resultante se puede purificar mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando cloroformo como eluyente. El benzoato purificado se puede hacer reaccionar con aldehídos comerciales disponibles usando el procedimiento descrito por Zidar, N. *et al.* (New 5-benzylidenethiazolidin-4-one inhibitors of bacterial MurD ligase: Design, synthesis, crystal structures, and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011. 46(11): pág. 5512-5523). La reacción se realiza en presencia de K₂CO₃, KI y CH₃CN, mientras se calienta, preferentemente a aproximadamente 70 °C, durante varias horas, preferentemente durante aproximadamente 5 horas, para proporcionar los compuestos intermedios: 4-((2-formilfenoxi)metil)benzoato de metilo (**B**), 4-(3-formilfenoxi)benzoato de metilo (**C**), 4-((2-*terc*-butil)-6-formilfenoxi)metil)benzoato de metilo (**D**), 4-((4-formil-2,6-dimetilfenoxi)metil)benzoato de metilo (**E**).

El producto en bruto (**B-E**) se puede purificar por cromatografía en columna ultrarrápida usando éter de petróleo-acetato de etilo (95:5) como eluyente. Los intermedios purificados se acoplan posteriormente con ácido barbitúrico, por ejemplo, usando un método de condensación de Knoevenagel (Ma, L., *et al.*, Synthesis and biological evaluation of 5-benzylidenepyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione derivatives for the treatment of obesity-related nonalcoholic fatty liver disease. *J Med Chem*, 2012. 55(22): pág. 9958-72) en presencia de 1:1 de EtOH/H₂O, preferentemente a reflujo, durante una noche, para obtener: 4-((3-((2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo (Fórmula **1**), 4-((2-((2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo (Fórmula **2**), 4-((2-((2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(6H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo (Fórmula **3**) y 4-((2,6-dimetil-4-((2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo (Fórmula **4**), respectivamente. El ácido barbitúrico se puede sintetizar por métodos conocidos *per se*, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento descrito por Ingle, V.N. *et al.* (Synthesis and biological activities of glycoconjugated spiro triones. *Int. J. PharmTech Res.*, 2009. 1(3): pág. 605-612) a partir de urea y ácido malónico en presencia de ácido acético y anhídrido acético.

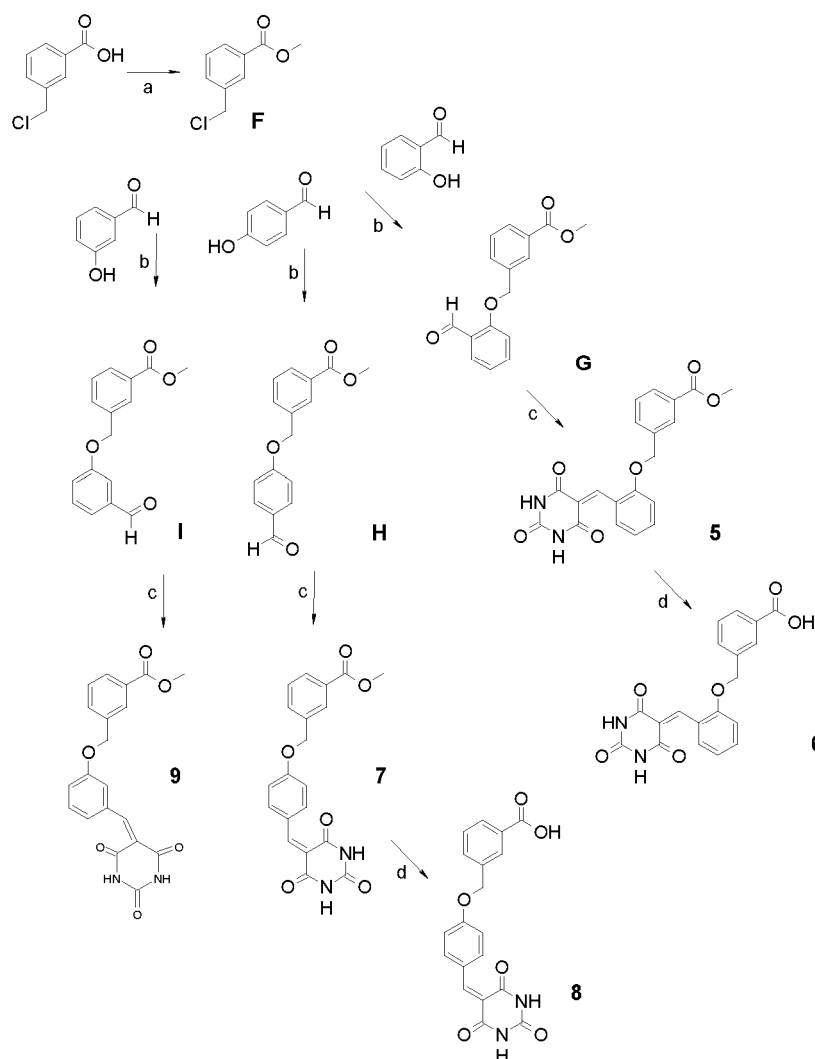
Esquema 1. Síntesis de compuestos de las Fórmulas 1, 2, 3 y 4.



- 5 Esquema 1. Vías sintéticas de compuestos derivados de ácido barbitúrico novedosos de las Fórmulas 1, 2, 3 y 4: a) MeOH, H₂SO₄, reflujo durante 5 horas. b) K₂CO₃, KI, CH₃CN, 70 °C durante 5 horas. c) 1:1 de EtOH/H₂O, ácido barbitúrico, reflujo durante una noche.

- 10 Determinados compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic) se pueden preparar como se muestra en el **Esquema 2**. Por ejemplo, usando como material de partida un ácido 3-(clorometil)-benzoico, se sintetizó un conjunto adicional de derivados de ácido barbitúrico novedosos de Fórmula general (I). Concretamente, 3-((2-((2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(6H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo (Fórmula 5), ácido 3-((2-((2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(6H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoico (Fórmula 6), 3-((4-((2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo (Fórmula 7), ácido 3-((4-((2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoico (Fórmula 8), y 3-((3-((2,4,6-trioxo-tetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo (Fórmula 9).

Esquema 2. Síntesis de los compuestos de las Fórmulas 5, 6, 7, 8 y 9.



Esquema 2. Vías sintéticas de compuestos derivados de ácido barbitúrico novedosos de las Fórmulas 5, 6, 7, 8 y 9:
 a) MeOH, H₂SO₄, reflujo durante 5 horas. b) K₂CO₃, KI, aldehído, CH₃CN, 70 °C durante 5 horas. c) 1:1 de EtOH/H₂O, ácido barbitúrico, reflujo durante una noche. d) NaOH 2 M, 1,4-dioxano:MeOH:H₂O/1:1:1, reflujo durante 5 horas.

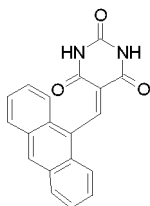
La invención también se refiere a los estereoisómeros, tales como diastereómeros y enantiómeros, mezclas y sales, particularmente las sales fisiológicamente aceptables, del compuesto de Fórmula general (Ib). Los compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic), o los productos intermedios en la síntesis de compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic), pueden resolverse en sus enantiómeros y/o diastereómeros sobre la base de sus diferencias físico-químicas usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las mezclas *cis/trans* pueden resolverse en sus isómeros *cis* y *trans* mediante cromatografía. Por ejemplo, los enantiómeros pueden separarse por cromatografía en fases quirales o por recristalización en un disolvente ópticamente activo o por siembra enriquecida en enantiómeros.

Los compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic), y los compuestos de las Fórmulas estructurales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, se pueden usar en su forma no salina final. Como alternativa, los compuestos de acuerdo con la invención se pueden convertir en sales de los mismos, particularmente sales fisiológicamente aceptables para uso farmacéutico, que se pueden obtener a partir de diversos ácidos y bases orgánicos e inorgánicos mediante procedimientos conocidos en la técnica. Las sales adecuadas de los compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic), y de los compuestos de las fórmulas estructurales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, pueden formarse con ácidos orgánicos o inorgánicos, tales como, sin limitación, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido palmítico o ácido maleico. Los compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic), que contienen un grupo carboxi, pueden convertirse en las sales de los mismos, particularmente en sales fisiológicamente aceptables para uso farmacéutico, con bases orgánicas o inorgánicas. Las bases adecuadas para este fin incluyen, por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, arginina o etanolamina.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un nuevo compuesto de Fórmula general (Ib), tal como, sin limitación, los compuestos de las Fórmulas estructurales **2** y **4**, que incluyen sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, que inhiben la trans migración de leucocitos *in vitro* y/o *in vivo* y poseen propiedades farmacológicas y farmacocinéticas adecuadas para su uso en terapia, es decir, para su uso como medicamentos.

De acuerdo con otro aspecto proporcionado en el presente documento son usos del compuesto de Fórmula general (Ib), tales como, sin limitación, los compuestos de las Fórmulas estructurales **2** y **4**, por ejemplo, como inhibidores de la trans migración de leucocitos.

En el presente documento se describe el uso de un compuesto que tiene la Fórmula estructural **10**:



Fórmula **10**,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como inhibidor de la trans migración de leucocitos.

El compuesto de Fórmula estructural **10** se puede obtener usando procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, como se describe en Knoevenagel, E., Condensation von Malonsäure mit aromatischen Aldehyden durch Ammoniak und Amine. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1898. 31(3): pág. 2596-2619; y en Figueroa-Villar, J.D. y A.A. Vieira, Nuclear magnetic resonance and molecular modeling study of exocyclic carbon-carbon double bond polarization in benzylidene barbiturates. Journal of Molecular Structure, 2013. 1034: pág. 310-317), por ejemplo, como se muestra en el **Esquema 3** en el Ejemplo 3 a continuación, evitando la formación de isómeros *cis* y *trans* durante el desarrollo del doble enlace en el proceso de condensación de Knoevenagel entre un aldehído correspondiente y un carbanión estable en la posición β-dicetona del ácido barbitúrico.

El compuesto de Fórmula estructural **10** se puede usar en su forma no salina final o se puede convertir en las sales del mismo, particularmente sales fisiológicamente aceptables para uso farmacéutico. Las sales adecuadas del compuesto de Fórmula **10** se pueden formar, por ejemplo, con ácidos orgánicos o inorgánicos, tales como, sin limitación, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, ácido palmítico o ácido maleico.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno o más de los compuestos de acuerdo con la Fórmula general (Ib), por ejemplo, los compuestos de las Fórmulas estructurales **2** y **4**, o estereoisómeros, enantiómeros y tautómeros de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y mezclas de los mismos; y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención opcionalmente comprenden además al menos un agente terapéutico que incluye, pero sin limitación, agentes antiinflamatorios, antisépticos, antibióticos, antivíricos, bactericidas, antifúngicos, antineoplásicos, compuestos anticancerosos y/u otros agentes bioactivos o terapéuticos que son aptos para uso humano.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del compuesto de acuerdo con la Fórmula general (Ib), y de los compuestos de las Fórmulas estructurales **2** y **4**, en la preparación de composiciones farmacéuticas para uso como medicamentos para el tratamiento de enfermedades como se describe en el presente documento.

Los compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic), especialmente los compuestos específicos de las Fórmulas **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8** y **9**, y el compuesto de Fórmula **10**, son inhibidores de la trans migración de leucocitos. El efecto de los compuestos de la invención y de los compuestos específicos de las Fórmulas **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9** y **10** sobre la trans migración de leucocitos, es decir, su capacidad para inhibir la trans migración de leucocitos, se determina mediante un ensayo de flujo. El cribado del ensayo de flujo puede realizarse como se describe en la técnica (Butcher, E.C., Leukocyte-Endothelial Cell Recognition - 3 (or More) Steps to Specificity and Diversity. Cell, 1991. 67(6): pág. 1033-1036).

Los compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic), y el compuesto de Fórmula estructural **10**, tienen valores de CI_{50} para varias actividades en el intervalo de 0,1 μM a 10 μM .

En vista de la capacidad de los compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic), tales como los compuestos específicos de las Fórmulas **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, y el compuesto de Fórmula **10**, y especialmente los compuestos específicos de las Fórmulas **2**, **9** y **10**, para inhibir la trans migración de leucocitos, los compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic), especialmente los compuestos específicos de las Fórmulas **2** y **9**, y el compuesto de

Fórmula 10, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden ser adecuados para tratar y/o prevenir todas aquellas afecciones o enfermedades que pueden verse influenciadas por la inhibición de la trans migración de leucocitos o enfermedades y trastornos asociados con la trans migración de leucocitos. Por lo tanto, los compuestos de acuerdo con las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic), tales como los compuestos específicos de las Fórmulas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y el compuesto de Fórmula 10, y especialmente los compuestos específicos de las Fórmulas 2, 9 y 10, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden ser particularmente adecuados para la prevención o el tratamiento de enfermedades o afecciones, tales como, sin limitación, enfermedades y trastornos inflamatorios, enfermedades y trastornos autoinmunitarios y cánceres.

Los compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic), tales como los compuestos específicos de las Fórmulas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y el compuesto de Fórmula 10, y especialmente los compuestos específicos de las Fórmulas 2, 9 y 10, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, también son particularmente adecuados para la prevención o tratamiento de enfermedades o afecciones tales como linfomas, en particular linfoma de linfocitos B, tales como, sin limitación, linfoma de linfocitos B pequeños (LLP), linfoma de células del manto, linfoma de células pilosas linfoma de linfocitos B de zona marginal, linfoma difuso de linfocitos B grandes y linfoma de Burkitt. Por ejemplo, se ha encontrado que el tratamiento con un compuesto de Fórmula 2 bloqueó significativamente la trans migración de las células cancerosas leucémicas al bazo y al hígado en ratones, como se describe en el Ejemplo 7 a continuación.

Los compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic), tales como los compuestos específicos de las Fórmulas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y el compuesto de Fórmula 10, y especialmente los compuestos específicos de las Fórmulas 2, 9 y 10, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, también pueden ser particularmente adecuados para la prevención o el tratamiento de enfermedades o afecciones tales como, por ejemplo: miocarditis, síndrome posinfarto de miocardio, síndrome de pospericardiotomía, endocarditis bacteriana subaguda (EBS), nefritis de la membrana basal antiglomerular, cistitis intersticial, colangitis esclerosante primaria, síndrome antisintetasa, alopecia areata, angioedema autoinmune, dermatitis autoinmune por progesterona, urticaria autoinmune, penfigoide ampolloso, penfigoide cicatricial, dermatitis herpetiforme, lupus eritematoso discoide, epidermólisis ampollosa adquirida, eritema nudoso, penfigoide gestacional, hidradenitis supurativa, liquen plano, liquen escleroso, enfermedad de IgA lineal (EAL), morfea, pénfigo vulgar, pitiriasis liquenoide y varioliforme aguda, enfermedad de Mucha-Habermann, enfermedad de Addison, síndrome poliendocrino autoinmune (SPA) de tipo 1, síndrome poliendocrino autoinmune (SPA) de tipo 2, síndrome poliendocrino autoinmune (SPA) de tipo 3, pancreatitis autoinmune, diabetes mellitus de tipo 1, tiroiditis autoinmune, tiroiditis de Ord, enfermedad de Graves, ooforitis autoinmune, endometriosis, enteropatía autoinmune, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, síndrome antifosfolípido (SAP, SAPL), anemia aplásica, anemia hemolítica autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune, enfermedad por crioaglutininas, crioglobulinemia mixta esencial, síndrome de Evans, hemoglobinuria paroxística nocturna, anemia perniciosa, aplasia pura de glóbulos rojos, trombocitopenia, adiposis dolorosa, enfermedad de Still de inicio en el adulto, espondilitis anquilosante, fascitis eosinófila, síndrome de Feltz, enfermedad relacionada con IgG4, artritis juvenil, enfermedad de Lyme (crónica), enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), reumatismo palindrómico, síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonnage-Turner, artritis psoriásica, artritis reactiva, policondritis recidivante, fibrosis retroperitoneal, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, síndrome de Schnitzler, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad indiferenciada del tejido conjuntivo, dermatomiositis, fibromialgia, miositis por cuerpos de inclusión, miositis, miastenia grave, neuromiotonía, degeneración cerebelosa paraneoplásica, polimiositis, encefalomiелitis aguda diseminada (EMAD), neuropatía axonal motora aguda, encefalitis anti receptor de N-metil-D-aspartato (Anti NMDA), esclerosis concéntrica de Baló, encefalitis de Bickerstaff, polineuropatía inflamatoria crónica desmielinizante, síndrome de Guillain-Barre, esclerosis múltiple, síndrome de Oshoran, trastorno neuropsiquiátrico pediátrico autoinmunitario asociado a *Streptococcus* (TNPAAS), neuropatía inflamatoria progresiva, síndrome de las piernas inquietas síndrome de la persona rígida, corea de Sydenham, mielitis transversa, retinopatía autoinmune, uveítis autoinmune, síndrome de Cogan, oftalmopatía de Graves, uveítis intermedia, conjuntivitis leñosa, úlcera de Mooren, neuromielitis óptica, síndrome de opsoclono-mioclono, neuritis óptica, escleritis, síndrome de Susac, oftalmía simpática, síndrome de Tolosa-Hunt, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (EAOI), enfermedad de Meniere, enfermedad de Behçet, granulomatosis eosinófila con poliangéitis (GEPA), arteritis de células gigantes, granulomatosis con poliangéitis (GPA), vasculitis por IgA (VlgA), enfermedad de Kawasaki, vasculitis leucocitoclástica, vasculitis lúpica, vasculitis reumatoide, poliangéitis microscópica (PAM), poliarteritis nodosa (PAN), polimialgia reumática, vasculitis urticaria, vasculitis, inmunodeficiencia primaria, encefalopatía de Hashimoto, enfermedades desmielinizantes inflamatorias idiopáticas, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, síndrome CREST, lupus inducido por fármacos, artritis relacionada con entesitis, neutropenia autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, colitis microscópica, colitis ulcerosa, orquitis autoinmune, síndrome de Sjögren, psoriasis, escleroderma sistémica, vitíligo, nefritis lúpica, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria (CBP).

La invención se refiere además a medicamentos que contienen al menos un compuesto de Fórmula general (Ib) y/o derivados, solvatos y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables del mismo, incluyendo mezclas del mismo en todas las relaciones, y opcionalmente excipientes y/o adyuvantes. El compuesto de Fórmula general (Ib), tal como, sin limitación, los compuestos de las Fórmulas estructurales 2 y 4, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, puede formularse en una composición farmacéutica, que comprende opcionalmente otras sustancias activas, y uno o más de excipientes convencionales inertes, como conocerán los expertos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse de acuerdo con la orientación general proporcionada en la técnica, por ejemplo, por Remington, The Science and Practice of Pharmacy (formerly known as Remington's Pharmaceutical Sciences), ISBN

978-0-85711-062-6. Dichas formulaciones farmacéuticas se pueden adaptar para la administración a través de cualquier método adecuado deseado conocido en la técnica, por ejemplo, por métodos por vía oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Dichas composiciones farmacéuticas, por ejemplo, en forma de formas farmacéuticas sólidas, formas farmacéuticas tópicas y/o formas farmacéuticas parenterales, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, cremas, ungüentos, parches, inyecciones y otros conocidos en la técnica, constituyen otro aspecto de la invención.

La dosis de los compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic), tales como, sin limitación, los compuestos de las Fórmulas estructurales **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9**, y el compuesto de Fórmula **10**, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, requerida para lograr el tratamiento o la prevención de una enfermedad, un trastorno o una afección normalmente depende de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del compuesto que se va a administrar, el paciente, la naturaleza de la enfermedad, el trastorno o afección y el método y frecuencia de administración.

Los intervalos de dosificación adecuados para los compuestos de las Fórmulas generales (I), (Ia), (Ib) e (Ic), tales como, sin limitación, los compuestos de las Fórmulas estructurales **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9**, y el compuesto de Fórmula **10**, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden ser de 1,0 a 100 mg/kg de peso corporal.

Por consiguiente, en otro aspecto, se proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o afección seleccionada de la lista que consiste en enfermedades y trastornos inflamatorios, enfermedades y trastornos autoinmunitarios, tales como, por ejemplo: miocarditis, síndrome posinfarto de miocardio, síndrome de pospericardiotomía, endocarditis bacteriana subaguda (EBS), nefritis de la membrana basal antiglomerular, cistitis intersticial, colangitis esclerosante primaria, síndrome antisintetasa, alopecia areata, angioedema autoinmune, dermatitis autoinmune por progesterona, urticaria autoinmune, penfigoide ampolloso, penfigoide cicatricial, dermatitis herpetiforme, lupus eritematoso discoide, epidermolisis ampollosa adquirida, eritema nudoso, penfigoide gestacional, hidradenitis supurativa, liquen plano, liquen escleroso, enfermedad de IgA lineal (EAL), morfea, pénfigo vulgar, pitiriasis liquenoide y varioliforme aguda, enfermedad de Mucha-Habermann, enfermedad de Addison, síndrome poliendocrino autoinmune (SPA) de tipo 1, síndrome poliendocrino autoinmune (SPA) de tipo 2, síndrome poliendocrino autoinmune (SPA) de tipo 3, pancreatitis autoinmune, diabetes mellitus de tipo 1, tiroiditis autoinmune, tiroiditis de Ord, enfermedad de Graves, ooforitis autoinmune, endometriosis, enteropatía autoinmune, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, síndrome antifosfolípido (SAP, SAPL), anemia aplásica, anemia hemolítica autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune, enfermedad por crioaglutininas, crioglobulinemia mixta esencial, síndrome de Evans, hemoglobinuria paroxística nocturna, anemia perniciosa, aplasia pura de glóbulos rojos, trombocitopenia, adiposis dolorosa, enfermedad de Still de inicio en el adulto, espondilitis anquilosante, fascitis eosinófila, síndrome de Felty, enfermedad relacionada con IgG4, artritis juvenil, enfermedad de Lyme (crónica), enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC), reumatismo palindrómico, síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonage-Turner, artritis psoriásica, artritis reactiva, policondritis recidivante, fibrosis retroperitoneal, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, síndrome de Schnitzler, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad indiferenciada del tejido conjuntivo, dermatomiositis, fibromialgia, miositis por cuerpos de inclusión, miositis, miastenia grave, neuromiotonía, degeneración cerebelosa paraneoplásica, polimiositis, encefalomiелitis aguda diseminada (EMAD), neuropatía axonal motora aguda, encefalitis anti receptor de N-metil-D-aspartato (Anti NMDA), esclerosis concéntrica de Baló, encefalitis de Bickerstaff, polineuropatía inflamatoria crónica desmielinizante, síndrome de Guillain-Barre, esclerosis múltiple, síndrome de Oshtoran, trastorno neuropsiquiátrico pediátrico autoinmunitario asociado a *Streptococcus* (TNPAAS), neuropatía inflamatoria progresiva, síndrome de las piernas inquietas, síndrome de la persona rígida, corea de Sydenham, mielitis transversa, retinopatía autoinmune, uveítis autoinmune, síndrome de Cogan, oftalmopatía de Graves, uveítis intermedia, conjuntivitis lefosa, úlcera de Mooren, neuromielitis óptica, síndrome de opsoclono-mioclono, neuritis óptica, escleritis, síndrome de Susac, oftalmía simpática, síndrome de Tolosa-Hunt, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (EAOI), enfermedad de Meniere, enfermedad de Behçet, granulomatosis eosinófila con poliangeítis (GEPA), arteritis de células gigantes, granulomatosis con poliangeítis (GPA), vasculitis por IgA (VlgA), enfermedad de Kawasaki, vasculitis leucocitoclástica, vasculitis lúpica, vasculitis reumatoide, poliangeítis microscópica (PAM), poliarteritis nodosa (PAN), polimialgia reumática, vasculitis urticaria, vasculitis, inmunodeficiencia primaria, encefalopatía de Hashimoto, enfermedades desmielinizantes inflamatorias idiopáticas, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, síndrome CREST, lupus inducido por fármacos, artritis relacionada con entesitis, neutropenia autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, colitis microscópica, colitis ulcerosa, orquitis autoinmune, síndrome de Sjögren, psoriasis, esclerodermia sistémica, vitiligo, nefritis lúpica, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria (CBP); linfomas de linfocitos B y otros tipos de cánceres, en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula general (Ib), tal como, sin limitación, los compuestos de las Fórmulas estructurales **2 y 4**.

Ejemplos

Materiales y métodos

Todos los reactivos químicos, disolventes y ácidos se adquirieron en Sigma-Aldrich, Acros Organic, Alfa Aesar, Bio-Lab Ltd., Merck o IU-CHEM Ltd., y se usaron tal como se recibieron. Se obtuvo THF anhidro por destilación a partir de

una mezcla hervida de color azul que contenía sodio (1 % p/v) y benzofenona (0,2 % p/v). Se obtuvo DMF anhidro por destilación al vacío y se almacenó sobre tamices moleculares de 4 Å. La cromatografía en columna se realizó en gel de sílice 60 (malla 230-400; Merck). Se realizaron análisis por HPLC analítica y preparativa (Young Lin Instruments, Anyang, Corea) en columnas preparativas LUNA C₁₈ (10 µm, 100 x 30 mm) o analíticas (5 µm, 250 x 4,6 mm), ambas de Phenomenex, Inc. (Torrance, CA, EE.UU.). La purificación por HPLC se realizó con un gradiente lineal creciente de CH₃CN en H₂O. La pureza de los compuestos sintetizados se confirmó mediante análisis por HPLC. El análisis por TLC analítica se realizó en láminas de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck) previamente recubiertas usando absorción UV y adsorción física de yodo para la visualización. Los espectros de masas se registraron en un instrumento Finnigan Modelo 400 usando un microespectrómetro QToF (Micromass, Milford, MA, EE.UU.), usando ionización por electronebulización (ESI, por sus siglas en inglés) en el modo de iones positivos. Los datos se procesaron usando un software de cálculo y desconvolución de masa L-ynX ver. 4.1 (Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.). Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se obtuvieron usando un LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Los puntos de fusión se midieron con un aparato de punto de fusión Fisher-Johns (Waltham, MA, EE.UU.). Los espectros de ¹H RMN, ¹³C RMN, F¹⁹ RMN y 2D se registraron a temperatura ambiente en un espectrómetro de RMN Bruker Avance (Vernon Hills, IL) que funcionaba a 300, 400, 600 y 700 MHz y fueron de acuerdo con las estructuras asignadas. Los valores de desplazamiento químico se informaron en relación con el TMS que se usó como patrón interno. Los desplazamientos químicos se expresaron en δ (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en hercios. Las abreviaturas del patrón de división son las siguientes: s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuadruplete; quint., quintuplete; m, multiplete no resuelto debido a la intensidad de campo del instrumento; dd, doblete de dobletes.

Para la preparación y cultivo de células endoteliales, se usó complemento de crecimiento de células endoteliales (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Para la purificación de monocitos se utilizó un kit de aislamiento de monocitos (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Las HUVEC se cultivaron a razón de 1 x 10⁵ células/portaobjetos en portaobjetos de 6 cámaras Ibidi (80606; Ibidi). Bomba calibrada usada (74 900; Cole Parmer, Vernon Hills, IL). Las observaciones realizadas con microscopía de contraste de fase (Modelo: Axiovert 100; Objetivo: 20x/0,3 NA air; Carl Zeiss) se registraron con una cámara de alta resolución (D70; Nikon, Zúrich, Suiza).

Ratones

Ratones NOD.CB17-Prkdcscid/J (NOD/SCID), DBA/1, NOD y cepa de ratón endogámica: C57BL/6J (B6 N.º 000664), los ratones hembra se obtuvieron de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) a las 6 semanas de edad. Todos los experimentos con animales se aprobaron por el Institutional Animal Care and Research Advisory Committee en la Geneva University and Veterinary Committee of Israeli Ministry of Health.

Preparación de los intermedios A y F

El procedimiento general para la síntesis de benzoatos metilados, tales como los intermediarios 4-(bromometil)benzoato de metilo (**A**) y 3-(clorometil)benzoato de metilo (**F**) se describe en Vassiliou, S., *et al.*, (A synthetic method for diversification of the P1' substituent in phosphinic dipeptides as a tool for exploration of the specificity of the S1' binding pockets of leucine aminopeptidases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007. 15(9): pág. 3187-3200).

A una solución de ácido 4-bromometilbenzoico o ácido 3-clorometilbenzoico (2,30 mmol) en MeOH (5,6 ml) se le añadió ácido sulfúrico concentrado (0,14 ml). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 5 horas. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó al vacío. A la mezcla de reacción se le añadió H₂O (20 ml) en un baño de hielo-agua, y el sólido resultante se filtró y se lavó con agua fría. El material sólido se repartió entre 1:1 de Et₂O/AcOEt y Na₂CO₃. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó al vacío para proporcionar los productos.

4-(Bromometil)benzoato de metilo (A): Se obtuvo partiendo de ácido 4-bromometilbenzoico, (polvo de color blanco, rendimiento del 48 %): ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,96 (d, J = 8,41 Hz, 2H), 7,40 (d, J = 8,41 Hz, 2H), 4,45 (s, 2H), 3,87 (s, 3H) ppm. ¹³C RMN (100,6 MHz, CDCl₃): δ 166,28, 142,59, 129,95, 128,98, 52,10, 32,27 ppm. MS (ESI, SQ), m/z (%): (229 ⁷⁹Br, 231 ⁸¹Br) [M+H]⁺.

3-(Clorometil)benzoato de metilo (F): Se obtuvo partiendo de ácido 3-clorometilbenzoico (jarabe incoloro, rendimiento del 75 %): ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8,06 (s, 1H), 7,99 (d, J = 7,76 Hz, 1H), 7,58 (d, J = 7,76 Hz, 1H), 7,429 (t, J = 7,76 Hz, 1H), 4,61 (s, 2H), 3,92 (s, 3H) ppm. ¹³C RMN (100,6 MHz, CDCl₃): δ 166,54, 137,91, 132,99, 130,73, 129,67, 129,55, 128,28, 52,23, 45,52 ppm. GC-MS (EI), 70 ev, m/z (%): 184 [M]⁺.

Preparación de los Intermedios B, C, D, E, G, H e I

El procedimiento general para la síntesis de los compuestos intermedios **B, C, D, E, G, H e I** se describe en Zidar, N., *et al.*, (New 5-benzylidenethiazolidin-4-one inhibitors of bacterial MurD ligase: Design, synthesis, crystal structures, and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011. 46(11): pág. 5512-5523). Una suspensión del compuesto intermedio **A** o **F** (6,55 mmol) y un benzaldehído correspondiente (6,55 mmol), carbonato potásico (13,10 mmol) y yoduro potásico (7,86 mmol) se calentó a 70 °C durante 5 horas. El disolvente se evaporó, el residuo

se disolvió en acetato de etilo (50 ml), se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (2 x 20 ml), agua (2 x 20 ml) y salmuera (2 x 10 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/éter de petróleo como eluyente.

4-((2-Formilfenoxi)metil)benzoato de metilo, (B): (polvo de color blanco, rendimiento del 60 %) ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 10,57 (s, 1H), 8,07 (d, J = 8,43 Hz, 2H), 7,86 (d, J = 7,50 Hz, 1H), 7,53 (d, J = 8,43 Hz, 2H), 7,76 (t, J = 7,50 Hz, 1H), 7,06 (t, J = 7,50 Hz, 1H), 7,01 (d, J = 8,44 Hz, 1H), 5,25 (s, 2H), 3,92 (s, 3H) ppm. ^{13}C RMN (75,49 MHz, CDCl_3): δ 189,48, 166,68, 160,64, 141,18, 135,94, 130,03, 128,73, 126,85, 125,19, 121,31, 112,90, 69,76, 52,20 ppm. MS (ESI, SQ), m/z (%): 293,1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

4-((3-Formilfenoxi)metil)benzoato de metilo, (C): (polvo de color amarillo, rendimiento del 54 %) ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 9,96 (s, 1H), 8,06 (d, J = 8,27 Hz, 2H), 7,54-7,44 (m, 5H), 7,29-7,22 (m, 1H), 5,17 (s, 2H), 3,91 (s, 3H) ppm. ^{13}C RMN (75,49 MHz, CDCl_3): δ 191,95, 166,74, 159,01, 141,48, 137,87, 130,23, 129,96, 129,89, 127,02, 124,00, 122,11, 113,15, 69,49, 52,16 ppm. MS (ESI, SQ), m/z (%): 271,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 293,2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

4-((2-terc-Butil)-6-formilfenoxi)metil)benzoato de metilo, (D): (polvo de color blanquecino, rendimiento del 43 %, p.f. 84 °C) ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 10,30 (s, 1H), 8,11 (d, J = 8,04 Hz, 2H), 7,75 (dd, J = 7,80 Hz, J = 1,65 Hz, 1H), 7,64 (dd, J = 7,81 Hz, J = 1,62 Hz, 1H), 7,58 (d, J = 8,04 Hz, 2H), 7,21 (t, J = 7,81 Hz, 1H), 5,12 (s, 2H), 3,94 (s, 3H), 1,44 (s, 9H) ppm. ^{13}C RMN (75,49 MHz, CDCl_3): δ 190,16, 166,78, 161,26, 143,93, 141,53, 133,72, 129,99, 129,91, 128,36, 126,53, 124,37, 79,35, 52,18, 35,26, 30,86 ppm. MS (ESI) encontrado m/z 349,14102 (calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_4$: 349,14103 $[\text{M}+\text{Na}]^+$). Anál. calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_4$: C, 73,60; H, 6,79. Encontrado: C, 74,32; H, 7,03.

4-((4-Formil-2,6-dimetilfenoxi)metil)benzoato de metilo, (E): (polvo de color amarillo, rendimiento del 94 %, p.f. 82 °C) ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 9,87 (s, 1H), 8,07 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,57 (s, 2H), 7,54 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,92 (s, 2H), 3,92 (s, 3H), 2,33 (s, 6H) ppm. ^{13}C RMN (75,49 MHz, CDCl_3): δ 191,52, 166,69, 160,86, 141,99, 132,52, 132,07, 130,75, 129,66, 127,24, 73,25, 52,13, 16,46 ppm. MS (ESI) encontrado m/z 299,12793 (calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_4$: 299,12779 $[\text{M}+\text{H}]^+$). Anál. calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_4$: C, 72,47; H, 6,08. Encontrado: C, 71,92; H, 5,87.

3-((2-Formilfenoxi)metil)benzoato de metilo, (G): (polvo de color blanco, rendimiento del 44 %) ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 10,52 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,98 (d, J = 7,63 Hz, 1H), 7,81 (d, J = 7,63 Hz, 1H), 7,63 (d, J = 7,63 Hz, 1H), 7,55-7,38 (m, 2H), 7,08-6,95 (m, 2H), 5,16 (s, 2H), 3,89 (s, 3H) ppm. ^{13}C RMN (75,49 MHz, CDCl_3): δ 189,00, 166,27, 160,43, 136,37, 135,68, 131,43, 130,32, 129,08, 128,57, 128,15, 128,06, 124,81, 120,86, 112,71, 69,48, 51,87 ppm. MS (ESI, SQ), m/z (%): 271,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 293,1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3-((4-Formilfenoxi)metil)benzoato de metilo, (H): (polvo de color blanco, rendimiento del 51 %) ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 9,83 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,98 (d, J = 7,56 Hz, 1H), 7,79 (d, J = 8,32 Hz, 2H), 7,60 (d, J = 7,56 Hz, 1H), 7,43 (t, J = 7,56 Hz, 1H), 7,04 (d, J = 8,32 Hz, 2H), 5,10 (s, 2H), 3,87 (s, 3H) ppm. ^{13}C RMN (75,49 MHz, CDCl_3): δ 190,58, 166,50, 163,34, 136,53, 131,89, 131,81, 130,54, 130,23, 129,32, 128,76, 128,45, 115,05, 69,46, 52,10 ppm. MS (ESI, SQ), m/z (%): 271,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 293 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3-((3-Formilfenoxi)metil)benzoato de metilo, (I): (polvo de color blanco, rendimiento del 41 %) ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 9,95 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 8,01 (d, J = 7,12 Hz, 1H), 7,63 (d, J = 7,12 Hz, 1H), 7,53-7,40 (m, 4H), 7,31-7,17 (m, 1H), 5,13 (s, 2H), 3,91 (s, 3H) ppm. ^{13}C RMN (75,49 MHz, CDCl_3): δ 192,02, 166,76, 159,06, 137,83, 136,81, 131,86, 130,57, 120,19, 129,33, 128,77, 128,54, 123,86, 122,06, 113,25, 69,55, 52,21 ppm. MS (ESI, SQ), m/z (%): 271,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 293 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Ejemplo 1

Preparación de compuestos de las Fórmulas 2 y 4, así como compuestos de referencia de las Fórmulas 1, 3, 5, 7 y 9

Se describe un procedimiento general para el acoplamiento de ácido barbitúrico y los aldehídos correspondientes en Ma, L., *et al.* (Synthesis and biological evaluation of 5-benzylidenepyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione derivatives for the treatment of obesity-related nonalcoholic fatty liver disease. J Med Chem, 2012. 55(22): pág. 9958-72).

Brevemente, un aldehído correspondiente (preparado como se ha descrito anteriormente en el presente documento) (3,5 mmol), etanol (10 ml), agua destilada (10 ml) y ácido barbitúrico (3 mmol) se calentaron a reflujo durante una noche. Los sólidos formados se recogieron por filtración por succión y se lavaron con agua hirviendo (3 x 15 ml), etanol (3 x 15 ml) y éter (3 x 15 ml). Los sólidos obtenidos se secaron al vacío.

4-((3-((2,4,6-Trioxotetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo, (Compuesto de referencia de Fórmula 1): (polvo de color amarillo, rendimiento del 57 %, p.f. 256 °C) ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 11,41 (s, 1H), 11,26 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 7,99 (d, J = 7,84 Hz, 2H), 7,91 (s, 1H), 7,71-7,57 (m, 3H), 7,405 (t, J = 8,10 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 8,10 Hz, 1H), 5,25 (s, 2H), 3,86 (s, 3H) ppm. ^{13}C RMN (75,49 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 165,93, 163,27, 161,49, 157,43, 154,19, 150,07, 142,26, 133,84, 129,27, 129,12, 128,95, 127,47, 126,29, 119,32, 118,93, 118,6468,62, 52,06 ppm. MS (ESI) encontrado m/z 403,09000 (calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6$: 403,09006 $[\text{M}+\text{Na}]^+$). Anál. calc.

para $C_{20}H_{16}N_2O_6$: C, 63,16; H, 4,24; N, 7,37. Encontrado: C, 63,23; H, 4,35; N, 7,56.

4-((2-(terc-Butil)-6-((2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo, (compuesto de Fórmula 2): (polvo de color amarillo, rendimiento del 14 %, p.f. 184 °C) 1H RMN (300 MHz, DMSO-6D): δ 11,33 (s, 1H), 11,19 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 7,99 (d, J = 8,08 Hz, 2H), 7,70 (d, J = 7,85 Hz, 1H), 7,61 (d, J = 8,08 Hz, 2H), 7,48 (d, J = 7,85 Hz, 1H), 7,12 (t, J = 7,85 Hz, 1H), 4,94 (s, 2H), 3,94 (s, 3H), 1,38 (s, 9H) ppm. ^{13}C RMN (100,6 MHz, DMSO-6D): δ 165,88, 162,95, 161,14, 157,91, 150,35, 150,20, 142,04, 141,62, 130,30, 130,27, 129,21, 129,05, 127,75, 127,37, 122,78, 119,60, 76,96, 52,07, 34,64, 30,50 ppm. MS (ESI) encontrado m/z 437,17087 (calc. para $C_{24}H_{24}N_2O_6$: 437,17071 [M+H]⁺). Anál. calc. para $C_{24}H_{24}N_2O_6$: C, 66,05; H, 5,54; N, 6,42. Encontrado: C, 66,12; H, 5,53; N, 6,81.

4-((2-((2,4,6-Trioxotetrahidropirimidin-5(6H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo, (Compuesto de referencia de Fórmula 3): (polvo de color amarillo, rendimiento del 64 %) 1H RMN (300 MHz, DMSO-6D): δ 11,35 (s, 1H), 11,17 (s, 1H), 8,58 (s, 1H), 8,06-7,93 (m, 3H), 7,60 (d, J = 8,28 Hz, 2H), 7,50 (t, J = 7,29 Hz, 1H), 7,16 (d, J = 8,28 Hz, 1H), 7,01 (t, J = 7,62 Hz, 1H), 5,34 (s, 2H), 3,86 (s, 3H) ppm. ^{13}C RMN (150,9 MHz, DMSO-6D): δ 165,87, 163,22, 161,32, 157,64, 150,14, 149,65, 142,05, 133,71, 132,40, 129,28, 129,06, 127,32, 122,07, 119,93, 118,94, 112,39, 69,25, 52,06 ppm. MS (ESI, SQ), m/z (%): 381,3 [M+H]⁺.

4-((2,6-Dimetil-4-((2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo, (compuesto de Fórmula 4): (polvo de color amarillo, rendimiento del 73 %, p.f. 281 °C) 1H RMN (400 MHz, DMSO-6D): δ 11,35 (s, 1H), 11,20 (s, 1H), 8,19 (s, 1H), 8,02 (d, J = 8,26 Hz, 2H), 7,99 (s, 2H), 7,66 (d, J = 8,26 Hz, 2H), 5,00 (s, 2H), 3,87 (s, 3H), 2,97 (s, 6H) ppm. ^{13}C RMN (100,6 MHz, DMSO-6D): δ 165,94, 163,54, 161,69, 159,16, 154,52, 150,11, 142,49, 135,17, 130,44, 129,24, 129,09, 128,26, 127,80, 117,32, 72,68, 52,07, 16,14 ppm. MS (ESI) encontrado m/z 409,13950 (calc. para $C_{22}H_{20}N_2O_6$: 409,13941 [M+H]⁺). Anál. calc. para $C_{22}H_{20}N_2O_6$: C, 64,70; H, 4,94; N, 6,86. Encontrado: C, 65,03; H, 4,76; N, 6,77.

3-((2-((2,4,6-Trioxotetrahidropirimidin-5(6H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo, (Compuesto de referencia de Fórmula 5): (polvo de color naranja, rendimiento del 56 %, p.f. 200 °C) 1H RMN (300 MHz, DMSO-6D): δ 11,46 (s, 1H), 11,27 (s, 1H), 8,68 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 8,10 (d, J = 8,21 Hz, 1H), 8,04 (d, J = 7,62 Hz, 1H), 7,85 (d, J = 7,33 Hz, 1H), 7,68 (t, J = 7,59 Hz, 1H), 7,61 (t, J = 7,87 Hz, 1H), 7,31 (d, J = 8,50 Hz, 1H), 7,116 (t, J = 7,62 Hz, 1H) ppm. ^{13}C RMN (75,49 MHz, DMSO-6D): δ 165,90, 163,18, 161,30, 157,66, 150,15, 149,72, 137,38, 133,70, 132,38, 132,04, 129,81, 128,96, 128,59, 127,88, 122,08, 119,87, 118,92, 112,41, 69,20, 52,12 ppm. MS (ESI) encontrado m/z 381,10834 (calc. para $C_{20}H_{16}N_2O_6$: 381,10811 [M+H]⁺). Anál. calc. para $C_{20}H_{16}N_2O_6$: C, 63,16; H, 4,24; N, 7,37. Encontrado: C, 63,16; H, 4,32; N, 7,12.

3-((4-((2,4,6-Trioxotetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo, (Compuesto de referencia de Fórmula 7): El compuesto del título se obtuvo partiendo de 34 y 5 (polvo de color amarillo, rendimiento del 71 %, p.f. 227 °C) 1H RMN (300 MHz, DMSO-6D): δ 11,33 (s, 1H), 11,20 (s, 1H), 8,37 (d, J = 8,34 Hz, 2H), 8,26 (s, 1H), 7,95 (d, J = 7,47 Hz, 1H), 7,77 (d, J = 7,60 Hz, 1H), 7,58 (t, J = 7,60 Hz, 1H), 7,16 (d, J = 8,34 Hz, 2H), 5,34 (s, 2H), 3,87 (s, 3H) ppm. ^{13}C RMN (75,45 MHz, DMSO-6D): δ 165,93, 163,798, 162,18, 162,06, 154,74, 150,12, 137,31, 137,14, 132,46, 129,83, 128,99, 128,72, 128,22, 125,40, 115,71, 114,60, 68,88, 52,14 ppm. MS (ESI) encontrado m/z 381,10818 (calc. para $C_{20}H_{16}N_2O_6$: 381,10811 [M+H]⁺). Anál. calc. para $C_{20}H_{16}N_2O_6$: C, 63,16; H, 4,24; N, 7,37. Encontrado: C, 62,39; H, 4,63; N, 7,24.

3-((3-((2,4,6-Trioxotetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoato de metilo, (Compuesto de referencia de Fórmula 9): (polvo de color amarillo, rendimiento del 17 %, p.f. 158 °C) 1H RMN (300 MHz, DMSO-6D): δ 11,40 (s, 1H), 11,25 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 8,06 (s, 1H), 7,93-7,83 (m, 2H), 7,75 (d, J = 7,54 Hz, 1H), 7,66 (d, J = 7,95 Hz, 1H), 7,57 (t, J = 7,54 Hz, 1H), 7,41 (t, J = 7,95 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 8,37 Hz, 1H), 5,24 (s, 2H), 3,87 (s, 3H) ppm. ^{13}C RMN (150,9 MHz, DMSO-6D): δ 165,96, 163,26, 161,48, 157,49, 154,24, 150,05, 137,57, 133,85, 132,32, 129,79, 129,11, 128,94, 128,55, 128,06, 126,19, 119,32, 118,89, 118,73, 68,67, 52,11 ppm. MS (ESI) encontrado m/z 381,10840 (calc. para $C_{20}H_{16}N_2O_6$: 381,10811 [M+H]⁺). Anál. calc. para $C_{20}H_{16}N_2O_6$: C, 63,16; H, 4,24; N, 7,37. Encontrado: C, 63,19; H, 4,29; N, 7,14.

Ejemplo 2

Preparación de compuestos de referencia de las Fórmulas 6 y 8

El procedimiento general para la síntesis de derivados de ácido benzoico se describe en Zidar, N., *et al.*, New 5-benzylidenethiazolidin-4-one inhibitors of bacterial MurD ligase: Design, synthesis, crystal structures, and biological evaluation. European Journal of Medicinal Chemistry, 2011. 46(11): pág. 5512-5523.

Brevemente, a una solución agitada de compuestos de las Fórmulas 5 o 7 (5,55 mmol) en 1,4-dioxano/metanol/agua (1:1:1) (30 ml) se le añadió gota a gota NaOH 2 M (5,55 ml, 11,10 mmol). Después de 5 horas, la mezcla se acidificó a pH 3 con HCl 1 M, la fase orgánica se evaporó, el residuo se disolvió en acetato de etilo (50 ml), se lavó con ácido cítrico al 10 % (2 x 20 ml) y salmuera (2 x 15 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida.

Ácido 3-((2-((2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(6H)ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoico, (Compuesto de referencia de Fórmula 6): (polvo de color amarillo, rendimiento del 49 %, p.f. 242 °C) ¹H RMN (600 MHz, DMSO-6D): δ 11,31 (s, 1H), 11,13 (s, 1H), 8,55 (s, 1H), 8,2 (s, 1H), 7,99 (d, J = 8,05 Hz, 1H), 7,91 (d, J = 7,47 Hz, 1H), 7,71 (d, J = 8,05 Hz, 1H), 7,54 (t, J = 8,05 Hz, 1H), 7,50 (t, J = 7,47 Hz, 1H), 7,19 (d, J = 8,38 Hz, 1H), 7,00 (t, J = 7,47 Hz, 1H) ppm. ¹³C RMN (150,9 MHz, DMSO-6D): δ 167,00, 163,25, 161,36, 157,81, 150,18, 149,75, 137,18, 133,80, 132,49, 131,76, 131,03, 128,84, 128,26, 122,06, 119,87, 118,90, 112,46, 69,44 ppm. MS (ESI) encontrado m/z 367,09259. calc. para C₁₉H₁₄N₂O₆: 367,09246 [M+H]⁺. Anál. calc. para C₁₉H₁₄N₂O₆: C, 62,30; H, 3,85; N, 7,65. Encontrado: C, 62,32; H, 3,90; N, 7,58.

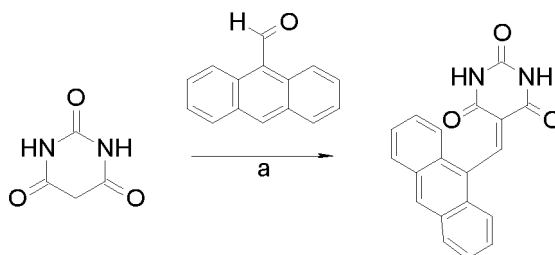
Ácido 3-((4-((2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(2H)ilideno)metil)fenoxi)metil)benzoico, (Compuesto de referencia de Fórmula 8): (polvo de color amarillo, rendimiento del 61 %, p.f. 289 °C) ¹H RMN (600 MHz, DMSO-6D): δ 11,30 (s, 1H), 11,17 (s, 1H), 8,37 (d, J = 9 Hz, 2H), 8,26 (s, 1H), 7,93 (d, J = 7,79 Hz, 1H), 7,73 (d, J = 7,79 Hz, 1H), 7,55 (t, J = 7,79 Hz, 1H), 7,16 (d, J = 9 Hz, 2H), 5,33 (s, 2H), 2,09 (s, 3H) ppm. ¹³C RMN (150,9 MHz, DMSO-6D): δ 166,98, 163,77, 162,22, 162,03, 154,74, 150,08, 137,28, 136,90, 132,01, 130,99, 128,85, 128,79, 128,38, 125,38, 115,71, 114,61, 68,99 ppm. MS (ESI) encontrado m/z 367,09265 (calc. para C₁₉H₁₄N₂O₆: 367,09246 [M+H]⁺). Anál. calc. para C₁₉H₁₄N₂O₆: C, 62,30; H, 3,85; N, 7,65. Encontrado: C, 62,12; H, 3,91; N, 7,43.

Ejemplo 3

Preparación del compuesto de referencia de Fórmula 10 (5-(antracen-9-ilmetileno)pirimidin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona)

El compuesto de Fórmula 10 se sintetizó como se muestra en el **Esquema 3** tras el procedimiento descrito en detalle en el Ejemplo 1 anterior del presente documento.

Esquema 3



En el **Esquema 3**: a) EtOH:H₂O, 1:1, ácido barbitúrico, reflujo durante una noche.

5-(antracen-9-ilmetileno)pirimidin-2,4,6(1H,3H,5H)-triona, (Compuesto de referencia de Fórmula 10): (polvo de color rojo, rendimiento del 54 %, p.f. >300 °C) ¹H RMN (400 MHz, DMSO-6D): δ 11,57 (s, 1H), 11,17 (s, 1H), 9,01 (s, 1H), 8,63 (s, 1H), 8,12 (s, 2H), 7,97 (s, 2H), 7,52 (s, 4H) ppm. ¹³C RMN (75,46 MHz, DMSO-6D) δ 162,28, 160,41, 151,20, 150,42, 130,50, 129,38, 128,57, 127,69, 127,55, 126,12, 125,42 ppm. MS (ESI) encontrado m/z 317,009259 (calc. para C₁₉H₁₂N₂O₃: 317,09207 [M+H]⁺). Anál. calc. para C₁₉H₁₂N₂O₃: C, 72,15; H, 3,82; N, 8,86. Encontrado: C, 72,12; H, 3,79; N, 8,72.

Ejemplo 4

Evaluación biológica *in vitro* - Flujo de leucocitos

Se usó un ensayo de flujo que permite un análisis detallado de las interacciones de leucocitos individuales con células endoteliales (CE), descrito en Bradfield *et al.* (Bradfield *et al.*, 2016, PLoS One, 21 de julio;11(7); Bradfield *et al.*, 2007, Blood. 1 de octubre;110(7):2545-55) para la evaluación de los efectos biológicos de los compuestos de acuerdo con la invención. Este método permite la determinación de los posibles efectos de los compuestos en tres fases principales de la migración de leucocitos: la captura de leucocitos libres no unidos por el endotelio, la migración de leucocitos en la superficie del endotelio y la migración transendotelial (transmigración) de leucocitos humanos a través del capa de las HUVEC. Los eventos posteriores a la transmigración también se pueden monitorizar mediante el seguimiento de leucocitos individuales. La figura 1 muestra la estructura genérica de una cámara de flujo. Se cultivaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) en el canal de plástico de la cámara de flujo, y se hicieron fluir leucocitos humanos sobre ellas usando una bomba calibrada, lo que permitió monitorizar la captura, la adhesión y la migración de monocitos.

Preparación de las células

Preparación y cultivo de células endoteliales

Se aislaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) mediante el tratamiento con collagenasa de las venas umbilicales como se ha descrito previamente (Wall, R.T., *et al.*, Factors influencing endothelial cell proliferation *in vitro*. J Cell Physiol, 1978. 96(2): pág. 203-13) y se mantuvieron en M199 que contenía suero fetal de ternero (FCS) al 20 %, 15 µg/ml de complemento de crecimiento de células endoteliales (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), 100 µg/ml de heparina, hidrocortisona 50 µM y 10 µg/ml de vitamina C. Las células se cultivaron hasta un máximo de 5 pases.

Aislamiento de monocitos

En primer lugar, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la sangre de donantes sanos, seguido de purificación de monocitos usando un kit de aislamiento de monocitos (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). La pureza y la actividad de los monocitos se controlaron mediante citometría de flujo marcando con anti CD14 y anti CD62L. Solo se usaron poblaciones del 90 % o más de células positivas dobles.

Configuración Experimental

Ensayos de flujo de cizallamiento

Los ensayos de flujo se realizaron como se ha descrito en un estudio previo (Bradfield, P.F., *et al.*, JAM-C regulates unidirectional monocyte transendothelial migration in inflammation. Blood, 2007. 110(7): pág. 2545-55). Las HUVEC se cultivaron a razón de 1×10^5 células/portaobjetos en portaobjetos de 6 cámaras Ibidi (80606; Ibidi) antes del tratamiento con TNF α (500 U/ml) durante 6-10 horas. A continuación se conectó una salida de cámara individual a una bomba calibrada (74 900; Cole Parmer, Vernon Hills, IL) y el flujo se generó perfundiendo tampón de lavado (M199 con BSA al 0,15 %) o una suspensión de monocitos ($2,5 \times 10^6$ células/ml) sobre la monocapa de HUVEC. El caudal fue representativo de las velocidades de cizallamiento en vénulas pequeñas (0,05 Pa). Las observaciones realizadas con microscopía de contraste de fase (Modelo: Axiovert 100; Objetivo: 20x/0,3 NA air; Carl Zeiss) se registraron con una cámara de alta resolución (D70; Nikon, Zúrich, Suiza). Las imágenes individuales se registraron cada 30 segundos con el software de captura de Nikon (v4.2) y se compilaron en secuencias de películas con Adobe Photoshop (CS6) e Image J (v1.5d), lo que permitió el análisis de monocitos individuales en grandes áreas. Los compuestos ensayados, por ejemplo, los compuestos de Fórmula general (I), se mantuvieron a la concentración especificada en todos los tampones de lavado durante el transcurso del experimento. Los compuestos se incubaron previamente por separado tanto en HUVEC como en monocitos 15 minutos antes del cocultivo de flujo. Las monocapas de HUVEC se lavaron durante 10 minutos antes de una etapa de lavado del compuesto para permitir este período de preincubación. A continuación, la suspensión de monocitos se perfundió sobre HUVEC durante 4 minutos, seguido de 20 a 60 minutos con tampón de lavado. El registro del intervalo de tiempo se inició con el primer contacto de los monocitos con la monocapa. Los datos de adhesión de monocitos se presentan como el número total de monocitos por campo unitario. Los eventos de trans migración se presentan como un porcentaje de monocitos totales capturados del flujo por campo unitario. Todos los experimentos se realizaron usando campos por cuadruplicado y se presentan como un valor medio ($\pm$ EEM).

Análisis

Perfil de seguimiento de una captura de monocitos humanos en una superficie luminal de HUVEC activadas

La figura 2 muestra el perfil de seguimiento de una captura de monocitos humanos en una superficie luminal de HUVEC activadas (cronología, posición e imágenes).

Se muestra una cronología para representar el posicionamiento y el tiempo de un monocito individual durante el análisis de películas (marcado como "Cronología"). Las imágenes de películas capturadas (marcadas como "Imágenes") representan los diferentes fenotipos asociados con la captura y trans migración de monocitos cuando se usa microscopía de contraste de fase. La posición de los monocitos se determina por la apariencia de la fase y la historia celular (marcada como "Posición"). En este ejemplo particular, se capturó un solo monocito 2 minutos después de la introducción del flujo de monocitos en la superficie luminal de HUVEC (recuadro con entramado). Esto vino seguido rápidamente de una adhesión firme y migración luminal (3-7 minutos, recuadros de color gris). Esto fue consistente con que el monocito adoptara una forma irregular y una apariencia de fase de color gris (marcada como "G"). La trans migración (Posición "T") tuvo lugar entre 8 y 9 minutos (recuadros con rayas de color gris/negro) en una unión de HUVEC intercelular donde el monocito adoptó una apariencia compuesta de fase de color gris y negro (marcada con "G" y "T", respectivamente) a medida que se mueve hacia el compartimento adluminal. Una vez que se completó la trans migración, el monocito migró dentro del compartimento adluminal durante la duración del experimento (recuadros de color negro) y tenía una apariencia de fase de color negro (marcada como "B").

Resultados

Los monocitos se hicieron fluir sobre las HUVEC activadas con TNF durante los primeros 5 minutos del experimento antes de cambiar a un tampón de lavado durante 40 minutos. Los monocitos adherentes aparecieron como una fase

de color blanco, que cambia rápidamente a una fase de color gris a medida que las células se vuelven firmemente adherentes. Los monocitos que transmigraron a través de la monocapa de HUVEC cambiaron a una apariencia de fase de color negro, con eventos de trans migración inversa marcados por un retorno al compartimento luminal y una reversión a la fase de color gris. Este cambio en la apariencia celular y las fases de migración permitieron medir todos los aspectos del reclutamiento y la retención de monocitos. Las condiciones de control indicaron que los monocitos tenían buena forma. Se adhirieron a las HUVEC y transmigraron en 15 minutos desde el inicio del experimento. El rango de potencia de los compuestos ensayados se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2

Compuesto (30 μ M)	Nivel de bloqueo de trans migración (%)
DMSO	0
Fórmula de referencia 1	81
Fórmula 2	100
Fórmula 4	75
Fórmula de referencia 6	78
Fórmula de referencia 9	98
Fórmula de referencia 10	92

Todos los compuestos ensayados exhibieron una inhibición efectiva (75 % o más) del rodamiento de monocitos. Los compuestos de referencia de las Fórmulas 9 y 10 exhibieron una inhibición del rodamiento de monocitos superior al 90 %; mientras que el compuesto de Fórmula 2 bloqueó completamente la trans migración de monocitos. En la figura 3 se presenta un resumen de los resultados.

Otro parámetro que se puede medir en el ensayo de trans migración de monocitos es el nivel de adhesión de los monocitos a las células endoteliales. Este parámetro se usó para determinar si los efectos inhibidores de los compuestos desvelados en el presente documento están relacionados con su intervención con la adhesión o con la propia vía de trans migración. El efecto del compuesto de Fórmula 2, así como de los compuestos de referencia de las Fórmulas 9 y 10 se ensayó de este modo y los resultados se muestran en las figuras 4A y 4B. La adhesión de los monocitos no se vio afectada, como se muestra en la figura 4A, por los tres compuestos ensayados. El único efecto se observó en el proceso de trans migración. Sin quedar ligado a ninguna teoría en particular, se puede plantear la hipótesis de que el mecanismo de acción de los compuestos ensayados puede ser a través de la inhibición del proceso de trans migración y que el efecto puede atribuirse a la adhesión de los monocitos a las células endoteliales.

Se investigó el efecto de respuesta a la dosis del compuesto de Fórmula 2 y el compuesto de referencia de Fórmula 10 usando el mismo sistema de monocitos/HUVEC mediante un ensayo de flujo idéntico que muestra la respuesta a la dosis para el compuesto de los compuestos. Se usaron diluciones en serie de ambos compuestos partiendo de 100 μ M a 3 nM. Los resultados se proporcionan en las figuras 5A y 5B, donde 5A muestra los resultados para el compuesto de Fórmula 2 y 5B muestra los resultados para el compuesto de referencia de Fórmula 10. La figura 5A muestra que el compuesto de Fórmula 2 no estuvo activo en una concentración por debajo de 300 nM. Sin embargo, en una concentración de 30-100 μ M, el compuesto mostró un bloqueo total de la trans migración de monocitos y en una concentración de 3 μ M se detectó un bloqueo parcial. El compuesto de referencia de Fórmula 10 no estuvo activo en concentraciones por debajo de 30 nM, mientras que a concentraciones más altas se observó un efecto parcial. El bloqueo total de la trans migración se detectó solo a altas concentraciones (100 μ M).

Para resumir los datos relativos a la actividad del compuesto de Fórmula 2 y el compuesto de referencia de Fórmula 10, se determinaron los valores de CI_{50} y el tiempo del efecto máximo, como se muestra en las figuras 6A-6D y 7A-7D, respectivamente. El valor de CI_{50} para el compuesto de Fórmula 2 fue de 2,4 μ M. El tiempo del efecto máximo del compuesto de Fórmula 2 fue de 20 minutos. La máxima eficacia del compuesto de Fórmula 2 se detectó como un 48 % de inhibición. La eficacia máxima del compuesto de referencia de Fórmula 10 se detectó en el 40 % de la incubación. El valor de CI_{50} para el compuesto de referencia de Fórmula 10 fue de 0,3 μ M. El tiempo del efecto máximo del compuesto de referencia de Fórmula 10 fue de 25 minutos.

Ejemplo 5

Evaluación del compuesto de Fórmula 2 *in vivo*, en un modelo de ratón con inflamación intraperitoneal (modelo de peritonitis por tioglicolato)

Se eligieron ratones hembra C57BL/6J (The Jackson Laboratory) para este experimento. La inflamación aguda se indujo mediante la inyección de tioglicolato en la cavidad abdominal como se describe por Hoover-Plow J.L. *et al.* (Strain and model dependent differences in inflammatory cell recruitment in mice. *Inflammation Research*, 2008. 57(10): pág. 457-463).

A los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal 0,5 ml de tioglicolato al 4 % (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) y después de 6 o 72 horas correspondientes al reclutamiento máximo de neutrófilos (6 horas) y macrófagos (72 horas),

el líquido de lavado peritoneal, y las células se recogieron como se ha descrito previamente por Ploplis, V.A. *et al.* (Plasminogen deficiency differentially affects recruitment of inflammatory cell populations in mice. *Blood*, 1998. 91(6): pág. 2005-2009). El número de neutrófilos y macrófagos (Tang, L.P. y J.W. Eaton, Fibrin (Ogen) Mediates Acute Inflammatory Responses to Biomaterials. *Journal of Experimental Medicine*, 1993. 178(6): pág. 2147-2156) acumulados en el lavado se determinó a partir de la actividad enzimática de la mieloperoxidasa para los neutrófilos (Himmelhoch, S.R., *et al.*, Purification of myeloperoxidases from the bone marrow of the guinea pig. *Biochemistry*, 1969. 8(3): pág. 914-21) y la esterasa no específica para los macrófagos/monocitos (Torres, J.L., R.S. Rush y A.R. Main, Physical and chemical characterization of a horse serum carboxylesterase. *Arch Biochem Biophys*, 1988. 267(1): pág. 271-9).

Después de inducir la inflamación (peritonitis), se inyectó el compuesto de Fórmula 2 a una concentración de 12,5 mg/kg (DMSO, 01 % en PBS, IP), dos veces (un día después del otro). Al día siguiente, los ratones se sacrificaron y el líquido peritoneal se extrajo de los ratones de control y tratados (n = 3 para cada grupo). Se realizaron dos ensayos para la estimación del posible efecto antiinflamatorio del compuesto de Fórmula 2: recuento de leucocitos (la cantidad total y el cálculo del porcentaje de diferentes fracciones de leucocitos) y una citometría de flujo.

Recuento de leucocitos

Como se muestra en la figura 8, el compuesto de Fórmula 2 redujo significativamente (85 %) la cantidad de linfocitos en el líquido peritoneal. Además, la cantidad de células dendríticas que son células presentadoras de antígenos del sistema inmunitario de los mamíferos aumentó significativamente (2,5 veces). Junto con el efecto inhibitorio predecible del compuesto sobre la trans migración de linfocitos al área de la inflamación, este aumento de la cantidad de células dendríticas es un resultado inesperado. Sin embargo, sin quedar ligado a ninguna teoría, se cree que este fenómeno está de acuerdo con el hecho de que durante el reclutamiento fallido de linfocitos con respecto al área de inflamación, las células dendríticas se estimulan para producir una reacción inmunitaria fisiológica debido a su función principal, que consiste en procesar material antigénico y presentarlo en la superficie celular para estimular los linfocitos T del sistema inmunitario. Estos resultados muestran que el compuesto de Fórmula 2 indujo una retroalimentación negativa en el sistema inmunitario para tratar de superar la falta de una cantidad suficiente de linfocitos en el área de la inflamación. Es importante destacar que la cantidad total de leucocitos en el líquido abdominal no se vio afectada por el compuesto de Fórmula 2. Esto puede indicar que el efecto del compuesto es específico para varias poblaciones de leucocitos pero no para todas. Además, la cantidad de neutrófilos y monocitos no se vio afectada en presencia del compuesto de Fórmula 2.

Ensayo de citometría de flujo de diez colores

Se seleccionó para el análisis la citometría de flujo basada en un marcador de proteína fluorescente (CD115). Se genera por monocitos y se localiza en su membrana plasmática como se describe por Yang, J. *et al.* (Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res*, 2014. 2(1): pág. 1). Esta proteína es capaz de reconocer y unirse específicamente a un anticuerpo F4/80 que activa los macrófagos del sistema inmunitario (Lin, H.H., *et al.*, The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, 2005. 201(10): pág. 1615-1625).

La viabilidad celular antes del experimento FACS se evaluó mediante incubación en el colorante reactivo con amina Aqua (Invitrogen) (dilución 1:500) en PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (TA), seguido de un solo lavado en PBS. Para todos los experimentos, las células se incubaron en 0,5 μg de Fc Block (BD Biosciences) durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). La tinción de la superficie se realizó en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C en tampón de tinción. Se usó un marcador de superficie (CD115, APC clon AFS98, en dilución 1:100, de eBioscience). Además, se aplicaron los siguientes anticuerpos contra CD115: clon F4/80 CLA3-1 Alexa Fluor 647 (diversas diluciones, optimizado a 1:200, AcD Serotec, Raleigh, NC, EE.UU.), clon F4/80 BM8 Alexa Fluor 700 (diversas diluciones, AbD Serotec), clon F4/80 BM8 APC (diversas diluciones, optimizado a 1:100, eBioscience), clon F4/80 BM8 FITC (diversas diluciones, eBioscience), clon F4/80 BM8 PE (diversas diluciones, eBioscience), clon F4/80 BM8 PE-Cy7 (diversas diluciones, eBioscience), clon F4/80 BM8 PE-Texas Red (diversas diluciones, eBioscience), clon F4/80 BM8 PerCP-Cy5.5 (diversas diluciones, eBioscience). Los experimentos de citometría de flujo se adquirieron en un citómetro LSR II (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, EE.UU.) equipado con láseres de excitación de 405 nm, 488 nm, 561 nm y 640 nm. Toda la recopilación y clasificación de datos se realizó con el software BD FACS Diva (BD Biosciences) y los análisis de datos se realizaron con el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EE.UU.). Se usaron controles de fluorescencia menos uno (FMO, por sus siglas en inglés) para análisis de selección para distinguir poblaciones de células teñidas positivamente de las teñidas negativamente. La compensación se realizó usando controles de un solo color preparados a partir de perlas BD Comp (BD Biosciences) para la tinción de la superficie celular o perlas Arc (Invitrogen) para la discriminación live/dead Aqua. Las matrices de compensación se calcularon y se aplicaron usando el software FlowJo (Tree Star). La transformación biexponencial se ajustó manualmente cuando fue necesario.

Usando esta interacción, solo los macrófagos positivos fluorescentes de la cavidad abdominal, que se trataron con el compuesto de Fórmula 2 y los ratones no tratados, fueron detectados por FACS. Los resultados obtenidos se

presentan en la figura 9. El compuesto de Fórmula 2 disminuyó considerablemente la cantidad de activados (macrófagos altos) y elevó el nivel de no activados (macrófagos bajos). Esto se puede observar por el cambio en la intensidad de la señal fluorescente en la figura 9 de la selección 2+3 a la selección 1.

5 **Ejemplo 6**

Perfil de seguridad del compuesto de Fórmula 2 en ratones sin tratar *in vivo*

Preparación de una suspensión a base de metilcelulosa para la administración *in vivo* del compuesto de Fórmula 2

Se preparó metilcelulosa al 1 % en solución de DDW añadiendo 0,5 g de metilcelulosa en 50 ml de DDW y agitando la solución a la velocidad más baja posible (sin formar burbujas) durante una noche a temperatura ambiente. La solución madre de Fórmula 2 se preparó en una concentración de 20 mg/ml a temperatura ambiente siguiendo el siguiente orden de acciones:

1. Se pusieron 30 mg del compuesto de Fórmula 2 en el vial de vidrio junto con un pequeño imán.
2. Se añadieron 1,5 ml de metilcelulosa al 1 % mediante un movimiento circular (remolino) muy lento. El disolvente cubrió suavemente toda la superficie del vial y no se permitió que el polvo flotara sobre el líquido.
3. La suspensión resultante se agitó a la menor velocidad posible hasta 48 horas a temperatura ambiente.
4. Se preparó una solución madre de Fórmula intermedia 2 a una concentración de 10 mg/ml diluyendo una solución madre de 20 mg/ml 1:1 (v/v) con la misma cantidad de DDW. Se añadió DDW a la solución madre de Fórmula 2. La suspensión obtenida se agitó a la menor velocidad posible durante una hora más a temperatura ambiente.
5. La solución de trabajo de Fórmula 2 a razón de 3 mg/ml se preparó diluyendo la solución madre intermedia (v/v) con DDW en consecuencia. La suspensión de trabajo de Fórmula 2 se agitó a baja velocidad (~80-100 rpm) durante 30 minutos a razón de 1 hora antes de usarla en experimentos con animales.

Toxicología aguda (pruebas bioquímicas e histología)

Se usaron para el experimento ocho grupos experimentales con 5 ratones hembra C57BL/6J de 6-7 semanas de edad cada uno y un grupo de control de ratones no tratados (sin tratar). Los ratones se administraron con aplicación diaria de la suspensión de trabajo del compuesto de Fórmula 2, preparada como se ha descrito anteriormente, a razón de 5, 10 y 15 mg/kg por inyección intraperitoneal (IP) o a razón de 10, 20 y 30 mg/kg por sonda nasogástrica (PO). Los ratones de todos los grupos experimentales se observaron en busca de signos de toxicidad inmediatamente después de la dosificación y después de 2 horas después de cada administración diaria. Los ratones de todos los grupos se sacrificaron con isoflurano 24 horas después de la administración de la última dosis. Muestreo para recuentos de sangre completa (WBC) y diferenciación de glóbulos blancos: Se recogieron 200 µl de sangre completa en tubos con EDTA (tubos Greiner MiniCollect K3EDTA). Para el panel metabólico completo, se extrajo el resto de la sangre completa (300-400 µl) para la preparación del suero. Todos los análisis de sangre se realizaron en American Medical Labs, Herzeliyah, Israel. Se extrajeron el hígado, bazo, pulmones, corazón y riñones de cada ratón y se pusieron en viales con formalina tamponada al 4 % después de la inclusión en parafina y el corte. Las secciones de cada órgano de cada animal se tiñeron con H&E y se realizó una evaluación histológica del tejido.

Resultados

Los resultados de estas pruebas se proporcionan en las figuras 10 a 16. Como puede observarse en estas figuras, no se observaron cambios significativos en los recuentos de sangre completa y la diferenciación de glóbulos blancos en todos los ratones tratados con el compuesto de Fórmula 2, a ninguna de las concentraciones y en las vías de administración usadas (figuras 10A-10G y 11A-11F). Todos los valores metabólicos ensayados se encontraban en el intervalo normal en ratones tratados con el compuesto de Fórmula 2 como se muestra en las figuras 12A-12F, 13A-13E y 14A-14F. La evaluación microscópica de todos los tejidos de los ratones no mostró cambios en la morfología de los tejidos en los ratones tratados con el compuesto de Fórmula 2 como se muestra en las figuras 15 y 16.

Ejemplo 7

Evaluación del compuesto de Fórmula 2 *in vivo* en un modelo de linfoma de linfocitos B en ratones NOD.CB17-Prkdcscid/J

Ensayo de migración dirigida de linfoma de linfocitos B

El efecto sobre la migración dirigida de los linfocitos B se ensayó en un modelo de linfoma de linfocitos B. El compuesto de Fórmula 2 (7,5 µM) se inyectó IV, junto con 10x10⁶ células de linfoma B humano. Después de una hora y media se

analizó la cantidad de linfocitos B en diferentes órganos.

Resultados

- 5 Se detectó una diferencia significativa en la migración dirigida de linfocitos B entre los ratones que se trataron con el compuesto de Fórmula 2 y los ratones no tratados. En el bazo la reducción de la migración dirigida fue del orden del 22 % y en el hígado del orden del 33 %. Los resultados se muestran en la figura 17 y es evidente que el compuesto de Fórmula 2 bloqueó significativamente la migración dirigida de las células cancerosas al bazo y al hígado.

10 Ejemplo 8

Evaluación del compuesto de Fórmula 2 *in vivo* en un modelo de colitis aguda inducida por sulfato sódico de dextrano (DSS) en ratones C57BL/6 (puntuación DAI y longitud del colon)

- 15 Se indujo la colitis añadiendo DSS al 1,5 % al agua de bebida de ratones hembra C57BL/6J (7-8 semanas de edad) durante 5 días consecutivos (días 0-4) para todos los animales de los grupos experimentales. El día 5, se cambió el agua que contenía DSS por agua potable regular y se inició el tratamiento. La suspensión de trabajo del compuesto de Fórmula 2 se administró a razón de 15 mg/kg mediante inyecciones IV, IP o SC en régimen q3w (administración 3 veces a la semana) y a razón de 30 mg/kg por PO en régimen qd (una vez al día). El tratamiento continuó durante 20 10 días y, posteriormente, se sacrificó a los ratones.

- La determinación del peso corporal individual de los animales se realizó antes de cada dosificación y el volumen administrado se ajustó en consecuencia. Se tomaron diariamente pesos corporales adicionales a lo largo de todo el período experimental. La puntuación del índice de actividad de la enfermedad (DAI) de gravedad de la colitis se controló diariamente según los criterios mostrados en la Tabla 3 y se calculó como una suma de la puntuación de pérdida de peso, la puntuación de diarrea y la puntuación de hematoquecia. Se usó el índice de actividad de la enfermedad (DAI) basándose en los métodos informados por Friedman *et al.* (PNAS, 2009).

Tabla 3. Criterios de puntuación del índice de actividad de la enfermedad.

Puntuación	Pérdida de peso (%)	Consistencia de las heces	Hematoquecia
0	Ninguna	Normal	Ausencia
1	0-10	Normal	Ausencia
2	11-15	Heces sueltas	Ausencia
3	16-20	Heces sueltas	Ausencia
4	>20	Diarrea	Presencia

- 30 Los ratones de todos los grupos se sacrificaron con isoflurano 24 horas después de la administración de la última dosis. Se extrajo el colon de cada ratón, se llenó con formalina tamponada al 4 % y se midió la longitud del colon. Los intestinos gruesos se fijaron, se incluyeron en parafina, las secciones y se tiñeron con H&E usando la técnica de rollo suizo modificada. La evaluación de la puntuación histológica se realizó basándose en: la infiltración de células inflamatorias y el daño tisular, en cuatro compartimentos del intestino grueso clasificados de 0 a 3. El aumento focal del número de células inflamatorias en la lámina propia se puntuó como 1, la confluencia de células inflamatorias que se extienden hacia el submucosa como 2 y la extensión transmural del infiltrado como 3.

- 40 Para el daño tisular, las lesiones linfopiteliales discretas se puntuaron como 1, las erosiones mucosas como 2 y el daño extenso de la mucosa y/o la extensión a través de estructuras más profundas de la pared intestinal como 3. La longitud de la ulceración se midió en mm. Las dos subpuntuaciones ponderadas por igual (infiltración celular y daño tisular) en cada compartimento del intestino se añadieron como una puntuación de gravedad de la colitis. Se realizó un análisis estadístico ANOVA unidireccional ordinario.

45 Resultados

- Los resultados obtenidos se resumen en las figuras 18 y 19A-19C. La Fórmula 2 disminuyó significativamente la puntuación DAI en todos los grupos tratados, se observó el efecto máximo en los ratones tratados por PO. La longitud del colon fue similar a la de los ratones sin tratar (sin colitis) en todos los grupos tratados en comparación con los grupos de control donde la longitud del colon era aproximadamente 2 cm más corta (figuras 19A y 19B). Además, en los grupos tratados no se detectó la formación de heces que fácilmente se convierten en pasta en el ano en comparación con los ratones de control. La puntuación de pérdida de peso en los grupos tratados fue significativamente menor en comparación con los grupos de control. La puntuación histológica se obtuvo basándose en Park *et al.* (2005, J. of Cancer Prevention). Los parámetros fueron significativamente más bajos en los ratones tratados con la Fórmula 2 en comparación con los ratones de control, como se muestra en la figura 19C.

Ejemplo 9**Evaluación del compuesto de Fórmula 2 *in vivo*, en una encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) directa inducida por MOG₃₅₋₅₅/CFA en ratones**

Se inmunizaron ratones hembra C57BL/6J de 7-8 semanas de edad con una emulsión de MOG₃₅₋₅₅ en CFA según el protocolo estándar, seguido de la administración de la toxina pertussis (PTX) en PBS. Después del inicio de la EAE (9 días), los ratones se asignaron mediante inclusión continua a los grupos de uno en uno a medida que mostraban los primeros signos de EAE (puntuación de parálisis de 0,5-1). Al grupo de tratamiento se le administró la Fórmula 2 a una dosis de 15 mg/kg en un régimen q3w mediante inyecciones SC, al grupo de control tratado de manera simulada (vehículo) se le administró con un volumen similar al del grupo tratado. El peso corporal de los animales se determinó antes del experimento y el volumen administrado de la formulación de Fórmula 2 se ajustó de acuerdo con el peso corporal. Durante el experimento, se controló diariamente el peso corporal de los ratones y la puntuación clínica de la parálisis. La puntuación de la EAE se calculó basándose en los criterios que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Puntuación	Manifestación clínica
1	Cola floja
2	Parálisis parcial de las patas traseras
3	Parálisis completa de las patas traseras
4	Parálisis completa de las patas traseras y parálisis parcial de las patas delanteras
5	Moribundas

Los ratones de todos los grupos se sacrificaron con isoflurano 24 horas después de la administración de la última dosis. Se realizó un análisis estadístico ANOVA bidireccional. El peso corporal se midió como un parámetro adicional para la estimación del efecto terapéutico del compuesto de Fórmula 2.

Resultados

Como puede observarse en la figura 20A, los animales tratados con el compuesto de Fórmula 2 mostraron una recuperación del peso corporal el día 20 al registrado al inicio de la enfermedad. Los ratones no tratados y de control perdieron peso corporal durante todo el período del experimento y, en promedio, la diferencia entre el grupo tratado y el no tratado al final del experimento fue de aproximadamente 4 g. Puntuación clínica correlacionada con la dinámica de los cambios de peso corporal. A partir del día 10, los ratones tratados con la Fórmula 2 mostraron una puntuación de parálisis estable y el día 20 la puntuación empezó a disminuir de 2 a 1,5 (figura 20B).

Ejemplo 10**Evaluación del compuesto de Fórmula 2 *in vivo*, en un modelo de esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) inducida por una dieta rica en grasas en ratones, evaluación histológica y puntuación de actividad de la EHNA, evaluación del peso del hígado y la grasa mesentérica**

Se alimentaron a voluntad ratones macho C57BL/6J (Envigo, Israel) (3-4 semanas de edad) con una dieta rica en grasas y sin carbohidratos (dieta occidental modificada, WD) con un 42 % de kcal de grasa y que contenía un 0,1 % de colesterol (Harlan TD.88137) con agua normal (sin solución alta en fructosa-glucosa) durante 14 semanas antes del inicio del tratamiento. Los ratones de control se alimentaron con una dieta de comida estándar (CD, Harlan TD.7012) con agua normal (NW, por sus siglas en inglés). El compuesto de Fórmula 2 se administró el día 85 de la dieta rica en grasas (15 mg/kg, para SC e IP en el régimen q3w; 30 mg/kg para PO en el régimen qd) durante 65 días. Al grupo de control tratado de manera simulada (vehículo) se le administraron inyecciones IP al mismo volumen y régimen que el grupo tratado correspondiente durante 65 días. El peso corporal de los animales se determinó antes del inicio del tratamiento y el volumen administrado del compuesto de Fórmula 2 se ajustó de acuerdo con el peso corporal. Todos los animales fueron sacrificados 24 horas después de la administración de la última dosis. En la autopsia se determinaron los pesos húmedos del hígado y la grasa mesentérica. El hígado y la grasa mesentérica se fijaron con formalina tamponada al 4 %, se incluyeron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con H&E. La esteatohepatitis se definió por la presencia de esteatosis, inflamación y balonamiento hepatocelular, según el algoritmo FLIP. La severidad de la esteatosis, la inflamación lobulillar y el balonamiento hepatocelular se puntuaron usando los criterios de la NASH-Clinical Research Network (CRN). La puntuación de actividad de la EHNA (NAS, por sus siglas en inglés) se calculó sumando las puntuaciones de: La esteatosis (puntuación máxima de 3), que se define por más del 66 % de hepatocitos que contienen gotitas de grasa; la inflamación lobulillar (puntuación máxima de 3), que se define por >4 focos/200 campos; el balonamiento de los hepatocitos (puntuación máxima de 2), que se define por muchas células/balonamiento prominente. Se realizó un análisis estadístico ANOVA unidireccional ordinario.

Resultados

Los resultados histológicos se muestran en las figuras 21A-21B: hígado (21A) y grasa mesentérica (21B).

Los ratones tratados con el compuesto de Fórmula 2 mostraron una reducción significativa en la puntuación de actividad de la EHNA (figura 21C), el peso húmedo del hígado (figura 21D), el peso de la grasa mesentérica (figura 21E) y el peso corporal de los ratones (figura 22).

5 Ejemplo 11

Evaluación del compuesto de Fórmula 2 *in vivo*, en un modelo de artritis inducida por colágeno (AIC) en ratones DBA/1: Puntuación clínica, puntuación histológica y evaluación del grosor de las extremidades

10 A ratones macho DBA/1OlaHsd (7-8 semanas de edad) se les inyectó emulsión CII (colágeno tipo II) + CFA (adyuvante completo de Freund) el día 0 (S.C.) para persuadir a la artritis inducida por colágeno (AIC). El día 21, los animales reciben la misma cantidad de emulsión como refuerzo. Dos veces entre los días 0 y 18 después de la inmunización (antes de que comience la inclusión), se midieron ambas patas traseras de todos los ratones usando calibradores para establecer valores de referencia para el grosor de las patas. El día 22, los ratones se incluyeron en grupos cuando
15 mostraron por primera vez hinchazón de las patas y se inició el tratamiento. Se administró una formulación de trabajo del compuesto de Fórmula 2 mediante inyecciones IP a una dosis de 15 mg/kg en un régimen q3w. Al grupo de control tratado de manera simulada (vehículo) se le administró IP con el mismo volumen y régimen que un grupo de tratamiento. La administración se realizó a una dosis de volumen constante basada en el peso corporal individual. La severidad de la AIC se monitorizó diariamente. La puntuación de la AIC está en una escala de 0 a 16 (de 0 a 4 para
20 cada pata, sumando las puntuaciones de las 4 patas). El día 43 (24 horas después de la última administración de la dosis), se midió el grosor de todas las patas y se sacrificó a los ratones. Todas las extremidades de cada ratón se colocaron en tubos etiquetados individuales, se fijaron en formalina tamponada al 4 %, se incluyeron en parafina y se seccionaron. La puntuación histológica se evaluó usando secciones teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). Las articulaciones se puntuaron según la inflamación, el daño en el cartílago, la formación de pannus y la reabsorción ósea
25 en una escala de 0 a 3 para cada lectura. Se realizó un análisis estadístico ANOVA bidireccional.

Resultados

La puntuación de la AIC se muestra en la figura 23.
30 Como puede observar en las figuras 24A y 24B, el grosor de las patas delanteras y traseras se redujo significativamente en ratones tratados con el compuesto de Fórmula 2. La puntuación histológica en ratones tratados con el compuesto de Fórmula 2 también se redujo significativamente (figura 24C).
35 Las figuras 25A-25B muestran secciones representativas a través de la articulación del astrágalo y el calcáneo de ratones sin tratar (25A) y tratados con la Fórmula 2 (25B). Los tejidos blandos que rodeaban las articulaciones de los ratones de control parecían normales. Las superficies de los huesos están cubiertas con cartílago hialino liso de grosor uniforme. No hay cartílago ni hueso ni erosión e infiltración profusa de células inflamatorias. Las figuras 25C-25J muestran erosión de hueso (25C) y cartílago (25D), formación de pannus (25E y 25F) e infiltración de tejidos blandos (25G y 25H, 25I y 25J) en ratones no tratados y tratados con vehículo, respectivamente.
40

Ejemplo 12

Investigación de los modos de acción del compuesto de Fórmula 2 y Tysabri® en ensayos de trans migración de linfocitos B

El efecto del compuesto de Fórmula 2 se ensayó en linfocitos B en un ensayo MesenFlow, como se describe en el Ejemplo 4 anteriormente en el presente documento. Modelo que utiliza un estímulo inflamatorio crónico (Agudo + quimiocinas linfoides). Para identificar cualquier diferencia potencial en el modo de acción se usó como control positivo
50 Tysabri® (Natalizumab), un anticuerpo contra la integrina alfa 4, que se ha postulado para bloquear la trans migración de linfocitos.

Resultados

55 El compuesto de Fórmula 2 (a razón de 30 µM) tuvo un efecto significativo sobre la trans migración de linfocitos B bloqueando tanto la adhesión como la trans migración (figura 26). Estos resultados indican que el compuesto de Fórmula 2 es un potente bloqueador del tráfico de linfocitos B muy superior a Tysabri® (a razón de 30 µg/ml), que no tuvo un efecto neto sobre el número de linfocitos B trans migrados. El compuesto de Fórmula 2 tuvo un efecto de bloqueo espectacular sobre la adhesión y trans migración de los linfocitos B, diferenciándolo de Tysabri®.
60

Ejemplo 13

Cambios fenotípicos en las uniones endoteliales con el compuesto de Fórmula 2

65 Los resultados *in vitro* adicionales usando el sistema MesenFlow mostraron manifestaciones fenotípicas de un movimiento distintivo dentro de las uniones intercelulares de las HUVEC observadas después del tratamiento con el

compuesto de Fórmula 2. Esta manifestación se denominó "aleteo". El aleteo se caracterizó por un rápido movimiento fluctuante en las uniones intercelulares de HUVEC adyacentes, y predominantemente dentro de las esquinas tricelulares. Esto se caracterizó por un rápido cambio de fase en los bordes celulares consistente con un movimiento físico que se asoció con la ausencia de adhesión o migración de leucocitos dentro de estas regiones (figura 27). Se observó aleteo en todos los experimentos de cocultivo de HUVEC que se trataron con el compuesto de Fórmula 2. En todos los casos, se mantuvo la integridad de la unión y no se observó rotura física en los contactos intercelulares endoteliales. Por lo tanto, esta observación es representativa de un fenotipo que es indicativo de una interrupción en la trans migración de leucocitos.

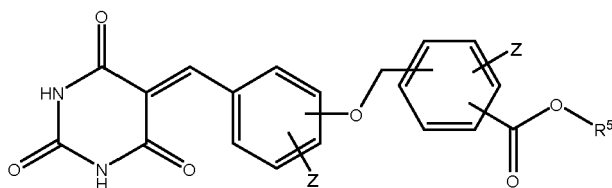
Ejemplo 14

Modelo informático de PECAM1 y modo de unión del compuesto de Fórmula 2

La figura 28 muestra un posible modo de unión entre el compuesto de Fórmula 2 y la interfase del dímero de PECAM-1. El modelo se desarrolló basándose en cálculos informáticos y predice que el compuesto de Fórmula 2 se une a la forma del dímero de PECAM1 activo y no al monómero de PECAM1 no activo (Chistiakov DA, Exp Mol Pathol. 2016, 100:409-415). Tal diferencia puede traer una ventaja muy importante en la clínica, porque sugiere que el tratamiento con los compuestos de Fórmula general (I) bloquea selectivamente PECAM-1 en el área de una enfermedad únicamente.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula general (Ib):



Fórmula (Ib)

en la que

uno o dos Z están presentes en un anillo y Z está ausente en el otro anillo; y cada Z se selecciona independientemente de alquilo lineal sin sustituir o alquilo ramificado sin sustituir, que tiene de 1 a 6 átomos de carbono (alquilo C₁₋₆); y

R⁵ es alquilo, seleccionado de alquilo lineal o alquilo ramificado, que tiene de 1 a 6 átomos de carbono (alquilo C₁₋₆), en donde cada alquilo puede estar sin sustituir o sustituido por uno, dos o tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, nitro, ciano y amino; y

estereoisómeros, enantiómeros y tautómeros del mismo, sales farmacéuticamente aceptables del mismo y mezclas del mismo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde uno o dos Z están presentes en el anillo de fenilo conectado al resto de barbitúrico y Z está ausente en el otro anillo.

3. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde cada Z se selecciona independientemente de alquilo lineal sin sustituir o alquilo ramificado sin sustituir, que tiene de 1 a 4 átomos de carbono (alquilo C₁₋₄).

4. El compuesto de la reivindicación 3, en donde cada Z se selecciona independientemente de metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo o *terc*-butilo.

5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde, R⁵ está sin sustituir.

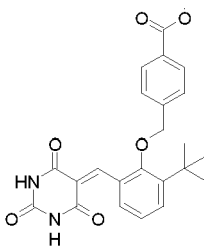
6. El compuesto de la reivindicación 5, en donde R⁵ se selecciona de alquilo lineal sin sustituir o alquilo ramificado sin sustituir, que tiene de 1 a 4 átomos de carbono (alquilo C₁₋₄), seleccionado de metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, *terc*-butilo.

7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el grupo carboxílico

-CO(=O)R⁵ está presente en la posición *para* con respecto al grupo de unión -O-CH₂-; o
en donde el grupo carboxílico -CO(=O)R⁵ está presente en la posición *meta* con respecto al grupo de unión -O-CH₂-; o
en donde el grupo carboxílico -CO(=O)R⁵ está presente en la posición *orto* con respecto al grupo de unión -O-CH₂.

8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde los enlaces al resto de ácido barbitúrico y al grupo de unión -O-CH₂- están en posición *para* entre ellos; o
en donde los enlaces al resto de ácido barbitúrico y al grupo de unión -O-CH₂- están situados en posición *meta* entre ellos; o
en donde los enlaces al resto de ácido barbitúrico y al grupo de unión -O-CH₂- están situados en posición *orto* entre ellos.

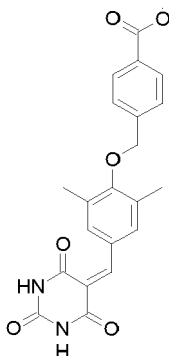
9. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene la Fórmula 2:



Fórmula 2

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene la Fórmula 4:



Fórmula 4

5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

11. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso como un medicamento.

10

12. Una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y un vehículo y/o un diluyente farmacéuticamente aceptables.

15

13. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y/o la composición farmacéutica de la reivindicación 12 para su uso como un inhibidor de la trans migración de leucocitos.

20

14. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, y/o la composición farmacéutica de la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones seleccionadas de enfermedades y trastornos inflamatorios, enfermedades y trastornos autoinmunitarios y cánceres.

15. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, que comprende uno o más agentes terapéuticos adicionales.

Figura 1

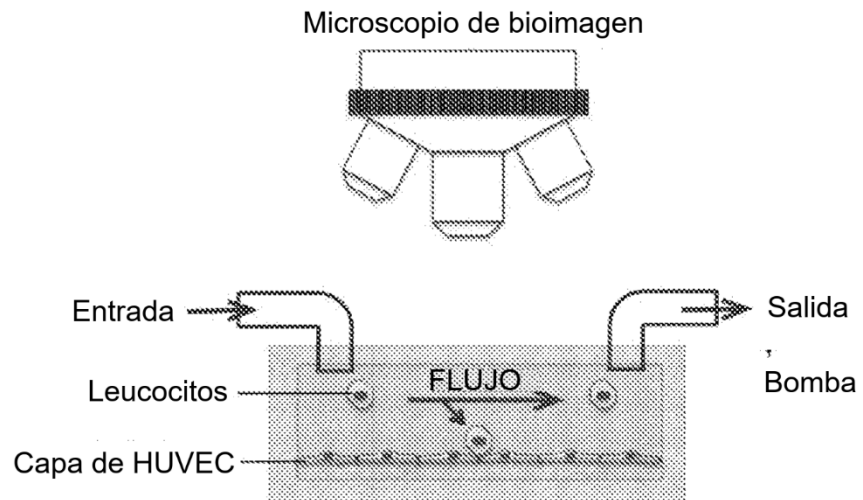


Figura 2

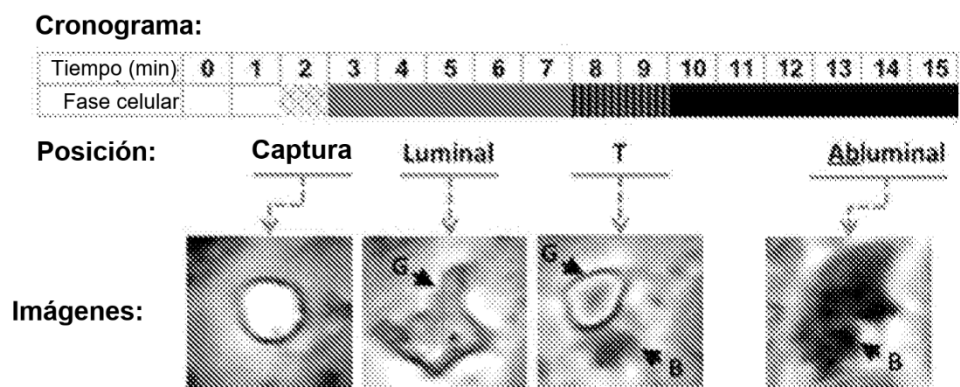


Figura 3

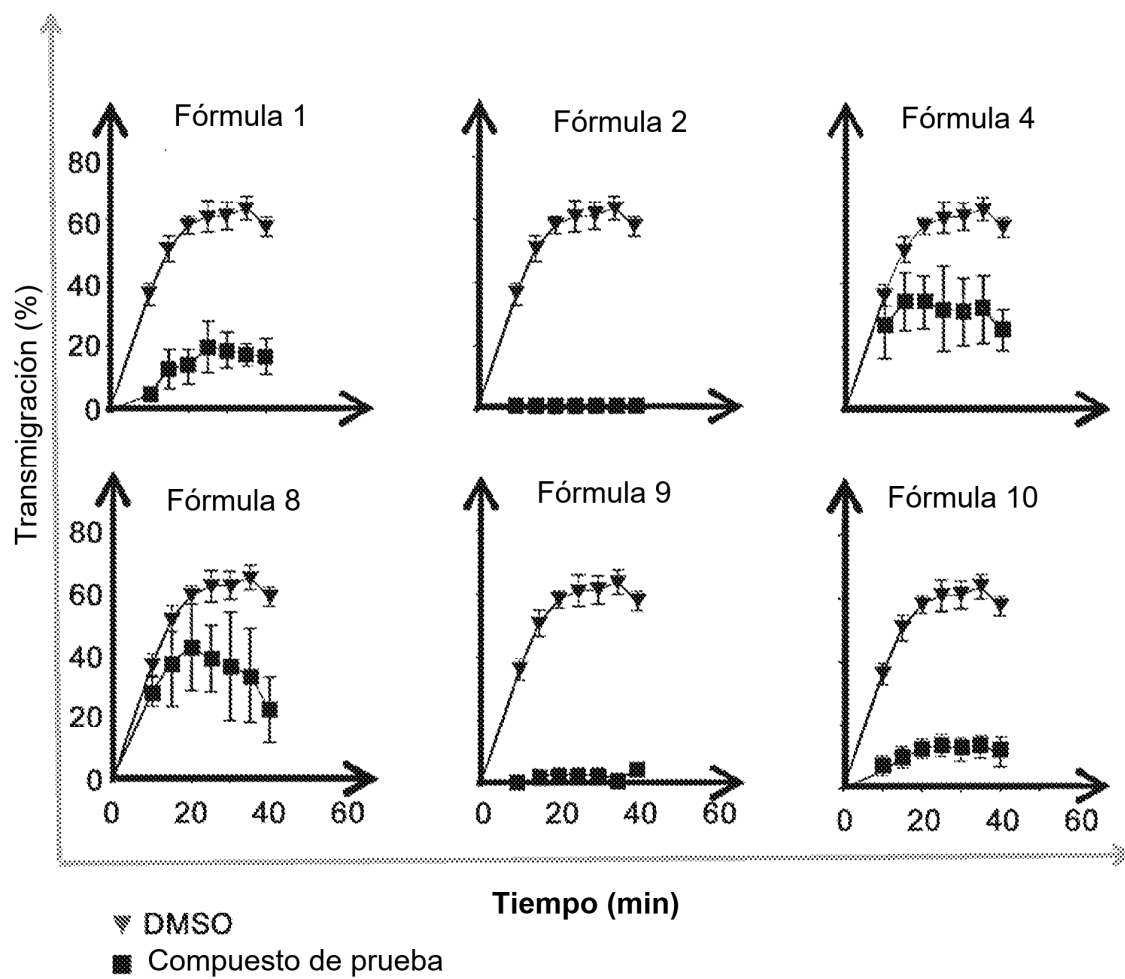


Figura 4A

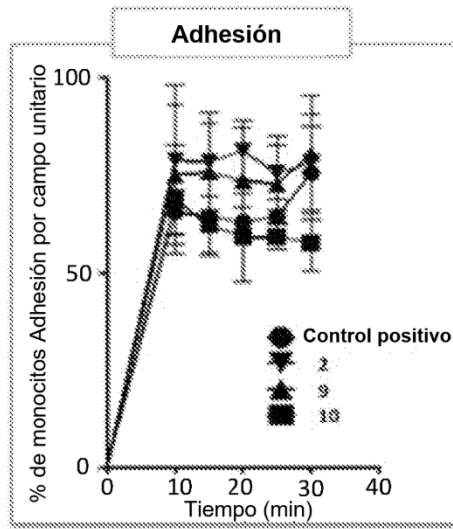


Figura 4B

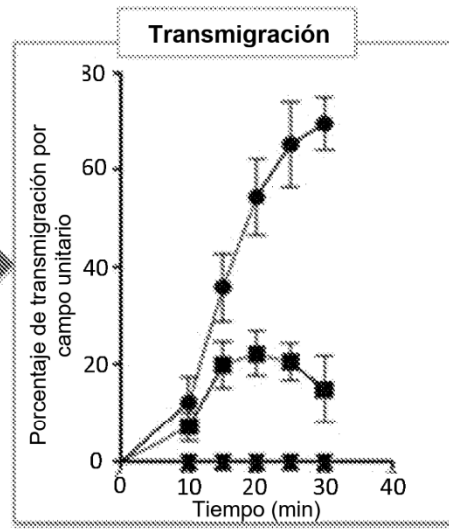


Figura 5A

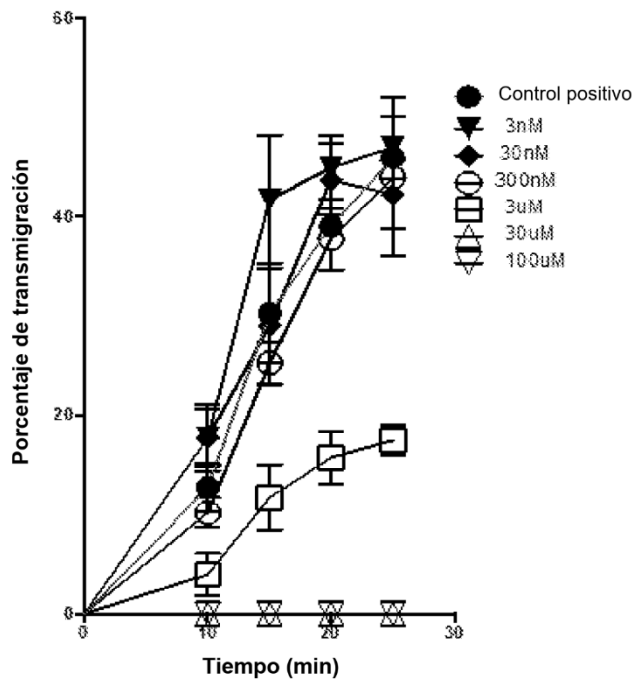


Figura 5B

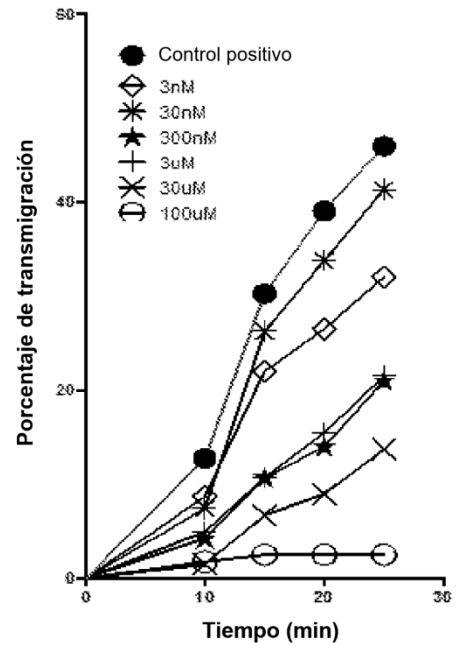


Figura 6A

10 minutos

CI50 = 894 nM

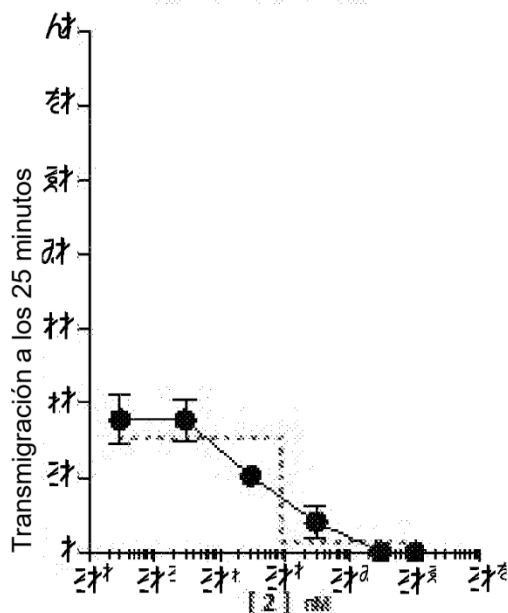


Figura 6B

15 minutos

CI50 = 1175 nM

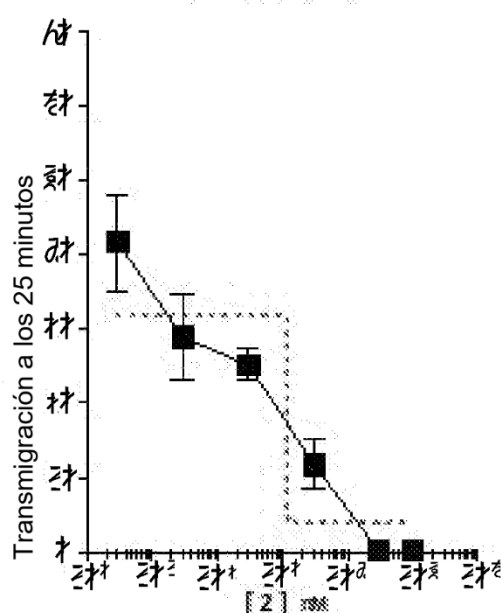


Figura 6C

20 minutos

CI50 = 2172 nM

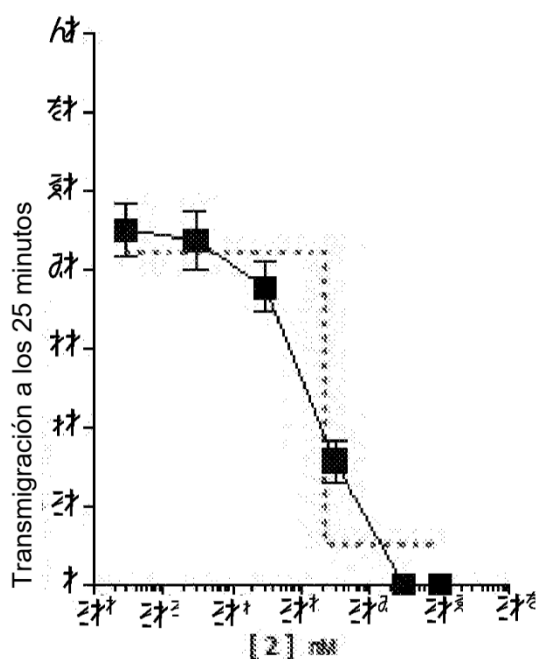


Figura 6D

25 minutos

CI50 = 2389 nM

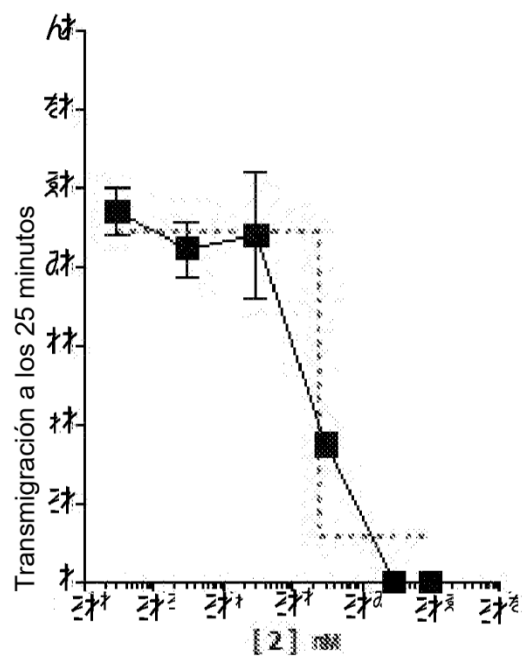


Figura 7A

10 minutos

CI50 = 227 nM

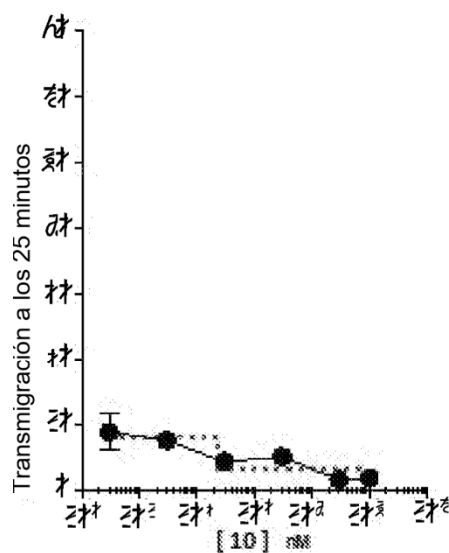


Figura 7B

15 minutos

CI50 = 237 nM

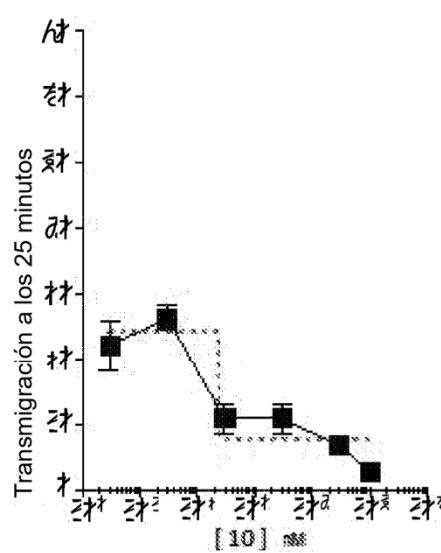


Figura 7C

20 minutos

CI50 = 244 nM

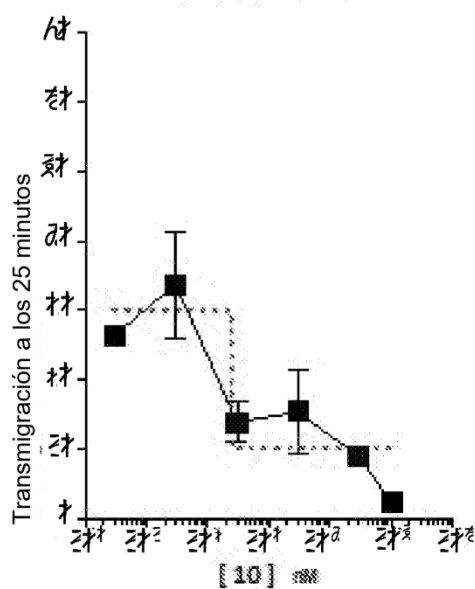


Figura 7D

25 minutos

CI50 = 300 nM

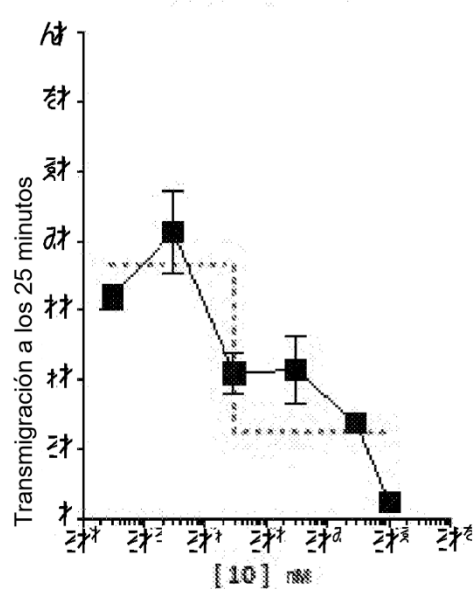


Figura 8

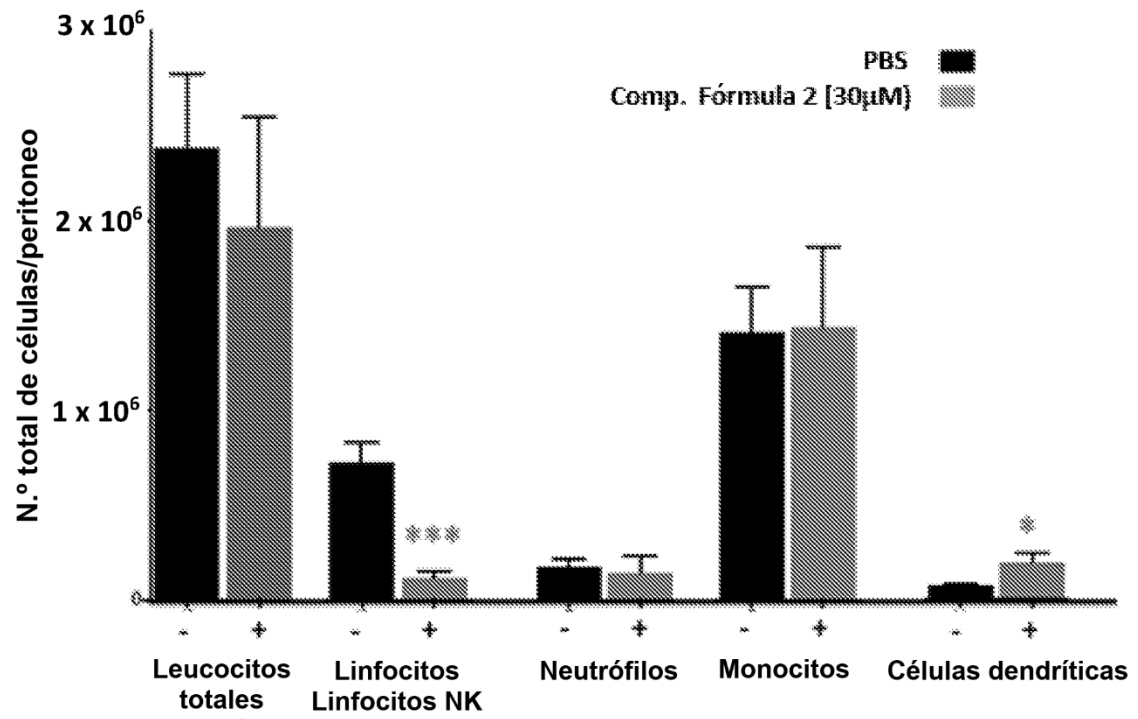


Figura 9

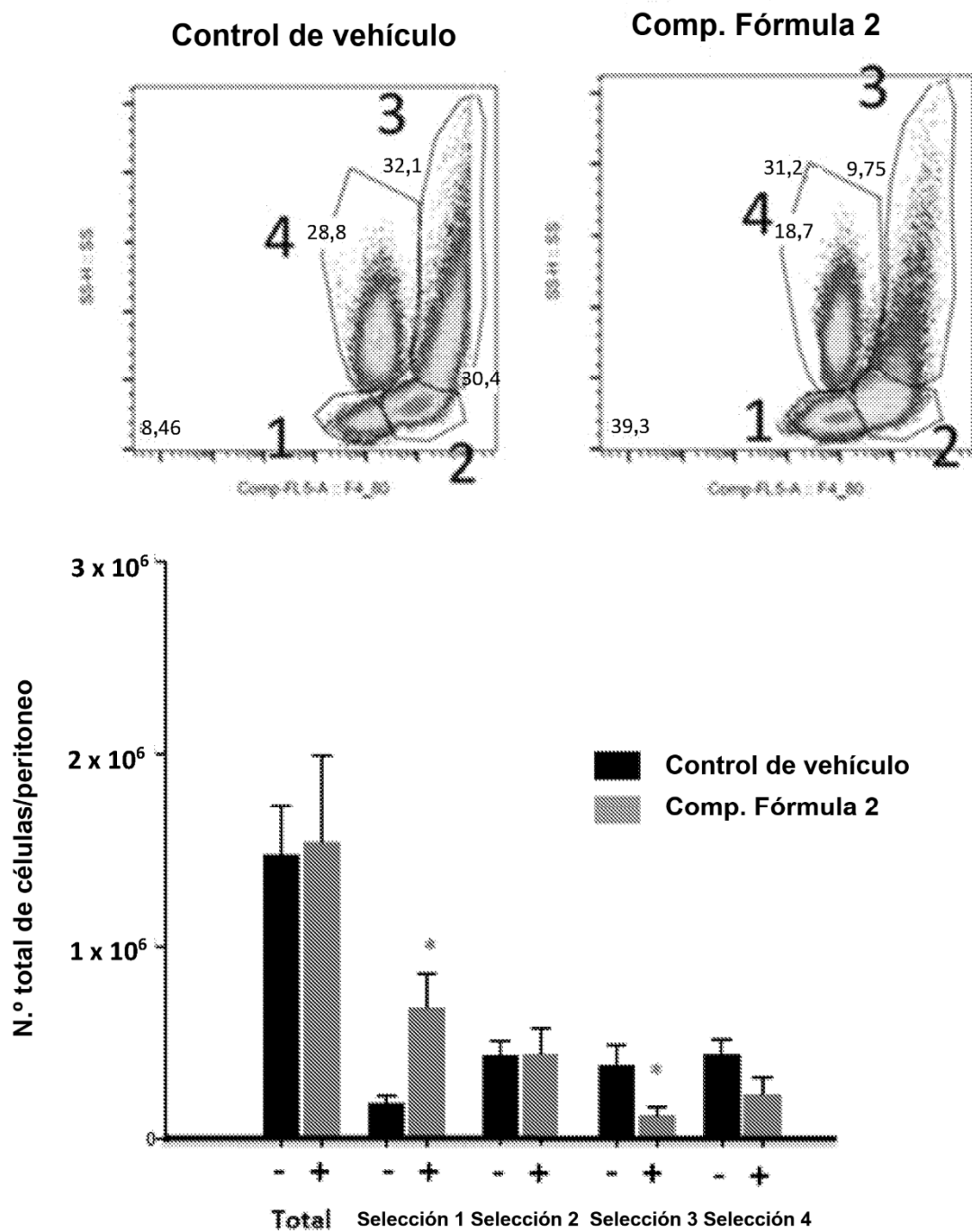


Figura 10A

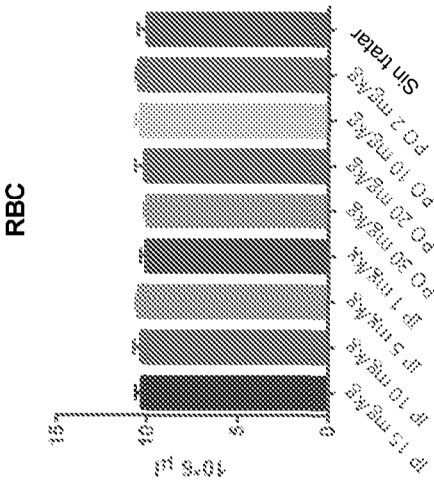


Figura 10B

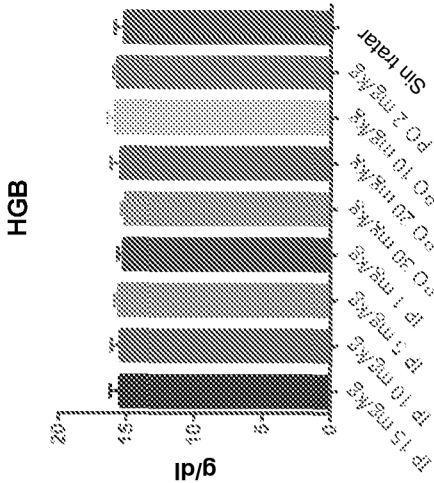


Figura 10C

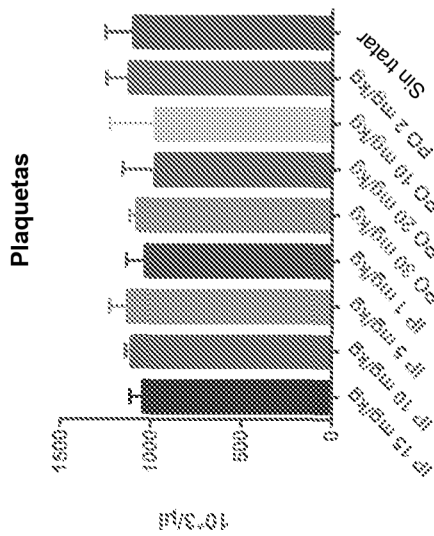


Figura 10D

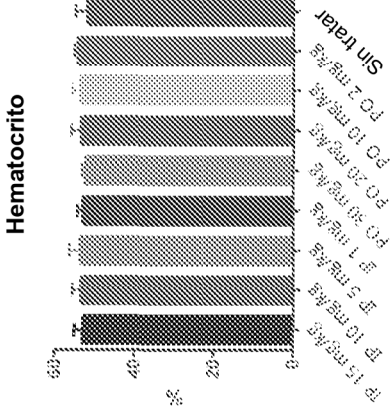


Figura 10E

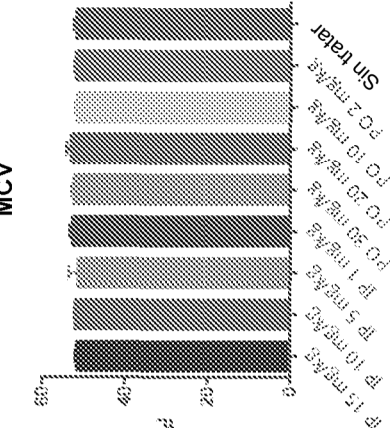


Figura 10F

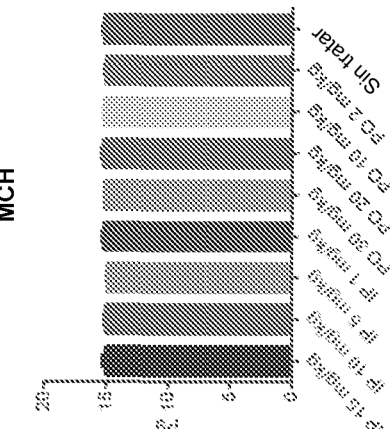


Figura 10G

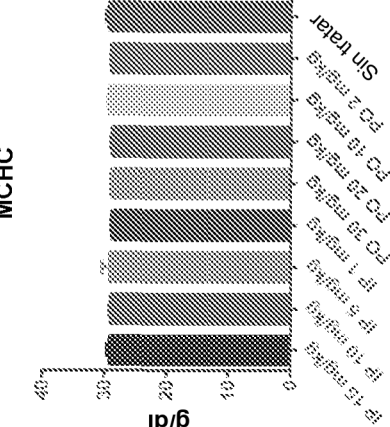


Figura 10D

Figura 10E

Figura 10F

Figura 10G

Figura 11A

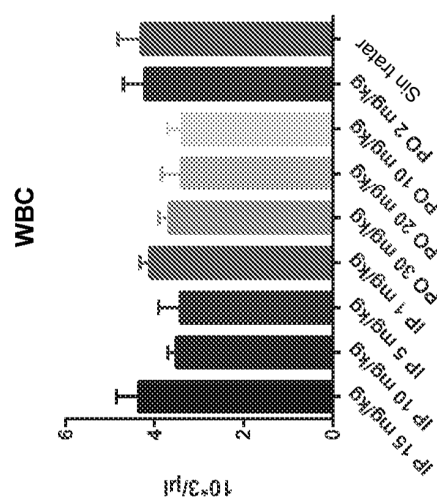


Figura 11B

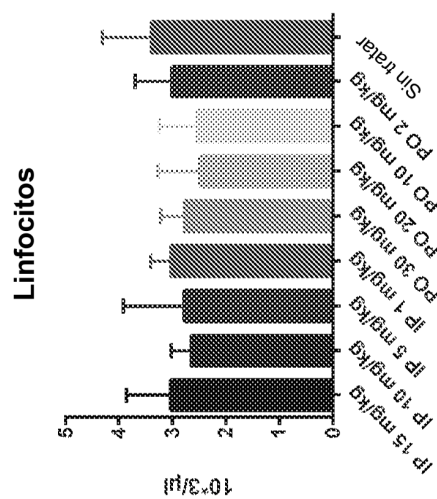


Figura 11C

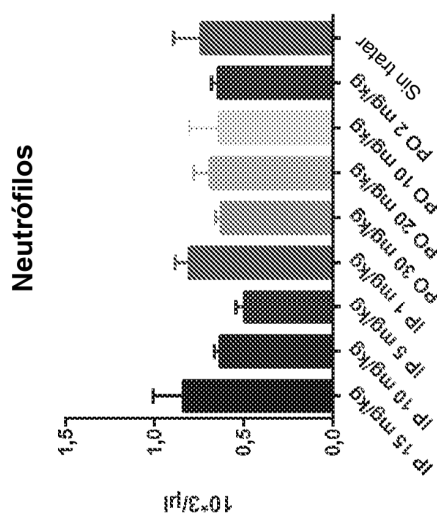


Figura 11D

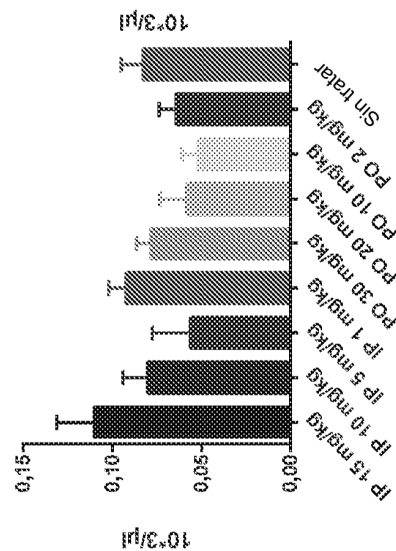


Figura 11E

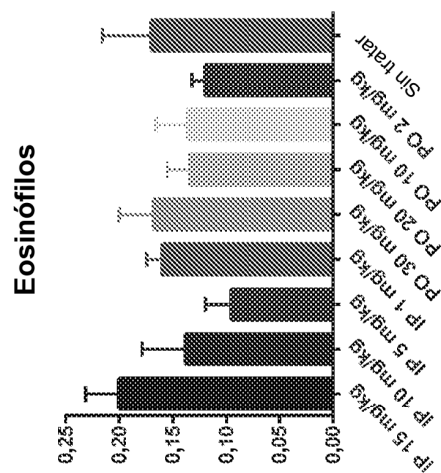


Figura 11F

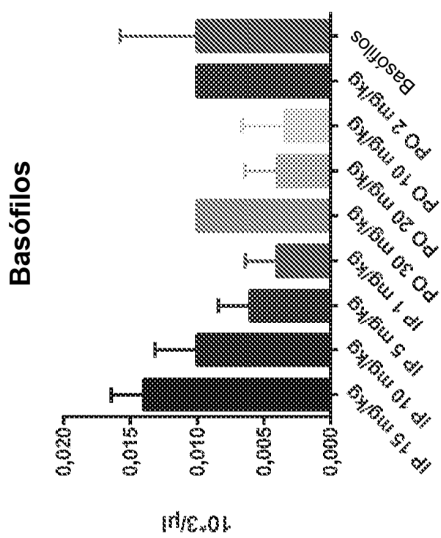


Figura 12A

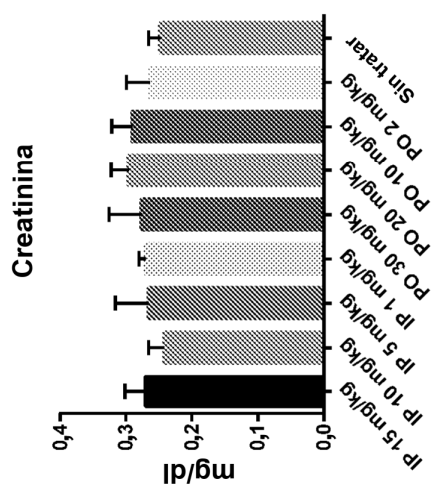


Figura 12B

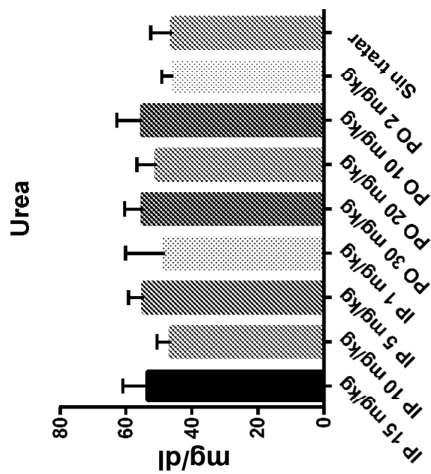


Figura 12C

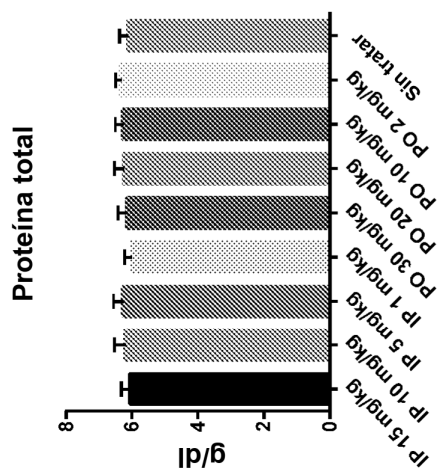


Figura 12D

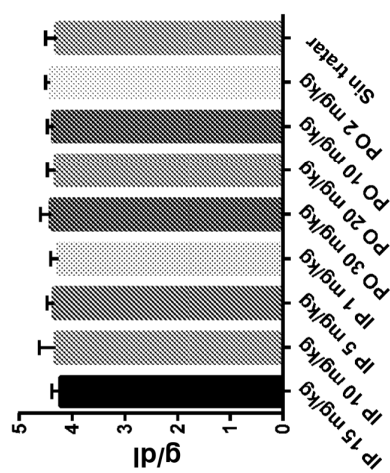


Figura 12E

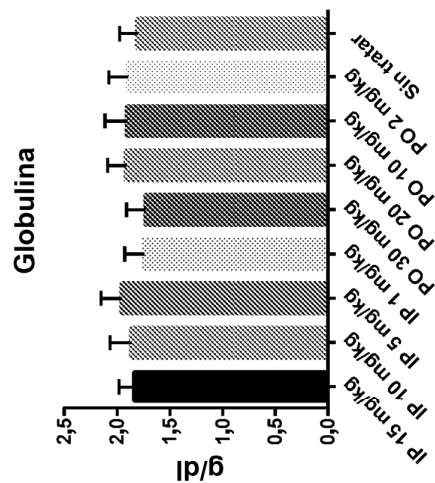


Figura 12F

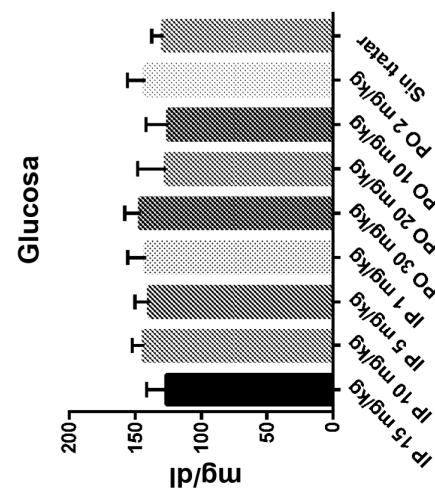


Figura 13A

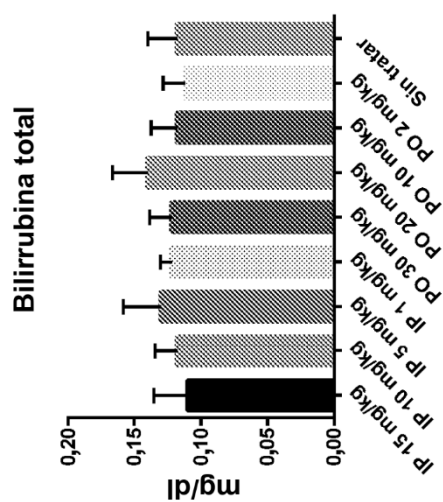


Figura 13B

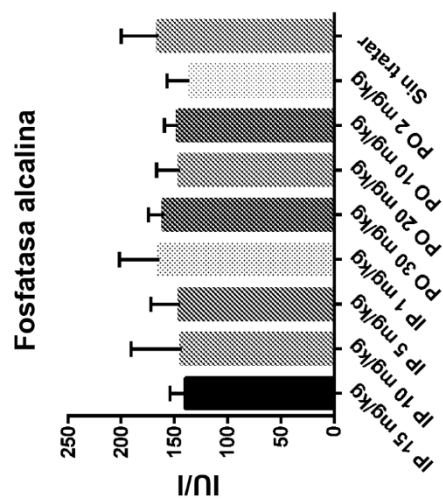


Figura 13C

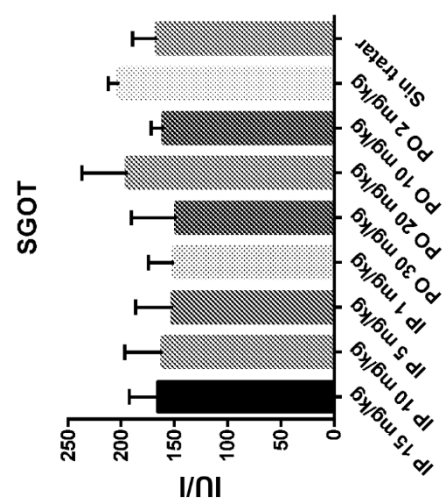


Figura 13D

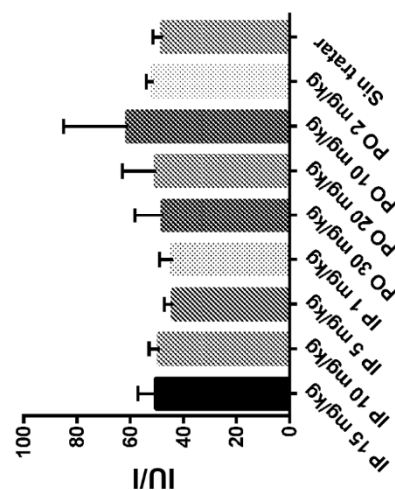


Figura 13E

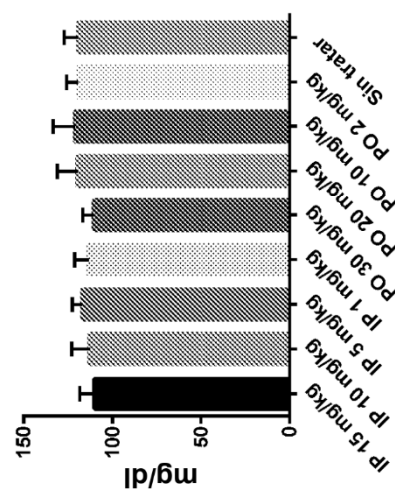


Figura 14A

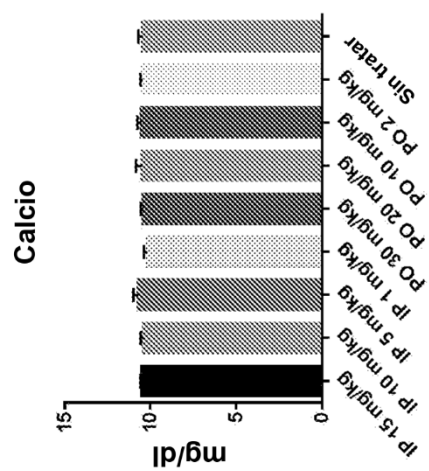


Figura 14B

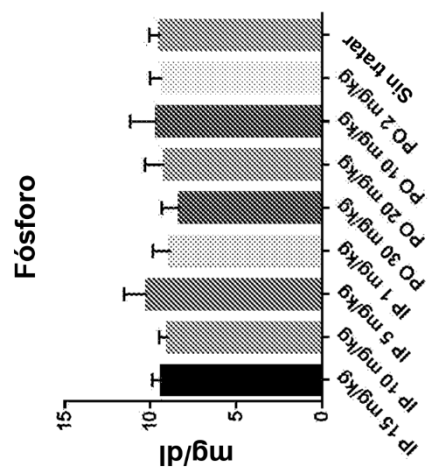


Figura 14C

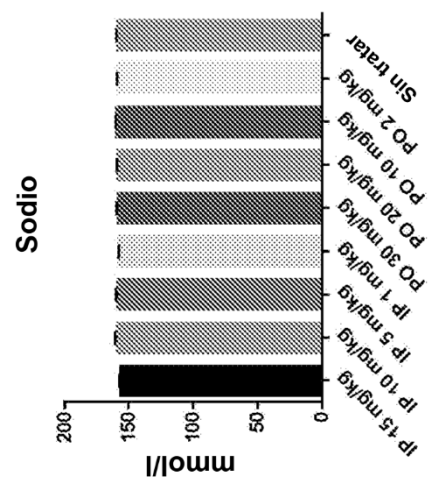


Figura 14D

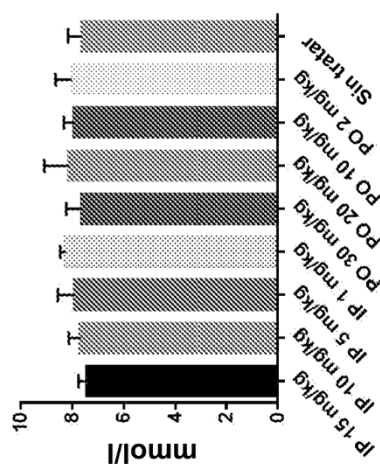


Figura 14E

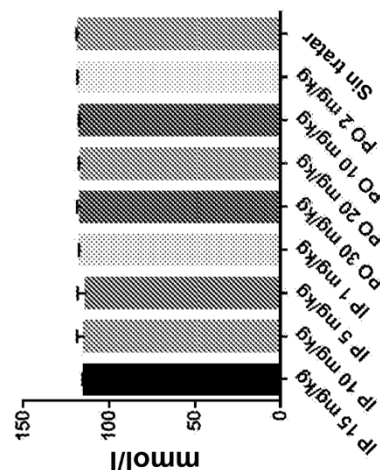


Figura 14F

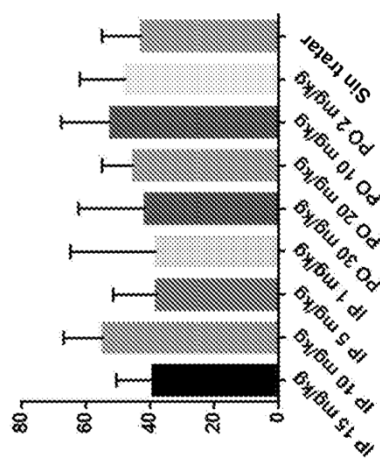


Figura 15

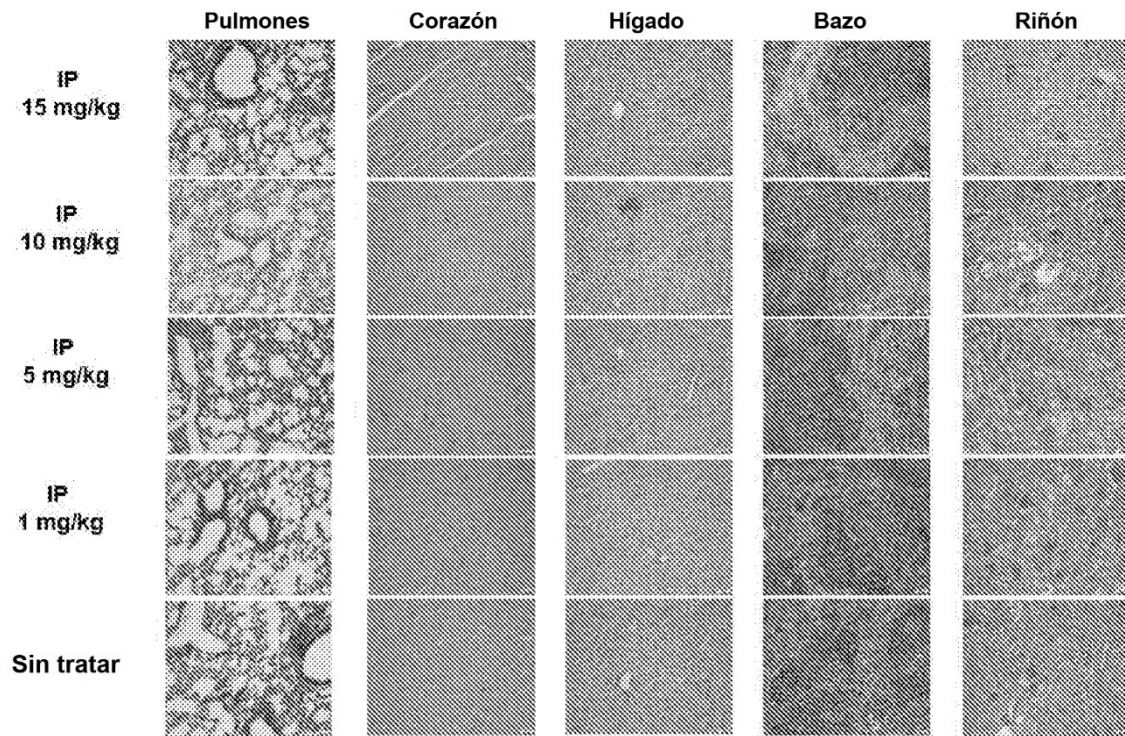


Figura 16

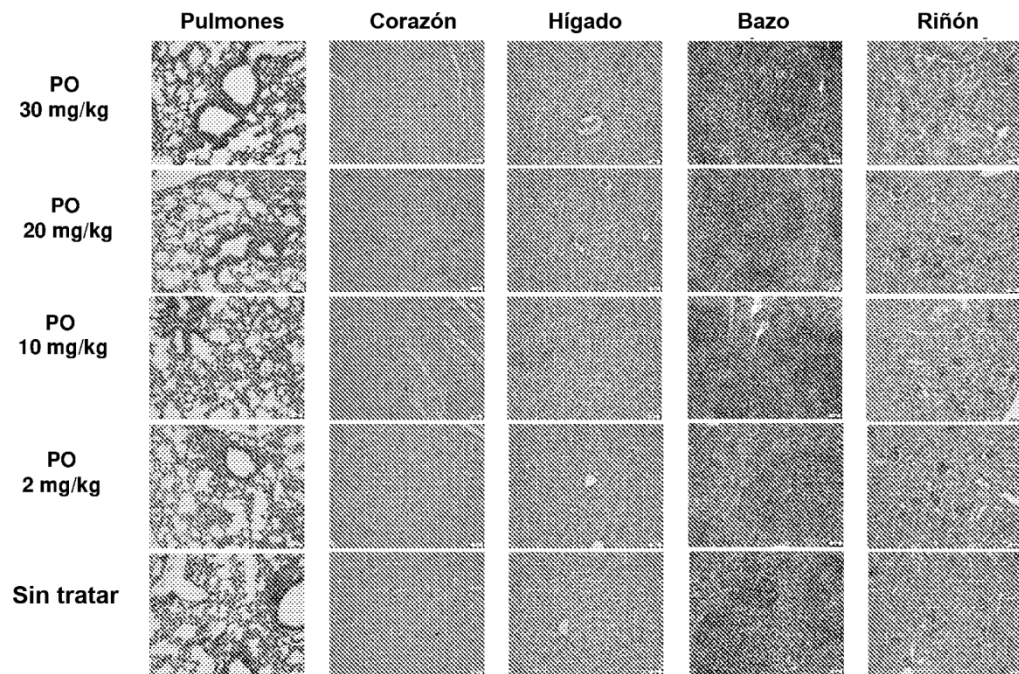


Figura 17

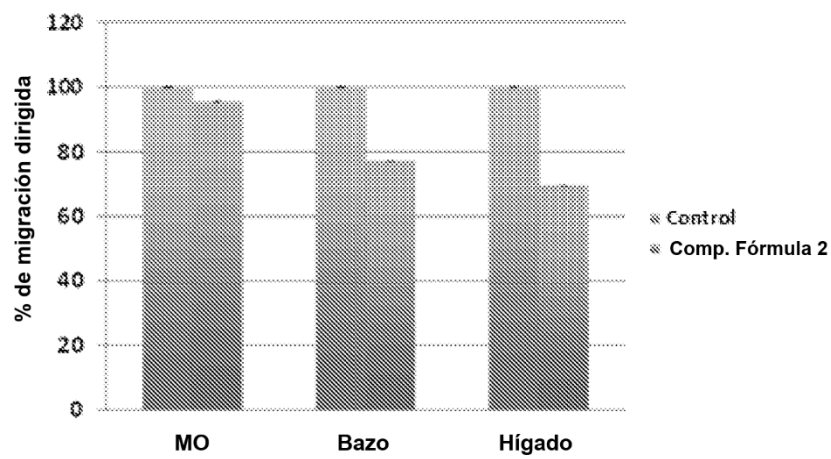


Figura 18

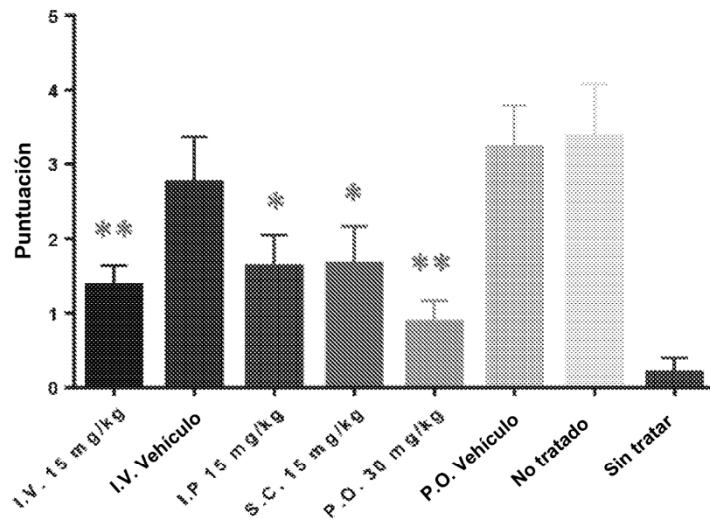


Figura 19A Tratamiento con la Fórmula 2

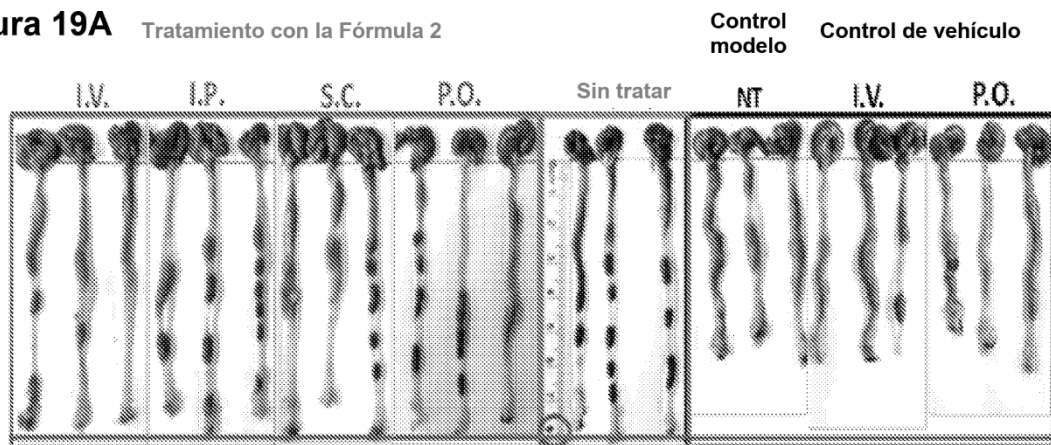


Figura 19B

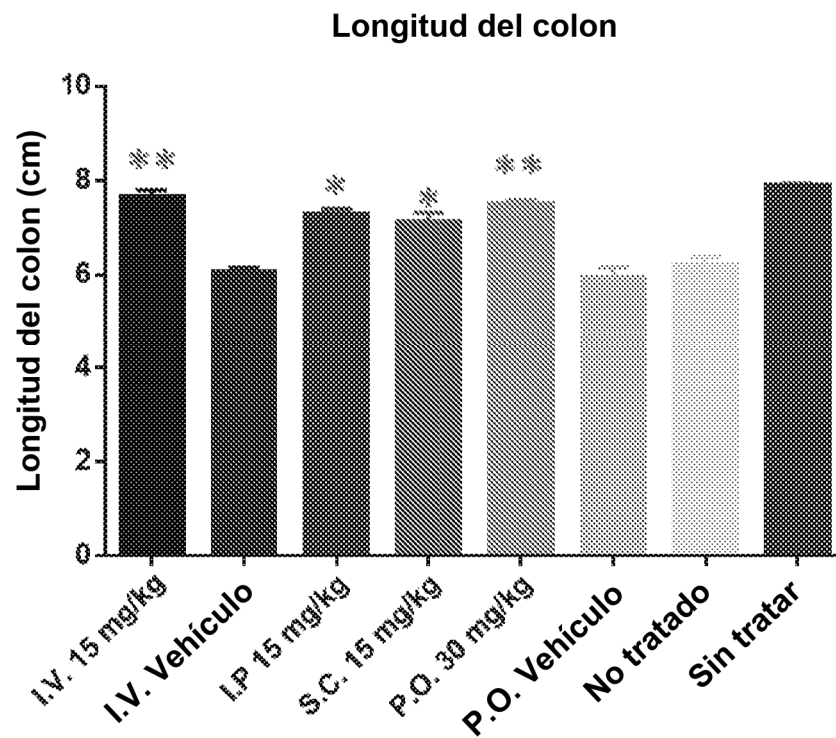


Figura 19C

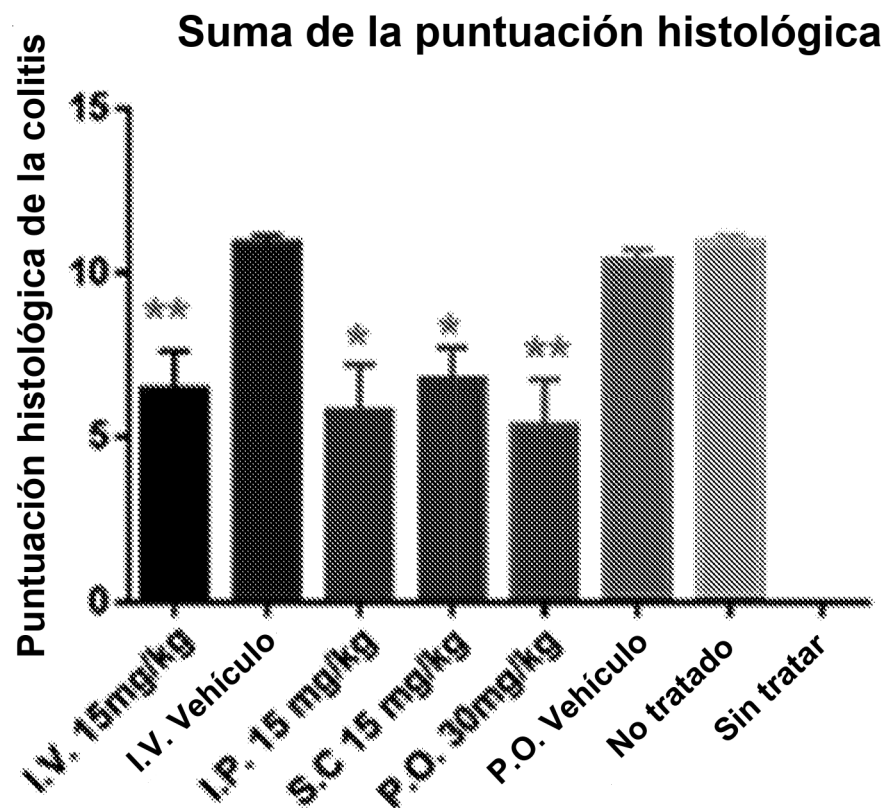


Figura 20A

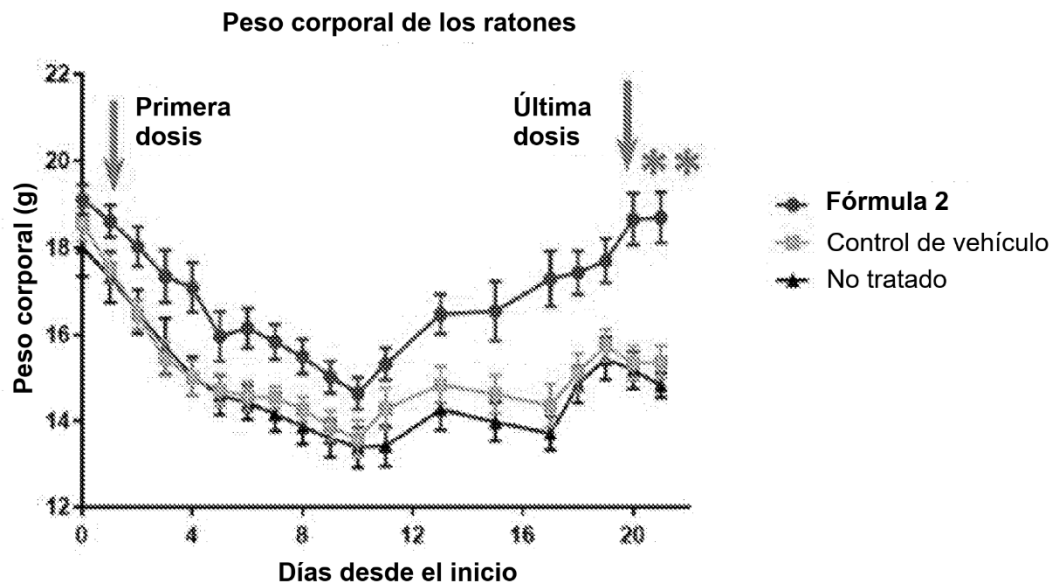


Figura 20B

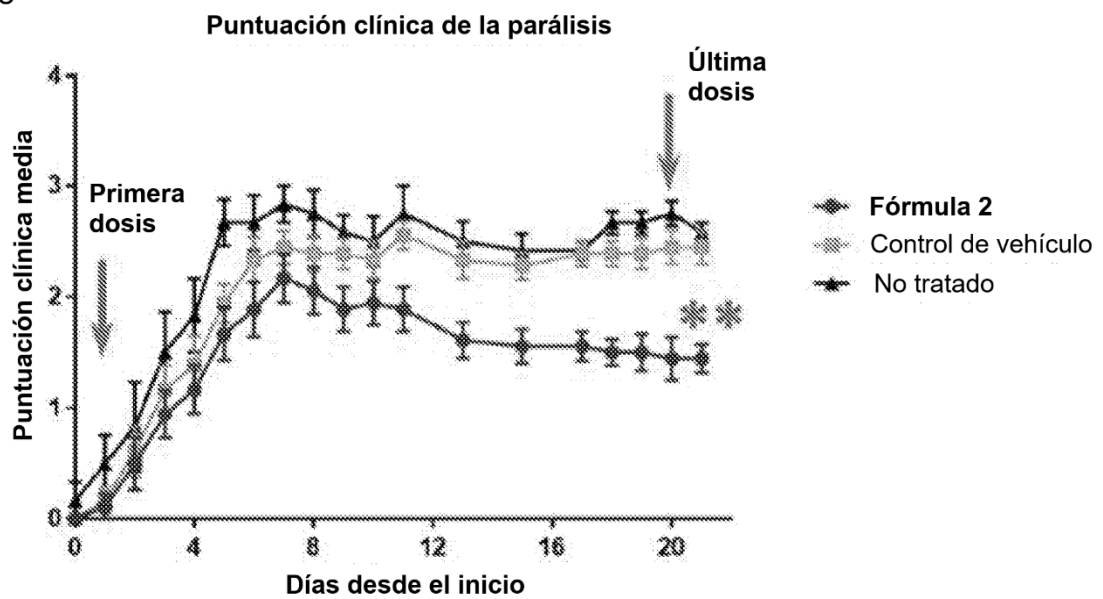


Figura 21A

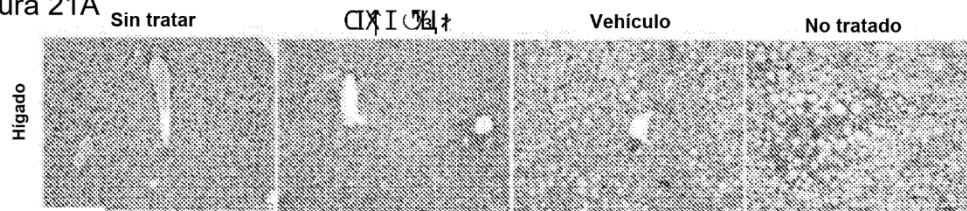


Figura 21B

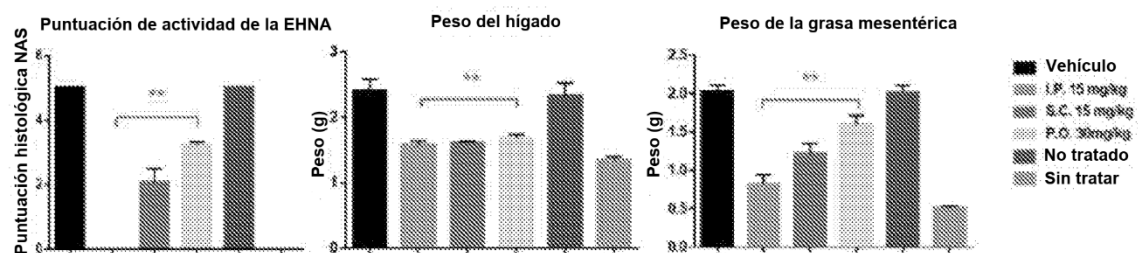
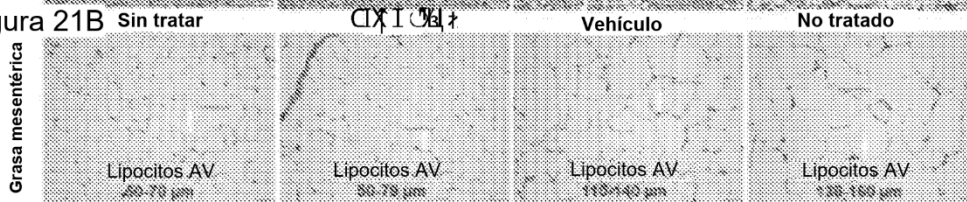


Figura 21C

Figura 21D

Figura 21E

Figura 22

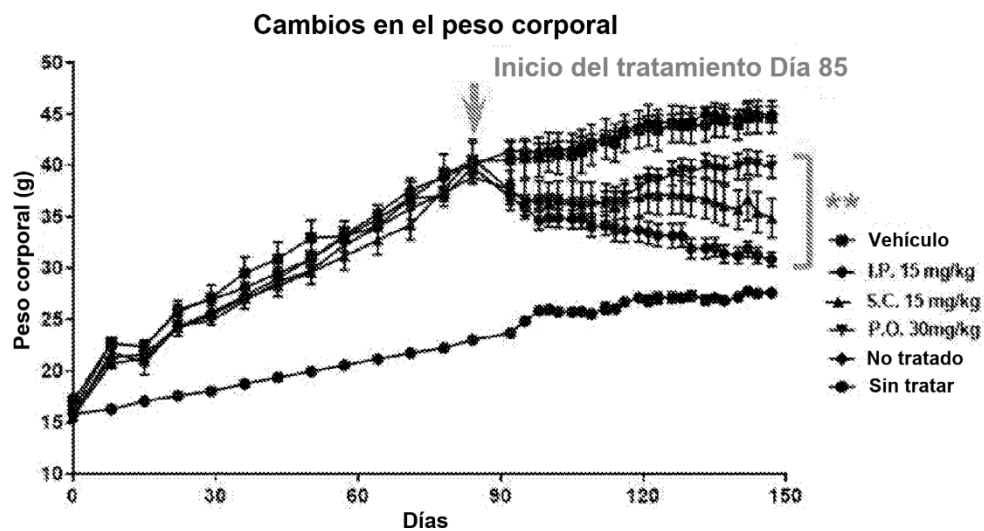


Figura 23

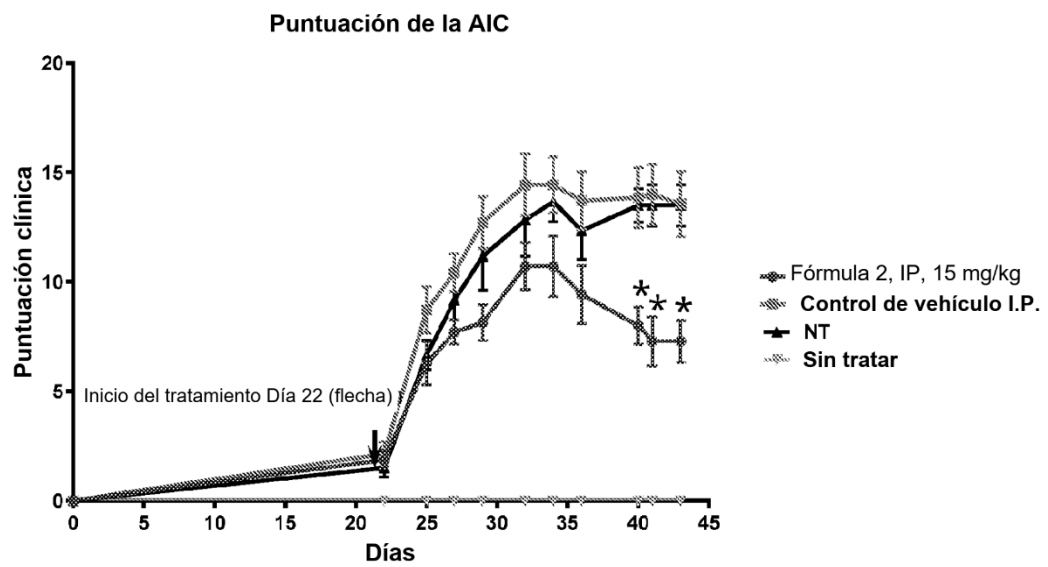


Figura 24A

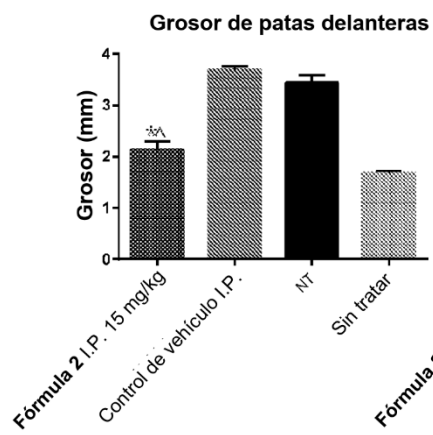


Figura 24B

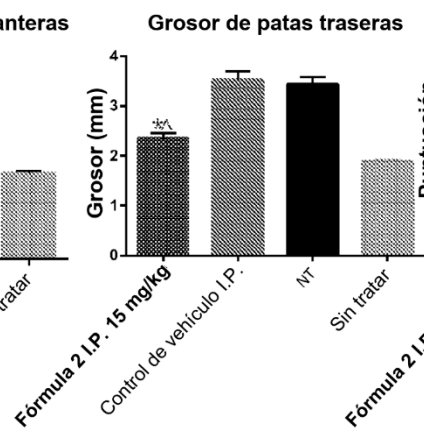
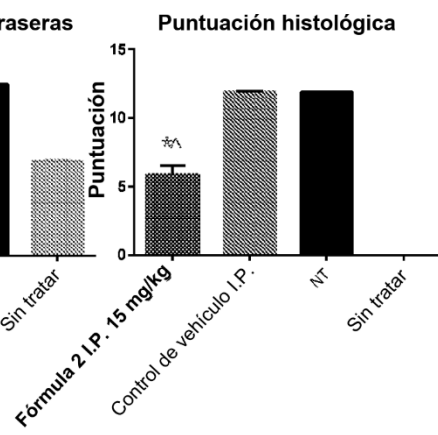


Figura 24C



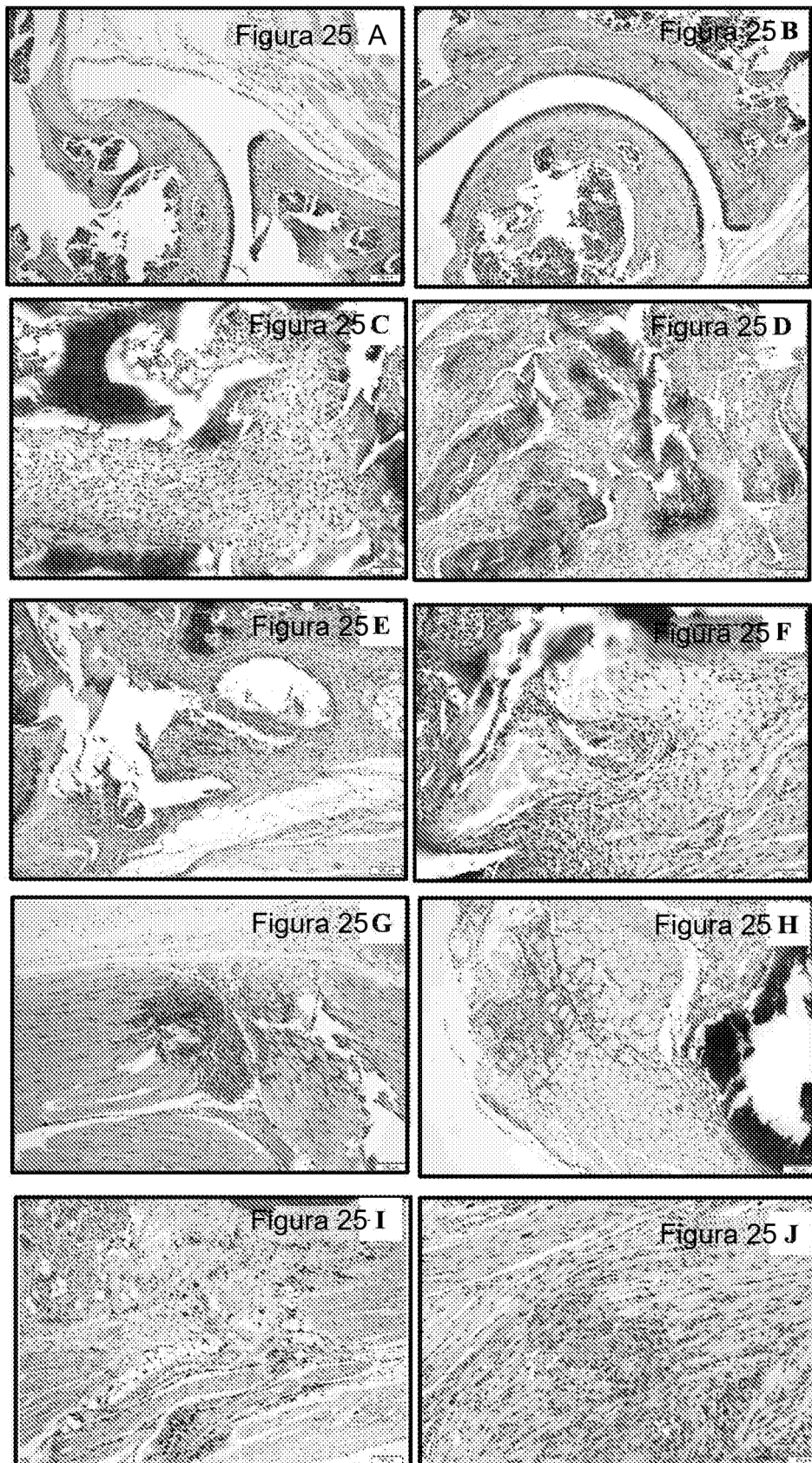


Figura 26

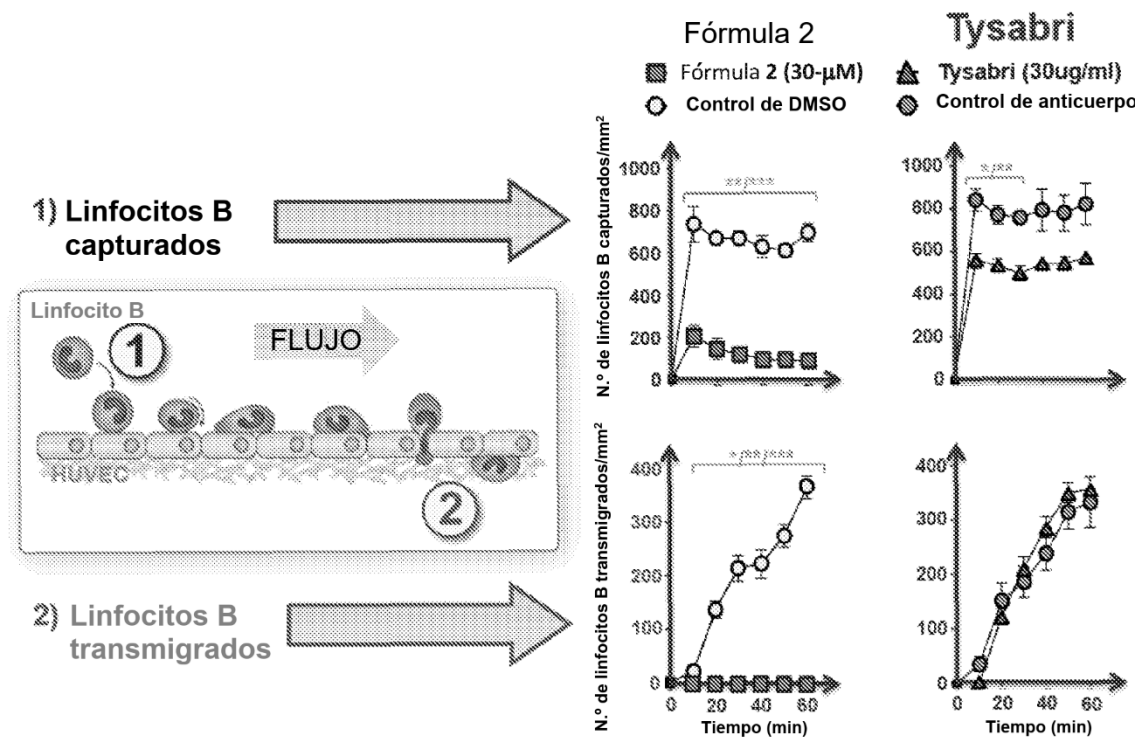


Figura 27

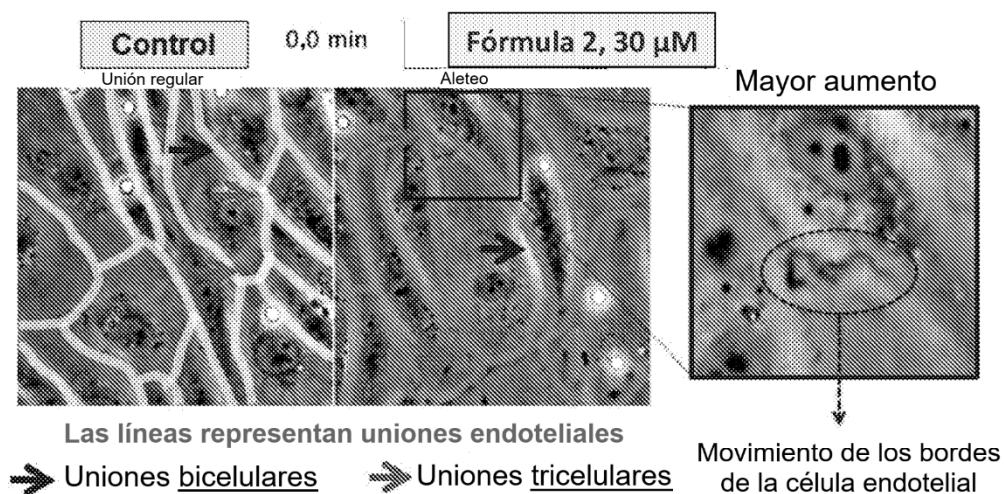


Figura 28

