



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 311 600**

51 Int. Cl.:

C07C 279/36 (2006.01) **A61K 31/155** (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) **C07D 213/40** (2006.01)

C07C 335/20 (2006.01) **C07C 257/14** (2006.01)

C07C 279/18 (2006.01) **C07D 209/42** (2006.01)

C07D 209/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02718096 .7**

96 Fecha de presentación : **06.02.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1363875**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2003**

54

Título: **Derivados de benzamidina novedosos que tienen actividad antiinflamatoria e inmunosupresora.**

30

Prioridad: **08.02.2001 IT TO01A0110**

73

Titular/es: **ROTTAPHARM S.p.A.**
Galleria Unione 5
20122 Milano, MI, IT

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2009

72

Inventor/es: **Makovec, Francesco;**
Zanzola, Simona;
Artusi, Roberto y
Rovati, Lucio, Claudio

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2009

74

Agente: **Justo Vázquez, Jorge Miguel de**

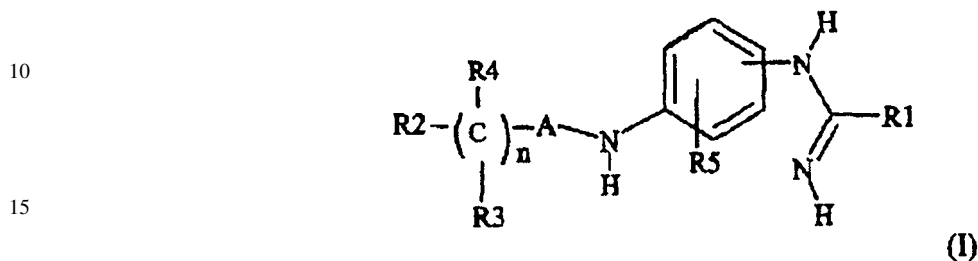
ES 2 311 600 T3

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 benzamidina novedosos que tienen actividad antiinflamatoria e inmunosupresora.

5 El objeto de la presente invención son derivados de amidina novedosos de fenilendiamina que pueden representarse por la fórmula (I) general indicada a continuación:



20 y en la que:

- A se selecciona independientemente del grupo carboxamida -NH-CO- y el grupo tiocarboxamida -NH-CS-, mediante los cuales el grupo “-A-NH-” forma el subresto -NH-CO-NH- o -NH-CS-NH-,

25 - R₁ se selecciona de un grupo alquilo que tiene desde 1 hasta 3 átomos de carbono y el grupo amino, no sustituido o sustituido con el grupo nitro o el grupo metilo,

30 - R₂ se selecciona independientemente de hidrógeno, un grupo alquilo que tiene desde 1 hasta 4 átomos de carbono, el grupo metoxilo, etoxilo o propoxilo, un residuo de cicloalcano mono, bi o tricíclico que tiene desde 5 hasta 12 átomos de carbono, el grupo adamantilo, un grupo arilo, naftilo o heterocíclico, no sustituido o sustituido con grupos metilo, metoxilo, hidroxilo, amino o halógeno,

- R₃ y R₄ se seleccionan independientemente de hidrógeno y un grupo alquilo que tiene desde 1 hasta 3 átomos de carbono,

35 - R₅ representa uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente de hidrógeno y los grupos metilo, metoxilo e hidroxilo,

- n es un número entero desde 0 hasta 6, y

40 - el grupo amidina está en la posición para o meta con respecto al grupo “-A-NH-”, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

45 En los compuestos de la invención, R₂ está directamente unido al grupo A (n=0) o está unido a A a través de un grupo alquileo, que tiene desde 1 hasta 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 3 átomos de carbono.

50 Se ha encontrado que los compuestos de la presente invención son antagonistas potentes de diversos mediadores de la inflamación y también tienen propiedades inmunosupresoras. *In vitro*, se ha encontrado que son inhibidores de la óxido nítrico sintasa inducible (ONSi) y de la enzima ciclooxigenasa (COX). *In vivo*, se ha encontrado que son inhibidores potentes de la citocina “factor de necrosis tumoral” (TNF α). Además, muchos de los productos de la invención pueden antagonizar la actividad colagenasa de las metaloproteasas.

55 El óxido nítrico (ON) se forma a nivel celular por la L-arginina, por medio de la enzima ONS. Existen tres subtipos de esta enzima. La enzima (ONSi) que puede inducirse en presencia de citocinas proinflamatorias o de endotoxinas se expresa en células de muchos tipos, entre los cuales están los macrófagos y neutrófilos.

60 La vasodilatación, que es una característica de la inflamación aguda, depende, para muchos mediadores del proceso inflamatorio, tal como, por ejemplo, histamina, bradicinina, sustancia P, PAF, etc., de la liberación de ON. En general, el ON aumenta las respuestas inflamatorias en muchos modelos experimentales, tanto agudos como crónicos.

65 Debe observarse que el ON puede producirse masivamente en respuesta a un estímulo inducido mediante citocinas en las articulaciones inflamadas de pacientes con artritis reumatoide y artrosis, y que las concentraciones plasmáticas de ON en el líquido sinovial en estos pacientes son generalmente muy altas.

También es interesante el hecho de que la actividad de la ONSi es también muy alta en el colon de pacientes con colitis ulcerosa.

ES 2 311 600 T3

Las prostaglandinas (PGE) son mediadores de la inflamación generadas por la enzima ciclooxigenasa (COX). La isoforma inducible (COX-2) se sobreproduce (“se regula por incremento”) en los tejidos inflamados y esto conduce a un aumento de la síntesis de PGE.

5 Existen interacciones entre los sistemas ONS y COX y por tanto el papel del ON en la inflamación puede depender no sólo de su efecto directo, sino también de su efecto modulador sobre la biosíntesis de PGE.

10 El TNF α es una citocina primaria que inicia la cascada de acontecimientos que caracterizan un proceso inflamatorio, induciendo la síntesis y liberación de citocinas secundarias y enzimas tales como las metaloproteasas (MMP, entre las cuales está la colagenasa), ONSi y COX-2. Como ya se mencionó, la mucosa intestinal es uno de los sitios más importantes de la producción de citocina proinflamatoria, tal como se observa en afecciones patológicas tales como inflamación crónica del colon (SII) y colitis ulcerosa.

15 Por tanto, puede considerarse que los compuestos de la presente invención pueden usarse con ventaja en el tratamiento de diversas enfermedades en seres humanos que se caracterizan por inflamación no específica, tal como por ejemplo, la artritis reumatoide que es un síndrome con una evolución crónica que puede avanzar hacia la destrucción progresiva de las estructuras articulares y periarticulares, la artrosis que es una enfermedad caracterizada por la degeneración del cartílago articular, con frecuencia acompañado por inflamación secundaria de la membrana sinovial, o en otros afecciones patológicas, por ejemplo, en el sistema gastrointestinal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, SII o intolerancia y alergias alimentarias.

20 También puede predecirse el uso ventajoso de los compuestos de la invención en otras áreas y sistemas, por ejemplo, en el tratamiento de afecciones patológicas del sistema cardiovascular con una base inflamatoria o aterosclerótica que son sensibles al tratamiento de inhibidores de ONSi.

25 Además, para los compuestos de la invención que tienen actividad inhibidora de MMP, puede predecirse el uso ventajoso en el tratamiento de afecciones tumorales, puesto que previenen potencialmente la invasión metastásica o localizada de células tumorales, tanto inhibiendo la activación de diversos factores de crecimiento como bloqueando la angiogénesis.

30 Se han realizado un gran número de estudios en la búsqueda de fármacos con actividad antiinflamatoria que puedan realizar una acción inhibidora sobre citocinas proinflamatorias y que estén libres de los efectos secundarios de fármacos antiinflamatorios convencionales (inhibidores de COX).

35 Chiou *et al* [Exp. Opin. Ther. Patents 6(1), 41-56 (1996)] han revisado recientemente, en un trabajo monográfico, un gran número de publicaciones y patentes en las que se describen diversas clases de compuestos que inhiben la producción de citocinas bloqueando su liberación, sus receptores, o sus enzimas de conversión. También se han publicado muchos trabajos monográficos sobre los inhibidores de los MMP, tal como, por ejemplo, el de Summers *et al* [Annual Reports in Med. Chemistry 33, 131-140 (1998)] en el que se examinan diversas clases químicas de inhibidores de MMP y se trata su potencial terapéutico. Entre otras, se han publicado patentes en las que se describe la actividad inhibidora de la ON-sintasa de diversas amidinas, tales como, por ejemplo, la patente PCT/GB/92/02387 y la patente PCT/GB/94/01325.

45 Sin embargo, los compuestos descritos son derivados de amidina de aminoácidos que son estructuralmente muy similares a los derivados análogos de L-arginina, tal como L-N-monometilarginina que es el objeto de la patente WO91/04024, pero son diferentes de las benzamidinas de la presente invención, tanto estructuralmente como con respecto a su actividad farmacológica en total.

50 Todas estas publicaciones e investigaciones muestran que existe una gran necesidad terapéutica para encontrar fármacos antiinflamatorios novedosos cada vez más potentes y mejor tolerados. Según esta necesidad, el objeto de la presente invención es proporcionar, para el tratamiento, fármacos novedosos que tengan simultáneamente actividad antiinflamatoria e inmunosupresora, expresada mediante sus actividades antagonísticas de ONSi y COX combinadas, su actividad inhibidora de MMP y su actividad para inhibir la producción de TNF- α , y que por tanto puedan usarse ventajosamente en el tratamiento de afecciones patológicas en seres humanos que se caracterizan por inflamación de base autoinmunitaria o no específica.

55 Las formas farmacéuticas de los compuestos de la invención pueden prepararse mediante técnicas convencionales, por ejemplo, como comprimidos, pastillas, cápsulas, supositorios, suspensiones, disoluciones, parches, cremas o pomadas y pueden administrarse por vía oral, parenteral, rectal, transdérmica o transmucosa o en otras formas adecuadas para conseguir el efecto terapéutico como tal, por ejemplo, preparaciones sólidas para uso oral con acción retardada que permiten la liberación controlada del principio activo a lo largo del tiempo.

60 El principio activo se administra normalmente al paciente con una dosis de referencia variable desde 0,1 hasta 10 mg/kg de peso corporal por dosis.

65 Para la administración parenteral, se prefiere el uso de una sal soluble en agua de los compuestos de la invención tal como el clorhidrato u otra sal derivada de un ácido orgánico o inorgánico farmacéuticamente aceptable y no tóxico. Para los derivados de la invención con un carácter ligeramente ácido, tales como los derivados en los que R₁ es

el grupo nitroamino, las correspondientes sales de sodio o sales equivalentes pueden prepararse mediante métodos convencionales.

5 Las sustancias comúnmente usadas en productos farmacéuticos tales como excipientes, aglutinantes, aromatizantes, disgregantes, sustancias para estimular la absorción transdérmica y transmucosa, colorantes, agentes humectantes, etc., pueden usarse como componentes inactivos.

El método para la preparación de los derivados de la invención consiste en una serie de reacciones que comprende:

10 a) hacer reaccionar la 1,3 o 1,4-fenilendiamina de fórmula (IV), sustituida de manera adecuada y en la que R₅ tiene el significado dado anteriormente, con el isotiocianato (V A), o isocianato (V C) apropiado, en los que R₂, R₃, R₄ y n tienen los significados dados anteriormente, en presencia de un exceso de fenilendiamina, en un disolvente inerte y a una temperatura de entre 4°C y la temperatura de reflujo del disolvente usado, para dar las correspondientes anilinas de fórmula (III) en la que R₂, R₃, R₄, R₅, A y n tienen los significados dados anteriormente y en la que el grupo amina está en la posición meta o para con respecto a la cadena con el grupo "A-NH" (véase el esquema de síntesis general, etapa 1), y

20 b) hacer reaccionar las anilinas de fórmula (III), en la que R₂, R₃, R₄, R₅, A y n tienen los significados dados anteriormente, con el imidato de fórmula II apropiado, generalmente salificado en forma de clorhidrato, en el que R₁ tiene el significado dado anteriormente.

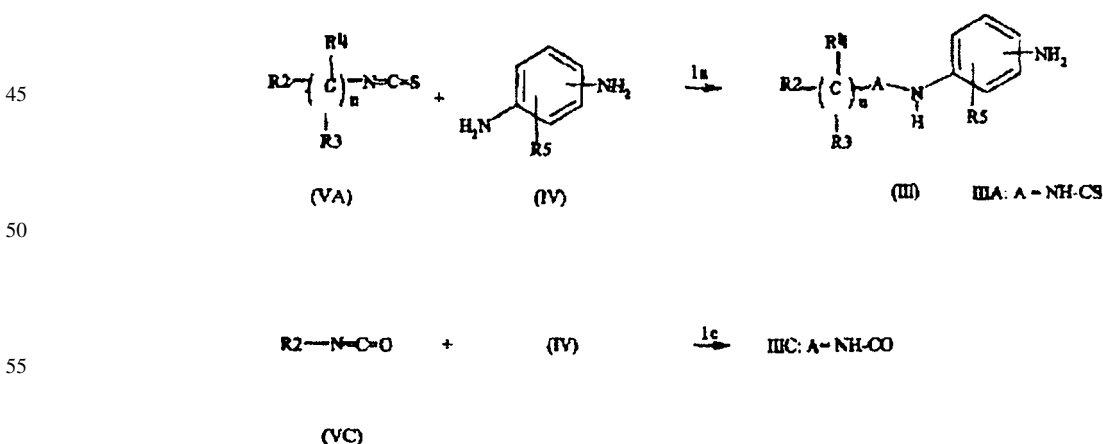
25 La reacción tiene lugar en presencia de un exceso de (II) con respecto a (III) (preferiblemente de 2 moles con respecto a 1) y en presencia de una cantidad estequiométrica, con respecto a (II), de una base terciaria, preferiblemente trietilamina, en un disolvente anhidro inerte, tal como, por ejemplo tetrahidrofurano, a una temperatura de entre 4°C y el punto de ebullición del disolvente, durante un periodo de entre 2 y 48 horas, para dar los correspondientes derivados finales de fórmula (I) en la que A, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y n tienen los significados dados anteriormente y en la que el grupo amidina está en la posición para o meta con respecto al grupo "A-NH".

30 Los compuestos de fórmula (I) descritos en la tabla 2 (I-30 y I-31) se obtuvieron con el uso de reactivos distintos de los de la fórmula (II) general y, en particular, tosilato de benzotriazol-1-carboxamidinio (véase el ejemplo 5) y N-metil-N-nitroso-N'-nitroguanidina (véase el ejemplo 6), respectivamente.

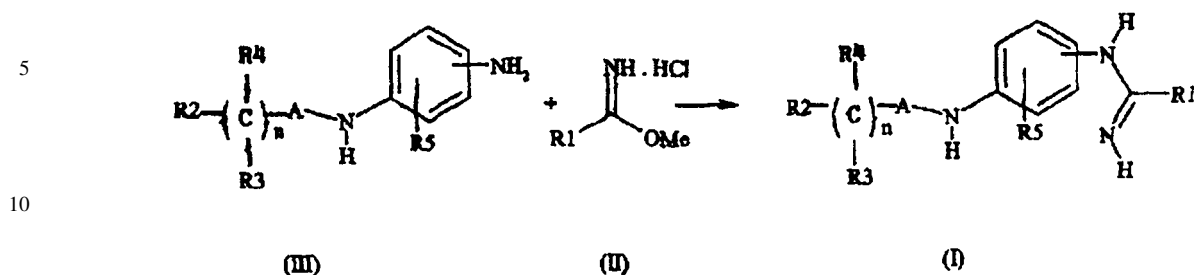
35 Las fenilendiaminas de partida, así como los isotiocianatos (V A), los isocianatos (V C) y los imidatos de fórmula (II) están comercialmente disponibles o se prepararon mediante métodos convencionales según la bibliografía existente.

Esquema de síntesis general (esquema 1)

40 Etapa 1



Etapa 2



15 Los siguientes ejemplos se facilitan a continuación como ilustración adicional de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de N-(4-aminofenil)-N'-pentiltiourea (Compuesto III-4 de la tabla 1)

20 Se suspendieron 71,8 g de 1,4-fenilendiamina (0,66 moles) en 300 ml de tetrahidrofurano y se añadieron lentamente gota a gota 43 g de isotiocianato de pentilo (0,33 moles), disueltos en 50 ml de tetrahidrofurano, con agitación y a temperatura ambiente. Tras 24 horas, se evaporó el disolvente a vacío y se lavó el residuo, absorbido con acetato de etilo, con agua, ácido cítrico 0,1 N, bicarbonato de sodio saturado y agua hasta pH neutro. Se convirtió el disolvente en anhidro con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a vacío, dando 75 g de producto bruto que se recristalizó en tolueno. Se obtuvieron 60 g.

Fórmula: C₁₂H₁₉N₃S (P.M. 237,46). Rendimiento 77%.

30 CCF:(cloroformo/metanol 9/1) rf 0,7. P.F. 125°C.

HPLC: tiempo de retención (tr) 4,60 minutos.

35 Condiciones de HPLC: Columna Supelcosil LC-DP, 100 x 4,6 mm, eluyente KH₂PO₄ 0,01 M 25/MetOH 27/MetCN 48 (pH 2,1), flujo 0,4 ml/min., detector UV a 248 nm.

¹H-RMN (DMSO-d₆), ppm: 2,21 (t a, 3H, J = 5,60 Hz); 0,98-1,71 (m, 6H); 3,33 (q, 2H, J = 6,68 Hz); 4,93 (s a, 2H); 6,45 (d, 2H, J = 8,59 Hz); 6,81 (d, 2H, J = 8,59 Hz); 7,05 (m, 1H); 8,88 (s, 1H).

40 Todos los compuestos intermedios de fórmula (III) según la invención en la que A es el grupo tiocarboxamida se sintetizaron con el uso del mismo método (véase el esquema 1, etapa 1a).

Ejemplo 3

Preparación de N-(4-aminofenil)-N'-ciclohexilurea (Compuesto III-28 de la tabla 1)

50 Se suspendieron 10,4 g de 1,4-fenilendiamina (0,095 moles) en 100 ml de tetrahidrofurano y se añadieron lentamente gota a gota 5 ml de isocianato de ciclohexilo (0,038 moles), disueltos en 20 ml de tetrahidrofurano, con agitación y a temperatura ambiente. Tras 24 horas, se filtró el sólido formado y se lavó con tetrahidrofurano frío, agua y etil éter. Se obtuvieron 8,8 g.

Fórmula: C₁₃H₁₉N₃O (P.M. 233,31). Rendimiento 98%

55 CCF: (cloroformo/metanol 9/1) rf 0,40. P.F. 199,8-202,4°C.

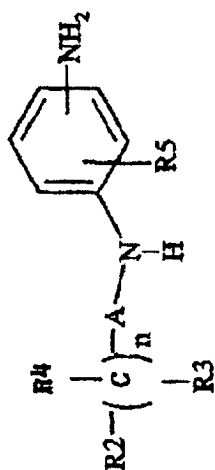
HPLC: tiempo de retención (tr) 6,39 minutos.

Condiciones de HPLC: véase el ejemplo 1.

60 ¹H-RMN (DMSO-d₆), ppm: 0,75-2,00 (m, 10H); 3,47 (m, 1H); 4,62 (s a, 2H); 5,75 (d, 2H, J = 7,50 Hz); 6,49 (d, 2H, J = 8,75 Hz); 7,00 (d, 2H, J = 8,75 Hz); 7,75 (s a, 1H).

65 Algunos derivados de fórmula (III) obtenidos tal como se describió anteriormente se facilitan en la tabla 1 a continuación, con algunas características químicas y físicas de identificación.

Tabla 1: Compuestos de fórmula (III)



(III)

Compuesto	R ₂	R ₃	n	A	Fórmula bruta	P.F. (disolvente de cristalización) ^d	CCF (Rf) ^e
III-1	CH ₃	-	0	NH-CS	C ₈ H ₁₁ N ₃ S	173,5-174,2 (A)	0,65 (I)
III-2	CH ₃	H	2	NH-CS	C ₁₀ H ₁₅ N ₃ S	118,6-120,2	0,58 (I)
III-3	CH ₃	H	3	NH-CS	C ₁₁ H ₁₇ N ₃ S	124,5-127	0,67 (I)
III-4	CH ₃	H	4	NH-CS	C ₁₂ H ₁₉ N ₃ S	113-115 (B)	0,70 (I)
III-5	CH ₃	H	5	NH-CS	C ₁₃ H ₂₁ N ₃ S	119,5-120,3	0,75 (I)
III-6	CH ₃	H	6	NH-CS	C ₁₄ H ₂₃ N ₃ S	107,0-107,4	0,75 (I)
III-7	Isopropilo	H	2	NH-CS	C ₁₂ H ₁₉ N ₃ S	153,5-154,6 (B)	0,60 (I)
III-8	CH ₃	CH ₃	1	NH-CS	C ₁₀ H ₁₅ N ₃ S	137,2-137,8 (B)	0,63 (I)
III-9	Etilo	CH ₃	1	NH-CS	C ₁₂ H ₁₉ N ₃ S	165,6-166,8	0,75 (I)
III-10	CH ₃ -O	H	3	NH-CS	C ₁₁ H ₁₇ N ₃ OS	104,6-105,2	0,65 (I)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

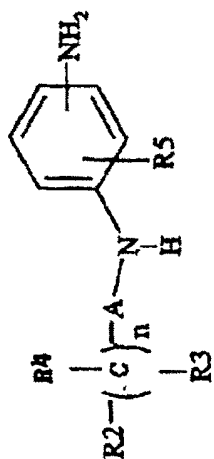
50

55

60

65

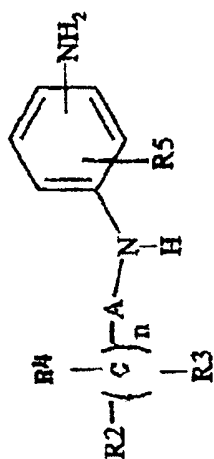
Tabla 1: Compuestos de fórmula (III)



(III)

Compuesto	R ₂	R ₃	n	A	Fórmula bruta	P.F. (disolvente de cristalización) ^d	CCF (Rf) ^e
III-11	Ciclohexilo	-	0	NH-CS	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ S	168,6-169,4	0,70 (I)
III-12	Fenilo	-	0	NH-CS	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ S	263,0-264,0 (A)	0,79 (II)
III-13	Fenilo	H	2	NH-CS	C ₁₅ H ₁₇ N ₃ S	168,2-169,0	0,83 (II)
III-14	Fenilo	H	3	NH-CS	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ S	117,3-117,9	0,83 (II)
III-15	4-F-Fenilo	H	2	NH-CS	C ₁₅ H ₁₇ ClFN ₃ S	190,2-191,6	0,85 (II)
III-16	4-Cl-Fenilo	H	2	NH-CS	C ₁₅ H ₁₆ ClN ₃ S	116,6-116,7	0,83 (II)
III-17	2,6-diF-Fenilo	H	2	NH-CS	C ₁₅ H ₁₅ F ₂ N ₃ S	147,7-149,7	0,50 (I)
III-18	2-Piridilo	H	1	NH-CS	C ₁₃ H ₁₄ N ₄ S	106,0-108,0	0,41 (I)
III-19	2-Piridilo	H	1	NH-CS	C ₁₄ H ₁₆ N ₄ S	82,0-84,0	0,38 (I)
III-20	5-CH ₃ -2-Tiazolilo	-	0	NH-CS	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ S ₂	157,5-159,0	0,40 (I)

Tabla 1: Compuestos de fórmula (III)



Compuesto	R ₂	R ₃	n	A	Fórmula bruta	P.F. (disolvente de cristalización) ^d	CCF (Rf) ^e
III-28	Ciclohexilo	-	0	NH-CO	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O	199,8-202,4	0,40 (I)
III-29	Ciclohexilo	-	0	NH-CS	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ S	101,0-102,8	0,70 (I)

Nota: a) En todos los compuestos facilitados a modo de ejemplo, R₄ es H, con la excepción del compuesto

III-9 en el que R₄ es CH₃.

b) En todos los compuestos facilitados a modo de ejemplo, el grupo amino está en la posición para con respecto al grupo "NH-A", con la excepción del compuesto III-29 en el que el grupo amino está en la posición meta con respecto al grupo "NH-A".

c) En todos los compuestos facilitados a modo de ejemplo, R₅ es H excepto para el compuesto III-21 en el que R₅ es 2,5-dimetilo.

d) Disolvente de cristalización: A (isopropanol); B (tolueno).

e) Eluyente: (I) cloroformo/metanol (9/1) (v/v); (II) cloroformo/metanol/agua/amoniaco (85/25/2/1) (v/v).

ES 2 311 600 T3

Ejemplo 4

Preparación de N-[4-(N-acetamidina)fenil]-N'-pentiltiourea (Compuesto I-4 de la tabla 2)

5 Se disolvieron 55 g de di-N-(4-aminofenil)-N'-pentiltiourea (0,23 moles) en 300 ml de tetrahidrofurano. Se añadieron 64,5 ml de trietilamina (0,46 moles) y 50,7 g de clorhidrato de acetimidato de metilo (0,46 moles), con agitación a temperatura ambiente; el pH de la suspensión era aproximadamente de 9. Tras 24 horas (el pH descendió hasta 7), se filtró el sólido y se lavó con un poco de tetrahidrofurano y etil éter. El residuo, absorbido con agua, se convirtió en básico con hidróxido de sodio 4 N hasta pH 11 y se dejó durante 1 hora con agitación y entonces se filtró, se lavó con agua y etil éter y se purificó en caliente con acetonitrilo. Se obtuvieron 51 g.

Fórmula: $C_{14}H_{22}N_4S$ (P.M. 278,42). Rendimiento 80%.

15 CCF: (butanol/ácido acético/agua 5/2/2) rf 0,70; (cloroformo/metanol saturado con amoníaco 9/1) rf 0,37. P.F. 191,4°C.

HPLC: tiempo de retención (tr) 7,70 minutos.

Condiciones de HPLC: véase el ejemplo 1.

20 1H -RMN (DMSO- d_6), ppm: 0,88 (t a, 3H, J = 5,60 Hz); 1,00-1,55 (m, 6H); 1,82 (s, 3H); 3,35 (m, 2H); 5,91 (s a, 1H); 6,63 (d, 2H, J = 8,56 Hz); 7,11 (d, 2H, J = 8,56 Hz); 7,28 (s a, 1H); 9,08 (s a, 1H).

25 Todos los derivados de fórmula (I) en la que R_1 era metilo se prepararon de manera similar con el uso de la anilina de fórmula (III) apropiada en lugar de N-(4-aminofenil)-N'-pentiltiourea.

Ejemplo 5

Preparación de 1-guanidinofenil-4-ciclohexiltiourea (Compuesto I-30 de la tabla 2)

30 Se suspendieron 15 g de N-(4-aminofenil)-N'-ciclohexiltiourea (0,06 moles) en 100 ml de acetonitrilo y se añadieron 20 g de tosilato de benzotriazol-1-carboxamidinio [0,06 moles, Katrizky, A. R. *et al.* Synth. Comm. 25(8), 1173-1186, (1995)] con agitación a temperatura ambiente. Tras 72 horas, se evaporó el disolvente a vacío y se lavó el residuo, absorbido con acetato de etilo, con hidróxido de sodio 0,1 N y se extrajo con ácido cítrico 0,1 N. Se llevó la fase acuosa hasta pH 9 con hidróxido de sodio 2 N y se extrajo con acetato de etilo y se lavó la fase orgánica con agua. Se convirtió el disolvente en anhidro sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó a vacío dando 8 g de producto bruto que se purificó con isopropil éter. Se obtuvieron 7,4 g.

40 Fórmula: $C_{14}H_{21}N_5S$ (P.M. 291,42). Rendimiento 43%.

CCF:(butanol/ácido acético/agua 5/2/2) rf 0,71. P.F. 188,6°C.

HPLC: tiempo de retención (tr) 8,0 minutos.

45 Condiciones de HPLC: véase el ejemplo 1.

50 1H -RMN (DMSO- d_6), ppm: 0,67-2,17 (m, 10H); 4,05 (m, 1H); 5,73 (m a, 6H); 6,71 (d, 2H, J = 8,43 Hz); 7,17 (d, 2H, J = 8,43 Hz).

Ejemplo 6

Preparación de 1-nitroguanidinofenil-4-ciclohexiltiourea (Compuesto I-31 de la tabla 2)

55 Se suspendieron 9 g de N-(4-aminofenil)-N'-ciclohexiltiourea (0,036 moles) en 140 ml de una mezcla 1/1 de etanol/agua y se añadieron 3 g de N-metil-N-nitroso-N'-nitroguanidina [0,021 moles, McKay, A. F. J. Am. Chem. Soc. 71, 1968-1970, (1949)] con agitación a temperatura ambiente. Tras 2 horas a temperatura ambiente, se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 1 hora; se filtró en caliente el precipitado que se formó, se lavó con etil éter y se secó. Se obtuvieron 3,8 g.

Fórmula: $C_{14}H_{20}N_6O_2S$ (P.M. 336,41). Rendimiento 54%.

65 CCF: (butanol/ácido acético/agua 5/2/2) rf 0,95. P.F. 215,2°C.

HPLC: tiempo de retención (tr) 4,16 minutos.

Condiciones de HPLC: véase el ejemplo 1.

ES 2 311 600 T3

¹H-RMN (DMSO-d₆), ppm: 0,84-1,99 (m, 10H); 4,01 (m, 1H); 7,15 (d, 2H, J = 8,76 Hz); 7,42 (d, 2H, J = 8,76 Hz); 7,52 (d a, 1H, J = 7,64 Hz); 8,03 (s a, 2H); 9,28 (s, 1H); 9,42 (s a, 1H).

5 Ejemplo 7

Preparación de clorhidrato de N-[4-(N-acetamidino)fenil]-N'-pentiltiourea (el clorhidrato del compuesto I-4)

10 Se disolvieron 3 g de N-[4-(N-acetamidino)fenil]-N'-pentiltiourea (0,011 moles) en HCl 1 N. Tras 0,5 horas a temperatura ambiente, se filtró el precipitado que se formó, se lavó con un poco de agua y con etil éter y se secó. Se obtuvieron 3,2 g.

Fórmula: C₁₄H₂₃ClN₄S (P.M. 314,88). Rendimiento 93%.

15 CCF: (butanol/ácido acético/agua 5/2/2) rf 0,70. P.F. 180,6°C.

¹H-RMN (DMSO-d₆), ppm: 0,84 (t, 3H, J = 5,60 Hz); 1,02-1,78 (m, 6H); 2,28 (s, 3H); 3,43 (q a, 2H, J = 6,05 Hz); 7,15 (d, 2H, J = 8,56 Hz); 7,73 (d, 2H, J = 8,56 Hz); 8,39 (m, 1H); 9,42 (s a, 1H); 10,38 (s, 1H); 11,28 (s, 1H).

20 Algunos derivados de fórmula (I) obtenidos según la invención se facilitan en la tabla 2 a continuación, con algunas características químicas y físicas de identificación, sin limitar por eso de ninguna manera el alcance de la invención.

25

(Tabla pasa a página siguiente)

30

35

40

45

50

55

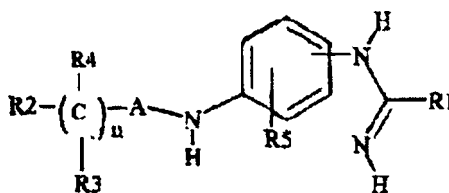
60

65

ES 2 311 600 T3

TABLA 2

Compuestos de fórmula (I)



(I)

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	n	A	Fórmula bruta	P.F. (disolvente de cristalización) ^d	CCF (Rf) ^e
I-1	CH ₃	CH ₃	-	0	NH-CS	C ₁₀ H ₁₄ N ₄ S	186,2-187,8	0,50
I-2	CH ₃	CH ₃	H	2	NH-CS	C ₁₂ H ₁₈ N ₄ S	188,1-189,1 (A)	0,70
I-3	CH ₃	CH ₃	H	3	NH-CS	C ₁₃ H ₂₀ N ₄ S	182,3-183,1 (A)	0,72
I-4	CH ₃	CH ₃	H	4	NH-CS	C ₁₄ H ₂₂ N ₄ S	190,7-191,4 (A)	0,71
I-5	CH ₃	CH ₃	H	5	NH-CS	C ₁₅ H ₂₄ N ₄ S	177,6-178,0	0,80
I-6	CH ₃	CH ₃	H	6	NH-CS	C ₁₆ H ₂₆ N ₄ S	177,8-178,4	0,80
I-7	CH ₃	Isopropilo	H	2	NH-CS	C ₁₄ H ₂₂ N ₄ S	177,7-179,1 (A)	0,58
I-8	CH ₃	CH ₃	CH ₃	1	NH-CS	C ₁₂ H ₁₈ N ₄ S	163,0-163,9 (A)	0,58
I-9	CH ₃	Etilo	CH ₃	1	NH-CS	C ₁₄ H ₂₂ N ₄ S	145,7-147,4 (B)	0,61
I-10	CH ₃	CH ₃ -O	H	3	NH-CS	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ OS	146,9-149,6 (B)	0,54
I-11	CH ₃	Ciclohexilo	-	0	NH-CS	C ₁₅ H ₂₂ N ₄ S	171,3-171,6 (A)	0,60
I-12	Etilo	Ciclohexilo	-	0	NH-CS	C ₁₆ H ₂₄ N ₄ S	155,0-156,0	0,66
I-13	CH ₃	Fenilo	H	0	NH-CS	C ₁₅ H ₁₆ N ₄ S	118,7-120,5	0,70
I-14	CH ₃	Fenilo	H	2	NH-CS	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ S	186,6-188	0,63
I-15	CH ₃	Fenilo	H	3	NH-CS	C ₁₈ H ₂₂ N ₄ S	146,6-148,0 (B)	0,60
I-16	CH ₃	4-F-Fenilo	H	2	NH-CS	C ₁₇ H ₁₉ FN ₄ S	179,1-181,6	0,57
I-17	CH ₃	4-Cl-Fenilo	H	2	NH-CS	C ₁₇ H ₁₉ ClN ₄ S	174,0-176,0 (A)	0,60
I-18	CH ₃	2,6-diF-Fenilo	H	2	NH-CS	C ₁₇ H ₁₈ F ₂ N ₄ S	158,8-160,4	0,58
I-19	CH ₃	2-Piridilo	H	1	NH-CS	C ₁₅ H ₁₇ N ₅ S	159,0-161,0 (A)	0,48
I-20	CH ₃	2-Piridilo	H	2	NH-CS	C ₁₆ H ₁₉ N ₅ S	171,5-173,0 (A)	0,42
I-21	CH ₃	5-CH ₃ -2-Tiazolilo	-	0	NH-CS	C ₃ H ₁₅ N ₅ S ₂	107,8-110,1	0,45
I-22	CH ₃	CH ₃	H	4	NH-CS	C ₁₆ H ₂₆ N ₄ S	118-121,7 (B)	0,61
I-29	CH ₃	Ciclohexilo	-	0	NH-CO	C ₁₅ H ₂₂ N ₄ O	220,2-224,6	0,50
I-30	NH ₂	Ciclohexilo	-	0	NH-CS	C ₁₄ H ₂₁ N ₅ S	176,5-179,4	0,71
I-31	NO ₂ -NH	Ciclohexilo	-	0	NH-CS	C ₁₄ H ₂₀ N ₆ O ₂ S	213,9-215,2	0,95
I-32	CH ₃	Ciclohexilo	-	0	NH-CS	C ₁₅ H ₂₂ N ₄ S	171,4-173,2	0,66

Nota: a) En todos los compuestos facilitados a modo de ejemplo, R₄ es H, con la excepción del compuesto I-9 en el que R₄ es CH₃.

b) En todos los compuestos facilitados a modo de ejemplo, el grupo amino está en la posición para con respecto al grupo "NH-A", con la excepción del compuesto I-32 en el que el grupo amino está en la posición meta con respecto al grupo "NH-A".

c) En todos los compuestos facilitados a modo de ejemplo, R₅ es H excepto para el compuesto I-22 en el que R₅ es 2,5-dimetilo.

d) Disolvente de cristalización: A (acetonitrilo); B (tolueno).

e) Eluyente: butanol/ácido acético/agua (5/2/2) (v/v).

ES 2 311 600 T3

Actividad farmacológica

5 a) La actividad para inhibir la formación de ON, medida como NO_2^- (nitritos), PGE_2 y proteasa neutra, se investigó *in vitro* en caldos de cultivo de condrocitos de articulaciones de conejo estimulados por citocina IL-1 β (1 ng/ml) durante 48 horas. Para la preparación de los condrocitos, se siguió el método descrito por Berenbaum *et al* [FEBS Letters 340, 51-55 (1994)]. Brevemente, se cortaron finamente fragmentos de cartílago extraídos en condiciones estériles de las cabezas de las articulaciones de rodilla, cadera y hombro de conejo y se digirieron a 37°C mediante disoluciones de hialuronidasa, tripsina y colagenasa, dando lugar, tras la filtración en una gasa estéril y la centrifugación a 600 x g y dilución adecuada con DMEM-FCS al 10%, a una concentración de aproximadamente 1×10^5 células por pocillo. Se mantuvieron las células en estas condiciones hasta alcanzar la confluencia (aproximadamente 15 días), cambiándose el caldo cada 3 días. En este momento se añadieron los productos sometidos a prueba, disueltos en el medio, a cada muestra de prueba y tras 20 minutos se añadieron 350 μl de IL-1 β con el fin de tener una concentración final de 1 ng/ml. La duración de la estimulación fue de 48 horas a 37°C (incubación en aire-CO₂ al 7%). La medición de los nitritos, tal como se describe por Green *et al.* [Anal. Biochem. 126, 131-138 (1982)] y de las PGE_2 mediante la medición por RIA, se realizó entonces en el fluido sobrenadante celular. Se realizó la medición de las proteasas neutras en el fluido sobrenadante celular que contenía el activador acetato de p-aminofenilmercurio (APMA) con el uso de azocoll como el sustrato y con incubación a 37°C durante 17 h tal como se describe por Chavira *et al.* [Anal. Biochem. 136, 446-450 (1984)]. Con el fin de evaluar el efecto inhibitorio directo de los compuestos sometidos a prueba sobre la actividad hidrolítica del fluido sobrenadante celular, éstos se añadieron al fluido sobrenadante que contenía las proteasas inducidas por IL-1 β y ya activadas por AMPA.

25 Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3, en la que la CI_{50} , es decir, la concentración (micromolar) de antagonista que puede inhibir la formación de nitritos, PGE_2 y proteasas neutras, respectivamente, en el 50% con respecto al grupo control, es decir, con respecto a las células estimuladas con IL-1 β , pero sin la adición de antagonistas, se facilita para algunos de los compuestos de la invención ya facilitados a modo de ejemplo en la tabla 2.

30 (Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

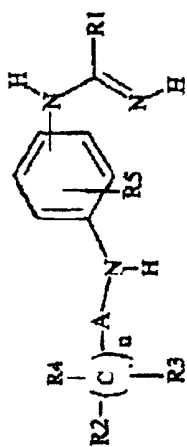
50

55

60

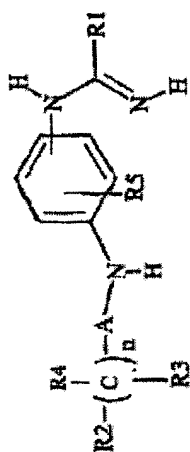
65

Tabla 3: Compuestos de fórmula (I)



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	n	A	Condrocitos de articulaciones de conejo			
						ON	PGE2	MP	CI ₅₀ (x10 ⁻⁶ M)
I-1	CH ₃	CH ₃	-	0	NH-CS	IN	IN	30	
I-2	CH ₃	CH ₃	H	2	NH-CS	IN	IN	30	
I-3	CH ₃	CH ₃	H	3	NH-CS	190	250	13,3	
I-4	CH ₃	CH ₃	H	4	NH-CS	6,6	3,3	6,6	
I-5	CH ₃	CH ₃	H	5	NH-CS	10,0	10,0	3,3	
I-6	CH ₃	CH ₃	H	6	NH-CS	30,0	20,0	20,0	
I-7	CH ₃	Isopropilo	H	2	NH-CS	3,3	6,6	13,3	
I-8	CH ₃	CH ₃	CH ₃	1	NH-CS	30,0	3,3	3,3	

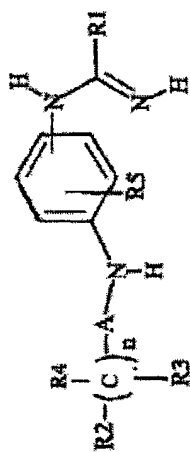
Tabla 3: Compuestos de fórmula (I)



(I)

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	n	A	Condrocitos de articulaciones de conejo		
						ON	PGE2	MP
I-9	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	1	NH-CS	10,0	10,0	6,6
I-10	CH ₃	CH ₃ -O	H	3	NH-CS	50,0	50,0	6,6
I-11	CH ₃	Ciclohexilo	-	0	NH-CS	110	16,6	30
I-12	Etilo	Ciclohexilo	-	0	NH-CS	IN	13,3	100
I-13	CH ₃	Fenilo	H	0	NH-CS	100	10	6,6
I-14	CH ₃	Fenilo	H	2	NH-CS	100	33	6,6
I-15	CH ₃	Fenilo	H	3	NH-CS	33	16,6	6,6
I-16	CH ₃	4-F-Fenilo	H	2	NH-CS	13,3	26,6	6,6
I-17	CH ₃	4-Cl-Fenilo	H	2	NH-CS	10,0	10	10

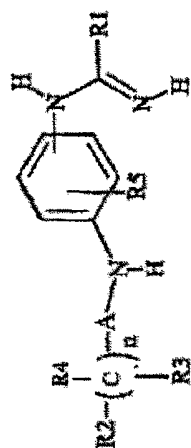
Tabla 3: Compuestos de fórmula (I)



(I)

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	n	A	Condrocitos de articulaciones de conejo		
						ON	PGE2	MP
						CI ₅₀ (x10 ⁻⁶ M)		
I-18	CH ₃	2,6-diF-	H	2	NH-CS	IN	6,6	6,6
I-19	CH ₃	Fenilo	H	1	NH-CS	300	IN	13,3
I-20	CH ₃	2-Piridilo	H	2	NH-CS	16,6	16,6	6,6
I-21	CH ₃	5-CH ₃ -2-	-	0	NH-CS	66,6	IN	IN
I-22	CH ₃	Tiazolilo	H	4	NH-CS	16,6	10,0	20,0
I-29	CH ₃	Ciclohexilo	-	0	NH-CO	25,0	6,6	25,0
I-30	NH ₂	Ciclohexilo	-	0	NH-CS	6,6	10	13,3

Tabla 3: Compuestos de fórmula (I)



(I)

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	n	A	Condrocitos de articulaciones de conejo		
						ON	PGE2	MP
I-31	NO ₂ -NH	Ciclohexilo	-	0	NH-CS	46,6	30	6,6
I-32	CH ₃	Ciclohexilo	-	0	NH-CS	300	300	IN
-	-	-	-	-	-	IN	3 (mM)	IN

Nota: a) para la identificación estructural, véanse las notas a, b y c de la tabla 2

b) ON determinado como nitritos

c) MP: metaloproteasas

ES 2 311 600 T3

Puede observarse a partir de los datos facilitados en la tabla 3 que algunos de los compuestos que se sometieron a prueba y que son objetos de la invención, tienen un potente efecto inhibidor, a nivel micromolar, sobre la producción de nitritos, PGE2 y metaloproteasas inducidas por citocina IL-1 β en cultivos de condrocitos de conejo. Los mejores compuestos fueron aquéllos en los que R₁ era CH₃, R₃ y R₄ eran H, R₂ era CH₃ si n era 4 ó 5, isopropilo si n era 2, o el grupo 2,6-difluorofenilo si n era 2 y en los que A era NH-CS (compuestos I-4, I-5, I-7 y I-18, respectivamente). El compuesto I-31 en el que R₁ era el grupo NH-NO₂, R₂ era ciclohexilo y A era el grupo NH-CS, también era muy activo. Es interesante observar que la actividad inhibidora sobre las metaloproteasas se expresó únicamente por los compuestos en los que A era el grupo NH-CS. También debe observarse que el compuesto inhibidor de la ON-sintasa de referencia L-NAME generalmente tenía una actividad aproximadamente 30-100 veces menos potente que los mejores compuestos de la invención, tal como el compuesto I-4 y era completamente inactivo para inhibir a las metaloproteasas.

b) Algunos de los compuestos de la invención, tales como los compuestos I-4, I-11 y I-31, se evaluaron *in vivo* en una serie de modelos de extravasación experimentales en los que se inyectaron 5 μ l del agente flogogénico preseleccionado disuelto en solución fisiológica, por vía intradérmica en las orejas de ratones tal como se describe por Erdo *et al.*, con ligeras modificaciones [Agents and Actions 39, 137-142 (1993)].

Los productos sometidos a prueba se administraron por vía oral 1 hora antes de la exposición y, 30 minutos antes de la exposición, se inyectó por vía intravenosa el colorante azul de Evans en una dosis de 100 mg/kg. Se sacrificaron los animales en un momento predeterminado según la prueba, 30 min. - 2 horas después de la exposición. Se evaluó la extravasación determinando la cantidad de colorante presente en la oreja, se extrajo tras la homogeneización del tejido en 2 ml de formamida e incubación a 50°C durante 2 horas. Tras centrifugar, se determinó la cantidad de colorante midiendo la absorción a 620 nm. El efecto máximo en % (% MPE) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ MPE} = \frac{(E_v - E_D)}{E_v - E_B} \times 100$$

en la que E_v es la absorción media observada en el grupo de animales tratados únicamente con el agente flogogénico, E_D es el grupo tratado con el agente flogogénico y el fármaco y E_B es el valor base, es decir, el valor para los animales a los que se les inyectó solución fisiológica sola.

Los agentes flogogénicos usados fueron:

Ácido araquidónico (disuelto en EtOH); (1 mg/ratón; sacrificado + 30 min.); histamina (3 nmoles/ratón; sacrificado + 30 min.); PAF (30 pmoles/ratón; sacrificado + 60 min.); zimosan (10 μ g/ratón; sacrificado + 120 min.); bradecina (0,6 nmoles/ratón; sacrificado + 30 min.).

Los resultados obtenidos con el compuesto I-4 se resumen en la tabla 4.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 4: Actividad del compuesto I-4 sobre la extravasación inducida por agentes algogénicos en las orejas de ratones

% de efectos de inhibición

Dosis mg/kg (v.o.)	Ácido araquidónico	Histamina	PAF	Zimosan	Bradicinina
Duración	30 min.	30 min.	1 h	2 h	30 min.
2,5 mg/kg	-	-	41,9	40,0	-
5 mg/kg	37,8	17,8	49,9	66,6	30,1
10 mg/kg	40,0	27,7	55,1	65,8	30,7
20 mg/kg	52,6	38,8	56,4	83,9	49,1
40 mg/kg	55,5	52,5	66,2	89,8	51,3
80 mg/kg	-	-	-	95,5	-

ES 2 311 600 T3

Se encontró que el compuesto I-4 era particularmente eficaz en la extravasación inducida por zimosan (DE_{50} 3,1 mg/kg); sin embargo, en los otros modelos de extravasación investigados, una dosis de sólo 5 mg/kg también produjo un efecto inhibitorio medio de aproximadamente el 35%. Se usaron como fármacos comparativos un inhibidor de la ON-sintasa no selectivo, éster metílico de N-nitro-L-arginina (L-NAME), un inhibidor de COX_1 (piroxicam) y un inhibidor de COX_2 (nimesulida).

Los resultados obtenidos se facilitan en la tabla 5 a continuación.

TABLA 5

*Inhibición de la extravasación en las orejas de ratones inducida por agentes alrogénicos
(DE_{50} mg/kg v.o.)*

	AA	Hista- mina	PAF	Zimosan	Bradicinina
Compuesto I-4	20,5	37,0	6,1	3,1	32,6
Compuesto I-31	30,5	-	10,8	10,5	-
L-NAME	55,1	36,4	40,0	IN (>100)	39,4
Piroxicam	-	-	21,2	6,1	-
Nimesulida	41,0	-	IN(>40)	-	-

Nota: AA = Ácido araquidónico (-): no sometido a prueba

En general, el compuesto I-4 era el más activo de los compuestos investigados. De hecho, de los compuestos de referencia, L-NAME era aproximadamente tan activo como el compuesto I-4 en la extravasación inducida por histamina y bradicinina pero era dos veces menos activo en la extravasación por AA, mucho menos activo para antagonizar PAF y completamente inactivo en la extravasación inducida por zimosan.

Piroxicam era 2-3 veces menos activo que el compuesto I-4 en los modelos en los que se usaron PAF y zimosan, y nimesulida era menos activa (2 veces) para antagonizar AA y era inactiva para antagonizar PAF. El compuesto I-31 tenía un perfil de actividad similar al del compuesto I-4 pero era generalmente 2-3 veces menos activo.

c) Se evaluó la actividad inmunosupresora del compuesto I-4 en una prueba *in vivo* en la rata, a la que se le inyectó i.p. un lipopolisacárido (LPS) de origen bacteriano, a una dosis de 6 mg/kg, y se le indujo un choque caracterizado por diarrea imperiosa acompañada por un gran aumento de la concentración plasmática de $TNF\alpha$.

Se extrajo sangre de los animales que se sacrificaron 90 minutos después de la exposición y se determinó la concentración de $TNF\alpha$ en el plasma mediante Elisa (Amersham Kit cod. RPN2734). Los resultados así obtenidos se facilitan en la tabla 6.

TABLA 6

*Efectos del compuesto I-4 sobre la concentración de $TNF\alpha$ plasmática en ratas tras la estimulación con LPS
(6 mg/kg/i.p.)*

	$TNF\alpha$ (ng/ml \pm DE)	Inhibición (%)
Control (SHAM)	<1 (n=4)	-
LPS control	61 \pm 13,4 (n=8)	-
Compuesto I-4 (50 μ g/kg i.c.v.) + LPS	2,3 \pm 1,2 (n=6)	96,2
Compuesto I-4 (10 mg/kg i.v.) + LPS	12,9 \pm 7,2 (n=6)	78,9
Compuesto I-4 (20 mg/kg v.o.) + LPS	30,6 \pm 1,0 (n=6)	49,8

ES 2 311 600 T3

Resulta evidente a partir de los datos facilitados anteriormente que el compuesto I-4 es muy activo para inhibir el aumento en plasma del TNF α en la evolución del choque endotóxico inducido por LPS. Por ejemplo, la dosis oral 20 mg/kg inhibió el efecto del LPS en aproximadamente el 50%.

5 d) Actividad antiinflamatoria intestinal.

El TNF α es una citocina implicada en la patogénesis de una variedad de enfermedades inflamatorias de base inmunológica, entre las que está la inflamación del intestino. Se ha demostrado [Bertrand *et al.* Br. J. Pharmacol. 124, 1385-1394 (1998)] que induciendo una sobreproducción de TNF α , inducida por fármacos antiinflamatorios de tipo COX₁, se provoca la activación de los neutrófilos y un aumento de la producción de nitritos debido a la activación de la ONSi tisular, que juntos contribuyen a los efectos ulcerosos tóxicos sobre la mucosa intestinal.

La capacidad combinada de algunos de los compuestos de la invención para inhibir tanto ONSi como la síntesis de TNF α ha conducido a que se controle su actividad en un modelo experimental de colitis provocada por un hapteno químico, ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS), que puede unirse a las proteínas tisulares y estimular la inmunidad mediada por células. La administración intrarrectal de TNBS junto con etanol provoca inflamación aguda caracterizada por ulceración extensa y necrosis.

Por tanto se indujo una colitis distal en la rata mediante instilación intrarrectal de TNBS (40 mg/kg) disuelto en etanol al 50% (0,5 ml/rata). Se administraron los fármacos por vía oral dos veces al día en los días -2; -1; 0; +1 y se sacrificaron los animales 48 horas tras la administración de TNBS.

Los parámetros examinados fueron: peso total del colon (g), "puntuación" del daño tisular macroscópico, medición de la actividad mieloperoxidasa (MPO) tisular, que es un marcador de la infiltración de los neutrófilos, y la medición de la actividad ONSi (pmoles/g de tejido/min.).

La puntuación macroscópica (MDS, "macroscopic damage score") se tomó en aproximadamente 10 cm de colon según la siguiente escala arbitraria:

30	0 Sin daño	4 Dos sitios de ulceración
	1 Hiperemia (sin úlceras)	5 Más de dos sitios de ulceración o 1 úlcera > 1 cm
35	2 1 pequeña úlcera o erosión	6-10 Si el daño era > 2 cm, se aumentó la puntuación en 1 por cada cm
	3 1 úlcera con inflamación	

40 La medición de MPO tisular se realizó según Velgara *et al.*, JPET 1994. La medición de los nitritos tisulares se realizó aplicando el método descrito anteriormente para los condrocitos al fluido sobrenadante del homogeneizado tisular.

45 Se examinaron el compuesto I-4, administrado en dosis de 5, 10 y 20 mg/kg, y el compuesto I-11, administrándolos por vía oral, en comparación con sulfasalazina (250 mg/kg) y ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) (100 mg/kg), 2 fármacos que se usan ampliamente en el tratamiento de colitis ulcerosa.

Los resultados así obtenidos se facilitan en la siguiente tabla.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

Tabla 7: Efectos del compuesto I-4, I-11, sulfasalazina y 5-ASA sobre la colitis inducida por TNBS en ratas

Grupos de tratamiento [mg/kg; número (n)]	Peso del colon (g)	Daño macroscópico (MDS)	Actividad mieloperoxidasa (UMPO/g/min.)	Actividad ONSi (pmoles/g/min.)
Control (SHAM) (n=6)	1,5±0,2		0,9±0,3	6,6±4,4
Control (TNBS) (n=8)	2,4±0,3	7,4±1,4	7,7±1,1	190,9±98,6
I-4 (5 mg/kg; n=8)	2,2±0,2	5,0±0,9	5,5±1,4	131,7±91,9
I-4 (10 mg/kg; n=8)	2,1±0,3	4,4±0,8(*)	5,0±1,7(*)	98,6±60,0
I-4 (20 mg/kg; n=8)	2,0±0,2(*)	3,5±0,8(*)	5,1±1,2(*)	61,5±31,4(*)
I-11 (20 mg/kg; n=7)	2,2±0,3	4,3±0,9(*)	6,5±1,8	90,6±45,6(*)
5-ASA (100 mg/kg; n=7)	2,4±0,4	6,9±1,1	7,9±2,3	167,3±106,5
Sulfasalazina (250 mg/kg; n=7)	2,5±0,3	6,0±2,9	7,5±5,5	100,8±86,8

Los valores facilitados son medias ± la desviación estándar

(*) valor significativamente diferente del grupo control con TNBS (prueba de Duncan)

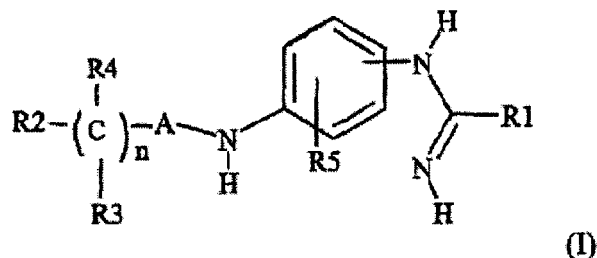
ES 2 311 600 T3

Resulta evidente a partir de los datos facilitados en la tabla que el compuesto I-4 tenía un efecto protector fuerte en el modelo experimental de colitis inducida en la rata por TNBS. De hecho, I-4 reduce tanto el daño macroscópico como todos los otros parámetros inflamatorios tomados en consideración de manera significativa y dependiente de la dosis a dosis media y alta (10 y 20 mg/kg). En particular, reduce el aumento del peso del colon inducido por el tratamiento con TNBS, reduce el daño macroscópico en aproximadamente el 50% a dosis de 10 y 20 mg/kg, y reduce el aumento de la actividad MPO tisular y la actividad ONSi inducida por TNBS en el 40% y el 50%, respectivamente, a la misma dosis. Por el contrario, de los dos fármacos de referencia seleccionados, 5-ASA (100 mg/kg) era inactivo sobre todos los parámetros y sulfasalazina era ligeramente activo a la dosis muy alta de 250 mg/kg y de manera no estadísticamente significativa únicamente sobre el daño macroscópico (efecto de aproximadamente el 20%) y sobre la actividad ONSi (efecto de aproximadamente el 50%). El otro compuesto de la invención que se sometió a prueba (compuesto I-11) también era activo a la dosis de 20 mg/kg aunque los efectos para reducir el daño, sobre los parámetros de aumento del peso del colon y la actividad MPO fueron menos claros que los del compuesto I-4.

Finalmente, en un modelo experimental de colitis en la rata que imita de manera tan rigurosa como posible un estado patológico que puede correlacionarse con la colitis ulcerosa en seres humanos [Morris *et al.* *Gastroenterology* 96, 795-803, (1989)] algunos de los compuestos de la invención tienen un efecto protector mucho mayor, y a dosis inferiores, que el de sulfasalazina que es fármaco usado ampliamente en el tratamiento de la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.

REIVINDICACIONES

1. Compuestos de fórmula (I) general indicada a continuación:



y en la que:

- A se selecciona independientemente del grupo carboxamida -NH-CO- y el grupo tiocarboxamida -NH-CS-, mediante los cuales el grupo “-A-NH-” forma el subresto -NH-CO-NH- o -NH-CS-NH-,

- R₁ se selecciona de un grupo alquilo que tiene desde 1 hasta 3 átomos de carbono y el grupo amino, no sustituido o sustituido con el grupo nitro o el grupo metilo,

- R₂ se selecciona independientemente de hidrógeno, un grupo alquilo que tiene desde 1 hasta 4 átomos de carbono, el grupo metoxilo, etoxilo o propoxilo, un residuo de cicloalcano mono, bi o tricíclico que tiene desde 5 hasta 12 átomos de carbono, el grupo adamantilo, un grupo arilo, naftilo o heterocíclico, no sustituido o sustituido con grupos metilo, metoxilo, hidroxilo, amino o halógeno,

- R₃ y R₄ se seleccionan independientemente de hidrógeno y un grupo alquilo que tiene desde 1 hasta 3 átomos de carbono,

- R₅ representa uno o dos sustituyentes seleccionados independientemente de hidrógeno y los grupos metilo, metoxilo e hidroxilo,

- n es un número entero desde 0 hasta 6, y

- el grupo amidina está en la posición para o meta con respecto al grupo “-A-NH-”, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

2. Compuestos según la reivindicación 1, de fórmula (I) general, en la que A es el grupo tiocarboxamida, R₁ es un grupo alquilo que tiene desde 1 hasta 3 átomos de carbono, R₂ es metilo o un grupo cicloalcano mono, bi o tricíclico que tiene desde 5 hasta 12 átomos de carbono, R₃, R₄ y R₅ son hidrógeno, n es un número entero entre 0 y 6 y el grupo amidina está en la posición para con respecto al grupo “-A-NH-”, una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

3. Compuestos según la reivindicación 2, en los que A es el grupo carboxamida, en lugar del grupo tiocarboxamida.

4. Compuestos según la reivindicación 2, en los que R₁ se selecciona del grupo amino, no sustituido o sustituido con el grupo nitro o metilo, en lugar de un grupo alquilo que tiene desde 1 hasta 3 átomos de carbono.

5. Compuestos según la reivindicación 2, en los que R₂ se selecciona de un grupo arilo, no sustituido o sustituido con grupos halógeno, en lugar del grupo metilo o de un grupo cicloalcano mono, bi o tricíclico.

6. Compuestos según la reivindicación 1, de fórmula (I) general, en la que A es el grupo tiocarboxamida, R₁ se selecciona independientemente del grupo metilo, el grupo amino o el grupo nitroamino, R₂, R₃, R₄ y R₅ son hidrógeno, n es 5 y el grupo amidina está en la posición para con respecto al grupo tiocarboxamida.

7. Uso de compuestos según la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de afecciones patológicas asociadas a fenómenos inflamatorios o autoinmunitarios.

8. Preparación farmacéutica que comprende como principio activo al menos uno de los compuestos según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

9. Preparación farmacéutica según la reivindicación 8, para su uso en tratamiento terapéutico de afecciones patológicas asociadas a fenómenos inflamatorios y autoinmunitarios.

ES 2 311 600 T3

10. Preparación farmacéutica según la reivindicación 8, para su uso en tratamiento terapéutico para el control y la prevención de enfermedades articulares degenerativas tales como la artritis reumatoide y la artrosis.

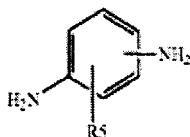
11. Preparación farmacéutica según la reivindicación 8, para su uso en tratamiento terapéutico de enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal, tales como colitis ulcerosa, colon irritable y enfermedad de Crohn.

12. Preparación farmacéutica según la reivindicación 8, para su uso en tratamiento terapéutico para el control antiproliferativo de afecciones tumorales sólidos.

13. Preparación farmacéutica según la reivindicación 8, que comprende además componentes inactivos farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en vehículos, aglutinantes, aromatizantes, edulcorantes, disgregantes, conservantes, agentes humectantes y mezclas de los mismos, o componentes que facilitan la absorción rectal, transdérmica o transmucosa, o que permiten la liberación controlada del principio activo a lo largo del tiempo.

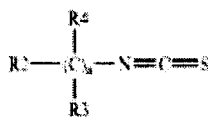
14. Método para la preparación de un derivado de fórmula (I) general en la que A, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y n tienen los significados dados en la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

a) hacer reaccionar la 1,3 ó 1,4-fenilendiamina de fórmula (IV):



(IV)

en la que R₅ tiene el significado dado anteriormente, con el isotiocianato de fórmula (V A):



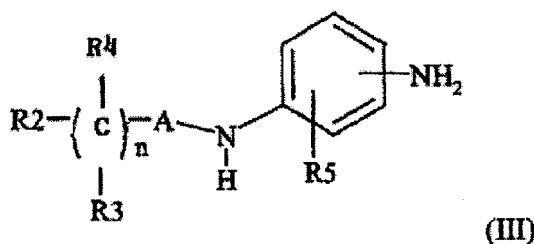
(VA)

o con el isocianato de fórmula (V C):



(VC)

en las que R₂, R₃ y n tienen los significados dados anteriormente, con un exceso de fenilendiamina, en un disolvente neutro y a una temperatura de entre 4°C y la temperatura de reflujo del disolvente usado, para dar las correspondientes anilinas de fórmula (III)

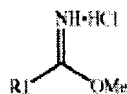


(III)

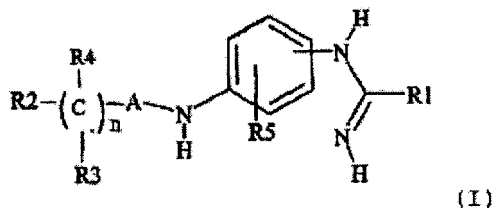
en la que R₂, R₃, R₄, A y n tienen los significados dados anteriormente y en la que el grupo amina está en la posición meta o para con respecto a la cadena con el grupo "A-NH";

ES 2 311 600 T3

b) hacer reaccionar las anilinas de fórmula (III) con el clorhidrato de imidato apropiado de fórmula (II):



10 en la que R₁ tiene el significado dado anteriormente, en presencia de un exceso de (II) y de la cantidad estequiométrica correspondiente de una base terciaria tal como trietilamina, en un disolvente anhidro inerte, a una temperatura de entre 4°C y el punto de ebullición del disolvente para dar los correspondientes derivados de fórmula (I)



20 en la que A, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y n tienen los significados dados anteriormente y en la que el grupo amidina está en la posición para o meta con respecto al grupo "A-NH", recuperándose los compuestos de fórmula (I) de la masa de reacción como tales o como sales farmacéuticamente aceptables y purificándose mediante métodos convencionales;

25 c) alternativamente, si R₁ es NH₂ o NH-NO₂, los correspondientes derivados de fórmula (I) general en la que A, R₂, R₃, R₄, R₅ y n tienen los significados dados anteriormente se preparan haciendo reaccionar las anilinas de fórmula (III) con tosilato de benzotriazol-1-carboxamidinio o con N-metil-N-nitroso-N'-nitroguanidina, respectivamente.