



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 350 585**

51 Int. Cl.:

C07C 259/04 (2006.01)

C07C 259/06 (2006.01)

C07C 259/08 (2006.01)

C07C 259/10 (2006.01)

A61K 31/16 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05752620 .4**

96 Fecha de presentación : **07.06.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1763507**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.03.2007**

54

Título: **Derivados de alfa aminoácidos con actividad antiinflamatoria.**

30

Prioridad: **05.07.2004 IT MI04A1347**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.01.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.01.2011

73

Titular/es: **ITALFARMACO S.p.A.**
Viale Fulvio Testi, 330
20126 Milano, IT

72

Inventor/es: **Mascagni, Paolo;**
Pinori, Massimo y
Mazzaferro, Rocco

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 350 585 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).

DERIVADOS DE ALFA AMINOÁCIDOS CON ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA**DESCRIPCIÓN**5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a derivados de alfa-aminoácidos, en particular derivados que contienen una función N-hidroxiamida, que tienen actividad antiinflamatoria y a las composiciones farmacéuticas de los mismos.

10

Antecedentes de la invención

El papel desempeñado por las citoquinas, en particular por la interleuquina 1β (IL- 1β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en el desarrollo de la respuesta antiinflamatoria está bien documentado (Dinarello C.A. y Wolff S.M., *New Eng. J. Med.* 328(2): 106113, 1993; Tracey K.J. y Cerami A., *Crit. Care Med.* 21: S415, 1993; Melli M. y Parente L., *Cytokines and lipocortines in inflammation and differentiation*, Wiley-Liss. Nueva York 1990; Dawson M.M. *Lymphokines and Interleukins*. CRC Press. Boca Raton, FL 1991). La investigación dirigida hacia el descubrimiento de sustancias capaces de inhibir la producción de citoquinas ha llevado al desarrollo de fármacos antiinflamatorios supresores de citoquinas (CSAID, por sus siglas en inglés), entre los que se incluyen los denominados fármacos antiinflamatorios no esteroideos no tradicionales (Chiu G.C.Y. y Liou S.X.L., *Exp. Opin. Ther. Patents*, 6(1): 41, 1996). En algunos de estos compuestos, la presencia del grupo hidroxilamina parece desempeñar un papel fundamental en determinar la actividad antiinflamatoria (Tanaka et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 31(8) 2810-2819, 1983).

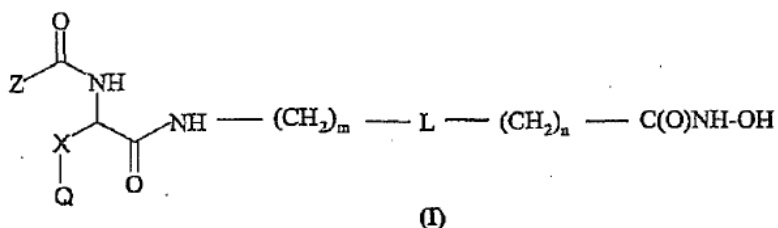
EP901465 describe derivados de ácido hidroxámico que contienen un grupo amidobenzoico, que son capaces de inhibir la producción de TNF- α y que tienen actividad antiinflamatoria e inmunosupresora; dichos compuestos han demostrado además actividad antitumoral como se describe en EP1583523.

35

Descripción de la invención

Se ha encontrado ahora que derivados del ácido hidroxámico que contienen un grupo alfa-aminoacilo tienen una acción inhibidora sobre la producción de citoquinas proinflamatorias, en particular de TNF- α .

La presente invención proporciona compuestos de fórmula (I)



en los que

Z es un alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado, arilo, arilalquilo o un residuo carbocíclico mono- di- o tricíclico saturado, insaturado o parcialmente insaturado, o un residuo heterocíclico mono-, di- o tricíclico saturado, insaturado o parcialmente insaturado que comprende uno o más heteroátomos seleccionados de entre N, S u O;

dicho alquilo C₁-C₄, arilo, arilalquilo, residuo carbocíclico o heterocíclico está opcionalmente sustituido con uno o más residuos mutuamente idénticos o diferentes, seleccionados de entre: halógeno, alquilsulfonilo, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, alcanilo, amino opcionalmente mono- o disustituido con alquilo C₁-C₄, aminoalquilo (C₁-C₄), opcionalmente mono- o disustituido con alquilo C₁-C₄, carboxi, alcóxicarbonilo C₁-C₄, mercaptoalcoxi, mercaptofenoxi, nitro, ciano, oxo, perfluoroalcoxi, perfluoroalquilo, fenilo, fenoxi, fenilalcoxi, benzoiloxi, fenilalquilo, benzoilo, fenilsulfonilo e hidroxí;

Q es arilo, arilalquilo o un residuo carbocíclico mono- di- o tricíclico saturado, insaturado o parcialmente insaturado, o un residuo heterocíclico mono-, di- o tricíclico saturado, insaturado o parcialmente insaturado que comprende uno o más heteroátomos seleccionados de entre N, S u O;

dicho arilo, arilalquilo, residuo carbocíclico o heterocíclico está opcionalmente sustituido con uno o más residuos mutuamente idénticos o diferentes, seleccionados de entre: halógeno, alquilsulfonilo, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, alcanoil, amino opcionalmente mono- o disustituido con alquilo C₁-C₄, aminoalquilo (C₁-C₄), opcionalmente mono- o disustituido con alquilo C₁-C₄, carboxi, alcoxicarbonilo C₁-C₄, mercaptoalcoxi, mercaptofenoxi, nitro, ciano, oxo, perfluoroalcoxi, perfluoroalquilo, fenilo, fenoxi, fenilalcoxi, benzoiloxi, fenilalquilo, benzoilo, fenilsulfonilo e hidroxii;

10 m y n son independientemente 0 ó 1;

X es alquilenos C₁-C₄ o está ausente;

L es fenileno, ciclohexeno o una cadena alquilo lineal o ramificada con de 2 a 6 átomos de carbono, que contiene opcionalmente uno o más dobles enlaces;

15 y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los compuestos de la invención contienen uno o más centros quirales (átomos de carbono asimétricos) y pueden por tanto existir en formas enantioméricas y/o diastereoisoméricas; todos los isómeros ópticos posibles, solos o mezclados entre sí, están dentro del ámbito de la presente invención.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I son aquellas con ácidos orgánicos e inorgánicos, tales como por ejemplo, ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, sulfúrico, fosfórico, acético, benzoico, maleico, fumárico, succínico, tartárico, cítrico, aspártico, metanosulfónico o con bases inorgánicas tales como por ejemplo, sales de sodio o potasio, o con bases orgánicas tales como, por ejemplo, lisina, arginina u otros aminoácidos o aminos.

30 Una clase de compuestos preferidos comprende compuestos de fórmula I en los que L es 1,4-fenileno, n y m son 0 y X es metileno o está ausente.

Otra clase de compuestos preferidos comprende compuestos de fórmula I en los que Z se selecciona de entre metilo, fenilo, naftilo, benzo[1,3]dioxolilo y piridilo, opcionalmente sustituidos como se estable anteriormente.

35

Otra clase de compuestos preferidos comprende compuestos de fórmula I en los que Q se selecciona de entre naftilo, indanilo, fenilo y bifenilo, opcionalmente sustituidos como se especifica anteriormente.

5 Una clase de compuestos más preferidos comprende compuestos de fórmula I en los que L es 1,4-fenileno, n y m son 0, X es metileno o está ausente y Q representa un carbociclo seleccionado de entre naftilo, indanilo, fenilo y bifenilo, opcionalmente sustituidos como se especifica anteriormente.

10 Otra clase de compuestos más preferidos comprende compuestos de fórmula I en los que L es 1,4-fenileno, n y m son 0, X es metileno o está ausente y Z se selecciona de entre alquilo C₁-C₃, fenilo, naftilo, piridilo y benzo[1,3]dioxolilo.

15 Una clase de compuestos aún más preferidos comprende compuestos de la fórmula I en los que L es 1,4-fenileno, n y m son 0, X es metileno o está ausente, Q representa un carbociclo seleccionado de entre naftilo, indanilo y fenilo y Z se selecciona de entre alquilo C₁-C₃, fenilo, naftilo, piridilo y benzo[1,3]dioxolilo.

20 Los siguientes compuestos de fórmula I son particularmente preferidos:

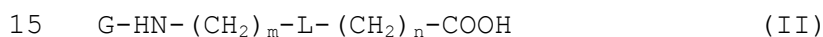
- a) 4-(2(R)-benzoilamino-3-naftalen-2-il-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- b) 4-(2(R)-acetilamino-3-naftalen-2-il-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- 25 c) 4-(2(S)-acetilamino-2-indan-2-il-acetilamino)-N-hidroxi-benzamida
- d) 4-(2(S)-acetilamino-3-naftalen-2-il-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- 30 e) 4-(2(S)-acetilamino-3-fenil-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- f) 4-(2(S)-benzoilamino-3-bifenil-4-il-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- g) 4-(2(S)-benzoilamino-3-naftalen-2-il-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- 35

- h) 4-(2(S)-benzoilamino-3-fenil-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- i) 4-[2(S)-acetilamino-3-(4-hidroxi-fenil)-propionilamino]-N-hidroxi-benzamida
- 5 j) 4-[2(S)-acetilamino-3-(4-trifluorometil-fenil)-propionilamino]-N-hidroxi-benzamida
- k) 4-[2(S)-benzoilamino-3-(4-hidroxi-fenil)-propionilamino]-N-hidroxi-benzamida
- l) 4-amino-N-[1(R)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-benzamida
- 10 m) 4-amino-N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-benzamida
- n) 5-bromo-N-[1(R)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-nicotinamida
- 15 o) 5-bromo-N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-(4-trifluorometil-fenil)-etil]-nicotinamida
- p) 5-bromo-N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-bifenil-4-il-etil]-nicotinamida
- q) 5-bromo-N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-nicotinamida
- 20 r) N-[1(R)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-amida del ácido benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico
- s) N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-(4-hidroxi-fenil)-etil]-amida del ácido benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico
- 25 t) N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-amida del ácido benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico
- u) N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-(3-fluoro-fenil)-etil]-amida del ácido benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico
- v) N-[1(R)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-amida del ácido naftaleno-2-carboxílico
- 30 w) N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-(4-trifluorometil-fenil)-etil]-amida del ácido naftaleno-2-carboxílico
- x) N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-fenil-etil]-amida del ácido naftaleno-2-carboxílico
- 35

y) N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-(bifenil-4-il)-etil]-amida del ácido naftaleno-2-carboxílico

Los compuestos de la invención se pueden preparar usando métodos que conoce el experto en la materia; por ejemplo, se pueden preparar por medio de síntesis orgánica en "fase sólida" usando una de las resinas especiales comercialmente disponibles para N-hidroxiamidas. Se puede usar para este fin una resina de poliestireno entrecruzada con divinilbenceno y funcionalizada con grupos hidroxilamina O-alquilado (resinas Wang) [cf. por ejemplo, Richter, L.S. y Desai, M.C. *Tetrahedron Letters* 38(3) pp. 321-322 (1996)]

Los grupos amino presentes en la resina se pueden acilar, en presencia de los agentes de condensación adecuados, con intermedios protegidos de fórmula



en los que L, m y n tienen los mismos significados especificados anteriormente y G es un grupo protector adecuado.

Se obtendrá una resina de fórmula



20 cuyo grupo amino, después de la eliminación del grupo protector G, se puede acilar posteriormente usando un derivado de α -aminoácido de fórmula



en el que Q, X y G tienen los significados especificados anteriormente; después de la posterior eliminación del grupo protector G, el grupo amino liberado se puede acilar definitivamente usando ácidos de fórmula,



30 donde Z tiene los significados especificados anteriormente, bien en forma activada (por ejemplo cloruros de acilo, ésteres activos, etc.) o en presencia de agentes de condensación.

Los productos de la invención se pueden liberar por último de la resina mediante tratamiento con ácidos de fuerza media,

por ejemplo, ácido trifluoroacético, filtración y purificación final opcional.

Las sales de los compuestos de fórmula I se preparan usando métodos conocidos. Los compuestos de la invención, usados a
5 concentraciones entre 1 y 1000 nM, preferiblemente entre 1 y 200 nM, producen alrededor del 50% de inhibición en la producción de TNF α por los mononucleocitos de sangre periférica estimulados con LPS según el ensayo descrito por R. de Waal Malefy, et al. (*J. Exp. Med.*, 1991, 174: 1209-1220) y se pueden usar por tanto
10 como medicinas, en particular como medicinas para el tratamiento de trastornos o afecciones patológicas que implican la sobreproducción de TNF α o de citoquinas proinflamatorias.

Los compuestos de fórmula I muestran además una actividad significativa en pruebas de citotoxicidad in vitro en la línea
15 celular de hepatoma humano Hep-G2, como se describe, por ejemplo en el ejemplo 4, esta prueba es predictiva de la actividad antitumoral in vivo. Estos compuestos se pueden usar según esto, solos o junto con otros fármacos antitumorales, no solo en el tratamiento de trastornos tumorales, sino también para el
20 tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o autoinmunes.

Según esto, la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de fórmula (I) o de las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos junto con
25 al menos un excipiente y/o soporte farmacéuticamente aceptable, tales como por ejemplo los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, XVII edición, Mack Pub., NY, USA. Tales composiciones pueden ser líquidas, adecuadas para la administración entérica o parenteral, o sólidas, por ejemplo, en
30 forma de cápsulas, comprimidos, comprimidos recubiertos, polvos o gránulos para la administración oral, o en formas adecuadas para la administración cutánea, tales como por ejemplo, cremas o pomadas, o administración por inhalación.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la
35 presente invención se pueden preparar usando métodos conocidos.

La presente invención se ilustrará a continuación con referencia a algunos ejemplos que no se deben ver en manera alguna como limitantes del ámbito de la invención.

5 EJEMPLOS

Las abreviaturas posteriores se usan en los siguientes ejemplos:

	ACN	acetonitrilo
	PVDF	difluoruro de polivilideno
10	DCM	diclorometano
	DIPEA	diisopropiletilamina
	DMF	dimetilformamida
	HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
	HATU	hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-
15		N,N,N',N'-tetrametiluronio
	TFA	ácido trifluoroacético

Método general de purificación

A menos que se establezca de otra manera, todas las purificaciones finales se realizaron por medio de un sistema de HPLC/MS preparativo de Waters con una columna Symmetry C18 5 mm 19x50mm de Waters, ajustada a un espectrómetro de masas ZQ de Waters.

25 Condiciones de operación:

Ionización centroide ES⁺, tiempo de barrido 15 minutos, barrido m/z 120-1000, diferencia de potencial del cono 15 V, temperatura de la fuente 120°C, temperatura de solvatación 250°C.

30

Eluyentes de HPLC:

A = H₂O, B = ACN, C = HCOOH al 1% en H₂O

Gradiente:

Tiempo (min)	A	B	C	Velocidad de flujo
--------------	---	---	---	--------------------

				(ml/min)
0	94%	5%	1%	20
2	94%	5%	1%	20
3	87%	12%	1%	20
8	87%	12%	1%	20
11	20%	80%	1%	20
12	94%	5%	1%	20

Se disolvió una alícuota del producto crudo a ser purificado (30-50 mg) en 0,1 ml de MeOH y se diluyó con 0,4 ml de mezcla ACN/H₂O (1:1; vol./vol.). La solución, filtrada a través de una membrana de PVDF de 0,45 mm, se inyectó en el sistema preparativo descrito anteriormente. Para cada carrera, se recogieron las fracciones correspondientes al pico asociado con el ión molecular esperado ([M+H]⁺), se combinaron y se concentraron a sequedad.

Ejemplo 1

a) 4-(2(R)-benzoilamino-3-naftalen-2-il-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida

Paso A

Se añadió una mezcla de HOAt (5,1 g; 37,5 mmoles) y HATU (14,3 g; 37,5 mmoles) en DMF anhídrido (20 ml) a una solución de ácido 4-(9H-fluoren-9-il-metoxicarbonilamino)-benzoico (13,5 g; 37,5 mmoles) en DMF anhídrido (25 ml) y después se añadió diisopropiletilamina (13 ml; 75 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, después se transfirió a un reactor que contenía una resina de poliestireno de tipo Wang funcionalizada con hidroxilamina (9 g; 9,36 mmoles) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La resina se filtró y se lavó, en sucesión, con DMF (5x50 ml), DCM (4x50 ml), MeOH (3x50 ml) y DCM (5x50 ml), por último se filtró y se secó al vacío.

Paso B

Se transfirió una alícuota de la resina obtenida en A (150 mg) a un reactor de síntesis en fase sólida y se volvió a hinchar con una solución al 20% de piperidina en DMF (2 ml).
5 Después de agitar a temperatura ambiente durante una hora, la resina se filtró y se lavó con DMF (5x2 ml).

Paso C

Se añadieron HATU (237 mg, 0,62 mmoles), HOAt (85 mg, 0,62 mmoles) y DIPEA (0,217 ml; 1,24 mmoles) a una solución de (9H-fluoren-9-il-metoxicarbonil-D-(2)-naftilalanina (Fmoc-D(2)Nal-OH; 273 mg, 0,62 mmoles) en DMF (1,5 ml). La solución (~2 ml) se añadió al reactor que contenía la resina obtenida en B y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La resina se
15 filtró y se lavó, en sucesión, con DMF (5x2 ml), DCM (2x2 ml), MeOH (2x2 ml), DCM (2x2 ml) y por último se filtró al vacío.

Paso D

La resina obtenida en C se trató con piperidina al 20% en
20 DFM, como se describe en el paso B.

Paso E

Se añadieron HATU (237 mg, 0,62 mmoles), HOAt (85 mg, 0,62 mmoles) y DIPEA (0,217 ml; 1,24 mmoles) a una solución de ácido benzoico (76 mg, 0,62 mmoles) en DMF (1,5 ml). La solución (~2 ml) se añadió al reactor que contenía la resina obtenida en D y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La resina se filtró y se lavó, en sucesión, con DMF (5x2 ml), DCM (2x2 ml), MeOH (2x2 ml), DCM (2x2 ml) y por último se filtró al vacío.

30

Paso F

La resina obtenida como se describe en el punto precedente se volvió a hinchar en una solución al 50% de TFA en DCM (2 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante una hora, después se
35 filtró y la solución se evaporó a sequedad. El residuo se resuspendió con t-BuOMe y se evaporó cinco veces más. El residuo

obtenido se purificó por medio de HPLC/MS preparativa según el método general previamente descrito.

Producto obtenido: 16,9 mg; $[M+H]^+ = 454,3$ (calculada 454,2)

5 **Ejemplo 2**

Se prepararon los siguientes productos usando el procedimiento descrito en el ejemplo 1:

- b) 4-(2(R)-acetilamino-3-naftalen-2-il-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- 10 c) 4-(2(S)-acetilamino-2-indan-2-il-acetilamino)-N-hidroxi-benzamida
- d) 4-(2(S)-acetilamino-3-naftalen-2-il-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- e) 4-(2(S)-acetilamino-3-fenil-propionilamino)-N-hidroxi-
15 benzamida
- f) 4-(2(S)-benzoilamino-3-bifenil-4-il-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- g) 4-(2(S)-benzoilamino-3-naftalen-2-il-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- 20 h) 4-(2(S)-benzoilamino-3-fenil-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- i) 4-[2(S)-acetilamino-3-(4-hidroxi-fenil)-propionilamino]-N-hidroxi-benzamida
- j) 4-[2(S)-acetilamino-3-(4-trifluorometil-fenil)-
25 propionilamino]-N-hidroxi-benzamida
- k) 4-[2(S)-benzoilamino-3-(4-hidroxi-fenil)-propionilamino]-N-hidroxi-benzamida
- l) 4-amino-N-[1(R)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-benzamida
- 30 m) 4-amino-N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-benzamida
- n) 5-bromo-N-[1(R)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-nicotinamida
- o) 5-bromo-N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-(4-
35 trifluorometil-fenil)-etil]-nicotinamida

- p) 5-bromo-N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-bifenil-4-il-etil]-nicotinamida
- q) 5-bromo-N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-nicotinamida
- 5 r) N-[1(R)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-amida del ácido benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico
- s) N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-(4-hidroxi-fenil)-etil]-amida del ácido benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico
- t) N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-
10 etil]-amida del ácido benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico
- u) N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-(3-fluoro-fenil)-etil]-amida del ácido benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico
- v) N-[1(R)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-amida del ácido naftaleno-2-carboxílico
- 15 w) N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-(4-trifluorometil-fenil)-etil]-amida del ácido naftaleno-2-carboxílico
- x) N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-fenil-etil]-amida del ácido naftaleno-2-carboxílico
- 20 y) N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-(bifenil-4-il)-etil]-amida del ácido naftaleno-2-carboxílico

Ejemplo 3

INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TNF α - DETERMINACIÓN IN VITRO

25 Los compuestos se disolvieron en DMSO a una concentración final de 10 mM.

Las soluciones para el ensayo se prepararon diluyendo las soluciones madre en RPMI 1640 con la adición de SFT al 1% y DMSO al 0,01% y se filtraron con de filtros de 0,2 μ m.

30 Se obtuvieron mononucleocitos de sangre periférica a partir de sangre de donantes sanos mediante separación en un gradiente de Ficoll-Hypaque [C.G. Figdor, et al. *Blood*, 1982, 60: 46-53]. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, a una concentración de aproximadamente 500.000 células por pocillo,
35 resuspendidas en RPMI 1640 que contenía SFT al 1% y se incubaron

a 37°C en presencia de diferentes concentraciones (desde 10⁻⁶ hasta 10⁻¹¹ M) de los compuestos a ser investigados.

Después de 1 hora, se añadió LPS (a una concentración final de 10 ng/ml; obtenido de E. coli 055:B5) y las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas adicionales. Al final de este periodo, se recogieron los sobrenadantes y se usaron para la determinación del contenido de TNFα por medio de ELISA (kit de ELISA DuoSet; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Se calculó la concentración de TNFα usando una curva de calibración y los valores de IC₅₀ (la concentración que produce alrededor del 50% de inhibición de la producción de la citoquina) se calcularon de la curva obtenida representando los valores del porcentaje de inhibición para cada concentración individual del compuesto en investigación.

15

Tabla 1: Inhibición de la producción de TNFα por monocitos humanos estimulados con LPS.

Ejemplo	IC ₅₀ (nM)	Ejemplo	IC ₅₀ (nM)
1a	3,0	2n	6,8
2b	51,8	2o	200,0
2c	55,9	2p	42,0
2d	4,4	2q	22,9
2e	12,5	2r	1,7
2f	72,1	2s	1000,0
2g	6,1	2t	4,8
2h	11,3	2u	6,8
2i	13,3	2v	16,8
2j	4,6	2w	23,7
2k	148,4	2x	8,6
2l	29,6	2y	21,3
2m	26,7		

Ejemplo 4

20 Citotoxicidad hacia células tumorales *in vitro*

Se evaluó la citotoxicidad de algunos compuestos descritos en los ejemplos precedentes *in vitro* en la línea celular de hepatoma humano Hep-G2, por medio de un método colorimétrico

comercial (Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay - Promega); el método determina el número de células viables en base a su capacidad de metabolizar una sal de tetrazolio que produce formazano. La cantidad de formazano
5 producida es proporcional al número de células viables.

Las células Hep-G2 se distribuyen en microplacas de 96 pocillos a una densidad de 4×10^4 células/pocillo (100 μ l), en medio M199 que contiene suero bovino fetal al 10% y suplementos (medio completo).

10 Después de incubar 24 horas (37°C, CO₂ al 5%, humedad del 90%), las células se lavan una vez y el medio se repone con 200 μ l de medio completo que contiene las sustancias a ser probadas a la concentración final de 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} M. La prueba se realiza en triplicado.

15 Las placas se incuban durante 48 horas más, al final de las cuales se retiran 100 μ l de medio y se añaden 20 μ l/pocillo de solución de tinción según las instrucciones del suministrador. Se lee la densidad óptica ($\lambda = 490$ nm) después de 1 hora de incubación a 37°C usando un lector de placas (Victor2 - Wallac
20 Perkin Elmer).

Los resultados, que demuestran la actividad antitumoral de la clase de compuestos de fórmula I, se exponen como el porcentaje de inhibición de la formación de formazano relativo al control. La siguiente tabla muestra los valores obtenidos a
25 las concentraciones de 10^{-5} y 10^{-6} M.

Tabla 2: Porcentaje de citotoxicidad hacia células Hep-G2

Ejemplo	Citotoxicidad a 10^{-6} M	Citotoxicidad a 10^{-5} M	Ejemplo	Citotoxicidad a 10^{-6} M	Citotoxicidad a 10^{-5} M
1a	22,6%	75,2%	2m	24,5%	72,4%
2b	10,6%	48,3%	2n	15,9%	68,2%
2c	28,5%	78,3%	2o	34,8%	72,4%
2d	9,6%	56,2%	2p	10,5%	61,7%
2e	13,3%	17,1%	2q	11,7%	53,9%
2f	22,7%	81,6%	2r	16,6%	72,5%
2g	43,2%	76,5%	2t	48,5%	79,3%

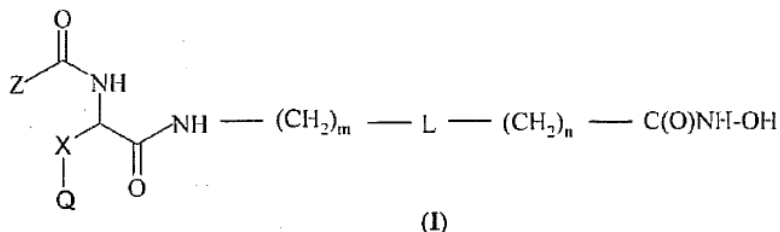
ES 2 350 585 T3

15

2h	31,2%	77,4%	2u	12,9%	62,9%
2i	15,7%	12,2%	2v	11,8%	69,4%
2j	15,8%	39,3%	2w	25,3%	65,7%
2k	27,7%	54,4%	2x	15,3%	77,3%
2l	14,4%	61,9%	2y	20,4%	73,7%

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



5 en el que

Z es un alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado, arilo, arilalquilo o un residuo carbocíclico mono- di- o tricíclico saturado, insaturado o parcialmente insaturado, o un residuo heterocíclico mono-, di- o tricíclico saturado, insaturado o parcialmente insaturado que comprende uno o más heteroátomos seleccionados de entre N, S u O;

dicho alquilo C₁-C₄, arilo, arilalquilo, residuo carbocíclico o heterocíclico está opcionalmente sustituido con uno o más residuos mutuamente idénticos o diferentes, seleccionados de entre: halógeno, alquilsulfonilo, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, alcanoil, amino opcionalmente mono- o disustituido con alquilo C₁-C₄, aminoalquilo (C₁-C₄), opcionalmente mono- o disustituido con alquilo C₁-C₄, carboxi, alcoxicarbonilo C₁-C₄, mercaptoalcoxi, mercaptofenoxi, nitro, ciano, oxo, perfluoroalcoxi, perfluoroalquilo, fenilo, fenoxi, fenilalcoxi, benzoiloxi, fenilalquilo, benzoilo, fenilsulfonilo e hidroxí;

Q es arilo, arilalquilo o un residuo carbocíclico mono- di- o tricíclico saturado, insaturado o parcialmente insaturado, o un residuo heterocíclico mono-, di- o tricíclico saturado, insaturado o parcialmente insaturado que comprende uno o más heteroátomos seleccionados de entre N, S u O;

dicho arilo, arilalquilo, residuo carbocíclico o heterocíclico está opcionalmente sustituido con uno o más residuos mutuamente idénticos o diferentes, seleccionados de

entre: halógeno, alquilsulfonilo, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, alcanilo, amino opcionalmente mono- o disustituido con alquilo C₁-C₄, aminoalquilo (C₁-C₄), opcionalmente mono- o disustituido con alquilo C₁-C₄,
5 carboxi, alcoxycarbonilo C₁-C₄, mercaptoalcoxi, mercaptofenoxi, nitro, ciano, oxo, perfluoroalcoxi, perfluoroalquilo, fenilo, fenoxi, fenilalcoxi, benzoiloxi, fenilalquilo, benzoilo, fenilsulfonilo e hidroxii;

m y n son independientemente 0 ó 1;

10 X es alquilenos C₁-C₄ o está ausente;

L es fenileno, ciclohexileno o una cadena alquilo lineal o ramificada con de 2 a 6 átomos de carbono, que contiene opcionalmente uno o más dobles enlaces;

y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo;

15 siempre que cuando Q es indol L es 1,4-fenileno, m es 0 y n es 0.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que L es 1,4-fenileno, n y m son 0 y X es metileno o está ausente.

20

3. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que Z se selecciona de entre metilo, fenilo, naftilo, benzo[1,3]dioxolilo y piridilo, opcionalmente sustituidos como se expone en la reivindicación 1.

25

4. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que Q se selecciona de entre naftilo, indanilo, fenilo y bifenilo opcionalmente sustituidos como se expone en la reivindicación 1.

30

5. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que L es 1,4-fenileno, n y m son 0, X es metileno o está ausente y Q representa un carbociclo seleccionado de entre naftilo, indanilo, fenilo y bifenilo, opcionalmente sustituidos como se expone en la reivindicación 1.

35

6. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que L es 1,4-fenileno, n y m son 0, X es metileno o está ausente y Z se selecciona de entre alquilo C₁-C₃, fenilo, naftilo, piridilo y benzo[1,3]dioxolilo, opcionalmente sustituidos como se expone en la reivindicación 1.
7. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que L es 1,4-fenileno, n y m son 0, X es metileno o está ausente, Q representa un carbociclo seleccionado de entre naftilo, indanilo, fenilo y bifenilo y Z se selecciona de entre alquilo C₁-C₃, fenilo, naftilo, piridilo y benzo[1,3]dioxolilo, opcionalmente sustituidos como se expone en la reivindicación 1.
8. Un compuesto de fórmula (I), como se define en la reivindicación 1, seleccionado de entre:
- 4-(2(R)-benzoilamino-3-naftalen-2-il-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- 4-(2(R)-acetilamino-3-naftalen-2-il-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- 4-(2(S)-acetilamino-2-indan-2-il-acetilamino)-N-hidroxi-benzamida
- 4-(2(S)-acetilamino-3-naftalen-2-il-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- 4-(2(S)-acetilamino-3-fenil-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- 4-(2(S)-benzoilamino-3-bifenil-4-il-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- 4-(2(S)-benzoilamino-3-naftalen-2-il-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- 4-(2(S)-benzoilamino-3-fenil-propionilamino)-N-hidroxi-benzamida
- 4-[2(S)-acetilamino-3-(4-hidroxi-fenil)-propionilamino]-N-hidroxi-benzamida
- 4-[2(S)-acetilamino-3-(4-trifluorometil-fenil)-propionilamino]-N-hidroxi-benzamida

- 4-[2(S)-benzoilamino-3-(4-hidroxi-fenil)-propionilamino]-N-hidroxi-benzamida
- 4-amino-N-[1(R)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-benzamida
- 5 4-amino-N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-benzamida
- 5-bromo-N-[1(R)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-nicotinamida
- 5-bromo-N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-(4-trifluorometil-fenil)-etil]-nicotinamida
- 10 5-bromo-N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-bifenil-4-il-etil]-nicotinamida
- 5-bromo-N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-nicotinamida
- 15 N-[1(R)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-amida del ácido benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico
- N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-(4-hidroxi-fenil)-etil]-amida del ácido benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico
- N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-amida del ácido benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico
- 20 N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-(3-fluoro-fenil)-etil]-amida del ácido benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico
- N-[1(R)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-naftalen-2-il-etil]-amida del ácido naftaleno-2-carboxílico
- 25 N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-(4-trifluorometil-fenil)-etil]-amida del ácido naftaleno-2-carboxílico
- N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-fenil-etil]-amida del ácido naftaleno-2-carboxílico
- 30 N-[1(S)-(4-hidroxicarbamoil-fenilcarbamoil)-2-(bifenil-4-il)-etil]-amida del ácido naftaleno-2-carboxílico
9. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como medicina.

10. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de medicinas con actividad antiinflamatoria.
- 5 11. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de medicinas útiles en trastornos caracterizados por la sobreproducción de TNF α u otras citoquinas proinflamatorias.
- 10 12. Uso de los compuestos según las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de medicinas con actividad antitumoral.
13. Uso de los compuesto según las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de medicinas para el tratamiento y/o
15 prevención de trastornos neurodegenerativos o autoinmunes.
14. Composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los compuestos de fórmula (I) como se define en la reivindicación 1, o las
20 sales farmacéuticamente aceptables del mismo junto con al menos un excipiente y/o soporte farmacéuticamente aceptable.