



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 857**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07D 263/56 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 31/423 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03813782 .4**

96 Fecha de presentación : **19.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1587821**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

54

Título: **Composiciones y métodos para estabilizar la transtiretina e inhibir el mal repliegamiento de la transtiretina.**

30

Prioridad: **19.12.2002 US 435079 P**
24.04.2003 US 465435 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73

Titular/es: **THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE**
10550 North Torrey Pines Road
La Jolla, California 92037, US

72

Inventor/es: **Kelly, Jeffrey, W.;**
Powers, Evan T. y
Razavi, Hossein

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para estabilizar la transtiretina e inhibir el mal repliegamiento de la transtiretina.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere, en general, a un plegamiento anómalo de proteínas. Más particularmente, esta invención proporciona composiciones y métodos para estabilizar la transtiretina e inhibir el plegamiento anómalo de la transtiretina y composiciones para tratar enfermedades de amiloides asociadas con la misma.

10 **Antecedentes de la invención**

La transtiretina (TTR) es una proteína homotetramérica de 55 kDa presente en suero y en el líquido cefalorraquídeo. La función de la TTR es transportar L-tiroxina (T_4) y proteína de unión a holo-retinol (RBP). La TTR es una de las más de 20 proteínas amiloidogénicas no homólogas que pueden transformarse en fibrillas y otros agregados ocasionando una patología en seres humanos. Estas enfermedades no parecen producirse por una pérdida de función debida a la agregación de proteínas, sino que más bien, la agregación parece producir una disfunción neuronal/celular por un mecanismo que aún no está claro.

En condiciones desnaturalizantes, la disociación del tetrámero de TTR de tipo silvestre limitante de la velocidad y el rápido plegamiento anómalo de los monómeros facilita el ensamblaje anómalo de amiloide, que produce supuestamente la amiloidosis sistémica senil (SSA). La disociación y plegamiento anómalo de una de las más de ochenta variantes de TTR produce la polineuropatía amiloide familiar (FAP) y la cardiomiopatía amiloide familiar (FAC).

El tetrámero de TTR tiene dos sitios de unión a T_4 simétricos C_2 . Se sabe que la unión cooperativa negativamente de T_4 estabiliza el tetrámero de TTR e inhibe la formación de fibrillas amiloides. Desafortunadamente, menos de 1% de TTR tiene T_4 unida en el suero humano, porque la globulina de unión al tiroides (TBG) tiene una afinidad un orden de magnitud mayor por T_4 que la TTR. Además, la concentración sérica de T_4 es relativamente baja ($0,1 \mu M$) en comparación con la de TTR ($3,6-7,2 \mu M$).

30 **Compendio de la invención**

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

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

La solicitud describe un método para seleccionar un compuesto que prevenga o reduzca la disociación de un tetrámero de transtiretina. El método puede incluir las siguientes etapas: poner en contacto un tetrámero de transtiretina con un compuesto candidato; y determinar si el compuesto candidato aumenta la energía de activación asociada con la disociación del tetrámero de transtiretina, previniendo de esta forma o reduciendo la disociación del tetrámero de transtiretina. El método opcionalmente puede incluir una etapa adicional de medir la capacidad del compuesto candidato para inhibir la formación de fibrillas.

La solicitud describe un método que incluye una etapa para determinar si el compuesto previene la disociación del tetrámero de transtiretina por medio de la desestabilización del estado de transición de disociación del tetrámero de transtiretina. La solicitud también describe un método que incluye la etapa de determinar si el compuesto previene la disociación del tetrámero de transtiretina por medio de la estabilización del tetrámero de transtiretina en lugar del estado de transición de disociación.

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

Opcionalmente, una molécula pequeña puede tener un peso molecular menor de 1500 y unirse a la transtiretina cooperativamente de forma positiva o no y conferir una energía de unión $> 2,3$ kcal/mol. La molécula pequeña puede presentar valores de K_{d1} y $K_{d2} < 100$ nM (por ejemplo < 10 nM) y/o una elevada concentración plasmática, contribu-

yendo ambas cosas a una estabilización de la proteína superior a 2,0 kcal/mol. La molécula pequeña también puede reducir el rendimiento de amiloidosis y reducir la velocidad de amiloidogénesis mediada por ácidos o mediada por MeOH y/o reducir la velocidad de disociación de TTR mediada por urea.

- 5 La solicitud describe una molécula pequeña que incluye bifenilaminas, bifenilos, éteres de oxima, benzazoles u otras estructuras compuestas de dos anillos aromáticos donde uno lleva grupos hidrófilos tales como un ácido o un fenol y el otro lleva grupos hidrófobos tales como halógenos o alquilos. La molécula pequeña de la invención incluye benzazoles.
- 10 La solicitud describe un compuesto candidato, siendo el compuesto candidato un biarilo donde un anillo lleva un uno o más sustituyentes hidrófilos y el otro tiene sustituyentes hidrófobos o un biarilo donde los dos anillos llevan al menos un sustituyente hidrófilo. El grupo hidrófilo puede ser un fenol, un COOH, un alcohol bencílico, un ácido borónico o un éster, un tetrazol, un aldehído o un aldehído hidratado o un grupo funcional que sirve como donador o aceptor de enlaces de H en la proteína directamente o a través de un enlace de H mediado por agua. El biarilo puede ser un biarilo simétrico que tiene los dos anillos sustituidos con funcionalidad hidrófila incluyendo fenoles, carboxilatos y alcoholes, y en algunos casos halógenos para rellenar los huecos de unión a halógeno de la TTR, por ejemplo, un biarilo con la siguiente funcionalidad: 3-Cl, 4-OH, 5-Cl y 3'-Cl, 4'-OH, 5'-Cl. En una realización, al menos un anillo del biarilo está sustituido con sustituyentes 2,4-difluoro o 3,5-difluoro o 2,6-difluoro o 3,5-dicloro o 3-Cl, 4-OH, 5-Cl o 3-F, 4-OH, 5-F, 3-COOH, 4-OH o 3-OH o 3-COOH o 4-COOH o 3-CH₂OH o 4-CH₂OH. Un biarilo ilustrativo es un Bifenilo policlorado, por ejemplo, un bifenilo policlorado hidroxilado donde al menos un anillo lleva sustituyentes OH y/o Cl incluyendo 3-Cl, 4-OH, 5-Cl o 2-Cl, 3-Cl, 4-OH, 5-Cl o 3,4-DiCl o 2,3,4-tricloro o 2,3,4,5-tetracloro. En el compuesto candidato pueden usarse halógenos distintos de cloruro. El compuesto candidato de la presente invención es un benzoxazol.
- 25 La solicitud describe un compuesto candidato que es un análogo de diflunisal. En la presente memoria se describe la estructura del diflunisal así como una diversidad de análogos de diflunisal. El análogo de diflunisal puede tener opcionalmente una actividad AINE reducida o ausente en comparación con el diflunisal. Por ejemplo, el análogo de diflunisal puede tener una actividad inhibidora de la ciclooxigenasa reducida o ausente en comparación con el diflunisal.
- 30 La solicitud describe un método que incluye una etapa adicional de determinar si el análogo de diflunisal presenta actividad como AINE. Por ejemplo, el método puede incluir una etapa para determinar si el análogo de diflunisal presenta actividad inhibidora de la ciclooxigenasa.
- 35 La transtiretina usada en los métodos de selección puede ser transtiretina de tipo silvestre o una transtiretina mutante, tal como una transtiretina mutante natural asociada causalmente con la incidencia de una enfermedad amiloide por transtiretina tal como la polineuropatía amiloide familiar o la cardiomiopatía amiloide familiar. Las transtiretinas mutantes naturales ilustrativas incluyen, pero sin limitación, V122I, V30M, L55P (la nomenclatura de mutantes describe la sustitución en la posición de aminoácido mencionada con respecto al tipo silvestre; véase, por ejemplo Saraiva *et al.* (2001) Hum. Mut. 17-493-503).
- 40 La invención también proporciona el uso de los compuestos de la invención para la preparación de un medicamento para estabilizar la transtiretina en un tejido o un fluido biológico, y que de esta forma inhibe el plegamiento anómalo. En general, el uso del medicamento comprende administrar al tejido o fluido biológico una composición que comprende una cantidad estabilizadora de un compuesto descrito en la presente memoria que se une a transtiretina y previene la disociación del tetrámero de transtiretina por estabilización cinética del estado nativo del tetrámero de transtiretina.
- 45 De esta manera, los métodos que estabilizan la transtiretina en un tejido enfermo mejoran el plegamiento anómalo y reducen los síntomas de una enfermedad asociada y, dependiendo de la enfermedad, pueden contribuir a la curación de la enfermedad. La invención contempla la inhibición del plegamiento anómalo de transtiretina en un tejido y/o dentro de una célula. El grado de plegamiento anómalo y, por lo tanto, el grado de inhibición conseguida por los presentes métodos puede evaluarse por una diversidad de métodos tales como los descritos en los ejemplos.
- 55 Por consiguiente, en otro aspecto, la invención incluye el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que previene la disociación de un tetrámero de transtiretina mediante la estabilización cinética del estado nativo del tetrámero de transtiretina, para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad amiloide por transtiretina en un sujeto al que se le ha diagnosticado una enfermedad amiloide por transtiretina.
- 60 La solicitud describe el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de diflunisal (por ejemplo, un análogo de diflunisal que previene la disociación de un tetrámero de transtiretina) que previene la disociación de un tetrámero de transtiretina, para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad amiloide por transtiretina, adecuada para administrarse a un sujeto al que se le ha diagnosticado una enfermedad amiloide por transtiretina. El análogo de diflunisal opcionalmente puede tener una actividad AINE reducida o ausente (por ejemplo, una actividad inhibidora de ciclooxigenasa) en comparación con el diflunisal.
- 65 La solicitud también describe el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un bifenilo policlorado (por ejemplo, un bifenilo policlorado que previene la disociación de un tetrámero de transtiretina) que previene la disociación

de un tetrámero de transtiretina, para la preparación de un medicamento para tratar la enfermedad amiloide por transtiretina, adecuada para administrarse a un sujeto al que se le ha diagnosticado enfermedad amiloide por transtiretina. El bifenilo policlorado puede ser un bifenilo policlorado hidroxilado.

En una realización particular, la invención se refiere al uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un benzoxazol (por ejemplo, un benzoxazol que previene la disociación de un tetrámero de transtiretina) que previene la disociación de un tetrámero de transtiretina, para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad amiloide por transtiretina, adecuada para administrarse a un sujeto al que se le ha diagnosticado una enfermedad amiloide por transtiretina.

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

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

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

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

Los compuestos y el uso para la preparación de un medicamento descrito en la presente memoria proporcionan ventajas significativas con respecto a las opciones de tratamiento disponibles actualmente para la amiloidosis por TTR. La amiloidosis por TTR típicamente conduce a la muerte en 10 años, y hasta hace poco se consideraba incurable. El trasplante hepático es un medio eficaz para reemplazar el alelo asociado con la enfermedad por un alelo WT en los casos familiares, ya que el hígado típicamente es la fuente de TTR amiloidogénica. Aunque el trasplante hepático es eficaz como forma de terapia génica, no carece de problemas. El trasplante se complica por la necesidad de una cirugía invasiva tanto para el receptor como para el donante, una terapia inmunosupresora a largo plazo después del trasplante, escasez de donantes, su alto coste y el gran número de pacientes con amiloidosis TTR que no son buenos candidatos debido a la progresión de su enfermedad. Desafortunadamente, la amiloidosis cardíaca progresa en algunos pacientes familiares incluso después de trasplante hepático porque con frecuencia sigue depositándose la TTR WT. Tampoco se alivia la deposición de TTR en el sistema nervioso central (SNC) por medio de un trasplante, ya que se sintetiza en el plexo coroides. El trasplante no es una opción viable para la enfermedad TTR más prevalente, la amiloidosis sistémica senil (SSA), que afecta a aproximadamente 25% de los pacientes con más de 80 años debido a la deposición de TTR WT.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que se entienden comúnmente por un especialista habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, más adelante se describen los métodos y materiales preferidos.

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

Breve descripción de los dibujos

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

Las Figs. 2A y 2B son gráficos que representan la evolución a lo largo del tiempo del desplegamiento de transtiretina en presencia de diferentes inhibidores. Las Figs. 3A y 3B son gráficos que representan la evolución a lo largo del tiempo de la formación de fibrillas en presencia de diferentes inhibidores.

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

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

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

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

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

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

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

Descripción detallada de la invención

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

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

Síntesis de Análogos de Diflunisal que Inhiben la Formación de Fibrillas Amiloides de Transtiretina

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

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

Las subunidades del tetrámero de TTR están relacionadas por tres ejes C_2 perpendiculares. La Fig. 1 es una representación esquemática del sitio de unión a T4 de TTR, que demuestra el modo de unión directo donde el carboxilato inhibidor participa en las interacciones electrostáticas con el amonio ϵ de Lys 15 y 15'. Los dos sitios de unión a T4 equivalentes creados por la interfaz estructural cuaternaria se intercambian por los dos ejes C_2 que son perpendiculares al eje de simetría C_2 cristalográfico. Cada sitio de unión a T4 puede dividirse en un hueco de unión interna y externa. Véase, por ejemplo, Blake, C.C.; Oatley, S.J. *Nature*, 1977, 268, 115-20, que se incorpora como referencia en su totalidad. El hueco de unión interno comprende un par de huecos de unión a halógeno (HBP), denominados HBP3 y 3', formados por las cadenas laterales de Leu 17, Ala 108, Val 121 y Thr 119. La convergencia de cuatro cadenas laterales de Ser 117 a partir de cada subunidad define la región más interna y la interfaz entre los dos sitios de unión idénticos. Los grupos hidroxilo de Ser 117 pueden servir como donadores o aceptores de enlaces de hidrógeno para la funcionalidad complementaria en el compuesto (por ejemplo, un inhibidor de la formación de amiloides) o mediar interacciones electrostáticas con el compuesto a través de moléculas de agua. El sitio de unión exterior se compone de HBP 1 y 1', mientras que HBP 2 y 2' se colocan en la interfaz de los huecos de unión interno y externo. Los grupos amonio ϵ de la Lys 15 y 15' definen los límites más externos del hueco de unión externo, permitiendo interacciones electrostáticas con sustituyentes aniónicos en un compuesto. Muchos de los compuestos estabilizadores de tetrámeros de TTR se unen en el modo de unión directo, donde un sustituyente aniónico en el anillo de fenilo hidrófilo colocado en el hueco de unión exterior encaja en una interacción electrostática con los grupos amonio ϵ de la Lys 15. En el modo de unión directo, un anillo de fenilo hidrófobo (a menudo sustituido con halógenos) puede ocupar el hueco de unión interno. Sin embargo, también se han observado ejemplos de unión en la orientación opuesta (el modo de unión inversa). En el modo de unión inversa, un anillo aromático hidrófilo puede colocarse en el hueco interno, permitiendo que un carboxilato forme un enlace de hidrógeno con Ser 117 y Ser 117'. En el modo de unión inversa, en el hueco exterior puede colocarse un anillo hidrófobo sustituido con halógeno.

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

El compuesto puede tener la fórmula:



en la que Ar^1 es un grupo arilo o heteroarilo, donde Ar^1 está opcionalmente sustituido con uno o más de: halo, $-\text{R}^1$, $-\text{OR}^1$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^1$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}^1$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NHR}^1$, $-\text{SR}^1$, $-\text{S}(=\text{O})\text{R}^1$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{R}^1$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^1$, $-\text{CO}_2\text{R}^1$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHR}^1$, $-\text{NR}^1\text{R}^2$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{R}^1$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NHR}^1$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{OR}^1$ o $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{R}^1$.

Ar^2 es un grupo arilo o heteroarilo, donde Ar^2 está opcionalmente sustituido con uno o más de: halo, $-\text{R}^1$, $-\text{OR}^1$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^1$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}^1$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NHR}^1$, $-\text{SR}^1$, $-\text{S}(=\text{O})\text{R}^1$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{R}^1$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^1$, $-\text{CO}_2\text{R}^1$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHR}^1$, $-\text{NR}^1\text{R}^2$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{R}^1$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NHR}^1$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{OR}^1$ o $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{R}^1$.

Cada R^1 es, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, heterocicloalqueno, alquino, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir.

Cada R^2 es, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alqueno, cicloalqueno, heterocicloalqueno, alquino, arilo o heteroarilo sustituido o sin sustituir.

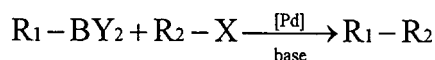
En algunas circunstancias, Ar^1 puede ser fenilo sustituido o sin sustituir. Ar^2 puede ser independientemente fenilo sustituido o sin sustituir. Ar^1 y Ar^2 pueden ser simultáneamente fenilo sustituido o sin sustituir. Los sustituyentes pueden ser flúor, cloro, hidroxilo, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CO}_2\text{Me}$, $-\text{OMe}$, $-\text{CH}_2\text{OH}$ o formilo. R^1 puede ser alquilo inferior.

Los compuestos pueden usarse en forma de sales farmacéuticamente aceptables obtenidas a partir de ácidos y bases inorgánicas u orgánicas. Entre estas sales de ácidos se incluyen las siguientes: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, diglucuronato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato,

hidrocloruro, hidrobromuro, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenil-propionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Las sales de bases incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos tales como sales sódicas y potásicas, sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas tales como sales de dicitohexilamina y N-metil-D-glucamina, y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina y similares. Además, los grupos básicos que contienen nitrógeno pueden estar cuaternizados con agentes tales como haluros de alquilo inferior tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo tales como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo tales como bromuros de bencilo y fenetilo y otros. De esta manera, se obtienen productos solubles o dispersables en agua o aceite.

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

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



$BY_2 = B(OH)_2, B(OR)_2, 9\text{-BBN}, B(CHCH_3CH(CH_3)_2)_2$

$X = I, Br, Cl, OSO_2(C_nF_{2n+1}), n = 0, 1, 4$

$R_1 =$ arilo, alquenilo, alquilo

$R_2 =$ arilo, alquenilo, bencilo, alilo, alquilo

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

Composiciones Farmacéuticas

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

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

ES 2 312 857 T3

sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina.

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

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

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

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

La aplicación tópica para el tracto intestinal inferior puede realizarse en una formulación de supositorio rectal (véase anteriormente) o en una formulación de enema adecuada. También pueden usarse parches transdérmicos tópicamente.

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

Para el uso oftálmico, las composiciones farmacéuticas pueden formularse como suspensiones micronizadas en solución salina isotónica de pH ajustado o, preferiblemente, como soluciones en solución salina estéril isotónica de pH ajustado, con o sin un conservante tal como cloruro de bencilalconio. Como alternativa, para usos oftálmicos, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una pomada tal como vaselina.

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

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

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

A continuación se proporcionan ejemplos de la práctica de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Prevención de la Enfermedad Amiloide por Transtiretina Cambiando la Energía de Plegamiento Anómalo de la Proteína

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

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

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

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

con anticuerpo, sobre la que se pasó tampón acuoso a 5,0 ml/min para evaluar velocidades de disociación eficaces de 6 a 10. Los mejores inhibidores fueron los que tenían las menores velocidades de disociación aparentes.

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

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

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

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

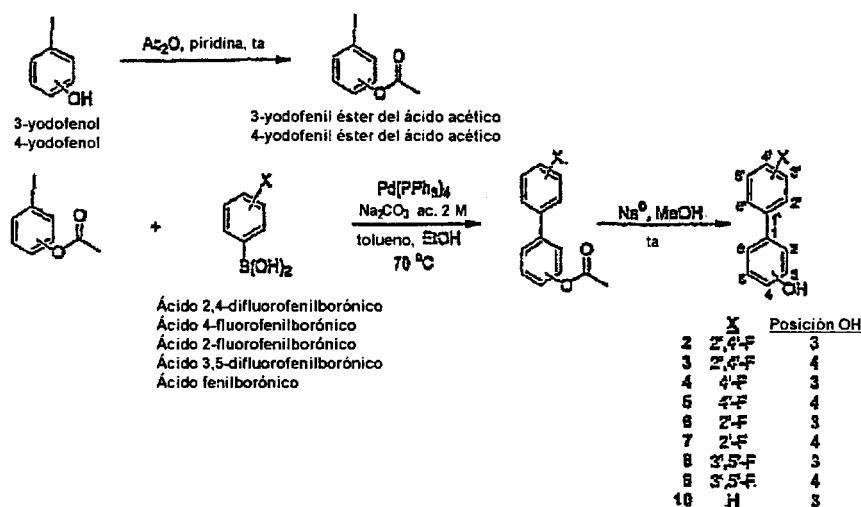
Ejemplo 2

Los análogos de Diflunisal Estabilizan el Estado Nativo de la Transtiretina y son Inhibidores de la Formación de Fibrillas de Amiloides de Transtiretina

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

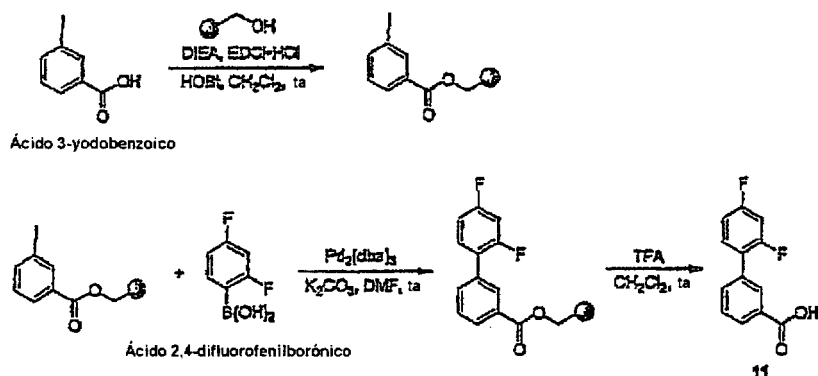
Se sintetizaron análogos de diflunisal usando acoplamiento de Suzuki mediado por Pd entre un haluro de arilo y un ácido aril borónico. La síntesis de los análogos 2-10 se consiguió por acetilación de 3- ó 4-yodofenol con anhídrido acético y piridina, seguido de acoplamiento de Suzuki con el ácido fluorofenil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

Esquema 1



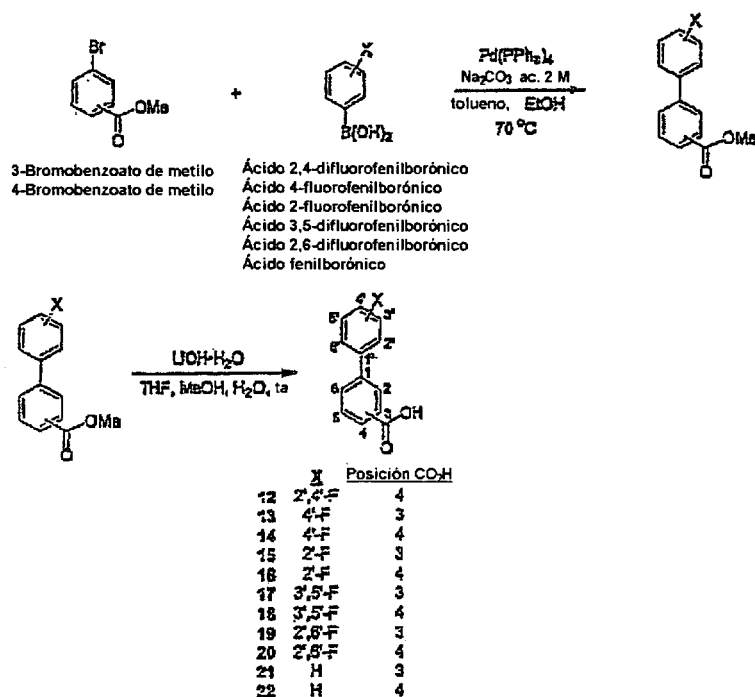
El análogo de diflunisal 11 se sintetizó usando métodos de fase sólida, como se muestra en el Esquema 2. Se acopló ácido 3-yodobenzoico a resina de Wang mediante un enlazador de éster, produciendo el yoduro de bencilo unido a resina, que después se acopló con el ácido 2,4-difluorofenilborónico y se escindió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

Esquema 2



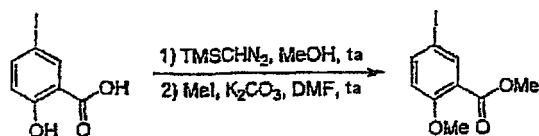
Los sustratos que contienen el carboxilato 12-22 se reunieron por acoplamiento de 3-bromobenzoato de metilo o 4-bromobenzoato de metilo (ambos disponibles en el mercado) con el ácido fluorofenilborónico apropiado utilizando condiciones de acoplamiento de Suzuki (véase anteriormente), como se muestra en el Esquema 3. Después, el éster se saponificó con $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ para proporcionar el carboxilato correspondiente. Véase, por ejemplo, Burnagin, N. A.; Bykov, V. V. *Tetrahedron* **1997**, 53, 14437-14450; Ananthakrishnanadar, P.; Kannan, N. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1982**, 1305-1308; Hornsi, F.; Nozaki, K.; Hiyama, T. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 5869-5872; y Hajduk, P. J.; *et al. J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3144-3150.

Esquema 3

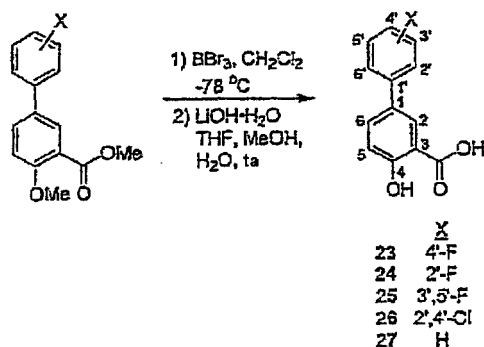
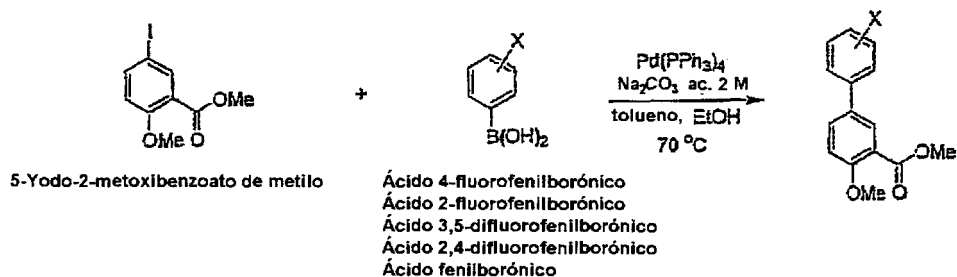


Se esterificó ácido 5-yodosalicílico usando $\text{TMS-CH}_2\text{N}_2$ y el fenol se convirtió en un éter metílico empleando MeI. El ácido salicílico protegido se acopló con los diversos ácidos fluorofenilborónicos y posteriormente se desprotegió mediante saponificación con $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ y desmetilación con BBr_3 para proporcionar los derivados de ácido salicílico 23-27, como se muestra en el Esquema 4. Véase, por ejemplo, Nicolaou, K. C.; *et al. Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 2602-2621; y Chu-Moyer, M. Y.; *et al. J. Med. Chem.* **2002**, 45, 511-528.

Esquema 4



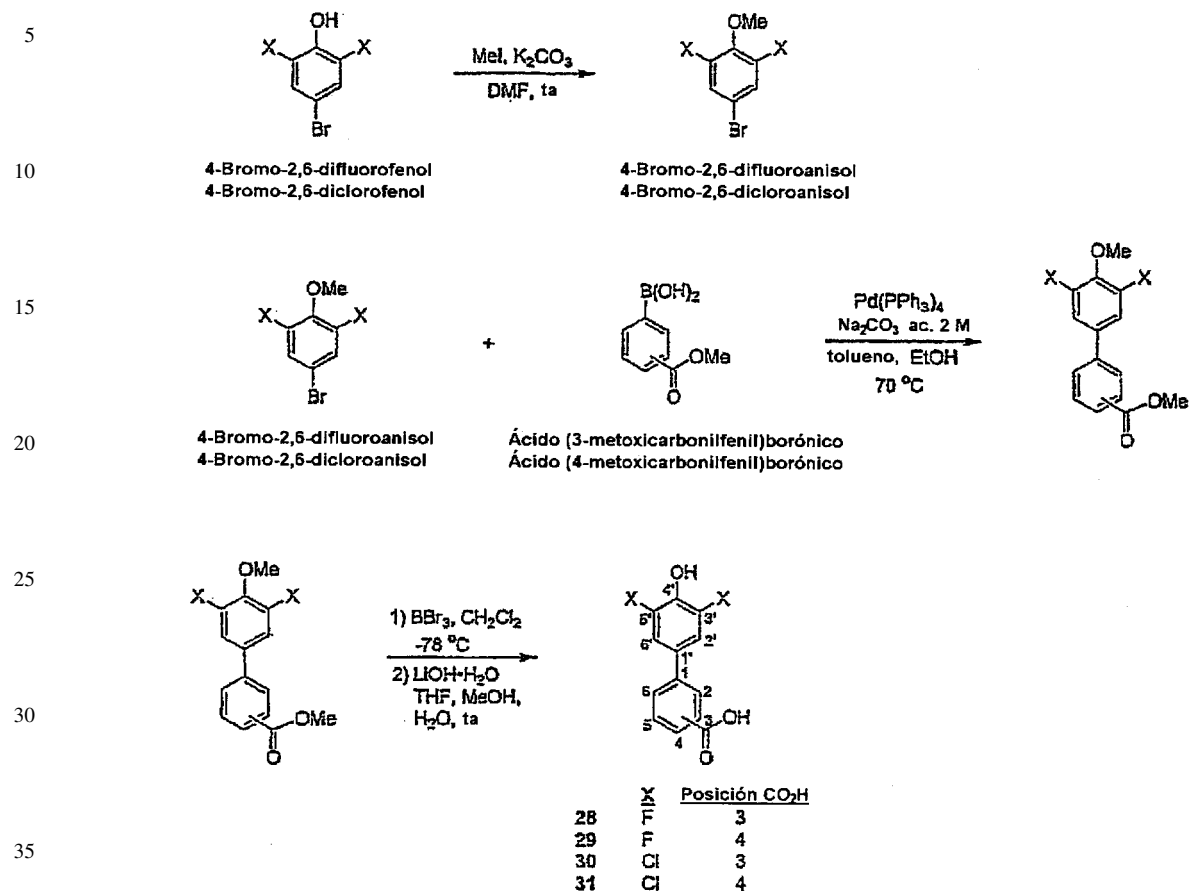
5-Yodo-2-metoxibenzoato de metilo



Los análogos que contienen 3',5'-dihalo-4'-hidroxilo 28-31 se sintetizaron protegiendo primero el bromofenol disponible en el mercado en forma del éter metílico (MeI y K₂CO₃). El acoplamiento de Suzuki con un ácido (metoxycarbonilfenil)borónico dio como resultado la formación de los sustratos de bifenilo totalmente protegidos. La escisión del éter metílico de BBr₃ y la saponificación con LiOH-H₂O proporcionaron los análogos de diflunisal totalmente funcionalizados 28-31, como se muestra en el Esquema 5.

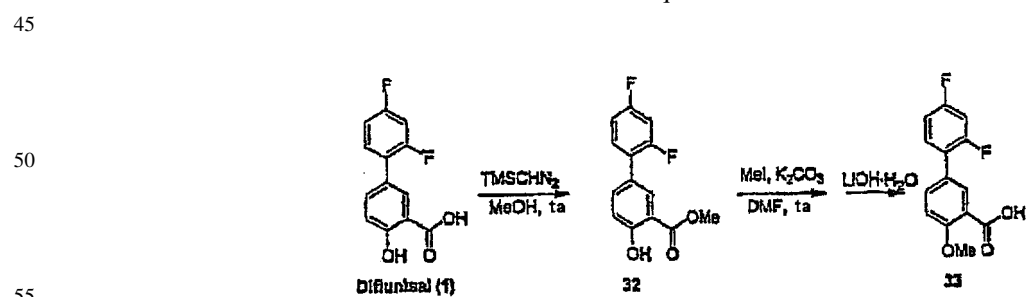
(Esquema pasa a página siguiente)

Esquema 5



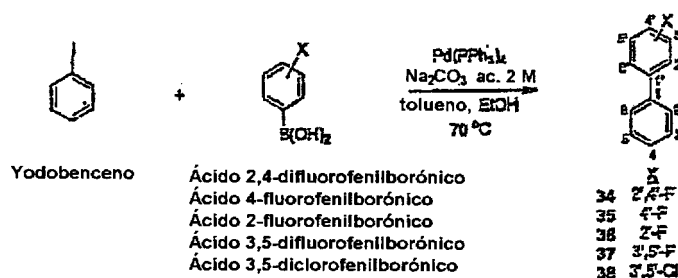
Los análogos de éter metílico y éster metílico de diflunisal se sintetizaron por esterificación del ácido carboxílico con TMS-diazometano para proporcionar 32, seguido opcionalmente de eterificación con MeI y K₂CO₃ e hidrólisis del éster con LiOH-H₂O para producir 33. Véase el Esquema 6.

Esquema 6



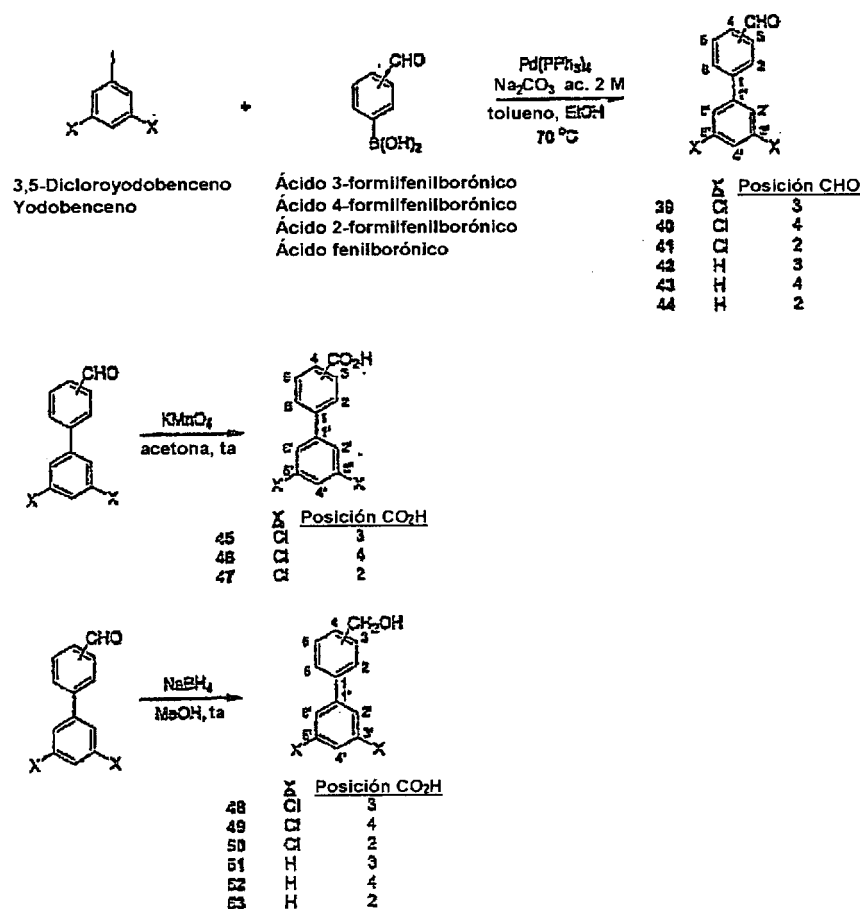
Una serie de bifenilos halogenados 34-38 se reunieron por acoplamiento de Suzuki de yodobenceno con una serie de ácidos borónicos que contienen halógeno, como se muestra en el Esquema 7. Véase, por ejemplo, Patrick, T. B.; Wiilaredt, R. P. DeGonia, D. J. *J. Org. Chem.* **1988**, 50, 2232-2235; Kuchar,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

Esquema 7



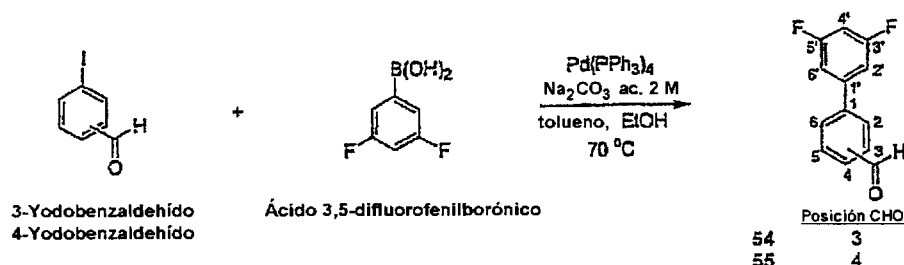
Los aldehídos de biarilo clorados se reunieron usando 3,5-dicloroyodobenceno y ácido 2-, 3- o 4-formilfenilborónico, como se muestra en el Esquema 8. Los aldehídos 42-44, que carecían de sustitución con halógeno, se prepararon de forma análoga. Los aldehídos 39-41 se oxidaron con KMnO_4 en acetona/agua para proporcionar los ácidos carboxílicos correspondientes 45-57 o se redujeron con NaBH_4 en MeOH para proporcionar los alcoholes bencílicos correspondientes 48-50, Esquema 8. La reducción de los aldehídos no clorados 42-44 con NaBH_4 y MeOH produjo los alcoholes bifenilbencílicos 51-53. Véase, por ejemplo, Song, X. P.; He, H. T.; Siahaan, T. J. *Org. Lett.* **2002**, 4, 549-552; y Nicolaou, K. C.; *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9313-9323; Hashizume, H.; *et al.* *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42, 512-520; Indolese, A. F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3513-3516; Pridgea, L. N.; Snyder, L.; Prol, J. J. *Org. Chem.* **1989**, 54, 1523-1526; Huang, C. G.; Beveridge, K. A.; Wan, P. J. *Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7676-7684; Wendeborn, S.; *et al.* *Synlett.* **1998**, 6, 671-675; Stevens, C. V.; Peristeropoulou, M.; De Kimpe, N. *Tetrahedron* **2001**, 57, 7865-7870; Tanaka, K.; Kishigami, S.; Toda, F. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 2981-2983; y Clive, D. L. J.; Kang, S. Z. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 6083-6091.

Esquema 8



Los bifenilos funcionalizados con 3',5'-difluoroformilo 54 y 55 se sintetizaron por acoplamiento de Suzuki de ácido 3,5-difluorofenilborónico con 2- o 3-yodobenzaldehído, como se muestra en el Esquema 9. Todos los demás inhibidores se sintetizaron por métodos similares y se informaron previamente. Los compuestos 10, 21, 35, 36 y 43 están disponibles en el mercado.

Esquema 9



Los reactivos y disolventes se adquirieron de Aldrich Lancaster, Acrbs, Combi-Blocks, Matrix y Pfaltz-Bauer. El THF y el CH_2Cl_2 se secaron pasándose por Al_2O_3 . Se obtuvieron otros disolventes y reactivos de proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional, a menos que se indique otra cosa. Las reacciones se controlaron por cromatografía analítica de capa fina (TLC) sobre placas recubiertas previamente de gel de sílice 60 F254 con indicador de fluorescencia adquirido de EM Science. La visualización de las placas de TLC se realizó por iluminación con UV, tratamiento con ácido fosfomolibdico seguido de calor o tratamiento con molibdato de amonio y cerio seguido de calor. La cromatografía ultrarrápida se realizó usando gel de sílice 60 (malla 230-400) de EM Science. La pureza de los nuevos compuestos que eran esenciales para las conclusiones extraídas en el texto se determinó por HPLC. La HPLC de fase normal se realizó con una bomba/controlador Waters 600, un detector de series de fotodiodos Waters 996 y una columna de sílice Waters NovaPak. El sistema de disolventes empleado fue hexanos y acetato de etilo, y los gradientes se realizaron de 50:50 de hexanos:acetato de etilo a 0:100 de hexanos:acetato de etilo durante 30 min. La HPLC de fase inversa se realizó con una bomba/controlador Waters 600, un detector de longitud de onda dual Waters 2487 y una proteína Vydac y columna de péptidos C18. El sistema de disolvente A fue 95:5 de agua:acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,5% y el disolvente B fue 5:95 de agua:acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,5%. Los gradientes se realizaron de 100:0 de A:B a 0:100 de A:B durante 20 min con un mantenimiento en 100% de B durante 10 min más. La espectroscopía de difracción circular se realizó en un espectrómetro AVIV Instruments, modelo 202SF. Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro de RMN Variari FT a una frecuencia de protones de 400 MHz. Los desplazamientos químicos de protones se informan en partes por millón (ppm) con respecto a CHCl_3 como patrón interno de desplazamientos químicos (7,26 ppm) a menos que se indique otra cosa. Las constantes de acoplamiento se informan en hertzios (Hz). Los desplazamientos químicos de carbono se informan en partes por millón (ppm) con respecto a CDCl_3 como patrón de desplazamientos químicos (77,23 ppm) a menos que se indique otra cosa. Todos los espectros de masas se obtuvieron en The Scripps Research Institute Center for Mass Spectrometry o el University of Illinois Mass Spectrometry Laboratory.

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

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

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

2',4'-Difluorobifenil-4-ol (3). ^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7,49 (td, 1H, $J = 9,4, 8,6$ Hz), 7,34 (AA'XX', 2H, $J_{AA'} = J_{XX'} = 2,5$ Hz, $J_{XA} = 8,7$ Hz, $J_{X'A'} = 8,5$ Hz, $J_{XA'} = 0,3$ Hz, $J_{X'A} = 0,3$ Hz, $\nu_A = \nu_{A'} = 2934,1$ Hz, $\nu_X = \nu_{X'} = 2746,2$ Hz), 7,28 (ddd, 2H, $J = 11,3, 9,4, 2,6$ Hz), 7,13 (dddd, 1H, $J = 8,3, 7,5, 2,8, 1,0$ Hz), 6,87 (AA'XX', 2H, como antes). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 162,3, 160,0, 157,2, 131,4, 129,9, 124,8, 115,4, 111,8, 104,3. HRESIMS calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}$ (M-H) 205,0464, encontrado 205,0465. Tiempo de retención de HPLC de fase normal: 11,2 min. Tiempo de retención de HPLC de fase inversa: 12,6 min. > 98% de pureza.

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

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

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

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

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

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

A una solución de éster metílico (1,0 equiv.) en THF:MeOH: H_2O (1:1:1) a una concentración de 0,06 M se le añadió LiOH· H_2O (3,0 equiv.). La reacción se agitó a ta durante 4 h y, después de que se completara, se acidificó con HCl al 30%, se extrajo con acetato de etilo (3 x 5 ml), se secó sobre MgSO_4 y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (CH_2Cl_2 , MeOH al 1%, ácido acético al 0,2%) para producir los ácidos bifenilcarboxílicos en forma de sólidos de color blanco con rendimientos de 6 - 93%.

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

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

ES 2 312 857 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 312 857 T3

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

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

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

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

Ácido 3',5'-difluoro-4-hidroxibifenil-3-carboxílico (25). ^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ 8,07 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz), 7,73 (dd, 1H, $J = 8,5, 2,7$ Hz), 7,15 (m, 2H); 101 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz), 6,86 (tt, 1H, $J = 9,0, 2,5$ Hz). ^{13}C RMN (CD_3OD , 100 MHz) δ 173,3, 156,3, 163,8, 145,1, 135,2, 131,0, 129,8, 119,2, 114,4, 110,4, 103,0. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_3$ (M-H) 249,0363, encontrado 249,0356. Tiempo de retención de HPLC de fase normal: 145 min. Tiempo de retención de HPLC de fase inversa: 13,3 min. > 99% de pureza.

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

Ácido 4-hidroxibifenil-3-carboxílico (27). ^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ 8,08 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz), 7,73 (dd, 1H, $J = 8,7, 2,3$ Hz), 7,54 (m, 2H), 7,41 (tt, 2H, $J = 7,3, 1,8$ Hz), 7,29 (tt, 1H, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,38 (dddd, 1H, $J = 8,8, 6,4$ Hz), 7,05 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz), 6,93 (m, 1H), 6,90 (ddd, 1H, $J = 7,3, 1,9$ Hz), 7,00 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz). ^{13}C RMN (CD_3OD , 100 MHz) δ 151,5, 140,1, 134,0, 132,4, 128,7, 128,3, 126,9, 126,3, 117,5, 112,9. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_3$ (M-H) 213,0552, encontrado 213,0545. Tiempo de retención de HPLC de fase normal: 12,9 min. Tiempo de retención de HPLC de fase inversa: 12,6 min. > 99% de pureza.

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

4-Bromo-2,6-dicloroanisol. Se añadieron yoduro de metilo (67 μl , 8,12 mmol) y K_2CO_3 (2,24 g, 16,24 mmol) a una solución de 4-bromo-2,6-diclorofenol (982 mg, 4,06 mmol) en DMF (10 ml) y se agitó a ta en una atmósfera de Ar durante 40 min. Después de que se completara, se añadió acetato de etilo y la reacción se lavó con HCl al 1% (2 x 20 ml) y salmuera (1 x), se secó sobre MgSO_4 y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (hexano) para producir 4-bromo-2,6-dicloroanisol (768 mg, 74%) en forma de un sólido de color blanco. Véase, por ejemplo, Li, J.; *et al. J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1846-1856. ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 7,75 (s, 2H), 3,81 (s, 3H). ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ 151,3, 131,5, 129,6, 116,5, 60,6. HREIMS calculado para $\text{C}_7\text{H}_5\text{BrCl}_2\text{O}$ (M+) 253,8905, encontrado 253,8901.

Los compuestos 28-31 se prepararon de acuerdo con el Esquema 5. A una solución del halo-anisol apropiado (1,0 equiv.) disuelto en tolueno suficiente para dar una concentración de 0,25 M, se le añadió una solución de ácido fenilborónico (2,0 equiv.) disuelto en EtOH para dar una solución 1,5 M de ácido borónico. Se añadió una solución

acuosa 2 M de Na_2CO_3 para dar una concentración de reacción final de 0,08 M con respecto al halo-anisol, seguido de la adición de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (10,0% en moles). La reacción se agitó a 65°C durante 17 h y, después de que se completara, se enfrió a ta y se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x), se lavó con salmuera (1 x), se secó sobre MgSO_4 y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (20:1 de hexano:acetato de etilo) para producir el bifenilo metilado en forma de un sólido de color blanco.

A una solución del bifenilo metilado (1,0 equiv.) en suficiente cantidad de CH_2Cl_2 para dar una concentración de 0,20 M se le añadió BBr_3 (2,0 equiv, solución 1 M en CH_2Cl_2). La reacción se agitó a ta en una atmósfera de Ar durante 3 h y, después de que se completara, se interrumpió con H_2O (10 ml), se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x), se lavó con salmuera (1 x), se secó sobre MgSO_4 y se concentró al vacío. El residuo se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.

A una solución de éster metílico (1,0 equiv.) en $\text{THF}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:1) a una concentración de 0,04 M se le añadió $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (3,0 equiv.). La reacción se agitó a ta durante 5 h y, después de que se completara, se acidificó con HCl al 30%, se extrajo con acetato de etilo (3 x 5 ml), se secó sobre MgSO_4 y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (CH_2Cl_2 , MeOH al 1%, ácido acético al 0,2%) para producir los productos de bifenilo en forma de sólidos de color blanco con un rendimiento de 14 - 39%.

Ácido 3',5'-difluoro-4'-hidroxibifenil-3-carboxílico (28). ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 10,60 (s a, 1H), 8,14 (t, 1H, $J = 1,7$ Hz), 7,91 (dt, 1H, $J = 7,7, 1,1$ Hz), 7,88 (ddd, 1H, $J = 8,0, 2,0, 1,1$ Hz), 7,55 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz), 7,41 (m, 2H). ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ 167,3, 154,0, 151,5, 138,4, 133,6, 131,6, 130,8, 129,9, 129,4, 128,4, 127,1, 110,3. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_3$ (M-H) 249,0363, encontrado 249,0358. Tiempo de retención de HPLC de fase normal: 18,3 min. Tiempo de retención de HPLC de fase inversa: 10,5 min. > 98% de pureza.

Ácido 3',5'-difluoro-4'-hidroxibifenil-4-carboxílico (29). ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 7,98 (AA'XX', 2H, $J_{\text{AA}'} = J_{\text{XX}'} = 1,7$ Hz, $J_{\text{XA}'} = J_{\text{X'A}'} = 8,2$ Hz, $J_{\text{XA}'} = J_{\text{XA}'} = 0,5$ Hz, $\nu_{\text{A}} = \nu_{\text{A}'} = 3189,9$ Hz, $\nu_{\text{X}} = \nu_{\text{X}'} = 3122,0$ Hz), 7,81 (AA'XX', 2H, como antes), 7,51 (m, 2H). ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ 167,7, 154,5, 142,5, 136,0, 130,5, 130,5, 130,4, 126,9, 111,0. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_3$ (M-H) 249,0363, encontrado 249,0375. Tiempo de retención de HPLC de fase normal: 18,9 min. Tiempo de retención de HPLC de fase inversa: 10,2 min. > 99% de pureza.

Ácido 3',5'-dicloro-4'-hidroxibifenil-3-carboxílico (30). ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 8,13 (t, 1H, $J = 1,6$ Hz), 7,91 (m, 2H), 7,70 (s, 2H), 7,56 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz). ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ 167,2, 149,0, 137,9, 132,2, 131,6, 130,8, 129,3, 128,4, 127,1, 126,8, 122,9, 123,0. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_3$ (M-H) 280,9772, encontrado 280,9767. Tiempo de retención de HPLC de fase normal: 16,2 min. Tiempo de retención de HPLC de fase inversa: 11,6 min. > 99% de pureza.

Ácido 3',5'-dicloro-4'-hidroxibifenil-4-carboxílico (31). ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 7,98 (AA'XX', 2H, $J_{\text{AA}'} = J_{\text{XX}'} = 1,7$ Hz, $J_{\text{XA}'} = J_{\text{X'A}'} = 8,1$ Hz, $J_{\text{XA}'} = J_{\text{XA}'} = 0,5$ Hz, $\nu_{\text{A}} = \nu_{\text{A}'} = 3189,9$ Hz, $\nu_{\text{X}} = \nu_{\text{X}'} = 3110,0$ Hz), 7,81 (AA'XX', 2H, como antes), 7,78 (s, 2H). ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ 167,2, 141,8, 141,7, 134,7, 129,9, 129,7, 126,9, 126,4, 123,0. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_3$ (M-H) 280,9772, encontrado 280,9785. Tiempo de retención de HPLC de fase normal: 15,9 min. Tiempo de retención de HPLC de fase inversa: 11,4 min. > 97% de pureza.

2',4'-difluoro-4'-hidroxibifenil-3-carboxilato de metilo (32). Los compuestos 32 y 33 se prepararon de acuerdo con el Esquema 6. Se añadió TMS-diazometano (5,87 ml, 11,75 mmol, solución 2 M en hexano) a una solución de diflunisal (1,03 g, 4,11 mmol) en MeOH (10 ml) y se agitó a ta durante 5 h. Después de que se completara, la reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (10:1 de hexano:acetato de etilo) para producir el compuesto 32 (774 mg, 71%) en forma de un sólido de color blanco. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,97 (dd, 1H, $J = 2,2, 1,3$ Hz), 7,59 (dt, 1H, $J = 8,8, 2,1$ Hz), 7,36 (dc, 1H, $J = 7,7, 1,5$ Hz), 7,48 (td, 1H, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,38 (dddd, 1H, $J = 8,8, 6,4$ Hz), 7,05 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz), 6,93 (m, 1H), 6,90 (ddd, 1H, $J = 10,6, 8,9, 2,5$ Hz), 3,96 (s, 3H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 170,6, 163,6, 161,3, 158,5, 136,4, 131,2, 130,3, 126,2, 124,2, 118,0, 112,6, 111,8, 104,6, 52,6, 124,2. HRFABMS calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}_3$ (M+) 264,0596, encontrado 264,0598. Tiempo de retención de HPLC de fase normal: 6,9 min. Tiempo de retención de HPLC de fase inversa: 14,7 min. > 99% de pureza.

Ácido 2',4'-difluoro-4'-metoxibifenil-3-carboxílico (33). Se añadieron yoduro de metilo (350 μl , 1,16 mmol) y K_2CO_3 (320 mg, 2,32 mmol) a una solución del compuesto 32 (152 mg, 0,58 mmol) en DMF (4 ml) y se agitó a ta en una atmósfera de Ar durante 14 h. Después de que se completara, se añadió acetato de etilo y la reacción se lavó con HCl al 1% (2 x 20 ml) y salmuera (1 x), se secó sobre MgSO_4 y se concentró al vacío y se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.

Se añadió $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (60 mg, 1,43 mmol) a una solución de diflunisal totalmente metilado (140 mg, 0,50 mmol) en $\text{MeOH}:\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$ (4,5 ml 1:1:1) y se agitó a ta durante 4 h. Después de que se completara, la reacción se acidificó con HCl al 30%, se extrajo con acetato de etilo (3 x 5 ml), se secó sobre MgSO_4 y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (2:1 de acetato de etilo:hexano, ácido acético al 1%) para producir 33 (122 mg, 93%) en forma de un sólido de color blanco. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 10,77 (s a, 1H), 8,31 (dd, 1H, $J = 2,5, 0,9$ Hz), 7,75 (dt, 1H, $J = 8,6, 2,1$ Hz), 7,41 (dt, 1H, $J = 8,9, 6,6$ Hz), 7,15 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 6,94 (m, 1H), 4,13 (s,

ES 2 312 857 T3

3H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 177,7, 161,4, 158,2, 135,7, 133,9, 131,4, 129,0, 123,5, 118,1, 112,2, 112,0, 104,6, 56,9. HRESIMS calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}_3$ (M-H) 263,0520, encontrado 263,0514. Tiempo de retención de HPLC de fase normal: 21,6 min. Tiempo de retención de HPLC de fase inversa: 11,9 min. > 99% de pureza.

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

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

20 *3',5'-Dicloro-4-formilbifenilo (40)*. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,99 (AA'XX', 2H, $J_{\text{AA}'} = J_{\text{XX}'} = 2,1$ Hz, $J_{\text{XA}} = J_{\text{X'A}'} = 8,5$ Hz, $J_{\text{X'A}} = J_{\text{XA}'} = 0,7$ Hz, $\nu_{\text{A}} = \nu_{\text{A}'} = 3193,7$ Hz, $\nu_{\text{X}} = \nu_{\text{X}'} = 3077,8$ Hz), 7,70 (AAXX', 2H, como antes), 7,47 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz), 7,39 (d, 2H, $J = 1,9$ Hz). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 191,8, 144,4, 142,9, 136,2, 135,8, 130,6, 128,5, 127,9, 126,1. HREIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}$ (M-H) 248,9873, encontrado 248,9874. Tiempo de retención de HPLC de fase normal: 7,9 min. Tiempo de retención de HPLC de fase inversa: 15,2 min. > 99% de pureza.

30 *3',5'-Dicloro-formilbifenilo (41)*. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 9,98 (s, 1H), 8,03 (dd, 1H, $J = 7,8, 1,3$ Hz), 7,66 (td, 1H, $J = 7,6, 1,5$ Hz), 7,55 (tt, 1H, $J = 7,6, 1,0$ Hz), 7,44 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz), 7,39 (dd, 1H, $J = 7,7, 1,0$ Hz), 7,27 (d, 2H, $J = 1,9$ Hz). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 191,4, 142,9, 141,0, 135,3, 134,0, 133,7, 130,7, 129,0, 128,5, 128,4, 128,4. HRFABMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}$ (M+H) 251,0030, encontrado 251,0029. Tiempo de retención de HPLC de fase normal: 7,0 min. Tiempo de retención de HPLC de fase inversa: 14,9 min. > 99% de pureza.

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

45 *Ácido 2',4'-diclorobifenil-3-carboxílico (45)*. ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 8,22 (s a, 1H), 8,00 (s a, 1H), 7,94 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 7,76 (s, 2H), 7,63 (s, 1H), 7,60 (s a, 1H). ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ 168,0, 143,7, 138,1, 135,4, 131,6, 129,9, 127,9, 126,2. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_2$ (M-H) 264,9823, encontrado 264,9810. Tiempo de retención de HPLC de fase normal: 12,3 min. Tiempo de retención de HPLC de fase inversa: 14,2 min. > 99% de pureza.

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

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

60 Los compuestos 48-53 se prepararon de acuerdo con el Esquema 8. A una solución de bifenilo aldehído (1,0 equiv.) en suficiente cantidad de MeOH para dar una concentración de 0,1 M, se le añadió NaBH_4 (2,0 equiv.) en suficiente cantidad de MeOH para dar una concentración de 0,3 M de borohidruro. La reacción se agitó a 0°C , se calentó lentamente hasta la t_a , después se agitó durante 16 h, se concentró al vacío y se purificó por cromatografía ultrarrápida (3:1 de hexano:acetato de etilo) para producir los bifenil alcoholes en forma de sólidos de color blanco con rendimientos de 94 -100%.

65 *3',5'-Diclorobifenil-3-il-metanol (48)*. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,54 (m, 1H), 7,46 (d, 2H, $J = 1,8$ Hz), 7,45 (m, 2H), 7,39 (m, 1H), 7,34 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz), 4,77 (s, 2H), 1,90 (s a, 1H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 144,1, 141,9, 139,0, 135,5, 129,5, 127,4, 127,1, 126,5, 125,8, 125,7, 65,3. HREIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}$ (M+)

ES 2 312 857 T3

252,0103, encontrado 252,0109. Tiempo de retención de HPLC de fase normal: 13,9 min. Tiempo de retención de HPLC de fase inversa: 14,0 min. > 99% de pureza.

3',5'-Diclorobifenil-4-il-metanol (49). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,53 (AA'XX', 2H, J_{AA'} = 1,9 Hz, J_{XX'} = 3,1 Hz, J_{XA} = 8,7 Hz, J_{X'A'} = 6,4 Hz, J_{X'A} = J_{XA'} = 0,5 Hz, ν_A = ν_{A'} = 3009,8 Hz, ν_X = ν_{X'} = 2977,8 Hz), 7,45 (AA'XX', 2H, como antes), 7,45 (d, 2H, J = 1,9 Hz), 7,33 (t, 1H, J = 1,9 Hz), 4,75 (d a, 2H, 7 = 4,8 Hz), 1,81 (t a, 1H, J = 5,2 Hz). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 144,0, 141,4, 138,0, 135,5, 127,8, 127,4, 127,4, 125,8, 65,1. HREIMS calculado para C₁₃H₁₀Cl₂O (M+) 251,0110, encontrado 252,0109. Tiempo de retención de HPLC de fase normal: 15,4 min. Tiempo de retención de HPLC de fase inversa: 14,0 min. > 97% de pureza.

3',5'-Diclorobifenil-2-il-metanol (50). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,55 (dd, 1H, J = 7,5, 1,3 Hz), 7,43 (td, 2H, J = 7,5, 1,4 Hz), 7,38 (m, 2H), 7,29 (d, 2H, J = 1,9 Hz), 7,24 (dd, 1H, J = 7,4, 1,4 Hz), 4,58 (s, 2H), 1,79 (s, 1H). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 143,7, 138,9, 137,9, 134,9, 130,0, 129,0, 128,9, 128,2, 127,9, 127,6, 63,0. HREIMS calculado para C₁₃H₁₀Cl₂O (M+) 252,0110, encontrado 252,0109. Tiempo de retención de HPLC de fase normal: 11,5 min. Tiempo de retención de HPLC de fase inversa: 14,0 min. > 99% de pureza.

Los compuestos 54 y 55 se prepararon de acuerdo con el Esquema 9. A una solución del yodobenzaldehído (1,0 equiv.) en suficiente cantidad de tolueno para dar una concentración de 0,07 M, se le añadió ácido 3,5-difluorofenil borónico (2,0 equiv.) disuelto en suficiente cantidad de EtOH para proporcionar una concentración 1,0 M de ácido borónico. Se añadió una solución acuosa 2 M de Na₂CO₃ para dar una concentración de reacción final de 0,04 M con respecto al yodobenzaldehído, seguido de la adición de Pd(PPh₃)₄ (4,0% en moles). La reacción se agitó a 60°C durante 17 h y, después de que se completara, se enfrió a ta y se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x), se lavó con salmuera (1 x), se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (10:1 de hexano:acetato de etilo) para producir los bifenil aldehídos en forma de sólidos de color blanco con rendimientos de 78 - 80%.

3',5'-Difluoro-3-formilbifenilo (54). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 10,06 (s, 1H), 8,02 (t, 1H, J = 1,4 Hz), 7,88 (dt, 1H, J = 7,8, 1,4 Hz), 7,78 (ddd, 2H, J = 7,8, 2,0, 12 Hz), 7,61 (t, 2H, J = 7,7), 7,10 (m, 2H), 6,80 (tt, 1H, J = 8,8, 2,3 Hz). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 192,0, 164,8, 162,3, 143,0, 139,8, 137,1, 132,9, 129,9, 127,9, 110,4, 103,5. HRFABMS calculado para C₁₃H₈F₂O (M+H) 219,0620, encontrado 219,0621. Tiempo de retención de HPLC de fase normal: 8,9 min. Tiempo de retención de HPLC de fase inversa: 13,7 min. > 99% de pureza.

3',5'-Difluoro-4-formilbifenilo (55). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 9,98 (s, 1H), 8,02 (dd, 1H, J = 7,8, 1,5 Hz), 7,65 (td, 1H, J = 7,3, 1,4 Hz), 7,54 (t, 1H, J = 7,8 Hz), 7,40 (dd, 1H, J = 7,6, 1,2 Hz), 6,90 (m, 3H). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 191,5, 164,1, 161,6, 143,4, 141,3, 134,0, 133,7, 130,6, 129,0, 128,3, 113,3, 103,8. HRFABMS calculado para C₁₃H₈F₂O (M+H) 219,0620, encontrado 219,0621. Tiempo de retención de HPLC de fase normal: 7,0 min. Tiempo de retención de HPLC de fase inversa: 13,4 min. > 99% de pureza.

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

Cada compuesto se sometió a un ensayo de formación de fibrillas inmovilizado. Los compuestos se secaron sobre P₂O₅ durante una noche y se disolvieron en DMSO a una concentración final de 7,2 mM para proporcionar una solución madre primaria (solución madre 10x). Se preparó una solución madre secundaria por medio de la dilución 5 veces de la solución madre primaria con DMSO a una concentración final de 1,44 mM (solución madre 2x). La amiloidogenicidad mediada por ácido de TTR (3,6 μM) en presencia de inhibidores (1,44 mM) se midió como se indica a continuación: en un cubeta UV desechable se añadieron 495 μl de una solución de proteína TTR WT de 0,4 mg/ml en fosfato sódico 10 mM, KCl 100 mM y EDTA 1 mM (pH 7,6) y 5 μl de la solución madre secundaria de inhibidor 1,44 mM en DMSO (solución madre 2x). La mezcla se sometió a agitación vorticial y se incubó durante 30 minutos (25°C), después de lo cual el pH se redujo a 4,4 con 500 μl de acetato 200 mM, KCl 100 mM, y EDTA 1 mM (pH 4,2). Un mililitro de solución final se agitó vorticialmente y se incubó durante 72 horas a 37°C sin agitación. Después de 72 horas, las cubetas se sometieron a agitación vorticial para suspender cualquier fibrilla presente y se midió la turbidez de la suspensión a 350 y 400 nm usando un espectrómetro UV-vis. El porcentaje de formación de fibrillas se obtuvo por la relación de las turbideces observadas para cada TTR más muestra de inhibidor con respecto a la de una muestra preparada de la misma manera pero sin inhibidor, multiplicada por 100. Se realizó un ensayo de formación de fibrillas empleando concentraciones equimolares de inhibidor y TTR (3,6 μM) como se ha indicado anteriormente usando una solución madre secundaria 1x. La solución madre 1x se preparó diluyendo 10 veces la solución madre primaria 10x 7,2 mM con DMSO a una concentración final de 0,72 mM y se usó en el ensayo de formación de fibrillas descrito anteriormente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y todos los compuestos se ensayaron usando TTR de tipo silvestre. Se descubrió que todos los compuestos eran solubles a lo largo de todo el transcurso del experimento ensayando la turbidez de las soluciones en ausencia de TTR WT, lo que asegura que la turbidez era el resultado de la formación de amiloides de TTR.

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

Se obtuvieron cristales de TTR WT a partir de soluciones de proteína a 7 mg/ml (en KCl 100 mM, EDTA 1 mM; fosfato sódico 10 mM, pH 7,0, sulfato amónico 0,35-0,50 M) equilibrado frente a sulfato amónico 2 M en gotas colgantes. Los complejos de TTR-ligando se prepararon a partir de cristales empapados durante más de 3 semanas con un exceso molar de 10 veces del ligando. Se usó un detector CCD-PXL-L600 (Broker instruments) acoplado a un generador de rayos X de ánodo giratorio RU200 para recoger los datos de los cristales empapados con 20 ó 26. Para recoger los datos de los cristales empapados con 1 ó 18 se usó el detector Quantum-4 con la fuente de alta energía monocromática de 14-BM-C, BIOCARS, Advance Photon Source. Los cristales se pusieron en aceite Paratone como crioprotector y se enfriaron para los experimentos de difracción (120 K para 20 y 26 y 100 K para 1 y 18). Los cristales de las estructuras complejas de TTR-ligando son isomorfas con la forma de cristal apo con dimensiones de celdas unitarias próximas a $a = 43$ Å, $b = 85$ Å y $c = 66$ Å; grupo espacial $P2_12_12_1$ con dos monómeros en la unidad asimétrica. Las series de datos de 1 y 18 se redujeron con DENZO y SCALEPACK. Véase Otwinowski, Z.; Minor, W. *Macromolecular Crystallography, Part A*, in *Methods in Enzymology*, Carter, C.W., Sweet, R. M. Eds.; Academic Press: 1997; Vol. 276, pág. 307-326. Las series de datos de 20 y 26 se redujeron con SAINT y PROSCALE (Broker AXS, Inc.).

Las coordenadas atómicas de la proteína para TTR del banco de datos de proteínas (número de acceso IBMZ) se usaron como modelo de partida durante la búsqueda de reemplazo molecular por EPMR. Las mejores soluciones para EPMR se refinaron por protocolos de dinámica molecular y minimización de energía de CNS. Los mapas de Fourier de diferencias resultantes revelaron la unión de los ligandos (en dos conformaciones para 18, 20 y 26, y cuatro conformaciones para 1) en cada hueco de unión del tetrámero de TTR. Usando estos mapas, el ligando podía colocarse inequívocamente en la densidad y se incluyó en el refinado cristalográfico. Después de varios ciclos de templado simulado y el posterior refinado del factor de temperatura y posicional, se pusieron moléculas de agua en los mapas de Fourier de diferencias. El ciclo final de ajuste de mapas se realizó usando el mapa de densidad de electrones ponderado no sesgado calculado por el protocolo de retirada de sesgo "shake/warp". Todas las conformaciones de unión del ligando estaban de acuerdo con los mapas de omisión templados sin sesgo así como con los mapas ponderados no sesgados "shake/warp" con fases en ausencia del inhibidor. Los ciclos finales del refinado se realizaron por el protocolo de refinado limitado de Refmac. Debido a la ausencia de densidades electrónicas interpretables en el mapa final, en el modelo final no se incluyeron los nueve restos N-terminales y los tres restos C-terminales. En la Tabla 2 se presenta un resumen del análisis cristalográfico. Véase, por ejemplo, Kissinger, C.R.; Gehlhaar, D.K.; Fogel, D.B. *Acta Crystallogr., Sect. D* **1999**, 55, 484-491; Brunger, A.T.; *et al.* *Acta Crystallogr., Sect. D* **1998**, 54, 905-921; Kantardjieff, K.; *et al.*, *Acta Crystallogr., Sect. D* **2002**, 58, 735-743; Bailey, S. *Acta Crystallogr., Sect. D* **1994**, 50, 760-763; y Murshudov, G.N.; Vagin, A.A.; Dodson, E.J. *Acta Crystallogr., Sect. D* **1997**, 53, 240-25.

La cinética de disociación del tetrámero de TTR se evaluó por medio del desplegamiento del monómero unido en urea. Una disociación lenta del tetrámero no se puede detectar por espectroscopia ultra-UV CD, pero está asociada a la rápida etapa de desplegamiento (500.000 veces más rápida) que puede detectarse fácilmente usando ultra-UV CD como se ha descrito previamente. Se evaluó la cinética de disociación del tetrámero de TTR (3,6 μ M) en función de inhibidor (3,6 μ M) añadiendo 3,6 μ l de una solución 1 mM (en etanol) del inhibidor de interés a 69 μ l de TTR WT (2,90 mg/ml, fosfato sódico 10 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0) a la que se habían añadido 127,4 μ l de tampón fosfato. Para una concentración de inhibidor (7,2 μ M) dos veces mayor que la concentración de TTR (3,6 μ M), se añadieron 7,2 μ l de una solución 1 mM (en etanol) del inhibidor de interés a 69 μ l de TTR WT (2,90 mg/ml, fosfato sódico 10 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0) a la que se habían añadido 123,8 μ l de tampón fosfato. Se añadieron 100 μ l de la solución de proteína-inhibidor de interés a una solución de 600 μ l de urea 10,3 M y 300 μ l de tampón fosfato, para producir una concentración final de urea de 6,5 M. Las soluciones se agitaron vorticialmente y se recogieron los espectros de dicroísmo circular a los siguientes intervalos: 0, 5, 8, 23, 46, 71, 95, 118, 144 y 168 h. Se preparó una muestra de control que contenía 7,2 μ l de etanol en lugar de inhibidor para la comparación y los espectros se recogieron en los mismos puntos de tiempo identificados anteriormente. Los espectros de CD se recogieron entre 220 y 213 nm, con exploración cada 0,5 nm y un tiempo de promediado de 10 segundos. Cada longitud de onda se exploró una vez. Los valores para la amplitud se promediaron entre 220 y 213 nm para determinar el grado de pérdida de lamina β a lo largo del experimento.

La velocidad de formación de fibrillas mediada por ácidos se siguió a pH 4,4 por medio de la turbidez. Los compuestos se secaron sobre P_2O_5 durante una noche y se disolvieron en DMSO a una concentración final de 7,2

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

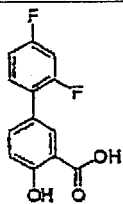
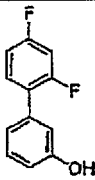
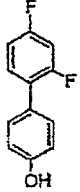
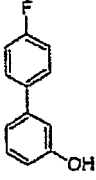
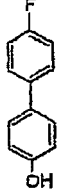
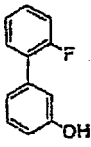
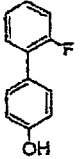
Se analizó la estructura cuaternaria de TTR en presencia de inhibidores a pH 4,4. El mecanismo por el cual 18 y 20 estabilizan TTR se evaluó incubando la proteína (3,6 μ M) durante 72 horas en las condiciones del ensayo de formación de fibrillas inmovilizado en presencia de inhibidor a una concentración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

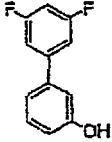
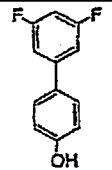
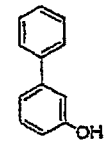
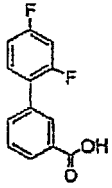
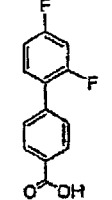
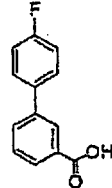
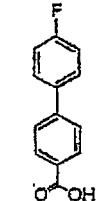
Las constantes de disociación que caracterizan la unión de 18 y 20 a TTR WT se determinaron por calorimetría de valoración isotérmica usando un Microcal Instrument (Microcal Inc., Northampton, MD). Se preparó una solución de inhibidor (300 μ M o 500 μ M en tampón Tris 25 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM; EtOH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

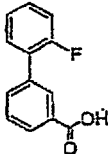
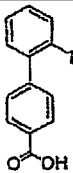
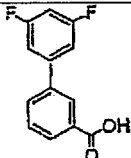
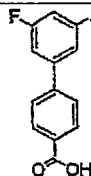
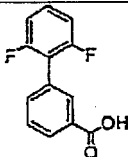
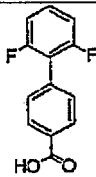
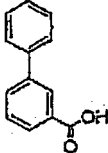
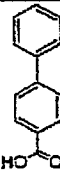
Los compuestos descritos se evaluaron como inhibidores de fibrillas de amiloides de TTR usando un ensayo de turbidez. La amiloidosis de TTR WT se inició por acidificación de TTR preincubada con inhibidor (25°C, 30 minutos), empleando adición de tampón para elevar el pH a un valor final de 4,4. Después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

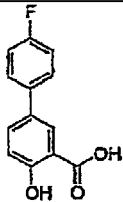
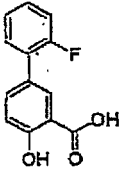
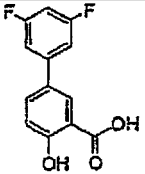
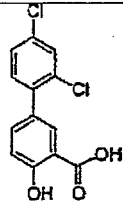
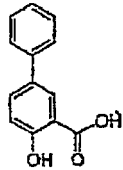
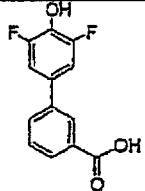
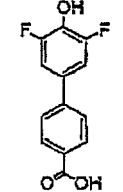
TABLA 1

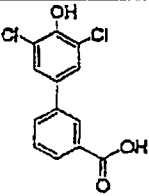
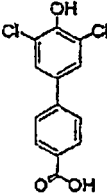
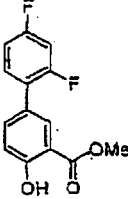
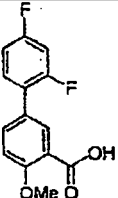
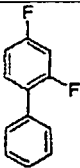
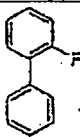
Efectos de Compuestos sobre la Formación de Fibrillas

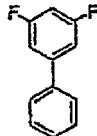
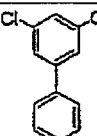
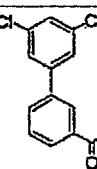
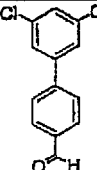
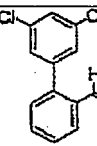
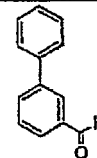
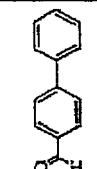
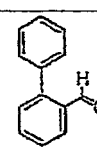
Número de Compuesto	estructura	% de formación de fibrillas (Inhibidor 3,6 μM)	% de formación de fibrillas (Inhibidor 7,2 μM)	Selectividad de plasma (unión de equiv.)
diflunisal (1)		37,0	3,4	$0,13 \pm 0,02$
2			31,5	
3			32,4	
4			46,3	
5			53,1	
6			19,5	
7			19,6	

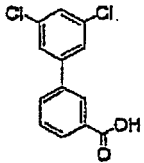
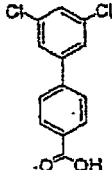
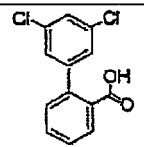
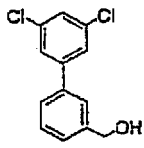
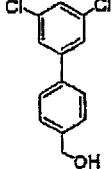
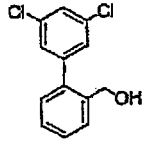
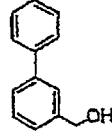
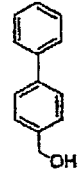
Número de Compuesto	estructura	% de formación de fibrillas (Inhibidor 3,6 μM)	% de formación de fibrillas (Inhibidor 7,2 μM)	Selectividad de plasma (unión de equiv.)
8		40,9	10,2	$0,18 \pm 0,05$
9			16,4	
10			61,2	
11		39,4	9,1	no observado
12		32,6	2,6	$0,20 \pm 0,05$
13			15,7	
14			13,3	

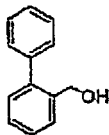
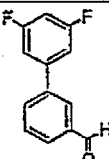
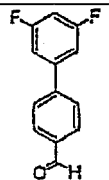
Número de Compuesto	estructura	% de formación de fibrillas (Inhibidor 3,6 μM)	% de formación de fibrillas (Inhibidor 7,2 μM)	Selectividad de plasma (unión de equiv.)
15		39,4	9,8	no observado
16		32,4	4,8	$0,08 \pm 0,00$
17		35,7	5,6	$0,23 \pm 0,00$
18		35,7	3,7	$1,27 \pm 0,12$
19		35,1	6,7	$0,29 \pm 0,12$
20		28,5	4,5	$0,50 \pm 0,05$
21			30,8	
22		51,5	14,3	$0,08 \pm 0,01$

Número de Compuesto	estructura	% de formación de fibrillas (Inhibidor 3,6 μ M)	% de formación de fibrillas (Inhibidor 7,2 μ M)	Selectividad de plasma (unión de equiv.)
23		38,7	2,6	$0,09 \pm 0,00$
24		38,7	2,5	$0,07 \pm 0,02$
25		35,5	1,0	no observado
26		29,9	3,6	$0,27 \pm 0,02$
27		47,4	15,4	no observado
28		38,5	3,5	no observado
29		31,7	3,4	$0,07 \pm 0,02$

Número de Compuesto	estructura	% de formación de fibrillas (Inhibidor 3,6 μM)	% de formación de fibrillas (Inhibidor 7,2 μM)	Selectividad de plasma (unión de equiv.)
30		25,5	4,4	$0,12 \pm 0,02$
31		25,8	3,8	$0,26 \pm 0,04$
32			69,9	
33			38,5	
34			100,0	
35			100,0	
36			99,4	

Número de Compuesto	estructura	% de formación de fibrillas (Inhibidor 3,6 μM)	% de formación de fibrillas (Inhibidor 7,2 μM)	Selectividad de plasma (unión de equiv.)
37			100,0	
38			52,2	
39		30,6	4,4	1,30 ± 0,15
40			25,4	
41		34,5	7,1	1,96 ± 0,11
42			35,4	
43			93,5	
44			72,5	

Número de Compuesto	estructura	% de formación de fibrillas (Inhibidor 3,6 μM)	% de formación de fibrillas (Inhibidor 7,2 μM)	Selectividad de plasma (unión de equiv.)
45		32,7	3,0	0,80 ± 0,08
46		41,2	4,9	1,56 ± 0,01
47			45,4	
48		30,0	3,3	0,89 ± 0,09
49		38,9	5,9	0,54 ± 0,10
50		33,6	7,7	no observado
51			85,5	
52			100,0	

Número de Compuesto	estructura	% de formación de fibrillas (Inhibidor 3,6 μ M)	% de formación de fibrillas (Inhibidor 7,2 μ M)	Selectividad de plasma (unión de equiv.)
53			81,0	
54			64,3	
55			69,6	

Basándose en la eficacia del inhibidor para los compuestos 2-55, se aprecia que un anillo hidrófilo sustituido con carboxilato unido directamente a un anillo hidrófobo funcionalizado es suficiente para una actividad excelente (Tabla 1). Un sustituyente fenólico en lugar de un carboxilato (2-10) produce considerablemente menos inhibidores activos, muy inferior al compuesto parental 1. Los inhibidores que tienen un halógeno en la posición orto o meta del anillo hidrófobo son superiores a los compuestos halógenos o éstos tienen un solo halógeno en posición para. Esto sugiere que los halógenos en posición para no cumplen el HBP de la misma manera que los biarilos halogenados en posición meta y orto. La completa eliminación de todos los halógenos puede dar como resultado un inhibidor deficiente, presumiblemente debido a la pérdida de complementariedad estérica para rellenar las bolsas de unión de halógenos (por ejemplo, los compuestos 10, 21-22, 27, 42-44 y 51-53). En las condiciones ensayadas, el mejor compuesto fenólico (8) es inferior a 1, que lleva tanto una funcionalidad fenólica como carboxílica en el anillo hidrófilo. Los compuestos biarilo estabilizados con un solo carboxilato (tal como 11-12) pueden ser excelentes inhibidores de fibrillas de amiloide, por ejemplo, los compuestos 11, 12, 15-20. Éstos rivalizan con el diflunisal para la inhibición, siendo la excepción los que contienen únicamente un halógeno para (por ejemplo, los compuestos 13 y 14). Un aril carboxilato sustituido en posición meta o para puede ser suficiente para proporcionar excelentes propiedades de inhibición, lo que sugiere que el sustituyente hidroxilo en 1 no es necesario para una buena actividad inhibidora. Además, la colocación para del carboxilato parece proporcionar inhibidores superiores, lo que sugiere que un carboxilato para es más capaz de aprovechar las interacciones electrostáticas con los grupos ϵ -amino de las Lys 15 y 15' (modo de unión directa), como ocurre en el caso de 20, o las interacciones de enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo de las Ser 117 y 117' (modo de unión inversa) en el caso de 18. Los biarilos donde el anillo hidrófobo está sustituido con halógenos en posiciones distintas de la posición para y el anillo hidrófilo con carboxilatos meta y particularmente para producen inhibidores de la formación de fibrillas de amiloide de TTR muy eficaces.

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

La inclusión de un sustituyente 3',5'-dihalo-4'-hidroxilo en el anillo que contiene halógeno, con carboxilatos en las posiciones para o meta (28-31), puede producir una actividad inhibidora elevada, similar al diflunisal. La sustitución 4'-hidroxilo se incluyó para conseguir un mayor parecido con la tiroxina, el ligando natural de la TTR. Estos inhibidores

también pueden imitar la actividad hormonal de la tiroxina y, por lo tanto, pueden actuar como agonistas o antagonistas del tiroides, un efecto que puede ser indeseable.

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

Se sintetizaron varios inhibidores que contenían cloro y se evaluó su actividad de inhibición de fibrillas de TTR. Cuando miembros de esta clase de inhibidores contienen carboxilatos en las posiciones meta o para (por ejemplo, 45 y 46) pueden poseer una alta actividad, mientras que los que tienen un carboxilato orto (tal como 47) pueden ser inhibidores inferiores. Esta observación sugiere que el carboxilato orto puede estar demasiado lejos de los grupos ϵ -amino de las Lys 15 y 15' para realizar interacciones electrostáticas favorables (modo de unión directa) o de los grupos hidroxilo de las Ser 117 y 117' para experimentar interacciones de enlaces de hidrógeno (modo de unión inversa). Los alcoholes bencílicos 48-50 sorprendentemente resultaron ser excelentes inhibidores de la formación de fibrillas. La sustitución dicloro en posición meta en el anillo parece estar complementada por la funcionalidad alcohol del bencilo en la posición orto, meta o para, potencialmente debido a la formación de enlaces de hidrógeno o enlaces de hidrógeno mediados por agua. Una serie de análogos de aldehído (39-41) donde los grupos-CH₂OH se reemplazaron por una funcionalidad aldehído, mostraron una buena inhibición excepto en el caso del aldehído 41 en posición para, posiblemente debido a la hidratación del aldehído para dar un gem-diol. Es posible que los aldehídos, los alcoholes bencílicos y los carboxilatos se unan al hueco a través de un mecanismo diferente. En ausencia de información estructural, sin embargo, no puede descartarse un modo de unión similar. También es posible que los aldehídos se unan covalentemente a la Ser 117 (117') a través de un hemiacetal o a la Lys 15 (15') a través de un enlace imina. La sustitución de los cloros con átomos de flúor (54 y 55) en el caso de los aldehídos puede dar como resultado inhibidores más bien deficientes (39 y 41). Como se ha indicado anteriormente, la eliminación completa de los halógenos puede producir inhibidores con mala actividad (42 y 44), excepto en el caso del aldehído meta 43 donde la actividad es modesta. Esta actividad modesta puede deberse a un alto grado de hidratación. Es sorprendente que el 3',5'-difluoro-meta aldehído (54), sea inferior a los halógenos que carecen de aldehído (42).

Se evaluaron adicionalmente inhibidores que mantenían la formación de fibrillas de TTR por debajo de 50% a una concentración igual a la de la TTR (3,6 μ M) con respecto a su capacidad de unirse a TTR selectivamente en relación con las demás proteínas del plasma sanguíneo. La concentración de diflunisal en sangre puede exceder de 30 μ M 20 h después de una sola dosis de 500 mg, o de 300 μ M 4 h después de la misma dosis. Aunque este alto nivel de concentración plasmática sostenida sugiere una excelente biodisponibilidad, los inhibidores más selectivos permitirán una menor dosificación y efectos secundarios potencialmente menores; por lo tanto, se incubó plasma humano con esta subserie de inhibidores a una concentración final de 10,8 μ M (la concentración media de TTR en plasma humano es de aproximadamente 5 μ M). Después se capturó la TTR usando un anticuerpo unido a resina, y la TTR inmovilizada se lavó tres veces con una solución de TSA (solución tris salina)/saponina al 0,05%, seguido de dos lavados con TSA. El complejo de TTR-inhibidor se liberó de la resina con trietilamina 100 mM (pH 11,5), y se determinó la estequiometría del inhibidor presente con respecto a la TTR por análisis de HPLC de fase inversa. Puede unirse un máximo de 2 equivalentes de inhibidor por tetrámero de TTR. En la Tabla 1 se resumen las estequiometrías de unión al plasma después del lavado, que representan los límites inferiores debido a las pérdidas asociadas con el lavado.

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

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

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

TABLA 2

Parámetros estadísticos cristalográficos

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

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

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

El compuesto 18 se une a TTR en el modo inverso con el anillo de arilo hidrófilo sustituido con carboxilato orientado en el hueco interno, dentro de una distancia de enlaces de hidrógeno de Ser 117 y Ser 117'. Los anillos de arilo están girados 34 grados entre sí para aprovechar las interacciones hidrófobas con Leu 17, Ala 108, Val 121 y Thr 119. Los átomos de flúor están colocados en los huecos de unión a halógenos 1 y 1'. No se esperaba el modo de unión inversa, en su lugar, se preveía que el carboxilato se colocara en el hueco externo para aprovechar las interacciones electrostáticas con Lys 15 y 15', con los átomos de flúor complejados en los huecos de unión a halógeno 2 y 2'. Sin embargo, el modo de unión inversa no era una sorpresa total, ya que se había observado previamente para el diclofenaco (una biaril amina) y varios análogos de diclofenaco.

La sustitución con átomos de cloro en lugar de átomos de flúor en el diflunisal induce diferencias significativas en la unión de 26 a TTR. El compuesto 26 se une a TTR en el modo de unión inversa con el anillo de arilo sustituido con carboxilo orientado en el hueco de unión interno y cloros complejados en los huecos de unión a halógeno 2 y 2'. Al igual que 18 y 20, el compuesto 26 también ocupa el centro del hueco de unión a hormona. Los restos Ala 108, Lys 15, Leu 17, Leu 110, Lys 17 y Thr 119 de los protómeros de TTR forman interacciones de van der Waals e hidrófobas con el inhibidor. En el hueco de unión interno, la cadena lateral de la Ser 117 existe en dos conformaciones para interactuar con la sustitución carboxilo de 26 y la Ser 117 de los otros monómeros. El mismo oxígeno de carboxilo de 26 también forma una interacción de enlace de hidrógeno con el oxígeno de la cadena principal de la Ser 117. El

otro oxígeno de carboxilo de 26 forma un enlace de hidrógeno con el oxígeno de la cadena principal de la Ala 108. A diferencia del diflunilal, el resto Thr 119 se orienta para alejarse del inhibidor, contribuyendo a la hidrofobia del hueco de unión en lugar de a la formación de enlaces de hidrógeno con el inhibidor.

Para explorar adicionalmente el mecanismo de acción de estos inhibidores, se evaluó su capacidad de estabilizar a la TTR frente a la disociación inducida por urea en función del tiempo. La velocidad de disociación del tetrámero se asoció irreversiblemente al desplegamiento rápido de los monómeros, controlado fácilmente, empleando concentraciones de urea superiores a las que permiten el plegamiento de los monómeros. La disociación controlada por el desplegamiento se exploró por ultra UV-CD en urea 6,5 M, revelando que los buenos inhibidores de la amiloidogénesis mediada por ácido ralentizaban la velocidad de disociación de tetrámeros de una forma dependiente de la dosis (Figs. 1A y 2B). Varios inhibidores, incluyendo 20, 46 y 48, muestran un efecto sorprendente sobre la disociación del tetrámero de TTR, la etapa limitante de la velocidad de la amiloidogénesis. Véase, por ejemplo, Hammarstrom, P.; *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 25, 16427-32.

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

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

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

TABLA 3

Constantes de Disociación para Compuestos que se Unen a la TTR de Tipo Silvestre

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

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

Las velocidades de disociación del tetrámero de TTR se midieron en función de la concentración de inhibidor durante un periodo de 168 h en urea 6,5 M. La selección de inhibidores, específicamente 18, 20, 39, 41, 45, 46, 48 y 49 demuestra una reducción global en el grado de disociación del tetrámero durante 160 h como se refleja en los cambios de amplitud con respecto a TTR sin inhibidor. La velocidad de disociación de tetrámero también se ralentiza espectacularmente en presencia de inhibidor, como se refleja en la reducción en la pendiente del transcurso de tiempo. Los inhibidores 20, 45, 46 y 48 son superiores, presumiblemente porque el inhibidor se disocia muy lentamente de TTR-I y TTR-I₂ debido a su alta afinidad de unión en urea. La formación de TTR-I y TTR-I₂ puede estabilizar significativamente el estado nativo debido a los bajos valores de K_d de estos complejos, y eleva la barrera cinética para la disociación del tetrámero, sustancialmente en el caso de 20, 45, 46 y 48. Aunque 16 y 18 se unen a TTR, parece ser que su afinidad es insuficiente para afectar a la estabilización cinética. Probablemente es significativo que el orden de

clasificación de eficacia del inhibidor en urea a una concentración de inhibidor de $3,6 \mu\text{M}$ (proteína $3,6 \mu\text{M}$) sea $20 \approx 45 > 46 \approx 48$, que es diferente que una concentración de inhibidor de $7,2 \mu\text{M}$ ($20 \approx 46 > 45 \approx 48$). Esto probablemente refleja una diferencia en los valores de K_d en urea.

- 5 La estabilización cinética del estado nativo es una estrategia terapéutica atractiva debido a las pruebas que están apareciendo de que los oligómeros plegados de forma anómala, tanto si están en la ruta amiloide o fuera de ella, son neurotóxicos. La obtención de una estabilización cinética con inhibidores puede proporcionar un tratamiento no invasivo para SSA, FAP y FAC.
- 10 Las velocidades de disociación del tetrámero en urea en presencia de un inhibidor dado no siempre predicen la capacidad del inhibidor de impedir la amiloidosis a bajo pH. Como no está claro cómo y cuándo se forma el amiloide en un ser humano, son deseables estabilizadores del tetrámero de TTR que funcionen bien en una diversidad de medios desnaturalizantes. Se exploró la velocidad de formación de fibrillas de TTR en función de la concentración de inhibidor en condiciones ácidas (Figs. 3A, 3B, 4A y 4B). Los inhibidores 20, 45 y 48 también se comportan excepcionalmente bien en este entorno. El inhibidor 46 es un estabilizador del tetrámero mejor en urea que en ácido, mientras que 1 es mucho mejor en ácido que en urea. La energía libre de estabilización asociada con la formación de los complejos TTR-I y TTR-I₂ en un entorno dado determina el grado de estabilización del estado basal y el aumento asociado en la energía libre de activación para la disociación del tetrámero. Estos datos sugieren que los inhibidores ralentizan la amiloidogénesis de TTR a bajo pH mucho más eficazmente que la disociación del tetrámero de TTR en urea de $6,5 \text{ M}$. Esto puede deberse a que la amiloidogénesis requiere un reensamblaje dependiente de la concentración después de la disociación. Los inhibidores más eficaces son los que pueden mantener la concentración del intermedio amiloidogénico monomérico de TTR a niveles suficientemente bajos como para hacer que la formación de fibrillas sea muy ineficaz. Como se observa en la desnaturalización por urea de TTR en presencia de inhibidores, el orden de clasificación de eficacia de inhibidor a bajo pH difiere significativamente desde una concentración de inhibidor de $3,6 \mu\text{M}$ (Figs. 3A y 3B) a una concentración de inhibidor de $7,2 \mu\text{M}$ (Figs. 4A y 4B). Esta observación probablemente refleja las diferencias en los valores de K_{d2} de cada uno de los inhibidores a bajo pH. El ejemplo más espectacular es el del diflunisal - uno de los inhibidores más eficaces de la formación de fibrillas a $3,6 \mu\text{M}$, pero uno de los menos eficaces a $7,2 \mu\text{M}$, debido a su K_{d2} relativamente elevada.
- 30 Los análogos de diflunisal representan una clase prometedora de compuestos para el tratamiento de la amiloidosis por TTR. Aunque varios análogos de diclofenaco son inhibidores muy buenos de la formación de fibrillas, los análogos de diflunisal ofrecen una clase adicional de estabilizadores del tetrámero de TTR muy eficaces. Varios análogos de diclofenaco ofrecen la capacidad de inhibir la formación de fibrillas resultante de la disociación y plegamiento anómalo de dos mutantes de TTR - Val30Met y Leu55Pro. Las estructuras co-cristalinas de rayos X demuestran que los análogos de diclofenaco principalmente se unen en el modo de unión inversa, sin embargo, pequeñas perturbaciones en las estructuras de los análogos de diflunisal permiten una unión inversa o directa. Además, el diflunisal puede unirse en el modo de unión directa o inversa, con una ocupación casi igual en los dos modos. Las constantes de disociación obtenidas para el diclofenaco (60 nM para K_{d1} y 1.200 nM para K_{d2}) fueron comparables a las obtenidas para el diflunisal y 20, demostrando 18 una unión casi 10 veces más fuerte para el primer acontecimiento de unión como se ilustra por su valor de K_{d1} . Además, las dos clases de inhibidores presentaron una unión cooperativa negativamente. Lo más destacable es que varios análogos de diflunisal fueran muy selectivos para la TTR en plasma sanguíneo humano, ofreciendo la posibilidad de reducir la toxicidad y los efectos secundarios. Véase Oza, V.B.; *et al.* J. Med. Chem **2002**, 45, 321-32.
- 45 Veintiocho de los compuestos sintetizados pueden inhibir sustancialmente la amiloidogénesis por TTR. De éstos, varios mostraron una estequiometría de unión superior a 0,50 equivalentes en plasma sanguíneo humano. Las subestructuras de arilo clorado y fluorado de los mejores inhibidores se encuentran en fármacos conocidos, por lo tanto, hay buenas razones para creer que estos compuestos o sus análogos podrían evolucionar para dar fármacos que no presenten la actividad AINE de 1. Los compuestos fluorados 18 y 20 pueden unirse y estabilizar a la TTR tetramérica en urea $6,5 \text{ M}$, reduciendo espectacularmente la primera etapa del plegamiento anómalo y la amiloidogénesis, la disociación del tetrámero de TTR. Estos compuestos y otros también ralentizan espectacularmente la amiloidogénesis por TTR mediada por ácido. De los compuestos ensayados, 18, 20, 39, 41, 45, 46, 48 y 49 fueron los que mejor se comportaron en la estabilización del tetrámero de TTR en urea y en condiciones ácidas. Estos compuestos de biarilo parecen aumentar la barrera de activación asociada con la disociación del tetrámero, la etapa limitante de la velocidad para la formación de amiloide, por estabilización del estado basal.

Ejemplo 3

El Diflunisal Administrado por Vía Oral Estabiliza a la Transtiretina Frente a la Desnaturalización

- 60 La transtiretina (TTR) es una proteína homotetramérica que transporta tiroxina y proteína de unión a holo-retinol. En condiciones desnaturalizantes, la disociación del tetrámero limitante de la velocidad y el plegamiento anómalo rápido del monómero permite un ensamblaje anómalo para dar amiloide, produciéndose amiloidosis sistémica senil, polineuropatía amiloide familiar y cardiomiopatía amiloide familiar. Se sabe que la unión del diflunisal a al menos uno de los dos sitios de unión a tiroxina no ocupados en la TTR estabiliza el tetrámero de TTR aumentando también la barrera de activación de disociación *in vitro*. Se investigó la posibilidad de usar diflunisal para el tratamiento de la amiloidosis por TTR.
- 65

Métodos

- Se incluyeron 30 voluntarios sanos (25 hombres, 5 mujeres) después de dar el consentimiento informado. Los sujetos variaban de 23 a 53 años (edad media, $37,6 \pm 8,8$) con un peso corporal medio de $78,0 \pm 12,1$ kg. Cada sujeto se trató con diflunisal (Dolobid®) a una dosis de 125, 250 ó 500 mg dos veces al día (cada 12 horas) durante 7 días (13 dosis en total). Se recogió sangre el día 1 antes del tratamiento y el día 8, 4 y 12 h después de tomar diflunisal. El diseño de este estudio se aprobó por el Human Subjects Committee of Scripps Clinic, Scripps Green Hospital, The Scripps Research Institute, y The Scripps General Clinical Research Center.
- Se midieron los niveles séricos de diflunisal. Se añadió 100 μ l de suero a 900 μ l de acetonitrilo para precipitar las proteínas. Después de la centrifugación, se añadieron 100 μ l de sobrenadante a 900 μ l de trietilamina acuosa 100 mM, pH 11,5. Después de la filtración, se inyectaron 100 μ l de cada muestra en una columna de fase inversa C18 Keystone de 3 cm usando un gradiente de 40-100% de solución B durante 10 min (solución A: 94,8% de agua/5% de acetonitrilo/0,2% de ácido trifluoroacético; solución B: 94,8% de acetonitrilo/5% de agua/0,2% de ácido trifluoroacético), con control por medio de un sistema de administración multidisolvente Waters 600E. La detección se realizó a 280 nm con un detector de absorbancia sintonizable Waters 486 y los picos se integraron para dar la concentración de diflunisal a partir de las curvas patrón.
- Se analizó la estequiometría de la unión del diflunisal a TTR en suero humano. Se añadió una suspensión 1:1 de gel/Tris·HCl 10 mM, pH 8,0/NaCl 140 mM/NaN₃(TSA) al 0,025% (62,5 μ l) de Sepharose a 500 μ l de suero y la mezcla se incubó a 4°C durante 1 h. Después de la centrifugación se añadieron 400 μ l de sobrenadante a 200 μ l de una suspensión 1:1 de gel/TSA de la Sepharose conjugada con anticuerpo anti-TTR y se agitó lentamente a 4°C durante 20 minutos. Después de la centrifugación, el gel se lavó con 1 ml de TSA/saponina al 0,05% (Fisher Scientific) (dos veces, 10 min cada x), y además con 1 ml de TSA (una vez, 10 min) a 4°C. Después se añadieron 150 μ l de trietilamina acuosa 100 mM, pH 11,5, para eluir la TTR y el diflunisal unido de los anticuerpos. Después de una agitación suave a 4°C durante 30 min, la muestra se centrifugó y se retiraron 145 μ l del sobrenadante. Se separó una inyección de 135 μ l de muestra y se analizó como se ha descrito previamente (Purkey *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:5566-71).
- Se evaluó la estabilidad del tetrámero de TTR en suero frente a la desnaturalización con urea. Se incubaron muestras de 10 μ l de suero (25°C) en 90 μ l de diversas concentraciones de urea en tampón fosfato 50 mM (pH 7,0: KCl, 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM). Las soluciones de urea se comprobaron por el índice de refracción para verificar las concentraciones preparadas en peso. Se realizó el entrecruzamiento por glutaraldehído de la proteína añadiendo 10 μ l de glutaraldehído (25%). Se dejó que la reacción de entrecruzamiento continuara durante 4 min antes de inactivarse por la adición de 10 μ l de NaBH₄ (al 7% en NaOH 0,1 M). Las muestras se mezclaron con 120 μ l de cóctel de carga de gel reductor de SDS (concentración final de SDS = 2,5%) y se llevaron a ebullición durante 5 min. Las muestras se separaron usando SDS-PAGE al 12% y los geles se analizaron por inmunotransferencia usando antisuero anti-TTR (Purkey *et al.*, *supra*).
- Se evaluó la estabilidad del tetrámero de TTR en suero frente a la desnaturalización con ácido. Se incubaron muestras de diez μ l de suero (37°C) en 90 μ l de tampón de acidificación 100 mM. Se usó tampón citrato cuando se deseaba un pH final $\leq 3,8$; y se empleó tampón acetato cuando el intervalo de pH a evaluar era 4,2-5,4. Después del entrecruzamiento, las muestras se analizaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia como se ha descrito anteriormente.
- Se expresaron TTR-WT recombinante y variantes en *Escherichia coli* Epicurian BL21/DE3 gold (Stratagene) transformada con el plásmido pmmH α que contenía los genes de TTR y de resistencia a ampicilina. La expresión y purificación se realizaron como se ha descrito previamente (Lashuel *et al.*, Biochemistry 1999; 38: 13560-73).
- La velocidad de disociación del tetrámero de TTR se midió por espectroscopía de diroísmo circular. La evaluación de las velocidades de disociación del tetrámero se realizó usando muestras de TTR recombinante (3,6 μ M) en urea 6,5 M, una concentración en la región posterior a la transición para el cambio estructural terciario (Hammarström *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 16427-32). Se midió el espectro ultra UV CD de TTR (210 - 220 nm) en función del tiempo para evaluar la ralentización de la velocidad de disociación del tetrámero por asociación a cambios estructurales terciarios rápidos.
- El ensayo de formación de fibrillas se realizó como se indica a continuación. Una solución madre de TTR recombinante (7,2 μ M) se diluyó 1:1 con tampón de acidificación 100 mM. Se usó tampón citrato cuando se deseaba un pH final de $\leq 3,8$; se empleó tampón acetato cuando el intervalo de pH a evaluar era 4,2 - 6,0, y se utilizó tampón fosfato para evaluar la amiloidogénesis a pH 6,5. Las muestras se incubaron a 37°C durante 72 h sin agitación después de la acidificación. El grado de formación de fibrillas se exploró por mediciones de turbidez a 400 nm.
- La cinética de formación de fibrillas se midió como se indica a continuación. Se mezclaron soluciones de TTR recombinante (7,2 μ M) con un volumen igual de tampón acetato 100 mM para producir un pH final de 4,4. Las muestras se incubaron a 37°C y se controló la turbidez a 400 nm durante el transcurso de 168 h. Se obtuvo una muestra separada para cada punto de tiempo.
- El efecto del diflunisal sobre la disociación de tetrámeros mediada por urea y la formación de fibrillas mediada por el pH se evaluó añadiendo diflunisal a una solución de TTR que se incubó durante 3 h (37°C) antes de someter la proteína a desnaturalización con urea o amiloidosis mediada por el pH.

Resultados

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

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

Una comparación de la estequiometría de unión del diflunisal ($100 \mu\text{M}$) en sujetos (0,8 - 1) con la TTR recombinante (1,5) revela una unión significativa a proteínas séricas aparte de la TTR, proporcionando el incentivo de desarrollar análogos de diflunisal que se unen más selectivamente a la TTR. El nivel sérico de TTR se aumentó y los niveles séricos de T_4 total y RBP se redujeron después de la administración de diflunisal en todos los grupos. Estos descubrimientos sugieren que el diflunisal influye en el metabolismo de TTR. No se observaron efectos secundarios evidentes durante o después del estudio. Sin embargo, el nivel sérico de albúmina se redujo significativamente y los niveles de BUN y creatinina aumentaron ligeramente en el grupo de 500 mg bid. En el grupo de 250 mg bid, el nivel sérico de albúmina se redujo moderadamente y el nivel de BUN aumentó ligeramente.

Se creó un nuevo método para demostrar que el diflunisal administrado por vía oral estabiliza a la TTR sérica frente a las tensiones de desnaturalización incluyendo la amiloidosis. Este método sirve como un marcador sustituido para identificar compuestos que prevengan enfermedades de plegamiento anómalo de TTR. El suero entero de los sujetos se sometió a desnaturalización añadiendo urea (0 - 9 M) o añadiendo ácido (pH 3,8 - 5,4). Como la TTR debe disociarse para desnaturalizarse, pueden usarse cambios estructurales cuaternarios para controlar el grado de desplegamiento (Hammarström *et al.*, *supra*). Se añadió glutaraldehído para reticular todas las proteínas en suero después de someterse a tensiones de desnaturalización y de establecer la fracción de TTR que se pliega normalmente (tetramero o dímero) frente a la que se desnaturaliza (monómero). La SDS-PAGE de suero entero separa el tetramero y el dímero de TTR reticulada (representando éstos la TTR plegada) del monómero. La inmunotransferencia permite comparaciones cuantitativas de la cantidad de TTR plegada. Los anticuerpos policlonales no se unen al monómero de TTR no plegado ni mucho menos tan bien como a la TTR plegada, por lo tanto, lo más útil es comparar la intensidad de las bandas de tetramero y dímero en ausencia y presencia de diflunisal. Por este método también puede evaluarse la dependencia del tiempo de la inhibición por diflunisal de la desnaturalización de TTR. La dependencia del tiempo apenas detectable de este proceso en presencia de diflunisal confirma claramente el mecanismo de estabilización cinética (véase el Ejemplo 1) donde la estabilización del estado basal por el diflunisal hace que la barrera de disociación del tetramero sea insuperable. La eficacia del diflunisal (250 mg bid) en estos cursos de tiempo de desnaturalización es mejor que la que se predeciría por la estequiometría medida (0,8 - 1,2), proporcionando pruebas adicionales de que el método de inmunoprecipitación infraestima la estequiometría de unión real, especialmente cuando excede de 1.

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

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

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

Ejemplo 4

Los Bifenilos Policlorados Hidroxilados se Unen Selectivamente a la Transtiretina en la Sangre e Inhiben la Amiloidogénesis

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

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

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

Selectividad de Unión de PCB y OH-PCB para Transtiretina en Plasma de Sangre Humana

Se evaluó la selectividad de unión de ocho PCB (compuestos 1-8, Fig. 5) que, según se ha informado, desplazan la hormona tiroidea de la TTR con un valor de CI_{50} menor de 50 nM y catorce OH-PCB (compuestos 9-22, Fig. 6), metabolitos de PCB conocidos que, según se ha informado, se unen a TTR o reducen los niveles de tiroxina en ratones o ratas. Se establecieron los límites inferiores sobre la estequiometría de unión de PCB a TTR en plasma usando anticuerpos policlonales contra TTR unidos covalentemente a una resina de sepharose que se mezcló con plasma sanguíneo humano pretratado con PCB u OH-PCB (10,8 μ M). Después del lavado, se evaluó la estequiometría de unión de PCB u OH-PCB a TTR ($\approx 5 \mu$ M) por HPLC de fase inversa.

Hasta dos PCB pueden unirse a los dos sitios de unión de hormona tiroidea idénticos en un tetrámero de TTR. Con la excepción de los PCB 1 & 3, los PCB no hidroxilados restantes presentaron una selectividad de unión relativamente baja para la TTR plasmática (Tabla 4). Por el contrario, los OH-PCB mostraron una selectividad de unión de buena a excelente para la TTR plasmática (Tabla 5). Varios de los PCB hidroxilados (por ejemplo, 16 y 22) se aproximan a una estequiometría de unión de 2. La selectividad de unión de los OH-PCB en sangre entera es muy similar a la observada en plasma, por lo tanto, las membranas de eritrocitos no complejan significativamente los OH-PCB estudiados.

ES 2 312 857 T3

TABLA 4

Estequiometría de Unión de PCB a TTR en Plasma Sanguíneo Humano

Compuesto	Equivalentes Unidos
3	1,50 ± 0,42
1	0,62 ± 0,12
6	0,19 ± 0,11
2	0,18 ± 0,03
5	0,06 ± 0,04
4	0,05 ± 0,04
7	Sin unión
8	Sin unión

TABLA 5

Estequiometría de Unión de PCB Hidroxilados a TTR en Plasma Sanguíneo Humano

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

La captura de anticuerpos del complejo de TTR-PCB podría infraestimar la estequiometría de unión de PCB debido a la disociación de PCB de la TTR durante las 5 etapas de lavado. Se incubaron PCB y OH-PCB (10,8 μ M) con TTR recombinante (3,6 μ M) para evaluar la estequiometría de moléculas pequeñas unidas a la TTR inmovilizada después de cada etapa de lavado. La estequiometría se redujo en 10-17% para PCB 2 y OH-PCB 18 después de 5 lavados, mientras que para el PCB 4 se redujo en 45%. La cuantificación de pérdidas asociadas con el lavado permite estimar la verdadera estequiometría de unión de PCB y OH-PCB en plasma. Además, una buena correlación entre la estequiometría final

del OH-PCB unido a TTR recombinante y la cantidad unida a TTR en plasma indica que el compuesto es un agente de unión a TTR muy selectivo en plasma, por ejemplo, OH-PCB 18. Por el contrario, los PCB 2 y 4 presentan una estequiometría de unión a TTR mayor en tampón que en plasma, lo que sugiere claramente que se unen a proteínas competidoras, así como a la TTR en plasma.

Inhibición de Fibrillas de Amiloide de TTR por PCB Hidroxilados

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

Unión de OH-PCB 18 a TTR

Los experimentos previos de espectrometría de masas sugieren que el OH-PCB 18 presenta una cooperatividad de unión positiva con dos sitios de unión a hormona tiroidea relacionados con C₂ de la TTR. Cuando se añaden cantidades subestequiométricas (<1:1) de 18 a TTR, las especies predominantes observadas en el espectrómetro de masas son apo-TTR y el complejo TTR·18₂, lo cual es coherente con la unión cooperativa de forma positiva. Las características de unión a TTR de 18 son contrarias a las presentadas con otros numerosos inhibidores de fibrillas de amiloide de TTR que se unen con cooperatividad negativa.

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

Estructuras Co-cristalinas de OH-PCB 12, 16, 17 y 18

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

Unión de OH-PCB a TTR

La estructura de rayos X de 1,8 Å del complejo TTR·18₂ demuestra que el inhibidor tiene una excelente complementariedad estérica con el sitio de unión a TTR. La mecánica molecular (Insight II, Accelrys) indica que la conformación no unida de 18 está próxima a su estructura unida. La estructura refinada define interacciones electrostáticas directas y mediadas por agua que contribuyen a la unión de alta afinidad de 18. Uno de los anillos aromáticos sustituidos de forma idéntica con 3-Cl, 4-OH, 5-Cl ocupa el hueco de unión interno, proyectando sus sustituyentes cloro en los HPB 3 y 3'. Las cadenas laterales de la Ser 117 y la Thr 119 adoptan una conformación alternativa por rotación alrededor de sus enlaces C α -C β como se aprecia por los mapas de densidad electrónica no sesgados. La cadena lateral de Ser 117 adopta las tres conformaciones de rotámero como se aprecia por la distribución de la densidad electrónica. De manera interesante, dos moléculas de agua están localizadas entre los restos de Ser 117 adyacentes en el eje doble con 50% de ocupación, facilitando una red de enlaces de hidrógeno que conectan los restos de Ser 117, las moléculas de agua próximas y la funcionalidad fenol de 18. Basándose en la inspección de la estructura no está clara la razón

de que 18 se una con un comportamiento cooperativo positivamente o no. El otro anillo sustituido de forma idéntica ocupa el hueco de unión a TTR exterior con sus halógenos que se proyectan al interior de los HBP 1 y 1'.

El Compuesto 16 se Une a TTR

El anillo fenólico tri-sustituido con 3-Cl, 4-OH, 5-Cl de 16 está orientado hacia el interior del sitio de unión interno de TTR formando las mismas interacciones electrostáticas e hidrófobas con TTR que forma este anillo en la estructura de TTR·18₂ descrita anteriormente. El anillo aromático 3,4-diclorado ocupa el hueco de unión exterior, con el halógeno dirigido hacia el interior de los HBP-1 o 1' dependiendo del modo de unión equivalente de simetría que se considere. La densidad electrónica de 16, al igual que la de OH-PCB 18, es simétrica y, por lo tanto, no es posible colocar el OH para y el Cl para de forma inequívoca basándose en el mapa de densidad electrónica. El mapa de densidad electrónica no sesgado es coherente con tres conformaciones de rotámero de la Ser 117 y contiene dos moléculas de agua entre los restos de Ser 117, de forma análoga a la estructura de TTR·18₂.

Unión de OH-PCB 17 a TTR

El inhibidor 17 se une al anillo arilo sustituido con 3-Cl, 4-OH, 5-Cl orientado hacia el interior del hueco de unión interno utilizando las mismas interacciones que usa este anillo en las estructuras TTR·16₂ y TTR·18₂ descritas anteriormente. El anillo 2,3,4-tri-clorado ocupa el hueco de unión externo utilizando interacciones con HBP-1, HBP-1', HBP-2 y HBP-2' en los dos modos de unión equivalentes de simetría. Las múltiples conformaciones de Ser 117 y las dos moléculas de agua conservadas también son características de la estructura TTR·17₂. Según los mapas de densidad electrónica no sesgados fue evidente un cambio conformacional de la cadena lateral de Thr 119.

El Compuesto 12 se Une a TTR

El biarilo 12 pone su anillo arilo sustituido con 3-Cl, 4-OH en el hueco de unión externo, interaccionando sus dos cloros con HBP-1 y 1'. Esto contrasta con las estructuras de TTR·16₂ y TTR·17₂ donde el fenol está localizado en el hueco de unión interno. El grupo hidroxilo (probablemente en forma ionizada) está dentro de la distancia de enlace de hidrógeno de las cadenas laterales de la Lys 15. El anillo tetra-clorado se sitúa en el hueco de unión interno donde los halógenos están orientados en HBP 2 y 2' así como 3 y 3'. Las cadenas laterales de Ser 117 y Thr 119 adoptan conformaciones que son idénticas a las encontradas en la estructura de apo-TTR, a diferencia de la situación en 16, 17 y 18.

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

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

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

sea amiloidogénica a pH 4,4 porque TTR-18 y TTR-18₂ son incompetentes para formar amiloide, el resto de TTR (1,18 μM) forma amiloide de forma muy ineficaz debido a su baja concentración. Las velocidades de disociación de los mejores inhibidores de OH-PCB también pueden ser menores que las esperadas debido al templado estructural de TTR alrededor del OH-PCB, pero esto aún no se ha evaluado tan cuidadosamente como se necesita. Como mínimo, estos compuestos proporcionan directrices para la síntesis de inhibidores excepcionales o pueden resultar útiles por sí mismos como inhibidores dependiendo de su perfil de toxicidad.

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

La orientación del anillo fenólico hacia el interior del hueco de unión interno parece jugar un papel importante, ya que permite que se forme una red de enlaces de hidrógeno mediados por agua entre él y las subunidades de TTR vecinas, que supuestamente estabiliza adicionalmente la estructura cuaternaria nativa de TTR. Un red de enlaces de H en la que están implicadas las tres conformaciones escalonadas de Ser 117, el grupo fenólico del inhibidor y las dos moléculas de agua conservadas crea una red electrostática que interconecta las dos subunidades que forman el sitio de unión de PCB. En las tres estructuras, Thr 119 también ocupa múltiples conformaciones de rotámero. Por el contrario, esta red de interacciones electrostáticas está ausente en el complejo 12₂-TTR en el que el anillo de fenilo sustituido con hidroxilo está orientado en el hueco de unión exterior y donde la Ser 117 y la Thr 119 adoptan conformaciones de cadenas laterales apo.

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

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

Materiales y métodos

Purificación de Anticuerpo contra Transtiretina y Conjugación con Sepharose

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

Preparación de Plasma Humano

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

Inmunoprecipitación de Transtiretina y PCB Unidos

Se rellenó un tubo eppendorf de 2 ml con 1,5 ml de plasma sanguíneo humano y 7,5 μl de una solución en DMSO 2,16 mM de PCB bajo evaluación. Esta solución se incubó a 37°C durante 24 h. Se añadió una suspensión 1:1 de

resina/TSA (187 μ l) de Sepharose inactivada a la solución y se agitó suavemente a 4°C durante 1 h. La solución se centrifugó (16.000 x g) y el sobrenadante se dividió en 3 alícuotas de 400 μ l cada una. Cada una de éstas se añadió a 200 μ l de una suspensión 1:1 de resina/TSA de la Sepharose conjugada con anticuerpo anti-transtiretina y se agitó lentamente a 4°C durante 20 min. Las muestras se centrifugaron (16.000 x g) y se retiró el sobrenadante. La resina se lavó con 1 ml de TSA/Saponina al 0,05% (Acros) (3 x 10 min) a 4°C y además con 1 ml de TSA (2 x 10 min) a 4°C. Las muestras se centrifugaron (16.000 x g), se retiró el lavado final y se añadieron 155 μ l de trietilamina 100 mM, pH 11,5 para eluir la TTR y las moléculas pequeñas unidas de los anticuerpos. Después de una agitación suave a 4°C durante 30 min, las muestras se centrifugaron (16.000 x g) y se retiraron 145 μ l del sobrenadante, que contenía TTR e inhibidor.

10 *Análisis de HPLC y Cuantificación de Transtiretina y PCB Unidos*

Las muestras de elución de sobrenadante de las perlas de anticuerpo contra TTR (145 μ l) se cargaron en un auto-muestreador Waters 71P. Se separó una inyección de 135 μ l de cada muestra en una columna de fase inversa C18 Keystone de 3 cm utilizando un gradiente de 40-100% de B durante 8 min (A: 94,8% de H₂O/5% de acetonitrilo/0,2% de TFA; B: 94,8% de acetonitrilo/5% de H₂O/0,2% de TFA), controlado por un sistema de administración de multi-disolvente Waters 600E. La detección se realizó a 280 nm con un detector de absorbancia sintonizable Waters 486 y los picos se integraron para dar el área de TTR y de la molécula pequeña. Para determinar la cantidad de cada especie, se inyectaron cantidades conocidas de TTR tetramérica o PCB en la HPLC. Los picos se integraron para crear curvas de calibración a partir de regresiones lineales de los datos usando Kaleidagraph (Synergy Software). Las curvas de calibración se usaron para determinar el número de moles de cada especie presentes en las muestras de plasma. Se calculó la relación entre la molécula pequeña y la proteína para producir la estequiometría de la molécula pequeña unida a TTR en plasma.

25 *Ensayo de Formación de Fibrillas Amiloide de Transtiretina*

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

Calorimetría de Valoración Isotérmica de PCB 18 y TTR

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

45 *Cristalización y Recogida de Datos de Rayos X*

Se obtuvieron cristales de TTR recombinante a partir de soluciones de proteína a 5 mg/ml (en KCl 100 mM, fosfato 100 mM, pH 7,4, sulfato amónico 1 M) equilibradas frente a sulfato amónico 2 M en experimentos de gotas colgantes. Los complejos de TTR-ligando se prepararon a partir de cristales humedecidos durante 2 semanas con un exceso molar de 10 veces del ligando para asegurar una saturación completa de los dos sitios de unión. Como agente para humedecer se usó una solución 1:1 de acetona:agua. Para recoger los datos se usó un sistema de placas de imágenes DIP2030b (MAC Science, Yokohama, Japón) acoplado a un generador de rayos X de ánodo giratorio RU200. Los cristales se pusieron en aceite paratone como crioprotector y se enfriaron a 120 K para los experimentos de difracción. Los cristales de todos los complejos de TTR-ligando son isomorfos, conteniendo la forma de cristal apo dimensiones de celda unitaria a=43 Å, b=86 Å y c=65 Å. Pertenecen al grupo espacial P2₁2₁2 y contienen la mitad del homotetrámero en la unidad asimétrica. Los datos se redujeron con DENZO y SCALEPACK.

Determinación de la Estructura y Refinado

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

En los tres casos, la conformación de mínima energía del inhibidor calculada por el programa InsightII (Accelrys) estaba de acuerdo con el mapa. Debido al eje de simetría cristalográfico doble a lo largo del canal de unión debe aplicarse un modelo de trastorno estadístico, que da lugar a dos modos de unión de ligando en cada uno de los dos sitios de unión de la TTR tetramérica. Se añadieron moléculas de agua basándose en el mapa de densidad electrónica no sesgado. Debido a la falta de densidades electrónicas interpretables en el mapa final, en el modelo final no se incluyeron los 9 restos N-terminales y los tres restos C-terminales.

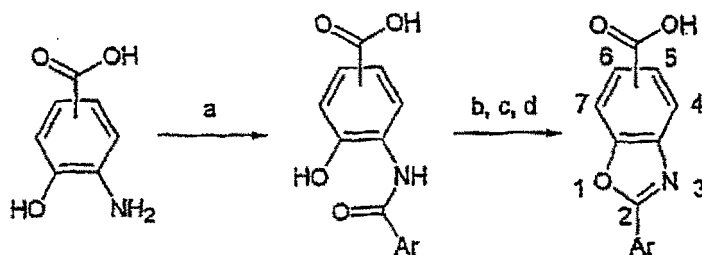
Ejemplo 5

Benzoxazoles como Inhibidores de Fibrillas de Amiloide de Transtiretina

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

Esquema 1

Síntesis General de Benzoxazoles



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

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

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

Para confirmar que 20 inhibe la formación de fibrillas de TTR uniéndose fuertemente al tetrámero, se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación y calorimetría de valoración isotérmica (ITC) con TTR wt. La ITC demostró que los dos equivalentes de 20 se unen con constantes de disociación medias de $K_{d1}=K_{d12}=55 (\pm 10) \text{ nM}$ en condiciones fisiológicas. Estos valores son comparables a las constantes de disociación de muchos otros inhibidores de la amiloidogénesis de TTR eficaces. Para los experimentos de la velocidad de sedimentación, se incubó TTR ($3,6 \mu\text{M}$) con 20 ($3,6 \mu\text{M}$, $7,2 \mu\text{M}$, $36 \mu\text{M}$) en condiciones óptimas para la formación de fibrillas (72 horas, pH 4,4, 37°C). El tetrámero (55 kDa) fue la única especie detectable en solución con 20 a $7,2$ o $36 \mu\text{M}$. Se formaron algunos agregados grandes con 20 a $3,6 \mu\text{M}$, pero el TTR que quedaba en solución era tetramérico.

La inclusión de subunidades de T119M y la unión de moléculas pequeñas prevenía la formación de amiloides de TTR elevando la barrera de activación para la disociación del tetrámero. La capacidad de un inhibidor para hacer esto se ensaya de forma más rigurosa midiendo su eficacia para ralentizar la disociación del tetrámero en urea 6 M, un estrés de desnaturalización severo. De esta forma, se compararon las velocidades de disociación del tetrámero de TTR en urea 6 M en presencia y ausencia de 20, 21 o 27 (Fig. 9). TTR (1,8 μ M) se desnaturalizó completamente después de 168 horas en urea 6 M. Por el contrario, 20 a 3,6 μ M previno la disociación del tetrámero durante al menos 168 horas ($> 3\times$ la vida media de TTR en plasma humano). Con una cantidad equimolar de 20, solo 27% de TTR se desnaturalizó en 168 horas. El compuesto 27 (3,6 μ M) tenía mucha menos capacidad de prevenir la disociación del tetrámero (90% de desplegamiento después de 168 horas) aunque era activo en el ensayo de formación de fibrillas. El compuesto 21 no impedía la disociación de TTR en absoluto. Estos resultados demuestran que el inhibidor que se une a TTR es necesario pero no suficiente para estabilizar cinéticamente al tetrámero de TTR en condiciones muy desnaturalizantes; también es importante que las constantes de disociación sean muy bajas (o que las velocidades de inactivación sean muy lentas). Además, la presentación de grupos funcionales en 20 aparentemente es óptima para estabilizar el tetrámero de TTR; al mover el ácido carboxílico de C(6) a C(7), como en 27, o retirar los cloros, como en 21, se reduce fuertemente su actividad.

El papel de los sustituyentes en 20 es evidente por su estructura co-cristalina con TTR (Fig. 10). El compuesto 20 orienta sus dos átomos de cloro cerca de los huecos de unión a halógeno 2 y 2' (denominados así porque están ocupados por yodos cuando la tiroxina se une a TTR). El patrón de sustitución 2,6 en los anillos de fenilo fuerza a los anillos de benzoxazol y fenilo a salir de la planaridad, colocándose óptimamente el ácido carboxílico del benzoxazol para formar enlaces de hidrógeno con los grupos ε -NH₃⁺ de Lys 15/15'. Las interacciones hidrófobas entre los anillos aromáticos de 20 y las cadenas laterales de Leu, 17, Leu 110, Ser 117 y Val 121 aportan una energía de unión adicional.

Métodos

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

Ultracentrifugación Analítica

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

Cristalización y Recogida de Datos de Rayos-X

Se obtuvieron cristales de TTR wt a partir de soluciones de proteína a 12 mg/ml (en KCl 100 mM, EDTA 1 mM, fosfato sódico 10 mM y sulfato amónico 0,35 M, pH 7,0) equilibrado frente a sulfato amónico 2 M en experimentos de gota colgante. El complejo de TTR-20 se preparó a partir de cristales empapados durante 3 semanas con un exceso molar de 10 veces del ligando para asegurar la saturación completa de los dos sitios de unión. El cristal empapado con ligando tuvo una difracción de hasta 1,55 Å en un detector Quantum-4 en la fuente de alta energía monocromática de 14-BM-C, BIOCARS, Advanced Photon Source (Argonne National Laboratory). Los cristales se empaparon en aceite Paratone y se enfriaron inmediatamente a 100 K para los experimentos de difracción. Los cristales del complejo de TTR-20 son isomorfos con la forma de cristal apo con dimensiones de celda unitaria $a = 43,1$ Å, $b = 84,7$ Å y $c = 64,7$ Å, grupo espacial P2₁2₁2 con dos subunidades TTR en la unidad asimétrica. Los datos se redujeron con DENZO y SCALEPACK del grupo HKL2000 (Otwinowski, 1997).

Determinación y Refinado de la Estructura

Como modelo de partida para las búsquedas de reemplazo molecular se usaron las coordenadas atómicas de proteínas para TTR del banco de datos de proteínas (número de acceso 1BMZ). El refinado de la estructura del complejo de TTR-20 se realizó usando los protocolos de dinámica molecular y de minimización de energía de CNS. Los mapas de Fourier de diferencias resultantes revelaron la unión del ligando en los dos huecos de unión del tetrámero de TTR. Usando estos mapas, el ligando podía colocarse de forma inequívoca en la densidad y se incluyó en el refinado cristalográfico. Como modelo inicial para el refinado cristalográfico se usó la conformación de energía mínima del inhibidor calculada por el programa Insight II (Accelrys Inc.). Como el eje de simetría cristalográfico duplicado está a lo largo del canal de unión, tuvo que aplicarse un modelo de trastorno estadístico, dando lugar a dos modos de unión

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

TABLA 6

Parámetros Estadísticos para la Estructura Cristalina de Rayos-X

Finalización (%) (global/cubierta exterior)	86/90
R _{sym} (global/cubierta exterior)	0,05/0,33
Parámetros estadísticos de refinado	
Resolución (Å)	33,02-1,55
Factor R/Sin R (%)	21,1/24,3
Longitud de enlace Rmsd (Å)	0,03
Ángulos de enlace Rmsd (°)	2,5
Otros parámetros estadísticos	
Dimensiones del cristal (mm)	0,3x0,2x0,15
Sistema cristalino	Ortorrómbico
Dimensiones de celda unitaria (a, b, c en Å)	43,1, 84,7, 64,7
Volumen de celda unitaria (Å ³)	236123
Resolución máxima (Å)	1,54
Modo de exploración	Phi
Temperatura de medición	100 K
Número de reflexiones independientes	30705
Método de solución de estructura	Reemplazo molecular por EPMR (Kissinger, 1999)
Refinado contra	F _{obs}
Diana de refinado	Máxima verosimilitud
Programa usado para el refinado	CNS-Solve (Brunger, 1998)
Base de datos	Banco de Datos de Proteínas

Síntesis de Benzoxazol - Métodos Generales

A menos que se indique otra cosa, todas las reacciones se realizaron en artículos de vidrio secados al horno en una atmósfera seca de argón usando un FirstMate Organic Synthesizer (Argonaut Technologies). Todos los disolventes (anhídros) y reactivos se adquirieron en Aldrich y se usaron sin purificación adicional. Los espectros de ¹H RMN se midieron a 500 MHz en un espectrómetro Broker DRX-500 o a 600 MHz en un espectrómetro Bruker DRX-600, y usaron como referencia CHD₂-S(O)-CD₃ (2,49 ppm) como patrón interno. Los espectros de ¹³C se realizaron a 125 MHz en un Bruker DRX-500 o a 150 MHz en un instrumento Bruker DRX-600 y utilizaron como referencia

(CD₃)₂SO (39,5 ppm). Los análisis cromatográficos de capa fina se realizaron en placas analíticas de capa fina con soporte de vidrio (Kieselgel 60 F254, 0,25 mm, EM Science n° 5715-7). La visualización se realizó usando absorbancia UV o ácido fosfomolibdico al 10% en etanol. La cromatografía se realizó en un cromatotrón (Harrison Research, Model 7924T, placa de 2 mm) o en una placa de gel de sílice preparativa (Kieselgel 60 F254, 1 mm, EM Science n° 13895-7).

Procedimiento General para la Síntesis de Benzoxazol

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

A la mezcla de reacción en bruto se le añadió ácido *p*-toluenosulfónico monohidrato (380,4 mg, 2,0 mmol) en xilenos (5 ml) y la mezcla resultante se agitó a la temperatura de reflujo durante una noche. Después de 12 h, la reacción se enfrió a temperatura ambiente, se interrumpió con NaOH (2 ml, 1 N) y las fases se separaron. La capa acuosa se acidificó con HCl (1 N) a pH 2 y se extrajo con EtOAc (4 x 3 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo resultante se disolvió en una mezcla de MeOH:Benceno (2 ml; 1:4), se trató con TMSrCHN₂ (200 µl de una solución 2,0 M en hexanos, 0,4 mmol) a 25°C y el progreso de la reacción se controló por TLC (normalmente se completó después de 0,5 h). La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se cromatografió (gradiente de EtOAc del 10 al 25%/hexanos) para producir el éster metílico de benzoxazol deseado.

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

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

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

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

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

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

4-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol (6). Se preparó a partir de ácido 3-hidroxiantranílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 6 en forma de un sólido de color blanco (5,2 mg, 8%). Datos para 6: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,80-12,50 (s a, 1H, CO_2H), 8,07 (AMX, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar), 7,95 (AMX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 7,77-7,71 (m, 3H, Ar), 7,59 (AMX, 1H, $J = 7,9$, 8,2 Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 165,8, 158,2, 150,8, 139,3, 134,8, 134,0, 128,7, 126,8, 126,7, 125,9, 122,4; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 307,9876, encontrado 307,9880.

4-Carboxi-2-fenil-benzoxazol (7). Se preparó a partir de ácido 3-hidroxiantranílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 7 en forma de un sólido de color blanco (10,2 mg, 21%). Datos para 7: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,50-12,60 (s a, 1H, CO_2H), 8,24-8,22 (m, 2H, Ar), 8,03 (AMX, 1H, $J = 0,9$; 8,2 Hz, Ar), 7,91 (AMX, 1H, $J = 0,9$, 7,9 Hz, Ar), 7,68-7,61 (m, 3H, Ar), 7,51 (AMX, 1H, $J = 7,9$, 8,2 Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,0, 163,4, 151,0, 140,8, 132,4, 129,4, 127,6, 126,7, 126,1, 125,0, 123,0, 115,0; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_3$ (MH^+) 240,0655, encontrado 240,0656.

5-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol (8). Se preparó a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 8 en forma de un sólido de color blanco (10,2 mg, 19%). Datos para 8: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,60-12,80 (s a, 1H, CO_2H), 8,32 (ABM, 1H, $J = 1,5$ Hz, Ar), 8,07 (ABM, 1H, $J = 1,5$, 8,5 Hz, Ar), 7,90 (ABM, 1H, $J = 8,5$ Hz, Ar), 7,86-7,85 (m, 2H, Ar), 7,60 (tt, 1H, $J = 2,4$, 9,2 Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,8, 162,8 (d, $J = 248$ Hz), 162,7 (d, $J = 248$ Hz), 161,5, 153,0, 141,2, 129,1 (t, $J = 11$ Hz), 128,2, 127,7, 121,4, 111,2, 110,8 (d, $J = 23$ Hz), 110,7 (d, $J = 22$ Hz), 107,8 (t, $J = 26$ Hz); HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 276,0467, encontrado 276,0469.

5-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol (9). Se preparó a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 9 en forma de un sólido de color blanco (6,8 mg, 12%). Datos para 9: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,50-12,80 (s a, 1H, CO_2H), 8,39 (ABM, 1H, $J = 0,7$, 1,6 Hz, Ar), 8,10 (ABM, 1H, $J = 1,6$, 8,7 Hz, Ar), 7,95 (ABM, 1H, $J = 0,7$, 8,7 Hz, Ar), 7,77 (m, 1H, Ar), 7,40 (t, 2H, $J = 8,8$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,8, 160,4 (d, $J = 257$ Hz), 160,3 (d, $J = 257$ Hz), 155,4, 152,6, 140,8, 134,8 (t, $J = 11$ Hz), 128,2, 127,7, 121,6, 113,0 (d, $J = 22$ Hz), 112,9 (d, $J = 22$ Hz), 111,2, 104,9; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 276,0467, encontrado 276,0467.

5-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol (10). Se preparó a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 10 en forma de un sólido de color blanco (6,7 mg, 11%). Datos para 10: ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,30-12,80 (s a, 1H, CO_2H), 8,51 (ABX, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar), 8,45 (s, 1H, Ar), 8,35 (ABM, 1H, $J = 1,7$ Hz, Ar), 8,08 (ABM, 1H, $J = 1,7$, 8,6 Hz, Ar), 8,04 (ABX, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar), 7,93 (ABM, 1H, $J = 8,6$ Hz, Ar), 7,89 (ABX, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ 166,8, 162,2, 153,1, 141,4, 131,4, 130,9, 130,1 (c, $J = 33$ Hz), 128,8, 128,2, 127,5, 127,1, 123,8 (c, $J = 4$ Hz), 123,7 (c, $J = 273$ Hz), 121,3, 111,2; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_2$ (MH^+) 308,0529, encontrado 308,0530.

5-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol (11). Se preparó a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 11 en forma de un sólido de color blanco (10,3 mg, 17%). Datos para 11: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,19 (s a, 1H, CO_2H), 8,38 (m, 1H, Ar), 8,19 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, Ar), 8,09 (dd, 1H, $J = 1,8$, 8,5 Hz, Ar), 8,03 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 7,94-7,88 (m, 3H, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,8, 161,6, 153,2, 141,1, 133,1, 132,5, 132,4, 128,2, 127,6, 127,5 (c, $J = 32$ Hz), 127,2 (c, $J = 6$ Hz), 124,7, 123,4 (c, $J = 274$ Hz), 121,6, 111,2; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3$ (MH^+) 308,0529, encontrado 308,0531.

5-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol (12). Se preparó a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 12 en forma de un sólido de color blanco (7,3 mg, 12%). Datos para 12: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,14 (s a, 1H, CO_2H), 8,33 (AMX, 1H, $J = 0,6$, 1,8 Hz, Ar), 8,16 (AM, 2H, $J = 1,8$ Hz, Ar), 8,08 (AMX, 1H, $J = 1,8$, 8,5 Hz, Ar), 7,95 (AM, 1H, $J = 1,8$ Hz, Ar), 7,91 (AMX, 1H, $J = 0,6$, 8,5 Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,7, 161,1, 153,0, 141,3, 135,2, 131,6, 129,2, 128,2, 127,7, 125,9, 121,4, 111,3; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 307,9876, encontrado 307,9879.

5-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol (13). Se preparó a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 13 en forma de un sólido de color blanco (10,8 mg, 18%). Datos para 13: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,08 (s a, 1H, CO_2H), 8,43 (AMX, 1H, $J = 0,6$, 1,8 Hz, Ar), 8,13 (AMX, 1H, $J = 1,8$, 8,5 Hz, Ar), 7,98 (AMX, 1H, $J = 0,6$, 8,5 Hz, Ar), 7,77-7,72 (m, 3H, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,7, 158,6, 152,8, 140,4, 134,8, 134,2, 128,8, 128,4, 127,8, 126,2, 121,8, 111,5; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 307,9876, encontrado 307,9879.

5-Carboxi-2-fenil-benzoxazol (14). Se preparó a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 14 en forma de un sólido de color blanco (11,5 mg, 24%). Datos para 14: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,12 (s a, 1H, CO_2H), 8,30 (ABX, 1H, $J = 1,8$ Hz, Ar), 8,20 (dt, 2H, $J = 1,5$, 6,7 Hz, Ar), 8,03 (ABX, 1H, $J = 1,8$, 8,5 Hz, Ar), 7,87 (ABX, 1H, $J = 8,5$ Hz, Ar), 7,67-7,60 (m, 3H, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,9, 163,6, 153,0, 141,6, 132,4, 129,4, 127,9, 127,5, 127,0, 126,0, 121,0, 111,0; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_3$ (MH^+) 240,0655, encontrado 240,0656.

6-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol (15). Se preparó a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 15 en forma de un sólido de color blanco (10,3 mg, 19%). Datos para 15: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,22 (s a, 1H, CO_2H), 8,20 (ABM, 1H, $J = 1,5$ Hz, Ar), 7,98 (ABM, 1H, $J = 1,5, 8,2$ Hz, Ar), 7,86 (ABM, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar), 7,79-7,78 (m, 2H, Ar), 7,57 (tt, 1H, $J = 2,4, 9,4$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,7, 162,7 (d, $J = 248$ Hz), 162,6 (d, $J = 248$ Hz), 162,4, 150,0, 144,7, 129,0 (t, $J = 11$ Hz), 128,7, 126,5, 120,0, 112,1, 110,9 (d, $J = 23$ Hz), 110,8 (d, $J = 22$ Hz), 108,0 (t, $J = 26$ Hz); HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 276,0467, encontrado 276,0468.

6-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol (16). Se preparó a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 16 en forma de un sólido de color blanco (8,5 mg, 15%). Datos para 16: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,25 (s a, 1H, CO_2H), 8,30 (ABM, 1H, $J = 0,6, 1,5$ Hz, Ar), 8,04 (ABM, 1H, $J = 1,5, 8,2$ Hz, Ar), 7,96 (ABM, 1H, $J = 0,6, 8,2$ Hz, Ar), 7,76 (m, 1H, Ar), 7,39 (t, 2H, $J = 8,8$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,7, 160,4 (d, $J = 257$ Hz), 160,3 (d, $J = 257$ Hz), 156,6, 149,7, 144,2, 134,9 (t, $J = 11$ Hz), 128,8, 126,4, 120,4, 113,1, 112,9, 112,2 (d, $J = 5$ Hz), 105,0 (t, $J = 16$ Hz); HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 276,0467, encontrado 276,0466.

6-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol (17). Se preparó a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 17 en forma de un sólido de color blanco (7,4 mg, 12%). Datos para 17: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,20 (s a, 1H, CO_2H), 8,48 (ABX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 8,41 (s, 1H, Ar), 8,28 (ABM, 1H, $J = 1,5$ Hz, Ar), 8,03 (ABX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 8,02 (ABM, 1H, $J = 1,5, 8,2$ Hz, Ar), 7,90 (ABM, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar), 7,86 (ABX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 168,0, 164,6, 151,4, 146,2, 132,8, 132,2, 131,4 (c, $J = 32$ Hz), 130,2, 129,8, 128,4, 127,8, 125,2, 125,0 (c, $J = 272$ Hz), 121,2, 113,6; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3$ (MH^+) 308,0529, encontrado 308,0530. HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3$ (MH^+) 308,0529, encontrado 308,0531.

6-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol (18). Se preparó a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 18 en forma de un sólido de color blanco (6,6 mg, 11%). Datos para 18: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,22 (s a, 1H, CO_2H), 8,30 (ABX, 1H, $J = 0,6, 1,5$ Hz, Ar), 8,20 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz, Ar), 8,06 (ABX, 1H, $J = 1,5, 8,2$ Hz, Ar), 8,04 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 7,98 (ABX, 1H, $J = 0,6, 8,2$ Hz, Ar), 7,94 (t, 1H, $J = 7,3$ Hz, Ar), 7,90 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 168,0, 164,0, 151,6, 145,9, 133,8, 130,0, 129,0 (c, $J = 32$ Hz), 128,6 (c, $J = 6$), 127,7, 126,0, 124,7 (c, $J = 273$ Hz), 121,6, 113,6; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3$ (MH^+) 308,0529, encontrado 308,0530.

6-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol (19). Se preparó a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 19 en forma de un sólido de color blanco (6,0 mg, 10%). Datos para 19: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,20 (s a, 1H, CO_2H), 8,17 (ABX, 1H, $J = 0,6, 1,5$ Hz, Ar), 8,00 (AB, 1H, $J = 2,0$ Hz, Ar), 7,96 (ABX, 1H, $J = 1,5, 8,5$ Hz, Ar), 7,83 (AB, 1H, $J = 2,0$ Hz, Ar), 7,82 (ABX, 1H, $J = 0,6, 8,5$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,6, 161,9, 150,0, 144,6, 135,1, 131,6, 129,0, 128,7, 126,4, 125,8, 119,9, 112,1; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 307,9876, encontrado 307,9879.

6-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol (20). Se preparó a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 20 en forma de un sólido de color blanco (12,7 mg, 21%). Datos para 20: ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,27 (s a, 1H, CO_2H), 8,38 (ABX, 1H, $J = 0,5, 1,5$ Hz, Ar), 8,09 (ABX, 1H, $J = 1,5, 8,3$ Hz, Ar), 8,02 (ABX, 1H, $J = 8,3, 0,5$ Hz, Ar), 7,78-7,71 (m, 3H, Ar); ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ 166,6, 159,8, 150,0, 143,8, 134,8, 134,2, 129,1, 128,8, 126,4, 126,3, 120,4, 112,6; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 307,9876, encontrado 307,9877.

6-Carboxi-2-fenil-benzoxazol (21). Se preparó a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 21 en forma de un sólido de color blanco (7,0 mg, 15%). Datos para 21: ^1H RMN. (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,16 (s a, 1H, CO_2H), 8,27 (d, 1H, $J = 0,9$ Hz, Ar), 8,25-8,22 (m, 2H, Ar), 8,01 (dd, 1H, $J = 1,5, 8,5$ Hz, Ar), 7,89 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, Ar), 7,69-7,62 (m, 3H, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,8, 164,7, 150,0, 145,2, 132,6, 129,4, 128,0, 127,6, 126,3, 126,0, 119,6, 112,0; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_3$ (MH^+) 240,0655, encontrado 240,0655.

7-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol (22). Se preparó a partir de ácido 3-aminosalicílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 22 en forma de un sólido de color blanco (8,8 mg, 16%). Datos para 22: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,55 (s a, CO_2H), 8,10 (AMX, 1H, $J = 1,2, 7,9$ Hz, Ar), 7,97 (AMX, 1H, $J = 1,2, 7,9$ Hz, Ar), 7,80-7,79 (m, 2H, Ar), 7,63 (tt, 1H, $J = 2,4, 9,2$ Hz, Ar), 7,55 (AMX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,5, 162,8 (d, $J = 248$ Hz), 162,6 (d, $J = 248$ Hz), 160,9, 149,2, 142,6, 129,2, 128,0, 125,2, 124,9, 116,1, 110,6 (d, $J = 28$ Hz), 107,7 (c, $J = 25$ Hz); HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 276,0467, encontrado 276,0469.

7-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol (23). Se preparó a partir de ácido 3-aminosalicílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 23 en forma de un sólido de color blanco (7,3 mg, 13%). Datos para 23: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,48 (s a, 1H, CO_2H), 8,16 (ABX, 1H, $J = 1,2, 8,2$ Hz, Ar), 8,00 (ABX, 1H, $J = 1,2, 7,6$ Hz, Ar), 7,78 (m, 1H, Ar), 7,57 (ABX, 1H, $J = 7,6, 8,2$ Hz, Ar), 7,40 (t, 2H, $J = 8,5$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,5, 160,4 (d, $J = 256$ Hz), 160,3 (d, $J = 257$ Hz), 154,9, 148,9, 142,1, 134,8 (t, $J = 10$ Hz), 128,0, 125,1, 125,0, 116,0, 113,0 (d, $J = 22$ Hz), 112,9 (c, $J = 21$ Hz), 105,1 (t, $J = 17$ Hz); HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 276,0467, encontrado 276,0467.

ES 2 312 857 T3

7-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil-benzoxazol (24). Se preparó a partir de ácido 3-aminosalicílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 24 en forma de un sólido de color blanco (7,9 mg, 13%). Datos para 24: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,51 (s a, CO_2H), 8,48 (ABX, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar), 8,40 (s, 1H, Ar), 8,10 (AMX, 1H, $J = 1,2$, 7,9 Hz, Ar), 8,05 (ABX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 7,96 (AMX, 1H, $J = 1,2$, 7,6 Hz, Ar), 7,94 (ABX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 7,54 (AMX, 1H, $J = 7,9$, 7,6 Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,6, 161,7, 149,3, 142,7, 131,3, 131,0, 130,0 (c, $J = 32$ Hz), 128,6 (d, $J = 3$ Hz), 127,7, 127,2, 125,0, 124,8, 123,7 (c, $J = 212$ Hz), 123,5, 116,0; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3$ (MH $^+$) 308,0529, encontrado 308,0532.

7-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol (25). Se preparó a partir de ácido 3-aminosalicílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 25 en forma de un sólido de color blanco (13,8 mg, 22%). Datos para 25: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,46 (s a, 1H, CO_2H), 8,18 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, Ar), 8,14 (AMX, 1H, $J = 1,2$, 7,9 Hz, Ar), 8,03 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 7,98 (AMX, 1H, $J = 1,2$, 7,6 Hz, Ar), 7,94 (t, 1H, $J = 7,3$ Hz, Ar), 7,89 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, Ar), 7,56 (AMX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,6, 161,1, 149,3, 142,4, 133,0, 132,4, 132,2, 127,8, 127,6, 127,2 (c, $J = 6$ Hz), 125,0, 124,9, 123,4 (c, $J = 273$ Hz), 116,2; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3$ (MH $^+$) 308,0529, encontrado 308,0534.

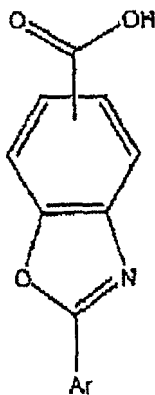
7-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol (26). Se preparó a partir de ácido 3-aminosalicílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 26 en forma de un sólido de color blanco (7,0 mg, 11%). Datos para 26: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14,00-12,80 (s a, CO_2H), 8,10-8,08 (m, 3H, Ar), 7,98-7,96 (m, 2H, Ar), 7,55 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,5, 160,5, 149,2, 142,6, 135,2, 131,5, 129,4, 128,0, 125,6, 125,2, 124,8, 116,2; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3$ (MH $^+$) 307,9876, encontrado 307,9874.

7-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol (27). Se preparó a partir de ácido 3-aminosalicílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 27 en forma de un sólido de color blanco (10,3 mg, 17%). Datos para 27: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,90-13,10 (s a, CO_2H), 8,16 (AMX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar), 8,02 (AMX, 1H, $J = 1,9$ Hz, Ar), 7,78-7,72 (m, 3H, Ar), 7,60 (AMX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,4, 158,3, 149,1, 141,7, 134,9, 134,2, 128,8, 128,2, 126,5, 125,3, 125,2, 116,2; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3$ (MH $^+$) 307,9876, encontrado, 307,9875.

7-Carboxi-2-fenil-benzoxazol (28). Se preparó a partir de ácido 3-aminosalicílico de acuerdo con el procedimiento general, para producir 28 en forma de un sólido de color blanco (13,1 mg, 27%). Datos para 28: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,48 (s a, 1H, CO_2H), 8,20-8,19 (m, 2H, Ar), 8,05 (AMX, 1H, $J = 1,2$, 7,9 Hz, Ar), 7,92 (AMX, 1H, $J = 1,2$, 7,6 Hz, Ar), 7,65-7,62 (m, 3H, Ar), 7,50 (AMX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,8, 163,1, 149,2, 142,9, 132,2, 129,4, 127,4, 127,2, 126,0, 124,7, 124,4; 115,8; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_3$ (MH $^+$) 240,0655, encontrado 240,0656.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde Ar es 3,5-difluorofenilo, 2,6-difluorofenilo, 3,5-diclorofenilo, 2,6-diclorofenilo, 2-(trifluorometil)fenilo o 3-(trifluorometil)fenilo.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es:

4-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol;

4-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol;

4-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol;

4-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol;

4-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol;

4-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol;

5-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol;

5-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol;

5-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol;

5-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol;

5-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol;

5-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol;

6-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol;

6-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol;

6-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol;

6-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol;

6-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol;

6-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol;

7-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol;

7-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol;

7-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol;

7-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol;

7-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol;

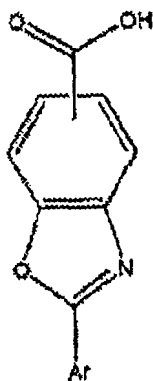
5 7-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol;

3. El uso de un compuesto de fórmula

10

15

20



25

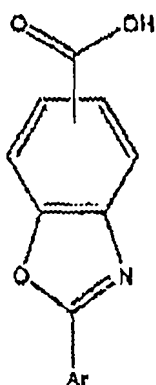
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde Ar es fenilo, 3,5-difluorofenilo, 2,6-difluorofenilo, 3,5-diclorofenilo, 2,6-diclorofenilo, 2-(trifluorometil)fenilo o 3-(trifluorometil)fenilo, para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad amiloide por transtiretina.

30

4. Un compuesto de fórmula

35

40



45

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde Ar es fenilo, 3,5-difluorofenilo, 2,6-difluorofenilo, 3,5-diclorofenilo, 2,6-diclorofenilo, 2-(trifluorometil)fenilo o 3-(trifluorometil)fenilo para tratar una enfermedad amiloide por transtiretina.

50

5. El uso de la reivindicación 3 o el compuesto de la reivindicación 4, donde el compuesto es:

55

4-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol;

4-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol;

4-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol;

60

4-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol;

4-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol;

4-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol;

65

4-Carboxi-2-fenil-benzoxazol;

5-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol;

ES 2 312 857 T3

5-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol;

5-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol;

5 5-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol;

5-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol;

5-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol;

10 5-Carboxi-2-fenil-benzoxazol;

6-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol;

15 6-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol;

6-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol;

6-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol;

20 6-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol;

6-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol;

25 6-Carboxi-2-fenil-benzoxazol;

7-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol;

7-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol;

30 7-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol;

7-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol;

35 7-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol;

7-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol;

7-Carboxi-2-fenil-benzoxazol;

40 6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 4-carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45 7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 4-carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 4-carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

50 9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 4-carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

55 10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 4-carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 4-carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

60 12. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 5-carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

13. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 5-carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

65 14. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 5-carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

ES 2 312 857 T3

15. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 5-carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

16. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 5-carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

17. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 5-carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

18. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 6-carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

19. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 6-carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 6-carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

21. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 6-carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

22. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 6-carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

23. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 6-carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

24. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 7-carboxi-2-(3,5-difluorofenil)-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 7-carboxi-2-(2,6-difluorofenil)-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

26. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 7-carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

27. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 7-carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

28. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 7-carboxi-2-(3,5-diclorofenil)-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

29. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 4 o el uso de la reivindicación 3, donde el compuesto es 7-carboxi-2-(2,6-diclorofenil)-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30. El uso de la reivindicación 3 o el compuesto de la reivindicación 4, donde el compuesto es 4-carboxi-2-fenil-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

31. El uso de la reivindicación 3 o el compuesto de la reivindicación 4, donde el compuesto es 5-carboxi-2-fenil-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

32. El uso de la reivindicación 3 o el compuesto de la reivindicación 4, donde el compuesto es 6-carboxi-2-fenil-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

33. El uso de la reivindicación 3 o el compuesto de la reivindicación 4, donde el compuesto es 7-carboxi-2-fenil-benzoxazol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

34. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 4 a 33, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 5 a 33, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es N-metil-D-glucamina.

35. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 4 a 34 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

36. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 35, en la que la composición farmacéutica se formula para administración de dosificación unitaria.

37. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 5 a 34 en el que la enfermedad amiloide por transtiretina es polineuropatía amiloide familiar, cardiomiopatía amiloide familiar, amiloidosis sistémica senil o amiloidosis cardiaca posterior a trasplante de órganos.

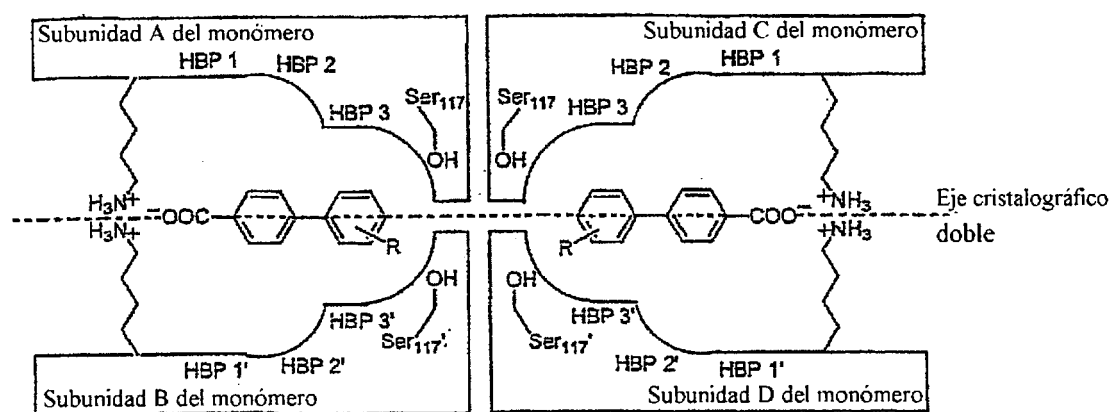


FIG. 1

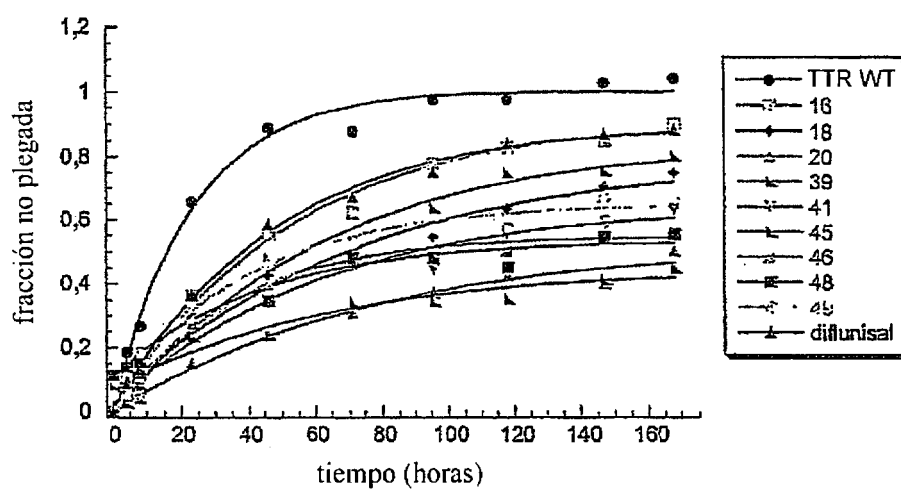


FIG. 2A

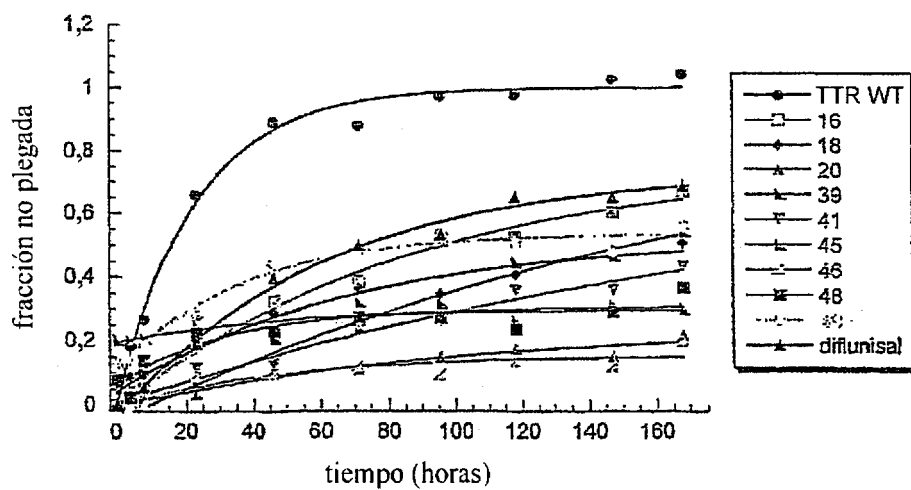


FIG. 2B

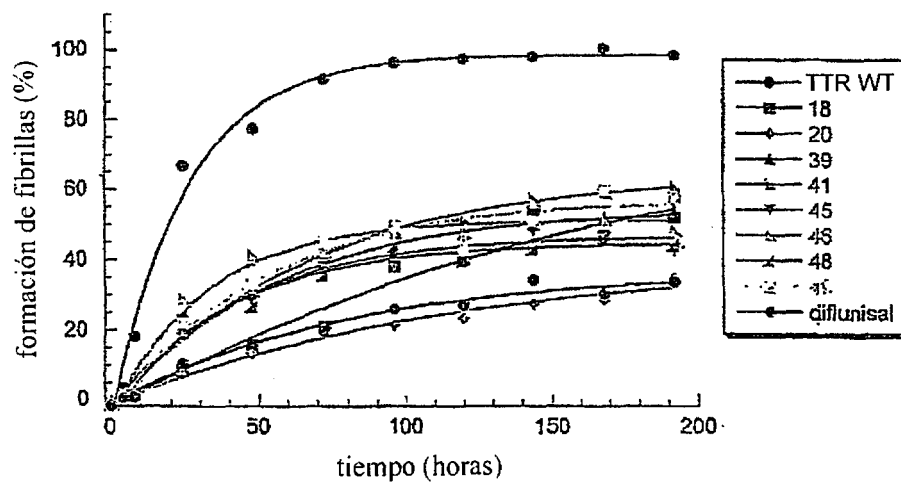


FIG. 3A

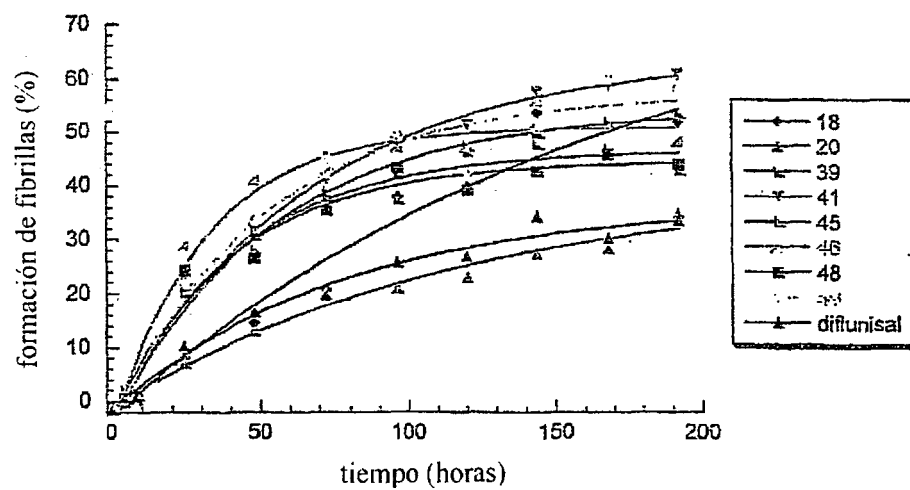


FIG. 3B

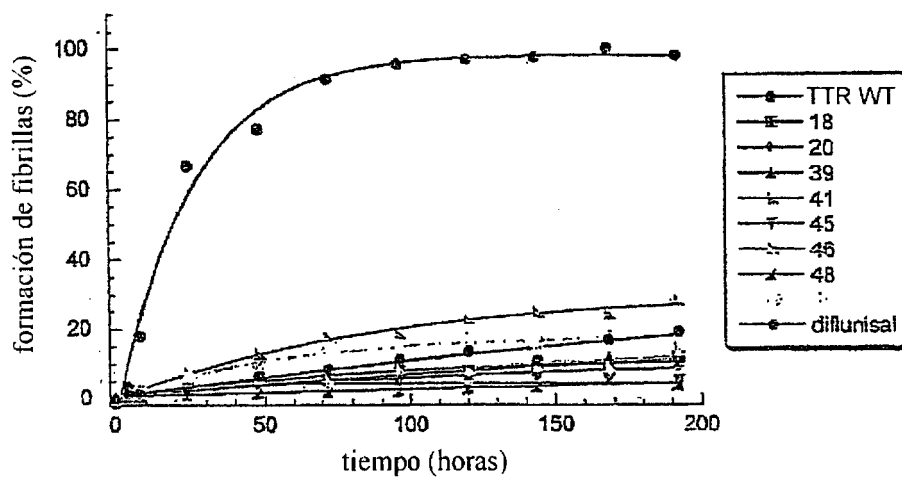


FIG. 4A

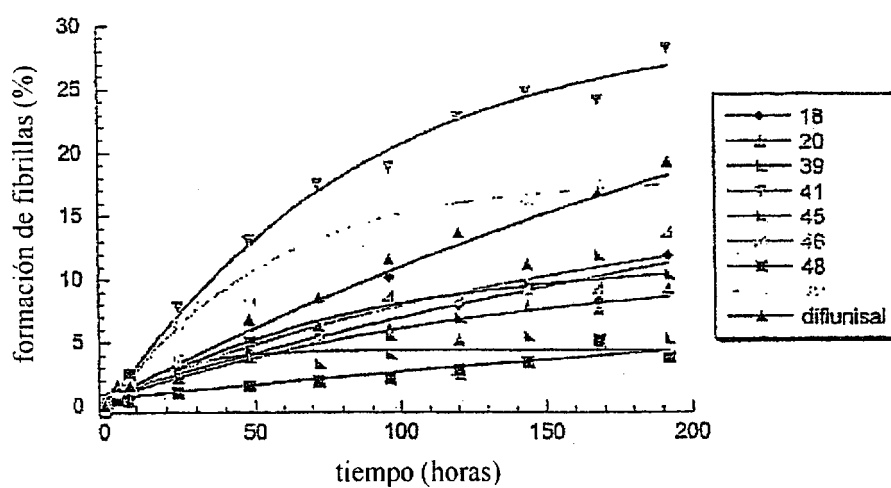


FIG. 4B

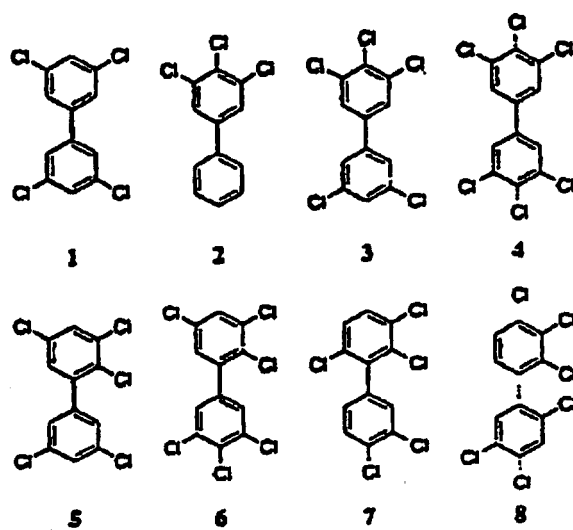


FIG. 5

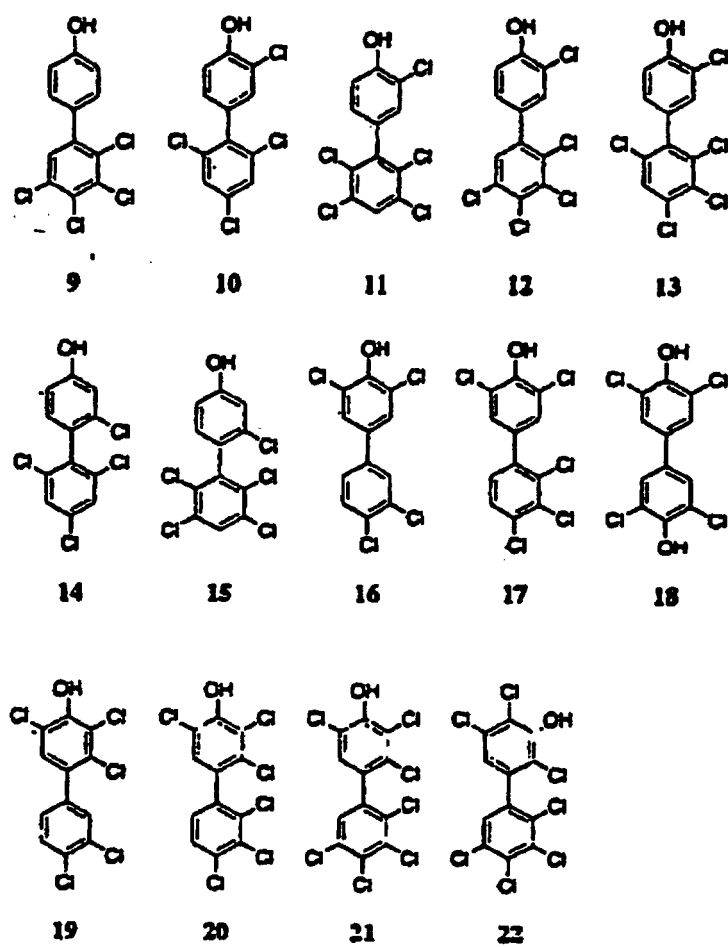


FIG. 6

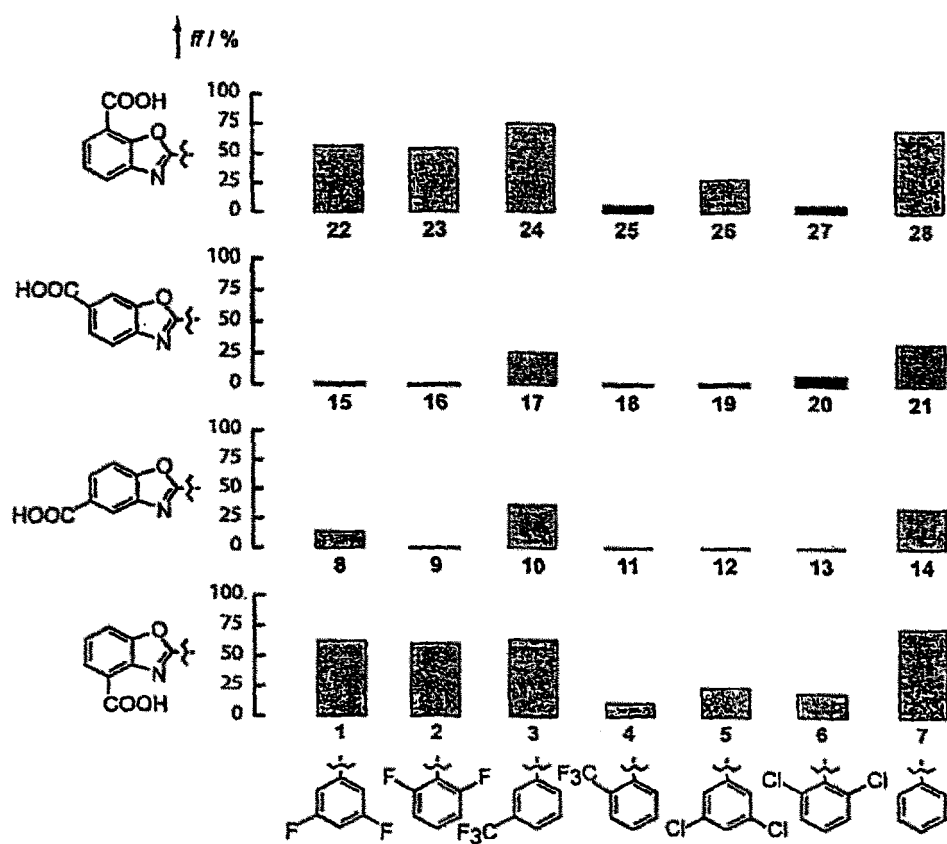


FIG. 7

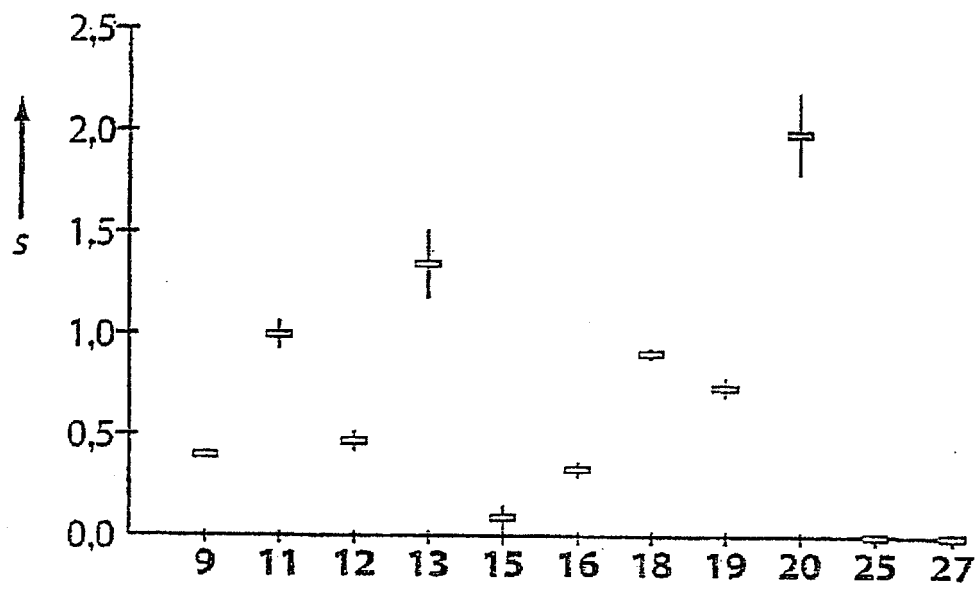


FIG. 8

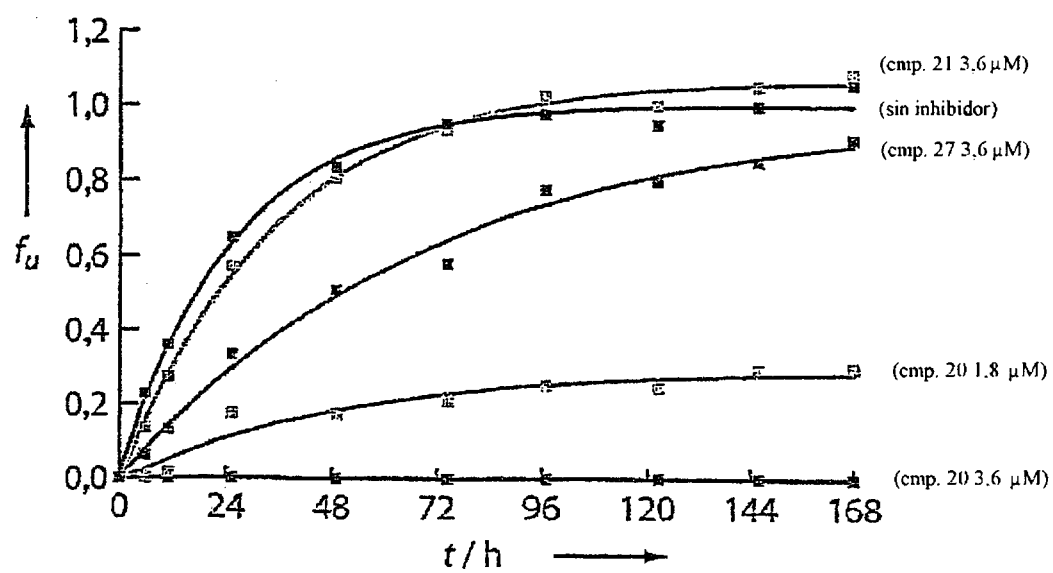


FIG. 9

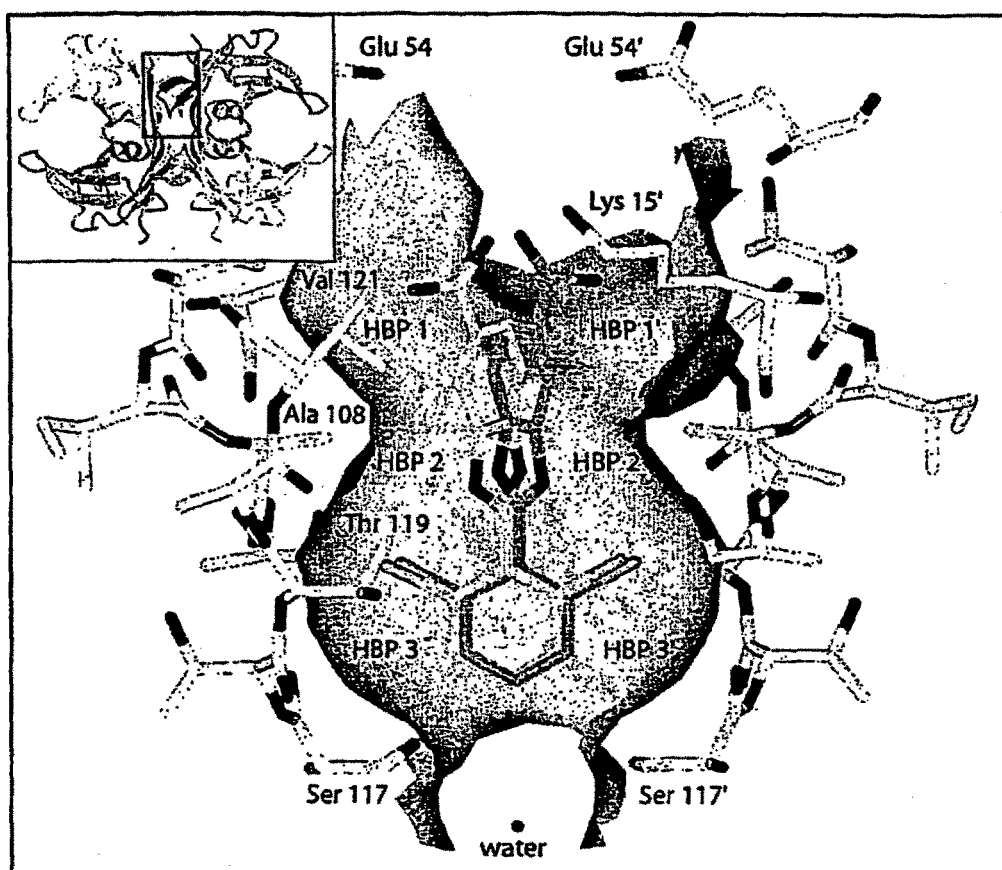


FIG. 10