

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 016 961**

51 Int. Cl.:

| | | | |
|--------------------|-----------|---------------------|-----------|
| A61K 31/205 | (2006.01) | A61P 19/04 | (2006.01) |
| C07C 309/14 | (2006.01) | A61P 25/28 | (2006.01) |
| A61P 17/06 | (2006.01) | C07D 211/14 | (2006.01) |
| A61P 37/08 | (2006.01) | C07D 211/46 | (2006.01) |
| A61P 27/06 | (2006.01) | C07F 9/38 | (2006.01) |
| A61P 27/14 | (2006.01) | C07C 229/12 | (2006.01) |
| A61P 17/10 | (2006.01) | C07D 211/06 | (2006.01) |
| A61P 11/06 | (2006.01) | C07D 211/60 | (2006.01) |
| A61P 11/16 | (2006.01) | C07D 211/62 | (2006.01) |
| A61P 19/02 | (2006.01) | C07D 295/037 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2012** **E 19173009 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2025** **EP 3610868**

54 Título: **Derivados de ácido sulfónico que contienen amino o amonio y su uso médico**

30 Prioridad:

26.05.2011 EP 11167752

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

12.05.2025

73 Titular/es:

GRI BIO, INC. (100.00%)
2223 Avenida de la Playa, Suite 208
La Jolla, CA 92037, US

72 Inventor/es:

SCHLECHTINGEN, GEORG;
KNÖLKER, HANS-JOACHIM;
FRIEDRICHSON, TIM;
JENNINGS, GARY y
BRAXMEIER, TOBIAS

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 3 016 961 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de ácido sulfónico que contienen amino o amonio y su uso médico

5 La presente invención se refiere a derivados de ácido sulfónico que contienen amino o amonio de fórmula 1b, 1q, o 1s, para uso como medicamento, incluyendo su uso en el tratamiento, la prevención o la mejora de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico.

10 Sin estar vinculado a la teoría, se considera que los compuestos proporcionados en el presente documento ejercen su actividad farmacológica a través de la inhibición de la ruta de la fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K)/Akt quinasa. La serina/treonina proteína quinasa Akt (también conocida como proteína quinasa B) es un mediador clave de transducción señales. Akt se activa por numerosos receptores, incluyendo los de factores de crecimiento, citoquinas, hormonas e insulina, así como por la unión de células a la matriz extracelular. Una vez activados, los receptores de la membrana plasmática estimulan la actividad de PI3K para generar fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP3), un segundo mensajero lipídico esencial para la translocación de Akt, que contiene un dominio de homología a pleckstrina (PH) de unión a PIP3, desde el citoplasma hasta la membrana plasmática (Franke *et al.*, Cell 81 :727-736, (1995)). Una vez reclutada a la membrana, es fosforilada y activada por otras quinastas (Hemmings, Science 275:628-630 (1997); Hemmings, Science 276:534 (1997); Downward, Science 279:673-674 (1998); Alessi *et al.*, EMBO J. 15:6541-6551 (1996)), tales como PDK1 y mTORC2.

20 Akt es a su vez responsable de regular la función de muchas proteínas celulares implicadas en procesos tales como transcripción y apoptosis (muerte celular programada), angiogénesis, movilidad celular y metabolismo de glucosa (Kulik *et al.*, Mol Cell Biol. 17:1595-1606 (1997); Franke *et al.*, Cell 88:435-437 (1997); Kaufmann-Zeh *et al.*, Nature 385:544-548 (1997) Hemmings, Science 275:628-630 (1997); Dudek *et al.*, Science 275:661-665 (1997)).

25 Estos hallazgos indican que Akt puede ser una diana farmacológica para el tratamiento de inflamación, enfermedades autoinmunitarias y alergia. Por consiguiente, los compuestos proporcionados en el presente documento, en particular los compuestos de fórmula 1b, 1q, o 1s, son útiles en el tratamiento, la prevención o la mejora de tales enfermedades.

30 Los fármacos inmunomoduladores de amplio espectro tales como corticosteroides, inhibidores de calcineurina y ciclosporina son muy eficaces y se han usado durante muchos años para la terapia de enfermedades alérgicas e inflamatorias celulares, incluyendo enfermedades autoinmunitarias. Son potentes en la supresión de procesos activados tanto por Th1 como por Th2, aunque adolecen de efectos secundarios indeseables, que limitan su intervalo terapéutico. Los corticosteroides regulan la expresión de numerosos genes y, en consecuencia, su uso está limitado por efectos adversos graves. Los efectos adversos graves típicos del uso de corticosteroides a corto plazo son alteraciones en la retención de agua y sales, en el metabolismo de lípidos, adelgazamiento de la piel y cambios en el comportamiento. Los efectos adversos más graves asociados con la exposición sistémica a largo plazo a corticosteroides incluyen aumento del apetito y ganancia de peso, depósitos de grasa en el pecho, la cara, la parte superior de la espalda y el estómago, retención de agua y sales que conduce a hinchazón y edema, tensión arterial alta, diabetes, cicatrización de heridas ralentizada, osteoporosis, cataratas, acné, debilidad muscular, adelgazamiento de la piel, sensibilidad aumentada a la infección, úlceras estomacales, aumento de la transpiración, cambios en el estado de ánimo, problemas psicológicos tales como depresión, supresión suprarrenal y crisis.

45 Los agentes terapéuticos más específicamente dirigidos, tales como los agentes biológicos, por ejemplo, anticuerpos contra determinadas citoquinas o sus receptores, inhiben una sola diana proteica y son eficaces en determinadas situaciones, pero solo abordan una de las dianas en una cascada inflamatoria altamente redundante y por tanto, a menudo se usan en terapia de combinación, ya que la resolución eficaz de las enfermedades inflamatorias requiere que se aborden varias dianas simultáneamente.

50 Existe una gran necesidad médica no satisfecha de nuevos fármacos que frenen los procesos subyacentes de la enfermedad. Por ejemplo, en artritis reumatoide (AR), tales fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (FARME) pueden ralentizar la destrucción progresiva de las articulaciones reduciendo la gravedad de la enfermedad a largo plazo. Esto proporciona tanto ventajas terapéuticas como económicas al acortar el periodo terapéutico y reducir la dosis de medicamentos concomitantes.

60 Muchas enfermedades inflamatorias crónicas, incluyendo enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide (AR), están asociadas con rutas de transducción de señales intracelulares desreguladas, incluyendo la ruta de la fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K)/Akt quinasa, y las interacciones patógenas resultantes entre células estromales del tejido conjuntivo y del sistema inmunitario conduce a cambios en la activación, proliferación, capacidad migratoria y supervivencia celulares que contribuyen a la inflamación (Tas *et al.*, Curr Pharm Des. 11:581-611 (2005)). Por ejemplo, se ha documentado el funcionamiento, la diferenciación y/o la activación anómalas de células T, células B y células mieloides en diversas enfermedades autoinmunitarias, incluyendo artritis reumatoide (AR), diabetes mellitus, lupus y esclerosis múltiple, y los estudios han detallado la activación anómala del eje de señalización de Akt en el contexto de la autoinmunidad sistémica (Wu *et al.*, Disord Drug Targets. 9:145-50 (2009)).

Akt es una ruta de transducción de señales importante que media el retraso de la apoptosis de neutrófilos por mediadores inflamatorios durante la activación de los neutrófilos durante la inflamación (Rane y Klein, *Front Biosci.* 14:2400-12 (2009)) y el control sobre la migración y la apoptosis de neutrófilos y macrófagos es un factor clave en la patogénesis de la mayoría de las enfermedades inflamatorias crónicas.

La AR es una enfermedad inflamatoria crónica, que produce inflamación del revestimiento sinovial y la destrucción del hueso y el cartílago adyacentes. Los macrófagos, fibroblastos y linfocitos sinoviales son críticos para la patogénesis de esta enfermedad, en la que la que la apoptosis desempeña papeles divergentes. Las rutas de señalización, tales como PI3K/Akt, están muy activadas en la articulación con AR, contribuyendo a la expresión de genes que producen inflamación y destrucción y la expresión de una variedad de moléculas antiapoptóticas. La inducción de apoptosis de macrófagos, linfocitos o fibroblastos sinoviales, a través de la inhibición de la expresión de moléculas antiapoptóticas, podría ser terapéuticamente beneficiosa en la AR (Liu y Pope, *Curr Opin Pharmacol.* 3:317-22 (2003)). Además, los resultados sugieren que las rutas de transducción de señales que dependen de PI3K/Akt están implicadas en la sobreproducción de la citoquina inflamatoria clave IL-17 en pacientes con artritis reumatoide (Kim *et al.*, *Arthritis Res Ther.* 7:R139-148 (2005)).

Akt está estrechamente asociada con receptores clave unidos a la membrana y representa un punto de integración convergente para múltiples estímulos implicados en la patogénesis de la EPOC. Akt también está implicada en las manifestaciones sistémicas de la EPOC tal como atrofia de los músculos esqueléticos y alteraciones metabólicas. Como tal, Akt representa una diana terapéutica particularmente atractiva para el tratamiento de la EPOC (Bozinovski *et al.*, *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 1:31-38 (2006)).

Los compuestos proporcionados en el presente documento están orientados a ser fármacos modificadores de la enfermedad. Los compuestos tienen el potencial de aplicarse en una amplia variedad de indicaciones inflamatorias crónicas y en combinación con una tolerabilidad favorable, puede esperarse que los productos se adopten por un número significativo de pacientes que padecen los efectos secundarios graves de los tratamientos actuales. Además, los compuestos proporcionados en el presente documento serán adecuados no solo para monoterapia, sino también en combinación con terapias existentes, que abordan dianas de enfermedad específicas, pero no son suficientes para resolver solos la enfermedad.

La activación de la ruta PI3K/Akt es esencial para el metabolismo de la glucosa inducido por insulina, incluyendo translocación de GLUT4 transportado a la superficie celular, captación de glucosa, síntesis de glucógeno, supresión de producción de glucosa y síntesis de triglicéridos, así como mitogénesis inducida por insulina (Asano *et al.*, *Biol Pharm Bull.* 30:1610-6 (2007)). Por tanto, los inhibidores de la señalización de PI3K/Akt tienen potencial para uso en el tratamiento de la diabetes y la obesidad (Huang *et al.*, *Obes Rev.* 10:610-616 (2009)).

El documento WO 2007/071402 describe el uso de determinados derivados de fosfato, fosfonolípidos y fosfolípidos iónicos internos para el tratamiento o la prevención de enfermedades alérgicas.

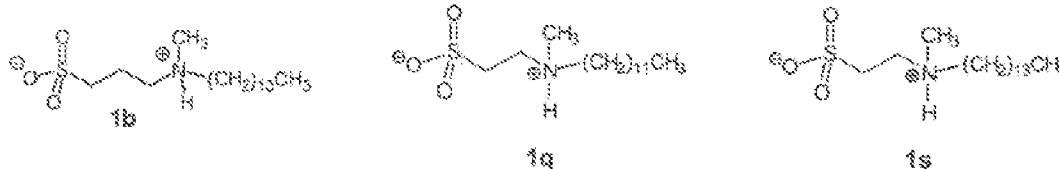
Además, en los documentos US 5.545.667 y US 6.136.857 se divulgan compuestos de amonio cuaternario específicos que son útiles como agentes antineoplásicos. Coy EA *et al.* *Int J Immunopharmacol.* 1990;12(8):871-81 describen una actividad antiproliferativa generalizada de moléculas anfífilas específicas sobre linfocitos T y sobre una variedad de líneas celulares tumorales y una falta de especificidad para el sistema inmunitario. El documento WO 2009/136396 se refiere a determinadas sulfobetainas que van a usarse en el tratamiento de cáncer, obesidad, degeneración macular senil y enfermedades neurodegenerativas. El documento WO 92/16201 se refiere al uso de compuestos de betaína específicos para el tratamiento de determinadas infecciones víricas. Yan L, *et al.* *Bioorg Med Chem Lett.* 2004;14(19):4861-6 describen determinados derivados del ácido aminopropil-fosfónico como agonistas de receptores acoplados a proteínas G de enfigosina-1-fosfato. Birnie CR, *et al.* *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(9):2514-2517 se refieren a determinadas N-alquil-N,N-dimetil-betaínas que se describe que muestran actividad antimicrobiana. Chen CKM, *et al.* *J Med Chem.* 2008;51(18):5594-5607 describen las estructuras por rayos X de determinados bisfosfonatos que comprenden dos grupos fosfonato y por tanto son diferentes de los compuestos de la presente invención al menos por ese motivo. Rachinskii FY, *et al.* *Journal of Applied Chemistry of USSR.* 1968;41(10):2205-2207 describen derivados específicos de N-carboximetil-azepano que no tienen ningún sustituyente en los átomos de carbono del anillo de azepano, y describen la actividad bactericida de estos compuestos. El compuesto que tiene el número CAS 23035-15-6 (es decir, cloruro de 1-(carboximetil)hexahidro-1-octadecil-1H-azepinio) tampoco tiene ningún sustituyente en sus átomos de carbono del anillo de azepano. El compuesto que tiene el número CAS 761356-67-6 (es decir, sal interna de 3-metil-4-(sulfometil)-1-(3-sulfopropil)-1-tetradecilpirrolidinio) comprende un sustituyente de sulfometilo en su anillo de pirrolidina y, al menos por ese motivo, es diferente de los compuestos de la invención. Compuestos de amonio cuaternario específicos adicionales se divulgan, por ejemplo, en: Ernst R *et al.* *Toxicology.* 1980;15(3):233-42; Speijers GJ *et al.* *Vaccine.* 1989;7(4):364-8; Vian L *et al.* *Toxic in vitro.* 1995;9(2):185-190; Parris N, *et al.* *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 1973;50(12):509-512; documento US 3.432.408; documento US 4.085.134; y documento CN 101456810 A.

Se ha encontrado sorprendentemente que los compuestos de la presente invención, en particular los compuestos de fórmula 1b, 1q, o 1s tal como se describe y se define a continuación en el presente documento, tienen una citotoxicidad ventajosamente baja. Por tanto, la presente invención resuelve el problema de proporcionar agentes

terapéuticos que tienen un perfil de toxicidad favorable que son eficaces, entre otros, en el tratamiento, la prevención o la mejora de trastornos inflamatorios, autoinmunitarios y/o alérgicos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto de la siguiente fórmula 1b, 1q, o 1s:

5



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso como un medicamento.

10 La invención se refiere además a un compuesto de fórmula 1b, 1q, o 1s, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico.

15 Preferiblemente, el trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico se selecciona de: psoriasis, dermatitis atópica (eccema atópico), dermatitis de contacto, eccema xerótico, dermatitis seborreica, neurodermatitis, dishidrosis, eccema discoide, eccema venoso, dermatitis herpetiforme (enfermedad de Duhring), autoeccematización, dermatomiositis, síndrome de hiper-IgE (Buckley), síndrome de Wiskott-Aldrich, anafilaxia, alergia alimentaria, reacciones alérgicas a picaduras venenosas, urticarias agudas, urticarias crónicas, urticarias físicas incluyendo urticaria acuagénica, urticaria colinérgica, urticaria por frío (urticaria por frío crónica), urticaria por presión retardada, urticaria dermatográfica, urticaria por calor, urticaria solar, urticaria por vibración, urticaria adrenérgica, urticaria angioedema, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis por desviación (diverticulitis), síndrome de Behçet, colitis indeterminada, enfermedad celíaca, síndrome del intestino irritable, íleo postoperatorio, gastroenteropatía eosinofílica, gastritis, rinitis alérgica crónica, rinitis alérgica estacional (fiebre del heno), conjuntivitis alérgica, conjuntivitis química, conjuntivitis neonatal, síndrome de Sjögren, glaucoma de ángulo abierto, enfermedad del ojo seco (DED; incluyendo, por ejemplo, ojo seco por deficiencia lagrimal acuosa (ADDE), ojo seco por síndrome de Sjögren (SSDE), por causa distinta a SSDE, u ojo seco evaporativo (EDE)), edema macular diabético (o retinopatía diabética), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma alérgica, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, fibrosis pulmonar, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia, artritis reactiva, polimialgia reumática, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, arteritis temporal, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmunitaria o alopecia areata.

35 Las respuestas alérgicas e inflamatorias se caracterizan por interacciones dinámicas de células inmunitarias y no inmunitarias, coordinadas a través del contacto célula-célula y mediadores inmunitarios solubles. Estas respuestas y sus resultados se modifican adicionalmente por la genética y el estilo de vida de cada individuo.

40 Las células T cooperadoras desempeñan un papel clave en el inicio y el mantenimiento de las respuestas inflamatorias y pueden dividirse en procesos dirigidos por Th1 (inmunidad mediada por células) y Th2 (inmunidad mediada por anticuerpos). Los desequilibrios en estas respuestas pueden producir hiper- o hiposensibilidad patológica a antígenos. Una inflamación crónica se manifiesta en diversos estados patológicos tales como, por ejemplo, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, dermatitis atópica, urticaria y psoriasis.

45 Las respuestas inflamatorias a los antígenos pueden adoptar la forma de respuestas dirigidas por células T cooperadoras de diferentes tipos. Las células Th1 median respuestas celulares que implican células citotóxicas tales como macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, mientras que las células Th2 median respuestas humorales que implican secreción de anticuerpos de células B y activación de mastocitos. También pueden estar implicadas otras respuestas no inmunitarias, tales como las que implican ciclooxigenasa y lipoxigenasa. La liberación incontrolada de citoquinas y quimioquinas es una parte fundamental de enfermedades inflamatorias, como la enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, dermatitis atópica, urticaria y psoriasis.

55 Se proporciona una nueva estrategia de intervención mediante los compuestos según la presente invención, que modulan ampliamente las actividades de proteínas en la cascada inflamatoria. A través del enriquecimiento del fármaco en los dominios de membrana, se ejerce una inhibición alostérica sobre proteínas diana clave en las cascadas de transducción de señales en inflamación.

60 Los compuestos de la presente invención se identificaron como inhibidores potentes de la liberación de mediadores inmunitarios *in vitro* en un modelo de mastocitos, tal como se muestra también en el ejemplo 27. Además, inhibieron la liberación de las citoquinas proinflamatorias, TNF- α e interleuquina-6 de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) estimuladas con lipopolisacárido, lo que demuestra la actividad inmunomoduladora en diferentes

tipos celulares.

La amplia actividad antiinflamatoria se confirmó en modelos animales de inflamación dirigida por Th1 y Th2.

5 En el contexto de la presente invención, se encontró sorprendentemente que los compuestos proporcionados en el presente documento son inhibidores potentes de la desgranulación de mastocitos y por tanto funcionan como estabilizadores de mastocitos y/o inhibidores potentes de la inflamación alérgica y/o celular. En particular, se encontró sorprendentemente que los compuestos tal como se divulgan en el presente documento pueden usarse terapéuticamente en el tratamiento, la prevención y/o la mejora de trastornos inmunológicos y trastornos
10 relacionados con inflamación alérgica y/o celular, en particular trastornos inflamatorios, autoinmunitarios y/o alérgicos.

Las células T cooperadoras (Th) son un subgrupo de linfocitos que desempeñan un papel importante en el sistema inmunitario debido a su participación en activar y dirigir otras células inmunitarias. Los otros tipos principales de linfocitos son las células B y los linfocitos citolíticos naturales (NK). Durante la activación antigénica y proliferación de las células Th, las células Th0 se diferencian a Th1, Th2 u otros subtipos dependiendo del tipo de antígeno, de la célula presentadora de antígenos y del entorno de citoquinas.
15

La hipersensibilidad de tipo retardado, también denominada hipersensibilidad de tipo IV, es una respuesta de memoria inmunitaria mediada por células Th independiente de anticuerpos que resulta de una sobreestimulación de las células inmunitarias, normalmente de linfocitos y macrófagos, produciendo inflamación crónica y liberación de citoquinas. Ejemplos de enfermedad importantes son dermatitis de contacto, inflamación crónica del íleo y el colon, por ejemplo tal como se observa en enfermedad inflamatoria del intestino (EII), artritis reumatoide y enfermedades relacionadas, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, enfermedad de Gaucher, fibromialgia, artrosis, artritis reactiva, enfermedad inflamatoria pélvica, polimialgia reumática, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave y rechazo de trasplante crónico. Para la EII, por ejemplo, Hue *et al.* demostraron una relación causal entre la enfermedad y la inflamación intestinal mediada por células T (Hue, S; *et al.* (2006) J. Exp. Med. 203 (11), 2473).
20
25

30 La psoriasis es una enfermedad autoinmunitaria crónica que afecta a la piel. Una hipótesis para la causa de la psoriasis contempla la enfermedad como un trastorno mediado por el sistema inmunitario en el que la reproducción excesiva de células cutáneas se deriva de factores producidos por el sistema inmunitario. Las células T se activan, migran a la dermis y desencadenan la liberación de citoquinas que producen inflamación y la rápida producción de células cutáneas.
35

Las células cebadas, o mastocitos, desempeñan un papel clave en el proceso inflamatorio. Cuando se activa, el mastocito libera rápidamente sus gránulos característicos y diversos mediadores hormonales al intersticio, un proceso denominado desgranulación. Las moléculas liberadas en el medio extracelular incluyen mediadores preformados, por ejemplo, histamina y serotonina, mediadores lipídicos recién formados (eicosanoides) y citoquinas. En reacciones alérgicas, los mastocitos permanecen inactivos hasta que un alérgeno se une al receptor de IgE expresado en la superficie celular, lo que conduce a desgranulación y liberación de mediadores.
40

Muchas formas de alergias cutáneas y mucosas, en la mayoría de los casos acompañadas por síntomas inflamatorios, están mediadas en gran medida por mastocitos. Estos desempeñan un papel fundamental en asma, eczema, prurito y las diversas formas de rinitis, conjuntivitis y urticaria. Los mastocitos también están implicados en la patología asociada con trastornos tales como artritis reumatoide, pénfigo ampolloso y esclerosis múltiple. También se ha mostrado que están implicados en el reclutamiento de células inflamatorias a las articulaciones y la piel. Además, la mastocitosis es un trastorno que presenta proliferación de mastocitos y existe en forma cutánea y sistémica.
45
50

La dermatitis atópica, también conocida como neurodermatitis, es un trastorno cutáneo inflamatorio y prurítico caracterizado por inflamación crónica. Aunque las causas que subyacen a la dermatitis atópica no se entienden bien y las relaciones entre la ingestión de, o el contacto con, alérgenos y diversos estímulos inflamatorios no están bien establecidas, se postula que los procesos relacionados con los mastocitos y/o las células T están implicados en procesos patológicos que conducen a dermatitis atópica.
55

El asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) son ambos trastornos obstructivos de las vías respiratorias, pero en la patogénesis de estas enfermedades están implicados diferentes tipos de inflamación. El asma es con frecuencia un proceso alérgico con preponderancia de células Th2 y eosinófilos en las vías respiratorias. En cambio, hay una actividad de Th1 predominante en la sangre de pacientes con EPOC (Lecki, M J; *et al.* (2003) Thorax 58, 23).
60

La enfermedad del ojo seco (DED) es un trastorno inflamatorio de la unidad funcional lagrimal que conduce a enfermedad crónica de la superficie ocular, calidad de visión alterada y una amplia gama de complicaciones. Se reconoce que una respuesta inflamatoria crónica desempeña un papel clave en la patogénesis de la enfermedad del ojo seco humana (Calonge M, *et al.* Ocul Immunol Inflamm. 2010. 18:244-253; Stevenson W, *et al.* Arch Ophthalmol.
65

2012. 130:90-100; Zoukhri D. *Exp Eye Res.* 2006. 82:885-898; Pflugfelder SC. *Am J Ophthalmol.* 2004. 137:337-342).

El edema macular diabético (o retinopatía diabética) se caracteriza por disfunción microvascular retiniana temprana y es una causa principal de ceguera en sujetos que padecen diabetes. Existen pruebas que indican que la inflamación retiniana desempeña un papel importante en la patogénesis del edema macular diabético (Joussen AM, *et al.* *FASEBJ.* 2004. 18:1450-1452; Rangasamy S, *et al.* *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2012. 19:52-59; Melet AD, *et al.* *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005. 46:4295-4301; Funatsu H, *et al.* *Ophthalmology.* 2009. 116:73-79; Kim SJ, *et al.* *Surv Ophthalmol.* 2010. 55:108-133).

Por consiguiente, los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento, la prevención o la mejora de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico.

El trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico que va a tratarse, prevenirse o mejorarse usando los compuestos según la invención se selecciona preferiblemente de: psoriasis, dermatitis atópica (eccema atópico), dermatitis de contacto, eccema xerótico, dermatitis seborreica, neurodermatitis, dishidrosis, eccema discoide, eccema venoso, dermatitis herpetiforme (enfermedad de Duhring), autoeccematización, dermatomiositis, síndrome de hiper-IgE (Buckley), síndrome de Wiskott-Aldrich, anafilaxia, alergia alimentaria, o reacciones alérgicas a picaduras venenosas; urticarias agudas, urticarias crónicas, urticarias físicas incluyendo urticaria acuagénica, urticaria colinérgica, urticaria por frío (urticaria por frío crónica), urticaria por presión retardada, urticaria dermatográfica, urticaria por calor, urticaria solar, urticaria por vibración, urticaria adrenérgica o urticaria angioedema; enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis por desviación (diverticulitis), síndrome de Behçet, colitis indeterminada, enfermedad celíaca, síndrome del intestino irritable, íleo postoperatorio, gastroenteropatía eosinofílica o gastritis; rinitis alérgica crónica, rinitis alérgica estacional (fiebre del heno), conjuntivitis alérgica, conjuntivitis química, conjuntivitis neonatal, síndrome de Sjögren, glaucoma de ángulo abierto, enfermedad del ojo seco (DED; incluyendo, por ejemplo, ojo seco por deficiencia lagrimal acuosa (ADDE), ojo seco por síndrome de Sjögren (SSDE), por causa distinta a SSDE, u ojo seco evaporativo (EDE)), o edema macular diabético (o retinopatía diabética); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma alérgica, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, o fibrosis pulmonar; artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia, artritis reactiva, o polimialgia reumática; o síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, arteritis temporal, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmunitaria o alopecia areata.

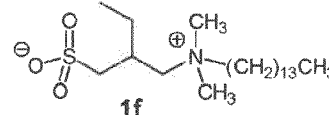
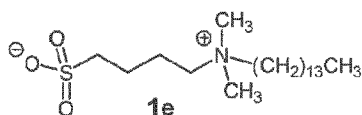
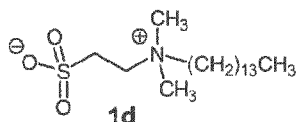
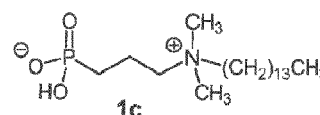
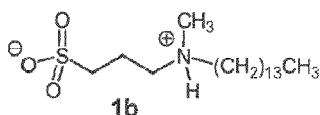
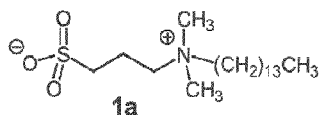
Los compuestos de la invención, que se ha demostrado que muestran una eficacia en la supresión de la respuesta inflamatoria al menos equivalente a la del corticosteroide dexametasona, son además ventajosos porque no muestran los efectos adversos que se observan habitualmente para los corticosteroides, tales como reducción del peso de los ganglios linfáticos y el número de células, lo que los hace particularmente útiles en el tratamiento, la prevención o la mejora de trastornos inflamatorios, autoinmunitarios y/o alérgicos.

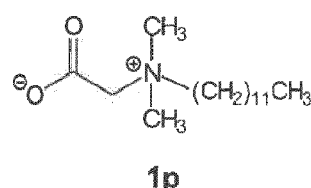
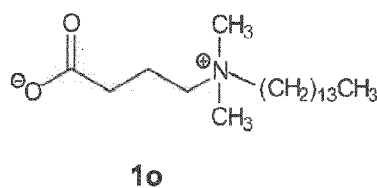
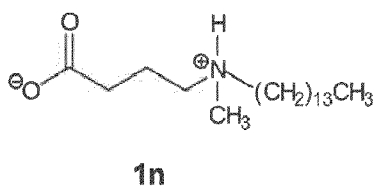
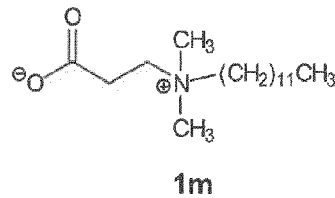
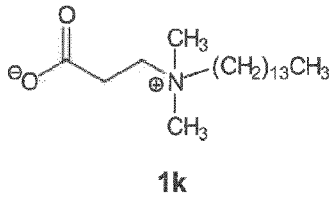
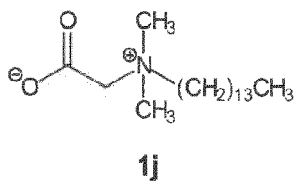
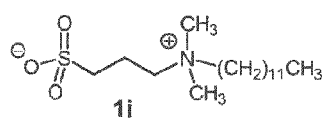
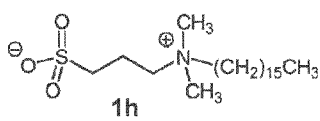
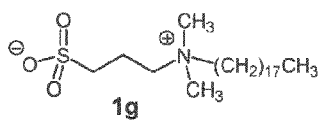
Además, los compuestos de la presente invención tienen una toxicidad particularmente baja y, por tanto, un perfil de toxicidad ventajoso, como también se demuestra en el ejemplo 27.

Un experto en la materia entiende que, si el compuesto de la invención se proporciona en disolución, la protonación del grupo ácido depende del pH de la disolución.

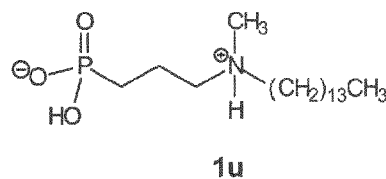
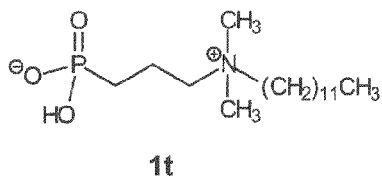
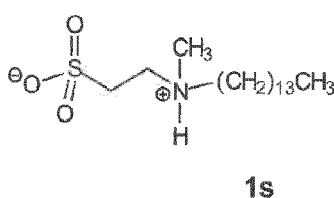
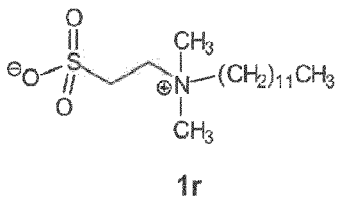
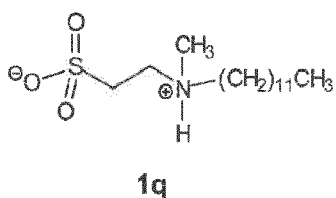
Asimismo, un experto en la materia entiende que, si el compuesto de la invención se proporciona en disolución, la protonación del átomo de nitrógeno y, por consiguiente, la carga en el átomo de nitrógeno depende del pH de la disolución.

Los compuestos 1b, 1q y 1s según la invención, así como los compuestos de referencia 1a, 1c a 1p, 1r, 1t a 1x y 2a a 2d se muestran a continuación:

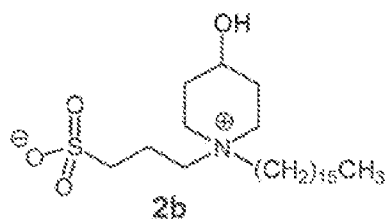
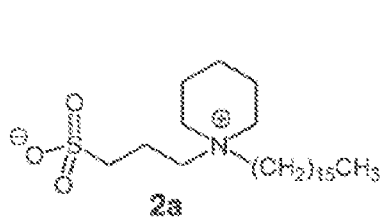
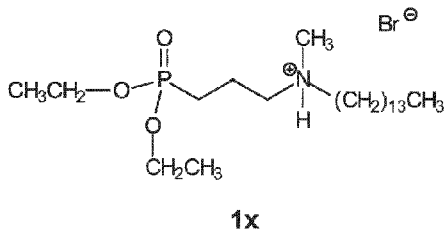
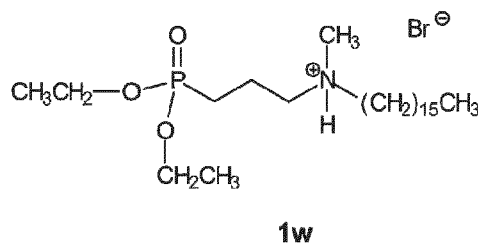
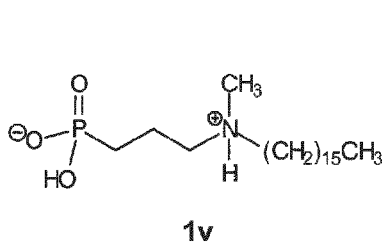




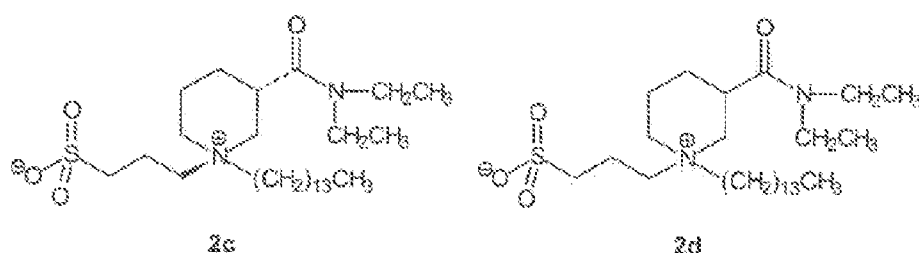
5



10



15



Como se ha explicado anteriormente, la presente invención también se refiere a un compuesto de fórmula 1b, 1q, o 1s, o un sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento, la prevención o la mejora de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico. El trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico que va a tratarse, prevenirse o mejorarse usando los compuestos según la invención se selecciona, por ejemplo, de: psoriasis, dermatitis atópica (eccema atópico), dermatitis de contacto, eccema xerótico, dermatitis seborreica, neurodermatitis, dishidrosis, eccema discoide, eccema venoso, dermatitis herpetiforme (enfermedad de Dühring), autoeccematización, dermatomiositis, síndrome de hiper-IgE (Buckley), síndrome de Wiskott-Aldrich, anafilaxia, alergia alimentaria, o reacciones alérgicas a picaduras venenosas; urticarias agudas, urticarias crónicas, urticarias físicas incluyendo urticaria acuagénica, urticaria colinérgica, urticaria por frío (urticaria por frío crónica), urticaria por presión retardada, urticaria dermatográfica, urticaria por calor, urticaria solar, urticaria por vibración, urticaria adrenérgica o urticaria angioedema; enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis por desviación (diverticulitis), síndrome de Behçet, colitis indeterminada, enfermedad celíaca, síndrome del intestino irritable, íleo postoperatorio, gastroenteropatía eosinofílica o gastritis; rinitis alérgica crónica, rinitis alérgica estacional (fiebre del heno), conjuntivitis alérgica, conjuntivitis química, conjuntivitis neonatal, síndrome de Sjögren, glaucoma de ángulo abierto, enfermedad del ojo seco (DED; incluyendo, por ejemplo, ojo seco por deficiencia lagrimal acuosa (ADDE), ojo seco por síndrome de Sjögren (SSDE), por causa distinta a SSDE, u ojo seco evaporativo (EDE)), o edema macular diabético (o retinopatía diabética); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma alérgica, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, o fibrosis pulmonar; artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia, artrosis, artritis reactiva, o polimialgia reumática; esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, arteritis temporal, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmunitaria, alopecia areata o síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS); una enfermedad de injerto contra huésped, una enfermedad de huésped contra injerto o un rechazo de trasplante; o una contribución inflamatoria a la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

Los compuestos que van a usarse según la presente invención, pueden prepararse por métodos conocidos en el campo de la química sintética.

En particular, los compuestos de la invención también pueden prepararse como se describe en la sección de ejemplos.

El ámbito de la invención abarca todas las formas de sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención, que pueden formarse, por ejemplo, mediante protonación de un átomo que porta un único par de electrones que sea susceptible a protonación, tal como un grupo amino, con un ácido orgánico o inorgánico. Las sales de adición de base ejemplares comprenden, por ejemplo, sales de metales alcalinos tales como sales de sodio o potasio; sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio o magnesio; sales de amonio; sales de aminas alifáticas, tales como sales de trimetilamina, trietilamina, dicitlohexilamina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, procaína, sales de meglumina, sales de dietanolamina o sales de etilendiamina; sales de aralquilamina tales como sales de N,N-dibenciletilendiamina, sales de benetamina; sales de aminas aromáticas heterocíclicas, tales como sales de piridina, sales de picolina, sales de quinolina o sales de isoquinolina; sales de amonio cuaternario, tales como sales de tetrametilamonio, sales de tetraetilamonio, sales de benciltrimetilamonio, sales de benciltrietilamonio, sales de benciltributilamonio, sales de metiltrioctilamonio o sales de tetrabutilamonio; y sales de aminoácidos básicos, tales como sales de arginina o sales de lisina. Las sales de adición de ácido a modo de ejemplo comprenden, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como sales de clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sales de sulfato, sales de nitrato, sales de fosfato (tal como sales de fosfato, hidrogenofosfato o dihidrogenofosfato), sales de carbonato, sales de hidrogenocarbonato o sales de perclorato; sales de ácidos orgánicos tales como sales de acetato, propionato, butirato, pentanoato, hexanoato, heptanoato, octanoato, ciclopentanopropionato, undecanoato, lactato, maleato, oxalato, fumarato, tartrato, malato, citrato, nicotinato, benzoato, salicilato o ascorbato; sales de sulfonato, tales como sales de metanosulfonato, etanosulfonato, 2-hidroxietanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato (tosilato), 2-naftalenosulfonato, 3-fenilsulfonato o canforsulfonato; y sales de aminoácidos ácidos, tales como sales de aspartato o glutamato.

Además, el ámbito de la invención abarca formas sólidas de los compuestos proporcionados en el presente documento en cualquier forma solvatada, incluyendo por ejemplo solvatos con agua, por ejemplo, hidratos, o con

disolventes orgánicos tales como, por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol o acetonitrilo, es decir, como un metanolato, etanolato, isopropanolato o acetonitrilato, respectivamente; o en forma de cualquier polimorfo.

5 Además, se pretende que las fórmulas en la presente solicitud cubran todos los estereoisómeros posibles, incluyendo enantiómeros y diastereómeros, de los compuestos indicados.

10 Por tanto, se contemplan todos los estereoisómeros de los compuestos de la presente invención como parte de la presente invención, o bien en mezcla o bien en forma pura o sustancialmente pura. El ámbito de los compuestos según la invención abarca todos los estereoisómeros posibles y sus mezclas. Muy particularmente, abarca las formas racémicas y los isómeros ópticos aislados. Las formas racémicas pueden resolverse mediante métodos físicos, tales como, por ejemplo, cristalización fraccionada, separación o cristalización de derivados diastereoméricos o separación mediante cromatografía quiral en columna. Los isómeros ópticos individuales pueden obtenerse a partir de los racematos usando métodos convencionales, tales como, por ejemplo, formación de sal con un ácido ópticamente activo seguido por cristalización.

15 Los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse como compuestos *per se* en su uso como farmacóforos o composiciones farmacéuticas o pueden formularse como medicamentos. Dentro del ámbito de la presente invención están las composiciones farmacéuticas que comprenden como principio activo un compuesto de fórmula 1b, 1q, o 1s. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como soportes, diluyentes, rellenos, disgregantes, agentes lubricantes, aglutinantes, colorantes, pigmentos, estabilizantes, conservantes o antioxidantes.

20 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse mediante técnicas conocidas por el experto en la materia, tales como las técnicas publicadas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse en formas posológicas para administración oral, parenteral, tal como intramuscular, intravenosa, subcutánea, intradérmica, intraarterial, rectal, nasal, tópica, en aerosol o vaginal. Las formas posológicas para administración oral incluyen comprimidos recubiertos y no recubiertos, cápsulas de gelatina blanda, cápsulas de gelatina dura, pastillas para chupar, tabletas, disoluciones, emulsiones, suspensiones, jarabes, elixires, polvos y gránulos para reconstitución, polvos y gránulos dispersables, chicles medicinales, comprimidos masticables y comprimidos efervescentes. Las formas posológicas para administración parenteral incluyen disoluciones, emulsiones, suspensiones, dispersiones y polvos y gránulos para reconstitución. Las emulsiones son una forma posológica preferida para administración parenteral. Las formas posológicas para administración rectal y vaginal incluyen supositorios y óvulos. Las formas posológicas para administración nasal pueden administrarse a través de inhalación e insuflación, por ejemplo, mediante un inhalador dosificado. Las formas posológicas para administración tópica incluyen cremas, geles, pomadas, bálsamos, parches y sistemas de administración transdérmica.

25 Los compuestos según la invención o las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente que comprenden uno o más compuestos de la invención pueden administrarse a un sujeto mediante cualquier vía de administración conveniente, ya sea de manera sistémica/periférica o en el sitio de acción deseada, incluyendo, pero sin limitarse, a una o más de: oral (por ejemplo como comprimido, cápsula o como disolución ingerible), tópica (por ejemplo, transdérmica, intranasal, ocular, yugal y sublingual), parenteral (por ejemplo, usando técnicas de inyección o técnicas de infusión, e incluyendo, por ejemplo, mediante inyección, por ejemplo subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intratecal, intraespinal, intracapsular, subcapsular, intraorbital, intraperitoneal, intratraqueal, subcuticular, intraarticular, subaracnoidea o intraesternal mediante, por ejemplo, implante de un depósito, por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular), pulmonar (por ejemplo, mediante terapia de inhalación o insuflación usando, por ejemplo, un aerosol, por ejemplo a través de la boca o la nariz), gastrointestinal, intrauterina, intraocular, subcutánea, oftálmica (incluyendo intravítrea o intracameral), rectal y vaginal.

30 Si dichos compuestos o composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, entonces los ejemplos de tal administración incluyen una o más de: intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea que administran los compuestos composiciones farmacéuticas y/o mediante el uso de técnicas de infusión. Para la administración parenteral, los compuestos se usan mejor en forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer que la disolución sea isotónica con la sangre. Las disoluciones acuosas deben tamponarse de manera adecuada (preferiblemente a un pH de desde 3 hasta 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se logra fácilmente mediante técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia.

35 Dichos compuestos o composiciones farmacéuticas también pueden administrarse por vía oral en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, disoluciones o suspensiones, que pueden contener agentes saborizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, pulsada o controlada.

60 Los comprimidos pueden contener excipientes, tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina, disgregantes, tales como almidón (preferiblemente almidón

de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa de sodio y determinados silicatos complejos, y aglutinantes de granulación, tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Adicionalmente, también pueden incluirse agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco. También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, el agente puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o colorantes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes, tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

Alternativamente, dichos compuestos o composiciones farmacéuticas pueden administrarse en forma de un supositorio u óvulo vaginal, o pueden aplicarse por vía tópica en forma de un gel, hidrogel, loción, disolución, crema, pomada o polvo para uso externo. Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse por vía dérmica o transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche cutáneo.

Dichos compuestos o composiciones farmacéuticas también pueden administrarse por vía pulmonar, vías rectales o vía ocular. Para el uso oftálmico, pueden formularse como suspensiones micronizadas en solución salina estéril, isotónica, con pH ajustado, o preferiblemente, como disoluciones en solución salina estéril, isotónica, con pH ajustado, opcionalmente en combinación con un conservante, tal como cloruro de benzalconio. Alternativamente, pueden formularse en una pomada, tal como vaselina.

Para la aplicación tópica a la piel, dichos compuestos o composiciones farmacéuticas pueden formularse como una pomada adecuada que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite de vaselina, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, cera emulsionante y agua. Alternativamente, pueden formularse como una loción o crema adecuada, suspendidos o disueltos en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite de vaselina, monoestearato de sorbitano, polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Normalmente, un médico determinará la dosis real que será más adecuada para un sujeto individual. El nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier sujeto individual particular pueden variarse y dependerán de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y el momento de administración, la velocidad de excreción, la combinación con fármacos, la gravedad del estado particular y la terapia en curso del sujeto individual.

Una dosis propuesta, aunque no limitante, de los compuestos de la invención para su administración a un ser humano (de aproximadamente 70 kg de peso corporal) puede ser de 0,05 a 5000 mg, preferiblemente de 0,1 mg a 1000 mg, del principio activo por dosis unitaria. La dosis unitaria puede administrarse, por ejemplo, de 1 a 4 veces al día. La dosis dependerá de la vía de administración. Se apreciará que puede ser necesario realizar variaciones de rutina en la dosificación dependiendo de la edad y el peso del paciente/sujeto, así como de la gravedad del estado que va a tratarse. La dosis precisa y la vía de administración dependerán en última instancia del criterio del médico o veterinario que atiende.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse en el contexto de una monoterapia o en coterapia con uno o más de otros agentes farmacéuticos. Por ejemplo, puede usarse un compuesto de la presente invención o dos o más compuestos de la invención en combinación con uno o más fármacos inmunomoduladores y/o fármacos antiinflamatorios para el tratamiento, la prevención o la mejora de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico.

Una composición farmacéutica puede comprender dicho(s) compuesto(s), fármaco(s) inmunomodulador(es) y/o fármaco(s) antiinflamatorio(s). La coterapia también puede incluir la administración de dos o más compuestos de la presente invención en ausencia de fármacos inmunomoduladores o fármacos antiinflamatorios adicionales. También se prevé en el presente documento que el/los compuesto(s), fármaco(s) inmunomodulador(es) y/o fármaco(s) antiinflamatorio(s) podían unirse, por ejemplo, mediante la formación de conjugados. Por consiguiente, los compuestos, fármacos inmunomoduladores y/o fármacos antiinflamatorios pueden administrarse a un sujeto simultáneamente. Además, una composición farmacéutica puede comprender solo el/los compuesto(s) de la presente invención, mientras que el uno o más fármacos inmunomoduladores y/o fármacos antiinflamatorios están comprendidos en una composición farmacéutica diferente. En ese caso, todavía puede ser posible administrar el/los compuesto(s) de la invención, fármacos inmunomoduladores y/o fármacos antiinflamatorios simultáneamente; sin embargo, el/los compuesto(s) de la invención también pueden administrarse antes y/o después del uno o más fármacos inmunomoduladores y/o fármacos antiinflamatorios. Resulta fácilmente evidente para un experto en la materia cómo administrar, por ejemplo, uno o más compuestos de la presente invención, uno o más fármacos inmunomoduladores y/o uno o más fármacos antiinflamatorios en coterapia.

Se prevé que uno o más de los compuestos como se describe en el presente documento pueda usarse en combinación con uno o más fármacos inmunomoduladores y/o uno o más fármacos antiinflamatorios.

El uno o más fármacos inmunomoduladores incluyen, sin limitarse a ellos: antimetabolitos tales como, por ejemplo, azatioprina, ácido micofenólico, leflunomida, teriflunomida o metotrexato; macrólidos tales como, por ejemplo, tacrolimus, ciclosporina o pimecrolimus; inhibidores de IL-2 tales como, por ejemplo, abetimus o gusperimus; inhibidores de TNF- α tales como, por ejemplo, talidomida o lenalidomida; antagonistas del receptor de IL-1 tales como, por ejemplo, anakinra; diana en mamíferos de proteínas de rapamicina (mTOR) tales como, por ejemplo, sirolimus, deforolimus, everolimus, temsirolimus, zotarolimus o biolimus A9; anticuerpos monoclonales tales como, por ejemplo, eculizumab, infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, afelimomab, golimumab, Mepolizumab, omalizumab, nerelimumab, faralimumab, elsilimumab, lebrikizumab, ustekinumab, muromonab-CD3, otezixumab, teplizumab, visilizumab, clenoliximab, keliximab, zanolimumab, efalizumab, erlizumab, afutuzumab, ocrelizumab, pascolizumab, lumiliximab, teneliximab, toralizumab, aselizumab, galiximab, gavilimumab, ruplizumab, belimumab, ipilimumab, tremelimumab, bertilimumab, lerdelimumab, metelimumab, natalizumab, tocilizumab, odulimumab, basiliximab, daclizumab, inolimumab, zolimomab aritox, atorolimumab, cedelizumab, dorlixizumab, fontolizumab, gantenerumab, gomiliximab, maslimomab, morolimumab, pexelizumab, rovelizumab, sipilizumab, talizumab, telimumab aritox, vopaliximab, o vepalimumab; anticuerpos policlonales tales como, por ejemplo, globulina antitímocítica o globulina antilinfocítica; o proteínas de fusión tales como, por ejemplo, abatacept, belatacept, etanercept, pegsunercept, aflibercept, alefacept o rilonacept.

Además, el uno o más fármacos antiinflamatorios incluyen, sin limitarse a ellos: derivados de pirazolidina o butilpirazolidina tales como, por ejemplo, ampirona, clofezona, kebusona, metamizol, mofebutazona, oxifenbutazona, fenazona, fenilbutazona, sulfpirazona o feprazona; derivados de ácido acético tales como, por ejemplo, aceclofenaco, acemetacina, alclofenaco, bromfenaco, bumadizona, bufexamac, diclofenaco, difenpiramida, etodolaco, fentiazaco, indometacina, ketorolaco, lonazolaco, oxametacina, proglumetacina, sulindaco, tolmetina, zomepiraco o amfenaco; derivados de oxicam tales como, por ejemplo, ampiroxicam, droxicam, lornoxicam, meloxicam, piroxicam o tenoxicam; derivados de ácido propiónico tales como, por ejemplo, alminoprofeno, benoxaprofeno, dexibuprofeno, dexketoprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, flunoxaprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, ibuproxam, indoprofeno, ketoprofeno, naproxeno, oxaprozina, piroprofeno, suprofeno o ácido tiaprofénico; derivados de ácido fenámico tales como, por ejemplo, ácido flufenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido tolfenámico, ácido niflúmico, morniflumato o azapropazona; inhibidores de COX-2 tales como, por ejemplo, celecoxib, etoricoxib, lumiracoxib, parecoxib, rofecoxib o valdecoxib; o nabumetona, glucosamina, bencidamina, glucosaminoglucano, salicilato de magnesio, proquazona, superóxido dismutasa/orgoteína, nimesulida, diacereína, tenidap, oxaceprol o sulfato de condroitina.

La coterapia usando el/los compuesto(s) de la presente invención, fármaco(s) inmunomodulador(es) y/o fármaco(s) antiinflamatorio(s) puede producir un efecto sinérgico, es decir los agentes que actúan juntos pueden crear un efecto mayor que el predicho conociendo sólo los efectos separados de los agentes individuales. Un efecto sinérgico de este tipo podría ser particularmente ventajoso si pudieran usarse después cantidades menores del/los compuesto(s), fármaco(s) inmunomodulador(es) y/o fármaco(s) antiinflamatorio(s). Por tanto, podrían disminuirse o evitarse los posibles efectos secundarios del/los compuesto(s), fármaco(s) inmunomodulador(es) y/o fármaco(s) antiinflamatorio(s).

Además, se prevé particularmente que uno o más de los compuestos de la invención puedan usarse en combinación con uno o más fármacos inmunomoduladores tal como se describió anteriormente en el presente documento y/o uno o más fármacos antiinflamatorios tal como se describió anteriormente en el presente documento (incluyendo, por ejemplo, azatioprina, ciclosporina, D-penicilamina, sales de oro, hidroxiclороquina, leflunomida, metotrexato, minociclina, sulfasalazina o ciclofosfamida) para el tratamiento, la prevención o la mejora de la artritis reumatoide.

El término "tratamiento de un trastorno o una enfermedad" tal como se usa en el presente documento, tal como "tratamiento de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico", se conoce bien en la técnica. El "tratamiento de un trastorno o una enfermedad" implica que se sospecha o se ha diagnosticado un trastorno o una enfermedad en un paciente/sujeto. Un paciente/sujeto que se sospecha que padece un trastorno o una enfermedad normalmente muestra síntomas clínicos y/o patológicos específicos que un experto puede atribuir fácilmente a un estado patológico específico (es decir, diagnosticar un trastorno o una enfermedad).

El "tratamiento de un trastorno o una enfermedad" puede conducir, por ejemplo, a una detención en la evolución del trastorno o la enfermedad (por ejemplo, sin deterioro de los síntomas) o a un retraso en la evolución del trastorno o la enfermedad (en caso de que la detención en la evolución sea solo de naturaleza transitoria). El "tratamiento de un trastorno o una enfermedad" también puede conducir a una respuesta parcial (por ejemplo, mejora de los síntomas) o respuesta completa (por ejemplo, desaparición de los síntomas) del sujeto/paciente que padece el trastorno o la enfermedad. La "mejora" de un trastorno o una enfermedad puede conducir, por ejemplo, a una detención en la evolución del trastorno o la enfermedad o a un retraso en la evolución del trastorno o la enfermedad. Tal respuesta parcial o completa puede ir seguida por una recaída. Ha de entenderse que un sujeto/paciente puede experimentar una amplia gama de respuestas a un tratamiento (por ejemplo, las respuestas a modo de ejemplo tal como se describió anteriormente en el presente documento).

El tratamiento de un trastorno o una enfermedad puede comprender, entre otros, el tratamiento curativo

(preferiblemente que conduce a una respuesta completa y en última instancia a la curación del trastorno o la enfermedad) y el tratamiento paliativo (incluyendo el alivio sintomático).

5 El término "prevención de un trastorno o una enfermedad" tal como se usa en el presente documento, tal como "prevención de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico", también se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, un paciente/sujeto que se sospecha que es propenso a padecer un trastorno o una enfermedad tal como se define en el presente documento puede beneficiarse, en particular, de una prevención del trastorno o la enfermedad. El sujeto/paciente puede tener susceptibilidad o predisposición a padecer un trastorno o una enfermedad, incluyendo, pero sin limitarse, a predisposición hereditaria. Tal predisposición puede determinarse mediante ensayos convencionales usando, por ejemplo, marcadores genéticos o indicadores fenotípicos. Ha de entenderse que un trastorno o una enfermedad que va a prevenirse según la presente invención no se ha diagnosticado o no puede diagnosticarse en el paciente/sujeto (por ejemplo, el paciente/sujeto no muestra ningún síntoma clínico ni patológico). Por tanto, el término "prevención" comprende el uso de compuestos de la presente invención antes de que se diagnostique o se determine cualquier síntoma clínico y/o patológico o de que pueda diagnosticarse o determinarse por el médico que atiende.

15 El sujeto o paciente, tal como el sujeto que necesita tratamiento, prevención o mejora, puede ser un eucariota, un animal, un animal vertebrado, un mamífero, un roedor (por ejemplo un cobaya, un hámster, una rata, un ratón), un murino (por ejemplo un ratón), un canino (por ejemplo un perro), un felino (por ejemplo un gato), un equino (por ejemplo un caballo), un primate, un simio (por ejemplo un mono o simio), un mono (por ejemplo un tití, un babuino), un simio (por ejemplo gorila, chimpancé, orangután, gibón), o un ser humano. El significado de los términos "eucariota", "animal", "mamífero", etc. se conoce bien en la técnica y puede deducirse, por ejemplo, de Wehner y Gehring (1995; Thieme Verlag). En el contexto de esta invención, se prevé particularmente que los animales que van a tratarse sean importantes desde el punto de vista económico, agronómico o científico. Los organismos importantes desde el punto de vista científico incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, moscas de la fruta como *Drosophila melanogaster* y nematodos como *Caenorhabditis elegans*. Los ejemplos no limitantes de animales importantes desde el punto de vista agronómico son ovejas, ganado bovino y cerdos, mientras que, por ejemplo, los gatos y los perros pueden considerarse animales importantes desde el punto de vista económico. Preferiblemente, el sujeto/paciente es un mamífero; más preferiblemente, el sujeto/paciente es un ser humano o un mamífero no humano (tal como, por ejemplo, un cobaya, un hámster, una rata, un ratón, un conejo, un perro, un gato, un caballo, un mono, un simio, un tití, un babuino, un gorila, un chimpancé, un orangután, un gibón, una oveja, ganado bovino o un cerdo; y en particular un animal canino, tal como un perro); incluso más preferiblemente, el sujeto/paciente es un ser humano.

20 La invención también se describe mediante las siguientes figuras ilustrativas. Las figuras adjuntas muestran:

25 Figura 1: Inhibición de la desgranulación de mastocitos por los compuestos 1a (figura 1A), 1b (figura 1B), 1c (figura 1C), 1d (figura 1D), 1e (figura 1E), 1f (figura 1F), 1g (figura 1G), 1h (figura 1H), 1i (figura 1I), 1j (figura 1J), 1k (figura 1K), 1n (figura 1L), 1q (figura 1M), 1r (figura 1N), 1s (figura 1O), 1t (figura 1P), 1u (figura 1Q), 1v (figura 1R), 1w (figura 1S), 1x (figura 1T), 2a (figura 1U), 2b (figura 1V) y miltefosina (figura 1W). Se muestran curvas de respuesta a la dosis para la inhibición de la liberación de β -hexosaminidasa de células RBL-2H3 estimuladas con IgE específica de antígeno y activadas con antígeno (medias \pm error estándar de la media).

30 Figura 2: Inhibición de la fosforilación de Akt en Ser473 por los compuestos 1a (figura 2A) y 1c (figura 2B). El porcentaje de Akt fosforilada total en Ser473 se expresa como un porcentaje de células no tratadas control inducidas con IgE y antígeno durante 15 min (se muestran las medias \pm la desviación estándar).

35 Figura 3: Efecto del compuesto 1a y dexametasona sobre la hinchazón de oreja de ratón en la respuesta DTH en ratones (los datos son medias \pm desviaciones estándar de 8 ratones; * $p < 0,01$ frente a control con vehículo (prueba a posteriori de Dunnett)).

40 Figura 4: Efecto del compuesto 1a sobre la hinchazón de oreja de ratón en el modelo de dermatitis de contacto alérgica en ratones. La figura 4A muestra la actividad inhibidora del compuesto 1a en diferentes momentos de administración antes de la exposición al antígeno (los datos son medias \pm EEM de 7 ratones; * $p < 0,05$ frente a control con vehículo (prueba a posteriori de Dunnett)). La figura 4B muestra la actividad inhibidora del compuesto 1a tras la aplicación tópica (los datos son medias \pm EEM de 7 ratones; *** $p < 0,001$ frente a control con vehículo (prueba a posteriori de Dunnett)).

45 La invención se describirá ahora haciendo referencia a los ejemplos siguientes.

60 Ejemplos

Ejemplo 1: Propanosulfonato de 3-(N,N-dimetilmiristilamónio) 1a (referencia)

65 El compuesto 1a está disponible comercialmente (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Múnich, Alemania, número de producto T7763).

Ejemplo 2: Preparación de propanosulfonato de 3-(N-metiltetradecilamonio) 1b

Se agitan N-metiltetradecilamina (454 mg, 2 mmol) y 1,3-propanosulfona (280 mg, 2,3 mmol) en acetato de etilo (10 ml) durante 24 h. Se retiran los componentes volátiles y se somete el residuo a cromatografía ultrarrápida en sílice usando diclorometano/metanol (4:1). La evaporación rotatoria y el secado en alto vacío producen 363 mg (52%) de 1b como un sólido blanco.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,81$ (t, J = 6,9, 3H), 1,1-1,35 (m, 22 H), 1,25 (m, 2H), 2,22 (m, 2H), 2,81 (s, 3H), 2,98 (m, 4H), 3,25 (m, 2H).

EM (ESI): 350,3 ($\text{M}+\text{H}^+$), 372,6 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 699,6 ($2\text{M}+\text{H}^+$), 721,6 ($2\text{M}+\text{Na}^+$).

Ejemplo 3: Preparación de ácido 3-N,N-dimetilmiristilamonio propilfosfónico 1c (referencia)

Se alquila N,N-dimetiltetradecilamina con 3-bromopropil-fosfonato de dietilo comercial para producir el éster etílico correspondiente, que se purifica mediante cristalización. El tratamiento con bromuro de trimetilsililo en presencia de ailtrimetilsilano (Hammerschmidt 1991, Yan 2007) seguido por la hidrólisis del fosfonato de sililo resultante produce el compuesto 1c como sal de bromhidrato (1c-HBr).

Los productos secundarios de la escisión de éster son volátiles y pueden retirarse a vacío. Posteriormente se purifica 1c-HBr mediante cristalización. La cantidad de agua usada debe mantenerse al mínimo porque 1c y su bromhidrato tienden a espumación intensa durante la evaporación rotatoria. El tratamiento final acuoso intentado del éster etílico mencionado anteriormente, 1c-HBr o 1c produce una emulsión estable. El bromhidrato se trata exactamente con un equivalente de NaOH, se desaliniza haciéndolo pasar a través de una columna RP-18 y se purifica la betaina 1c resultante mediante recristalización.

$^1\text{H-RMN}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 8:2): $\delta = 0,90$ (t, 3H), [1,22-1,43 (m), 1,39 (s a), $\Sigma = 22\text{H}$], 1,66 (d/t, J = 17,3/7,0, 2H), 1,75 (m a, 2H), 2,02 (m, 2H), 3,09 (s, 6H), 3,25 (m, 2H), 3,47 (m, 2H).

Ejemplo 4: Preparación de etanosulfonato de 2-(N,N-dimetiltetradecilamonio) 1d (referencia)

Se suspenden 2-bromoetanosulfonato de sodio (411 mg, 1,95 mmol), N-metiltetradecilamina (342 mg, 1,50 mmol) y K_2CO_3 (269 mg, 1,95 mmol) en dimetilformamida (DMF) (3 ml) y se agita a reflujo durante la noche. Se retiran los componentes volátiles y se purifica el residuo mediante HPLC preparativa para dar, tras el secado a alto vacío, 324 mg de etanosulfonato de 2-(N-metiltetradecilamonio) como un sólido blanco.

Se suspenden etanosulfonato de 2-(N-metiltetradecilamonio) (113 mg, 0,25 mmol), yoduro de metilo (284 mg, 2,0 mmol) y K_2CO_3 (103 mg, 0,75 mmol) en una mezcla de acetona (3 ml) y diclorometano (1 ml). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante la noche, se retira el disolvente y se purifica el residuo mediante HPLC preparativa para dar 50 mg (57%) de 1d.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 8:2): $\delta = 0,80$ (t, J = 6,9, 3H), 1,1-1,45 (m, 22H), 1,68 (m, 2H), 3,02 (s, 6H), 3,19 (m, 4H), 3,61 (m, 2H).

EM (ESI): 350,3 ($\text{M}+\text{H}^+$), 699,6 ($2\text{M}+\text{H}^+$).

Ejemplo 5: Preparación de butanosulfonato de 4-(N,N-dimetilmiristilamonio) 1e (referencia)

Se disuelven 1,4-butanosulfona (681 mg, 5 mmol) y N,N-dimetiltetradecilamina (966 mg, 4 mmol) en DMF (10 ml) y se agita en una atmósfera de argón a una temperatura de baño de 130°C durante 2 d. Se retiran los componentes volátiles y se purifica el residuo mediante HPLC preparativa para producir 831 mg (55%) de 1e como un sólido blanco.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,81$ (t, J = 6,9, 3H), 1,1-1,35 (m, 22H), 1,61 (m, 2H), 1,83 (m, 4H), 2,84 (m, 2H), 3,08 (s, 6H), 3,18 (m, 2H), 3,44 (m, 2H).

EM (ESI): 378,3 ($\text{M}+\text{H}^+$), 755,6 ($2\text{M}+\text{H}^+$).

Ejemplo 6: Preparación de 1-sulfonato de 2-((dimetil(tetradecil)amonio)metil)butano 1f (referencia)

Se disuelven éster dietílico del ácido etilmalónico (1,86 g, 9,9 mMol) y N-metiltetradecilamina (1,5 g, 6,6 mmol) en DMF (20 ml) y se agita a una temperatura de baño de 130°C bajo atmósfera de argón durante 24 h. Se reparte la mezcla entre agua y EtOAc. Se extrae la fase acuosa con EtOAc dos veces y se lavan las fases combinadas de EtOAc con NaCl saturado, se secan sobre Na_2SO_4 y se retira el disolvente. Se hace pasar el residuo a través de un lecho corto de sílice usando diclorometano/metanol 4:1, se retira el disolvente a presión reducida y se seca el

ES 3 016 961 T3

residuo en alto vacío para proporcionar 2,1 g (86%) de 2-(metil(tetradecil)carbamoil)butanoato de etilo como un material blanco.

5 En una atmósfera de argón, se suspende LiAlH_4 (608 mg, 16,0 mmol) en 10 ml de tetrahidrofurano (THF) y se calienta a reflujo. Se añade una disolución de 2-(metil(tetradecil)-carbamoil)butanoato de etilo (3,0 g, 8,0 mmol) en 15 ml de THF gota a gota con precaución y se calienta la mezcla resultante a reflujo durante la noche. Se añade metanol gota a gota con precaución hasta que cesa el desprendimiento de hidrógeno. Se añaden 15 ml de agua, con lo que cambia el color desde gris a blanco. Se diluye la mezcla con agua y acetato de etilo. Se separan los sólidos por filtración usando una capa de Celite con lavado con EtOAc. Se separa la fase acuosa y se extrae tres veces con acetato de etilo. Se lavan las fases orgánicas combinadas con NaCl saturado (1x), se secan sobre Na_2SO_4 y se retira el disolvente a presión reducida. Se somete el residuo a cromatografía en sílice usando diclorometano/metanol 10:1 para producir 550 mg (22%) de 2-((metil(tetradecil)amino)metil)butan-1-ol como un sólido blanco.

15 Se disuelve el 2-((metil(tetradecil)amino)metil)butan-1-ol (390 mg, 1,24 mmol) en diclorometano (8 ml) bajo atmósfera de argón. Se añaden N,N-diisopropiletilamina (DIEA) (163 mg, 1,30 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (15 mg, 0,12 mmol). A esta mezcla se le añade gota a gota cloruro de metanosulfonilo (148 mg, 1,30 mmol). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se extingue la mezcla con metanol y se retira el disolvente a presión reducida. La cromatografía en sílice usando diclorometano/metanol 10:1 produce 208 mg (43%) de metanosulfonato de 2-((metil(tetradecil)amino)-metil)butilo.

25 Se disuelve el metanosulfonato de 2-((metil(tetradecil)amino)-metil)butilo (200 mg, 0,5 mmol) en etanol (2 ml). Se añade una disolución de Na_2SO_3 (315 mg, 2,5 mmol) en 1 ml de agua y se agita la mezcla a una temperatura de baño de 100°C durante 3 h. Tras retirar el disolvente a presión reducida, se somete el residuo a cromatografía en sílice usando diclorometano/metanol 20:1 para producir 120 mg (64%) de 1-sulfonato de 2-((metil(tetradecil)amino)metil)butano.

30 Se disuelve el 1-sulfonato de 2-((metil(tetradecil)amino)metil)butano (90 mg, 0,23 mmol) en 2 ml de diclorometano bajo atmósfera de argón. Se añaden K_2CO_3 (97 mg, 0,70 mmol) y yoduro de metilo (255 mg, 1,80 mmol) y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Tras retirar el disolvente a presión reducida, se purifica el residuo mediante HPLC preparativa para producir 78 mg (87%) de 1f como un sólido blanco.

35 $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 0,81 (t, J = 6,9, 3H), 0,92 (t, J = 7,3, 3H), 1,1-1,35 (m, 22H), 1,50 (m, 2H), 1,66 (m, 2H), 2,40 (m, 1H), 2,75 (m, 1H), 2,91 (d/m, J = 12,5, 1H), 3,10 (m, 1H), 3,12/3,16 (2s, 3H), 3,26 (m, 2H), 4,06 (d/m, J = 12,9, 1H).

EM (ESI): 392,4 ($\text{M}+\text{H}^+$), 783,7 ($2\text{M}+\text{H}^+$).

40 Ejemplos 7, 8 y 9: Preparación de propanosulfonato de 3-(N,N-dimetiloctadecilamonio) 1g (referencia), propanosulfonato de 3-(N,N-dimetilpalmitilamonio) 1h (referencia) y propanosulfonato de 3-(N,N-dimetildodecilamonio) 1i (referencia)

45 Los compuestos 1g, 1h y 1i se preparan de manera similar a la descrita para el compuesto 1b usando N-metiloctadecilamina (para 1g), N-metilhexadecilamina (para 1h) o N-metildodecilamina (para 1i) en lugar de N-metiltetradecilamina seguido por cuaternización del nitrógeno usando yoduro de metilo tal como se describe en la etapa de preparación final para el compuesto 1d.

50 Alternativamente, los compuestos 1g, 1h y 1i están disponibles comercialmente de Sigma-Aldrich GmbH, Múnich, Alemania (1g: número de producto 41570; 1h: número de producto H6883; 1i: número de producto D0431).

Ejemplo 10: N-Tetradecil-N,N-dimetilglicina 1j (referencia)

55 Compuesto 1j está disponible comercialmente (Affymetrix, Santa Clara, CA 95051, EE.UU., número de producto T305).

Ejemplo 11: Preparación de propanoato de 3-(dimetil(tetradecil)amonio) 1k (referencia)

60 En una atmósfera de argón, se disuelve β -propiolactona (216 mg, 3,0 mmol) en una mezcla de 4 ml de éter y 2 ml de acetonitrilo. Se añade N,N-dimetiltetradecilamina (724 mg, 3,0 mmol) gota a gota a lo largo de un periodo de 2 h. Se agita la mezcla durante otros 30 min y se recoge el producto, un precipitado blanco, mediante filtración, se lava con varias porciones de éter y se seca a vacío, produciendo 470 mg (50%) de 1k como un polvo blanco. Se almacena el producto por debajo de -15°C .

65 $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 0,81 (t, J = 6,4, 3H), 1,1-1,35 (m, 22H), 1,65 (m, 2H), 2,55 (t, J = 7,8, 2H), 3,13 (s, 6H), 3,20 (m, 2H), 3,69 (t, J = 7,5, 2H).

ES 3 016 961 T3

EM (ESI): 314,3 (M+H⁺), 627,5 (2M+H⁺).

Ejemplo 12: Preparación de propanoato de 3-(dimetil(dodecil)amonio) 1m (referencia)

5 En una atmósfera de argón, se disuelve β-propiolactona (216 mg, 3,0 mmol) en una mezcla de 4 ml de éter y 2 ml de acetonitrilo. Se añade N,N-dimetildodecilamina (639 mg, 3,0 mmol) gota a gota a lo largo de un periodo de 2 h. Se agita la mezcla durante la noche y se recoge el producto, un precipitado blanco, mediante filtración, se lava con varias porciones de éter y se seca a vacío, produciendo 653 mg (76%) de 1m como un polvo blanco. Se almacena el producto por debajo de -15°C.

10 ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 0,81 (t, J = 6,4, 3H), 1,1-1,35 (m, 22H), 1,65 (m, 2H), 2,55 (t, J = 7,8, 2H), 3,13 (s, 6H), 3,20 (m, 2H), 3,69 (t, J = 7,5, 2H).

EM (ESI): 314,3 (M+H⁺), 627,5 (2M+H⁺).

15 Ejemplo 13: Preparación de butanoato de 4-(metil(tetradecil)amonio) 1n (referencia)

A una disolución de 681 mg (3,0 mmol) de N-metil-tetradecilamina en dimetilformamida absoluta (DMF) (6 ml), se le añaden 834 mg (6,0 mmol) de K₂CO₃ en polvo y 1,34 g (6,0 mmol) de ácido 4-bromobutírico. Se agita la mezcla bajo atmósfera de argón a una temperatura de baño de 130°C durante 3 d. Se retiran los componentes volátiles en un evaporador rotatorio y se purifica el residuo mediante HPLC preparativa para producir 594 mg (41%) de éster tert-butílico del ácido 4-(metil(tetradecil)amonio)butírico como una sal de TFA.

ESI-EM (pos.): 370,3 (M+H⁺).

25 Se suspende el éster tert-butílico del ácido 4-(metil(tetradecil)amonio)butírico (241 mg, 0,5 mmol) en 3 ml de TFA/H₂O (95:5). Se agita la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente, se retiran los componentes volátiles en un evaporador rotatorio y se purifica el residuo mediante HPLC preparativa para producir 114 mg (36%) de 1n como un sólido blanco.

30 ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD 8:2): δ = 0,73 (t, J = 6,9, 3H), 1,11 (m), 1,18 (m, Σ = 22H), 1,56 (m, 2H), 1,85 (m, 2H), 2,29 (t, J = 6,7, 2H), 2,66 (s, 3H), 2,89 (m), 2,97 (m, Σ = 4H), 4,05 (s a, 3H).

EM (ESI): 314,2 (M+H⁺), 627,4 (2M+H⁺). Neg.: 312,0 (M-H⁻).

35 Ejemplo 14: Preparación de butanoato de 4-(dimetil(tetradecil)amonio) 1o (referencia)

40 En una atmósfera de argón, se disuelve el éster tert-butílico del ácido 4-(metil(tetradecil)amonio)butírico, sal de TFA (descrita para 1n) (338 mg, 0,70 mmol) en acetona (5 ml). Se añaden K₂CO₃ en polvo seco (486 mg, 3,5 mmol) y yoduro de metilo (497 mg, 3,5 mmol) y se agita la mezcla durante la noche. Se purifica el producto mediante HPLC preparativa y se seca en alto vacío, produciendo 266 mg (53%) del éster tert-butílico del ácido 4-(dimetil(tetradecil)amonio)butírico, sal de TFA, 100% pura mediante HPLC. Se agita este material con 3 ml de TFA/H₂O (95:5) durante 1 h. La HPLC indica conversión completa. Se retiran los componentes volátiles en un evaporador rotatorio y se purifica el residuo mediante HPLC preparativa y se seca en alto vacío para producir 105 mg (60%) de 1o.

45 ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 0,86 (t, J = 6,4, 3H), 1,15-1,35 (m, 22H), 1,69 (m, 2H), 1,98 (m, 2H), 2,41 (t, J = 6,1, 2H), 3,06 (s, 6H), 3,17 (m, 2H), 3,34 (m, 2H).

50 EM (ESI): 328,3 (M+H⁺), 655,6 (2M+H⁺).

Ejemplo 15: N-Dodecil-N,N-dimetilglicina 1p (referencia)

55 El compuesto 1p está disponible comercialmente (Affymetrix, Santa Clara, CA 95051, EE.UU., número de producto D350).

Ejemplo 16: Preparación de etanosulfonato de 2-(N-metildodecilamonio) 1q

60 Se suspenden 2-bromoetanosulfonato de sodio (411 mg, 1,95 mmol) y K₂CO₃ en polvo (269 mg, 1,95 mmol) en 3 ml de DMF seca en una atmósfera de argón. Se añade N-metildodecilamina (298 mg, 1,50 mmol) y se agita la mezcla a 130°C durante la noche. Se retiran los componentes volátiles en un evaporador rotatorio y se purifica el residuo mediante HPLC preparativa y se seca en alto vacío para producir 342 mg (74%) de 1q como un sólido blanco.

65 ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 0,81 (t, J = 6,4, 3H), 1,10-1,35 (m, 18H), 1,70 (m, 2H), 2,88 (s), 2,89 (s, Σ = 3H), 3,0-3,45 (m, 5H), 3,55 (m, 1H), 8,46 (s a, 1H), 8,89 (s a, 1H).

ES 3 016 961 T3

EM (ESI): 308,2 (M+H⁺), 325,3 (M+NH₄⁺), 615,4 (2M+H⁺).

Ejemplo 17: Preparación de etanosulfonato de 2-(N,N-dimetildodecilamonio) 1r (referencia)

5 Se agita una mezcla de etanosulfonato de 2-(N-metildodecilamonio) 1q (225 mg, 0,73 mmol), yoduro de metilo (568 mg, 4,0 mmol), carbonato de potasio (207 mg, 1,5 mmol) y acetona (5 ml) en una atmósfera de argón durante 2,5 d. Se retiran los componentes volátiles y se purifica el residuo mediante HPLC preparativa y se seca en alto vacío para producir 161 mg (68%) de producto 1r.

10 ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD 8:2): δ = 0,80 (t, J = 6,5, 3H), 1,18/ 1,29 (2m, Σ = 18H), 1,68 (m, 2H), 3,02 (s, 6H), 3,20 (m, 4H), 3,61 (m, 2H).

EM (ESI): 322,2 (M+H⁺), 643,5 (2M+H⁺), 660,5 (2M+NH₄⁺), 665,5 (2M+Na⁺).

15 Ejemplo 18: Preparación de etanosulfonato de 2-(N-metiltetradecilamonio) 1s

Se agita una mezcla de 2-bromoetanesulfonato de sodio (411 mg, 1,95 mmol), N-metiltetradecilamina (342 mg, 1,50 mmol), K₂CO₃ (269 mg, 1,95 mmol) y DMF (3 ml) a una temperatura de baño de 135°C en una atmósfera de argón durante la noche. Se retiran los componentes volátiles en un evaporador rotatorio y se purifica el residuo mediante HPLC preparativa para producir 324 mg (64%) de 1s.

20 ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 0,90 (t, J = 6,4, 3H), 1,15-1,45 (m, 22H), 1,78 (m, 2H), 2,97 / 2,99 (2s, Σ = 3H), 3,05-3,55 (m, 5H), 3,64 (m, 1H), 7,36 (s a, 1H).

25 EM (ESI): 336,3 (M+H⁺), 671,5 (2M+H⁺), 693,5 (2M+Na⁺), 709,5 (2M+K⁺).

Ejemplo 19: Preparación de ácido 3-(N,N-dimetildodecilamonio)propilfosfónico 1t (referencia)

30 En una atmósfera de argón, se disuelve (3-bromopropil)fosfonato de dietilo (1,50 g, 5,75 mmol) en 5 ml de éter absoluto. Se añade N,N-dimetildodecilamina (1,07 g, 5,00 mmol) y se agita la mezcla durante la noche. Se retiran los componentes volátiles y se seca el residuo a vacío, produciendo solidificación. El sólido higroscópico se rompe y se tritura con éter y se retira el éter mediante filtración por succión. Se seca el residuo en alto vacío para producir 1,46 g (62%) de éster dietílico del ácido 3-(N,N-dimetildodecilamonio)propilfosfónico (sal de bromuro) como un sólido higroscópico blanco.

35 ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 0,81 (t, J = 6,4, 3H), 1,19 (m), 1,27 (t, J = 7,05, Σ = 24 h), 1,67 (m, 2H), 1,81 (d/t, J = 18,1 / 6,8, 2H), 2,00 (m, 2H), 3,36 (s, 6H), 3,42 (m, 2H), 3,73 (m, 2H), 4,04 (m, 4H).

40 EM (ESI): 392,4 (M+H⁺).

45 Se coloca el éster dietílico del ácido 3-(N,N-dimetildodecilamonio)propilfosfónico, sal de bromuro (175 mg, 0,37 mmol), en una atmósfera de argón. Se añaden diclorometano absoluto (3 ml), bromotrimetilsilano (233 µl, 1,8 mmol) y aliltrimetilsilano (143 µl, 0,9 mmol) y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 2,5 d. Se retiran los componentes volátiles en un evaporador rotatorio y se purifica el residuo mediante HPLC preparativa para producir 106 mg (85%) de 1t.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD 8:2): δ = 0,78 (t, J = 6,3, 3H), 1,1-1,3 (m, 18H), 1,62 (m, 4H), 2,10 (m, 2H), 2,97 (s, 6H), 3,13 (m, 2H), 3,27 (m, 2H).

50 EM (ESI): 336,2 (M+H⁺), 671,5 (2M+H⁺).

Ejemplo 20: Preparación de bromuro de éster dietílico del ácido 3-(N-metil-N-hexadecilamino)propilfosfónico 1w (referencia)

55 En una atmósfera de argón, se disuelve parcialmente N-metilhexadecilamina (510 mg, 2,0 mmol) en éter absoluto (4 ml). Se añade (3-bromopropil)fosfonato de dietilo (647 mg, 2,50 mmol) y diisopropiletilamina (436 µl, 2,5 mmol) y se agita la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. Se retiran los componentes volátiles y se purifica el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en sílice usando diclorometano/metanol 10:1 para producir 216 mg (21%) de 1w.

60 ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 0,81 (t, J = 6,3, 3H), 1,19 (m), 1,25 T, J = 6,9, Σ = 32H), 1,40 (m, 2H), 1,72 (m, 4H), 2,18 (s, 3H), 2,31 (m, 2H), 2,39 (t a, J = 6,5, 2H), 4,02 (m_c, 4H).

65 EM (ESI): 434,4 (M+H⁺), 889,7 (2M+Na⁺).

Ejemplo 21: Preparación de ácido 3-(N-metil-N-hexadecilamino)propilfosfónico 1v (referencia)

ES 3 016 961 T3

En una atmósfera de argón, se agita una mezcla de bromhidrato de éster dietílico del ácido 3-(N-metil-N-hexadecilamino)propilfosfónico (1w) (130 mg, 0,25 mmol), diclorometano absoluto (2 ml), bromotrimetilsilano (184 mg, 1,20 mmol) y aliltrimetilsilano (68 mg, 0,60 mmol) durante la noche a temperatura ambiente. Se retiran los componentes volátiles y se purifica el residuo mediante HPLC preparativa para producir 52 mg (55%) de 1v.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 8:2): δ = 0,89 (t, J = 6,5, 3H), 1,2-1,4 (m, 26H), 1,65-1,87 (m, 4H), 2,06 (m, 2H), 2,80 (s, 3H), 2,85-3,25 (m a, 4H).

EM (ESI): 378,3 ($\text{M}+\text{H}^+$), 755,6 ($2\text{M}+\text{H}^+$).

Ejemplo 22: Preparación de bromuro de éster dietílico del ácido 3-(N-metil-N-tetradecilamino)propilfosfónico 1x (referencia)

Se disuelve N-metiltetradecilamina (454 mg, 2,0 mmol) en éter absoluto (3 ml) en una atmósfera de argón. Se añaden diisopropiletilamina (322 mg, 2,5 mmol) y (3-bromopropil)fosfonato de dietilo (647 mg, 2,5 mmol) y se agita la mezcla durante 2,5 d a temperatura ambiente. Se retira el precipitado y se concentra el sobrenadante en un evaporador rotatorio y se purifica mediante cromatografía ultrarrápida en sílice usando diclorometano/metanol (10:1) para producir 356 mg (26%) de 1x como un sólido blanco.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 0,81 (t, J = 6,9, 3H), 1,19 (m), 1,25 (t, J = 7,1, Σ = 28H), 1,40 (m, 2H), 1,71 (m, 4H), 2,18 (s, 3H), 2,31 (m, 2H), 2,39 (t a, J = 7,2, 2H), 2,95 (s a, 1H), 4,02 (m_c, 4H).

EM (ESI): 406,4 ($\text{M}+\text{H}^+$), 833,6 ($2\text{M}+\text{Na}^+$).

Ejemplo 23: Preparación de ácido 3-(N-metil-N-tetradecilamino)propilfosfónico (betaína) 1u (referencia)

Se disuelve bromhidrato de éster dietílico de ácido 3-(N-metil-N-tetradecilamino)propilfosfónico 1x (162 mg, 0,33 mmol) en 2 ml de diclorometano absoluto en una atmósfera de argón. Se añaden bromuro de trimetilsililo (245 mg, 1,6 mmol) y aliltrimetilsilano (91 mg, 0,8 mmol) y se agita la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. Se retiran los componentes volátiles en un evaporador rotatorio y se disuelve el residuo en etanol y se purifica mediante HPLC preparativa para producir 105 mg (91%) de 1u como un sólido blanco.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 0,81 (t, J = 6,9, 3H), 1,1-1,3 (m, 20H), 1,61 (s a, 2H), 1,75 (m, 2H), 2,00 (m, 2H), 2,73 (s, 3H), 2,86 (m), 3,02 (m), 3,14 (m, Σ = 4H).

EM (ESI): 350,3 ($\text{M}+\text{H}^+$), 699,6 ($2\text{M}+\text{H}^+$). Neg.: 697,3 ($2\text{M}-\text{H}^+$).

Ejemplos 24 y 25: Preparación de N-hexadecil-N-(3-sulfonatopropil)piperidinio 2a (referencia) y 1-hexadecil-1-(3-sulfonatopropil)-4-hidroxipiperidinio 2b (referencia)

Se disuelven piperidina (1,32 g, 15,5 mmol) y 1-yodoheptadecano (1,82 g, 5,17 mmol) en 6-8 ml de etanol y se agita durante la noche mientras que se protege de la luz. Se reparte la mezcla entre suficiente éter y NaOH diluido, se lava con NaCl saturado una vez, se seca sobre Na_2SO_4 , se somete al evaporador rotatorio hasta obtener un aceite y se seca a vacío. Rendimiento: 1,45 g (90% de aceite parduzco). El producto se usa en la siguiente etapa sin purificación adicional.

En 4 ml de EtOAc, se mezcla N-hexadecilpiperidina (300 mg, 0,97 mmol) con 1,3-propanosultona (142 mg, 1,63 mmol). Se agita la mezcla primero a temperatura ambiente (2 d), luego a 50°C durante la noche. Tras la adición de otros 142 mg de 1,3-propanosultona, se agita la mezcla a reflujo durante 2 días, punto en el cual la HPLC analítica indica conversión completa. Se retiran los componentes volátiles y se purifica el residuo mediante HPLC preparativa para producir 298 mg (71%) de 2a puro como un sólido blanco.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 0,81 (t, J = 7,8, 3 H), 1,1-1,4 (m, 26 H), 1,5-1,8 (m, 6 H), 1,91 (m, 2 H), 2,14 (m, 2 H), 2,91 (t, J = 6,2, 2H), 3,16 (m, 2H), 3,29 (m, 2H), 3,45 (M, 2H), 3,64 (m, 2H).

EM (ESI): 432,4 ($\text{M}+\text{H}^+$), 863,8 ($2\text{M}+\text{H}^+$).

El compuesto 2b se prepara de manera similar usando 4-hidroxipiperidina en lugar de piperidina.

Ejemplo 26: Preparación de trans-N-tetradecil-N-(3-sulfonatopropil)-3-dietilaminocarbonil-piperidinio 2c (referencia)

Se agita una mezcla de N,N-dietil-3-piperidincarbonamida (809 mg, 4,4 mmol), etanol (3 ml) y yoduro de tetradecilo (620 mg, 1,9 mmol) durante la noche a temperatura ambiente. La HPLC muestra conversión completa. La mezcla se diluye con éter (200 ml) y se extrae con NaOH 1N (1x 100 ml) y NaCl saturado (1x 100 ml) y se seca la fase orgánica sobre Na_2SO_4 y se filtra. Se retiran los componentes volátiles y se purifica el residuo mediante

cromatografía ultrarrápida en sílice usando diclorometano/metanol (10:1). Se seca el producto a vacío para producir 682 mg (94%) de 1-tetradecil-3-dietilaminocarbonilpiperidina. El producto contiene N,N-dietil-3-piperidinacarboxamida residual, que se retira en la siguiente etapa.

5 EM (ESI): 381,4 (M+H⁺).

Se agita una mezcla de 1-tetradecil-3-dietilaminocarbonilpiperidina (380 mg, 1,0 mmol), acetato de etilo (3 ml) y 1,3-propanosulfona (488 mg, 4,0 mmol) bajo atmósfera de argón a reflujo durante 6 d. La HPLC muestra que la conversión es incompleta y los estereoisómeros cis y trans dan lugar a dos picos que eluyen próximos. Se retiran los componentes volátiles y se purifica el residuo mediante HPLC preparativa. Se purifican de nuevo las dos fracciones resultantes mediante HPLC preparativa, produciendo el estereoisómero racémico cis y trans en un 95% de pureza, con un rendimiento de 71 mg (14%) de estereoisómero trans 2c y un 54 mg (11%) del estereoisómero cis.

15 ¹H-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ = 0,81 (t, J = 6,4, 3H), 1,03 (t, J = 7,1, 3H), 1,10-1,35 (m, 25H), 1,50 (m, 1H), 1,60-1,90 (m, 3H), 1,90-2,20 (m, 3H), 2,20-2,45 (m, 1H), 2,85-3,15 (m, 5H), 3,15-3,55 (m, 7H), 3,60 (d a, J = 12,2, 1H), 3,75-3,95 (m, 3H).

20 ¹³C-RMN y DEPT (125,7 MHz, CDCl₃): 12,73 (CH₃), 14,09 (CH₃), 14,74 (CH₃), 18,15 (CH₂), 18,88 (CH₂), 21,60 (CH₂), 22,66 (CH₂), 25,91 (CH₂), 26,37 (CH₂), 28,99 (CH₂), 29,32 (CH₂), 29,38 (CH₂), 29,52 (CH₂), 29,60 (CH₂), 29,62 (CH₂), 31,88 (CH₂), 32,92 (CH), 40,51 (CH₂), 40,51 (CH₂), 42,15 (CH₂), 47,09 (CH₂), 53,80 (CH₂), 59,20 (CH₂), 60,64 (CH₂), 65,23 (CH₂), 170,09 (CO).

EM (ESI): 503,5 (M+H⁺).

25 Ejemplo 27: Inhibición de desgranulación de mastocitos.

Introducción

30 Los mastocitos son células efectoras clave implicadas en enfermedades alérgicas e inflamatorias, y la línea celular de leucemia basófila de rata, clon 2H3, (RBL-2H3) es un modelo usado habitualmente de liberación de inmunomoduladores (desgranulación) dependiente de alérgeno en mastocitos. En su superficie expresan el receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI). Tras la unión de la IgE específica de antígeno al receptor, las células se sensibilizan para el antígeno específico de IgE (alérgeno). Cuando las células sensibilizadas para la IgE se encuentran después con antígeno multivalente, el antígeno agrupa complejos de IgE-FcεRI e inicia una cascada de transducción de señales que conduce a desgranulación, es decir, la liberación de mediadores inflamatorios, tales como citoquinas, eicosanoides, histamina y enzimas. El ensayo puede usarse como método de cribado para identificar compuestos inmunomoduladores, en particular compuestos útiles en el tratamiento médico de enfermedades alérgicas e inflamatorias y asma. Se demostró previamente que la β-hexosaminidasa se libera con la misma cinética que la histamina (Schwartz *et al.*, J Immunology; 123:1445-1450 (1979)), ofreciendo de ese modo un medio sencillo para seguir la desgranulación. La línea celular RBL-2H3 se ha usado con éxito para identificar compuestos con actividad antialérgica (Choo *et al.* Planta Med., 69: 518-522 (2003)).

Materiales y métodos

45 *Materiales*

Productos químicos: El anticuerpo monoclonal IgE de rata anti-DNP se adquirió de Biozol (BZL06936), la seroalbúmina humana conjugada con dinitrofenilo (A6661) y Triton X-100 (T9284) eran de Sigma-Aldrich, la 4-metilumbeliferil-N-acetil-β-D-glucosaminida (474502), el 12-miristato-13-acetato de forbol (524400) y la tapsigargina (586005) de Calbiochem. La ionomicina (ALX-450-006) se adquirió de Alexis Biochemicals. El DMSO era de Merck (1.02950.0500) o Sigma-Aldrich (D2650). Los medios de cultivo celular y los suplementos, medio esencial mínimo (21090-022), medio esencial mínimo sin rojo fenol (51200-046), medio RPMI 1640 (31870-025), L-glutamina (25030-024) y tripsina al 0,05%-EDTA (25300-054), se obtuvieron de Invitrogen. El suero bovino fetal (A15-151) era de PAA Laboratories. Otros reactivos eran de calidad de laboratorio convencional o mejores.

55 Tampones y disoluciones: La solución salina tamponada con fosfato (PBS) y HEPES 1 M se proporcionaron por infraestructura interna de servicios. El tampón de Tyrode (TYB) consistía en medio esencial mínimo sin rojo fenol con suplemento de L-glutamina 2 mM y HEPES 20 mM. El tampón de lisis consistía en Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM y Triton X-100 al 0,1% (p/v). Se disolvió DNP-HSA a 1 mg/ml en agua. La disolución de sustrato MUG consistía en 4-metilumbeliferil-N-acetil-β-D-glucosaminida 2,5 mM en citrato 0,05 M, pH 4,5; la disolución de parada era NaHCO₃ 0,1 M/Na₂CO₃ 0,1 M, pH 10.

65 Consumibles y equipos: Para los procedimientos de manipulación de líquidos de pequeño volumen, se usaron de forma rutinaria pipetas electrónicas Rainin LTS (Mettler-Toledo). Las placas de 24 pocillos Costar-Corning (3337) se centrifugaron en una centrifuga Eppendorf 5804 R. Se usó una incubadora de sobremesa Heraeus B15 para las incubaciones a 37°C en condiciones no estériles. Se midió la fluorescencia en placas negras Nunc de 96 pocillos

(237105) usando un lector de microplacas (Tecan Safire) o un lector de placas multimodo FlexStation 3 (Molecular Devices). Las células se mantuvieron en incubadoras de CO₂ Hera Cell 240 (Thermo Scientific). Las pipetas serológicas (4487, 4488 y 4489) y las botellas de cultivo celular (431080) eran de Corning-Costar, los tubos de microcentrífuga de 1,5 y 2 ml (0030 120.086 y 0030 120.094) eran de Eppendorf.

Cultivo celular: Las células RBL-2H3 obtenidas de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (ACC312) (Braunschweig, Alemania) se mantuvieron en medio esencial mínimo al 70% con sales de Earle, medio RPMI 1640 al 20%, SBF al 10% y L-glutamina 2 mM en aire al 95%/CO₂ al 5% a 37°C y se controlaron de manera rutinaria para contaminación por micoplasmas. Se realizaron pases de las células cada 3-4 días; después de lavar las células una vez con 35 ml de PBS, las células se incubaron 8 min con 5 ml de solución de tripsina al 0,05%-EDTA a 37°C. Se retiraron las células de la incubadora, se añadieron 15 ml de medio de cultivo y se resuspendieron las células mediante pipeteo repetido.

Siembra de células: Se recogieron las células con tripsina-EDTA tal como se describe y se sembraron 50-100 µl de suspensión de células en placas de agrupación de 24 pocillos Costar CellBind (no. 3337). Se mantuvieron las placas durante 30 min a TA en la campana estéril antes de transferirse a la incubadora. Las células se usaron en el plazo de uno o dos días después de la siembra.

Medida de la liberación de β-hexosaminidasa

Procedimientos experimentales

Para la sensibilización, las células para su uso inmediato se sensibilizaron 6-12 h después de la siembra en placa; las células que iban a usarse al día siguiente se sensibilizaron 26-38 h después de la siembra en placa. Las placas de cultivo se retiraron de la incubadora y se comprobaron para determinar el crecimiento celular y la contaminación. Se desechó el medio y las células se sensibilizaron con IgE anti-DNP (0,4 µg/ml) en 0,4 ml de medio de cultivo durante la noche. Después de la sensibilización durante la noche, las células se lavaron con 0,8 ml de TyB precalentado y se añadieron 0,38 ml del compuesto de prueba o vehículo control (suplementado o no con SBF al 1%) a pocillos por duplicado. Las muestras se ajustaron para que contuvieran un 1% de vehículo para los compuestos de prueba disueltos en disolventes orgánicos. Se incubaron las células durante 1 h a 37°C. Al final del período de incubación, las células se estimularon de manera rutinaria con 20 µl de DNP-HSA (2 µg/ml; concentración final 0,1 µg/ml) diluido en TyB y las células se incubaron durante 15 min a 37°C. Alternativamente, las células se estimularon con 20 µl de ionomicina 5 µM (concentración final 0,25 µM) o 20 µl de tapsigargina 5 µM (concentración final 0,25 µM), tanto en ausencia como en presencia de PMA 20 nM (concentración final).

Se retiraron las placas de la incubadora y se centrifugaron inmediatamente a 4°C durante 5 min a 250 x g y se transfirieron a un baño de hielo. Alícuotas de los sobrenadantes, 25 µl, se transfirieron a placas de 96 pocillos. El sobrenadante restante se aspiró de los pocillos control y las células se lisaron en 400 µl de tampón de lisis durante 5 min a TA en un agitador orbital a 450 rpm en condiciones no estériles. Después de la lisis, se transfirieron alícuotas de 25 µl de lisados a placas de 96 pocillos

Se añadió disolución de sustrato MUG, 100 µl, al sobrenadante y las muestras de lisado y las placas se incubaron 30 min a 37°C. La reacción se terminó mediante la adición de 150 µl de disolución de parada. Se midió la fluorescencia a longitudes de onda de excitación de 365 nm y de emisión de 440 nm.

Preparación del compuesto de prueba: Los compuestos de prueba se prepararon en tubos de microcentrífuga de 1,5 o 2 ml y se incubaron durante 30 min a 37°C en un dispositivo Thermomixer Comfort con agitación (750 rpm). Se usó una pipeta multicanal electrónica para la transferencia rápida de diluciones del compuesto desde los tubos de microcentrífuga a las células.

Controles: los controles usados se definen como sigue: control negativo, se midió el sobrenadante de células no estimuladas para determinar la liberación inespecífica de β-hexosaminidasa; control positivo, se midió el sobrenadante de células estimuladas con DNP-HSA para determinar la liberación específica de β-hexosaminidasa estimulada por antígeno; control máximo, se midió el lisado de células no estimuladas para determinar el contenido total de β-hexosaminidasa.

Evaluación del efecto farmacológico

Desgranulación (liberación de β-hexosaminidasa): La desgranulación se calculó como el porcentaje de β-hexosaminidasa liberada con respecto a un control máximo (β-hexosaminidasa total) después de la sustracción del control negativo (liberación inespecífica) usando la fórmula;

% de desgranulación = $100 \times (\text{compuesto de prueba} - \text{control negativo}) / (\text{control máximo} - \text{control negativo})$.

Inhibición de la desgranulación (inhibición de la liberación de β-hexosaminidasa): La inhibición de la desgranulación se calculó como el porcentaje de reducción de la liberación de β-hexosaminidasa con respecto al control positivo

ES 3 016 961 T3

(liberación estimulada por antígeno) después de la sustracción del control negativo (liberación inespecífica) usando la fórmula;

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times (1 - (\text{compuesto de prueba} - \text{control negativo}) / (\text{control positivo} - \text{control negativo})).$$

Medida de la concentración máxima tolerada

Se midió la concentración máxima tolerada (MTC), es decir, la concentración más alta del compuesto de prueba que no produce citotoxicidad, tal como se determina por la liberación de lactato deshidrogenasa, en el intervalo de concentración de prueba. Se usó una prueba de citotoxicidad disponible comercialmente (Promega Cytotox-One no. de catálogo 67891).

El índice de seguridad (SI) de un compuesto de prueba es la proporción entre la concentración máxima tolerada y la CI50 y se usa como medida de la seguridad relativa del compuesto de prueba.

Resultados

Se determinó la inhibición dependiente de la concentración de la desgranulación para todos los compuestos de prueba en un intervalo de concentración, tal como se muestra en la figura 1, y se determinaron los valores de CI50 (concentración a la que se alcanza el 50% de inhibición máxima) para cada compuesto junto con los valores de MTC en el mismo intervalo de concentración (tabla 1). Los resultados se recogen de al menos tres experimentos independientes.

Tabla 1. Inhibición de la desgranulación: Valores de CI50, MTC y SI

| Compuesto | CI50 (µM) | MTC (µM) | SI |
|-------------|---------------------------|----------|------|
| 1a | 3,2 | 100 | 31,3 |
| 1b | 4,3 | 100 | 23,3 |
| 1c | 2,8 | 200 | 71,4 |
| 1d | 3,9 | 100 | 25,6 |
| 1e | 3,7 | 150 | 40,5 |
| 1f | 4,0 | 75 | 18,8 |
| 1g | 9,5 | 50 | 5,3 |
| 1h | 3,7 | 50 | 13,5 |
| 1i | 4,1 | 200 | 48,8 |
| 1j | 5,1 | 75 | 14,7 |
| 1k | 5,3 | 100 | 18,9 |
| 1m | 73% de inhibición a 25 µM | 100 | - |
| 1n | 8,0 | 100 | 12,5 |
| 1o | 65% de inhibición a 25 µM | 100 | - |
| 1p | 50% de inhibición a 25 µM | 100 | - |
| 1q | 8,8 | 200 | 22,7 |
| 1r | 4,2 | 200 | 47,6 |
| 1s | 5,6 | 100 | 17,9 |
| 1t | 6,1 | 200 | 32,8 |
| 1u | 5,9 | 200 | 33,9 |
| 1v | 8,8 | 200 | 22,7 |
| 1w | 6,9 | 200 | 29,0 |
| 1x | 5,5 | 100 | 18,2 |
| 2a | 4,5 | 50 | 11,1 |
| 2b | 4,3 | 50 | 11,6 |
| 2c | 50% de inhibición a 25 µM | 100 | - |
| Miltefosina | 4,2 | 25 | 6,0 |

La MTC de los compuestos de prueba fue 5-70 veces mayor que sus respectivas CI50 y, por tanto, la inhibición de la desgranulación puede atribuirse a un efecto farmacológico y no a un efecto secundario a la citotoxicidad.

Todas las sustancias expuestas en la tabla 1 muestran valores de CI50 en el intervalo micromolar bajo en combinación con valores de MTC altos cuando se comparan con miltefosina. Por tanto, los compuestos 1b, 1q, y 1s según la invención, así como los compuestos de referencia ensayados en el presente documento, tienen una citotoxicidad ventajosamente baja.

La desgranulación de mastocitos es un suceso celular clave en reacciones alérgicas e inflamatorias, en particular en sucesos patológicos que implican la liberación de mediadores tales como histamina, leucotrienos y prostaglandinas,

así como proteasas. Como consecuencia, la inhibición de la desgranulación de mastocitos es una estrategia valiosa para la prevención o el tratamiento de procesos patológicos que implican a los mediadores mencionados anteriormente. Además, el ensayo de desgranulación de mastocitos proporciona una estimación de la actividad de los compuestos de prueba en otras células que desempeñan un papel clave en la respuesta inflamatoria, tales como granulocitos, macrófagos y timocitos, que liberan citoquinas y quimioquinas proinflamatorias y proteasas que erosionan tejidos.

Ejemplo 28: Inhibición de activación de Akt quinasa.

10 Introducción

También se usó el ensayo de desgranulación de mastocitos usando la línea celular RBL-2H3 (véase el ejemplo 27) para determinar el estado del eje PI3K/Akt. La activación de PI3K conduce a la producción de PIP3 en el lado citosólico de la bicapa lipídica. Akt se recluta al dominio PIP3 y posteriormente se activa mediante fosforilación en los residuos Ser473 y Thr308. (Franke *et al.*, Cell 81: 727-736, (1995)). Una vez reclutada a la membrana, se fosforila y activa por otras quinanas (Hemmings, Science 275: 628-630 (1997); Hemmings, Science 276: 534 (1997); Downward, Science 279: 673-674 (1998); Alessi *et al.*, EMBO J. 15:6541-6551 (1996)). La inmunotransferencia de del residuo Ser473 fosforilado en Akt (fosfo-Ser473 de Akt) se usa ampliamente para evaluar el nivel de activación del eje PI3K/Akt.

20 Materiales y métodos

Materiales

25 Todos los tampones y disoluciones usados para el ensayo de fosfo-Ser473 de Akt eran de Meso Scale Discovery. El tampón de lisis Tris consistía en NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM y Triton-X-100 al 1%. Se preparó tampón de lisis Tris completo antes de su uso mediante la adición de inhibidor de proteasa, inhibidores de fosfatasa y PMSF. El tampón de lavado Tris 10x consistió en Tris 500 mM, pH 7,5, NaCl 1,5 M y Tween-20 al 0,2%. El bloqueador A estaba compuesto por seroalbúmina bovina en tampón de lavado Tris. Se usó tampón de lectura T según las instrucciones del fabricante. Los kits de lisado de células completas usados fueron fosfo-Ser473 de Akt (K11100D, Lote K0011749) y ERK1/2 (K11107D, Lote K0011698) total como control de carga.

Equipos

35 Se usaron pipetas multicanal de 12 pocillos (30-300 µl) de Eppendorf. Las placas de ensayo se agitaron en un control TiMix 5 (Edmund Bühler). La detección de electroquimioluminiscencia se realizó en un dispositivo SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery).

40 Medida de fosfo-Ser473 de Akt

Procedimientos experimentales

45 Ensayo de proteínas: Se determinó la concentración de proteínas usando el kit de ensayo de proteínas BCA (ácido bicinconónico) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron muestras por duplicado de 10 µl de patrones de seroalbúmina bovina (BSA), el blanco y lisados en una placa de 96 pocillos con 0,2 ml de reactivo de trabajo durante 30 min a 37°C. Las placas se enfriaron a temperatura ambiente durante 5 min y se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de placas multimodo. Las concentraciones de proteínas se calcularon usando el software FlexStation 3 (SoftMax Pro versión 5.3). La concentración de proteínas de los lisados se determinó a partir de una curva de patrón (BSA) usando un ajuste de curva lineal.

50 Ensayo de fosfoproteínas: se determinó la fosforilación de proteínas usando el sistema de ensayo MULTI-SPOT® (Meso Scale Discovery) que proporciona detección simultánea de proteínas fosforiladas y totales. Brevemente, anticuerpos de captura contra la proteína fosforilada y total forman patrones en manchas distintas en el mismo pocillo de placas de 96 pocillos. Se combinan inmunoensayo de tipo sándwich y tecnología de detección de electroquimioluminiscencia para medir la intensidad de la luz emitida de manchas de proteínas fosforiladas y totales. El análisis de fósforo-Ser473 de Akt se realizó según las instrucciones del fabricante. Se determinó la cantidad óptima de proteína en 5 µg de lisado por pocillo para ERK1/2 y 10 µg/pocillo para fosfo-Ser473 de Akt. Se bloquearon las placas con 25 µl/pocillo de bloqueante A durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Durante este tiempo, se descongelaron los lisados y se diluyeron hasta la concentración deseada de proteína en tampón de lisis Tris completo. Se lavaron las placas cuatro veces en tampón de lavado Tris y se añadieron 25 µl de lisado por pocillo. Se incubaron las placas durante 1-3 horas a temperatura ambiente con agitación según las recomendaciones del fabricante. Se lavaron las placas cuatro veces con tampón de lavado Tris, seguido por la adición de 25 µl/pocillo del anticuerpo de detección respectivo e incubación durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación. Después de cuatro lavados finales con tampón de lavado Tris, se añadieron 150 µl/pocillo de tampón de lectura T, y se leyeron las placas en un lector de placas SECTOR Imager 6000.

Evaluación de los efectos de fosfo-Ser473 de Akt

Se sustrajo la señal media de fondo de cada placa de los datos sin procesar promediados. La cantidad de proteína total fosforilada se expresó como el % de fosfoproteína según las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery)

Resultados

Se determinaron los niveles de fosfo-Ser473 de Akt en células estimuladas por antígeno y sensibilizadas con IgE después del tratamiento sin (control positivo) o con compuesto de prueba 1, 5 y 25 μM y se normalizaron a los niveles de Akt total. Se demostró inhibición dependiente de la concentración de la fosforilación de Akt en Ser473, tal como se muestra en la figura 2. La tabla 2 muestra los niveles de fosfo-Ser473 de Akt normalizados como un porcentaje de los del control positivo.

Tabla 2. Inhibición de fosforilación de Akt en Ser473 por los compuestos 1a y 1c

| Compuesto | Nivel de fosfo-Ser473 de Akt (% de control positivo) | | |
|-----------|--|-----------------|------------------|
| | 1 μM | 5 μM | 25 μM |
| 1a | 103,1 \pm 17,4 | 57,0 \pm 15,2 | 13,2 \pm 4,2 |
| 1c | 83,2 \pm 17,3 | 11,7 \pm 7,7 | 2,2 \pm 1,4 |

El porcentaje del Akt total fosforilada en Ser473 se expresa como el porcentaje de células no tratadas control, después de la inducción con IgE y antígeno durante 15 min.

Se observó una disminución dependiente de la dosis en los niveles de fosfo-Ser473 de Akt después del tratamiento con todos los compuestos expuestos en la tabla 2. Por tanto, estos compuestos pueden usarse para reducir los niveles de Akt activada y, en consecuencia, son útiles en la intervención médica en indicaciones en las que Akt hiperactivada desempeña un papel patogénico, tales como enfermedades inflamatorias y alérgicas.

Ejemplo 29: Inhibición de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) en ratones.

Introducción

Se evaluaron los efectos antiinflamatorios y antialérgicos del compuesto 1a (referencia) en un modelo de ratón de reacciones cutáneas de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) y se compararon con un control con vehículo y con el fármaco de referencia, dexametasona. Las reacciones DTH son respuestas inmunitarias mediadas por células específicas de antígeno, activadas principalmente por células T cooperadoras de tipo 1 (Th1), similares a la respuesta de inmunización de tuberculina. La reacción inmunitaria inducida por exposición a ovoalbúmina en animales previamente sensibilizados con ovoalbúmina en adyuvante completo de Freund se caracteriza por hinchazón (edema) en el sitio de la exposición, por ejemplo, la oreja del ratón. La dexametasona, un esteroide antiinflamatorio, reduce las respuestas inmunitarias mediadas por células y se empleó para validar la capacidad de respuesta del ensayo al tratamiento farmacológico.

Materiales y métodos*Materiales*

La ovoalbúmina (fracción V, polvo liofilizado), el adyuvante completo de Freund (ACF) y la metilcelulosa se obtuvieron de Sigma-Aldrich, la dexametasona de Pharmaceutical Works Polfa (Pabianice, Polonia).

Animales

Se criaron ratones BALB/cJW hembra en la Universidad de Lodz, Lodz, Polonia y se alojaron en grupos de 8 en jaulas Makrolon con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h. A los ratones se le dio acceso libre a la comida (Agropol S.j., Motycz, Polonia) y el agua.

Sensibilización con y exposición a antígeno

El tamaño del grupo fue $n = 8$ ratones a menos que se indique de otro modo. El compuesto de prueba estaba recién preparado antes de la administración.

Sensibilización: El antígeno proteico, la ovoalbúmina, se reconstituyó en PBS a 4 mg/ml. Se preparó una emulsión de ovoalbúmina-ACF mezclando la disolución de proteína con la suspensión de ACF a una razón de 1:1, usando dos jeringas de tipo Luer. La emulsión se sometió a prueba poniendo una gota de emulsión sobre PBS; si la emulsión permanecía como una gotita apretada sobre el PBS, la emulsión se consideraba lista. Los ratones se sensibilizaron mediante inyección subcutánea de 25 μl de emulsión en cada lado de la cola (100 μg de ovoalbúmina por ratón).

Exposición: El sexto día después de la sensibilización, se provocó DTH exponiendo los animales por vía subcutánea (aguja de calibre 30, B. Braun Melsungen, Melsungen, Alemania) en la oreja izquierda con 10 µl de una suspensión al 1% de ovoalbúmina agregada por calor (HOVA) (100 µg de ovoalbúmina por ratón). A las orejas derechas se le administró por vía subcutánea PBS y sirvieron para determinar las diferencias individuales en grosores de oreja. Se preparó HOVA calentando una disolución al 5% de ovoalbúmina en solución salina durante 1 hora a 80°C con agitación ocasional. Después de enfriar a temperatura ambiente y centrifugación (400 g, 10 min a 4°C), el sedimento se lavó dos veces con solución salina, se resuspendió al 2% en PBS y las alícuotas se almacenaron a -30°C. Antes de la inyección, se diluyó HOVA con un volumen igual de PBS y se sonicó. Se midió el grosor de la oreja con un calibre accionado por resorte preciso (artículo no. 7309, Mitutoyo, Kawasaki, Japón) antes de la exposición y 24 horas después de la exposición.

La sensibilización, la exposición y la medida del grosor de la oreja se realizaron con anestesia (80 mg/kg de ketamina más 8 mg/kg de xilazina, por vía intraperitoneal).

Administración del compuesto

Los efectos antiinflamatorios del compuesto 1a se compararon con un control con vehículo (disolución de metilcelulosa al 0,5%) y con el fármaco de referencia, dexametasona. El compuesto de prueba se administró por vía oral mediante sonda nasogástrica (artículo no. 432093, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Alemania) como sigue: 16 h antes de la sensibilización con ovoalbúmina se administró una dosis de carga de 100 mg/kg; la primera dosis de mantenimiento de 25 mg/kg se administró 3 h antes de la sensibilización (día 0) y en cada uno de los cinco días consecutivos siguientes (día 1 a 5) así como en el día de la exposición al antígeno (día 6) (un total de 8 administraciones). Tres horas después de la última dosis, se realizó la exposición al antígeno en las orejas tal como se describió anteriormente. Se administró dexametasona a 1 mg/kg por vía oral mediante sonda nasogástrica 3 h antes de la sensibilización y una vez al día, administrándose la dosis final 3 h antes de la exposición al antígeno (un total de 7 administraciones). Todas las administraciones se realizaron en un volumen de 10 ml/kg.

Cuantificación de los resultados del ensayo

Para tener en cuenta la variabilidad individual, se sustrajo el aumento en el grosor de la oreja derecha, antes y 24 h después de la administración de PBS, del aumento inducido por HOVA en el grosor de la oreja izquierda. El aumento en el grosor de la oreja se calculó por la diferencia entre el grosor de la oreja antes y 24 h después de la exposición al antígeno. El porcentaje de inhibición de la hinchazón de oreja se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times (\text{IET}_{\text{vehículo}} - \text{IET}_{\text{compuesto}}) / \text{IET}_{\text{vehículo}}$$

en la que IET = (ET_{24 h pc} - ET_{predosis})_{orejas tratadas con HOVA} - (ET_{24 h pc} - ET_{predosis})_{orejas tratadas con PBS}

(IET, aumento en el grosor de la oreja; ET, grosor de la oreja; pc, después de la exposición)

Evaluación estadística

La media y la desviación estándar (DE) se calcularon a partir de valores de edema de oreja individuales. La evaluación estadística fue un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) con prueba a posteriori de Dunnett o prueba de la t de Student según fuera apropiado.

Resultados

En la figura 3 se muestra la supresión de la hinchazón de oreja de ratón por el compuesto 1a (referencia) y dexametasona, en comparación con control con vehículo. La tabla 3 resume la inhibición de DTH para el compuesto 1a.

Tabla 3. Efecto del compuesto 1a (referencia) sobre la hinchazón de oreja en la respuesta de DTH en ratones.

| Compuesto | Inhibición de hinchazón de oreja de ratón |
|-------------------------|---|
| 1a, 100 mg/kg | 32* |
| Dexametasona, 1,0 mg/kg | 49* |

*p<0,01 frente a control con vehículo (prueba a posteriori de Dunnett)

La dexametasona administrada por vía oral a una dosis de 1 mg/kg, una vez al día durante todo el período de sensibilización produjo una respuesta DTH reducida significativamente, con una inhibición de un 49%. Dicha alta dosificación (sobredosis), sin embargo, no es adecuada para el tratamiento de seres humanos debido a efectos secundarios graves del corticoesteroide y solo se usó para validar la sensibilidad del modelo. Además, en el curso del presente estudio, la administración de dexametasona produjo una pérdida significativa en el peso corporal del

4,4% ($p < 0,01$ frente a control con vehículo con la prueba de la *t* de Student de datos apareados), un signo típico de toxicidad de corticosteroides. En cambio, no se observaron efectos secundarios tóxicos del compuesto 1a durante el transcurso del estudio.

- 5 El compuesto 1a, administrado por vía oral dos veces al día durante todo el período de sensibilización a 20 mg/kg (dosis de carga 100 mg/kg), redujo significativamente la respuesta de DTH en un 32%. Por tanto, el compuesto 1a pudo producir una inhibición equivalente al 65% a la de la dosis alta de dexametasona.

10 La reducción de la respuesta DTH obtenida mediante el tratamiento con el compuesto 1a demuestra que este compuesto es eficaz en la intervención farmacéutica en enfermedades alérgicas e inflamatorias que implican respuestas inmunitarias mediadas por células específicas de antígeno.

Ejemplo 30: Inhibición de la respuesta inflamatoria de dermatitis de contacto alérgica en ratones.

15 Introducción

Se evaluaron los efectos antiinflamatorios y antialérgicos del compuesto 1a (referencia) en un modelo de ratón de dermatitis de contacto alérgica, una respuesta activada principalmente por células T cooperadoras de tipo 2 (Th2). Se ha demostrado que los ratones BALB/c son susceptibles al alérgeno 2,4-diisocianato de tolueno (TDI), produciendo un estado inflamatorio de la piel con aspectos similares a los de la dermatitis atópica humana (Baumer *et al.*, J Pharm Pharmacol, 55: 1107-1114 (2003); Baumer *et al.*, Br J Dermatol. 151: 823-830 (2004); Ehinger *et al.*, Eur J Pharmacol. 392: 93-99 (2000)). En este modelo, se obtiene una respuesta de dermatitis alérgica sensibilizando ratones a TDI y posteriormente exponiéndolos al antígeno mediante administración tópica sobre las orejas. Es posible una evaluación cuantitativa de los efectos antiinflamatorios y antialérgicos de los compuestos de prueba administrados por vía tópica o por vía oral, midiendo la hinchazón de oreja resultante.

30 Las ventajas del modelo de dermatitis de contacto alérgica (Zollner *et al.*, Bioessays 26: 693-6 (2004)) son la reproducibilidad y fiabilidad (> 90% de los ratones BALB/c responden a la sensibilización), un protocolo de inducción corto, evaluación cuantitativa midiendo el grosor de la oreja, pueden inducirse lesiones cutáneas de tipo dermatitis atópica, y productos farmacéuticos clínicamente relevantes, tales como los corticoesteroides, los inhibidores de calcineurina y los inhibidores de PDE4, son eficaces en este modelo.

Materiales y métodos

35 Animales

Se obtuvieron ratones BALB/c hembra de Charles River (Sulzfeld, Alemania) a la edad de 8 semanas. Todos los animales se alojaron en grupos de ocho por jaula a 22°C con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. El agua y una dieta convencional (Altromin, Lage/Lippe, Alemania) estaban disponibles a voluntad. Todos los animales se aclimataron durante una semana antes de que se iniciaran los procedimientos experimentales.

Sensibilización con TDI, exposición al alérgeno y prueba de hinchazón de oreja de ratón

45 Los procedimientos experimentales para los ratones BALB/c, el alojamiento, la sensibilización y exposición a TDI, y la medida del grosor de la oreja se realizaron como se describió anteriormente (Baumer *et al.*, J Pharm Pharmacol. 55: 15 1107-1114 (2003)) con las siguientes modificaciones. Para la sensibilización activa, se administraron 100 µl de TDI al 5% (p/v) a la epidermis abdominal afeitada y sometida a dermoabrasión en el día uno, y durante los siguientes tres días consecutivos, se aplicaron 50 µl de TDI al 5% (p/v). La reacción alérgica se potenció 21 días después mediante la aplicación de 50 µl de TDI al 5% (p/v). Para el examen de los efectos del compuesto de prueba, se usaron las orejas izquierdas para la exposición a TDI (20 µl de un 0,5% en acetona) y se midió el grosor de la oreja 3 horas antes y 24 horas después de la exposición.

Administración del compuesto para el tratamiento sistémico

55 El tamaño del grupo fue $n = 7$ ratones a menos que se indique de otro modo. Los compuestos de prueba estaban recién preparados antes de la administración.

60 Tiempo de administración: para determinar el tiempo óptimo para la administración, los grupos de tratamiento se trataron por vía oral mediante sonda nasogástrica con 100 mg/kg del compuesto 1a (suspendido en solución salina tamponada con fosfato (PBS), 10 ml/kg) 4 o 16 h antes de la exposición tópica a TDI. Los ratones tratados con vehículo recibieron PBS (10 ml/kg) por vía oral, 4 h antes de la exposición.

65 Dosis-respuesta: Se trataron dos grupos de ratones por vía oral con compuesto 1a a 20 mg/kg o 100 mg/kg suspendido en PBS, 4 h antes de la exposición tópica a TDI. Los ratones tratados con vehículo recibieron PBS por vía oral 4 h antes de la exposición.

Administración del compuesto para tratamiento tópico

Se administró el compuesto 1a a dos grupos de ratones por vía tópica en 20 µl de una disolución al 2% o al 6% en acetona/agua (1:1). Se aplicó la disolución, 2 h antes de la exposición tópica a TDI mediante la administración de 10 µl sobre cada una de las superficies interior y exterior de las orejas izquierdas. Un grupo con vehículo (n=7) se trató con acetona/agua (1:1).

Determinación del peso de los ganglios linfáticos locales y recuento de células

Directamente después del sacrificio, se preparó el ganglio linfático de drenaje de la oreja (*Ln. auricularis*) y se extirpó. Se determinó el peso del órgano por medio de una balanza analítica (Kern, Balingen, Alemania). Se prepararon suspensiones de células individuales por medio de un homogeneizador Potter de vidrio (VWR, Darmstadt, Alemania) y se contaron las células con un hemocitómetro (Neubauer, VWR, Alemania).

Evaluación estadística

La media y el error estándar de la media (EEM) se calcularon a partir de valores de edema de oreja individuales. La evaluación estadística fue un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) (si se había pasado la prueba para la distribución normal) o el ANOVA unidireccional de Kruskal-Wallis sobre el orden (si no se había pasado la prueba de la distribución normal). Ambos fueron seguidos por una prueba a posteriori (método de Dunnett o prueba de Dunn, respectivamente). Se consideró que $p < 0,05$ era significativo.

Resultados

En la figura 4A se muestra la supresión de hinchazón de oreja de ratón por el compuesto 1a (referencia) tras la administración oral, en comparación con el control con vehículo. La tabla 4 resume la inhibición de la respuesta por dermatitis de contacto alérgica por el compuesto 1a.

Tabla 4. Efecto del compuesto 1a (referencia) administrado por vía oral sobre la hinchazón de oreja en la respuesta de dermatitis de contacto alérgica en ratones.

| Compuesto | Inhibición de hinchazón de oreja de ratón |
|---------------------------------|---|
| Tiempo de administración (oral) | |
| 1a, 100 mg/kg, 4 h | 51,7* |
| 1a, 100 mg/kg, 16 h | 32,2 |

* $p < 0,05$ frente a control con vehículo (prueba a posteriori de Dunnett) en comparación con vehículo

En el estudio de tiempo de administración con administración oral, el compuesto 1a redujo la hinchazón de oreja significativamente (52% del control con vehículo) cuando se administró 4 h antes de la exposición, tal como también se muestra en la figura 4A.

El compuesto 1a tuvo un impacto significativo sobre la reacción inflamatoria inducida por TDI en un estudio piloto a 100 mg/kg. Por tanto, los compuestos según la invención y, en particular el compuesto 1a, son particularmente eficaces y, por tanto, útiles para la intervención farmacéutica oral en enfermedades inflamatorias, en particular en la dermatitis atópica.

En la figura 4B se muestra la supresión de la hinchazón de oreja de ratón por el compuesto 1a tras la administración tópica, en comparación con el control con vehículo. La tabla 5 resume la inhibición de la repuesta por dermatitis de contacto alérgica por el compuesto 1a.

Tabla 5. Efecto del compuesto 1a (referencia) administrado por vía tópica sobre la hinchazón de oreja en la repuesta de dermatitis de contacto alérgica en ratones.

| Compuesto | Inhibición de hinchazón de oreja de ratón |
|-----------|---|
| 1a, 2% | 72,0*** |
| 1a, 6% | 86,0*** |

*** $p < 0,001$ frente a control con vehículo (prueba a posteriori de Dunnett) en comparación con vehículo

El compuesto 1a administrado por vía tópica como una disolución al 2% o al 6% redujo la hinchazón de la oreja de manera sumamente significativa en el 72 o el 86%, respectivamente.

Uno de los efectos secundarios más indeseables de la administración de corticosteroides es la inmunosupresión, que conduce a la incapacidad de abordar eficazmente una infección parasitaria, la cicatrización de heridas y el

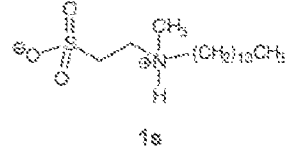
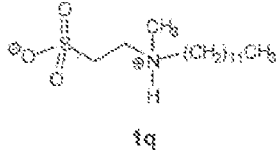
crecimiento tumoral. En el estudio actual, se determinó la reacción de ganglios linfáticos locales tras la exposición a TDI (el peso de los ganglios linfáticos y el número de células) para evaluar la respuesta de los órganos inmunitarios. El tratamiento sistémico con compuesto 1a a 100 mg/kg o el tratamiento tópico al 2% o al 6% no tuvo ningún efecto sobre la reacción de los ganglios linfáticos locales.

5 En vista del fuerte efecto mostrado en el modelo de dermatitis de contacto alérgica, el compuesto 1a es particularmente eficaz y, por tanto, útil para la intervención farmacéutica tópica en enfermedades inflamatorias, en particular en dermatitis atópica.

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula 1b, 1q, o 1s:



5

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;
para uso como un medicamento.

10 2. El compuesto según la reivindicación 1, para uso en el tratamiento, prevención o mejora de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario o alérgico.

15 3. El compuesto para uso según la reivindicación 2, en donde el trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico se selecciona de: psoriasis, dermatitis atópica (eccema atópico), dermatitis de contacto, eccema xerótico, dermatitis seborreica, neurodermatitis, dishidrosis, eccema discoide, eccema venoso, dermatitis herpetiforme (enfermedad de Duhring), autoeccematización, dermatomiositis, síndrome de hiper-IgE (Buckley), síndrome de Wiskott-Aldrich, anafilaxia, alergia alimentaria, o reacciones alérgicas a picaduras venenosas; urticarias agudas, urticarias crónicas, urticarias físicas incluyendo urticaria acuagénica, urticaria colinérgica, urticaria por frío (urticaria por frío crónica), urticaria por presión retardada, urticaria dermatográfica, urticaria por calor, urticaria solar, urticaria por vibración, urticaria adrenérgica, o urticaria angioedema; enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis por desviación (diverticulitis), síndrome de Behçet, colitis indeterminada, enfermedad celíaca, síndrome del intestino irritable, íleo postoperatorio, gastroenteropatía eosinofílica, o gastritis; rinitis alérgica crónica, rinitis alérgica estacional (fiebre del heno), conjuntivitis alérgica, conjuntivitis química, conjuntivitis neonatal, síndrome de Sjögren, glaucoma de ángulo abierto, enfermedad del ojo seco (DED; incluyendo, por ejemplo, ojo seco por deficiencia lagrimal acuosa (ADDE), ojo seco por síndrome de Sjögren (SSDE), por causa distinta a SSDE, u ojo seco evaporativo (EDE)), o edema macular diabético; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma alérgica, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, o fibrosis pulmonar; artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia, artrosis, artritis reactiva, o polimialgia reumática; esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, arteritis temporal, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmunitaria, alopecia areata o síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS); una enfermedad del injerto contra el huésped, una enfermedad del huésped contra el injerto o un rechazo a trasplante; o una contribución inflamatoria a la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

20

25

30

35

Fig. 1

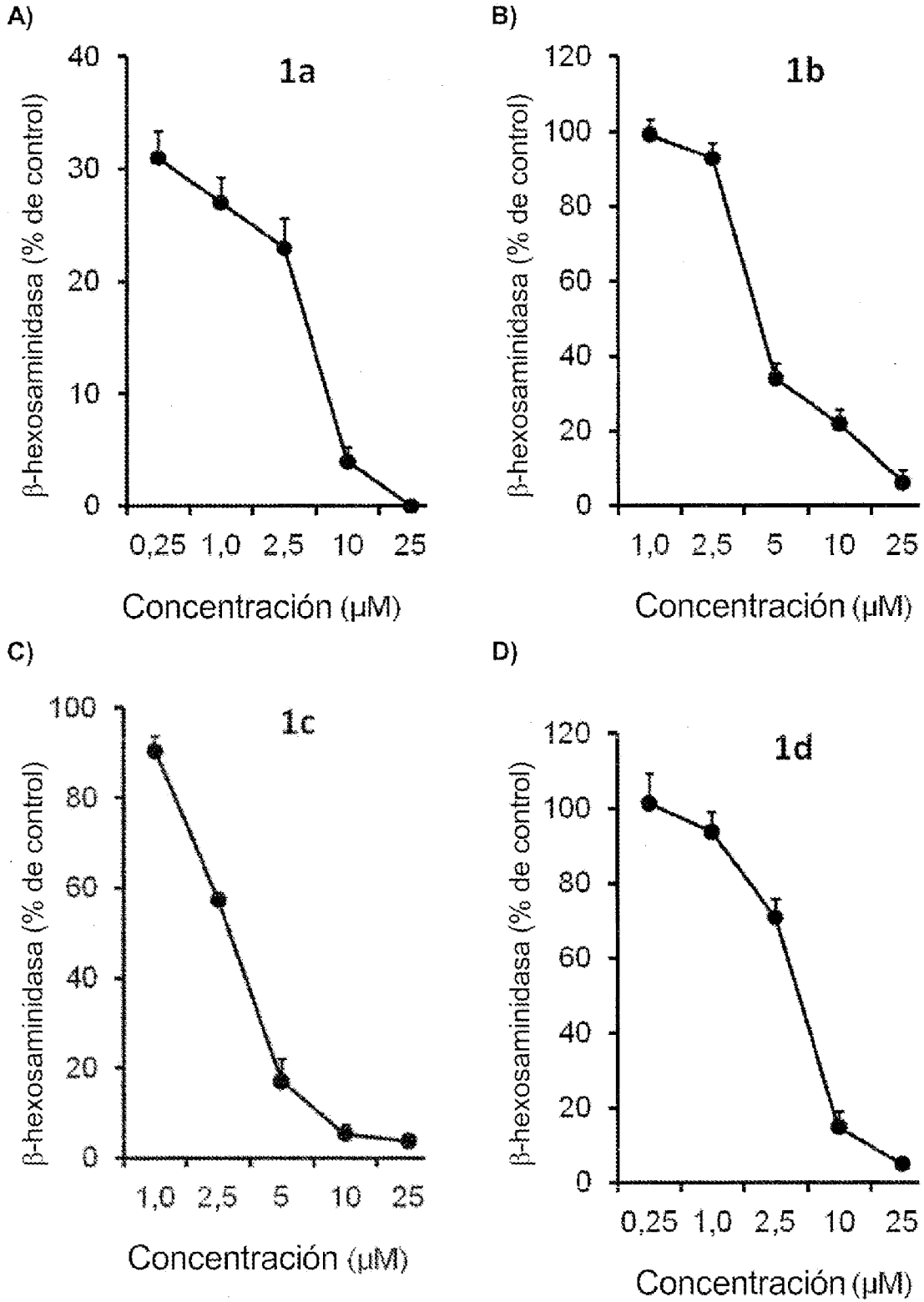


Fig. 1 (cont.)

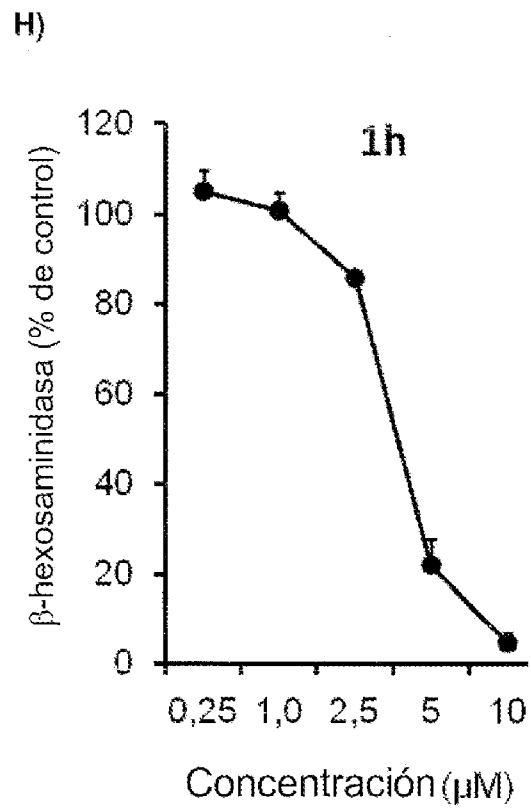
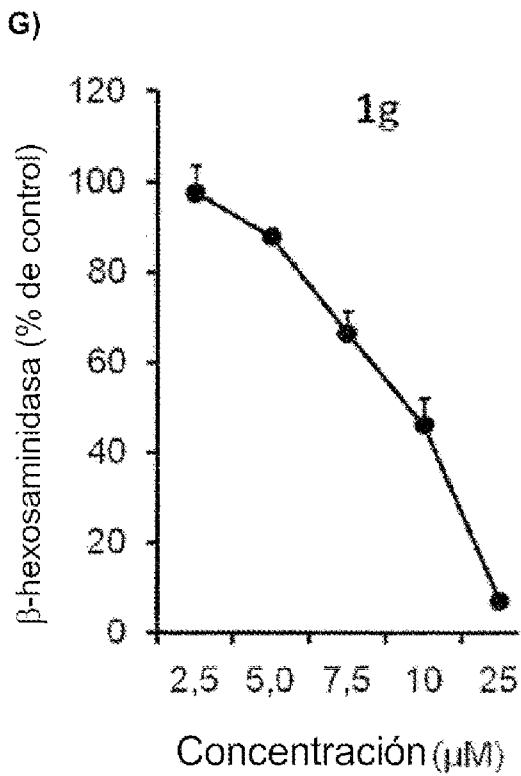
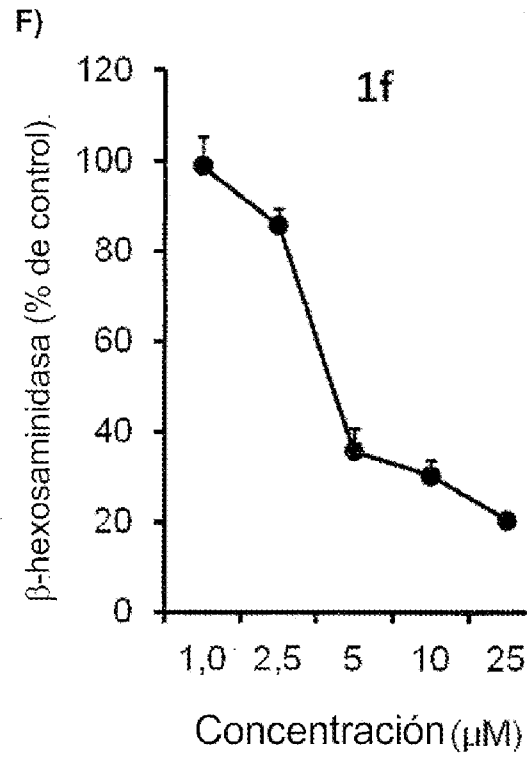
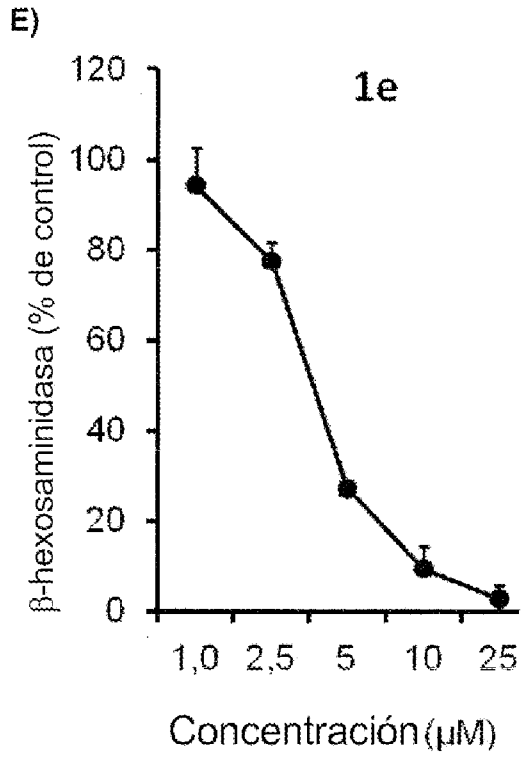


Fig. 1 (cont.)

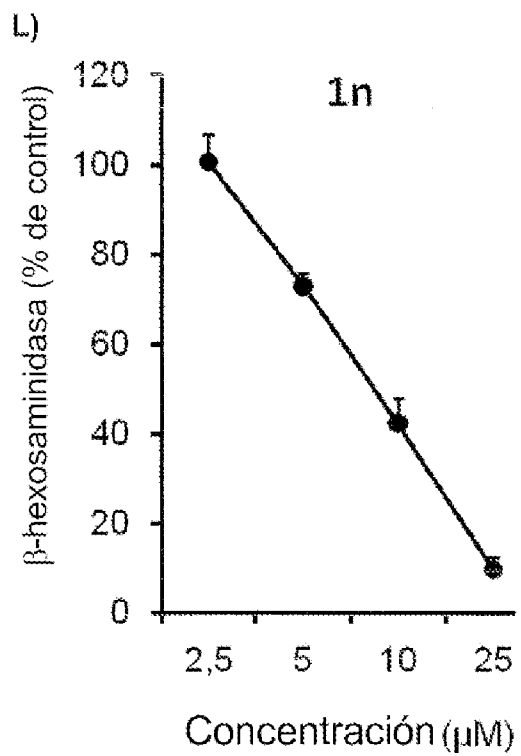
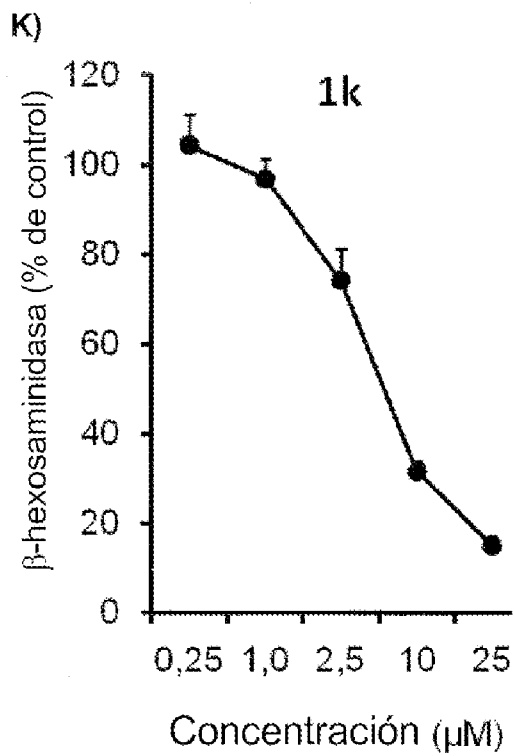
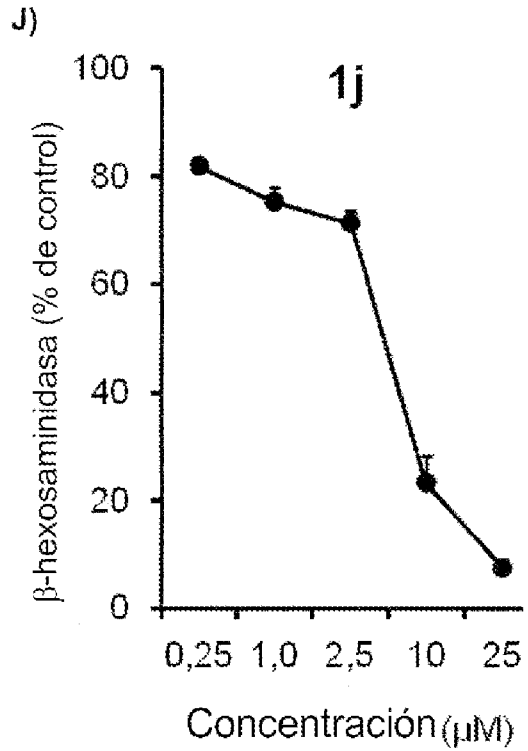
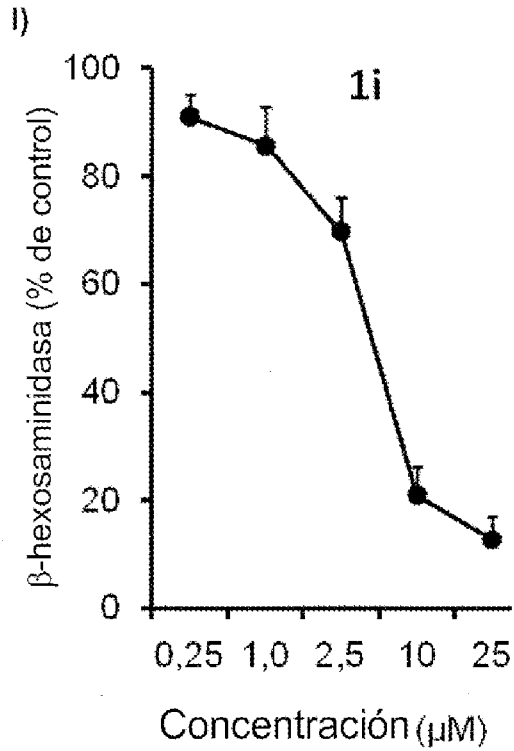


Fig. 1 (cont.)

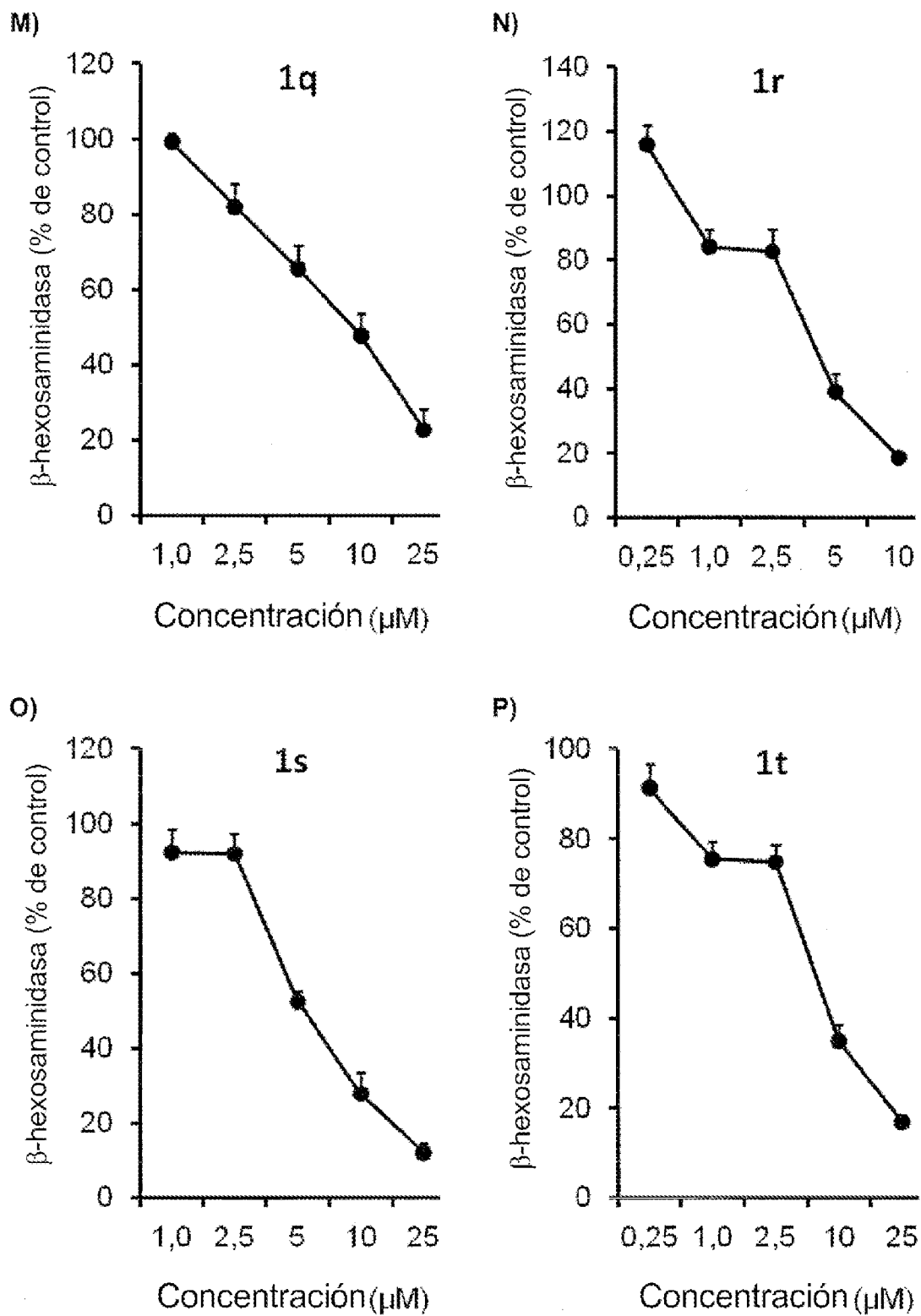


Fig. 1 (cont.)

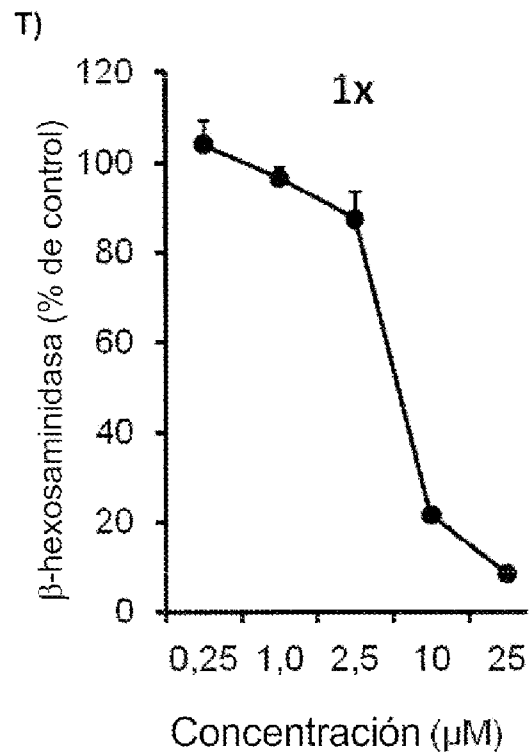
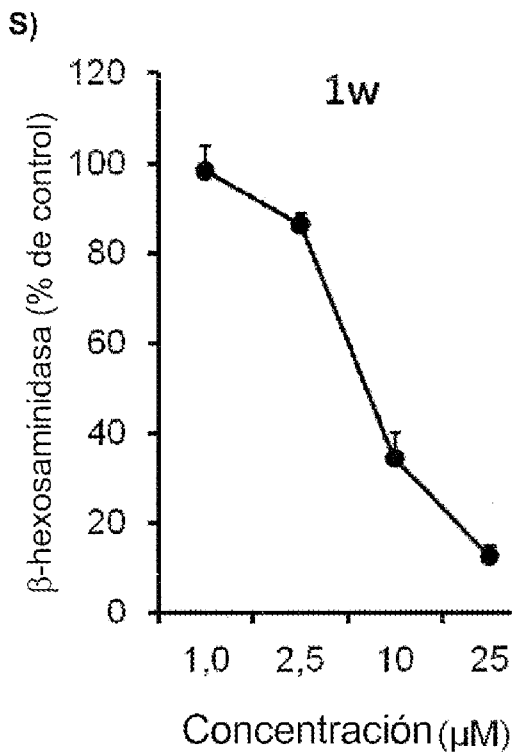
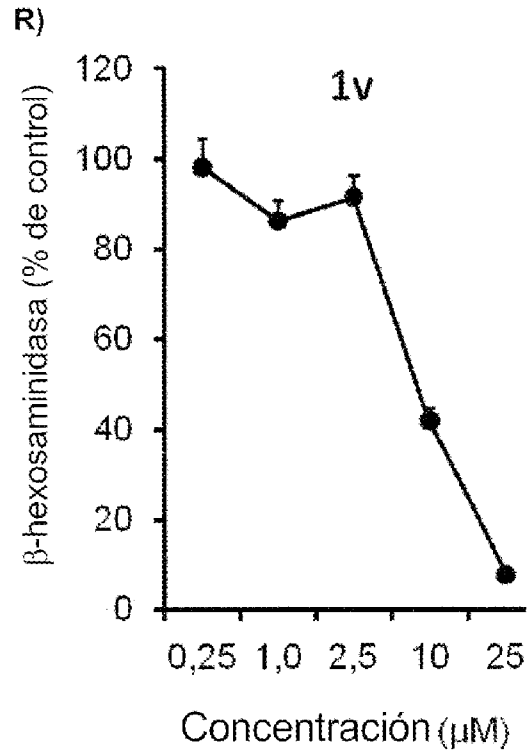
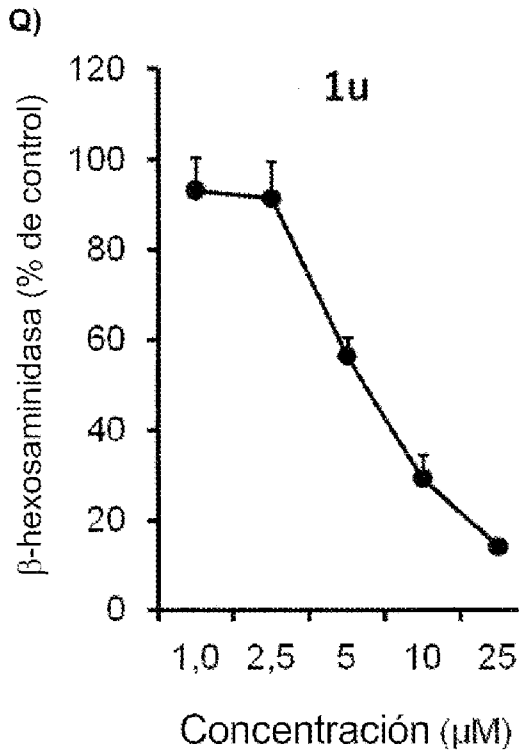


Fig. 1 (cont.)

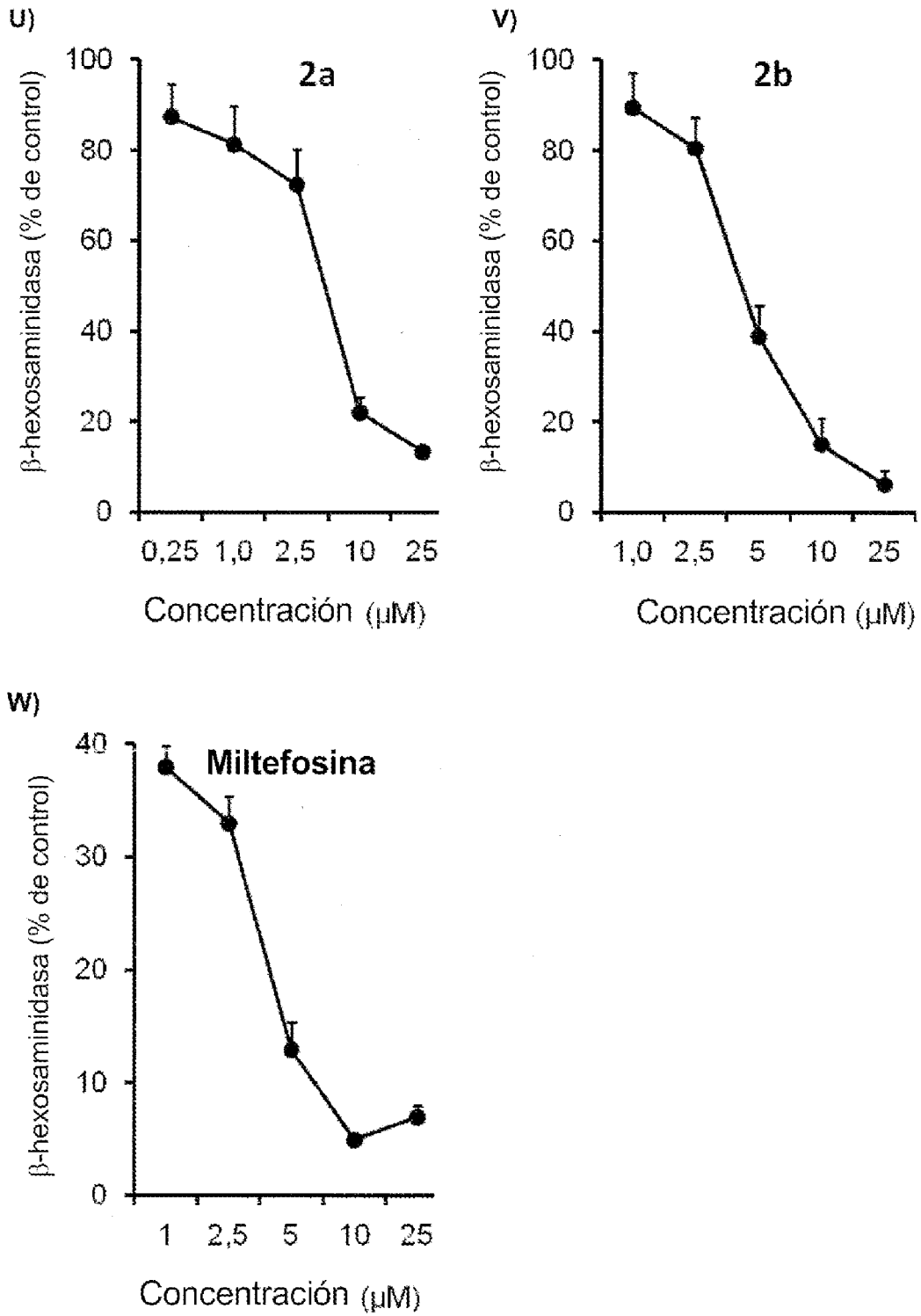


Fig. 2

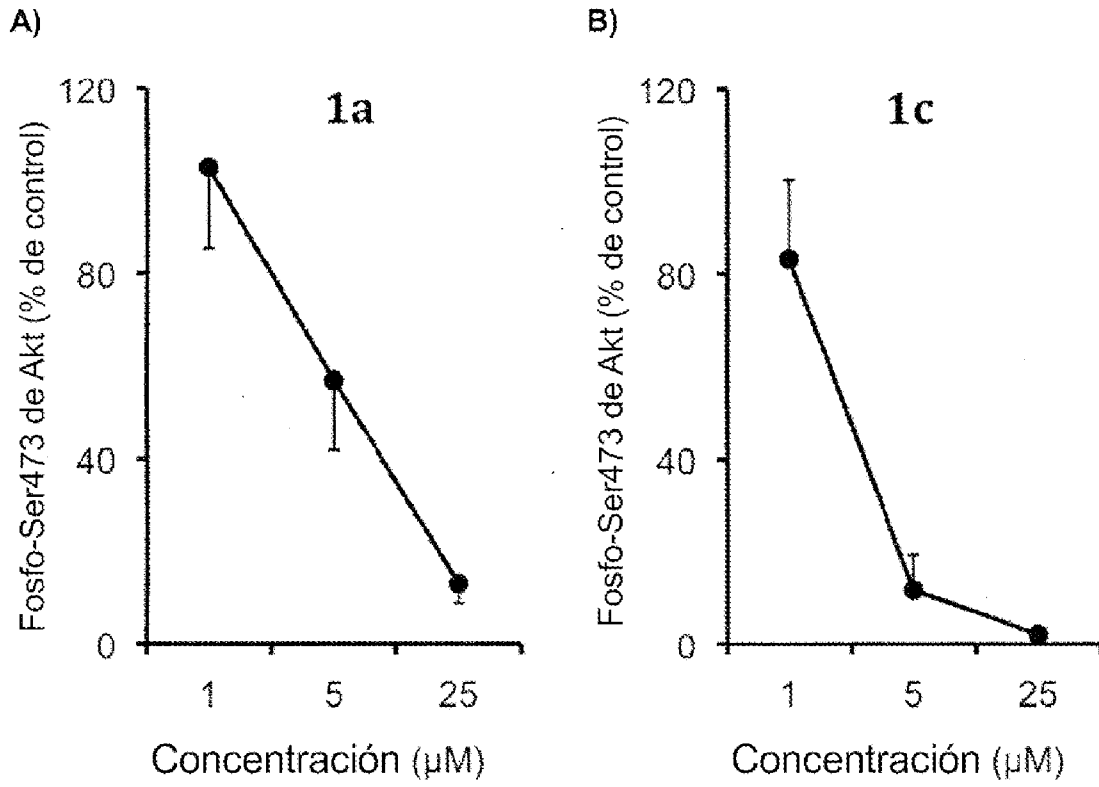


Fig. 3

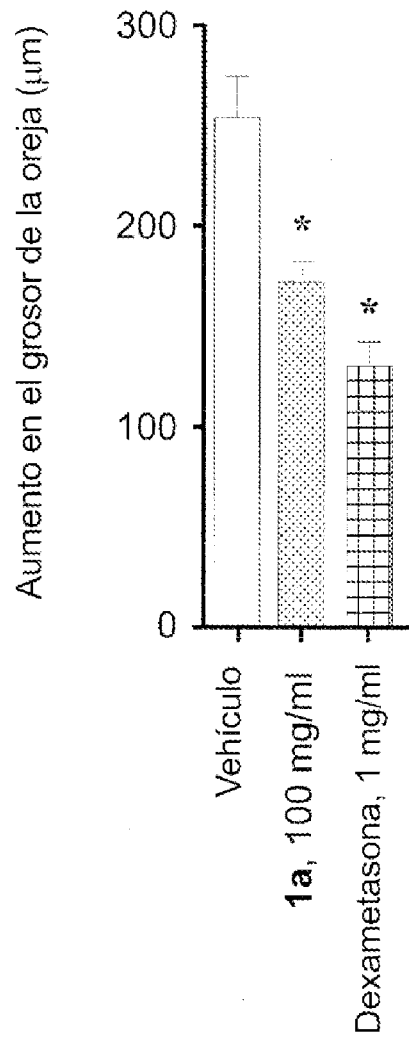


Fig. 4

A)

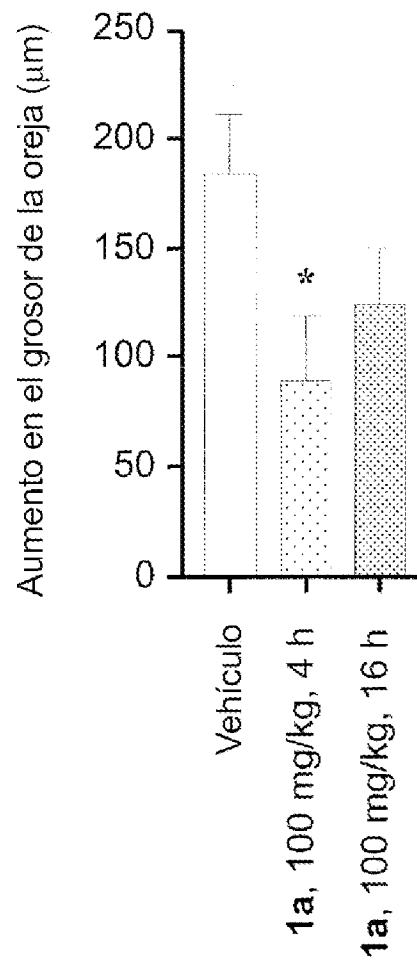


Fig. 4 (cont.)

B)

