



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 307 603**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/18 (2006.01)

A61K 31/196 (2006.01)

A61K 31/216 (2006.01)

A61K 31/222 (2006.01)

A61K 31/277 (2006.01)

C07C 311/47 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01918676 .6**

(96) Fecha de presentación : **14.03.2001**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1265603**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **18.12.2002**

(54) Título: **Antagonistas del receptor de IL-8.**

(30) Prioridad: **14.03.2000 US 189175 P**

(73) Titular/es: **SmithKline Beecham Corporation
One Franklin Plaza
Philadelphia, Pennsylvania 19101, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

(72) Inventor/es: **Widdowson, Katherine, L. y
Jin, Qi**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Antagonistas del receptor de IL-8.

5 Esta descripción se refiere a nuevos compuestos de difenilurea sustituidos con sulfonamida, a composiciones farmacéuticas, a procesos para su preparación, y a su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 y ENA-78.

Antecedentes de la invención

10 Se han aplicado muchos nombres diferentes a la interleuquina-8 (IL-8), tal como proteína-1 de activación/atraventante de neutrófilos, factor quimiotáctico de neutrófilos derivado de monocitos (MDNCF), factor activador de neutrófilos (NAF), y factor quimiotáctico de células T linfocíticas. La interleuquina-8 es un quimioatraventante para neutrófilos, basófilos y un subgrupo de células T. Es producida por un gran número de las células nucleadas, incluyendo los 15 macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales expuestas a TNF, IL-1 α , IL-1 β o LPS, y por los propios neutrófilos cuando se exponen a LPS o a factores quimiotácticos, tales como FMLP, M. Baggolini *et al.*, J. Clin. Invest., 84, 1045 (1989); J. Schroder *et al.*, J. Immunol., 139, 3474 (1987), y J. Immunol., 144, 2223 (1990); Strieter, *et al.*, Science, 243, 1467 (1989), y J. Biol. Chem., 264, 10621 (1989); Cassatella *et al.*, J. Immunol., 148, 3216 (1992).

20 GRO α , GRO β , GRO γ y NAP-2 también pertenecen a la familia de las quimioquinas. Al igual que IL-8, estas quimioquinas también han recibido diferentes nombres. Por ejemplo, GRO α , β , γ se han denominado MGSA α , β y γ , respectivamente (MGSA, siglas inglesas de “actividad estimulante del crecimiento de melanomas”), véase Richmonde *et al.*, J. Cell Physiology, 129, 375 (1986), y Chang *et al.*, J. Immunol., 148, 451 (1992). Todas las quimioquinas de la familia α que poseen el motivo ELR directamente antes del motivo CXC se unen al receptor B de IL-8 (CXCR2).

30 IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 y ENA-78 estimulan una serie de funciones *in vitro*. Se ha demostrado que todos tienen propiedades quimioatraventantes para los neutrófilos, mientras que IL-8 y GRO α han demostrado una actividad quimiotáctica basófila y de linfocitos T. Además, IL-8 puede inducir la liberación de histamina desde basófilos en individuos normales y atópicos. Además, GRO α e IL-8 inducen la liberación de enzimas lisozómicas y el estallido respiratorio desde neutrófilos. También se ha demostrado que IL-8 aumenta la expresión sobre la superficie de Mac-1 (CD11b/CD18) en neutrófilos sin síntesis proteica *de novo*. Esto puede contribuir a una mayor adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales vasculares. Muchas enfermedades conocidas se caracterizan por una infiltración masiva de neutrófilos. Puesto que IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ y NAP-2 estimulan la acumulación y la activación de los neutrófilos, estas quimioquinas se han implicado en una amplia variedad de trastornos inflamatorios agudos y crónicos, incluyendo psoriasis y artritis reumatoide, Baggolini *et al.*, FEBS Lett., 307, 97 (1992); Miller *et al.*, Crit. Rev. Immunol., 12, 17 (1992); Oppenheim *et al.*, Annu. Rev. Immunol., 9, 617 (1991); Seitz *et al.*, J. Clin. Invest., 87, 463 (1991); Miller *et al.*, Am. Rev. Respir. Dis., 146, 427 (1992); Donnelly *et al.*, Lancet, 341, 643 (1993). Además, las 35 quimioquinas ELR (las que contienen el motivo de aminoácidos ELR junto antes del motivo CXC) también se han implicado en la angiostasis, Strieter *et al.*, Science, 258, 1798 (1992).

40 In *vitro*, IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ y NAP-2 inducen el cambio en la forma, la quimiotaxis, la liberación de gránulos y el estallido respiratorio en neutrófilos, uniéndose y activando los receptores de la familia siete-transmembrana, unida a proteína G, en particular uniéndose a los receptores de IL-8, de forma más prominente al receptor IL-8 β (CXCR2), Thomas *et al.*, J. Biol. Chem., 266, 14839 (1991); y Holmes *et al.*, Science, 253, 1278 (1991). El desarrollo 45 de antagonistas de molécula pequeña no peptídicos para los miembros de esta familia de receptores tiene precedentes. Para un informe, véase R. Freidinger en: Progress in Drug Research, vol. 40, pp. 33-98, Birkhauser Verlag, Basilea, 1993. Por tanto, el receptor de IL-8 representa una diana prometedora para el desarrollo de nuevos agentes antiinflamatorios.

50 Se han caracterizado dos receptores de IL-8 humanos de alta afinidad (77% de homología): IL-8 α , que se une sólo a IL-8 con alta afinidad, e IL-8 β , que tiene una alta afinidad por IL-8, así como por GRO α , GRO β , GRO γ y NAP-2. Véase Holmes *et al.*, *supra*; Murphy *et al.*, Science, 253, 1280 (1991); Lee *et al.*, J. Biol. Chem., 267, 16283 (1992); LaRosa *et al.*, J. Biol. Chem., 267, 25402 (1992); y Gayle *et al.*, J. Biol. Chem., 268, 7283 (1993). La solicitud 55 de patente internacional WO97/49286A1 describe compuestos de fenilurea y su uso en el tratamiento de estados de enfermedad mediados por la quimioquina interleuquina-8 (IL-8).

60 Sigue habiendo la necesidad de un tratamiento, en este campo, de compuestos que sean capaces de unirse al receptor de IL-8 o β . Por tanto, las afecciones asociadas con un aumento en la producción de IL-8 (que es responsable de la quimiotaxis de neutrófilos y el subgrupo de células T hacia el sitio inflamatorio) se beneficiarían de compuestos que sean inhibidores de la unión al receptor de IL-8.

Sumario de la invención

65 La presente invención proporciona nuevos compuestos de la invención, composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, y un vehículo o diluyente farmacéutico.

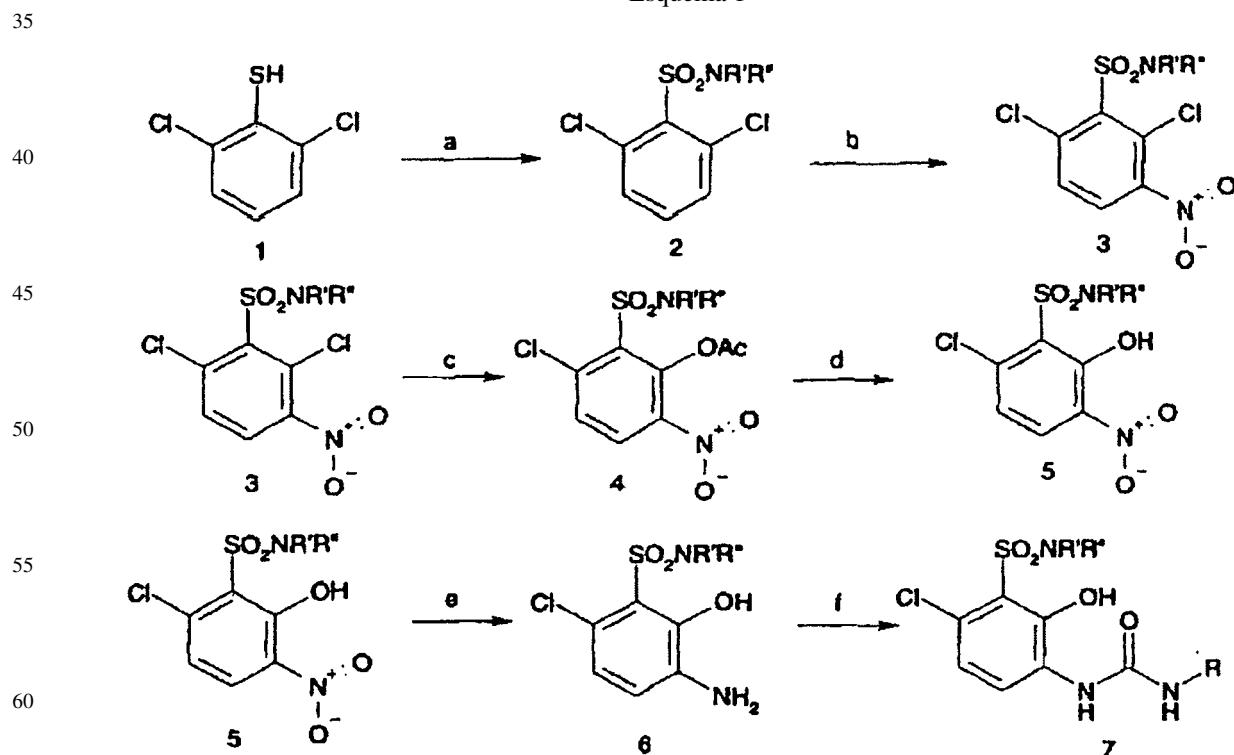
Los compuestos de la invención son:

- N-alil-N'-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)urea;
- 5 N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-isopropilurea;
- N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-etilurea;
- 10 N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-propilurea;
- N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N-(etoxicarbonil)metilurea;
- 15 3-(3-sec-butilureido)-6-cloro-2-hidroxibencensulfonamida;
- 6-cloro-3-[3-(1-metilpropil)ureido]-2-hidroxibencensulfonamida;
- 6-cloro-2-hidroxi-3-[3-(1-etilbutil)ureido]bencensulfonamida;
- 20 éster metílico del ácido (2S,3S)-2-[3-(4-cloro-2-hidroxi-3-sulfamoilfenil)ureido]-3-metilpentanoico; y
ácido (S)-2-[3-(4-cloro-2-hidroxi-3-sulfamoilfenil)ureido]-3-metilpentanoico.

Procedimientos de preparación

25 Los compuestos de la invención pueden obtenerse aplicando procedimientos sintéticos, algunos de los cuales se ilustran en los esquemas a continuación. La síntesis proporcionadas en estos esquemas es aplicable a la producción de compuestos de la invención que tienen una diversidad de grupos R, R_b y R₂₀ diferentes que se hacen reaccionar, empleando sustituyentes opcionales que están protegidos de forma adecuada, para lograr la compatibilidad con las reacciones indicadas en la presente. Una posterior desprotección, en los casos pertinentes, produce entonces los compuestos de la naturaleza descrita en general. Despues de haber establecido el núcleo de urea pueden prepararse otros compuestos con estas fórmulas aplicando técnicas convencionales para la interconversión de grupos funcionales, muy conocidas en la técnica.

Esquema 1



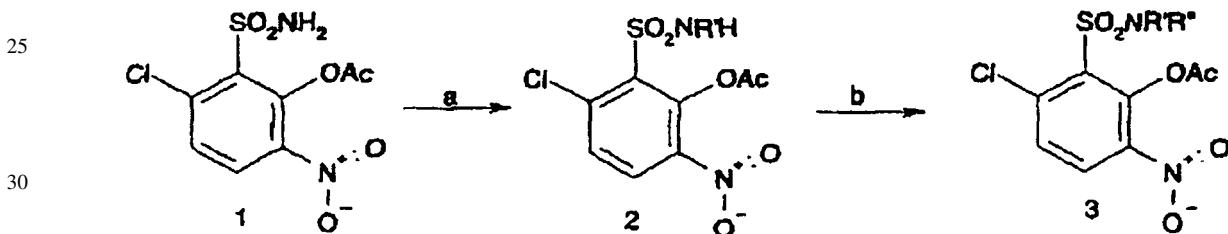
- a) i) NCS, AcOH, H₂O, ii) NRR''H, pir, b) H₂SO₄, HNO₃, c) NaOAc, 18-corona-6, d) H₂SO₄, MeOH, e) Pd/C, H₂, f) RCNO, DMF

ES 2 307 603 T3

La 4-cloro-N-(3-sulfonamido-2-hidroxifenil)-N"-alquilurea deseada puede sintetizarse a partir del 2,6-diclorotiofenol disponible en el mercado utilizando el procedimiento desarrollado arriba en el esquema 1. El tiol puede oxidarse hasta el correspondiente haluro de sulfonilo utilizando un agente halogenante, tal como NCS, NBS, Cl₂ o Br₂, en presencia de un disolvente prótico, tal como agua, ácido acético o un alcohol o una combinación. El rendimiento 5 puede aumentar si se incluye un agente tamponante, tal como acetato de sodio o potasio, en la mezcla de reacción, y la reacción se realiza a temperatura ambiente o por debajo. El correspondiente haluro de sulfonilo entonces puede condensarse con una amina en presencia de una base, tal como piridina, trietilamina, carbonato de potasio o hidruro de 10 sodio para formar la sulfonamida 2-esquema 1 análoga. La diclorosulfonamida 2-esquema 1 puede nitrarse utilizando condiciones nitrantes fuertes, tales como ácido nítrico en ácido sulfúrico, para formar el nitrocompuesto aromático 3-esquema 1. El cloro en posición orto con respecto al grupo nitro puede hidrolizarse de manera selectiva utilizando una sal acetato, tal como acetato de sodio, en presencia de un éter corona, tal como 18-corona-16, para formar el acetato 4-esquema 1. El grupo acetato puede hidrolizarse bajo condiciones ácidas en un disolvente alcohólico, tal como metanol o etanol, con una cantidad catalítica del ácido para formar el fenol 5-esquema 1. El nitro puede reducirse mediante 15 condiciones muy conocidas en la técnica, tales como hidrógeno y paladio sobre carbono, cloruro de estaño en metanol, cinc en ácido acético o tiol, para formar la correspondiente anilina 5-esquema 1. La anilina entonces puede acoplarse con un isocianato o tioisocianato disponible en el mercado para formar la urea o tiourea deseada. Como alternativa, pueden prepararse los isocianatos deseados condensando la amina con trifosgeno en presencia de una base (tal como carbonato de potasio), o haciendo reaccionar el ácido carboxílico con difenil fosforil azida en presencia de una base (tal como trietilamina).

20

Esquema 2



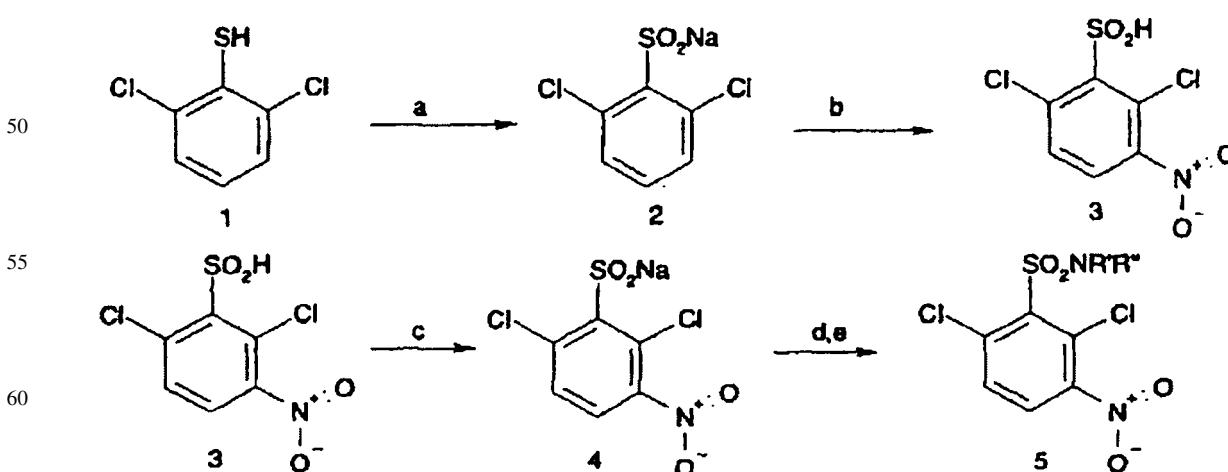
a) NaH, R'X, b) NaH, R''X

35

Si la sulfonamida 1-esquema 2 (3-esquema 1) es R'=R''=H no funcionalizado entonces puede funcionalizarse como se requiere en la presente mediante una alquilación. La sulfonamida se desprotona utilizando una base, tal como hidruro de sodio, y después se alquila utilizando un haluro de alquilo, tal como bromuro de bencilo o yoduro de metilo para formar 2-esquema 2. La sulfonamida entonces puede alquilarse por segunda vez utilizando hidruro de sodio y otro haluro de alquilo para formar 3-esquema 2. Este compuesto entonces puede convertirse en la urea deseada utilizando el proceso desarrollado en el esquema 1.

45

Esquema 3



65

a) i) NCS, AcOH, H₂O, ii) NaOH, MeOH, b) H₂SO₄, HNO₃, c) NaOH, MeOH, d) PCl₅, POCl₃, e) NHRR'', Et₃N

ES 2 307 603 T3

Una vía alternativa hasta 5-esquema 3 (3-esquema 1) se indica arriba, en el esquema 3, en el que el 2,6-diclorotiol disponible en el mercado puede oxidarse hasta el haluro de sulfonilo utilizando un agente halogenante, tal como NCS, NBS, cloro o bromo, en presencia de un disolvente próctico, tal como un alcohol, ácido acético o agua. El haluro de sulfonilo puede hidrolizarse utilizando un hidróxido metálico, tal como hidróxido de sodio o potasio, para formar la correspondiente sal de ácido sulfónico. La sal de ácido sulfónico entonces puede nitrarse bajo condiciones nitrantes, tales como ácido nítrico en un disolvente de un ácido fuerte, tal como ácido sulfúrico, para formar el ácido nitrofenilsulfónico 3-esquema 3. El ácido sulfónico 3-esquema 3 puede convertirse en la sulfonamida 5-esquema 3 utilizando un procedimiento en tres etapas que implica la formación de la sal metálica utilizando una base, tal como hidróxido de sodio, hidruro de sodio o carbonato de sodio para formar 4-esquema 3. La sal de ácido sulfónico entonces se convierte en el cloruro de sulfonilo utilizando PCl_5 con POCl_3 como disolvente. El cloruro de sulfonilo entonces puede convertirse en la correspondiente sulfonamida utilizando la amina deseada $\text{HNR}'\text{R}''$ en trietilamina a unas temperaturas que varían de -78°C a 60°C para formar la correspondiente sulfonamida 5-esquema 3 (3-esquema 1). La sulfonamida 5-esquema 3 puede seguir elaborándose mediante los procedimientos contenidos en el esquema 1. Este procedimiento no se limita al 2,6-diclorotiol, también puede aplicarse al 2,6-difluorotiol, 2,6-dibromotiol y 2,6-diidotiotol. Los halógenos en estos compuestos pueden convertirse en los correspondientes compuestos de ciano, amino, tiol o alcoxi mediante reacciones de desplazamiento nucleofílico utilizando nucleófilos, tales como tiolatos de alquilo, alcóxidos, aminas y cianuros. Los halógenos también pueden funcionalizarse aún más mediante reacciones de acoplamiento con paladio y carbonilación, muy conocidas en la técnica, para formar los correspondientes productos sustituidos con amido, carbonilo, alquenilo, alquilo, fenilo y heterocíclicos, según requieran los compuestos de la invención.

Ejemplos sintéticos

La invención se describirá a continuación haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

Todas las temperaturas se ofrecen en grados centígrados, todos los disolventes son de la mayor pureza disponible, y todas las reacciones se realizan bajo condiciones anhidras en una atmósfera de argón, a menos que se indique lo contrario.

En los ejemplos, todas las temperaturas están en grados centígrados (°C). Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro de masas VG Zab utilizando bombardeo de átomos rápidos, a menos que se indique lo contrario. Los espectros de RMN de ^1H (en lo sucesivo "RMN") se registraron a 250 MHz utilizando un espectrómetro Bruker AM 250 o Am 400. Las multiplicidades indicadas son: s = singulete, d = doblete, t = triplete, q = cuadruplete, m = multiplete, y a indica una señal ancha. Sat. indica una disolución saturada, eq. indica la proporción de un equivalente molar de reactivo con relación al reactante principal.

Síntesis general de 2-hidroxi-3-amino-6-clorobencensulfonamida

a) Cloruro de 2,6-diclorobencensulfonilo

A una mezcla de 200 mililitros (en lo sucesivo "ml") de ácido acético, agua y diclorometano (3/1/4, v/v/v) se añadieron 2,6-diclorobencentiol (10,0 gramos (en lo sucesivo "g"), 55,8 milímoles (en lo sucesivo "mmol")), N-clorosuccinimida (37,28 g, 279 mmol) y acetato de potasio (2,29 g, 27,9 mmol). La mezcla resultante se agitó a 0°C y después se calentó hasta la temperatura ambiente durante la noche. La mezcla entonces se diluyó con 200 ml de diclorometano y se lavó con agua (100 ml x 3). La capa orgánica se secó (Na_2SO_4) y se concentró para dar el producto deseado (11 g, 80%). RMN de ^1H (CDCl_3): δ 7,57 (d, 2H), 7,47 (t, 1H).

b) 2,6-diclorobencensulfonamida

Una disolución de cloruro de 2,6-diclorobencensulfonilo (10,50 g, 42,77 mmol) en 100 ml de piridina se añadió a 100 ml de piridina gota a gota mientras se hacía pasar amoniaco anhídrico gaseoso a través de la disolución de forma simultánea durante 4 horas a 0°C. La mezcla se acidificó hasta $\text{pH} > 1$ con HCl acuoso 6 N y después se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica reunida entonces se secó (Na_2SO_4) y se concentró para dar el producto deseado (8,69 g, 90%). EI-MS (m/z) 225,0, 227,1 (M^-).

c) 2,6-dicloro-3-nitrobencensulfonamida

A una disolución de 2,6-diclorobencensulfonamida (7,8 g, 34,5 mmol) en 30 ml de ácido sulfúrico concentrado a 0°C se le añadió gota a gota ácido nítrico (1,74 ml, 41,4 mmol). La mezcla se agitó a 0°C durante 2 horas, después se añadieron 200 ml de agua para producir un precipitado. La mezcla resultante se filtró. El sólido blanco se recogió, se lavó con agua y se secó al vacío para dar el producto deseado (7,17 g, 76%). RMN de ^1H (DMSO-d_6): δ 8,25 (s, 2H), 8,20 (d, 1H), 7,92 (d, 1H).

d) 2-acetoxi-3-nitro-6-clorobencensulfonamida

Una disolución de 2,6-dicloro-3-nitrobencensulfonamida (2,04 g, 7,5 mmol), acetato de potasio (2,21 g, 22,5 mmol) y 18-corona-6 (5,95 g, 22,5 mmol) en 50 ml de sulfóxido de dimetilo se calentó hasta 45°C durante 7 días. La mezcla se acidificó con HCl acuoso 1 N y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se concentró para producir

ES 2 307 603 T3

un producto bruto. Una cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexano/ácido acético (50/49/1, v/v/v) produjo el producto deseado (1,67 g, 76%), EI-MS (m/z) 293,1, 295,1 (M^-).

e) 2-hidroxi-3-nitro-6-clorobencensulfonamida

Una disolución de 2-acetoxi-3-nitro-6-clorobencensulfonamida (1,72 g, 5,83 mmol), clorotrimetilsilano (2 ml) y ácido sulfúrico húmedo (0,5 ml) en metanol se calentó a reflujo durante 20 horas. El disolvente se evaporó. El residuo se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua. La capa orgánica entonces se secó (Na_2SO_4) y se concentró para producir el producto deseado (1,0 g, 68%). EI-MS (m/z) 251,1, 253,2 (M^-).

f) 2-hidroxi-3-amino-6-clorobencensulfonamida

A una disolución de 2-hidroxi-3-nitro-6-clorobencensulfonamida (1,1 g, 4,36 mmol) en acetato de etilo se le añadió Pd al 10%/C (500 mg). La mezcla se enjuagó con hidrógeno y después se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno a presión de balón durante 4 horas a temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de Celite y el Celite se lavó con metanol. El disolvente se evaporó para dar el producto deseado (91%). EI-MS (m/z) 221,1, 223,1 (M^-).

Ejemplo 1

20 Procedimiento convencional para la condensación de anilinas con isocianatos. Preparación de N-alil-N'-(3-amino-sulfonil-4-cloro-2-hidroxifenol)urea

Una disolución de 3-amino-6-cloro-2-hidroxibencensulfonamida (40 mg, 0,18 mmol) e isocianato de alilo (19 μ L, 0,22 mmol) en 1 ml de N,N-dimetilformamida se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua para producir un producto bruto. Una purificación con una cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexano (70/30, v/v) produjo el producto deseado (15 mg, 27%). EI-MS (m/z) 304,1, 306,4 (M^-).

Ejemplo 2

30 Preparación de N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-isopropilurea

Una disolución de 3-amino-6-cloro-2-hidroxibencensulfonamida (150 mg, 0,67 mmol) e isocianato de isopropilo (80 μ L, 0,81 mmol) en 1 ml de N,N-dimetilformamida se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua para producir un producto bruto. Una purificación con una cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexano (50/50, v/v), seguido de una recristalización en acetona y hexano, produjo el producto deseado (111 mg, 54%). LC-MS (m/z) 308,0 (M^+).

Ejemplo 3

40 Preparación de N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-etilurea

Una disolución de 3-amino-6-cloro-2-hidroxibencensulfonamida (150 mg, 0,67 mmol) e isocianato de etilo (64 μ L, 0,81 mmol) en 1 ml de N,N-dimetilformamida se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua para producir un producto bruto. Una purificación con una cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexano (50/50, v/v), seguido de una recristalización en acetona y hexano, produjo el producto deseado (88 mg, 44%). LC-MS (m/z) 294,0 (M^+).

Ejemplo 4

50 Preparación de N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-propilurea

Una disolución de 3-amino-6-cloro-2-hidroxibencensulfonamida (150 mg, 0,67 mmol) e isocianato de propilo (76 μ L, 0,81 mmol) en 1 ml de N,N-dimetilformamida se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua para producir un producto bruto. Una purificación con una cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexano (50/50, v/v), seguido de una recristalización en acetona y hexano, produjo el producto deseado (92 mg, 44%). LC-MS (m/z) 308,2 (M^+).

Ejemplo 5

60 Preparación de N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-(etoxicarbonil)-metilurea

Una disolución de 3-amino-6-cloro-2-hidroxibencensulfonamida (170 mg, 0,76 mmol) e isocianato-acetato de etilo (103 μ L, 0,92 mmol) en 1,5 ml de N,N-dimetilformamida se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua para producir un producto bruto. Una purificación con una cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexano (50/50, v/v), seguido de una separación mediante HPLC Gilson, produjo el producto deseado (20 mg, 7%). LC-MS (m/z) 352,0 (M^+).

ES 2 307 603 T3

Ejemplo de referencia 6

N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-fenetilurea

5 Una disolución de 3-amino-6-cloro-2-hidroxibencensulfonamida (120 mg, 0,54 mmol) e isocianato de fenetilo (82 μ l, 0,59 mmol) en 1,0 ml de N,N-dimetilformamida se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Una purificación con una cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexano (50/50, v/v), produjo el producto deseado (109 mg, 55%). LC-MS (m/z) 369,8 (M^+).

10 Ejemplo 7

N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-sec-butilurea

15 Una disolución de 3-amino-6-cloro-2-hidroxibencensulfonamida (200 mg, 0,90 mmol) e isocianato de sec-butilo (102 μ l, 0,90 mmol) en 1,5 ml de N,N-dimetilformamida se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Una purificación con una cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexano (40/60, v/v), produjo el producto deseado (156 mg, 54%). LC-MS (m/z) 322,2 (M^+).

20 Ejemplo 8

25 *Procedimiento convencional para la síntesis de ureas acoplando ácidos carboxílicos con una anilina. Síntesis de 6-cloro-3-[3-(1-etilpropil)ureido]-2-hidroxibencensulfonamida*

A una disolución de ácido 2-etylbutirico (0,125 ml, 1,0 mmol) en DMF (0,5 ml) se le añadió DPPA (0,25 ml, 1,2 mmol) y TEA (0,25 ml, 1,8 mmol) y la reacción se calentó a 70°C. Después de 18 horas se añadió 3-amino-6-cloro-2-hidroxibencensulfonamida (1,0 mmol) y la reacción se calentó a 70°C. Después de 18 horas la mezcla de reacción se extinguío con agua y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentraron a presión reducida. El residuo bruto se purificó mediante HPLC para producir 51 mg (15%) de 6-cloro-3-[3-(1-etilpropil)ureido]-2-hidroxibencensulfonamida. LC-MS (m/z) 336 (M^+).

30 Ejemplo 9

Síntesis de N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-1-metilbutilurea

35 a) *2-azidocarbonilpentano*

Bajo una atmósfera de argón, una mezcla de azidotrimetilsilano (1,15 g, 9,98 mmol) y anhídrido crómico (998 mg, 9,98 mmol) se agitó a temperatura ambiente hasta que se obtuvo una disolución homogénea. Se añadió una disolución de 2-metilpentanal (500 mg, 4,99 mmol) en 5 ml de diclorometano. La mezcla se agitó durante 5 horas más y después se filtró a través de gel de sílice. El filtrado se concentró para producir el material bruto. FT-IR 2135,80 cm^{-1} , 2110,9 cm^{-1} .

b) *N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-1-metilbutilurea*

45 Una disolución de 3-amino-6-cloro-2-hidroxibencensulfonamida (175 mg, 0,78 mmol) y el 2-azidocarbonilpentano bruto en 2 ml de N,N-dimetilformamida se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Una purificación mediante una HPLC Gilson, eluyendo con acetonitrilo/agua (de 10/90 v/v a 90/10 v/v, a lo largo de 10 min), produjo el producto deseado (5 mg, 2%). LC-MS (m/z) 336,2 (M^+).

50 Ejemplo 10

N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-(isoleucin-metil éster)urea

Una disolución de 3-amino-6-cloro-2-hidroxibencensulfonamida (400 mg, 1,80 mmol) y éster metílico del ácido 55 (2s,3s)-2-isocianato-3-metilvalárico (338 mg, 1,98 mmol) en 1,5 ml de N,N-dimetilformamida se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Una purificación con una cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexano/AcOH (60/40/1, v/v/v), seguido de una separación mediante HPLC Gilson, produjo el producto deseado (20 mg, 28%). LC-MS (m/z) 394,2 (M^+).

60 Ejemplo 11

N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxibencil)-N'-isoleucinurea

Una disolución de N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-(isoleucin-metil éster)urea (80 mg, 0,20 mmol) e hidróxido de litio (40 mg, 1,67 mmol) en metanol se calentó hasta refluo durante 18 horas. Una purificación mediante HPLC Wilson, eluyendo con acetonitrilo (TFA al 0,1%)/agua (TFA al 10%) (de 10/90 v/v a 90/10 v/v, a lo largo de 10 min) produjo el producto deseado (42 mg, 55%). LC-MS (m/z) 380,0 (M^+).

ES 2 307 603 T3

Los compuestos de la invención, o su sal farmacéuticamente aceptable, pueden utilizarse en la fabricación de una medicina para el tratamiento profiláctico o terapéutico de cualquier estado de enfermedad en un ser humano u otro mamífero que sea exacerbada o provocada por una producción excesiva o no regulada de citoquinas IL-8 por las células de este mamífero, tales como, pero sin limitarse a monocitos y/o macrófagos, u otras quimoquinas que se unan al receptor IL-8 α o β , también denominados receptor de tipo I o de tipo II.

Los compuestos de la invención se administran en una cantidad suficiente para inhibir la función de las citoquinas, en particular, IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78, de forma que se infrarregulan biológicamente hasta alcanzar niveles normales de función fisiológica o, en algunos casos, niveles subnormales, de forma que se mejora el estado de enfermedad. Unos niveles anormales de IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78, por ejemplo, en el contexto de la presente invención, constituyen: (i) unos niveles de IL-8 libre mayores o iguales que 1 picogramo por ml; (ii) cualquier IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78 asociados a células por encima de los niveles fisiológicos normales; o (iii) la presencia de IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78 por encima de los niveles basales en células o tejidos en los que se producen IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78, respectivamente.

En general, se ha demostrado que los compuestos de la invención tienen un tiempo $t_{1/2}$ más largo y una mejor biodisponibilidad oral que los compuestos descritos en los documentos WO 96/25157 y WO 97/29743.

Existen muchos estados de enfermedad en los que está implicada una producción excesiva o no regulada de IL-8 en la exacerbación y/o la causa de la enfermedad. Las enfermedades mediadas por quimoquinas incluyen psoriasis, dermatitis atópica, osteoartritis, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de insuficiencia respiratoria en adultos, enfermedad del intestino inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, accidentes cerebrovasculares, choque séptico, esclerosis múltiple, choque endotóxico, sepsis por organismos gram-negativos, síndrome del choque tóxico, lesiones por reperfusión cardíacas y renales, glomerulonefritis, trombosis, reacción del receptor frente a un injerto, enfermedad de Alzheimer, rechazos de aloinjertos, malaria, reestenosis, angiogénesis, atherosclerosis, osteoporosis, gingivitis y liberación de células pluripotenciales hematopoyéticas no deseadas, y enfermedades provocadas por virus respiratorios, herpesvirus y virus de la hepatitis, meningitis, fibrosis quística, parto prematuro, tos, prurito, disfunción de múltiples órganos, traumatismos, torceduras, esguinces, contusiones, artritis psoriática, herpes, encefalitis, vasculitis del SNC, lesiones cerebrales traumáticas, tumores del SNC, hemorragia subaracnoidea, traumatismo postquirúrgico, pneumonitis intersticial, hipersensibilidad, artritis inducida por cristales, pancreatitis aguda y crónica, hepatitis alcohólica aguda, enterocolitis necrotizante, sinusitis crónica, uveitis, polimiositis, vasculitis, acné, úlceras gástricas y duodenales, enfermedad celíaca, esofagitis, glositis, obstrucción de las vías respiratorias, hipercapacidad de respuesta de las vías respiratorias, neumonía que organiza bronquiolitis obliterante, bronquiectasia, bronquiolitis, bronquiolitis obliterante, bronquitis crónica, cor pulmonae, dispnea, enfisema, hiperkapnea, hiperinflación, hipoxemia, inflamaciones inducidas por hiperoxia, hipoxia, reducción del volumen pulmonar quirúrgico, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, hipertrofia ventricular derecha, sarcoidosis, enfermedad de las vías respiratorias pequeñas, desacoplamiento de la ventilación-perfusión, respiración jadeante, enfriamientos y lupus.

Estas enfermedades se caracterizan principalmente por una infiltración masiva de neutrófilos, infiltración de células T o crecimiento neovascular, y están asociadas con un aumento en la producción de IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78 que es responsable de la quimiotaxis de neutrófilos hacia el sitio inflamatorio o el crecimiento direccional de células endoteliales. Por contraste con otras citoquinas inflamatorias (IL-1, TNF e IL-6), IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78 presentan la propiedad exclusiva de estimular la quimiotaxis de neutrófilos, la liberación de enzimas incluyendo, pero sin limitarse a la liberación de elastasa, así como la producción y activación de superóxido. Las α -quimoquinas, pero en particular GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78, actuando a través del receptor de IL-8 de tipo I o de tipo II, pueden estimular la neovascularización de tumores, estimulando el crecimiento direccional de células endoteliales. Por tanto, la inhibición de la quimiotaxis o la activación inducidas por IL-8 podría conducir a una reducción directa en la infiltración de neutrófilos.

Pruebas recientes también relacionan el papel de las quimoquinas en el tratamiento de infecciones por VIH, Littleman *et al.*, Nature, 381, pp. 661 (1996), y Koup *et al.*, Nature, 381, pp. 667 (1996).

Pruebas actuales también indican el uso de inhibidores de IL-8 en el tratamiento de la atherosclerosis. La primera referencia, Boisvert *et al.*, J. Clin. Invest., 1998, 101:353-363, demuestra, mediante el trasplante de la médula ósea, que la ausencia de receptores de IL-8 sobre células pluripotenciales (y, por tanto, sobre monocitos/macrófagos) conduce a una reducción en el desarrollo de placas ateroscleróticas en ratones deficientes en receptores de LDL. Otras referencias de apoyo son: Apostolopoulos, *et al.*, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1996, 16:1007-1012; Liu, *et al.*, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1997, 17:317-323; Rus, *et al.*, Atherosclerosis, 1996, 127:263-271; Wang *et al.*, J. Biol. Chem., 1996, 271:8837-8842; Yue, *et al.*, Eur. J. Pharmacol., 1993, 240:81-84; Koch, *et al.*, Am. J. Pathol., 1993, 142:1423-1431; Lee, *et al.*, Immunol. Lett., 1996, 53, 109-113; y Terkeltaub *et al.*, Arterioscler. Thromb., 1994, 14:47-53.

Las lesiones del SNC, según se definen en la presente, incluyen traumatismos en la cabeza abiertos o penetrantes, tales como los realizados mediante cirugía, o una lesión traumática cerrada en la cabeza, tal como la producida por una lesión en la región de la cabeza. También se incluyen dentro de esta definición los accidentes cerebrovasculares isquémicos, en particular los producidos en el área del cerebro.

Los accidentes cerebrovasculares isquémicos pueden definirse como un trastorno neurológico focal que se produce como resultado de un suministro de sangre insuficiente a un área concreta del cerebro, normalmente como consecuen-

ES 2 307 603 T3

cia de un émbolo, trombo, o cierre ateromatoso local del vaso sanguíneo. El papel de las citoquinas inflamatorias en esta área ha ido surgiendo, y la presente invención proporciona un medio para el tratamiento potencial de estas lesiones. Hay disponibles relativamente pocos tratamientos para las lesiones agudas como éstas.

5 El TNF- α es una citoquina con acciones proinflamatorias, incluyendo la expresión de moléculas de adhesión de leucocitos endoteliales. Los leucocitos se infiltran en las lesiones cerebrales isquémicas y, por tanto, los compuestos que inhiban o disminuyan los niveles de TNF serían útiles para el tratamiento de las lesiones cerebrales isquémicas. Véase Liu *et al.*, Stroke, vol. 25, nº 7, pp. 1481-1488 (1994), cuya descripción se incorpora en la presente como referencia.

10 10 Los modelos de lesiones cerradas en la cabeza y el tratamiento con agentes 5-LO/CO mixtos se analiza en Shohami *et al.*, J. of Vaisc. & Clinical Physiology and Pharmacology, vol. 3, nº 2, pp. 99-107 (1992), cuya descripción se incorpora en la presente como referencia. Se descubrió que el tratamiento, que reduce la formación de edemas, mejora el resultado funcional en los animales tratados.

15 15 Los compuestos de la invención se administran en una cantidad suficiente para inhibir a la IL-8, que se une a los receptores IL-8 alfa o beta, y que no se une a estos receptores, tal como prueba una reducción en la quimiotaxis y la activación de neutrófilos. El descubrimiento de que los compuestos de la invención son inhibidores de la unión de IL-8 se basa en los efectos de los compuestos de la invención en los ensayos de unión a receptores *in vitro* que se describen 20 en la presente. Se ha demostrado que los compuestos de la invención son inhibidores de los receptores de IL-8 de tipo II.

25 Tal como se emplea en la presente, la expresión "enfermedad o estado de enfermedad mediado por IL-8" se refiere a cualquiera y a todos los estados de enfermedad en los que IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78 desempeñan un papel, a través de la producción de IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78 en sí mismas, o porque IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78 provocan que se libere otra monoquina, tal como, pero sin limitarse a IL-1, IL-6 o TNF. Un estado de enfermedad en el que, por ejemplo, IL-1 sea un componente principal, y cuya producción o acción sea exacerbada o segregada en respuesta a IL-8 se consideraría, por tanto, un estado de enfermedad mediado por IL-8.

30 30 Tal como se emplea en la presente, la expresión "enfermedad o estado de enfermedad mediado por quimoquinas" se refiere a cualquiera y a todos los estados de enfermedad en los que una quimoquina que se une a un receptor IL-8 α o β desempeña un papel, tal como, pero sin limitarse a IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78. Esto incluye un estado de enfermedad en el que IL-8 desempeña un papel, a través de la producción de IL-8 en sí misma, o porque 35 IL-8 provoca que se libere otra monoquina, tal como, pero sin limitarse a IL-1, IL-6 o TNF. Un estado de enfermedad en el que, por ejemplo, IL-1 sea un componente principal, y cuya producción o acción sea exacerbada o segregada en respuesta a IL-8 se consideraría, por tanto, un estado de enfermedad mediado por IL-8.

40 Tal como se emplea en la presente, el término "citoquina" se refiere a cualquier polipéptido segregado que afecte a las funciones de las células y sea una molécula que module las interacciones entre células en la respuesta inmunológica, inflamatoria o hematopoyética. Una citoquina incluye, pero no se limita a monoquinas y linfoquinas, independientemente de cuál sea la célula que las produce. Por ejemplo, se indica que una monoquina, en general, es producida y segregada por una célula mononuclear, tal como un macrófago y/o monocito. Sin embargo, muchas otras células también producen monoquinas, tales como células asesinas naturales, fibroblastos, basófilos, neutrófilos, células endoteliales, astrocitos cerebrales, células estromáticos de médula ósea, queratinocitos epidérmicos y linfocitos B. En general se indica que las linfoquinas son producidas por células linfocíticas. Los ejemplos de citoquinas incluyen, pero no se limitan a interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8), el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y el factor de necrosis tumoral-beta (TNF- β).

45 50 Tal como se emplea en la presente, el término "quimoquina" se refiere a cualquier polipéptido segregado que afecte a las funciones de las células y sea una molécula que module las interacciones entre células en la respuesta inmunológica, inflamatoria o hematopoyética, similar al término "citoquina" anterior. Una quimoquina es segregada principalmente a través de transmembranas celulares y provoca la quimiotaxis y la activación de células blancas sanguíneas específicas y leucocitos, neutrófilos, monocitos, macrófagos, células T, células B, células endoteliales y células del músculo liso. Los ejemplos de quimoquinas incluyen, pero no se limitan a IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2, ENA-78, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , PF4 y MCP 1, 2 y 3.

55 60 Para utilizar un compuesto de la invención o su sal farmacéuticamente aceptable en terapia, normalmente se formulará en una composición farmacéutica de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional. Por tanto, esta invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz, no tóxica, de un compuesto de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

65 Los compuestos de la invención, sus sales farmacéuticamente aceptables y las composiciones farmacéuticas que los incorporan pueden administrarse, de manera conveniente, mediante cualquiera de las vías que se emplean de modo convencional para la administración de fármacos, por ejemplo, por vía oral, tópica, parenteral o mediante inhalación. Los compuestos de la invención pueden administrarse en formas de dosificación convencionales preparadas combinando un compuesto de la invención con vehículos farmacéuticos convencionales según procedimientos convencionales. Los compuestos de la invención también pueden administrarse en dosificaciones convencionales en combinación con

ES 2 307 603 T3

un segundo compuesto terapéuticamente activo conocido. Estos procedimientos pueden implicar mezclar, granular y comprimir o disolver los ingredientes, según sea apropiado para la preparación deseada. Se apreciará que la forma y el carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable vendrá dictado por la cantidad de principio activo con el que se va a combinar, la vía de administración y otras variables muy conocidas. El o los vehículos deben ser 5 "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudiciales para el receptor de ésta.

El vehículo farmacéutico empleado puede ser, por ejemplo, un sólido o un líquido. Los ejemplos de vehículos sólidos son lactosa, sulfato de calcio dihidrato, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Los ejemplos de vehículos líquidos son jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, agua y similares. De forma similar, el vehículo o diluyente puede incluir un material de retraso en el tiempo, 10 muy conocidos en la técnica, tal como monoestearato de glicerol o diestearato de glicerilo solos o con una cera.

Puede emplearse una amplia variedad de formas farmacéuticas. Por tanto, si se utiliza un vehículo sólido, la preparación puede formarse en comprimidos, colocarse en forma de polvos o gránulos en una cápsula de gelatina dura, o 15 presentarse en forma de un trocisco o pastilla. La cantidad de vehículo sólido variará con amplitud, pero preferiblemente será de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 1 mg. Cuando se emplee un vehículo líquido, la preparación estará en forma de un jarabe, emulsión, cápsula de gelatina blanda, líquido inyectable estéril, tal como una ampolla o 20 una suspensión líquida no acuosa.

Los compuestos de la invención pueden administrarse por vía tópica, es decir, mediante una administración no 25 sistémica. Esto incluye la aplicación de un compuesto de la invención de forma externa a la epidermis o la cavidad bucal, y la instilación de este compuesto al oído, ojo y nariz, de forma que el compuesto no entre significativamente en la corriente sanguínea. Por contraste, la administración sistémica se refiere a la administración oral, intravenosa, intraperitoneal e intramuscular.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semilíquidas adecuadas para la penetración a través de la piel hasta el sitio de la inflamación, tales como linimentos, lociones, cremas, 30 ungüentos o pastas, y gotas adecuadas para la administración al ojo, oído o nariz. El principio activo puede comprender, para la administración tópica, del 0,001% al 10% p/p, por ejemplo, del 1% al 2% en peso de la formulación. Sin embargo, puede comprender tanto como 10% p/p, pero preferiblemente comprenderá menos que 5% p/p, más preferiblemente del 0,1% al 1% p/p de la formulación.

Las lociones según la presente invención incluyen aquellas adecuadas para la aplicación a la piel o el ojo. Una loción para el ojo puede comprender una disolución acuosa estéril que contenga opcionalmente un bactericida y puede 35 prepararse mediante procedimientos similares a los de la preparación de gotas. Las lociones o linimentos para la aplicación a la piel también pueden incluir un agente para acelerar el secado y para refrescar la piel, tal como un alcohol o acetona, y/o un hidratante, tal como glicerol, o un aceite, tal como aceite de ricino o aceite de cacahuete.

Las cremas, ungüentos o pastas según la presente invención son formulaciones semisólidas del principio activo para 40 la aplicación externa. Pueden fabricarse mezclando el principio activo en forma finamente dividida o en polvo, por sí solo o en disolución o suspensión en un fluido acuoso o no acuoso, con la ayuda de la maquinaria adecuada, con una base oleosa o no oleosa. La base puede comprender hidrocarburos, tales como parafina dura, blanda o líquida, glicerol, cera de abejas, un jabón metálico; un mucílago; un aceite de origen natural, tal como aceite de almendras, maíz, 45 cacahuete, ricino u oliva; lanolina anhidra o sus derivados, o un ácido graso, tal como ácido esteárico u oleico, junto con un alcohol, tal como propilenglicol o un macrogel. La formulación puede incorporar cualquier agente tensioactivo adecuado, tal como un tensioactivo aniónico, catiónico o no iónico, tal como un éster de sorbitán o su derivado de polioxietileno. También pueden incluirse agentes suspensores, tales como gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos, tales como sílices silicáceas, y otros ingredientes, tales como lanolina.

Las gotas según la presente invención pueden comprender disoluciones o suspensiones acuosas u oleosas estériles, y pueden 50 prepararse disolviendo el principio activo en una disolución acuosa adecuada de un agente bactericida y/o fungicida y/o cualquier otro conservante adecuado e incluyendo, preferiblemente, un tensioactivo. La disolución resultante entonces puede aclararse mediante filtración, trasladarse a un recipiente adecuado, que entonces se sella y se esteriliza mediante un autoclave o manteniéndola a 98-100°C durante media hora. Como alternativa, la disolución puede 55 esterilizarse mediante filtración y trasladarse al recipiente mediante una técnica aséptica. Los ejemplos de agentes bactericidas y fungicidas adecuados para su inclusión en las gotas son nitrato o acetato fenilmercúrico (al 0,002%), cloruro de benzalconio (al 0,01%) y acetato de clorhexidina (al 0,01%). Los disolventes adecuados para la preparación de una disolución oleosa incluyen glicerol, alcohol diluido y propilenglicol.

Los compuestos de la invención pueden administrarse por vía parenteral, es decir, mediante administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal, intrarrectal, intravaginal o intraperitoneal. En general se prefieren las 60 formas subcutánea e intramuscular de la administración parenteral. Las formas de dosificación apropiadas para esta administración pueden prepararse mediante técnicas convencionales. Los compuestos de la invención también pueden administrarse mediante inhalación, es decir, administración mediante inhalación intranasal y oral. Las formas de dosificación apropiadas para esta administración, tal como una formulación en aerosol o un inhalador dosificador de dosis, pueden 65 prepararse mediante técnicas convencionales.

ES 2 307 603 T3

Para todos los procedimientos de uso descritos en la presente para los compuestos de la invención, el régimen de dosificación oral diario será preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal total. El régimen de dosificación parenteral diario será de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal total. El régimen de dosificación tópica diario será preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg a 150 mg, administrados de una a cuatro, preferiblemente dos o tres veces diarias. El régimen de dosificación mediante inhalación diario será preferiblemente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg diarios. Los expertos en la técnica también reconocerán que la cantidad y distanciamiento temporal óptimos de las dosificaciones individuales de un compuesto de la invención, o su sal farmacéuticamente aceptable, vendrán determinados por la naturaleza y grado de la afección que se está tratando, la forma, vía y sitio de la administración, y el paciente concreto que se esté tratando, y que estos óptimos pueden determinarse mediante técnicas convencionales. Los expertos en la técnica también apreciarán que el desarrollo óptimo del tratamiento, es decir, el número de dosis de un compuesto de la invención, o su sal farmacéuticamente aceptable, administradas a diario durante un número definido de días, puede ser determinado por los expertos en la técnica utilizando ensayos de determinación del desarrollo del tratamiento convencionales.

La invención se describirá a continuación haciendo referencia a los siguientes ejemplos biológicos, que son sólo ilustrativos y no deben considerarse como una limitación del alcance de la presente invención.

20 Ejemplos biológicos

Se determinaron los efectos inhibidores de las quimioquinas IL-8 y GRO- α de los compuestos de la presente invención mediante el siguiente ensayo *in vitro*.

25 Ensayos de unión al receptor

La [125 I]-IL-8 (recombinante humana) se obtuvo de Amersham Corp., Arlington Heights, IL, con una actividad específica de 2000 Ci/mmol. El GRO- α se obtuvo de NEN (New England Nuclear). Todos los demás productos químicos son de calidad analítica. Se expresaron individualmente altos niveles de receptores IL-8 de tipo α y β humanos recombinantes en células de ovario de hámster chino, como se ha descrito previamente (Holmes, *et al.*, Science, 1991, 253, 1278). Se homogeneizaron las membranas de las células de ovario de hámster chino según un protocolo previamente descrito (Haour, *et al.*, J. Biol. Chem., 249, pp. 2195-2205 (1974)), excepto que el tampón de homogeneización se cambió a Tris-HCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM, EDTA 0,5 mM (ácido etilendiaminotetraacético), PMSF 1 mM (fluoruro de α -toluensulfonilo), leupeptina 0,5 mg/l, pH 7,5. Se determinó la concentración de proteínas de las membranas utilizando un kit de microensayo Pierce Co., empleando albúmina de suero bovina como patrón. Todos los ensayos se realizaron en un formato de microplaca de 96 pocillos. Cada mezcla de reacción contenía 125 I-IL-8 o 125 I-GRO- α (0,25 nM), y 0,5 μ g/ml de membranas IL-8R α o 1,0 μ g/ml de membranas IL-8R β en tampones bis-trispropano 20 mM y Tris-HCl 0,4 mM, pH 8,0, que contenían MgSO₄ 1,2 mM, EDTA 0,1 mM, Na 25 mM, y CHAPS al 0,03%. Además se añade el fármaco o compuesto de interés, que se había disuelto previamente en DMSO para alcanzar una concentración final entre 0,01 nM y 100 uM. El ensayo se inicia mediante la adición de 125 I-IL-8. Después de 1 hora a temperatura ambiente la placa se recolecta utilizando un recolector de 96 pocillos Tomtec sobre un filtro de fibra de vidrio bloqueado con polietilenimina al 1%/BSA al 0,5%, y se lavó 3 veces con NaCl 25 mM, Tris-HCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM, EDTA 0,5 mM, CHAPS al 0,03%, pH 7,4. El filtro entonces se secó y se contó sobre un contador de centelleo líquido Betaplate. El receptor recombinante IL-8 R α , o de tipo I, también se denomina en la presente receptor no permisivo, y el receptor recombinante IL-8 R β , o de tipo II, también se denomina en la presente receptor permisivo.

Los compuestos representativos de la invención, los ejemplos 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10 y 11, mostraron una actividad inhibidora positiva en este ensayo a niveles de IC₅₀ < 30 uM.

50 Ensayo de quimiotaxis

Se determinan las propiedades inhibidoras *in vitro* de estos compuestos en el ensayo de quimiotaxis de neutrófilos según se describe en Current Protocols in Immunology, vol. I, supl. 1, unidad 6.12.3., cuya descripción se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Se aislaron neutrófilos de sangre humana como se describe en Current Protocols in Immunology, vol. I, supl. 1, unidad 7.23.1., cuya descripción se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Los quimioatractantes IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ y NAP-2 se colocan en la cámara inferior de una cámara de 48 multipocillos (Neuro Probe, Cabin John, MD) a una concentración entre 0,1 y 100 nM. Las dos cámaras se separan mediante un filtro de policarbonato de 5 μ M. Cuando se ensayan los compuestos de esta invención, se mezclan con las células (0,001-1000 nM) justo antes de la adición de las células a la cámara superior. Se deja que la incubación se desarrolle durante aproximadamente 45 y 90 min a aproximadamente 37°C en un incubador humidificado con CO₂ al 5%. Al final del periodo de incubación, la membrana de policarbonato se retira y se lava la parte superior, la membrana entonces se tiñe utilizando el protocolo de tinción Diff Quick (Baxter Products, McGaw Park, IL, EEUU). Las células, que han experimentado quimiotaxis hacia las quimioquinas, se cuentan de forma visual utilizando un microscopio. En general se cuentan cuatro campos para cada muestra, haciendo una media con estos números para producir el número medio de células que habían migrado. Cada muestra se ensaya por triplicado y cada compuesto se repite al menos cuatro veces. No se añade compuesto a ciertas células (células de control positivo), representando estas células la máxima respuesta quimiotáctica de las células. En el caso en que se desee un control negativo (no

ES 2 307 603 T3

estimulado), no se añade quimioquina a la cámara inferior. La diferencia entre el control positivo y el control negativo representa la actividad quimiotáctica de las células.

Ensayo de liberación de elastasa

Los compuestos de esta invención se ensayan para su capacidad para evitar la liberación de elastas desde neutrófilos humanos. Se aislan neutrófilos de sangre humana como se describe en Current Protocols in Immunology, vol. I, suppl. 1, unidad 7.23.1. Se colocan $0,88 \times 10^6$ células PMN suspendidas en disolución de Ringer (NaCl 118, KCl 4,56, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1,03, glucosa 11,1, HEPES 5 mM, pH 7,4) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos en un volumen de 50 ul. A esta placa se le añade el compuesto de ensayo (0,001-1000 nM) en un volumen de 50 ul, citocalasina B en un volumen de 50 ul (20 ug/ml) y tampón de Ringer en un volumen de 50 ul. Se deja que estas células se calienten (37°C, CO₂ al 5%, HR al 95%) durante 5 min antes de añadir IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ o NAP-2 a una concentración final de 0,01-1000 nM. Se deja que la reacción se desarrolle durante 45 min antes de centrifugar la placa de 96 pocillos (800 x g, 5 min) y se retiran 100 ul del sobrenadante. Este sobrenadante se añade a una segunda placa de 96 pocillos, seguido de un sustrato de elastasa artificial (MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC, Nova Biochem, La Jolla, CA) hasta una concentración final de 6 ug/ml disueltos en disolución salina tamponada con fosfato. Inmediatamente se coloca la placa en un lector de placas de 96 pocillos fluorescente (Cytofluor 2350, Millipore, Bedford, MA) y los datos se recogen a intervalos de 3 min según el procedimiento de Nakajima *et al.*, J. Biol. Chem., 254, 4027 (1979). La cantidad de elastasa liberada desde las PMN se calcula mediante la velocidad de la degradación de MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC.

TNF- α en un ensayo de lesión cerebral traumática

El presente ensayo proporciona un estudio sobre la expresión del ARNm del factor de necrosis tumoral en regiones específicas del cerebro, tras una lesión cerebral traumática (TBI) de percusión de fluido lateral inducida de forma experimental en ratas. Ratas Sprague-Dawley adultas ($n = 42$) se anestesiaron con pentobarbital sodio (60 mg/kg, por vía intraperitoneal) y se sometieron a una lesión cerebral de percusión de fluido lateral de gravedad moderada (2,4 atm.) centrada sobre la corteza temporoparietal izquierda ($n = 18$), o un tratamiento “falso” (anestesia y cirugía sin lesión, $n = 18$). Los animales se sacrificaron mediante decapitación a las 1, 6 y 24 horas tras la lesión, se retiraron los cerebros, y se prepararon muestras de tejido de la corteza parietal izquierda (LC) (lesionada), la correspondiente área en la corteza derecha contralateral (RA), la corteza adyacente a la corteza parietal lesionada (LA), la correspondiente área adyacente en la corteza derecha (RA), el hipocampo izquierdo (LH) y el hipocampo derecho (RH). Se aíslo el ARN total y se realiza una hibridación de transferencia Northern y se cuantifica con relación a un ARN de TNF- α de control positivo (macrófagos = 100%). Se observó un marcado aumento de la expresión del ARNm de TNF- α en LH ($104 \pm 17\%$ del control positivo, $p < 0,05$ comparado con el falso), LC ($105 \pm 21\%$, $p < 0,05$) y LA ($69 \pm 8\%$, $p < 0,01$) en el hemisferio traumatizado 1 hora después de la lesión. También se observó un aumento en la expresión del ARNm de TNF- α en LH ($46 \pm 8\%$, $p < 0,05$), LC ($30 \pm 3\%$, $p < 0,01$) y LA ($32 \pm 3\%$, $p < 0,01$) a las 6 horas que se resuelve a las 24 horas después de la lesión. En el hemisferio colateral, la expresión del ARNm de TNF- α aumenta en RH ($46 \pm 2\%$, $p < 0,01$), RC ($4 \pm 3\%$) y RA ($22 \pm 8\%$) a 1 hora, y en RH ($28 \pm 11\%$), RC ($7 \pm 5\%$) y RA ($26 \pm 6\%$, $p < 0,05$) a las 6 horas pero no a las 24 horas tras la lesión. En animales con tratamiento falso (cirugía sin lesión) o intocados, no se observaron cambios coherentes en la expresión del ARNm de TNF- α en ninguna de las 6 áreas cerebrales de cualquiera de los hemisferios en ningún momento. Estos resultados indican que después de una lesión cerebral de percusión de fluido parasagital, la expresión temporal del ARNm de TNF- α se altera en regiones cerebrales específicas, incluyendo las del hemisferio no traumatizado. Puesto que el TNF- α es capaz de inducir el factor de crecimiento nervioso (NGF) y estimular la liberación de otras citoquinas desde astrocitos activados, esta alteración postraumática en la expresión génica del TNF- α desempeña un papel importante en la respuesta aguda y regenerativa a traumatismos en el SNC.

Modelo de lesión en el SNC para ARNm de IL-1 β

Este ensayo caracteriza la expresión regional de ARNm de interleuquina-1B (IL-1B) en regiones cerebrales específicas tras una lesión cerebral traumática (TBI) de percusión de fluido lateral experimental en ratas. Ratas Sprague-Dawley adultas ($n = 42$) se anestesiaron con pentobarbital sodio (60 mg/kg, por vía intraperitoneal) y se sometieron a una lesión cerebral de percusión de fluido lateral de gravedad moderada (2,4 atm.) centrada sobre la corteza temporoparietal izquierda ($n = 18$), o un tratamiento “falso” (anestesia y cirugía sin lesión, $n = 18$). Los animales se sacrificaron a las 1, 6 y 24 horas tras la lesión, se retiraron los cerebros, y se prepararon muestras de tejido de la corteza parietal izquierda lesionada (LC), la correspondiente área en la corteza derecha contralateral (RA), la corteza adyacente a la corteza parietal lesionada (LA), la correspondiente área adyacente en la corteza derecha (RA), el hipocampo izquierdo (LH) y el hipocampo derecho (RH). Se aíslo el ARN total y se realiza una hibridación de transferencia Northern, y se presenta la cantidad de ARNm de IL-1 β en el tejido cerebral como el porcentaje relativo de radiactividad de ARN de macrófagos positivo frente a IL-1 β que se cargó en el mismo gel. A la hora tras la lesión cerebral, se observó un marcado y significativo aumento de la expresión del ARNm de IL-1 β en LC ($20,0 \pm 0,7\%$, del control positivo, $n = 6$, $p < 0,05$ comparado con el animal con tratamiento falso), LH ($24,5 \pm 0,9\%$, $p < 0,05$) y LA ($21,5 \pm 3,1\%$, $p < 0,05$) en el hemisferio traumatizado, que permaneció elevado hasta 6 horas tras la lesión en LC ($4,0 \pm 0,4\%$, $n = 6$, $p < 0,05$) y LH ($5,0 \pm 1,3\%$, $p < 0,05$). En animales con tratamiento falso o intocados, no se observó expresión del ARNm de IL-1 β en ninguna de las respectivas áreas cerebrales. Estos resultados indican que después de una TBI, la expresión temporal del ARNm de IL-1 β resulta estimulada regionalmente en regiones cerebrales específicas. Estos cambios regionales en las citoquinas, tales como IL-1 β , desempeña un papel importante en la fase postraumática.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

5 N-alil-N'-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)urea;
N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-isopropilurea;
10 N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-etilurea;
N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-propilurea;
15 N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-(etoxicarbonil)metilurea;
3-(3-sec-butilureido)-6-cloro-2-hidroxibencensulfonamida;
20 6-cloro-3-[3-(1-etilpropil)ureido]-2-hidroxibencensulfonamida;
6-cloro-2-hidroxi-3-[3-(1-metilbutil)ureido]bencensulfonamida;
éster metílico del ácido (2S,3S)-2-[3-(4-cloro-2-hidroxi-3-sulfamoilfenil)ureido]-3-metilpentanoico; y
ácido (S)-2-[3-(4-cloro-2-hidroxi-3-sulfamoilfenil)ureido]-3-metilpentanoico.

25 2. Un compuesto según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en N-alil-N'-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)urea; y N-(3-aminosulfonil-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-isopropilurea.

3. Un compuesto según la reivindicación 1 que es 6-cloro-3-[3-(1-etilpropil)ureido]-2-hidroxibencensulfonamida.

30 4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

35 5. El uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la psoriasis, dermatitis atópica, osteoartritis, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de insuficiencia respiratoria en adultos, enfermedad del intestino inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, accidentes cerebrovasculares, choque séptico, esclerosis múltiple, choque endotóxico, sepsis por organismos gram-negativos, síndrome del choque tóxico, lesiones por reperfusión cardíacas y renales, glomerulonefritis, trombosis, reacción del receptor frente a un injerto, enfermedad de Alzheimer, rechazos de aloinjertos, malaria, reestenosis, angiogénesis, aterosclerosis, osteoporosis, gingivitis y liberación de células pluripotenciales hematopoyéticas no deseadas, y enfermedades provocadas por virus respiratorios, herpesvirus y virus de la hepatitis, meningitis, fibrosis quística, parto prematuro, tos, prurito, disfunción de múltiples órganos, traumatismos, torceduras, esguinces, contusiones, artritis psoriática, herpes, encefalitis, vasculitis del SNC, lesiones cerebrales traumáticas, tumores del SNC, hemorragia subaracnoidea, traumatismo postquirúrgico, pneumonitis intersticial, hipersensibilidad, artritis inducida por cristales, pancreatitis aguda y crónica, hepatitis alcohólica aguda, enterocolitis necrotizante, sinusitis crónica, uveitis, polimiositis, vasculitis, acné, úlceras gástricas y duodenales, enfermedad celíaca, esofagitis, glositis, obstrucción de las vías respiratorias, hipercapacidad de respuesta de las vías respiratorias, neumonía que organiza bronquiolitis obliterante, bronquiectasia, bronquiolitis obliterante, bronquitis crónica, cor pulmonae, dispnea, enfisema, hipercapnea, hiperinflación, hipoxemia, inflamaciones inducidas por hiperoxia, hipoxia, reducción del volumen pulmonar quirúrgico, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, hipertrofia ventricular derecha, sarcoidosis, enfermedad de las vías respiratorias pequeñas, desacoplamiento de la ventilación-perfusión, respiración jadeante, enfriamientos y lupus.

55 6. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el tratamiento de la psoriasis, dermatitis atópica, osteoartritis, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de insuficiencia respiratoria en adultos, enfermedad del intestino inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, accidentes cerebrovasculares, choque séptico, esclerosis múltiple, choque endotóxico, sepsis por organismos gram-negativos, síndrome del choque tóxico, lesiones por reperfusión cardíacas y renales, glomerulonefritis, trombosis, reacción del receptor frente a un injerto, enfermedad de Alzheimer, rechazos de aloinjertos, malaria, reestenosis, angiogénesis, aterosclerosis, osteoporosis, gingivitis y liberación de células pluripotenciales hematopoyéticas no deseadas, y enfermedades provocadas por virus respiratorios, herpesvirus y virus de la hepatitis, meningitis, fibrosis quística, parto prematuro, tos, prurito, disfunción de múltiples órganos, traumatismos, torceduras, esguinces, contusiones, artritis psoriática, herpes, encefalitis, vasculitis del SNC, lesiones cerebrales traumáticas, tumores del SNC, hemorragia subaracnoidea, traumatismo postquirúrgico, pneumonitis intersticial, hipersensibilidad, artritis inducida por cristales, pancreatitis aguda y crónica, hepatitis alcohólica aguda, enterocolitis necrotizante, sinusitis crónica, uveitis, polimiositis, vasculitis, acné, úlceras gástricas y duodenales, enfermedad celíaca, esofagitis, glositis, obstrucción de las vías respiratorias, hipercapacidad de respuesta de las vías respiratorias, neumonía que organiza bronquiolitis obliterante, bronquiectasia, bronquiolitis obliterante, bronquitis crónica, cor pulmonae, dispnea, enfisema, hipercapnea, hiperinflación, hipoxemia, inflamaciones inducidas por hiperoxia, hipoxia, reducción del volumen pulmonar quirúrgico, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, hipertrofia ventricular derecha, sarcoidosis, enfermedad de las vías respiratorias pequeñas, desacoplamiento de la ventilación-perfusión, respiración jadeante, enfriamientos y lupus.

ES 2 307 603 T3

ción, hipoxemia, inflamaciones inducidas por hiperoxia, hipoxia, reducción del volumen pulmonar quirúrgico, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, hipertrofia ventricular derecha, sarcoidosis, enfermedad de las vías respiratorias pequeñas, desacoplamiento de la ventilación-perfusión, respiración jadeante, enfriamientos y lupus.

- 5 7. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en terapia.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65