



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 325 495**

(51) Int. Cl.:

C07K 5/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03762853 .4**

(96) Fecha de presentación : **08.07.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1551865**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **13.07.2005**

(54) Título: **Moléculas híbridas de macrólidos con moléculas anti-inflamatorias esteroideas y no esteroideas.**

(30) Prioridad: **08.07.2002 US 395190 P**

(73) Titular/es:
GlaxoSmithKline istrazivacki centar Zagreb d.o.o.
Prilaz Baruna Filipovica 29
10000 Zagreb, HR

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.09.2009

(72) Inventor/es: **Mercep, Mladen;**
Mesic, Milan;
Tomaskovic, Linda y
Markovic, Stribor

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.09.2009

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

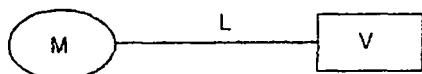
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar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

DESCRIPCIÓN

Moléculas híbridas de macrólidos con moléculas anti-inflamatorias esteroideas y no esteroideas.

5 Compendio de la invención

La presente invención se refiere (a) a nuevos compuestos representados por la estructura I:



15

I

en donde M representa una subunidad macrólida que posee la propiedad de acumularse en las células inflamatorias, V 20 representa un compuesto antiinflamatorio, ya sea una subunidad esteroidea o no esteroidea, y L representa un grupo de enlace que enlaza covalentemente M y V, (b) a las sales y solvatos farmacológicamente aceptables, (c) a procedimientos e intermedios para la preparación de tales compuestos, y (d) a su uso en el tratamiento de enfermedades y estados inflamatorios en seres humanos y animales. Tales compuestos pueden actuar como profármacos, transportando el compuesto al interior de la célula diana y liberándolo dentro de ella en concentración más alta de lo que cabría esperar normalmente para el compuesto en solitario, o pueden ser activos en su forma híbrida, tal como se administran. Por 25 lo tanto, estos compuestos y sus usos mencionados anteriormente dan respuesta al problema técnico de incrementar la eficacia y/o la eficiencia y/o disminuir los efectos secundarios de uno o más de los ingredientes activos mencionados anteriormente, mediante su entrega en forma híbrida a las células diana o a las inmediaciones de las células diana.

30 **Antecedentes de la invención**

Los medicamentos antiinflamatorios se podrían clasificar en esteroideos y no esteroideos. Los compuestos antiinflamatorios esteroideos siguen siendo los más efficaces en el tratamiento de las enfermedades y los estados inflamatorios, tales como: asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades inflamatorias nasales tales como rinitis alérgica, pólipos nasales, enfermedades intestinales tales como enfermedad de Crohn, colitis, colitis ulcerosa, inflamaciones dermatológicas tales como eczema, psoriasis, dermatitis alérgica, neurodermatitis, prurito, conjuntivitis, enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide, e inhibición de la inmunidad en transplantes. Más aún, los esteroides se usan como agentes quimioterapéuticos auxiliares en el tratamiento de diversos tumores malignos, incluyéndose las leucemias, los linfomas, los mielomas, y otros tumores malignos del sistema hematopoyético. Además 35 de su excelente potencia y eficacia, los medicamentos de este tipo también poseen numerosos efectos secundarios no deseados, p. ej., sobre el metabolismo de los carbohidratos, la resorción del calcio, la secreción de corticosteroides endógenos, así como sobre las funciones fisiológicas de la glándula pituitaria, la corteza suprarrenal y el timo. Los esteroides desarrollados recientemente son altamente efficaces contra los estados y procesos inflamatorios ya que inhiben muchos mediadores de la inflamación, mientras que sus efectos secundarios sistémicos disminuyen. Las Solicitudes 40 de Patente WO 94/13690, WO 94/14834, WO 92/13873 y WO 92/13872 describen los denominados esteroides " blandos" o corticosteroides hidrolizables destinados a aplicaciones tópicas sobre el sitio de la inflamación, mientras que sus efectos secundarios sistémicos disminuyen debido a la inestabilidad de los esteroides " blandos" en suero, en donde el esteroide activo se hidroliza muy rápidamente convirtiéndose en la forma inactiva. Sin embargo, todavía no se ha encontrado un esteroide ideal, sin efectos no deseados en un tratamiento continuo y de larga duración, que es lo que 45 se necesita para el control de enfermedades tales como el asma o la enfermedad de Crohn. Así, existe una necesidad acuciante de esteroides con un perfil terapéutico mejorado, y/o con efectos secundarios menores en número o más débiles.

50 Los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos que tienen diferentes mecanismos de acción actúan sobre unos mediadores particulares de la inflamación, proporcionando así un efecto terapéutico. Debido a diferencias no sólo en los mecanismos de acción sino también en los mediadores particulares de la inflamación que son inhibidos, los medicamentos esteroideos y no esteroideos poseen diferentes perfiles de efectos antiinflamatorios, y de aquí que ciertos medicamentos puedan ser más adecuados que otros para determinados estados. Además, casi ningún medicamento antiinflamatorio es absolutamente específico y su uso va acompañado de efectos secundarios no deseados cuando se usan en dosis más altas o durante períodos de tiempo muy prolongados. Se sabe que muchos medicamentos antiinflamatorios no esteroideos actúan como inhibidores de la enzima COX-1 endógena, que es una enzima muy importante para mantener la integridad de la mucosa gástrica. Por ello, el uso de estos medicamentos suele producir lesiones en la mucosa gástrica e incluso hemorragias (Warner T. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 96, 7563-7568.) Por lo tanto, los agentes que inhiben selectivamente COX-2 pero no COX-1 son preferibles para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias. Es más, se sabe que algunos compuestos antiinflamatorios (tales como la teofilina) tienen un índice terapéutico muy estrecho, lo que limita su uso.

ES 2 325 495 T3

Recientemente, el fármaco antiinflamatorio no esteroideo celecoxib que bloquea específicamente COX-2 ha sido autorizado por la FDA para uso en el tratamiento de artritis reumatoide (Luong *et al.* *Ann. Pharmacother.* **2000**, 34, 743-760). COX-2 también se expresa en muchos cánceres y lesiones precancerosas y existen muchas pruebas de que los inhibidores selectivos de COX-2 pueden ser útiles para tratar y prevenir cánceres colorrectales entre otros (Taketo, M. M., *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, 90, 1609-1620, Fournier *et. al.* *J. Cell Biochem. Suppl.* **2000**, 34, 97-102).

En 1975, el TNF- α se definió como un factor del suero inducido por endotoxinas que provoca necrosis tumoral *in vitro* e *in vivo* (Carswell E. A. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1975**, 72, 3666-3670). Además de actividad antitumoral, el TNF- α tiene otras varias actividades biológicas que son importantes en la homeostasis así como en las 10 afecciones patofisiológicas. Las fuentes principales de TNF- α son los monocitos-macrófagos, los linfocitos T y los mastocitos.

El hallazgo de que los anticuerpos anti-TNF- α (cA2) son efectivos en el tratamiento de pacientes que padecen artritis reumatoide (RA) (Elliot M. *et al.* *Lancet* **1994**, 344, 1105-1110) intensificó el interés por encontrar nuevos 15 agentes inhibidores de TNF- α como posibles medicamentos potentes para la RA. La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmunitaria caracterizada por cambios patológicos irreversibles en las articulaciones. Además de la RA, los agentes antagonistas del TNF- α también son aplicables a otras varias afecciones y enfermedades 20 patológicas tales como espondilitis, osteoartritis, gota y otras afecciones artríticas, sepsis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, psoriasis, glomerulonefritis, lupus eritematoso, esclerodermia, asma, caquexia, enfermedad obstructiva crónica de los pulmones, insuficiencia cardiaca congestiva, resistencia 25 a la insulina, fibrosis pulmonar, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, infecciones víricas y SIDA.

Los macrólidos tales como los antibióticos macrólidos se acumulan dentro de diferentes células de los sujetos a los 25 que se administran tales moléculas, especialmente dentro de las células fagocíticas tales como células mononucleares de sangre periférica, macrófagos peritoneales y alveolares así como en el líquido que rodea el epitelio broncoalveolar (Glaude R. P. *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33 **1989**, 277-282; Olsen, K. M. *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 **1996**, 2582-2585). Más aún, también se han descrito efectos inflamatorios relativamente débiles de algunos macrólidos. Por ejemplo, el efecto antiinflamatorio de derivados de eritromicina (*J. Antimicrob. Chemother.*, 41 **1998** 37-46; documento WO 00/42055) y de derivados de azitromicina ha sido descrito recientemente (documento EP 0283055). También se conocen los efectos antiinflamatorios de algunos macrólidos por estudios *in vitro* e *in vivo* 30 en modelos con animales experimentales tales como la peritonitis inducida por zimosano (*J. Antimicrob. Chemother.*, 30 **1992** 339-348) y la acumulación de neutrófilos inducida por endotoxinas en tráquea de rata (*J. Immunol.* 159 **1997** 3395-4005). El efecto modulador de los macrólidos sobre citoquinas tales como la interleuquina 8 (IL-8) (*Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156 **1997** 266-271) o la interleuquina 5 (IL-5) (documentos EP 0775489 y EP 0771564) también 35 es conocido. Aún más, el perfil farmacocinético favorable de los macrólidos podría aumentar la concentración tisular de un compuesto p. ej. en el hígado, o incrementar la razón globulos blancos/plasma (Girard A.E. *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 31 **1987** 1948-54; Widlfeuer A. *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 **1996**, 75-79).

Para obtener compuestos con un perfil de actividad mejorado y/o nuevo frente a enfermedades en las que se 40 necesita una actividad selectiva, se han conectado varias sustancias de diferente actividad a macrólidos con diferentes tipos de enlazadores. Se han dado a conocer unos cuantos ejemplos de híbridos/conjugados/quimeras de derivados de eritromicina A y bases nucleicas (uracilo y timina) o nucleósidos derivados de timidina. (Costa A.M. *et al.* *Tetrahedron Lett.* 41, **2000**, 3371-3375). Sin embargo, esas construcciones no mostraron actividad ni/o selectividad hacia una diana deseada. Además, no se han dado a conocer construcciones macrólidas en las que el enlazador sea de tipo peptídico.

45 El enlazador peptídico introducido como enlazador en las moléculas híbridas de la presente invención permite que dichas moléculas actúen como profármacos, liberando el resto V por escisión lisosómica específica dentro de la célula diana. Se han descrito enlazadores similares para otras moléculas pequeñas (en el caso de la presente invención representadas por híbridos de un compuesto anti-inflamatorio) y una macromolécula o polímero (Duncan R. *et al.* en 50 Robinson J.R. y Lee V.H. (eds.) *Controlled Drug Delivery:Fundamentals and Applications*, 2^a edición, 1987 581-607, Subr V. *et al.*, *J. Controlled Rel.* 18 **1992** 123-132).

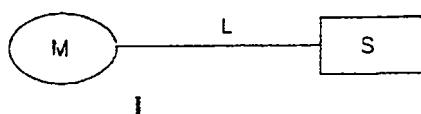
Descripción detallada de la invención

55 Los compuestos representados por la Fórmula I se diferencian de los compuestos de la técnica anterior en que su estructura permite que sean acumulados en los órganos diana por y en células que efectúan la respuesta inmunitaria inflamatoria que requiere tratamiento. Esta acción de los compuestos de Fórmula I nace en el resto macrólido M que tiene la propiedad farmacocinética de acumularse en las células del sistema inmunitario, especialmente en los 60 fagocitos. Esto permite que los compuestos de Fórmula I actúen predominantemente, si no exclusivamente, en el sitio de la inflamación o de la infección, “dejándose llevar” el macrólido dentro de las células de la inflamación reclutadas en el lugar de la inflamación o de la infección, donde el ingrediente activo puede ejercer su actividad. De esta manera, los efectos secundarios sistémicos de las sustancias antiinflamatorias esteroideas o no esteroideas se 65 reducen significativamente o incluso se eliminan. (Hay que señalar que los esteroideos se usan como terapia auxiliar en el tratamiento de tumores malignos y la presente invención también contempla los esteroideos para uso antineoplásico). Despues de la aplicación tópica o sistémica, las moléculas híbridas de la invención (y/o sus partes constituyentes, si son 70 liberables) se acumulan rápidamente en el sitio de la inflamación o en las células infectadas o en sus inmediaciones.

ES 2 325 495 T3

Recientemente se ha encontrado que ciertos compuestos dentro de la Fórmula I:

5



10

ejercen un efecto terapéutico mejorado en el tratamiento de las enfermedades, los trastornos o los estados inflamatorios. El símbolo M en la estructura anterior representa una subunidad macrólida que posee la propiedad de acumularse en las células inflamatorias, S representa una subunidad esteroidea antiinflamatoria y L representa un enlazador que enlaza covalentemente M y S. La Solicitud Internacional de Patente PCT/HR02/00001, en tramitación con la presente y del mismo propietario, describe compuestos con la subunidad esteroidea S enlazada vía la cadena L a la posición N/9a de 9-dihidro-9-desoxo-9a-aza-9a-homoeritromicina o a la posición C/3 de un derivado de des-cladinosil azitromicina o a la posición C/2' del desozaminoazúcar. Sin embargo, hasta ahora no se han descrito compuestos híbridos con la subunidad esteroidea enlazada con el enlazador peptídico en la posición N/9a de 9-dihidro-9-desoxo-9a-aza-9a-homoeritromicina, que posean también la acción terapéutica mencionada anteriormente. Tampoco se han descrito compuestos híbridos con las subunidades no esteroideas enlazadas con el enlazador peptídico en la posición N/9a. Todos estos compuestos son el objeto de la presente solicitud.

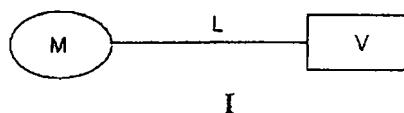
15

La presente invención se refiere a

20

(a) nuevos compuestos "híbridos" representados por la Fórmula I:

30



35

en donde M representa una subunidad macrólida que posee la propiedad de acumularse en las células inflamatorias, V representa una subunidad antiinflamatoria esteroidea o no esteroidea, como se define más abajo, y L representa un grupo de enlace polipeptídico que enlaza covalentemente M y V;

40

(b) composiciones que contienen uno o más de los compuestos precedentes en una cantidad efectiva para combatir la inflamación y de este modo tratar trastornos y estados que implican inflamación en mamíferos, incluyendo los seres humanos; e

45

(c) métodos para usar estos compuestos para tratar tales trastornos y estados.

50

Ventajosamente, los presentes compuestos proporcionan un efecto terapéutico y/o un perfil de efectos secundarios mejorado.

55

Las subunidades macrólidas adecuadas para los compuestos híbridos de la presente invención se pueden seleccionar sin limitación de subunidades macrólidas constituidas por anillos de 14 y 15 miembros, siendo las más preferidas la azitromicina y sus derivados y la eritromicina y sus derivados.

60

Ejemplos no limitantes más específicos de moléculas entre las que se puede seleccionar la subunidad macrólida son los siguientes:

65

(i) Antibióticos macrólidos, incluidas las azalidas, por ejemplo eritromicina, diritromicina, azitromicina, 9-dihidro-9-desoxo-9a-aza-9a-homoeritromicina, HMR 3004, HMR 3647, HMR 3787, eritromicilamina, ABT 773, fluritromicina, claritromicina, oleandomicina, y roxitromicina, y derivados de los mismos, tales como cetólidos (p. ej., 3-cetona), lactamas (p. ej., 8a- o 9a-lactamas) y derivados que carecen de uno o más restos de azúcar.

70

Las metodologías para la síntesis de los macrólidos anteriores no disponibles en el mercado y para la manipulación sintética de macrólidos en general son conocidas por los expertos en la técnica o se pueden encontrar en: Denis A. et al. Biorg. & Med. Chem. Lett 1999, 9, 3075-3080; Agouridas C. et al. J. Med. Chem. 1998, 41, 4080-4100; y documento EP-00680967 (1998); Sun Or Y. et al. J. Med. Chem. 2000, 43, 1045-1049; documento US-05747467 (1998); McFarland J. W. et al. J. Med. Chem. 1997, 40, 1041-1045; Denis A. et al. Biorg. & Med. Chem. Lett 1998, 8, 2427-2432; documento WO-09951616 (1999); Lartey et al. J Med Chem. 1995, 38, 1793-1798; documento EP 0984019; documento WO 98/56801.

ES 2 325 495 T3

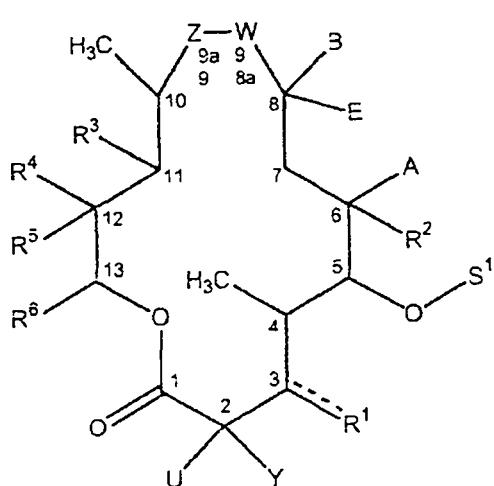
- Se conocen otros macrólidos adecuados, algunos de los cuales están descritos en Bryskier, A. J. *et al. Macrolides, Chemistry, Pharmacology and Clinical Use*; Arnette Blackwell: Paris, 1993, págs. 485-491, 14(R)-hidroxicularitromicina, 11,12-carbonato de eritromicina, tri-O-acetiloleandomicina; en Ma, Z. *et al. Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents*, **2002**, 1, 15-34; picromicina, narbomicina, HMR-3562, CP-654743, CP-605006, TE-802, TE-935, 5 TE-943, TE-806, cetólidos con puentes en posición 6,11, CP-544372, FMA-199, A-179461. Véanse en particular las estructuras y derivados para macrólidos con anillos de 14 y 16 miembros en las págs. 487-491 de Bryskier, *et al.*, y los diversos derivados cetólidos y síntesis en Ma *et al.*, especialmente en todas las tablas de estructuras y todos los esquemas de reacción. Todos estos macrólidos después de conjugarse con V están dentro del alcance de la presente invención.
- 10 Los compuestos macrólidos referidos o nombrados específicamente en los que antecede son obtenibles en el mercado o se conocen métodos para su síntesis.
- Es importante que la subunidad macrólida proceda de un macrólido que tenga la propiedad de acumularse dentro de 15 las células del sistema inmunitario reclutadas en el sitio de la inflamación, especialmente células fagocíticas. Es sabido que la mayoría de los compuestos lactónicos poseen esta propiedad. Por ejemplo, los macrólidos de 14 miembros tales como la eritromicina y sus derivados; los macrólidos de 15 miembros tales como la azitromicina y sus derivados, así como 8a- y 9a-lactamas y sus derivados.
- 20 Se pueden encontrar ejemplos adicionales de macrólidos que se acumulan dentro de clases específicas de células en: Pascual A. *et al. Clin. Microbiol. Infect.* **2001**, 7, 65-69. (Captación y actividad intracelular del cetólido HMR 3647 en células fagocíticas y no fagocíticas humanas); Hand W. L. *et al. Int. J. Antimicrob. Agents*, **2001**, 18, 419-425. (Características y mecanismos de la acumulación y el eflujo de azitromicina en leucocitos polimorfonucleares humanos); Amsden G. W. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2001**, 18, 11-15. (Generación avanzada de macrólidos: antibióticos dirigidos a tejidos); Johnson J. D. *et al. J. Lab. Clin. Med.* **1980**, 95, 429-439. (Captación de antibióticos por macrófagos alveolares); Wildfeuer A. *et al. Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, 40, 75-79. (Captación de azitromicina por diversas células y su actividad intracelular bajo condiciones *in vivo*); Scorneaux B. *et al. Poult. Sci.* **1998**, 77, 1510-1521. (Acumulación intracelular, distribución subcelular y eflujo de tilmicosina en fagocitos de pollo); Mtairag E. M. *et al. J. Antimicrob. Chemother.* **1994**, 33, 523-536. (Investigación sobre la captación de diritromicina y eritromicilamina por neutrófilos humanos *in vitro*); Anderson R. *et al. J. Antimicrob. Chemother.* **1988**, 22, 923-933 (Una evaluación *in vitro* de la captación celular y la bioactividad intrafagocítica de la claritromicina (A-56268, TE-031), un nuevo agente antimicrobiano macrólido); Tasaka Y. *et al. Jpn. J. Antibiot.* **1988**, 41, 836-840. (Captación de roquitamicina por los macrófagos alveolares); Harf R. *et al. J. Antimicrob. Chemother.* **1988**, 22, 135-140 (Captación de espiramicina por los macrófagos alveolares).
- 35 Además, la presencia de propiedad acumulativa dentro de las células del sistema inmunitario reclutadas en el sitio de la inflamación, especialmente células fagocíticas, puede ser constatada fácilmente por el experto en el campo de la invención, usando uno de los ensayos bien conocidos para este propósito. Por ejemplo, se puede usar el procedimiento detallado por Olsen, K. M. *et al. Antimicrob. Agents & Chemother.* **1996**, 40, 2582-2585. Brevemente, las células que 40 hay que ensayar, p. ej., leucocitos polimorfonucleares se pueden obtener de sangre venosa de voluntarios sanos por centrifugación de Ficoll-Hypaque seguida por sedimentación con dextrano al 2%. Se separan los eritrocitos por lisis osmótica y se evalúan los PMN por exclusión con azul Tripán. Alternativamente, otras fracciones celulares pueden ser separadas y ensayadas de modo similar. Los compuestos macrólidos tritiados (p. ej., 10 μ M) se incuban con $2,5 \times 10^6$ células durante 120 minutos (37°C, 5% de CO₂, humedad relativa 90%) y seguidamente las células se separan por 45 centrifugación del sobrenadante que contiene compuesto p. ej., a través de una capa de aceite de silicona-parafina (86% vol:14% vol). La cantidad de compuesto se determina, p. ej., por recuento de centelleo, y una puntuación significativamente elevada por encima del fondo indica acumulación del macrólido en las células de ensayo. Véase Bryskier *et al. Macrolides, Chemistry, Pharmacology and Clinical Use*; Arnette Blackwell: Paris, **1993** págs 375-386, página 381, columna 2, línea 3. Alternativamente, el compuesto no se marca radiactivamente y la cantidad de compuesto se 50 puede determinar por HPLC.
- Otros métodos de ensayo que se pueden utilizar se describen en Bryskier, A. J. *et al. Macrolides, Chemistry, Pharmacology and Clinical Use*; Arnette Blackwell: Paris, **1993** págs. 375-386. Véase, en particular la determinación de la captación de fagocitos en las págs. 380-381 y las descripciones particulares en cuanto a captación y localización de macrólidos en las págs. 381, 383 y 385 y las tablas de las págs. 382 y 383.

60

65

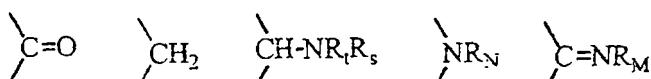
ES 2 325 495 T3

Esta invención se refiere a compuestos, sus sales y solvatos representados por la Fórmula I, en donde M concretamente representa una subunidad macrólida con anillo lactónico de 14 o 15 miembros representada por la Fórmula II:



1

en donde



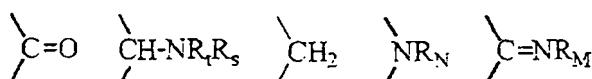
(i) Z y W independientemente son , , , , , , , , , o un enlace, en donde

R_t y R_s independientemente son H o alquilo (preferiblemente metilo o H)

R_M es OH, OR^p, alcoxi o alcoxi sustituido (ya sea en configuración Syn o Anti o mezclas de los mismos)

R_N es H, R^p , alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxialquilo, o $-C(=X)-NR_tR_s$;

X es O o S;

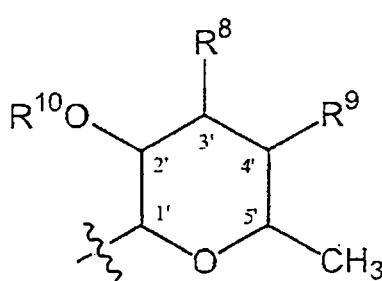


siempre que Z y W no puedan ser simultáneamente , , , , , , , , , o un enlace,

(ii) U e Y son independientemente H, halógeno, alquilo, o hidroxialquilo (preferiblemente H, metilo o hidroximeto);

(iii) R¹ es hidroxi, OR^p, -O-S², o =O;

(iv) S¹ es un resto de azúcar en la posición C/5 del anillo de aglicona (p. ej., un grupo desozamina) de fórmula:



ES 2 325 495 T3

en donde

R⁸ y R⁹ son ambos hidrógeno o juntos forman un enlace, o R⁹ es hidrógeno y R⁸ es -N(CH₃)R^y, en donde

5 R^y puede ser R^p, R^z o -C(O)R^z, en donde R^z es hidrógeno o cicloalquilo (preferiblemente ciclohexilo) o alquilo (preferiblemente un alquilo C₁-C₇) o alquenilo (preferiblemente alquenilo C₂-C₇) o alquinilo (preferiblemente alquinilo C₂-C₇) arilo o heteroarilo o pueden ser alquilo sustituido con alquilo C₁-C₇ o alquenilo C₂-C₇ o alquinilo C₂-C₇ o arilo o heteroarilo. (R^y es preferiblemente hidrógeno, metilo, o etilo);

10 R¹⁰ es hidrógeno o R^p;

(v) S² es un resto de azúcar en la posición C/3 del anillo de aglicona (p. ej., un grupo cladinosilo) de fórmula



25 en donde R^{3'} puede ser H o metilo y R¹¹ y R¹² son independientemente hidrógeno, R¹¹ puede ser un R^p o R¹¹ y R¹² juntos forman un enlace

30 (vi) R² es H, hidroxi, un grupo OR^p, alcoxi (preferiblemente alcoxi C₁-C₄, lo más preferiblemente metoxi), alcoxi sustituido;

(vii) A es H o metilo;

(viii) B es metilo o epoxi;

35 (ix) E es H o halógeno (preferiblemente flúor);

(x) R³ es hidroxi, un grupo OR^p o alcoxi (preferiblemente alcoxi C₁-C₄, lo más preferiblemente metoxi), alcoxi sustituido o R³ es un grupo que se puede combinar con R⁵ para formar un “puente” (p. ej., un carbonato o carbamato

40 cíclico) o si W o Z es , R³ es un grupo que se puede combinar con W o Z para formar un “puente” (p. ej., un carbamato cíclico);

45 (xi) R⁴ es alquilo C₁-C₄ (preferiblemente metilo);

(xii) R⁵ es H, hidroxi, un grupo OR^p, alcoxi C₁-C₄, alcoxi sustituido o un grupo que se puede combinar con R³ para formar un puente (p. ej., un carbonato o carbamato cíclico);

50 (xiii) R⁶ es H o alquilo C₁-C₄ (preferiblemente metilo o etilo);

en donde la subunidad M tiene un sitio de enlace a través del cual se une a la subunidad D vía el grupo enlazador L, estando el sitio de enlace en uno o más de los siguientes:

55 a. cualquier grupo hidroxi, N, o epoxi reactivo localizado en S¹, S², o un oxígeno de aglicona si S² está (o si tanto S² como S¹ están) escindidos;

b. un grupo reactivo >N-R_N, NR₁R_s, u =O localizado en Z o W;

60 c. un grupo hidroxi reactivo localizado en uno cualquiera de R¹, R², R³, y R⁵;

d. cualquier otro grupo que pueda modificarse primero para dar un grupo hidroxi o -NR₁R_s y

R^p es hidroxilo o un grupo protector de amino.

65 Pueden estar presentes independientemente uno o más grupos R^p en la subunidad macrólida de Fórmula II. Cuando R^p representa un grupo protector de amino puede seleccionarse de grupo alquilo (preferiblemente metilo), alcanoilo (preferiblemente acetilo), alcoxcarbonilo (preferiblemente metoxicarbonilo o *terc*-butoxicarbonilo), arilometoxicar-

ES 2 325 495 T3

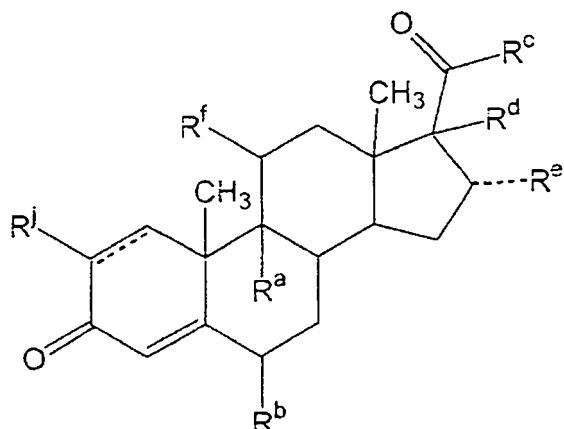
bonilo (preferiblemente benciloxicarbonilo), aroilo (preferiblemente benzoilo), ariloalquilo (preferiblemente bencilo), alquilsililo (preferiblemente trimetilsililo) o alquilsililalcoxialquilo (preferiblemente trimetilsililoetoximetilo). Los grupos protectores de amino se pueden separar por técnicas convencionales. Así, por ejemplo, los grupos acilo tales como alcanoílo, alcoxicarbonilo o aroílo se pueden separar por solvólisis, p. ej. por hidrólisis en condiciones ácidas o básicas. Un grupo arilmethoxicarbonilo (benciloxicarbonilo) se puede escindir por hidrogenolisis en presencia de un catalizador tal como paladio-sobre-carbón vegetal.

L representa un enlazador polipeptídico, elegido del grupo que consiste en:

10 Gly-Phe-Leu, Gly-Gly-Phe, Gly-Phe-Phe, Gly-Phe-Gly, Gly-Leu-Gly, Gly-Val-Ala, Gly-Phe-Ala, Gly-Leu-Phe, Gly-Leu-Ala, Ala-Val-Ala, Gly-Gly-Phe-Leu, Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Phe-Ala-Leu, Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Phe-Phe-Leu, Gly-Leu-Leu-Gly, Gly-Phe-Tyr-Ala, Gly-Phe-Gly-Phe, Ala-Gly-Val-Phe y Gly-Phe-Phe-Gly;

15 V representa una subunidad antiinflamatoria elegida del grupo que consiste en subunidad antiinflamatoria esteroidea y subunidad antiinflamatoria no esteroidea.

Cuando V es una subunidad esteroidea, es preferiblemente de Fórmula X:



X

(ii) en la que

45 R^a y R^b son, independientemente uno de otro, hidrógeno o halógeno;

R^c es hidroxi, alcoxi (preferiblemente metoxi), alquilo, tiocarbamoílo, carbamoílo o un enlace de valencia;

50 R^d y R^e son, independientemente uno de otro, hidrógeno, OH, CH₃ o alcoxi C₁-C₄ (preferiblemente metoxi o n-propoxi) o cada uno es un grupo que forma un anillo de 1,3-dioxolano con el otro (opcionalmente alquilo o alquenilo mono- o di-sustituido) (preferiblemente un anillo 2,2-dimetilo o 2-monopropilo o trans-propenilo) o un enlace de valencia;

R^f es hidrógeno, hidroxi, cloro, o =O que forma un grupo ceto con el átomo de carbono al que está unido;

55 R^j es hidrógeno o halógeno;

y sus sales y solvatos farmacológicamente aceptables.

60 Alternativamente, dentro de la presente invención se describen subunidades esteroideas descritas en el documento WO 94/14834, en donde en lugar del grupo >CH-C(O)-R^c tienen el grupo >CH-S(O)_n-R^c en donde n es un número entero de 0 a 2. Véase el documento WO 94/14834, especialmente págs. 2-3.

65 Más generalmente, los esteroides útiles como fuente de subunidad esteroidea incluyen, pero no se limitan a, corticosteroides (tales como glucocorticoides y mineralocorticoides) y andrógenos. Ejemplos no limitantes de corticosteroides incluyen cortisol, cortisona, clobetasol, hidrocortisona, fludrocortisona, fludroxicortida, flumetasona, flunisolida, fluocinolona, fluocinonida, fluocortolona, fluorometolona, prednisona, prednisolona, 6-alfa-metilprednisolona, triamcinolona, alclometasona, beclometasona, betametasona, budesonida, dexametasona, amcinonida, cortivazol, desonida,

ES 2 325 495 T3

desoximetasona diflucortolona, difluprednato, flucolorolona y diclorisona, fluperinideno, fluticasona, halcinonida, meprednisona, metilprednisolona, parametasona, prednazolina, prednilideno, tixocortol, triamcinolona, y derivados de los mismos con ácidos, p. ej., acetato, propionato, dipropionato, valerato, fosfato, isonicotinato, metasulfobenzoato, tebutato, y hemisuccinato.

V puede ser una subunidad antiinflamatoria no esteroidea es decir, un resto de un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) incluyendo, los que inhiben cicloxygenasa, la enzima responsable de la biosíntesis de prostaglandinas y ciertos inhibidores autocoides, incluyendo inhibidores de las diversas isozimas de cicloxygenasa (incluyendo, pero sin limitarse a ellas, cicloxygenasa-1 y -2), y como inhibidores tanto de cicloxygenasa como de lipoxigenasa se refiere a un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (AINE), tal como los AINEs disponibles en el mercado aceclofenaco, acetometacina, acetaminofeno, acetaminosalol, ácido acetilsalicílico, ácido acetil-salicílico-2-amino-4-picolina, ácido 5-aminoacetilsalicílico, alclofenaco, aminoprofeno, amfenaco, ampirola, ampiroxicam, anileridina, bendazaco, benoxaprofeno, bermoprofeno, α -bisabolol, bromfenaco, acetato de ácido 5-bromosalicílico, bromosaligenina, ácido buclóxico, butibufeno, carprofeno, celecoxib, cromoglicato, cinmetacina, clidanaco, clopiraco, diclofenaco sódico, diflunisal, ditazol, droxicam, ácido enfenámico, etodolaco, etofenamato, felbinaco, fentibufen, ácido fenclózico, fendosal, fenoprofeno, fentiazaco, fepradinol, flufenaco, ácido flufenámico, flunixina, flunoxyprofeno, flurbiprofeno, glucametacina, salicilato de glicol, ibufenaco, ibuprofeno, ibuprofex, indometacina, indoprofeno, isofezolaco, isoxicam, cetoprofeno, cеторолако, lornoxicam, loxoprofeno, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, meloxicam, mesalamina, ácido metiazínico, mofezolaco, montelukast, nabumetona, naproxeno, ácido niflúmico, nimesulida, olsalazina, oxaceprol, oxaprozina, oxifenbutazona, paracetamol, parsalmida, perisoxal, salicilato de fenilacetilo, fenilbutazona, salicilato de fenilo, pirazolaco, piroxicam, pirprofeno, pranoprofeno, ácido protizínico, resveratol, salacetamida, salicilamida, ácido salicilamida-O-acético, ácido salicilsulfúrico, salicina, salsalato, sulindaco, suprofeno, suxibuzona, tamoxifeno, tenoxicam, ácido tiaprofénico, tiaramida, ticlopidina, tinoridina, ácido tolafenámico, tolmetina, tropesina, xenbucina, ximoprofeno, zaltoprofeno, zomepiraco, tomoxyprofeno, zafirlukast y ciclosporina. Se describen más géneros de AINEs y más compuestos AINEs particulares en la Patente de los EE.UU 6,297,260 (especialmente en las fórmulas genéricas de su reivindicación 1 y la lista específica de los AINEs contenidos en ella y en la reivindicación 3, y los AINEs tiazolidénicos descritos en la Solicitud de Patente Internacional WO 01/87890).

Son AINEs preferidos ácido acetilsalicílico, indometacina, naproxeno, ibuprofeno, flurbiprofeno, cetoprofeno, sulindaco, etodolaco, cеторолако, suprofeno, flunixina, diclofenaco sódico, y tolmetina.

Los enlaces en negrilla en las fórmulas contenidas aquí denotan enlaces levantados o por encima del plano del papel; Los enlaces de trazo discontinuo denotan enlaces por debajo del plano papel, mientras que las líneas de rayas representan un enlace que puede estar por debajo por encima del plano del papel. Las líneas paralelas, una de trazo continuo y otra de rayas representan un enlace sencillo o doble. Salvo indicación explícita en contrario, los términos siguientes tienen los significados adjudicados a ellos más abajo.

“Alquilo” representa un radical hidrocarbonado monovalorante saturado, lineal o ramificado, de uno a diez átomos de carbono, más preferiblemente de uno a seis átomos de carbono. Los alquilos de cadena lineal o ramificada preferidos incluyen metilo, etilo, propilo, *iso*-propilo, butilo, *sec*-butilo y *terc*-butilo. El metilo es el más preferido. Los grupos alquilo pueden estar sustituidos con uno a cinco sustituyentes incluyendo halógeno (preferiblemente flúor o cloro), hidroxi, alcoxi (preferiblemente metoxi o etoxi), acilo, acilamino ciano, amino, N-alquil(C1-C4)amino (preferiblemente N-metilamino o N-etylamino), N,N-di(alquil C1-C4)amino (preferiblemente dimetilamino o dietilamino), arilo (preferiblemente fenilo) o heteroarilo, tiocarbonilamino, aciloxi, amino, amidino, alquilamidino, tioamidino, aminoacilo, aminocarbonilamino, aminotiocarbonilamino, aminocarboniloxi, arilo, heteroarilo, ariloxi, ariloxiarilo, nitro, carboxilo, carboxilalquilo, alquilo sustituido con carboxilo, carboxil-cicloalquilo, cicloalquilo sustituido con carboxilo, carboxilarilo, arilo sustituido con carboxilo, carboxilheteroarilo, heteroarilo sustituido con carboxilo, carboxilheterociclico, heterociclico sustituido con carboxilo, cicloalquilo, cicloalcoxi, heteroariloxi, heterocicloloxi, y oxicarbonilamino. Tales grupos alquilo sustituidos están dentro de la presente definición de “alquilo”. La presente definición de alquilo es trasladable a los otros grupos en donde el alquilo es un constituyente, tal como alcoxi.

“Alquenilo” representa un radical hidrocarbonado monovalorante lineal o ramificado de dos a diez y preferiblemente dos a seis átomos de carbono que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los grupos alquenilo pueden estar sustituidos con los mismos grupos que los alquilos y tales grupos alquenilo opcionalmente sustituidos están dentro del término “alquenilo”. Se prefieren etenilo, propenilo, butenilo y ciclohexenilo.

“Alquinilo” representa un radical hidrocarbonado monovalorante lineal o ramificado, que tiene una cadena lineal o una cadena ramificada de dos a diez, y preferiblemente dos a seis átomos de carbono y que contiene al menos uno y preferiblemente no más de tres triple enlaces carbono-carbono. Los grupos alquinilo pueden estar sustituidos con los mismos grupos que alquilo, y los grupos sustituidos están dentro de la presente definición de alquinilo. Se prefieren los grupos etinilo, propinilo y butinilo.

“Cicloalquilo” representa un grupo cíclico con 3-8 átomos de carbono que tienen un solo anillo opcionalmente condensado con un grupo arilo o heteroarilo. Los grupos cicloalquilo pueden estar sustituidos como se infica para “arilo” más abajo y los grupos cicloalquilo sustituidos están dentro de la presente definición de “cicloalquilo”. Son cicloalquilos preferidos ciclopentilo y ciclohexilo.

ES 2 325 495 T3

“Arilo” significa un grupo carbocíclico aromático insaturado que tiene 6-14 átomos de carbono que tiene un solo anillo tal como fenilo o múltiples anillos condensados tal como naftilo. Además, arilo puede estar opcionalmente condensado con un grupo alifático o arilo o puede estar sustituido con uno o más sustituyentes tales como halógeno (flúor, cloro y/o bromo), hidroxi, alquilo C₁-C₇, alcoxi C₁-C₇ o ariloxi, alquiltio C₁-C₇ o ariltio, alquilsulfonilo, ciano o amino primario o no primario.

“Heteroarilo” representa un anillo hidrocarbonado aromático monocíclico o bicíclico que tiene de 2 a 10 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos, tal como O, S o N. El anillo de heteroarilo puede estar opcionalmente condensado con otro heteroarilo, arilo o grupo cíclico alifático. Ejemplos de este tipo son furano tiofeno, pirrol, imidazol, indol, 10 piridina, oxazol, tiazol, pirrol, pirazol, pirazol, pirimidina, pirazina y triazina, siendo preferidos furano, pirrol, piridina e indol. El término incluye grupos que están sustituidos con los mismos sustituyentes especificados más arriba para arilo.

“Heterocíclico” representa un grupo saturado o insaturado que tiene uno o múltiples anillos de 1 a 10 átomos de carbono y de 1-4 heteroátomos seleccionados de nitrógeno, azufre u oxígeno, en donde en un sistema de anillos condensados el otro o los otros anillos pueden ser arilo o heteroarilo. Los grupos heterocíclicos pueden estar sustituidos como se especifica para los grupos alquilo y los grupos heterocíclicos así sustituídos están dentro de la presente definición.

“Aminoácido” se refiere a cualquier compuesto que contiene tanto un grupo amino como un grupo ácido carboxílico. El grupo amino puede estar en la posición adyacente a la función carboxi, tal como en los α -aminoácidos, o en cualquier posición dentro de la molécula. El aminoácido también puede contener grupos funcionales adicionales, tales como amino, tio, carboxilo, carboxamida, imidazol, etc. El aminoácido puede ser sintético o natural, o un aminoácido natural modificado, tal como norvalina o norleucina.

El símbolo K se usa a veces para referirse a la parte del grupo L, unida a M, o a V según lo indique el contexto.

En la preparación de los compuestos representados por la estructura I, de la actividad farmacológica especificada, ciertos compuestos nuevos fueron preparados como intermedios en la preparación de compuestos farmacológicamente activos. La presente invención también se refiere a esos intermedios.

La presente invención también abarca las sales farmacéuticamente aceptables de los presentes compuestos. Las sales farmacéuticamente adecuadas de los compuestos de la presente invención incluyen sales con ácidos inorgánicos (p. ej. ácido clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico o sulfúrico) o ácidos orgánicos (p. ej. ácidos tartárico, acético, metanosulfónico, trifluoroacético, cítrico, maleico, láctico, fumárico, benzoico, succínico, metanosulfónico, oxálico y p-toluenosulfónico).

La presente invención también abarca los solvatos (preferiblemente hidratos) de los compuestos de Fórmula I o sus sales.

Los compuestos de Fórmula I tienen uno o más centros quirales, y, dependiendo de la naturaleza de los sustituyentes individuales, también pueden tener isómeros geométricos. Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan “estereoisómeros”. Los estereoisómeros que no son imágenes especulares uno de otro se denominan “diastereómeros” y los que son imágenes especulares no superponibles entre sí se denominan “enantiómeros”. Cuando un compuesto tiene un centro quiral, es posible un par de enantiómeros. Un enantiómero puede ser caracterizado por la configuración absoluta de su centro de asimetría y se describe por las normas de secuenciación R y S de Cahn y Prelog, o por la manera en que la molécula hace girar el plano de luz polarizada designándose como dextrorrotatoria o levorrotatoria (es decir, como isómero (+) o (-) respectivamente). Un compuesto quiral puede existir como un enantiómero individual o como una mezcla de enantiómeros. Una mezcla que contiene proporciones iguales de los enantiómeros se denomina “mezcla racémica”. La presente invención abarca todos los isómeros individuales de los compuestos de Fórmula I. La descripción o denominación de un compuesto particular en la parte descriptiva y las reivindicaciones tiene el propósito de incluir tanto enantiómeros individuales como mezclas, racémicas u otras, de los mismos. Los métodos para la determinación de la estereoquímica y la resolución de estereoisómeros son bien conocidos en la técnica.

La presente invención también abarca estereosómeros del tipo syn-anti, que se dan cuando está presente un grupo oxima u otro similar. El grupo de máxima prioridad según las reglas de Cahn-Ingold-Prelog unido a uno de los átomos del doble enlace terminal de la oxima, se compara con el grupo hidroxilo de la oxima. El estereoisómero se designa como Z (*zusammen* = juntos) o Syn si el hidroxilo de oxima cae en el mismo lado de un plano de referencia que atraviesa el doble enlace C=N como grupo de máxima prioridad; el otro estereoisómero se denomina E (*entgegen* = opuesto) o Anti.

Un “excipiente farmacéuticamente aceptable” significa un excipiente que es útil para la preparación de una composición farmacéutica que, en general, es segura, no tóxica y que no es indeseable biológicamente ni de otra manera, e incluye un excipiente que es aceptable para un uso veterinario, o para un uso farmacéutico humano. Un “excipiente farmacéuticamente aceptable”, tal como se usa en la presente solicitud, incluye tanto uno como más de uno de estos excipientes.

ES 2 325 495 T3

“Tratar” o “tratamiento” de un estado, trastorno o afección incluye:

- (1) prevenir o retrasar la aparición de al menos uno de los síntomas clínicos del estado, trastorno o afección que se está desarrollando en un mamífero que puede sufrir, o está predisposto al estado, trastorno o afección, pero que aún no experimenta o muestra síntomas clínicos o subclínicos del estado, trastorno o afección,
- 5 (2) inhibir el estado, trastorno o afección, es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad, o al menos uno de sus síntomas clínicos o subclínicos,
- 10 (3) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión del estado, trastorno o afección, o al menos uno de sus síntomas clínicos o subclínicos.

El efecto beneficioso en un sujeto que se va a tratar es estadísticamente significativo o al menos perceptible para el paciente o el médico.

15 Una “cantidad terapéuticamente eficaz” es la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un mamífero para tratar un estado, trastorno o afección, es suficiente para hacer eficaz ese tratamiento (como se indica en la definición de la palabra). La “cantidad terapéuticamente eficaz” variará dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad, y la edad, peso, condición física y respuesta del mamífero que se va a tratar.

20 Los síntomas clásicos de la inflamación aguda son enrojecimiento, temperatura elevada, hinchazón y dolor en la zona afectada, y pérdida de la función del órgano afectado.

Los síntomas y signos de inflamación asociados con afecciones específicas incluyen:

- 25 • artritis reumatoide- dolor, hinchazón, calor y palpación dolorosa de las articulaciones implicadas; rigidez matutina y generalizada;
- 30 • diabetes mellitus dependiente de la insulina- insulitis; esta afección puede conducir a una variedad de complicaciones con un componente inflamatorio, incluyendo: retinopatía, neuropatía, nefropatía; enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad vascular periférica, y enfermedad cerebrovascular;
- 35 • tiroiditis autoinmunitaria- debilidad, estreñimiento, respiración entrecortada, abotargamiento de cara, manos y pies, edema periférico, bradicardia;
- 40 • esclerosis múltiple- espasticidad, visión borrosa, vértigo, debilidad de las extremidades, parestesias;
- 45 • uveorretinitis- visión nocturna disminuida, pérdida de visión periférica;
- 50 • lupus eritematoso- dolor en las articulaciones, sarpullidos, fotosensibilidad, fiebre, dolor muscular, abotargamiento de las manos y pies, urinalisis anormal (hematuria, cilindruria, proteinuria), glomerulonefritis, disfunción cognitiva, trombosis de los vasos sanguíneos, pericarditis;
- 55 • esclerodermia- enfermedad de Raynaud; hinchazón de manos, brazos, piernas y cara; engrosamiento de la piel; dolor, hinchazón y rigidez de dedos y rodillas, disfunción gastrointestinal, enfermedad pulmonar restrictiva; pericarditis; insuficiencia renal;
- 60 • otras afecciones artríticas que tienen un componente inflamatorio tales como espondilitis reumatoide, osteoartritis, artritis séptica y poliartritis- fiebre, dolor, hinchazón, palpación dolorosa;
- 65 • otros trastornos inflamatorios del cerebro, tales como meningitis, enfermedad de Alzheimer, complejo demencia-SIDA encefalitis- fotofobia, disfunción cognitiva, pérdida de memoria;
- 70 • otras inflamaciones inflamatorias de los ojos, tales como retinitis- agudeza visual disminuida;
- 75 • trastornos inflamatorios de la piel, tales como eczema, otras dermatitis (por ejemplo, atópica, de contacto), psoriasis, quemaduras inducidas por la radiación UV (rayos solares y fuentes similares de radiación UV)- eritema, dolor, descamación, hinchazón, palpación dolorosa;
- 80 • enfermedades inflamatorias de los intestinos, tales como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa- dolor, diarrea, estreñimiento, sangrado rectal, fiebre, artritis;
- 85 • asma- respiración entrecortada, respiración sibilante;
- 90 • otros trastornos alérgicos, tales como la rinitis alérgica- estornudos, picazón, goteo nasal;
- 95 • afecciones asociadas con trauma agudo tales como lesión cerebral después de un ataque cerebral- pérdida sensorial, pérdida de la función motora, pérdida cognitiva;

ES 2 325 495 T3

- lesión del tejido cardíaco debida a isquemia miocardial- dolor, respiración entrecortada;
- lesión pulmonar tal como la que ocurre en el síndrome disneico del adulto- respiración entrecortada, hiper-ventilación, oxigenación disminuida, infiltraciones pulmonares;
- infecciones que acompañan a la inflamación, tales como sepsis, choque séptico, síndrome de choque tóxico-fiebre, insuficiencia respiratoria, taquicardia, hipotensión, leucocitosis;
- otras afecciones inflamatorias asociadas con órganos o tejidos particulares, tales como nefritis (por ejemplo, glomerulonefritis)-oliguria, urinalisis anormal;
- apéndice inflamado- fiebre, dolor, palpación dolorosa, leucocitosis;

gota- dolor, palpación dolorosa, hinchazón y eritema de la articulación implicada, concentración elevada de ácido úrico en el suero y/o en la orina;

vesícula biliar inflamada- dolor y palpación dolorosa abdominal, fiebre, náuseas, leucocitosis;

enfermedad pulmonar obstructiva crónica- respiración entrecortada, respiración sibilante;

insuficiencia cardíaca congestiva- respiración entrecortada, estertores, edema periférico;

diabetes tipo II - complicaciones en los órganos periféricos incluyendo la enfermedad cardiovascular, ocular, renal y vascular periférica;

fibrosis pulmonar- hiperventilación, respiración entrecortada, oxigenación disminuida;

enfermedad vascular, tal como aterosclerosis y restenosis- dolor, pérdida de sensibilidad, pulso disminuido, pérdida de función

y aloinmunidad que conduce al rechazo de transplantes- dolor, palpación dolorosa, fiebre.

Los síntomas subclínicos incluyen sin limitación marcadores de diagnóstico para la inflamación, cuya aparición puede preceder a la manifestación de síntomas clínicos. Una clase de síntomas subclínicos es la de los síntomas inmunológicos, tales como la invasión o acumulación en un órgano o tejido de células linfoides proinflamatorias o la presencia local o periférica de células linfoides proinflamatorias activadas que reconocen a un patógeno o un antígeno específico para ese órgano o tejido. La activación de células linfoides puede medirse por métodos conocidos en la técnica.

“Entregar” una cantidad terapéuticamente eficaz de un ingrediente activo a una localización particular dentro de un huésped significa provocar una concentración terapéuticamente eficaz del ingrediente activo en la sangre en la localización particular. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante administración local o sistémica del ingrediente activo al huésped.

Preferiblemente, en los compuestos representados por la Fórmula II,

Z y W juntos son $-N(R_N)C(O)-$, $-C(O)N(R_N)-$, $>C-NR_sR_t$, $-C(O)-$, $>C=N-R_M$, $-CH_2NR_N-$ o $-NR_NCH_2-$, lo más preferiblemente, $-NCH_2CH_2-$, $-NHCH_2-$, $-CH_2NH-$, $-C(O)NH-$, $-NHCO-$,

R_s, R_t es metilo o H;

R_M es OH o metoxi;

X es O;

R_N es H, metilo, o $-C(=X)-NR_tR_s$;

A es H o metilo

U, Y son H, F, metilo o hidroximetilo;

R¹ es hidroxi, $-O-S^2$, o =O

R² es H, hidroxi o metoxi;

R³ es OH, metoxi o un grupo que forma un puente carbamato cíclico con W o Z;

R⁴ es metilo;

ES 2 325 495 T3

⁵ R⁵ es H, OH, metoxi o un grupo que forma un puente carbonato o carbamato cíclico con R³;

El enlace es a través del nitrógeno de Z en las posiciones N/9a o N/8a o a través del carbono de R¹² o a través del oxígeno de R¹¹ ambos en la posición C/4" del azúcar S².

⁵ R⁶ es H, metilo o etilo;

R⁸ es H o; o N(CH₃)₂, NH(CH₃) o N(CH₃)CH₂CH₃,

¹⁰ R⁹ es H

El sitio de enlace está preferiblemente en la posición C/3; o a través del grupo amino en la posición C/3' del azúcar S¹ o en la posición C/11 o en W o Z, o a través de la posición C/4" del azúcar S².

¹⁵ También se prefieren los compuestos de Fórmula I en donde M es de Fórmula II y (i) Z es NCH₃, W es CH₂, R² es hidroxi; o (ii) Z es NH, W es =CO, y R² es metoxi. (Los compuestos descritos en este párrafo pueden, o no, satisfacer las anteriores preferencias restantes en la sección inmediatamente preferente, aunque preferiblemente lo hacen..)

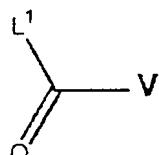
²⁰ Generalmente, los compuestos de Fórmula I se pueden obtener de la siguiente manera: primero se une un extremo de la cadena al macrólido, y después se une el otro extremo de la cadena a V; o, primero se une un extremo de la cadena a V y después se une el otro extremo de la cadena al macrólido, o finalmente, se une un resto de la cadena al macrólido, mientras que el otro resto de la cadena se une a V, siendo después unidos químicamente los extremos de las partes de la cadena para formar la cadena L.

²⁵ Los expertos en la técnica apreciarán que puede ser deseable usar derivados protegidos de intermedios usados en la preparación de los compuestos de Fórmula I. La protección y desprotección de grupos funcionales se puede realizar por métodos conocidos en la técnica. Los grupos hidroxilo o amino se pueden proteger con cualquier grupo protector de hidroxi o amino, por ejemplo como se describe en Green, T. W.; Wuts, P. G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley and Sons, New York, 1999. Véase también la discusión de grupos protectores en relación con la Fórmula I anterior. Los grupos protectores de amino se pueden separar por técnicas convencionales. Por ejemplo, los grupos acidilo, tales como los grupos alcanofilo, alcoxcarbonilo y arofilo, se pueden separar por solvólisis, p. ej., por hidrólisis en condiciones ácidas o básicas. Los grupos arilmethoxcarbonilo (por ejemplo, benciloxicarbonilo) pueden escindirse por hidrogenólisis en presencia de un catalizador tal como paladio sobre carbón vegetal.

³⁵ Más concretamente, los compuestos de Fórmula I se pueden preparar por los siguientes procedimientos:

a) Los compuestos de Fórmula I, en donde X² es -NHC(O)-, se pueden preparar haciendo reaccionar un compuesto de Fórmula VI:

⁴⁰

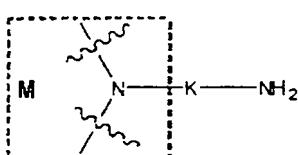


⁴⁵

VI

en donde L¹ representa un grupo saliente (tal como hidroxi), y un grupo amino libre de un macrólido representado por la Fórmula VIIa:

⁵⁵



VIIa

⁶⁰

en donde K es la porción de la molécula enlazadora L unida a la subunidad de macrólido.

ES 2 325 495 T3

En general, la reacción se efectúa con derivados ácidos que tienen la capacidad de activar el grupo ácido carboxílico tal como halogenuros, anhídridos mixtos y especialmente carbodiimidas tales como (3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) y benzotriazoles. La reacción transcurre en presencia de una base, tal como una base orgánica (p. ej., trietilamina), a temperatura ambiente en una atmósfera inerte, tal como argón o nitrógeno. La reacción puede 5 necesitar varias horas o días para llegar al final.

Por ejemplo, cuando L es $-K-NH_2$ el compuesto de Fórmula I puede formarse modificando un grupo $>NH$ del anillo del macrólido para dar un grupo $>N-K-NH_2$ y haciendo reaccionar el macrólido modificado con un compuesto de Fórmula VI como se indica abajo.

10

15

20

25

Por ejemplo este proceso se puede realizar cuando el grupo $>NH$ en la subunidad macrólida de Fórmula II está unida a la posición C/3' o N/9a.

30 Los compuestos representados por la Fórmula VI son obtenibles en el mercado o se pueden obtener a partir de la subunidad V por métodos conocidos en la técnica que incluyen una.

35 La preparación del macrólido de partida de Fórmula VIIa se ha descrito en el documento WO02/055531. Véase también la Patente de EE.UU. n.º 4,474,768 y Bright, G. M. et al, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1029-1047.

b) Los compuestos representados por la Fórmula I, donde X^2 es $-OC(O)-$, se pueden formar haciendo reaccionar un compuesto de Fórmula VI:

40 y el grupo hidroxilo libre de un macrólido representado por la Fórmula VIIb:

45

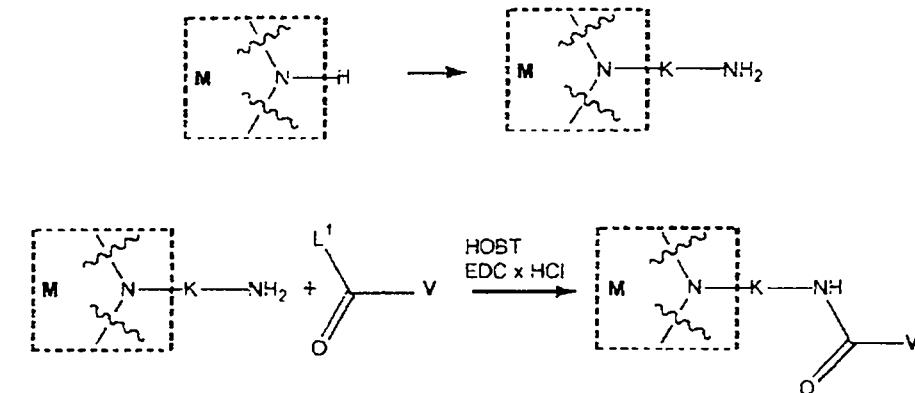
50

Generalmente, la reacción se realiza con derivados de ácido que tienen la propiedad de activar el grupo ácido carboxílico, tales como halogenuros (tal como dicloruro de etileno-EDC), anhídridos mixtos, especialmente carbodiimida. La reacción se realiza típicamente a temperatura ambiente en una atmósfera inerte, tal como argón o nitrógeno. La reacción puede necesitar varias horas o días para llegar al final.

55 Por ejemplo, cuando el enlazador L es $-K-O-$, el compuesto de Fórmula I puede formarse (1) modificando un grupo $>NH$ sobre un macrólido para dar un grupo $>N-K-OH$ y (2) haciendo reaccionar el macrólido modificado con un compuesto representado por la Fórmula VI como se indica abajo.

60

65



ES 2 325 495 T3

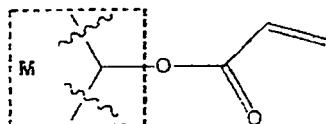
El grupo de enlace -K-OH puede unirse al átomo de nitrógeno secundario del macrólido como sigue. El macrólido se hace reaccionar con un derivado de alquenoílo tal como $\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_{m-2}\text{C}(\text{O})\text{O}$ -alquilo (p. ej., acrilato de metilo). Después se reduce el grupo éster (es decir, -C(O)O-alquilo), tal como con un hidruro metálico (p. ej., LiAlH_4) en un disolvente orgánico anhidro, para dar el macrólido que tiene el grupo de enlace -K-OH (es decir, M-K-OH). La reducción se realiza típicamente a baja temperatura y preferiblemente a 0°C o menos.

Por ejemplo, este proceso también se puede realizar cuando el grupo >NH está unido a la posición C/3' o N/9a de las subunidades macrólidas representadas por la Fórmula II.

10 El macrólido de partida de Fórmula VIIb es un compuesto conocido o se puede obtener de acuerdo con los procedimientos descritos para compuestos análogos, tales como los descritos en Costa, A. M. et al. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 3371-3375.

15 c) Los compuestos representados por la Fórmula I, en donde X^1 es -OC(O)-, Q es -NH- y X^2 es -NHC(O)-, pueden prepararse haciendo reaccionar un macrólido representado por la Fórmula VIIc:

20



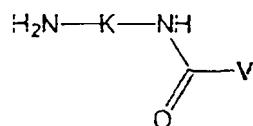
25

VIIc

30

y un compuesto representado por la Fórmula VIb:

35



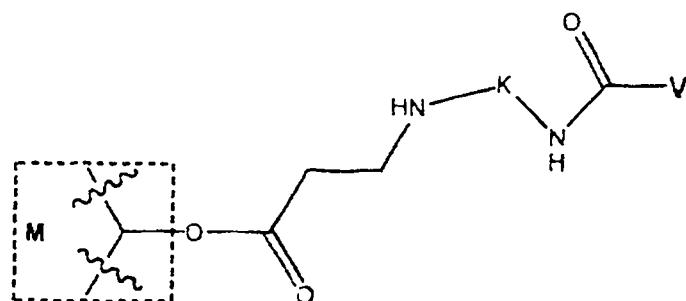
40

VIb

45

para dar

50



55

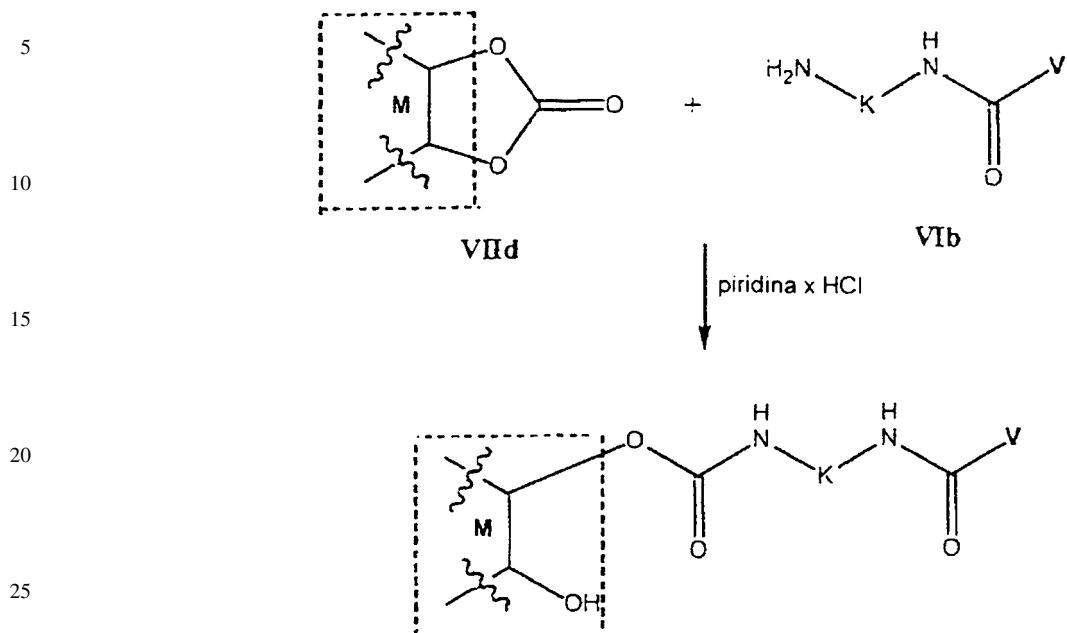
60 Por ejemplo este proceso se puede realizar cuando el grupo OH está unido en la posición C/6 o C/4" de la subunidad macrólida representada por la Fórmula II.

65 El macrólido representado por la Fórmula VIIc puede formarse por reacción del correspondiente cloruro de halógenoalcanoílo en el grupo OH libre del macrólido.

El compuesto representado por la Fórmula VIb se puede formar haciendo reaccionar una amina apropiada (que tiene el grupo de enlace -K-NH₂) con un compuesto de Fórmula VI.

ES 2 325 495 T3

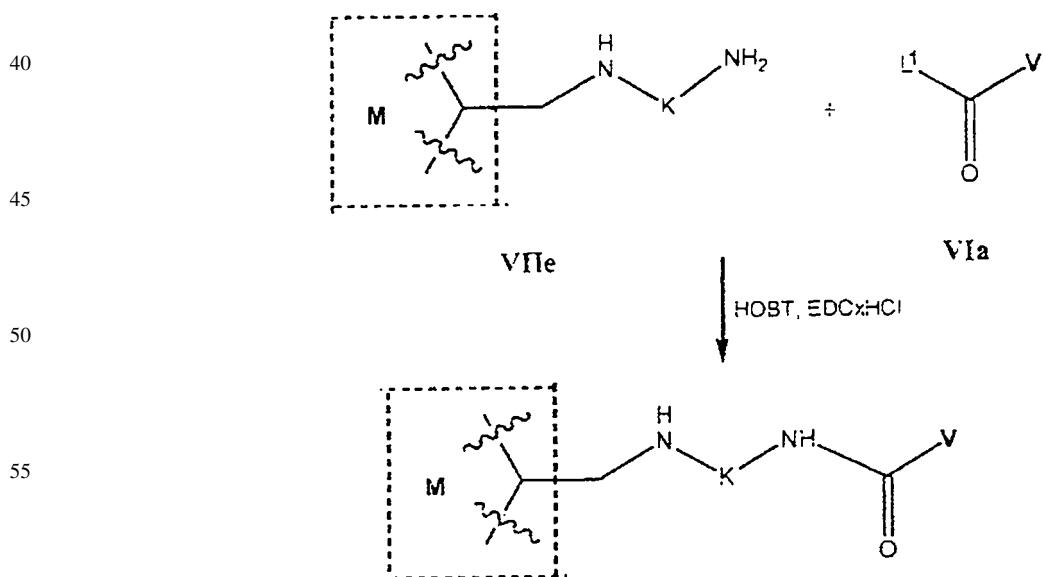
d) Los compuestos de Fórmula I, donde X^1 es $-OC(O)NH-$ y X^2 es $-NHC(O)-$, pueden prepararse haciendo reaccionar un macrólido representado por la Fórmula VIId y un compuesto de Fórmula VIb como se indica abajo.



Este proceso se puede realizar cuando los dos grupos OH libres están unidos, por ejemplo, en las posiciones C/11 y C/12 de la subunidad macrólida representada por la Fórmula II.

El macrólido reaccionante representado por la Fórmula VIId puede formarse por reacción del carbonato de etilo sobre la subunidad macrólida que tiene los dos sustituyentes hidroxi vecinales;

35 e) Los compuestos representados por la Fórmula I, donde X^1 es $-\text{CH}_2-$, Q es $-\text{NH}-$ y X^2 es $-\text{NHC(O)}-$, pueden prepararse haciendo reaccionar un macrólido representado por la Fórmula VIIe y un compuesto de Fórmula VIa como se indica abajo.

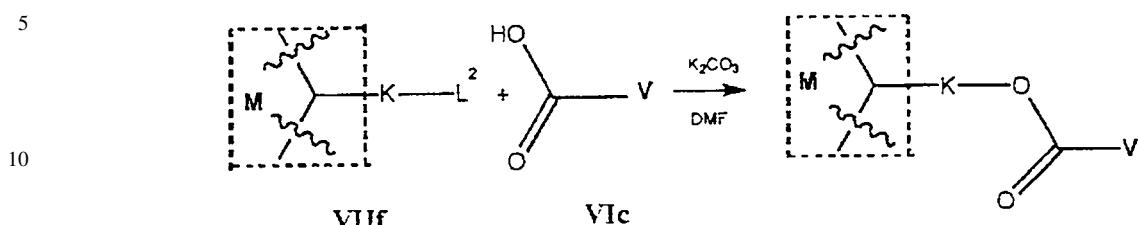


Por ejemplo este proceso se puede realizar cuando el grupo OH está unido en la posición C/4" de la subunidad macrólida representada por la Fórmula II.

El macrólido reaccionante representado por la Fórmula VIIe puede formarse por oxidación del correspondiente
 65 macrólido que tiene un grupo hidroxi para obtener un sustituyente, ($\text{C}=\text{O}$), conversión en un grupo epoxi ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$), y escisión del grupo epoxi con un agente reaccionante apropiado (p. ej., etilendiamina).

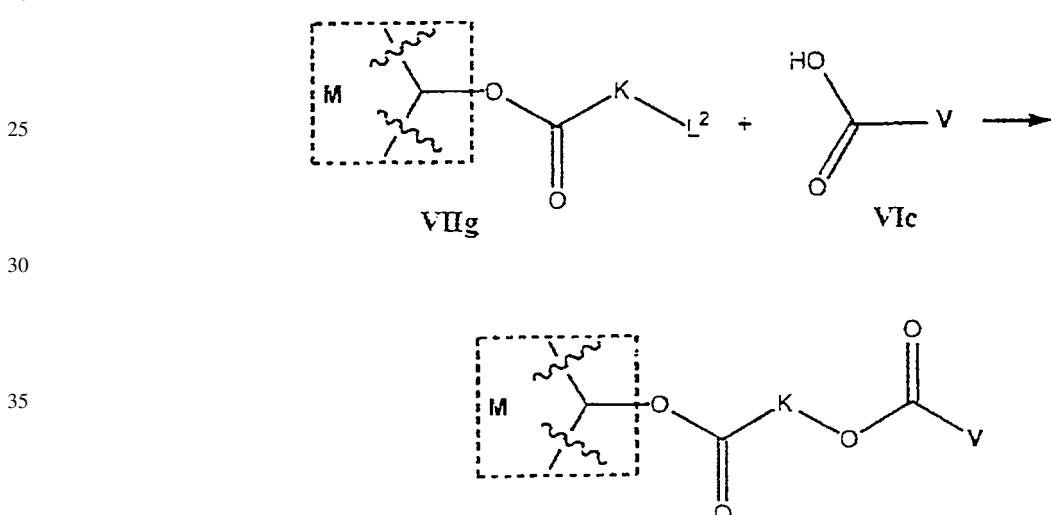
ES 2 325 495 T3

f) Los compuestos de Fórmula I pueden prepararse haciendo reaccionar un macrólido representado por la Fórmula VIIf que tiene un grupo saliente L² (tal como Br), y una subunidad V representada por la Fórmula VIc como se indica abajo.



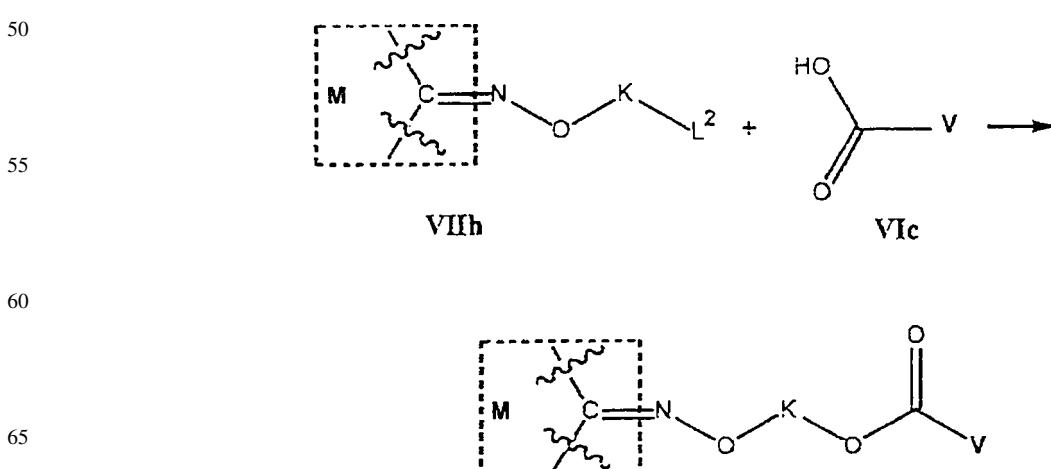
15 El macrólido de partida de Fórmula VIIf puede prepararse, por ejemplo, escindiendo el grupo azúcar unido en la posición C/3 de la subunidad macrólida representada por la Fórmula II y después haciendo reaccionar el macrólido con un reactivo de Fórmula L³-K-L², donde L² y L³ son grupos salientes.

g) Los compuestos de Fórmula I pueden prepararse haciendo reaccionar un macrólido representado por la Fórmula VIIg que tiene un grupo saliente L² (tal como Br), y una subunidad V de Fórmula VIc como se indica abajo.



El macrólido de partida de Fórmula VIIg puede prepararse por reacción de un macrólido que tiene un grupo OH libre, por ejemplo, en la posición C'2' de la subunidad macrólida representada por la Fórmula II, con un reactivo de fórmula $L^3-C(O)-K-L^2$, donde L^2 y L^3 son grupos salientes.

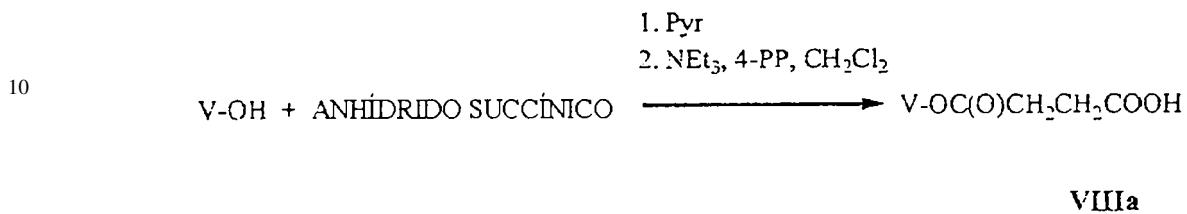
45 h) Los compuestos representados por la Fórmula I también pueden prepararse haciendo reaccionar un macrólido representado por la Fórmula VIIh que tiene un grupo saliente L² (tal como Br), y una subunidad V representada por la Fórmula VIc como se indica abajo.



ES 2 325 495 T3

i) Los compuestos representados por la Fórmula I también pueden prepararse haciendo reaccionar una subunidad V representada por la Fórmula VIIa preparada a partir de la subunidad V con un grupo hidroxilo libre (Huang C.M. et al. *Chem. & Biol.* **2000**, 7, 453-461; Hess S. et al. *Biorg. & Med. Chem.* **2001**, 9, 1279-1291) y un macrólido representado por la Fórmula VIIa como se indica abajo.

5



20 j) Los compuestos representados por la Fórmula I también pueden prepararse haciendo reaccionar una subunidad V representada por la Fórmula VIIIb (Pandori M. W. et al. *Chem. & Biol.* **2002**, 9, 567-573) o VIIIc preparada a partir de la subunidad V con un grupo amino libre (Hess S. et al. *Bioorg. & Med. Chem.* **2001**, 9, 1279-1291) y el macrólido representado por la Fórmula VIIa como se indica abajo.

35 O

40 V>NH $\xrightarrow[\text{yodoacetato de terc-butilo}]{\text{NaH, DMF}}$

45

50 V>NCH₂COOH

55 VIIIC

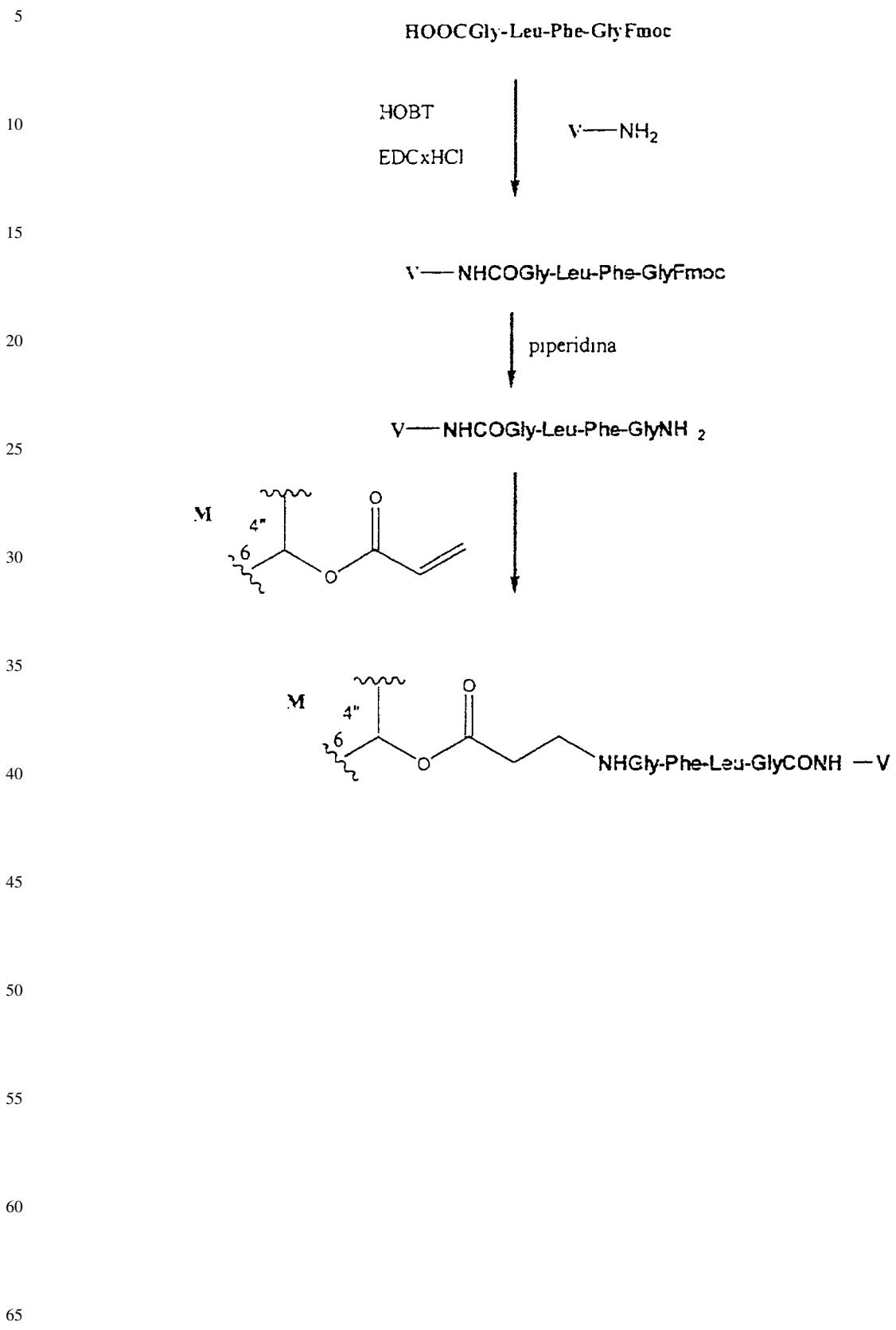
Los siguientes ejemplos ilustran la preparación del compuesto de Fórmula I y no limitan la invención de ningún modo.

60

65

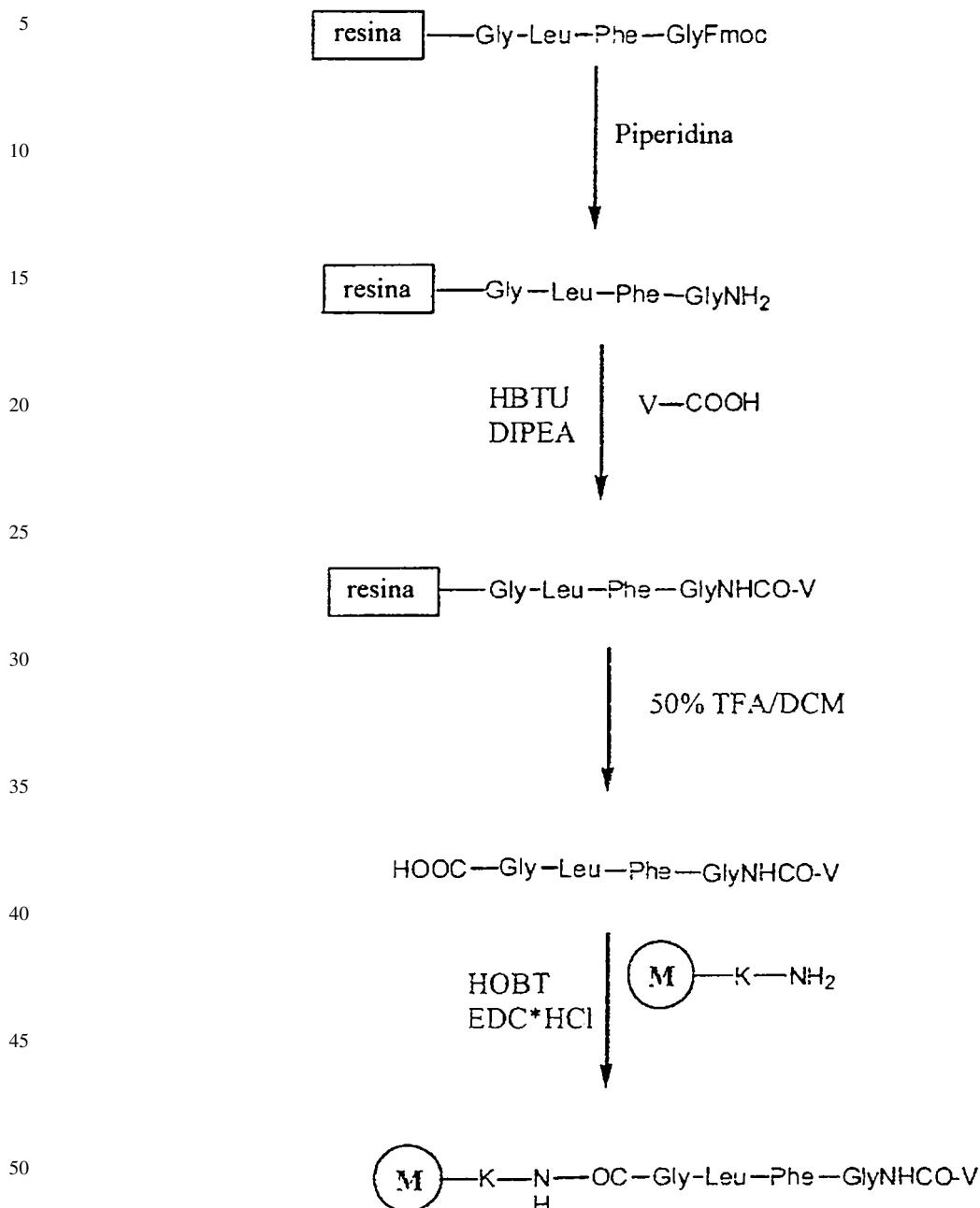
ES 2 325 495 T3

En el ejemplo siguiente, se ilustra una ruta de síntesis de un compuesto de Fórmula I (V es una subunidad antiinflamatoria esteroidea o no esteroidea con un grupo amino libre) cuando L es un enlazador peptídico:



ES 2 325 495 T3

En el ejemplo siguiente, se ilustra una ruta de síntesis para un compuesto de Fórmula I (V es una subunidad antiinflamatoria esteroidea o no esteroidea con un grupo carboxi libre) cuando L es un enlazador peptídico:



Las sales de los compuestos representados por la Fórmula I se pueden preparar aplicando procedimientos generalmente conocidos tales como, p. ej., una reacción de los compuestos de Fórmula I con una base o ácido correspondiente en un disolvente adecuado o mezcla de disolventes p. ej., éteres (éter dietílico) o alcoholes (etanol, propanol o *iso*-propanol).

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de compuestos de Fórmula I en el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones inflamatorias que se caracterizan por o están asociadas con una respuesta inmunitaria inflamatoria indeseable, especialmente todas las enfermedades y afecciones inducidas por o asociadas con una secreción excesiva de TNF- α e IL-1.

Puede determinarse una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la presente invención por métodos conocidos en la técnica. Ya que el compuesto de la presente invención se libera más eficientemente al sitio deseado que el correspondiente fármaco en solitario, se puede administrar una cantidad menor del compuesto en moles que del fármaco antiinflamatorio, obteniéndose sin embargo el mismo efecto terapéutico. Además, ya que, una vez interioriz-

ES 2 325 495 T3

zado por el tejido diana, el ingrediente activo de la presente invención dejará de estar en contacto con otros tejidos, se adelanta que su administración dará como resultado menos efectos secundarios, lo que permitirá aumentar la cantidad antiinflamatoria tolerable máxima. Así, la tabla siguiente sirve sólo como una guía. Una cantidad umbral terapéuticamente eficaz del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un solvato del mismo, o un profármaco del mismo generalmente es igual o menor que una cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco antiinflamatorio en moles. Las cantidades eficaces amplias y preferidas del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un solvato del mismo, o un profármaco del mismo se indican en la tabla siguiente.

	Cantidad de compuesto, sal del mismo farmacéuticamente aceptable, solvato del mismo o profármaco del mismo	
	mg/kg de peso corporal/día del fármaco (administrado en solitario)	μmol/kg de peso corporal/día del híbrido o del fármaco
Amplio	de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1000	de aproximadamente 0,004 a aproximadamente 4000
Preferido	de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100	de aproximadamente 0,04 a aproximadamente 400
Más preferido	de aproximadamente 1 a aproximadamente 100	de aproximadamente 4 a aproximadamente 400
El más preferido	de aproximadamente 3 a aproximadamente 30	de aproximadamente 12 a aproximadamente 120

Así, por ejemplo, el intervalo de dosificación preferido para indometacina es 50-200 mg/día, que corresponde al intervalo de 140 a 560 μmol por día. El mismo intervalo basado en moles, 140-560 mol de un compuesto híbrido de la invención, será el punto de partida para determinar el intervalo de dosificación preferido. Los refinamientos de esta estrategia son bien conocidos por el experto en la técnica.

Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen una dosis efectiva de compuestos de la presente invención así como a excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos o diluyentes.

La preparación de las composiciones farmacéuticas de la invención puede incluir mezclar, granular, comprimir y disolver los ingredientes. Los vehículos químicos pueden estar en forma sólida o líquida. Los vehículos sólidos pueden ser lactosa, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, estearato de magnesio, ácidos grasos sin limitación. Los vehículos líquidos pueden ser jarabes, aceites tales como aceites de semilla de girasol o soja, agua o solución salina fisiológica sin limitación. De modo similar, los vehículos también pueden contener un componente para una liberación controlada del componente activo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Se pueden preparar varias formas de composiciones farmacéuticas. Si se usa un vehículo sólido, estas formas pueden incluir comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas de gelatina dura, polvos o granulados, sin limitación, que pueden administrarse por vía oral. La cantidad del vehículo sólido puede variar, pero principalmente está en el intervalo de 25 mg a 1 g. Si se usa un vehículo líquido, la formulación puede estar en forma de un jarabe, una emulsión, cápsulas de gelatina dura o líquidos inyectables estériles, o suspensiones líquidas no acuosas.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse tópica o sistémicamente, p. ej., oral, parenteral, percutánea o mocosamente, p. ej., bucal, intranasal, intrarrectal e intravaginalmente. "Parenteralmente" significa por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Las correspondientes preparaciones de los compuestos de la presente invención pueden usarse en la profilaxis así como en el tratamiento terapéutico (prevención, retraso, inhibición o alivio) de varios trastornos (enfermedades y otros estados inflamatorios patológicos) que están causados o asociados con una respuesta inmunitaria inflamatoria anómala o indeseable (excesiva, no regulada, o disregulada) que implica la producción de citoquinas inflamatorias u otros mediadores de la inflamación, incluidos sin limitación TNF-α y IL-1β. Estos trastornos incluyen enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide, diabetes mellitus dependiente de la insulina, tiroiditis autoinmunitaria, esclerosis múltiple, uveorretinitis, lupus eritematoso, esclerodermia; otras condiciones artísticas que tienen un componente inflamatorio tales como espondilitis reumatoide, osteoartritis, artritis séptica y poliartritis; otros trastornos cerebrales inflamatorios, tales como la meningitis, la enfermedad de Alzheimer, la encefalitis asociada con la demencia del SIDA, otras inflamaciones inflamatorias de los ojos, tales como la retinitis; trastornos inflamatorios de la piel, tales como eczema, otras dermatitis (por ejemplo, atópica, de contacto), psoriasis, quemaduras inducidas por la radiación UV (rayos solares y fuentes similares de radiación UV); enfermedades inflamatorias de los intestinos, tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa; asma; otros trastornos

ES 2 325 495 T3

alérgicos, tales como la rinitis alérgica; afecciones asociadas con el trauma agudo tales como lesión cerebral tras la apoplejía, lesión del tejido cardiaco debido a isquemia miocardial, lesión pulmonar tal como la que se produce en el síndrome disneico del adulto; la inflamación que acompaña a la infección, tal como sepsis, choque séptico, síndrome de choque tóxico, otras condiciones inflamatorias asociadas con órganos o tejidos particulares, tales como nefritis (p. ej., glomerulonefritis), apéndice inflamado, gota, vesícula biliar inflamada, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia cardíaca congestiva, diabetes de tipo II, fibrosis pulmonar, enfermedad vascular, tal como aterosclerosis y restenosis; y aloinmunidad que conduce al rechazo de transplantes.

La actividad biológica de los compuestos de la presente invención se determinó en los siguientes experimentos *in vitro* e *in vivo*:

1. *Ensayo de unión al receptor humano de glucocorticoides*

Se clona el gen para la isoforma alfa del receptor humano de glucocorticoides (EMBL Acc. No. M10901) por una reacción en cadena de la polimerasa inversa. Se aísla el ARN total de linfocitos de sangre periférica humana siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen), se transcribe en ADNc con transcriptasa inversa AMV (Roche) a 50°C durante 45 minutos y el gen se multiplica mediante cebadores específicos

- 20 1) 5' ATATGGATCCCTGATGGACTCCAAAGAACATTAACTCC 3' y
2) 5' ATATCTCGAGGGCAGTCACTTTGATGAAACAGAAG 3'.

25 y pfx polimerasa (Invitrogen). Las condiciones para la PCR son: desnaturización a 94°C durante 30 segundos, reasociación de las bases a 55°C durante 30 segundos, 68°C durante 3 minutos, con un total de 36 ciclos; etapa final de extensión a 68°C durante 7 minutos. El producto de reacción obtenido se clona en el sitio XhoI/BamHI del plásmido Bluescript KS (Stratagene), se somete a secuenciación por el método fluorescente didexosi con los cebadores M13 y M13rev (Microsynth) y después se clona en el sitio XhoI/BamHI del plásmido pcDNA3.1 hygro(+) (Invitrogen Life Technologies). Se siembran 1x10⁵ células COS-1 en una placa de 12 pocillos (Falcon) en medio DMEM (Invitrogen Life Technologies) con 10% de FBS (Biowhitaker) y se cultivan hasta 70% de confluencia a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Se separa el medio y se añade 1 µg de ADN, 7 µl de reactivo PLUS y 2 µl de Lipofectamina (Life Technologies) en 500 µl DMEM a cada pocillo. Las células se incuban a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y después de 5 horas se añade el mismo volumen de 20% de FBS/DMEM. Después de 24 horas, se cambia el medio completamente. 48 horas después de la transfección, se añaden los compuestos de ensayo en diferentes concentraciones y [³H]dexametasona (Pharmacia) 24 nM en medio DMEM. Las células se incuban durante 90 minutos a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂, se lavan tres veces con tampón PBS (Sigma) enfriado a 4°C (pH = 7,4) y después se lisan en tampón Tris (pH = 8,0) (Sigma) con 0,2% de SDS (Sigma). Después de la adición de líquido de centelleo UltimaGold XR (Packard), se lee la radiactividad residual en un contador de centelleo-β Tricarb (Packard).

40 2. *Ensayo de inhibición de la proliferación de hibridoma 13 de células T de ratón como resultado de la inducción de apoptosis*

45 En una placa de 96 pocillos, se hacen triplicados de dilución de esteroide de ensayo en medio RPMI (Institute of Immunology, Zagreb) con 10% de FBS. A las soluciones de los compuestos, se añaden 20000 células por pocillo y se incuban durante una noche a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂, después se añade 1 µCi de [³H]timidina (Pharmacia) y la mezcla se incuba durante 3 horas más. Las células se recogen aplicando vacío sobre un filtro GF/C (Packard). A cada pocillo, se añaden 30 µl de líquido de centelleo Microscynt O (Packard) y se mide la radiactividad incorporada usando un contador de centelleo-β (Packard). La especificidad de la inducción de apoptosis por los glucocorticoides se demuestra por el antagonismo de la inhibición de la proliferación con mifepristona (Sigma).

55 3. *Modelo de eosinofilia pulmonar en ratones*

Cierto número de ratones Balb/C machos con un peso corporal de 20-25 g se distribuyen aleatoriamente en grupos y se sensibilizan con una inyección i.p. de ovalbúmina (OVA, Sigma) el día cero y el día catorce. El día veinte, los ratones se someten a un ensayo de provocación por aplicación i.n. (intranasal) de OVA (control positivo o grupos de ensayo) o PBS (control negativo). 48 horas después de la aplicación i.n. de OVA, los animales se anestesian y los pulmones se lavan con 1 mL de PBS. Las células se separan en una citocentrífugadora Cytospin 3 (Shandon). Las células se tiñen con Diff-Quick (Dade) y se determina el porcentaje de eosinófilos por recuento diferencial de al menos 100 células.

Se usan fluticasona y beclometasona como sustancias anti-inflamatorias patrón.

65 Los compuestos se administran diariamente i.n. o i.p. en diferentes dosis 2 días antes del ensayo de provocación y hasta la finalización del ensayo. Los compuestos se administran suspendidos ya sea en carboximetil celulosa o en solución de lactosa.

ES 2 325 495 T3

4. Modelo de supresión de corticosterona y reducción del tamaño del timo en ratas

Cierto número de ratas Wistar machos con un peso corporal entre 200 y 250 g se distribuyeron aleatoriamente. Los compuestos de ensayo y glucocorticoides estándar se aplican por vía s.c. una vez al día durante tres días. El tercer día, 5 las ratas se someten a estrés por frío (4°C, durante una hora), se anestesian con tiopenetal (Pliva Inc.) y se extrae sangre en heparina. Se extirpa el timo completo de cada animal y se pesa inmediatamente. Se aguarda el plasma a -70°C hasta que se ensaya. Se extrae corticosterona con cloroformo (5 mL) de 1 mL de plasma, o de diluciones estándar de corticosterona en PBS, los compuestos interferentes se lavan con NaOH 0,1 M y se añade ácido sulfúrico:H₂O:C₂H₅OH=8:2:1. Se mide la fluorescencia 60 minutos más tarde, la longitud de onda de excitación/emisión es 470/530.

10

5. Determinación *in vitro* de la secreción de TNF- α e IL-1 β en células mononucleares de sangre periférica humana

Se preparan células mononucleares de sangre periférica (PMBC) a partir de sangre completa heparinizada después 15 de la separación de PMBC en Ficoll-Hypaque (Amersham-Pharmacia). Para determinar el nivel de TNF- α , se cultivan 3,5-5x10⁴ células en un volumen total de 200 μ L en un intervalo de 18 a 24 horas en placas de fondo plano de microtítulo (96 pocillos, Falcon) en medio RPMI 1640 enriquecido con 10% de suero AB humano inactivado con calor (Croatian Centre For Transfusion Medicine, Zagreb), 100 unidades/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina y 20 mM de HEPES (Invitrogen Life Technologies). Las células se incuban a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 90% de 20 humedad. Las células de un control negativo se cultivan sólo en el medio (NC), mientras que la secreción de TNF- α en un control positivo fue estimulada por adición de 1 μ g/mL de lipopolisacárido (LPS, *E. coli* serotipo 0111:B4, SIGMA) (PC) y el efecto de las sustancias de ensayo sobre la secreción de TNF- α se ensaya después de su adición a 25 cultivos de células estimulados con LPS (TS). El nivel de TNF- α en el sobrenadante celular se determina por ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems). La sensibilidad del ensayo era de TNF- α <3 pg/ml. La determinación del nivel de IL-1 β se realiza como se describe para la determinación de TNF- α , sólo que se usan 25x10⁵ célula/pocillo y 0,1 ng/mL de LPS. El nivel de IL-1 β se determina por ELISA (R&D Systems). La inhibición porcentual de la producción de TNF- α o IL-1 β se calcula por la siguiente ecuación:

30

$$\% \text{ de inhibición} = [1-(\text{TS-NC})/(\text{PC-NC})] \times 100$$

35

El valor CI-50 se define como la concentración de la sustancia a la que se inhibe el 50% de la producción de TNF- α . Los compuestos que presentan valores de CI-50 en concentraciones de 20 μ M o menores se consideran activos. La CI-50 se calcula usando el programa de ordenador Graf Pad Prism.

6. Determinación de la secreción de TNF- α por células RAW 264.7

Las células se cultivan en 10% de suero bovino fetal (FBS) en medio DMEM (Invitrogen Life Technologies) a 37°C 40 en una atmósfera con 5% de CO₂ y 90% de humedad. Se cultivan 20000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos (Falcon). Las células en un control negativo se cultivan sólo en el medio (NC), mientras que la secreción de TNF- α en un control positivo fue estimulada por adición de 500 pg/mL de lipopolisacárido (LPS, *E. coli* serotipo 0111:B4, SIGMA) (PC) y el efecto de las sustancias de ensayo sobre la secreción de TNF- α se ensaya después de su adición a 45 cultivos de células estimulados con LPS (TS). El nivel de TNF- α en el sobrenadante celular se determina por ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Biosource). La inhibición procentual de la producción de TNF- α se calcula por la siguiente ecuación:

50

$$\% \text{ de inhibición} = [1-(\text{TS-NC})/(\text{PC-NC})] \times 100$$

El valor CI-50 se define como la concentración de la sustancia a la que se inhibe el 50% de la producción de TNF- α . Los compuestos que presentan valores de CI-50 en concentraciones de 10 μ M o menores se consideran activos.

55

7. Ensayo de inhibición de prostaglandina-H sintasa-1 humana (hPGH-1) y prostaglandina-H Sintasa-2 humana (hPGH-2)

Se amplifican genes que codifican hPGH-1 y hPGH-2 mediante PCR usando platino pfx ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies) obtenida de un banco de ADNc de placenta humana (Stratagene). Las secuencias de los 60 cebadores que se usan para hPGH-1 son:

65

5' ATATAAGCTTGCATGCCGGAGTCTTC 3' y

5' ATATGGATCCTCAGAGCTGTGGATGGTCGC 3';

ES 2 325 495 T3

para hPGH-2:

5' ATATAAGCTTGCTGCGATGCTGCCCGC 3' y
5' ATATGGATCCCTACAGTTCAGTCGAACGTTC 3'.

Los productos de la PCR se clonian en los sitios de restricción HindIII y BamHI del plásmido pcDNA3.1 Hygro(+) (Invitrogen Life Technologies), y las secuencias se confirman por secuenciación.

La transfección se realiza en células COS-7 (ATCC), las células se cultivan 10% de suero bovino fetal (FBS) en medio DMEM (Invitrogen Life Technologies), 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 90% de humedad, hasta confluencia completa en una placa de 24 pocillos (Falcon). Se combina 1 µg de ADN plasmídico (pcDNA Hygro 3.1 (+) que contiene el gen PGH-1 o PGH-2, o pcDNA Hygro 3.1 (+) para muestras que hacen de control negativo) con 1,5 µl Lipofectamina 2000 (Invitrogen Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del fabricante. 24-48 horas después de la transfección, se añaden los compuestos ensayados en DMEM se añaden a las células sin retirar el medio, y después de 40 minutos, se añade ácido araquidónico (Sigma) hasta una concentración final 20 µM. Después de 30 minutos, se retiran los sobrenadantes y se mide PGE-2 con un kit de ensayo de PGE-2 (Cayman) siguiendo las instrucciones del fabricante. No se detecta producción alguna de PGE-2 en el control negativo.

El % de inhibición se calcula por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = (1 - \text{concentración de PGE-2 en la muestra / concentración de PGE-2 en el control positivo}) * 100$$

8. *Modelo in vivo de secreción excesiva de TNF-α inducida por LPS en ratones*

Se induce secreción de TNF-α en ratones de acuerdo con el método descrito previamente (Badger A. M. *Et al., J. of Pharmac. and Env. Therap.* 279 **1996** 1453-1461). En el ensayo, se usan ratones BALB/c machos de 8 a 12 semanas de edad en grupos de 6 a 10 animales. Los animales se tratan p.o. o bien sólo con el disolvente (en un control negativo y un control positivo) o con soluciones de la sustancia 30 minutos antes del tratamiento i.p. con LPS (*E. coli* serotipo 0111:B4, Sigma) en una dosis de 25 µg/animal. Dos horas después se lleva a cabo la eutanasia a los animales mediante inyección i.p. de Roumpun (Bayer) y Ketanest (Park-Davis). Se extrae una muestra de ensayo de cada animal en un tubo "vacutainer" (Becton Dickinson) y se separa el plasma de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El nivel de TNF-α en el plasma se determina por ELISA (Biosource, R&D Systems) de acuerdo con la procedimiento prescripto por el fabricante. La sensibilidad del ensayo era de TNF-α <3 pg/ml. La inhibición procentual de la producción de TNF-α se calcula por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = [1 - (\text{TS-NC}) / (\text{PC-NC})] * 100$$

Los compuestos que presentan un 30% o más de inhibición de la producción de TNF-α a una dosis de 10 mg/kg se consideran activos.

9. *Ensayo de dolor agudo que produce contorsiones para determinar la actividad analgésica*

En este ensayo, se induce dolor agudo con una inyección de un irritante, normalmente ácido acético, en la cavidad peritoneal de ratones. Los animales responden contorsionándose de forma característica, lo que da nombre al ensayo (Collier H. O. J. *et al. Pharmac. Chemother.* **1968**, 32, 295-310; Fukawa K. *et al. J. Pharmacol. Meth.*, **1980**, 4, 251-259; Schweizer A. *et al. Agents Actions*, **1988**, 23, 29-31). El ensayo es adecuado para la determinación de la actividad analgésica de compuestos. Procedimiento: Se usan ratones BALB-/c machos (Charles River, Italia) de 8 a 12 semanas de vida. Se administra metilcelulosa p.o. a un grupo control, 30 minutos antes de la administración i.p. de ácido acético en una concentración de 0,6%, mientras que, a los grupos de ensayo, se administra una sustancia estándar (ácido acetilsalicílico) o sustancia de ensayo en metilcelulosa p.o. 30 minutos antes de la administración i.p. de 0,6% de ácido acético (volumen 0,1 mL/10 g). Los ratones se ponen individualmente en embudos de vidrio y se registra el número de contorsiones de cada animal durante un periodo de 20 minutos. La inhibición porcentual de contorsiones se calcula de acuerdo con la ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = (\text{valor medio del número de contorsiones en el grupo de control} - \text{número de contorsiones en el grupo de ensayo}) / \text{número de contorsiones en el grupo de control} * 100.$$

Los compuestos que presentan la misma actividad analgésica, o mejor, que el ácido acetilsalicílico se consideran activos.

ES 2 325 495 T3

10. *Modelo in vivo de choque inducido por LPS en ratones*

Se usan ratones BALB/c machos (Charles River, Italia) de 8 a 12 semanas de vida. LPS aislado de *Serratia marcescens* (Sigma, L-6136) se diluye en solución salina estéril. La primera inyección LPS se administra indradérmicamente a una dosis de 4 μg /ratón. 18 a 24 horas más tarde LPS se administra i.v. en una dosis de 200 μg /ratón. A un grupo control, se administran dos inyecciones de LPS de la manera descrita anteriormente. Los grupos de ensayo reciben las sustancias p.o. media hora antes de cada administración de LPS. Se observa la supervivencia después de 24 horas.

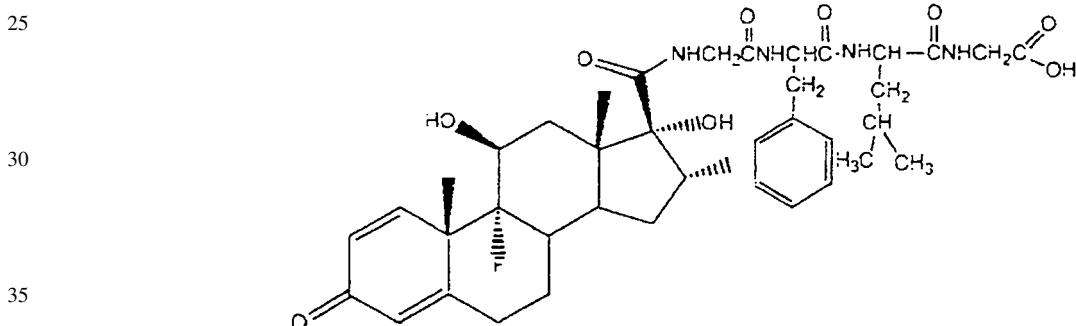
Los compuestos que producen como resultado una supervivencia de 40% o mejor a una dosis de 30 mg/kg se consideran activos.

Los compuestos se consideran activos si presentan un resultado estadísticamente significativo (por el ensayo de la t de Student, $p<0,05$) en al menos dos de los ensayos anteriores. Las cantidades molares de compuesto usado están por debajo de la cantidad umbral de macrólido (por encima de 30 μm) para ejercer un efecto antiinflamatorio suave como se indica en la bibliografía.

Métodos y ejemplos de síntesis

20 Preparación de intermedios

Intermedio A



Se puso resina de cloruro de 2-clorotritilo (1 eq = 0,5 mmol, 600 mg) en una columna de vidrio equipada con un filtro de tipo frita de vidrio grueso y se dejó expandir en DCM durante 10 min. Después la resina se filtró y se lavó tres veces con DCM. Después de lavarla con DMF la resina se cargó con N-R-Fmoc-glicina por adición de 2,0 mL de una solución 0,6 M del aminoácido en DMF y 0,630 ml de N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) y se mezcló. Después de 5 min se añadieron 0,315 ml de DIPEA. Después de mezclar durante 50 min se añadió una cantidad de 0,5 ml de metanol. Después de 10 min la resina se filtró y se lavó diez veces con DCM, DMF y metanol.

45

Desprotección

Se prepararon diferentes soluciones de piperidina en DMF y se vertieron sobre las perlas somo sigue:

- | | | |
|----|-----------------------|------------------|
| 50 | 5% de piperidina/DMF | 10 min (~ 10 ml) |
| | 30% de piperidina/DMF | 15 min (~ 10 ml) |
| 55 | 50% de piperidina/DMF | 30 min (~ 10 ml) |

Después de la desprotección la resina se lavó con DMF.

60 El segundo aminoácido, Fmoc-Leucina (1060 mg, 3 mmol) y hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) se disolvieron en 3 mL de DMF y, con 0,216 mL (5 mmol) de DIPEA, se añadieron rápida y simultáneamente a la mezcla de monómero/resina en el tubo de reacción.

65 Bloqueo terminal

Se preparó una solución de 10 eq (2,04 ml) de anhídrido acético y 10 eq (3,48 ml) de DIPEA en 5 ml de DMF. Se añadieron 2,5 ml de esta solución a la mezcla de reacción durante 5 min.

ES 2 325 495 T3

El segundo aminoácido se desprotegió con una solución de piperidina en DMF como sigue:

30% de piperidina/DMF 2 min (~ 10 ml)

5 30% de piperidina/DMF 2 min (~ 10 ml)

30% de piperidina/DMF 5 min (~ 10 ml)

10 30% de piperidina/DMF 5 min (~ 10 ml)

y se lavó con una gran cantidad de DMF.

Se repitió el mismo procedimiento de acoplamiento y desprotección para el tercer aminoácido

15 Fmoc-fenilalanina, 1162 mg, 3 mmol

HBTU, 1081 mg/3 ml DMF

20 DIPEA, 0,87 ml

y el cuarto aminoácido

25 Fmoc-glicina, 892 mg, 3 mmol

HBTU, 1081 mg /3 ml DMF

DIPEA, 0,87 ml

30 seguido de filtración y lavado con DMF.

A la mezcla de tetrapéptido/resina en el tubo de reacción, se añadió la mezcla de ácido dexametasónico (567 mg, 3 eq), HBTU (540 mg, 3,8 eq) y 0,435 ml de DIPEA en 3 ml de DMF, se mezcló y se dejó estar durante una noche.

35

Bloqueo terminal

Se añadió solución de 0,5 ml de anhídrido acético y 0,5 ml de DIPEA en 3 ml de DMF a la mezcla de reacción

40 durante 5 min, y luego se lavó con DCM, DMF y MeOH y se secó a vacío.

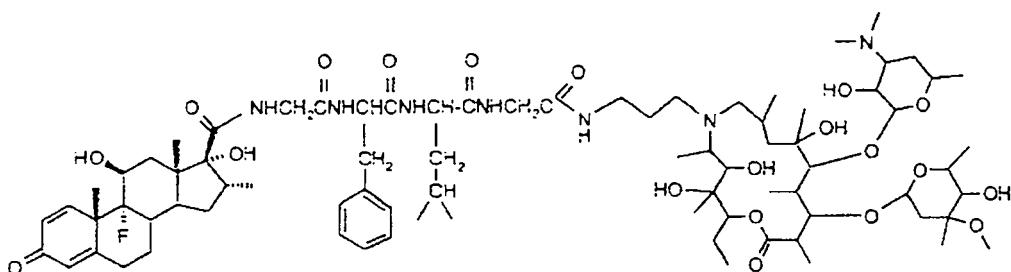
Escisión de la resina

45 Se vertieron 10 ml de una solución de ácido trifluoroacético al 50% en DCM encima de las perlas y se mezcló durante 15 min. Los reactivos se separaron por filtración y las perlas se lavaron 2 veces con DCM. Se repitió el mismo procedimiento con los siguientes 10 ml de ácido.

50 El disolvente recogido se evaporó separando el exceso de TFA por adición de una cantidad de éter dietílico. Se aislaron 60,1 mg de Intermedio A. MS (*m/z*): 753,3 [MH]⁺.

Ejemplo I

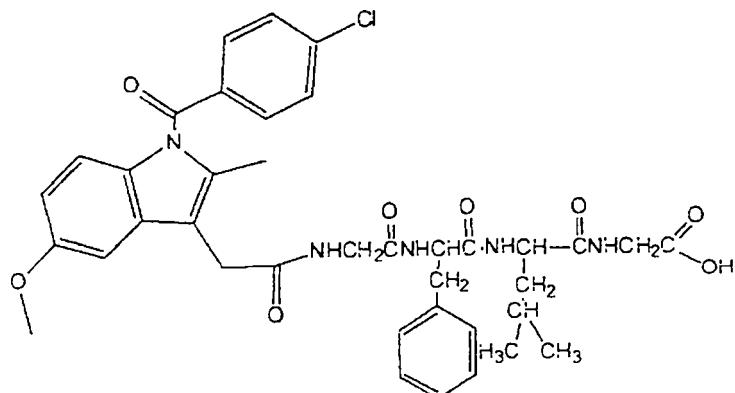
55 *Compuesto 1 (Dexametasona-Gly-Phe-Leu-Gly-Azitromicina)*



ES 2 325 495 T3

Se disolvió Intermedio A (57 mg; 0,076 mmole) en CH_2Cl_2 seco (5 mL) en una atmósfera inerte y se enfrió a 0°C. Se añadieron 0,115 mL de N,N-diisopropiletilamina y 20,5 mg de 1-hidroxibenzotriazol, seguidos de la adición del compuesto 9-desoxo-9a-aza-9a-(γ -aminopropil)-9a-homoeritromicina A (60 mg; 0,076 mmol) e hidrocloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (57,6 mg, 0,30 mmol). La mezcla de reacción se agitó en una corriente de argón a temperatura ambiente durante 24 horas y después se evaporó hasta un volumen más pequeño a presión reducida y se purificó en una columna de gel de sílice (eluente: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH} = 6:1:0,1$). Se obtuvieron 14 mg de compuesto 1; MS (m/z): 1527,3 [MH]⁺. IR(cm^{-1})/KBr: 3415, 2969, 2939, 2874, 1664, 1528, 1458, 1378, 1262, 1168, 1107, 1054, 1013, 959, 894, 803, 702.

10 **Intermedio B**



15 Se puso resina de cloruro de 2-clorotritilo (1 eq = 0,5 mmol, 600 mg) en una columna de vidrio equipada con un filtro de tipo frita de vidrio grueso y se dejó expandir en DCM durante 10 min. Después la resina se filtró y se lavó tres veces con DCM. Despues de lavarla con DMF la resina se cargó con N-R-Fmoc-glicina por adición de 2,0 mL de una solución 0,6 M del aminoácido en DMF y 0,630 ml de N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) y se mezcló. Despues de 5 min se añadieron 0,315 ml de DIPEA. Despues de mezclar durante 50 min se añadió una cantidad de 0,5 ml de metanol. Despues de 10 min la resina se filtró y se lavó diez veces con DCM, DMF y metanol.

35 **Desprotección**

Se prepararon diferentes soluciones de piperidina en DMF y se vertieron sobre las perlas somo sigue:

- | | |
|------------------------------|------------------|
| 40 5% de piperidina/DMF | 10 min (~ 10 ml) |
| 30% de piperidina/DMF | 15 min (~ 10 ml) |
| 50% de piperidina/DMF | 30 min (~ 10 ml) |

45 Despues de la desprotección la resina se lavó con DMF.

El segundo aminoácido, Fmoc-Leucina (1060 mg, 3 mmol), y hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) se disolvieron en 3 mL de DMF y, con 0,216 mL (5 mmol) de DIPEA, se añadieron rápidamente y simultáneamente a la mezcla de monómero/resina en el tubo de reacción.

Bloqueo terminal

55 Se preparó una solución de 10 eq (2,04 ml) de anhídrido acético y 10 eq (3,48 ml) de DIPEA en 5 ml de DMF. Se añadieron 2,5 ml de esta solución a la mezcla de reacción durante 5 min.

El segundo aminoácido se desprotegió con una solución de piperidina en DMF como sigue:

- | | |
|-------------------------------|-----------------|
| 60 30% de piperidina/DMF | 2 min (~ 10 ml) |
| 30% de piperidina/DMF | 2 min (~ 10 ml) |
| 30% de piperidina/DMF | 5 min (~ 10 ml) |
| 65 30% de piperidina/DMF | 5 min (~ 10 ml) |

y se lavó con una gran cantidad de DMF.

ES 2 325 495 T3

Se repitió el mismo procedimiento de acoplamiento y desprotección para el tercer aminoácido:

Fmoc-fenilalanina, 1162 mg, 3 mmol

5 HBTU, 1081 mg/3 ml DMF

DIPEA, 0,87 ml

y para el cuarto aminoácido:

10 Fmoc-glicina, 892 mg, 3 mmol

HBTU, 1081 mg /3 ml DMF

15 DIPEA, 0,87 ml

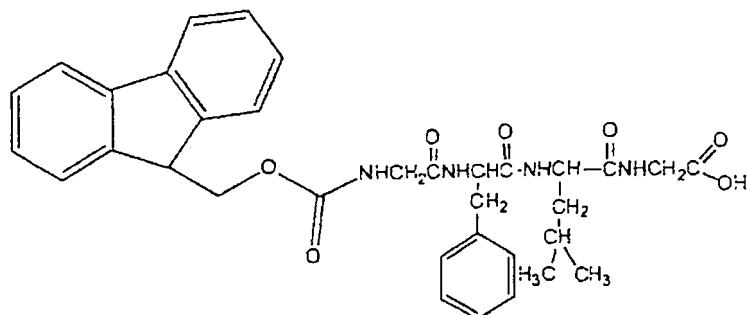
sólo después de acoplar el cuarto aminoácido es cuando se separó el grupo protector Fmoc.

20 Después de filtrar y lavar con DMF se separó el producto de la resina:

Se vertieron 10 ml de una solución de ácido trifluoroacético al 50% en DCM encima de las perlas y se mezcló durante 15 min. Los reactivos se separaron por filtración y las perlas se lavaron 2 veces con DCM. Se repitió el mismo procedimiento con los siguientes 10 ml de ácido.

25 El disolvente recogido se evaporó separando el exceso de TFA por adición de una cantidad de éter dietílico. Se aislaron 109,1 mg de Intermedio B1. MS (*m/z*): 715,6 [MH]⁺

30



35

40

Intermedio B1

45 Se puso resina de cloruro de 2-clorotritilo (1 eq = 0,352 mmol, 326 mg) en una columna de vidrio equipada con un filtro de tipo frita de vidrio grueso y se dejó expandir en DCM durante 10 min. Después la resina se filtró y se lavó tres veces con DCM. Después de lavar con DMF la resina se cargó con un compuesto Intermedio B1 por adición de 259 mg (0,422 mmol) disuelto en 2 ml de DMF y 0,150 ml de N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) y se mezcló. Después de 5 min se añadieron 0,230 ml de DIPEA. Después de mezclar durante 50 min se añadió una cantidad de 0,355 ml de metanol. Después de 10 min la resina se filtró y se lavó diez veces con DCM, DMF y metanol.

50

Desprotección

55 Se prepararon diferentes soluciones de piperidina en DMF y se vertieron sobre las perlas somo sigue:

60 5% de piperidina/DMF 10 min (~ 10 ml)

30% de piperidina/DMF 15 min (~ 10 ml)

65 50% de piperidina/DMF 30 min (~ 10 ml)

Después de la desprotección la resina se lavó con DMF.

ES 2 325 495 T3

Se disolvieron 377 mg (1,055 mmol) de indometacina y 533 mg (1,41 mmol) de hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) en 3 mL de DMF y se añadieron rápida y simultáneamente con 0,602 mL (3,52 mmol) de DIPEA a la mezcla de polímero/resina en el tubo de reacción.

5

Bloqueo terminal

Se añadió una solución de 0,5 ml de anhídrido acético y 0,5 ml de DIPEA en 3 ml de DMF a la mezcla de reacción durante 5 min, se filtró y se lavó con DCM, DMF y MeOH.

10

Escisión de la resina

Se vertieron 10 ml de una solución de ácido trifluoroacético al 50% en DCM encima de las perlas y se mezcló 15 durante 15 min. Los reactivos se separaron por filtración y las perlas se lavaron 2 veces con DCM. Se repitió el mismo procedimiento con los siguientes 10 ml de ácido.

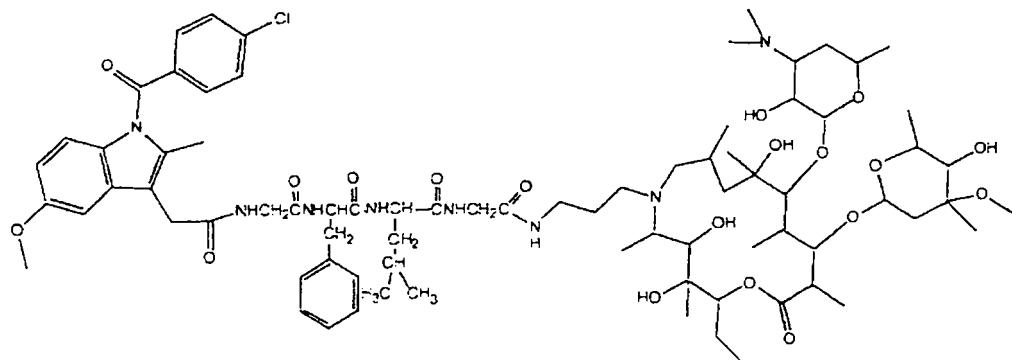
El disolvente recogido se evaporó separando el exceso de TFA por adición de una cantidad de éter dietílico. Se aislaron 210,8 mg de producto Intermedio B. MS (*m/z*): 732,66 [MH]⁺

20

Ejemplo II

Compuesto 2 (Indometacina-Gly-Phe-Leu-Gly-Azitromicina)

25



30
35
40
45
50
55
60
65

El Intermedio B (200 mg; 0,27 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ seco (5 mL) en una atmósfera inerte. Se añadieron 0,416 mL (2,14 mmol) de N,N-diisopropiletilamina y 74 mg (0,55 mmol) de 1-hidroxibenzotriazol, seguidos de la adición del compuesto 9-desoxo-9a-aza-9a-(γ -aminopropil)-9a-homoeritromicina A (216,6 mg; 0,27 mmol) e hidrocloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (188 mg, 1,09 mmol). La mezcla de reacción se agitó en una corriente de argón a temperatura ambiente durante 24 horas y después se evaporó hasta un volumen más pequeño a presión reducida y se purificó en una columna de gel de sílice (eluyente: CHCl₃:CH₃OH:NH₄OH = 6:1:0,1). Se obtuvieron 70 mg de compuesto 2; MS (*m/z*): 1505,8 [MH]⁺. IR(cm⁻¹)/KBr: 3654, 3633, 3425, 3084, 2970, 2936, 1720, 1652, 1637, 1545, 1439, 1368, 1309, 1230, 1179, 1111, 1089, 1055, 1013, 867, 803, 739, 700, 643.

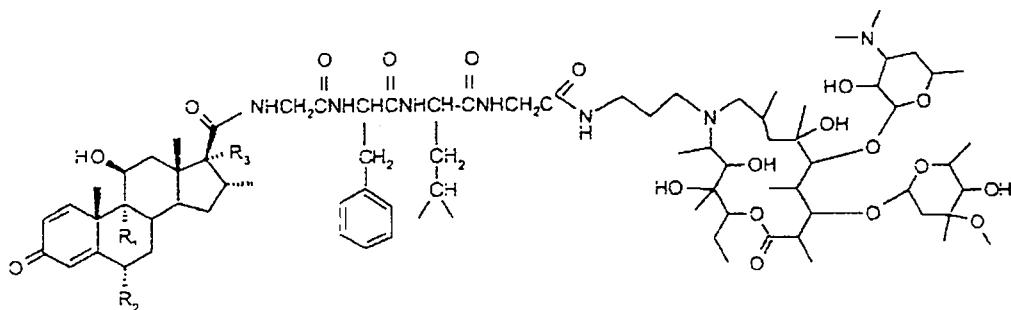
ES 2 325 495 T3

Ejemplo III

Siguiendo el procedimiento general del Ejemplo I y y utilizando los agentes reaccionantes apropiados se obtienen los siguientes compuestos:

5

10



15

20

Compuesto 3: $R_1=F; R_2=F; R_3=OH$

25

Compuesto 4: $R_1=F; R_2=H; R_3=H$

Compuesto 5: $R_1=F; R_2=F; R_3=H$

30

Compuesto 6: $R_1 = H; R_2=F; R_3=OH$

Ejemplo IV

Siguiendo el procedimiento general del Ejemplo II y utilizando los agentes reaccionantes apropiados se obtienen los siguientes compuestos:

35

V-Gly-Phe-Leu-Gly-M

40

45

50

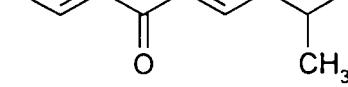
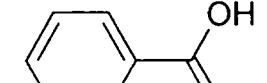
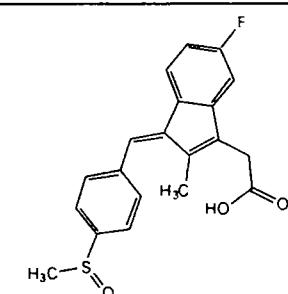
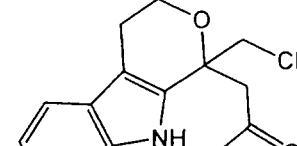
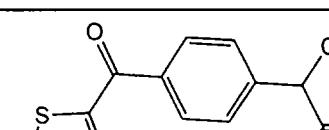
55

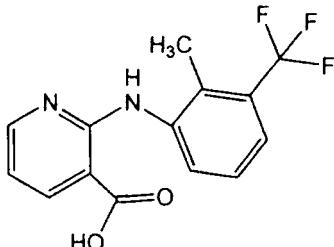
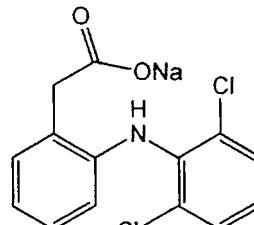
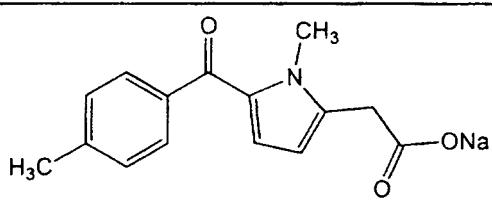
60

65

Compuesto	V
7	
8	
9	

ES 2 325 495 T3

Compuesto	V
10	
11	
12	
13	
14	
15	

Compuesto	V
16	
17	
18	

Abreviaturas

- 35 pyr: piridina
 NEt₃: trietilamina
 4-PP: 4-pirrolopiridina
 40 DMAP: 2,6-dimetilaminopiridina
 DIPEA: *N,N*-diisopropiletilamina
 DMF: dimetilformamida
 TFA: ácido trifluoroacético

50

55

60

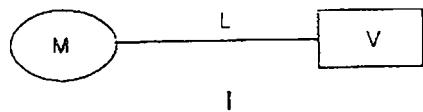
65

ES 2 325 495 T3

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula I:

5

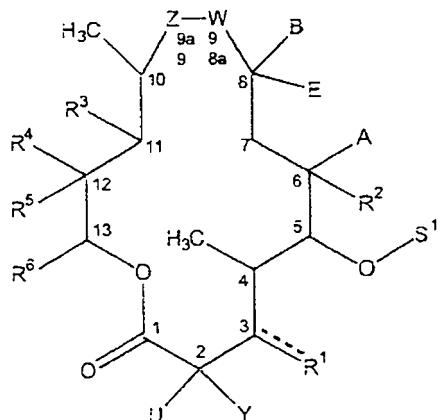


10

en la que

M representa una subunidad macrólido que posee la propiedad de acumularse en las células inflamatorias en donde
15 M representa un grupo de Fórmula II:

20



25

30

35 en donde:

(i) Z y W independientemente son: >C=O, >CH₂, >CH-NR_tR_s, >N-R_N o >C=N-R_M o un enlace en donde:

40

R_t y R_s independientemente son hidrógeno o alquilo;

45

R_M es hidroxi, alcoxi, alcoxi sustituido o OR^p;

R_N es hidrógeno, R^p, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, alcoxialquilo, o -C(X)-NR_tR_s; en donde X es =O o =S;

50

siempre que Z y W no puedan ser simultáneamente >C=O, >CH₂, >CH-NR_tR_s, >N-R_N o >C=N-R_M o un enlace,

55

(ii) U e Y independientemente son hidrógeno, halógeno, alquilo, o hidroxialquilo;

60

(iii) R¹ es hidroxi, OR^p, grupo -O-S² o un =O;

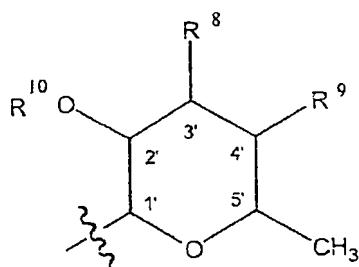
65

(iv) S¹ es un resto de azúcar de fórmula:

55

60

65



ES 2 325 495 T3

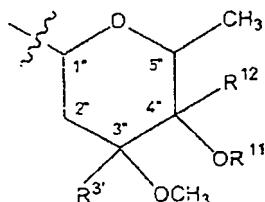
en donde

R⁸ y R⁹ son ambos hidrógeno o juntos forman un enlace, o R⁹ es hidrógeno y R⁸ es -N(CH₃)R^y, en donde

5 R^y es R^p, R^z o -C(O)R^z en donde R^z es hidrógeno o alquilo o alquenilo o alquinilo o cicloalquilo o arilo o heteroarilo o alquilo sustituido con alquilo C₂-C₇, alquenilo C₂-C₇, alquinilo C₂-C₇, arilo o heteroarilo

R¹⁰ es hidrógeno o R^p;

10 (v) S² es un resto de azúcar de fórmula:



en donde:

25 R^{3'} es hidrógeno o metilo;

R¹¹ es hidrógeno, R^p o O-R¹¹ es un grupo que con R¹² y con el átomo de carbono C/4" forma un grupo >C=O o epoxi;

30 R¹² es hidrógeno o un grupo que con el grupo O-R¹¹ y con el átomo de carbono C/4" forma un grupo >C=O o epoxi;

(vi) R² es hidrógeno, hidroxi, OR^p o alcoxi;

35 (vii) A es hidrógeno o metilo;

(viii) B es metilo or epoxi;

(ix) E es hidrógeno o halógeno;

40 (x) R³ es hidroxi, OR^p, alcoxi o R³ es un grupo que con R⁵ y con los átomos de carbono C/11 y C/12 forman un carbonato o carbamato cíclico; o si W o Z es >N-R_N, R³ es un grupo que con W o Z forma un carbamato cíclico;

45 (xi) R⁴ es alquilo C₁-C₄;

(xii) R⁵ es hidrógeno, hidroxi, OR^p, alcoxi C₁-C₄, o un grupo que con R³ y con los átomos de carbono C/11 y C/12 forma un carbonato o carbamato cíclico;

50 (xiii) R⁶ es hidrógeno o alquilo C₁-C₄;

en donde M tiene un sitio de enlace a través del cual se enlaza a V vía un grupo de enlace L; siempre que el sitio de enlace esté en uno o más de los siguientes:

55 a) cualquier grupo hidroxi, nitrógeno o epoxi reactivo situado en S¹, S², o un oxígeno de aglicona si S¹ o/y S² se separan por escisión;

b) un grupo reactivo >N-R_N o -NR_tR_s u =O localizado en Z o W;

60 c) un grupo hidroxi reactivo localizado en uno cualquiera de R¹, R², R³, y R⁵;

d) cualquier otro grupo que pueda modificarse primero para dar un grupo hidroxi o -NR_tR_s y R^p es hidroxilo o un grupo protector de amino;

65 V es una subunidad antiinflamatoria elegida del grupo que consiste en subunidad antiinflamatoria esteroidea y subunidad antiinflamatoria no esteroidea; y

ES 2 325 495 T3

L es una molécula enlazadora a la que se unen covalentemente cada uno de M y V, en donde L representa un enlazador polipeptídico elegido del grupo que consiste en:

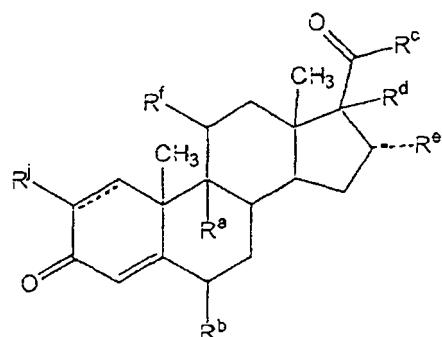
- Gly-Phe-Leu, Gly-Gly-Phe, Gly-Phe-Phe, Gly-Phe-Gly, Gly-Leu-Gly, Gly-Val-Ala, Gly-Phe-Ala, Gly-Leu-Phe,
 5 Gly-Leu-Ala, Ala-Val-Ala, Gly-Gly-Phe-Leu, Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Phe-Ala-Leu, Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Phe-Phe-Leu, Gly-Leu-Leu-Gly, Gly-Phe-Tyr-Ala, Gly-Phe-Gly-Phe, Ala-Gly-Val-Phe, y Gly-Phe-Phe-Gly;

y sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables y sus diastereoisómeros individuales.

10

2. Un compuesto según la reivindicación 1 en donde la subunidad antiinflamatoria V es una subunidad antiinflamatoria esteroidea representada por la Fórmula X:

15



20

25

30

X

en donde

35

R^a y R^b independientemente representan, hidrógeno o halógeno;

R^c es hidroxi, alcoxi, alquilo, tiocarbamoílo, carbamoílo o un enlace de valencia;

40

R^d y R^e independientemente representan: hidrógeno, hidroxi, metilo o alcoxi C₁-C₄ o cada uno es un grupo que forma un anillo de 1,3-dioxolano con el otro enlace o un enlace de valencia;

R^f es hidrógeno, hidroxi, cloro, o forma un grupo ceto con el átomo de carbono al que está unido;

45

R^j es hidrógeno o halógeno.

50

3. Un compuesto según la reivindicación 1 en donde la subunidad antiinflamatoria V es una subunidad antiinflamatoria no esteroidea obtenida a partir de los AINEs seleccionados de: por ejemplo, los AINE disponibles en el mercado aceclofenaco, acemetacina, acetaminofeno, acetaminosalol, ácido acetil-salicílico, ácido acetil-salicílico-2-amino-4-picolina, ácido 5-aminoacetilsalicílico, alclofenaco, aminoprofeno, amfenaco, ampirona, ampiroxican, anileridina, bendazaco, benoxaprofeno, bermoprofeno, α -bisabolol, bromfenaco, acetato del ácido 5-bromosalicílico, bromosaligenina, ácido buclóxico, butibufeno, carprofeno, celecoxib, cromoglicato, cinmetacina, clidanaco, clopiraco, diclofenaco sódico, diflunisal, ditazol, droxicam, ácido enfenámico, etodolaco, etofenamato, felbinac, fenbufeno, ácido fenclózico, fendosal, fenoprofeno, fentiazaco, fepradinol, flufenaco, ácido flufenámico, flunixina, flunoxaprofeno, flurbiprofeno, glutametacina, salicilato de glicol, ibufenaco, ibuprofeno, ibuproxam, indometacina, indoprofeno, isofezolaco, isoxepaco, isoxicam, cetoprofeno, cеторолако, lornoxicam, loxoprofeno, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, meloxicam, mesalamina, ácido metiazínico, mofezolaco, montelukast, nabumetona, naproxeno, ácido niflúmico, nimesulida, olsalazina, oxaceprol, oxaprozin, oxifenbutazona, paracetamol, parsalmida, perisoxal, salicilato de fenil-acetilo, fenilbutazona, fenilsalicilato, pirazolaco, piroxicam, pirprofeno, pranoprofeno, ácido protizínico, reserveratol, salacetamida, salicilamida, ácido salicilamida-O-acético, ácido salicilsulfúrico, salicina, salicilamida, sal-salato, sulindaco, suprofeno, succibutazona, tamoxifeno, tenoxicam, ácido tiaprofénico, tiaramida, ticlopridina, tinoridina, ácido tolfenámico, tolmetin, tropesin, xenbucin, ximoprofeno, zaltoprofeno, zomepiraco, tomoxiprol, zafirlukast y ciclosporina.

60

65

ES 2 325 495 T3

4. Un compuesto según la reivindicación 1 en donde Z y W juntos son:

-N(CH₃)-CH₂-; -NH-CH₂-; -CH₂-NH-; -C(O)-NH- o -NH-C(O)-;

5 A y B son metilo;

E es hidrógeno;

R² es hidroxi o metoxi;

10 S¹ representa desosamino azúcar en donde R⁸ se selecciona de: hidrógeno, metilo, amino, alquil C₁-C₆ amino o di (alquil C₁-C₆)amino;

15 R⁹ y R¹⁰ son hidrógeno;

15 R¹ es hidroxi o el grupo O-S² en donde S² representa un azúcar cladinosa en donde:

20 R¹¹ es hidrógeno, o O-R¹¹ es un grupo que con R¹² y con el átomo de carbono C/4" forma un grupo >C=O o epoxi; R¹² es hidrógeno o un grupo que con O-R¹¹ y con el átomo de carbono C/4" forma un grupo >C=O o epoxi;

20 R¹³ es metilo;

U es hidrógeno;

25 Y es metilo;

R⁶ es hidroxi, metilo o etilo;

30 R⁵ es hidrógeno, hidroxi, metoxi o un grupo que con R³ y con los átomos de carbono C/11 y C/12 forma un puente carbonato o carbamato cíclico;

R³ es hidroxi o un grupo que forma un puente carbamato cíclico con W o Z, o

35 R³ es un grupo que con R⁵ y con los átomos de carbono C/11 y C/12 forma un puente carbonato o carbamato cíclico;

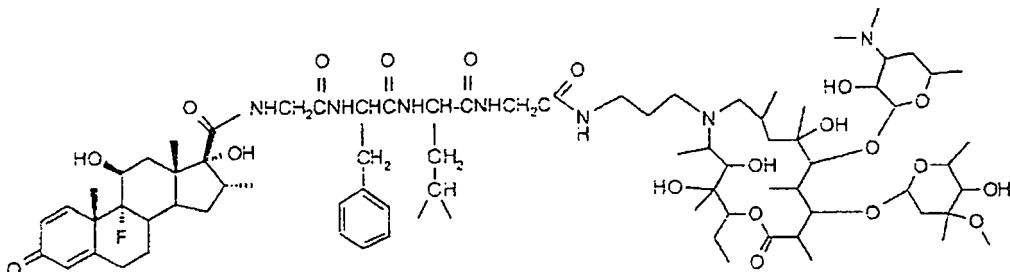
R⁴ es metilo;

40 siempre que el enlace sea a través del nitrógeno de Z en posición N/9a o a través del carbono de R¹² o a través del oxígeno de R¹¹ ambos en la posición C/4" del azúcar S².

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en donde:

45 la subunidad antiinflamatoria V es una subunidad antiinflamatoria no esteroidea derivada de un AINE seleccionado de: S-(+)-ibuprofeno, indometacina, flurbiprofeno, naproxeno, ketoprofeno, ácido acetilsalicílico, sulindaco, etodolaco, ketorolaco, suprofeno, flunixin, diclofenaco sódico y tolmetin sódico.

50 6. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:

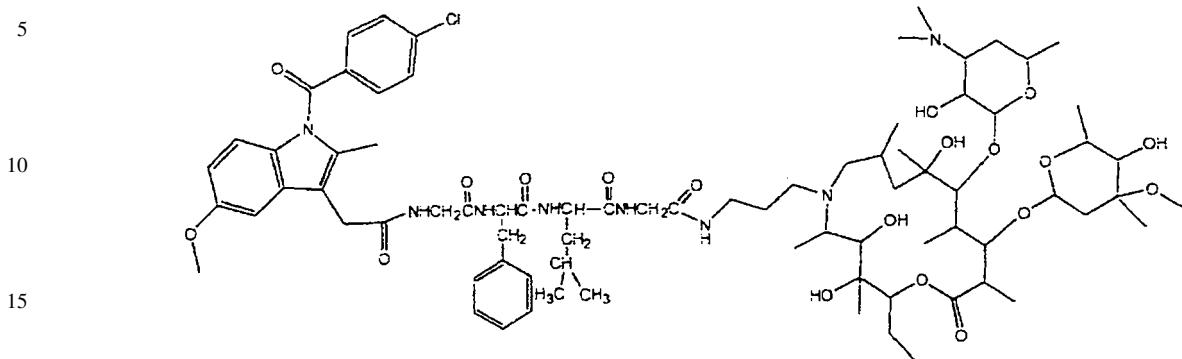


65

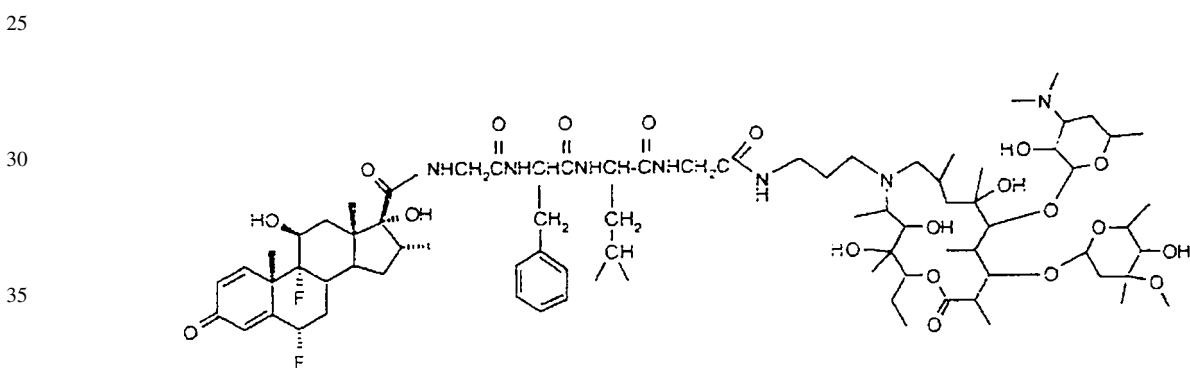
o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

ES 2 325 495 T3

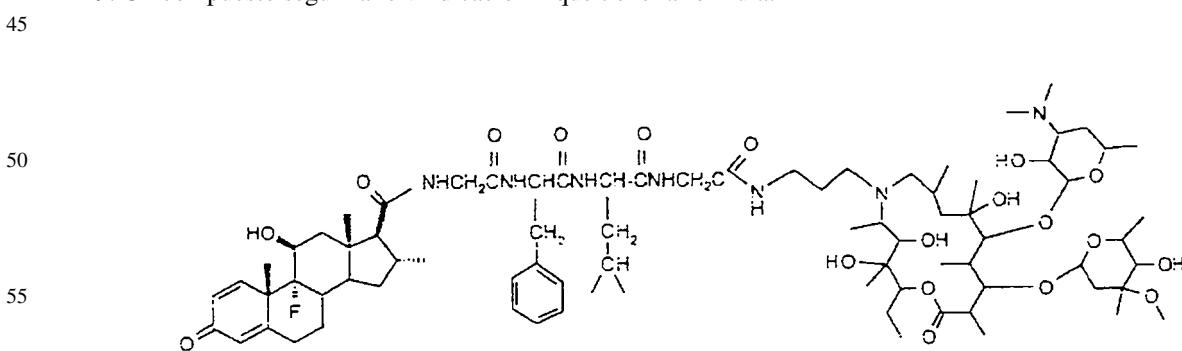
7. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



8. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:

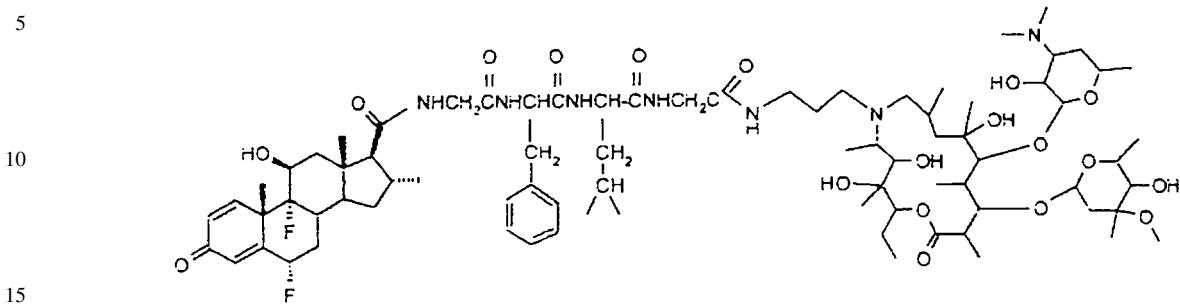


9. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



ES 2 325 495 T3

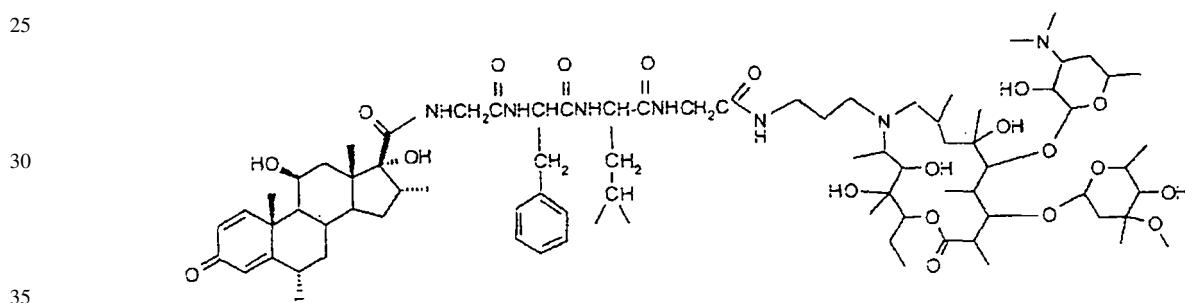
10. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

20

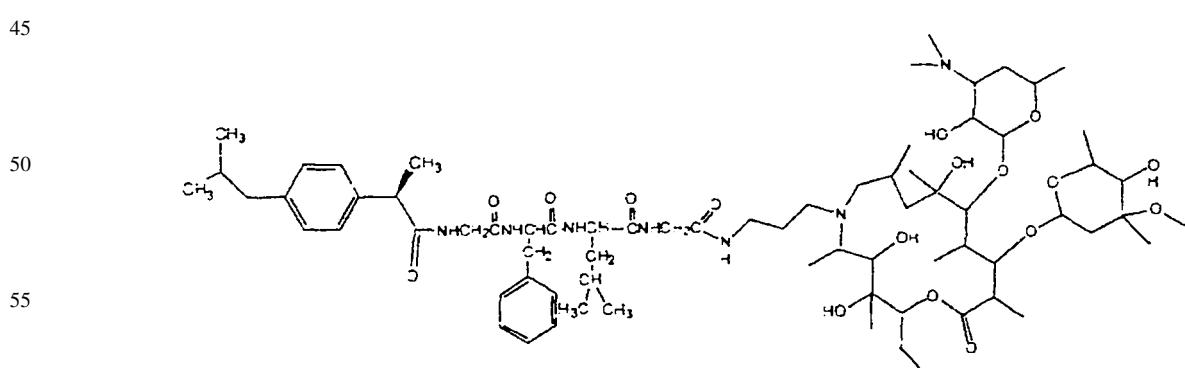
11. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

40

12. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



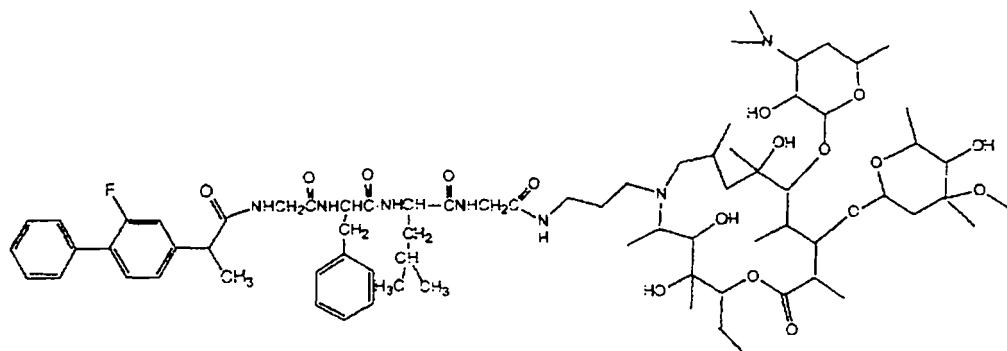
60

o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

ES 2 325 495 T3

13. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:

5



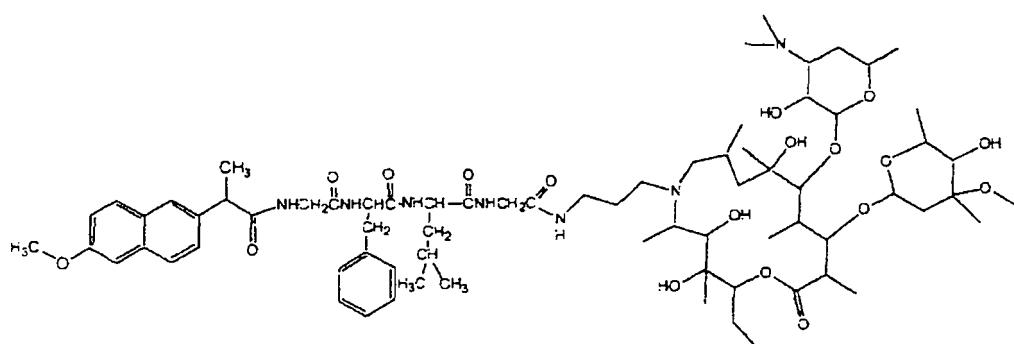
10

15

20 o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

14. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:

25



30

35

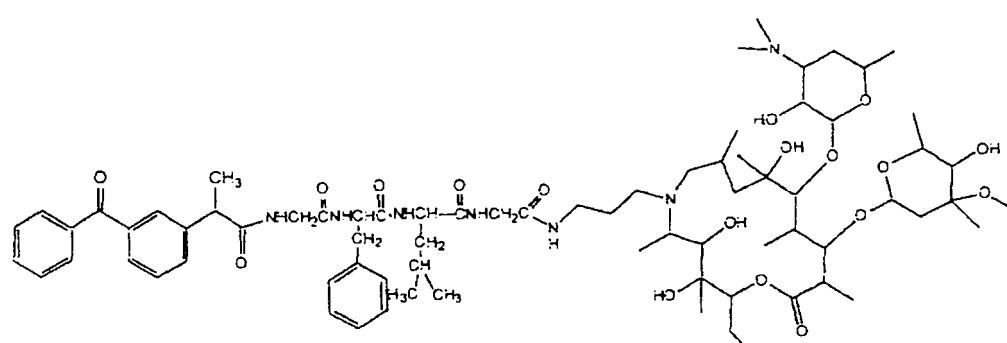
40

o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

45

15. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:

50



55

60

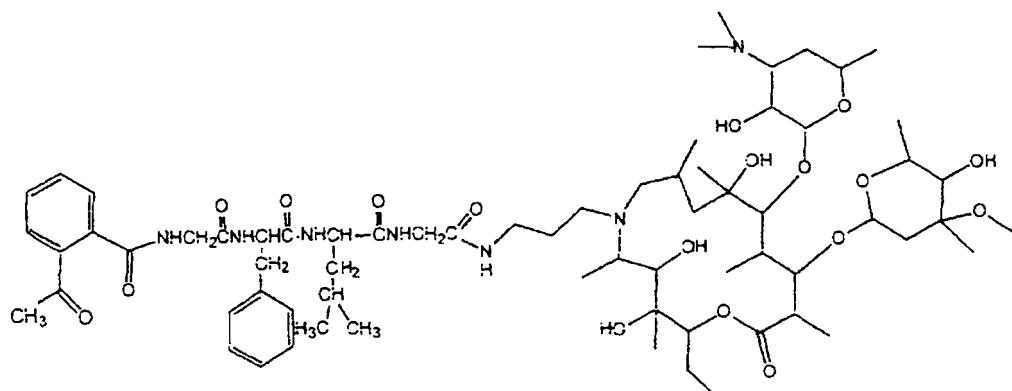
o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

65

ES 2 325 495 T3

16. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:

5



10

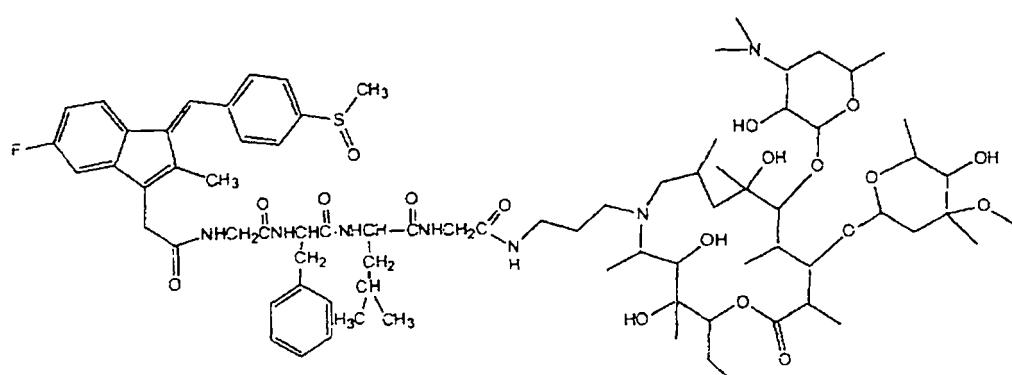
15

20

o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

17. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:

25



30

35

40

o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

45

18. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:

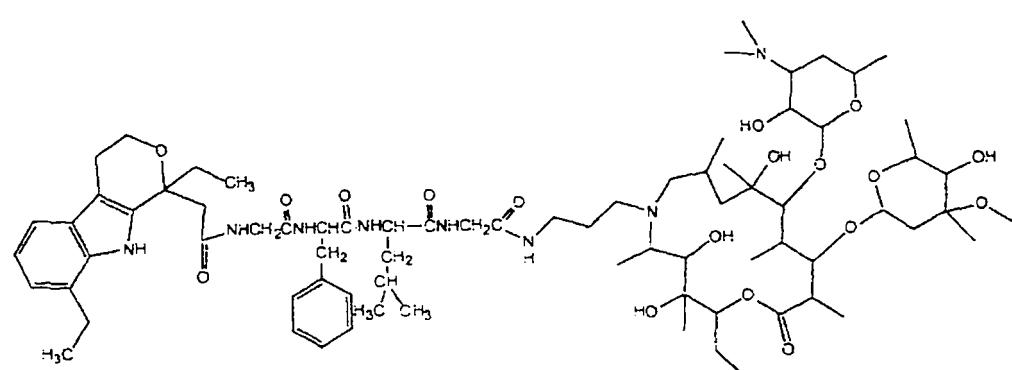
50

55

60

o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

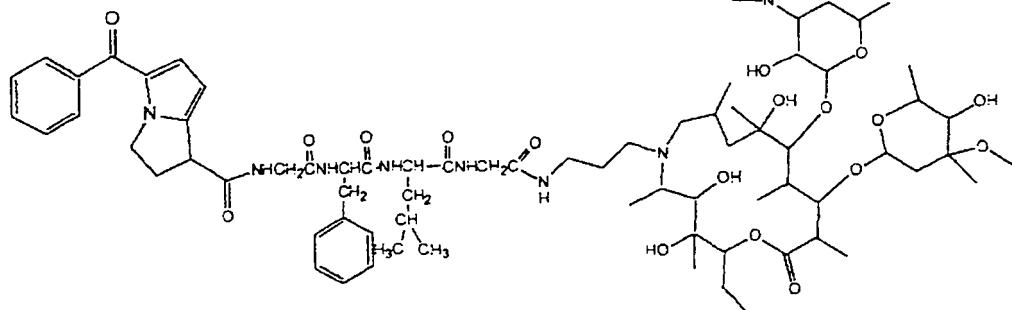
65



ES 2 325 495 T3

19. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:

5



10

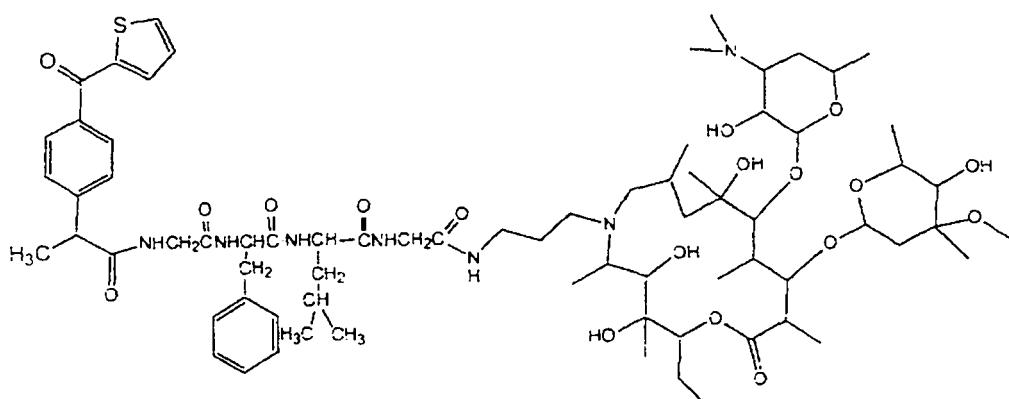
15

20

o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

20. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:

25



30

35

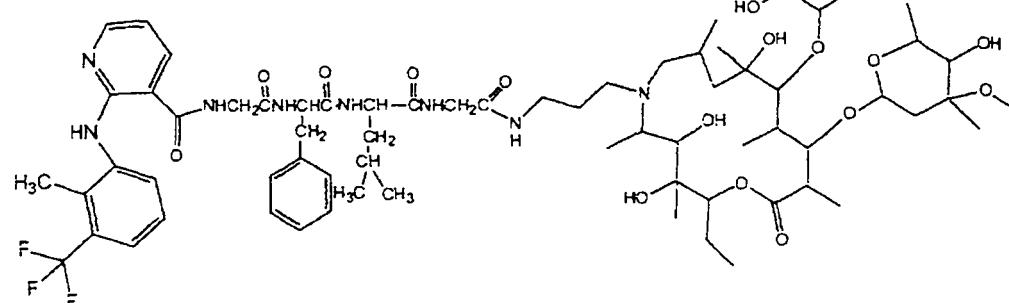
40

o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

45

21. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:

50



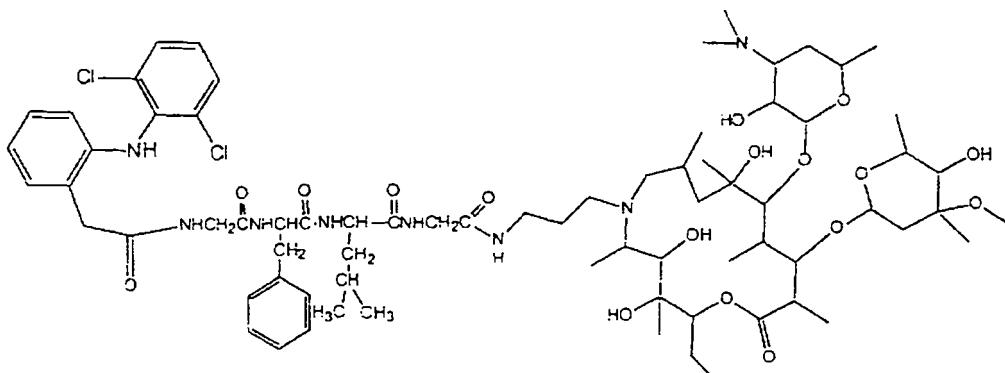
55

60

65

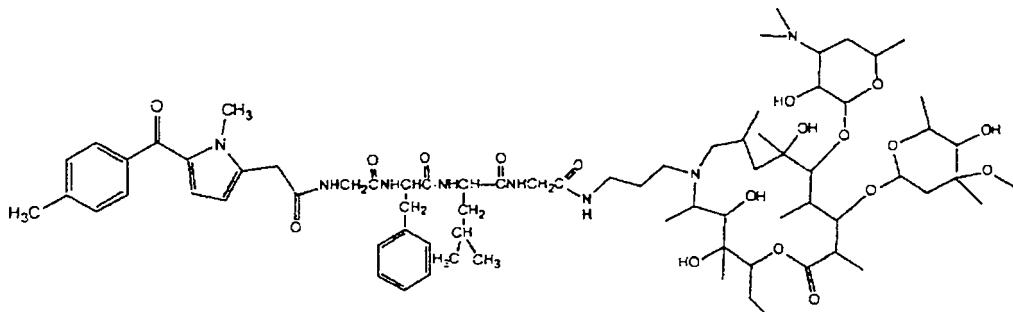
o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

22. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

23. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

40 24. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 así como un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 25. El uso de un compuesto según la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones inflamatorias que se **caracterizan** por o están asociadas con una respuesta inmunitaria inflamatoria indeseable, especialmente enfermedades y afecciones inducidas o asociadas con una secreción excesiva de TNF- α y IL-1.

50 26. El uso de un compuesto según la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección inflamatoria o un trastorno inmunitario o anafiláctico asociados con la infiltración de leucocitos en el tejido inflamado.

27. El uso según la reivindicación 26 en donde dicha afección o trastorno se selecciona del grupo que consiste en asma, síndrome disneico en adultos, bronquitis y fibrosis quística.

55 28. El uso según la reivindicación 26 en donde dicha afección o trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en afecciones inflamatorias o trastornos inmunitarios de los pulmones, las articulaciones, los ojos, el intestino, la piel y el corazón.

29. El uso según la reivindicación 26 en donde dicha afección o trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que
60 consiste en asma, síndrome disneico en adultos, bronquitis, fibrosis quística, artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, osteoartritis, artritis gotosa, uveítis, conjuntivitis, afecciones inflamatorias intestinales, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, proctitis distal, psoriasis, eczema, dermatitis, daño por infarto coronario, inflamación crónica, choque endotóxico y trastornos de proliferación de músculo liso.

65 30. El uso de un compuesto según la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para abatir la inflamación en un órgano o tejido afectado.