



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 280 217**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4168 (2006.01) **A61K 31/4188** (2006.01)
A61K 31/429 (2006.01) **A61P 7/02** (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) **A61P 29/00** (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01) **A61P 37/08** (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) **C07D 233/88** (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01) **C07D 487/14** (2006.01)
C07D 513/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00936369 .8**

86 Fecha de presentación : **26.05.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1180028**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2002**

54

Título: **Antagonistas del receptor de IL-8.**

30

Prioridad: **28.05.1999 US 136717 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

73

Titular/es: **SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION**
One Franklin Plaza, P.O. Box 7929
Philadelphia, Pennsylvania 19101, US

72

Inventor/es: **Palovich, Michael, R. y**
Widdowson, Katherine, L.

74

Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 280 217 T3

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

DESCRIPCIÓN

Antagonistas del receptor de IL-8.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a un nuevo grupo de compuestos de guanidina, a procedimientos para la preparación de los mismos, al uso de los mismos en el tratamiento de enfermedades mediadas por IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2, y ENA-78 y a composiciones farmacéuticas para usar en dicha terapia.

10 **Antecedentes de la invención**

Se han aplicado muchos nombres diferentes a la Interleuquina-8 (IL-8), tales como proteína-1 de atracción/activación de neutrófilos (NAP-1), factor quimiotáctico de neutrófilos derivado de monocitos (MDNCF), factor activante de neutrófilos (NAF), y factor quimiotáctico de linfocitos de células T. La interleuquina-8 es un quimioatrayente para neutrófilos, basófilos, y un subconjunto de células T. La produce una gran cantidad de células nucleadas incluyendo macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales expuestas a TNF, IL-1 α , IL-1 β o LPS, y los propios neutrófilos cuando se exponen a LPS o factores quimiotácticos tales como FMLP. M. Baggiolini *et al.*, *J. Clin. Invest.* 84, 1045 (1989); J. Schroder *et al.*, *J. Immunol.* 139, 3474 (1987) y *J. Immunol.* 144, 2223 (1990); Strieter, *et al.*, *Science* 243, 1467 (1989) y *J. Biol. Chem.* 264, 10621 (1989); Cassatella *et al.*, *J. Immunol.* 148, 3216 (1992).

GRO α , GRO β , GRO γ y NAP-2 pertenecen también a la familia de quimioquinas α . Al igual que IL-8 estas quimioquinas se han denominado también con diferentes nombres. Por ejemplo, GRO α , β , γ se han denominado MGS α , β y γ respectivamente (Melanoma Growth Stimulating Activity), véase Richmond *et al.*, *J. Cell Physiology* 129, 375 (1986) y Chang *et al.*, *J. Immunol.* 148, 451 (1992). Todas las quimioquinas de la familia α que poseen el motivo ELR precediendo directamente al motivo CXC se unen al receptor de IL-8 B.

IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 y ENA-78 estimulan numerosas funciones *in vitro*. Todas ellas han demostrado tener propiedades quimioatrayentes para neutrófilos, mientras que IL-8 y GRO α han demostrado actividad quimiotáctica frente a linfocitos T, y basófilos. Además IL-8 puede inducir la liberación de histamina a partir de basófilos de individuos normales y atópicos. GRO- α e IL-8 pueden inducir, además, la liberación de enzimas lisosomales y el estallido respiratorio de los neutrófilos. Se ha demostrado también que IL-8 aumenta la expresión superficial de Mac-1 (CD11b/CD18) sobre neutrófilos sin la síntesis de proteína de novo. Esto puede contribuir al aumento de la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales vasculares. Muchas enfermedades conocidas se caracterizan por una infiltración masiva de neutrófilos. Como IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ y NAP-2 promueven la acumulación y activación de neutrófilos, estas quimioquinas se han visto implicadas en una amplia variedad de trastornos inflamatorios agudos y crónicos incluyendo psoriasis y artritis reumatoide, Baggiolini *et al.*, *FEBS Lett.* 307, 97 (1992); Miller *et al.*, *Crit. Rev. Immunol.* 12, 17 (1992); Oppenheim *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* 9, 617 (1991); Seitz *et al.*, *J. Clin. Invest.* 87, 463 (1991); Miller *et al.*, *Am. Rev. Respir. Dis.* 146, 427 (1992); Donnelly *et al.*, *Lancet* 341, 643 (1993). Además las quimioquinas ELR (aquellas que contienen los aminoácidos con el motivo ELR justo antes del motivo CXC) se han visto implicadas también en la angiostasis, Strieter *et al.*, *Science* 258, 1798 (1992).

In vitro, IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , y NAP-2 inducen el cambio de forma, quimiotaxis, liberación de gránulos, y estallido respiratorio de neutrófilos, uniéndose y activando receptores de la familia de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G, en particular uniéndose a los receptores de IL-8, más particularmente el receptor B, Thomas *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266, 14839 (1991); y Holmes *et al.*, *Science* 253, 1278 (1991). El desarrollo de antagonistas de moléculas pequeñas no peptídicas para convertirse en miembros de esta familia de receptores tiene precedentes. Para un informe, véase R. Freidinger en: *Progress in Drug Research*, Vol. 40, pág. 33-98, Birkhauser Verlag, Basel 1993. Por lo tanto, el receptor de IL-8 representa una diana prometedor para el desarrollo de nuevos agentes anti-inflamatorios.

Se han caracterizado dos receptores de IL-8 humanos de alta afinidad (homología del 77%): IL-8R α , que se une únicamente a IL-8 con alta afinidad, e IL-8R β , que tiene alta afinidad por IL-8 así como por GRO- α , GRO β , GRO γ y NAP-2. Véase Holmes *et al.*, *supra*; Murphy *et al.*, *Science* 253, 1280 (1991); Lee *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267, 16283 (1992); LaRosa *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267, 25402 (1992); y Gayle *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268, 7283 (1993).

Sigue habiendo una necesidad de tratamiento, en este campo, para compuestos que son capaces de unirse al receptor IL-8 α o β . Por lo tanto, las afecciones asociadas con un aumento de la producción de IL-8 (que es el responsable de la quimiotaxis de neutrófilos y subconjuntos de células T en el sitio inflamatorio) podrían beneficiarse de compuestos que son inhibidores de la unión al receptor de IL-8.

Descripción detallada de la invención

Los compuestos de la invención pueden usarse junto con el tratamiento veterinario de mamíferos, distintos de los seres humanos, en necesidad de inhibición de IL-8 u otras quimioquinas que se unen a los receptores de IL-8 RA y RB. Las enfermedades mediadas por quimioquinas para un tratamiento, terapéutico o profiláctico, en animales incluyen patologías tales como las indicadas en este documento en la sección de Procedimientos de Tratamiento.

Los compuestos de la presente invención son:

4-[[3-(2-bromofenil)-4-oxo-1-(fenilmetil)-2-imidazolidiniliden]imino]-3-hidroxibenzonitrilo;

5 4-[[[(7aS)-2-(2-bromofenil)-hexahidro-1-oxo-3H-pirrolo[1,2-c]imidazol-3-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo;

4-[[[5-(2-bromofenil)-3,3a,4,5-tetrahidro-1,1-dioxido-4-oxoimidazo[1,5-b]isotiazol-6(2H)-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo;

10 4-[[[(6R,7aS)-2-(2-bromofenil)-hexahidro-6-hidroxi-1-oxo-3H-pirrolo[1,2-c]imidazol-3-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo;

4-[[[(7aR)-2-(2-bromofenil)-hexahidro-1-oxo-3H-pirrolo[1,2-c]imidazol-3-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo,

15 4-[(S)-2-(2,3-Dicloro-fenil)-1-oxo-hexahidro-pirrolo[1,2-c]imidazol-3-ilidenamino]-3-hidroxibenzonitrilo,

4-[(R)-2-(2,3-Dicloro-fenil)-1-oxo-hexahidro-pirrolo[1,2-c]imidazol-3-ilidenamino]-3-hidroxibenzonitrilo,

4-[2-(2,3-Dicloro-fenil)-1-oxo-hexahidro-pirrolo[1,2-c]imidazol-3-ilidenamino]-3-hidroxibenzonitrilo,

20

4-[(S)-2-(2-Bromo-fenil)-1-oxo-hexahidro-pirrolo[1,2-c]imidazol-3-ilidenamino]-3-hidroxibenzonitrilo,

4-[(R)-2-(2-Bromo-fenil)-1-oxo-hexahidro-pirrolo[1,2-c]imidazol-3-ilidenamino]-3-hidroxibenzonitrilo,

25

4-[2-(2-Bromo-fenil)-1-oxo-hexahidro-pirrolo[1,2-c]imidazol-3-ilidenamino]-3-hidroxibenzonitrilo, y

4-[[[2-(2-bromofenil)-1,5,6,7,8,8a-hexahidro-1-oxoimidazo[1,5-a]piridin-3(2H)-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos,

30

Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas las conocen bien los especialistas en la técnica e incluyen sales básicas de ácido inorgánicos y orgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido acético, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido fenilacético y ácido mandélico. Además, pueden formarse también sales farmacéuticamente aceptables de compuestos de la invención con un catión farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, si un grupo sustituyente comprende un resto carboxi. Los cationes farmacéuticamente aceptables adecuados los conocen bien los especialistas en la técnica e incluyen cationes de metales alcalinos, alcalinotérreos y de amonio cuaternario.

35

Procedimientos de preparación

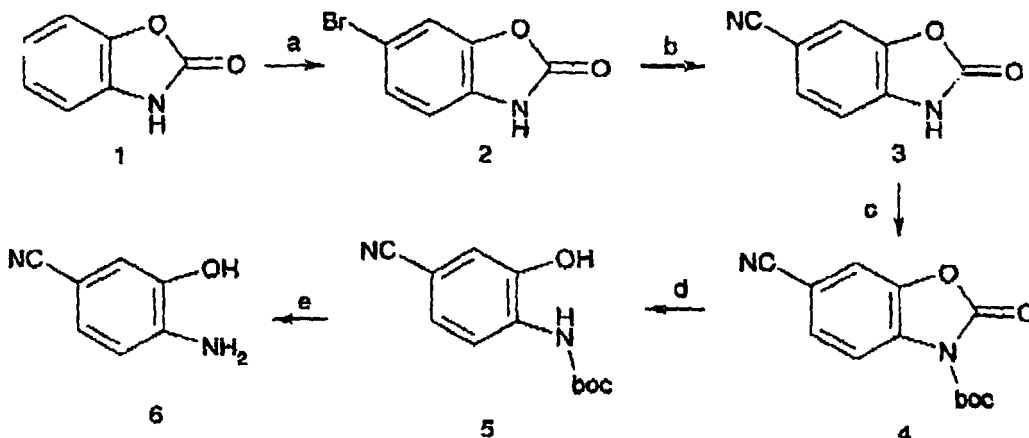
40

Los compuestos de la invención pueden obtenerse aplicando procedimientos de síntesis, algunos de los cuales se ilustran en los siguientes Esquemas.

Una vez se haya establecido el núcleo de guanidina, pueden prepararse otros compuestos de estas fórmulas aplicando técnicas convencionales para la interconversión de grupos funcionales, bien conocidas en la técnica.

45

Esquema 1



50

55

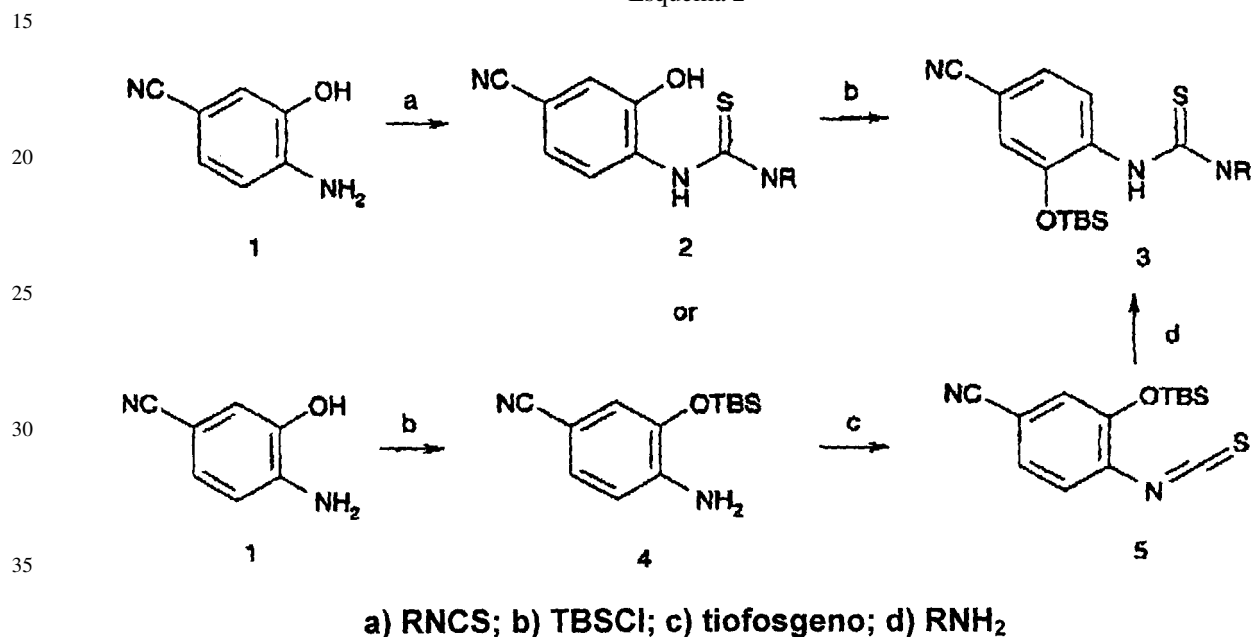
60

65

a) Br₂, NaOAc, HOAc; b) CuCN, DMF, reflujo;
c) (BOC)₂O, DMAP, TEA; d) K₂CO₃, MeOH; e) TFA

La anilina 6-esquema-1 deseada puede prepararse a partir de la benzoxazolinona 1-esquema-1 disponible en el mercado. El bromuro 2-esquema-1 puede prepararse a partir de benzoxazolinona 1-esquema-1 usando condiciones convencionales de bromación tales como bromo y acetato sódico en ácido acético. El bromuro 2-esquema-1 puede convertirse en el cianuro 3-esquema-1 usando procedimientos convencionales tales como cianuro de cobre (I) en DMF a reflujo. La amida 3-esquema-1 puede convertirse en el compuesto 4-esquema-1 protegido con BOC usando condiciones convencionales tales como anhídrido de BOC y trietilamina con una cantidad catalítica de dimetilaminopiridina en cloruro de metileno u otro disolvente orgánico adecuado. La oxazolinona 4-esquema-1 puede convertirse en la anilina 6-esquema-1 deseada hidrolizando primero al fenol 5-esquema-1 usando condiciones convencionales tales como carbonato potásico en metanol seguido de la retirada del grupo protector BOC usando condiciones convencionales tales como ácido trifluoroacético en cloruro de metileno u otro disolvente orgánico adecuado dando la anilina 6-esquema-1.

Esquema 2



40

45

50

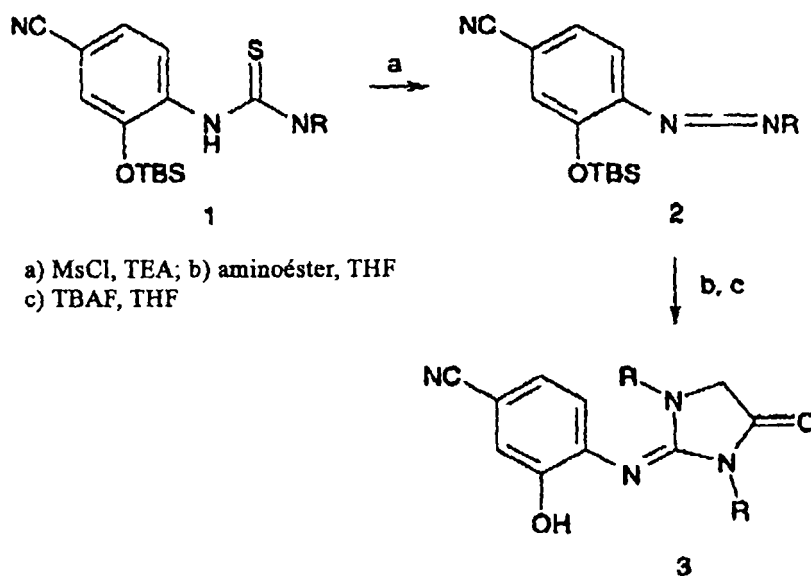
55

60

65

La tiourea 3-esquema-2 deseada puede prepararse como se muestra en el esquema 2. La anilina 1-esquema-2 puede acoplarse con un isotiocianato disponible en el mercado o con un isotiocianato hecho a partir de la condensación de una amina disponible en el mercado con tiofosgeno o un equivalente de tiofosgeno dando la tiourea 2-esquema-2. El fenol 2-esquema-2 puede protegerse como el éter TBS 3-esquema-2 usando condiciones convencionales tales como TBSCl e imidazol en THF u otro disolvente orgánico adecuado. Como alternativa la amina 1-esquema-2 puede convertirse en el isotiocianato 5-esquema-2 protegiendo en primer lugar el fenol 1-esquema-2 con un grupo protector adecuado tal como el éter TBS 4-esquema-2 usando condiciones convencionales tales como TBSCl y una base de amina tal como imidazol en THF u otro disolvente orgánico adecuado. La tiourea 5-esquema-2 puede prepararse condensando la amina 4-esquema 2 con tiofosgeno en presencia de una base tal como carbonato potásico. La tiourea 3-esquema-2 deseada puede prepararse a partir del isotiocianato 5-esquema-2 condensándolo con la amina deseada en un disolvente orgánico adecuado tal como etanol o DMF.

Esquema 3



La lactama 3-esquema-3 deseada puede prepararse como se muestra en el Esquema 3. La carbodiimida 2-esquema-3 puede prepararse a partir de la tiourea 1-esquema-3 usando condiciones convencionales tales como una cantidad en exceso de cloruro de metanosulfonilo y una base de amina adecuada tal como trietilamina en un disolvente orgánico preferiblemente cloruro de metileno a temperatura ambiente. La lactama 3-esquema-3 puede prepararse a partir de la carbodiimida 2-esquema-3 condensando en primer lugar la carbodiimida 2-esquema-3 con el α -aminoéster deseado en un disolvente orgánico adecuado tal como THF seguido de la retirada del grupo TBS usando condiciones convencionales tales como TBAF en THF a 0°C.

Ejemplos de síntesis

La invención se describirá ahora haciendo referencia a los siguientes ejemplos que son simplemente ilustrativos y no deben considerarse como una limitación del alcance de la presente invención. Todas las temperaturas se dan en grados centígrados, todos los disolventes son de la mayor pureza disponible y todas las reacciones se realizan en condiciones anhidras en una atmósfera de argón a menos que se indique otra cosa.

En los Ejemplos, todas las temperaturas están en grados centígrados (°C). Los espectros de masas se realizan en un espectrómetro de masas VG Zab usando bombardeo con átomos rápidos, a menos que se indique otra cosa. Los espectros de ^1H -RMN (en lo sucesivo en este documento "RMN") se registraron a 250 MHz usando un espectrómetro Bruker AM 250 o Am 400. Las multiplicidades indicadas son; s = singlete, d = doblete, t = triplete, c = cuadruplete, m = multiplete y a indica una señal ancha. Sat. indica una solución saturada, eq. indica la proporción de un equivalente molar de reactivo respecto al reactivo principal.

Ejemplo 1

Preparación de 4-[[3-(2-bromofenil)-4-oxo-1-(fenilmetil)-2-imidazolidiniliden]imino]-3-hidroxibenzonitrilo

a) Preparación de 4-bromo-1,2-benzoxazolinona

A una solución de benzoxazolinona (10 g, 74 mmol) en ácido acético (50 ml) a 0°C se le añadió acetato sódico (7,4 g, 74 mmol) y bromo (3,8 ml, 74 mmol) y se permitió que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente. Después de 21 h, el precipitado se recogió por filtración y se lavó con agua. El filtrado se concentró a presión reducida dando más material sólido que se recogió por filtración seguido de lavado con agua. El material se combinó dando 14 g (88%) de 4-bromo-1,2-benzoxazolinona en forma de un sólido amarillo que no necesitó purificación adicional. ^1H RMN (400 MHz, DMSO) δ 7,6 (s, 1 H), 7,3 (d, 1 H), 7,0 (d, 1 H); EM(EI) m/e 212 (M+).

b) Preparación de 4-ciano-1,2-benzoxazolinona

A una solución de 4-bromo-1,2-benzoxazolinona (5,0 g, 23 mmol) en DMF (11 ml) se le añadió cianuro de cobre (I) (3,6 g, 39 mmol) y la reacción se calentó a 165°C. Después de 6,5 h, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron agua (20 ml) y cianuro sódico (3,6 g) y la reacción se calentó a 100°C. Después de 12 h, la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se filtraron a través de un lecho corto de lavado de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo. El filtrado se concentró a presión reducida dando 1,9 g

ES 2 280 217 T3

(51%) de 4-ciano-1,2-benzoxazolinona en forma de un sólido pardo que no necesitó purificación adicional. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO) δ 7,8 (s, 1 H), 7,6 (d, 1 H), 7,2 (d, 1 H).

c) Preparación de N-t-butilacetoxi-4-ciano-1,2-benzoxazolinona

5

A una solución de 4-ciano-1,2-benzoxazolinona (1,9 g, 15 mmol) en THF (50 ml) a 0°C se le añadió trietilamina (2,5 ml, 18 mmol), DMAP (0,37 g, 3,0 mmol) y anhídrido de BOC (4,3 g, 20 mmol) y se permitió que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente. Después de 1,5 h, la mezcla se inactivó con agua (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentraron a presión reducida dando 4,3 g (100%) de N-t-butilacetoxi-4-ciano-1,2-benzoxazolinona en forma de un sólido amarillo que no necesitó purificación adicional. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,8 (d, 1 H), 7,55 (d, 1 H), 7,45 (s, 1 H), 1,65 (s, 9 H).

d) Preparación de N-t-butilacetoxi-4-ciano-2-hidroxilanilina

15

A una solución de N-t-butilacetoxi-4-ciano-1,2-benzoxazolinona (4,3 g, 16 mmol) en metanol (50 ml) se le añadió carbonato potásico (2,3 g, 16 mmol). Después de 1,5 h, la reacción se interrumpió con agua (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentraron a presión reducida dando 3,1 g (81%) de N-t-butilacetoxi-4-ciano-2-hidroxilanilina en forma de una espuma parda que no necesitó purificación adicional. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,7 (d, 1 H), 7,15 (s, 1 H), 7,1 (d, 1 H), 1,5 (s, 9 H).

e) Preparación de 4-ciano-2-hidroxilanilina

25

A una solución de N-t-butilacetoxi-4-ciano-2-hidroxilanilina (3,1 g, 13 mmol) en cloruro de metileno (100 ml) a 0°C se le añadió ácido trifluoroacético y se permitió que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente. Después de 2,5 h, la reacción se interrumpió con agua (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentraron a presión reducida. El material bruto se purificó por cromatografía de resolución rápida en columna (acetato de etilo al 50%/hexanos) dando 1,7 g (96%) de 4-ciano-2-hidroxilanilina en forma de un sólido tostado. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO) δ 7,0 (d, 1 H), 6,85 (s, 1 H), 6,65 (d, 1 H); EM(EI) m/e 134 (M+).

30

f) Preparación de N-(4-ciano-2-hidroxifenil)-N'-(2-bromofenil)tiourea

35

A una solución de 4-ciano-2-hidroxilanilina (1,0 g, 7,5 mmol) en etanol (20 ml) se le añadió 2-bromofenilisotiocianato (1,0 ml, 7,5 mmol). Después de 24 h, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida dando 2,0 g (77%) de N-(4-ciano-2-hidroxifenil)-N'-(2-bromofenil)tiourea en forma de un sólido amarillo que no necesitó purificación adicional. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO) δ 10,8 (s, 1 H), 10,1 (s, 1 H), 9,6 (s, 1 H), 8,7 (d, 1 H), 7,7 (d, 1 H), 7,6 (d, 1 H), 7,4 (t, 1 H), 7,25 (d, 1 H), 7,2 (s, 1 H y d, 2 H); EM(EI) m/e 229 (100), 348 (75 (M+)), 462 (30), 695 (10).

40

g) Preparación de N-(4-ciano-2-t-butildimetilsilanoxifenil)-N'-(2-bromofenil)tiourea

A una solución de N-(4-ciano-2-hidroxifenil)-N'-(2-bromofenil)tiourea (3,5 g, 10 mmol) en THF (50 ml) a 0°C se le añadió imidazol (1,0 g, 15 mmol) y TBSCl (1,5 g, 10 mmol). Después de 1 h, la mezcla de reacción se inactivó con agua (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentraron a presión reducida. El material bruto se cristalizó en acetato de etilo dando 3,9 g (84%) de N-(4-ciano-2-t-butildimetilsilanoxifenil)-N'-(2-bromofenil)tiourea en forma de un sólido amarillo. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO) δ 9,9 (s, 1 H), 9,2 (s, 1 H), 8,1 (d, 1 H), 7,7 (d, 1 H), 7,6 (d, 1 H), 7,45 (d, 1 H), 7,4 (t, 1 H), 7,35 (s, 1 H), 7,2 (t, 1 H); EM(EI) m/e 347 (100 (M+)), 175 (40), 461 (40).

50

h) Preparación de N-(4-ciano-2-t-butildimetilsilanoxifenil)-N'-(2-bromofenil)carbodiimida

A una solución de N-(4-ciano-2-t-butildimetilsilanoxifenil)-N'-(2-bromofenil)tiourea (3,4 g, 7,4 mmol) en cloruro de metileno (40 ml) a 0°C se le añadió trietilamina (3,1 ml, 22 mmol), DMAP (20 mg) y cloruro de metanosulfonilo (1,1 ml, 15 mmol). Después de 25 min, la mezcla de reacción se inactivó con agua (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentraron a presión reducida dando 3,3 g (100%) de N-(4-ciano-2-t-butildimetilsilanoxifenil)-N'-(2-bromofenil)carbodiimida en forma de un sólido amarillo que no necesitó purificación adicional. $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO) δ 7,7 (d, 1 H), 7,45 (d, 1 H), 7,4 (m, 4 H), 7,15 (t, 1 H).

60

i) Procedimiento convencional para la síntesis de tetraalquilguanidinas cíclicas. Preparación de 4-[[3-(2-bromofenil)-4-oxo-1-(fenilmetil)-2-imidazolidiniliden]imino]-3-hidroxibenzonitrilo

A una solución de N-(4-ciano-2-t-butildimetilsilanoxifenil)-N'-(2-bromofenil)carbodiimida (86 mg, 0,20 mmol) en THF (2 ml) se le añadió diisopropiletileno (25 μl , 0,57 mmol) y N-bencil glicina etil éster (41 mg, 0,22 mmol). Después de 15 min, a la mezcla se le añadió metanol (0,1 ml) y después TBAF (0,24 ml, 0,24 mmol) a 0°C. Después de 30 min, la mezcla de reacción se inactivó con agua (2 ml) y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentraron a presión reduci-

65

ES 2 280 217 T3

da. El material bruto se purificó por recristalización (cloruro de metileno/hexanos) dando 74,5 mg (80%) de 4-[[[3-(2-bromofenil)-4-oxo-1-(fenilmetil)-2-imidazolidiniliden]imino]-3-hidroxibenzonitrilo en forma de un polvo tostado. ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,45 (2 H, d), 7,35 (2 H, t), 7,3 (1 H, d), 7,25 (1 H, d), 7,15 (1 H, d), 6,9 (3 H, m), 6,8 (1 H, d), 6,6 (1 H, t), 4,6 (2 H, m), 4,0 (2 H, s); EM(EI) m/e 463 (100 (M⁺)).

5

j) *Preparación de 4-[[[(7aS)-2-(2-bromofenil)-hexahidro-1-oxo-3H-pirrolol[1,2-c]imidazol-3-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo*

Se siguió el procedimiento convencional usando N-(4-ciano-2-t-butildimetilsilanoxifenil)-N'-(2-bromofenil)carbodiimida (54 mg, 0,13 mmol), diisopropiletilamina (32 μ l, 0,29 mmol), clorhidrato de benciléster de L-prolina (34 mg, 0,14 mmol) y TBAF (0,16 ml, 0,16 mmol) en THF (2 ml) y metanol (0,1 ml) dando 36 mg (67%) de 4-[[[(7aS)-2-(2-bromofenil)-hexahidro-1-oxo-3H-pirrolol[1,2-c]imidazol-3-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo en forma de un polvo tostado. ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,6 (2 H, m), 7,35 (3 H, m), 7,15 (1 H, m), 7,0 (1 H, m), 4,5 (1 H, t), 3,0 (1 H, m), 2,4 (1 H, m), 2,2 (1 H, m), 2,05 (2 H, m); EM(EI) m/e 412 (M⁺).

15

k) *Preparación de 4-[[[5-(2-bromofenil)-3,3a,4,5-tetrahidro-1,1-dioxido-4-oxoimidazo[1,5-b]isotiazol-6(2H)-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo*

Se siguió el procedimiento convencional usando N-(4-ciano-2-t-butildimetilsilanoxifenil)-N'-(2-bromofenil)carbodiimida (60 mg, 0,14 mmol), diisopropiletilamina (17 μ l, 0,15 mmol), aminoéster (27 mg, 0,15 mmol) y TBAF (0,17 ml, 0,15 mmol) en THF (1,5 ml) y metanol (0,1 ml) dando 46 mg (71%) de 4-[[[5-(2-bromofenil)-3,3a,4,5-tetrahidro-1,1-dioxido-4-oxoimidazo[1,5-b]isotiazol-6(2H)-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo en forma de un polvo tostado. ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,1 (1 H, d), 7,8 (1 H, s), 7,75 (1 H, d), 7,7 (1 H, d), 7,6 (2 H, m), 7,25 (1 H, t), 4,35 (1 H, t), 3,9 (2 H, s), 3,25 (1 H, t), 2,9 (1 H, m), 2,7 (1 H, m); EM(EI) m/e 330 (100), 662 (20).

25

l) *Preparación de 4-[[[(6R,7aS)-2-(2-bromofenil)-hexahidro-6-hidroxi-1-oxo-3H-pirrolol[1,2-c]imidazol-3-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo*

Se siguió el procedimiento convencional usando N-(4-ciano-2-t-butildimetilsilanoxifenil)-N'-(2-bromofenil)carbodiimida (102 mg, 0,24 mmol), diisopropiletilamina (60 μ l, 0,26 mmol), clorhidrato de hidroxil L-prolina metil éster (44 mg, 0,26 mmol) y TBAF (0,29 ml, 0,29 mmol) en THF (2,5 ml) y metanol (0,1 ml) dando 80 mg (78%) de 4-[[[(6R,7aS)-2-(2-bromofenil)-hexahidro-6-hidroxi-1-oxo-3H-pirrolol[1,2-c]imidazol-3-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo en forma de un polvo tostado. EM(EI) m/e 427 (100 (M⁺)).

35

m) *Preparación de 4-[[[(7aR)-2-(2-bromofenil)-hexahidro-1-oxo-3H-pirrolol[1,2-c]imidazol-3-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo*

Se siguió el procedimiento convencional usando N-(4-ciano-2-t-butildimetilsilanoxifenil)-N'-(2-bromofenil)carbodiimida (107 mg, 0,25 mmol), diisopropiletilamina (71 μ l, 0,55 mmol), clorhidrato de D-prolina metil éster (46 mg, 0,28 mmol) y TBAF (0,30 ml, 0,30 mmol) en THF (2,5 ml) y metanol (0,1 ml) dando 80 mg (78%) de 4-[[[(7aR)-2-(2-bromofenil)-hexahidro-1-oxo-3H-pirrolol[1,2-c]imidazol-3-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo en forma de un polvo tostado. EM(EI) m/e 411 (100(M⁺)).

45

n) *Preparación de 4-[[[2-(2-bromofenil)-1,5,6,7,8,8a-hexahidro-1-oxoimidazo[1,5-a]piridin-3(2H)-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo*

Se siguió el procedimiento convencional usando N-(4-ciano-2-t-butildimetilsilanoxifenil)-N'-(2-bromofenil)carbodiimida (106 mg, 0,25 mmol), diisopropiletilamina (71 μ l, 0,28 mmol), clorhidrato de metilpipercolinato (50 mg, 0,28 mmol) y TBAF (0,30 ml, 0,30 mmol) en THF (2,5 ml) y metanol (0,1 ml) dando 80 mg (75%) de 4-[[[2-(2-bromofenil)-1,5,6,7,8,8a-hexahidro-1-oxoimidazo[1,5-a]piridin-3(2H)-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo en forma de un polvo tostado. EM(EI) m/e 425 (100(M⁺)).

55

Procedimiento de tratamiento

55

Los compuestos de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos pueden usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de cualquier patología en un ser humano, u otro mamífero, que empeora o está causada por una producción excesiva o no regulada de la citoquina IL-8 por las células de dicho mamífero, tal como, aunque sin limitación, monocitos y/o macrófagos, u otras quimioquinas que se unen al receptor de IL-8 α o β , denominados también receptor de tipo I o de tipo II.

60

En particular, las quimioquinas son IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78.

65

Los compuestos de la invención se administran en una cantidad suficiente para inhibir la función de las citoquinas, en particular IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78, de manera que se regulan biológicamente a la baja hasta niveles normales de la función fisiológica, o en algún caso hasta niveles por debajo de los normales, para mejorar la patología. Los niveles anormales de IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78 por ejemplo en el contexto de la presente invención, constituyen: (i) niveles de IL-8 libre mayores o iguales a 1 picogramo por ml; (ii) cualquier célula asociada a IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78 por encima de los niveles fisiológicos normales, o (iii) se

ES 2 280 217 T3

produce la presencia de IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78 por encima de los niveles basales en células o tejidos en IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78 respectivamente.

5 Hay muchas patologías en las que una producción excesiva o no regulada de IL-8 está implicada en empeorar y/o provocar la enfermedad. Las enfermedades mediadas por quimioquinas incluyen psoriasis, dermatitis atópica, artritis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de insuficiencia respiratoria en adultos, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, accidentes cerebrovasculares, choque séptico, choque endotóxico, sepsis por gram negativas, síndrome de choque tóxico, lesión por reperfusión cardiaca y renal, glomerulonefritis, trombosis, reacción de injerto frente al receptor, enfermedad de Alzheimer, rechazos de aloinjertos, malaria, reestenosis, angiogénesis, aterosclerosis, osteoporosis, gingivitis y liberación de células madre hematopoyéticas no deseadas.

15 Estas enfermedades se caracterizan fundamentalmente por una infiltración masiva de neutrófilos, infiltración de células T, o crecimiento neovascular, y están asociadas con un aumento de la producción de IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ o NAP-2 que es responsable de la quimiotaxis de neutrófilos hacia el sitio inflamatorio o del crecimiento direccional de las células endoteliales. Por contraste con otras citoquinas inflamatorias (IL-1, TNF, e IL-6), IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ o NAP-2 tienen la propiedad exclusiva de promover la quimiotaxis de neutrófilos, liberar enzimas incluyendo, aunque sin limitación, liberación de elastasa así como la producción y activación de superóxido. Las α -quimioquinas, aunque particularmente, GRO α , GRO β , GRO γ o NAP-2, que trabajan a través del receptor de IL-8 de tipo I o II pueden promover la neovascularización de tumores promoviendo el crecimiento direccional de las células endoteliales. Por lo tanto, la inhibición de la quimiotaxis o activación inducida por IL-8 conduciría a dirigir la reducción en la infiltración de neutrófilos.

25 Evidencias recientes implican también el papel de las quimioquinas en el tratamiento de infecciones por VIH, Littleman *et al.*, *Nature* 381, pág. 661 (1996) y Koup *et al.*, *Nature* 381, pág. 667 (1996).

30 El TNF- α es una citoquina con acciones proinflamatorias, incluyendo la expresión de la molécula de adhesión a leucocitos endoteliales. Los leucocitos infiltrados en las lesiones cerebrales isquémicas y, por lo tanto, los compuestos que inhiben o hacen disminuir los niveles de TNF serán útiles para el tratamiento de la lesión cerebral isquémica. Véase Liu *et al.*, *Stroke*, Vol. 25, N° 7, pág. 1481-1488 (1994).

Los modelos de lesiones craneales cerradas y el tratamiento con agentes mixtos 5-LO/CO se analiza en Shohami *et al.*, *J. de Vasc & Clinical Physiology and Pharmacology*, Vol. 3, N° 2, pág. 99-107 (1992).

35 Los compuestos de la invención se administran en una cantidad suficiente para inhibir la unión a los receptores de IL-8 alfa o beta tal como pone de manifiesto una reducción en la quimiotaxis y activación de neutrófilos. El descubrimiento de que los compuestos de la invención son inhibidores de la unión a IL-8 se basa en los efectos de los compuestos de la invención en los ensayos de unión al receptor *in vitro* que se describen en este documento. Los compuestos de la invención han demostrado, en algunos casos, ser inhibidores dobles de ambos receptores recombinantes de IL-8 de tipo I y tipo II. Preferiblemente los compuestos son inhibidores sólo de un receptor, más preferiblemente de Tipo II.

45 Como se usa en este documento, la expresión “enfermedad o patología mediada por IL-8” se refiere a todas y cada una de las patologías en las que IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78 desempeñan un papel, por producción de las propias IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78, o porque IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78 provocan la liberación de otra monoquina, tal como, aunque sin limitación, IL-1, IL-6 o TNF. Una patología en la que, por ejemplo, IL-1 es un componente principal, y cuya producción o acción aumenta o se secreta como respuesta a IL-8, se considerará, por lo tanto, una patología mediada por IL-8.

50 Como se usa en este documento, la expresión “enfermedad o patología mediada por quimioquina” se refiere a todas y cada una de las patologías en las que una quimioquina que se une a un receptor de IL-8 α o β desempeña un papel, tal como, aunque sin limitación, IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 o ENA-78. Esto incluiría una patología en la que, IL-8 desempeña un papel, por producción de la propia IL-8, o porque IL-8 provoca la liberación de otra monoquina, tal como, aunque sin limitación, IL-1, IL-6 o TNF. Una patología en la que, por ejemplo, IL-1 es un componente principal, y cuya producción o acción aumenta o se secreta como respuesta a IL-8, se consideraría, por lo tanto, una patología mediada por IL-8.

60 Como se usa en este documento, el término “citoquina” se refiere a cualquier polipéptido secretado que afecte a las funciones de las células y es una molécula que modula las interacciones entre células en la respuesta inmune, inflamatoria o hematopoyética. Una citoquina incluye, aunque sin limitación, monoquinas y linfoquinas, independientemente de qué células las produzcan. Por ejemplo, se dice en general que una monoquina está producida y secretada por una célula mononuclear, tal como un macrófago y/o un monocito. Sin embargo, otras muchas células producen también monoquinas, tales como células asesinas naturales, fibroblastos, basófilos, neutrófilos, células endoteliales, astrocitos cerebrales, células estromáticas de médula ósea, queratinocitos epidérmicos y linfocitos B. Se dice en general que las linfoquinas son producidas por células linfocíticas. Los ejemplos de citoquinas incluyen, aunque sin limitación, Interleuquina-1 (IL-1), Interleuquina-6 (IL-6), Interleuquina-8 (IL-8), Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α) y Factor de Necrosis Tumoral-beta (TNF- β).

ES 2 280 217 T3

Como se usa en este documento, el término “quimioquina” se refiere a cualquier polipéptido secretado que afecte a las funciones de las células y sea una molécula que modula las interacciones entre las células en la respuesta inmune, inflamatoria o hematopoyética, similar al término “citoquina” anterior. Una quimioquina se secreta fundamentalmente a través de transmembranas celulares y provoca la quimiotaxis y activación de glóbulos blancos y leucocitos, neutrófilos, monocitos, macrófagos, células T, células B, células endoteliales y células del músculo liso específicas. Los ejemplos de quimioquinas incluyen, aunque sin limitación, IL-8, GRO- α , GRO- β , GRO- γ , NAP-2, ENA-78, IP-10, MIP-1 α , MIP- β , PF4, y MCP 1, 2, y 3.

Para usar un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en terapia, normalmente se formulará en una composición farmacéutica de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional. Esta invención, por lo tanto, se refiere también a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz, no tóxica, de un compuesto de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos de la invención, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y las composiciones farmacéuticas que los incorporan pueden administrarse convenientemente por cualquiera de las vías usadas convencionalmente para la administración de fármacos, por ejemplo, por vía oral, tópica, parenteral o por inhalación. Los compuestos de la invención pueden administrarse en formas de dosificación convencionales preparadas combinando un compuesto de la invención con vehículos farmacéuticos convencionales de acuerdo con procedimientos convencionales. Los compuestos de la invención pueden administrarse también en dosificaciones convencionales en combinación con un segundo compuesto terapéuticamente activo conocido. Estos procedimientos pueden implicar la mezcla, granulación y compresión o disolución de los ingredientes según sea apropiado para la preparación deseada. Se entenderá que la forma y carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable están dictados por la cantidad de ingrediente activo con la que se combina, la vía de administración y otras variables bien conocidas. El vehículo o vehículos deben ser “aceptables” en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el destinatario de la misma.

El vehículo farmacéutico empleado puede ser, por ejemplo, un sólido o un líquido. Los vehículos sólidos ejemplares son lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Los vehículos líquidos ejemplares son jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, agua. De forma similar, el vehículo o diluyente puede incluir un material de liberación retardada en el tiempo bien conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera.

Puede emplearse una amplia variedad de formas farmacéuticas. De esta manera, si se usa un vehículo sólido, la preparación puede usarse para formar comprimidos, ponerse en una cápsula dura de gelatina, en forma de polvo o gránulo, o en forma de un trocisco o pastilla. La cantidad de vehículo sólido variará ampliamente aunque preferiblemente será de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 1 g. Cuando se usa un vehículo líquido, la preparación estará en forma de un jarabe, emulsión, cápsula de gelatina blanda, un líquido inyectable estéril tal como una ampolla o suspensión líquida no acuosa.

Los compuestos de la invención pueden administrarse por vía tópica, es decir, por administración no sistémica. Esto incluye la aplicación de un compuesto de la invención externamente a la epidermis o la cavidad bucal y la instilación de dicho compuesto al oído, ojo y nariz, de manera que el compuesto no entra significativamente en el torrente circulatorio. Por contraste, administración sistémica se refiere a la administración oral, intravenosa, intraperitoneal e intramuscular.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semi-líquidas adecuadas para la penetración a través de la piel al sitio de inflamación tales como linimentos, lociones, cremas, pomadas o pastas, y gotas adecuadas para administración al ojo, oído o nariz. El ingrediente activo puede comprender, para administración tópica, del 0,001% al 10% p/p, por ejemplo del 1% al 2% en peso de la Formulación. Sin embargo, puede comprender tanto como 10% p/p aunque preferiblemente comprenderá menos del 5% p/p, más preferiblemente del 0,1% al 1% p/p de la Formulación.

Las lociones de acuerdo con la presente invención incluyen aquellas adecuadas para aplicación a la piel o al ojo. Una loción para el ojo puede comprender una solución acuosa estéril que contiene opcionalmente un bactericida y puede prepararse mediante procedimientos similares a aquellos para la preparación de gotas. Las lociones o linimentos para aplicación a la piel pueden incluir también un agente para acelerar el secado y para refrigerar la piel, tal como un alcohol o acetona, y/o un humectante tal como glicerol o un aceite tal como aceite de ricino o aceite de cacahuete.

Las cremas, pomadas o pastas de acuerdo con la presente invención son formulaciones semi-sólidas de los ingredientes activos para aplicación externa. Pueden prepararse mezclando el ingrediente activo en forma finamente dividida o de polvo, solo o en solución o suspensión en un fluido acuoso o no acuoso, con ayuda de la maquinaria adecuada, con una base grasa o no grasa. La base puede comprender hidrocarburos tales como parafina dura, blanda o líquida, glicerol, cera de abejas, un jabón metálico; un mucílago; un aceite de origen natural tal como aceite de almendra, maíz, cacahuete, ricino u oliva; lanolina anhidra o sus derivados o un ácido graso tal como un ácido estérico u oleico junto con un alcohol tal como propilenglicol o un macrogel. La formulación puede incorporar cualquier agente tensioactivo adecuado tal como un tensioactivo aniónico, catiónico o no iónico tal como un éster de sorbitano o un polioxitileno derivado del mismo. Pueden incluirse también agentes de suspensión tales como gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos tales como sílices silíceas, y otros ingredientes tales como lanolina.

ES 2 280 217 T3

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

Los compuestos de la invención pueden administrarse por vía parenteral, es decir, por administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal, intrarrectal, intravaginal o intraperitoneal. Las formas subcutánea e intramuscular de administración parenteral se prefieren generalmente. Las formas de dosificación apropiadas para dicha administración pueden prepararse por técnicas convencionales. Los compuestos de la invención pueden administrarse también por inhalación, es decir, por administración intranasal e inhalación oral. Las formas de dosificación apropiadas para dicha administración, tales como una formulación en aerosol o un inhalador de dosis medida, pueden prepararse por técnicas convencional.

Para todos los procedimientos de uso descritos en este documento para los compuestos de la invención el régimen de dosificación oral diario será preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal total. El régimen de dosificación parenteral diario será de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal total. El régimen de dosificación tópico diario será preferiblemente de 0,1 mg a 150 mg, administrados de una a cuatro, preferiblemente dos o tres veces al día. El régimen de dosificación de inhalación diario será preferiblemente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg por día. Un especialista en la técnica reconocerá también que la cantidad óptima y la separación de las dosificaciones individuales de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se determinarán según la naturaleza y el grado de la afección a tratar, la forma, vía y sitio de administración, y el paciente particular a tratar, y que dichos óptimos pueden determinarse por técnicas convencionales. Un especialista en la técnica entenderá también que el transcurso óptimo del tratamiento, es decir, el número de dosis de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo dadas por día durante un número de días definido, puede establecerlo un especialista en la técnica usando ensayos de determinación del transcurso convencional del tratamiento.

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

Ejemplos biológicos

Los efectos inhibitorios de IL-8, y la quimioquina GRO- α de los compuestos de la presente invención se determinaron mediante el siguiente ensayo *in vitro*:

Ensayos de Unión al Receptor

[¹²⁵I] IL-8 (recombinante humana) se obtuvo de Amersham Corp., Arlington Heights, IL, con actividad específica 2000 Ci/mmol. GRO- α se obtuvo de NEN-New England Nuclear. Los demás compuestos químicos eran de calidad analítica. Los altos niveles de receptores de IL-8 de tipo α y β humana recombinantes se expresaron individualmente en células de ovario de hámster chino como se ha descrito anteriormente (Holmes, *et al.*, Science, 1991, 253, 1278). Las membranas de células de ovario de hámster chino se homogeneizaron de acuerdo con un protocolo descrito anteriormente (Haour, *et al.*, J Biol Chem., 249 pág. 2195-2205 (1974)). Excepto que el tampón de homogeneización se cambió por Tris-HCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM, EDTA 0,5 mM (ácido etilendiaminatetraacético), PMSF 1 mM (fluoruro de α -toluenosulfonilo), 0,5 mg/l de leupeptina, pH 7,5. La concentración de proteína de membrana se determinó usando un kit de micro-ensayo Pierce Co. usando albúmina de suero bovino como patrón. Todos los ensayos se realizaron en un formato de microplaca de 96 pocillos. Cada mezcla de reacción contenía ¹²⁵I IL-8 (0,25 nM) o ¹²⁵I GRO- α y 0,5 μ g/ml de membranas de IL-8R α o 1,0 μ g/ml de membranas de IL-8R β en tampones Bis-Trispropano 20 mM y Tris HCl 0,4 mM, pH 8,0, que contenían MgSO₄ 1,2 mM, EDTA 0,1 mM, NaCl 25 mM y CHAPS al 0,03%. Además, se añadió fármaco o el compuesto de interés que se había predisoluelto en DMSO para alcanzar una concentración final de entre 0,01 nM y 100 μ M. El ensayo se inició por adición de ¹²⁵I-IL-8. Después de 1 hora a temperatura ambiente la placa se recolectó usando un recolector Tomtec de 96 pocillos sobre un filtro de fibra de vidrio bloqueado con polietilenimina al 1%/BSA al 0,5% y se lavó 3 veces con NaCl 25 mM, TrisHCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM, EDTA 0,5 mM, CHAPS al 0,03%, pH 7,4. El filtro se secó después y se contó en el contador de centelleo líquido Betaplate. El receptor de IL-8 R α o de Tipo I recombinante, se denomina también en este documento receptor no permisivo y el receptor IL-8 R β o de Tipo II recombinante, se denomina receptor permisivo.

Todos los compuestos mencionados en este documento en la Sección de Química de Síntesis, Ejemplo 1 a 15, demostraron una CI₅₀ de aproximadamente 45 a aproximadamente <1 μ g/ml en los modelos permisivos para la inhibición del receptor de IL-8. De los compuestos ensayados, se descubrió también que los Ejemplos 1 a 12 eran inhibidores de la unión a GRO- α a aproximadamente el mismo nivel.

Ensayo de Quimiotaxis

Las propiedades inhibitorias *in vitro* de estos compuestos se determinan en el ensayo de quimiotaxis de neutrófilos como se describe en Current Protocols in Immunology, Vol. I, Supl. 1, Unidad 6.12.3. Los neutrófilos se aislaron de sangre humana como se describe en Current Protocols in Immunology Vol. I, Supl. 1 Unidad 7.23.1. Los quimioatrayentes IL-8, GRO- α , GRO- β , GRO- γ y NAP-2 se ponen en la cámara inferior de una cámara de 48 multipocillos (Neuro Probe, Cabin John, MD) a una concentración entre 0,1 y 100 nM. Las dos cámaras están separadas por un filtro de policarbonato de 5 μ m. Cuando se ensayan los compuestos de esta invención, se mezclan con las células (0,001 - 1000 nM) justo antes de la adición de las células a la cámara superior. Se permite que transcurra la incubación durante entre aproximadamente 45 y 90 min a aproximadamente 37°C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%. Al final del periodo de incubación, la membrana de policarbonato se retira y el lado superior se lava, después la membrana se tiñe usando el protocolo de tinción Diff Quick (Baxter Products, McGaw Park, IL, EE.UU.). Las células que han sido quimioatraídas por la quimioquina se cuentan visualmente usando un microscopio. Generalmente, se cuentan cuatro campos para cada muestra, calculándose la media de estas cantidades para producir el número medio de células que han migrado. Cada muestra se ensaya por triplicado y cada compuesto se repite al menos cuatro veces. A ciertas células (células de control positivo) no se les añade compuesto, representando estas células la máxima respuesta quimiotáctica de las células. En el caso en el que se desee un control negativo (no estimulado), no se añade quimioquina a la cámara inferior. La diferencia entre el control positivo y el control negativo representa la actividad quimiotáctica de las células.

Ensayo de Liberación de Elastasa

Los compuestos de esta invención se ensayan por su capacidad de evitar la liberación de elastasa de neutrófilos humanos. Los neutrófilos se aíslan de sangre humana como se describe en Current Protocols in Immunology Vol. I, Supl. I Unidad 7.23.1. Los PMN, 0,88 x 10⁶ células, suspendidos en Solución de Ringer (NaCl 118, KCl 4,56, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1,03, Glucosa 11,1, HEPES 5 mM, pH 7,4) se ponen en cada pocillo de una placa de 96 pocillos en un volumen de 50 ul. A esta placa se le añade el compuesto de ensayo (0,001 -1000 nM) en un volumen de 50 ul, citocalasina B en un volumen de 50 ul (20 ug/ml) y tampón de Ringer en un volumen de 50 ul. Se permite que estas células se calienten (37°C, CO₂ al 5%, HR del 95%) durante 5 min antes de añadir IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ o NAP-2 a una concentración final de 0,01 - 1000 nM. Se permite que la reacción transcurra durante 45 min antes de centrifugar la placa de 96 pocillos (800 xg 5 min) y se retiran 100 ul del sobrenadante. Este sobrenadante se añade a una segunda placa de 96 pocillos seguido de un sustrato de elastasa artificial (MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC, Nova Biochem, La Jolla, CA) hasta una concentración final de 6 ug/ml disuelto en solución salina tamponada con fosfato. Inmediatamente, la placa se pone en un lector de placas de 96 pocillos fluorescente (Cytofluor 2350, Millipore, Bedford, MA) y los datos se recogen a intervalos de 3 min de acuerdo con el procedimiento de Nakajima *et al* J. Biol. Chem; 254, 4027 (1979). La cantidad de elastasa liberada de los PMN se calcula midiendo la velocidad de degradación de MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC.

TNF- α en Ensayo de Lesión Cerebral Traumática

El presente ensayo proporciona el examen de la expresión del ARNm del factor de necrosis tumoral en zonas específicas del cerebro que aparecen tan una lesión cerebral traumática (TBI) con percusión con fluido lateral inducida experimentalmente en ratas. Las ratas Sprague-Dawley adulto (n=42) se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) y se sometieron a una lesión cerebral con percusión con fluido lateral de gravedad moderada (2,4 atm.) centra en la corteza temporoparietal izquierda (n=18), o tratamiento "simulado" (anestesia y cirugía sin lesión, n=18). Los animales se sacrifican por decapitación a las 1, 6 y 24 h. Después de la lesión, se retiran los cerebros, y se preparan muestras de tejido de corteza parietal izquierda (CI) (lesionada), el área correspondiente en la corteza contralateral derecha (CD), corteza adyacente a la corteza parietal (AI) lesionada, el área adyacente correspondiente en la corteza derecha (AD), hipocampo izquierdo (HI) e hipocampo derecho (HD). El ARN total se aisló y se realizó una hibridación por transferencia Northern y se cuantificó respecto a un ARN de control positivo de TNF- α (macrófago = 100%). Se observa un aumento notable de la expresión del ARNm de TNF- α en HI (104 \pm 17% del control positivo, p < 0,05 comparado con el simulado), CI (105 \pm 21%, p < 0,05) y AI (69 \pm 8%, p < 0,01) en el hemisferio con traumatismo 1 h después de la lesión. Se observa también un aumento en la expresión del ARNm de TNF- α en HI (46 \pm 8%, p < 0,05), CI (30 \pm 3%, p < 0,01) y AI (32 \pm 3%, p < 0,01) a las 6 h que se resuelve en las 24 h siguientes a la lesión. En el hemisferio contralateral, la expresión del ARNm de TNF- α aumenta en HD (46 \pm 2%, p < 0,01), CD (4 \pm 3%) y AD (22 \pm 8%) en 1 h y en HD (28 \pm 11%), CD (7 \pm 5%) y AD (26 \pm 6%, p < 0,05) en 6 h aunque no en las 24 h después de la lesión. En los animales simulados (cirugía sin lesión) o sin tratamiento previo, no se observan cambios coherentes en la expresión del ARNm de TNF- α en cualquiera de las 6 áreas cerebrales en cualquiera de los hemisferios en cualquier momento. Estos resultados indican que después de una lesión cerebral con percusión de fluido parasagital, la expresión temporal del ARNm de TNF- α se altera en zonas específicas del cerebro, incluyendo aquellas del hemisferio sin traumatismo. Como TNF- α puede inducir el factor de crecimiento nervioso (NGF) y estimular la liberación de otras citoquinas a partir de astrocitos activados, esta alteración post-traumática en la expresión génica de TNF- α desempeña un papel importante en ambas respuestas aguda y regenerativa al traumatismo del SNC.

Modelo de lesión del SNC para ARNm de IL- β

Este ensayo caracteriza la expresión regional del ARNm de interleuquina-1B (IL-1B) en zonas cerebrales específicas después de una lesión cerebral traumática (TBI) con percusión con fluido lateral experimental en ratas. Las ratas

ES 2 280 217 T3

Sprague-Dawley adulto (n=42) se anestesian con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) y se someten a lesión cerebral con percusión de fluido lateral de gravedad moderada (2,4 atm.) centrada en la corteza temporoparietal izquierda (n=18), o tratamiento “simulado” (anestesia y cirugía sin lesión). Los animales se sacrifican a las 1, 6 y 24 h después de la lesión, se retiran los cerebros, y se preparan muestras de tejido de corteza parietal izquierda (CI) lesionada, el área correspondiente en la corteza contralateral derecha (CD), corteza adyacente a la corteza parietal (AI) lesionada, el área adyacente correspondiente en la corteza derecha (AD), hipocampo izquierdo (HI) e hipocampo derecho (HD). El ARN total se aísla y se realizó una hibridación por transferencia Northern y la cantidad de ARNm de IL-1 β en tejido cerebral se presenta como porcentaje con respecto a la radiactividad del ARN de macrófago positivo de IL-1B que se cargó sobre el mismo gel. A 1 h después de la lesión cerebral, se observa un aumento notable y significativo en la expresión del ARNm de IL-1B en CI (20,0 \pm 0,7% de control positivo, n=6, p < 0,05 comparada con el animal simulado), HI (24,5 \pm 0,9%, p < 0,05) y AI (21,5 \pm 3,1%, p < 0,05) en el hemisferio lesionado, que permaneció elevado hasta 6 h después de la lesión en la CI (4,0 \pm 0,4%, n=6, p < 0,05) y HI (5,0 \pm 1,3%, p < 0,05). En los animales simulados o sin tratamiento previo, no se observa expresión del ARNm de IL-1B en ninguna de las áreas cerebrales respectivas. Estos resultados indican que después de una TBI, la expresión temporal del ARNm de IL-1B se estimula regionalmente en zonas cerebrales específicas. Estos cambios regionales en citoquinas, tales como IL-1 B desempeñan un papel después del traumatismo.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado entre el grupo constituido por:

5 4-[[3-(2-bromofenil)-4-oxo-1-(fenilmetil)-2-imidazolidiniliden]imino]-3-hidroxibenzonitrilo;

4-[[7aS)-2-(2-bromofenil)-hexahidro-1-oxo-3H-pirrolol[1,2-c]imidazol-3-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo;

10 4-[[5-(2-bromofenil)-3,3a,4,5-tetrahidro-1,1-dioxido-4-oxoimidazo[1,5-b]isotiazol-6(2H)-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo;

4-[[6R,7aS)-2-(2-bromofenil)-hexahidro-6-hidroxi-1-oxo-3H-pirrolol[1,2-c]imidazol-3-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo;

15 4-[[7aR)-2-(2-bromofenil)-hexahidro-1-oxo-3H-pirrolol[1,2-c]imidazol-3-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo;

4-[(S)-2-(2,3-Dicloro-fenil)-1-oxo-hexahidro-pirrolol[1,2-c]imidazol-3-ilidenamino]-3-hidroxi-benzonitrilo;

20 4-[(R)-2-(2,3-Dicloro-fenil)-1-oxo-hexahidro-pirrolol[1,2-c]imidazol-3-ilidenamino]-3-hidroxi-benzonitrilo;

4-[2-(2,3-Dicloro-fenil)-1-oxo-hexahidro-pirrolol[1,2-c]imidazol-3-ilidenamino]-3-hidroxi-benzonitrilo;

4-[(S)-2-(2-Bromo-fenil)-1-oxo-hexahidro-pirrolol[1,2-c]imidazol-3-ilidenamino]-3-hidroxi-benzonitrilo;

25 4-[(R)-2-(2-Bromo-fenil)-1-oxo-hexahidro-pirrolol[1,2-c]imidazol-3-ilidenamino]-3-hidroxi-benzonitrilo;

4-[2-(2-Bromo-fenil)-1-oxo-hexahidro-pirrolol[1,2-c]imidazol-3-ilidenamino]-3-hidroxi-benzonitrilo, y;

30 4-[[2-(2-bromofenil)-1,5,6,7,8,8a-hexahidro-1-oxoimidazo[1,5-a]piridin-3(2H)-iliden]amino]-3-hidroxibenzonitrilo; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

35 3. El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una patología mediada por quimioquina seleccionada entre psoriasis, dermatitis atópica, artritis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de insuficiencia respiratoria en adultos, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, accidentes cerebrovasculares, choque séptico, choque endotóxico, sepsis por gram negativos, síndrome de choque tóxico, lesión por reperfusión cardiaca y renal, glomerulonefritis, trombosis, reacción de injerto frente al receptor, enfermedad de Alzheimer, rechazos de aloinjertos, malaria, reestenosis, angiogénesis, aterosclerosis, osteoporosis, gingivitis y liberación de células madre hematopoyéticas no deseadas.

45

50

55

60

65