



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 838**

51 Int. Cl.:  
**C07D 209/42** (2006.01)  
**A61K 31/404** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05706935 .3**  
96 Fecha de presentación : **20.01.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1708998**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.10.2006**

54 Título: **Derivados de indol-alanina como agonistas selectivos del S1P4.**

30 Prioridad: **21.01.2004 GB 0401332**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2009**

73 Titular/es: **NOVARTIS AG.**  
**Lichtstrasse 35**  
**4056 Basel, CH**

72 Inventor/es: **Azzaoui, Kamal;**  
**Bouhelal, Rochdi;**  
**Buehlmayer, Peter;**  
**Guerini, Danilo y**  
**Koller, Manuel**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 315 838 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Derivados de indol-alanina como agonistas selectivos del S1P4.

5 La presente invención se refiere a compuestos orgánicos, a un procedimiento para su obtención y a composiciones farmacéuticas que los contienen.

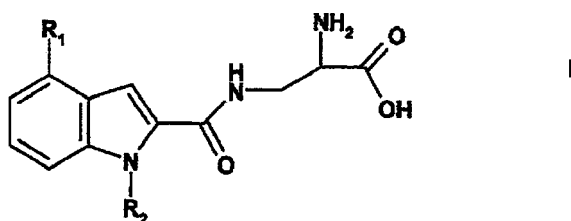
10 La presente invención describe un compuesto, que es un agonista del receptor del esfingosina-1-fosfato (S1P4), cuyo compuesto tiene selectividad para el receptor del S1P4 a través de uno o varios de los receptores del S1P1, del S1P2, del S1P3 o del S1P5. Los receptores del S1P han sido descritos, por ejemplo, en la publicación WO 03/061567. De manera preferente, el compuesto es selectivo para el receptor de S1P4 a través de cada uno de los receptores del S1P precedentemente indicados. El compuesto presenta, de manera preferente, una selectividad de, al menos, un múltiplo de 10, de manera más preferente de un múltiplo de 20, de manera muy especialmente preferente de un múltiplo de 100 para el receptor del S1P4 a través de uno o varios de los receptores del S1P, que han sido citados precedentemente. 15 La selectividad puede ser medida por medio de la determinación de la relación entre la  $EC_{50}$  del compuesto para el receptor del S1P4 y la  $EC_{50}$  del compuesto para el receptor del S1P1, del S1P2, del S1P3 o del S1P5. El valor  $EC_{50}$  puede ser obtenido, por ejemplo, de conformidad con el ensayo de enlace  $GTP\gamma^{35}S$  o por medio del ensayo para la movilización del calcio, que ha sido descrito más adelante. De manera típica, el compuesto presenta, igualmente, un valor  $EC_{50}$  para el receptor del S1P4 de  $1 \mu M$  o por debajo del mismo en el ensayo de enlace  $GTP\gamma^{35}S$  o en el ensayo de movilización del calcio. 20

Los autores M.R. Candelore *et al.* describen en la publicación Biochem. Biophys. Res. Comm. 297, 600 (2002) algunos derivados de esfingosinas-1-fosfato como ligandos, que tienen una elevada afinidad para el receptor del S1P4.

25 La publicación WO 03/105771 describe derivados de aril-oxadiazolazetidina-3-carboxilato y de aril-oxadiazol-pirrolidina-3-carboxilato como agonistas de los S1P.

La publicación WO 03/062252 describe, así mismo, derivados de pirrolidina y derivados de azetidina como agonistas de los S1P y su empleo en el tratamiento de enfermedades y de condiciones inmunodependientes.

30 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un compuesto de la fórmula I



en la que

45  $R_1$  significa fenilo o naftilo, estando substituido el fenilo por uno o por dos halógenos, alquilo con 1 hasta 6 átomos de carbono, alcoxi con 1 hasta 6 átomos de carbono o fenilo-alquilo con 1 hasta 6 átomos de carbono; y

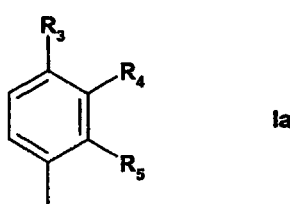
$R_2$  significa hidrógeno o alquilo con 1 hasta 6 átomos de carbono;

50 en estado libre o en forma de sal.

Cada una de las partes alquilo puede ser lineal o ramificada. El alquilo con 1 hasta 6 átomos de carbono es preferentemente alquilo con 1 hasta 4 átomos de carbono. El alcoxi con 1 hasta 6 átomos de carbono es preferentemente alcoxi con 1 hasta 4 átomos de carbono.

55 Halógeno puede significar F, Cl, Br o I.

De manera preferente,  $R_1$  es un grupo de la fórmula Ia:



## ES 2 315 838 T3

en la que

uno o dos de los restos  $R_3$ ,  $R_4$  y  $R_5$  significa hidrógeno; y

5 uno o dos de los restos  $R_3$ ,  $R_4$  y  $R_5$  significa halógeno, alquilo con 1 hasta 6 átomos de carbono, alcoxi con 1 hasta 6 átomos de carbono o fenil-alquilo con 1 hasta 6 átomos de carbono;

o  $R_3$  y  $R_4$ , o  $R_4$  y  $R_5$ , forman un anillo de benceno junto con el átomo de carbono, con el que están enlazados.

10 En la fórmula I y en la fórmula Ia son preferentes los significados siguientes tomados independientemente, de manera colectiva o en cualquier combinación o subcombinación:

a) un  $R_4$  o  $R_5$  es diferente de hidrógeno, de una manera más preferente  $R_5$  es diferente de hidrógeno y  $R_4$  significa hidrógeno,

15 b)  $R_4$  o  $R_5$  significa bencilo, etilo, butoxi, propilo, isopropilo o cloro, de una manera más preferente  $R_5$  significa uno de los grupos mencionados precedentemente y  $R_4$  significa hidrógeno;

b)  $R_3$  significa hidrógeno o cloro, de una manera más preferente significa hidrógeno;

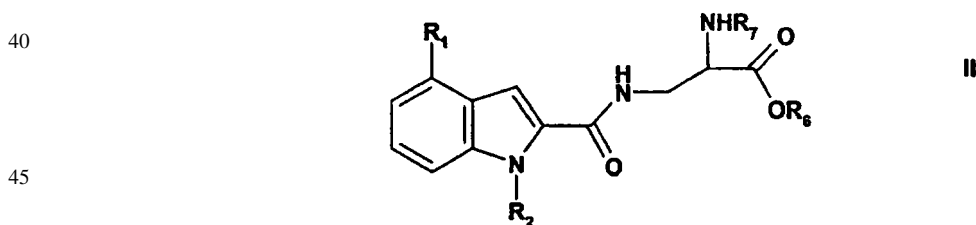
20 c)  $R_2$  significa hidrógeno o metilo.

Los compuestos de la fórmula I pueden formar así mismo sales de adición de ácido con ácidos inorgánicos o ácidos orgánicos, por ejemplo el ácido clorhídrico, el ácido bromhídrico o el ácido maleico. Los compuestos de la fórmula I pueden formar, así mismo, sales catiónicas derivadas del grupo carboxi, de una manera más particular sales con metales alcalinos o sales con metales alcalinotérreos, por ejemplo la sal de sodio, de potasio, de calcio o de magnesio, y sales de amonio derivadas de amoníaco o de aminas orgánicas.

30 Los compuestos de la fórmula I contienen un centro quiral en el átomo de carbono que porta el grupo amino primario. El compuesto de la fórmula I puede existir, por lo tanto, en dos formas enantiómeras. Se entenderá que la presente invención abarca el racemato de la fórmula I y cualquiera forma enantiómera.

Los compuestos de la fórmula I pueden ser obtenidos, así mismo, en forma de sus hidratos. Los hidratos forman, así mismo, parte de la invención.

35 La presente invención proporciona, de la misma manera, un procedimiento para la obtención de los compuestos de la fórmula I, que comprende la desprotección de un compuesto de la fórmula II



en la que

50  $R_1$  y  $R_2$  tienen el significado precedentemente citado,

$R_6$  significa alquilo con 1 hasta 6 átomos de carbono o bencilo,

55  $R_7$  significa un grupo protector de amino, y

si se desea se convierte el compuesto de la fórmula I en una sal del mismo.

60 El procedimiento puede ser llevado a cabo por medio del empleo de métodos convencionales. Ejemplos de grupos protectores de amino adecuados son, por ejemplo, los que han sido descritos en la publicación "Protective Groups in Organic Synthesis" T.W. Greene, J. Wiley & Sons NY, segunda edición, capítulo 7, 1991, y en las referencias contenidas en la misma, por ejemplo acilo, por ejemplo terc.-butiloxycarbonilo, benciloxycarbonilo, 9-flúorenilmetoxycarbonilo, trifluoracetilo, trimetilsililetanosulfonilo y similares. La desprotección puede llevarse a cabo, por ejemplo, por medio de hidrogenolisis, cuando  $R_7$  signifique benciloxycarbonilo y  $R_6$  signifique bencilo. La reacción puede llevarse a cabo en un disolvente orgánico tal como el tetrahidrofurano, el cloruro de metileno o el dioxano a la temperatura ambiente empleándose paladio sobre carbón como catalizador. Cuando  $R_6$  signifique alquilo con 1 hasta 6 átomos de carbono, el procedimiento se lleva a cabo, de manera conveniente, en dos etapas. En la primera etapa puede ser desprotegido el grupo carboxi de un compuesto de la fórmula II por medio de hidrólisis suave por ejemplo con NaOH acuoso

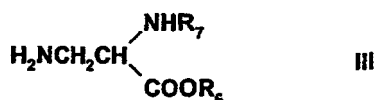
## ES 2 315 838 T3

o con resina intercambiadora de iones básica en un disolvente orgánico tal como el tetrahidrofurano, el dioxano, el metanol o el etanol a la temperatura ambiente. En la segunda etapa se desprotege el grupo amino, por ejemplo con yodotrimetilsilano en cloruro de metileno. Si R<sub>7</sub> significa benciloxicarbonilo puede ser empleada la hidrogenolisis. El procedimiento en dos etapas es empleado, de manera conveniente, cuando uno o dos de los restos R<sub>3</sub> hasta R<sub>5</sub> signifique halógeno.

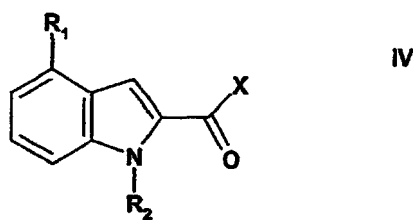
La formación opcional de una sal puede llevarse a cabo de manera convencional.

Una mezcla racémica del compuesto de la fórmula I puede ser separada de manera conocida, por ejemplo empleándose un ácido ópticamente activo como agente de separación. De manera alternativa, puede obtenerse una forma enantiómeramente pura por medio de la utilización de materiales de partida ópticamente activos.

Los compuestos de la fórmula II, empleados como material de partida, pueden ser preparados, por ejemplo, por medio de la reacción de un compuesto de la fórmula III



en la que R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> tienen el significado precedentemente indicado, con un compuesto de la fórmula IV



en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> tienen el significado precedentemente indicado, y X significa un grupo disociable.

La reacción puede llevarse a cabo de manera convencional. Por ejemplo, la reacción puede llevarse a cabo en un disolvente orgánico tal como el cloruro de metileno, a una temperatura comprendida entre -15° y 25°. El grupo disociable X es, por ejemplo, halógeno, especialmente es cloro o hidroxilo.

De manera conveniente, está presente un agente aceptor de ácido, por ejemplo una amina terciaria tal como la piridina.

En tanto en cuanto no se describa de manera particular la obtención de las materias primas para el procedimiento precedentemente indicado, éstas pueden ser obtenidas de manera análoga a la de los compuestos conocidos o de manera análoga a la de los procedimientos aquí descritos.

En los ejemplos siguientes, todas las temperaturas están dadas en grados centígrados y no están corregidas. Los valores  $[\alpha]_D^{20}$  tampoco están corregidos.

### Ejemplo 1

#### 3-(4-(2-Etilfenil)-2-carboxamido-indol)-D-alanina

##### a) Ácido 4-(2-etilfenil)-indol-2-carboxílico

Se añade una solución de 0,300 g del ácido 2-etilfenilborónico, en 3 ml de etanol, a una mezcla constituida por 0,28 g del ácido 4-bromo-indol-2-carboxílico y por 0,069 g de tetraquistrifenilfosfinapaladio en 11 ml de tolueno y por 2 ml de carbonato de sodio 2M. Esta mezcla se hierve bajo reflujo durante 16 horas, se filtra y se acidifica la fase acuosa con HCl 2N y se extrae con acetato de etilo. La concentración de la fase orgánica proporciona el producto en forma de un polvo parduzco, punto de fusión comprendido entre 230 y 233°, suficientemente puro para la etapa siguiente.

## ES 2 315 838 T3

### b) Éster de metilo de la 3-(4-(2-etilfenil)-2-carboxamido-indol)-N(2)-Z-D-alanina

Se añaden 1,41 g de carbonildiimidazol a una solución de 2,11 g del ácido 4-(2-etilfenil)-indol-2-carboxílico en 32 ml de piridina. Una vez concluido el desprendimiento gaseoso, se añaden 2,29 g de N(2)-Z-D-2,3-diaminopropionato de metilo y la mezcla se agita a la temperatura ambiente durante 4 días. Tras evaporación del disolvente, el residuo se extrae con agua/acetato de etilo, la fase orgánica se seca, se concentra y el producto en bruto se cromatografía sobre sílice con acetato de isopropilo/tolueno 4:1, lo que da como resultado el compuesto deseado en forma de un polvo amorfo amarillo.

### c) 3-(4-(2-Etilfenil)-2-carboxamido-indol)-D-alanina

Se agita, a la temperatura ambiente, durante 2 horas, una mezcla de 2,03 g del éster de metilo de la 3-(4-(2-etilfenil)-2-carboxamido-indol)-N(2)-Z-D-alanina, 4,1 ml de NaOH 2N y 10 ml de dioxano. Tras elaboración de manera convencional se disuelve el ácido obtenido en 22 ml de cloruro de metileno y se trata con 1,03 ml de yodotrimetilsilano a 0°C. Tras agitación durante 50 minutos se concentra la mezcla a sequedad y se recoge el residuo en agua. El producto en bruto precipita y se recoge por medio de filtración, se lava con agua y se recrystaliza en agua/isopropanol por medio del ajuste del pH a un valor de 6, por adición de NaOH 0,2N, lo que da por resultado el compuesto del título como polvo blanco, punto de fusión 258 - 265°.

Los compuestos de la fórmula I, en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> están definidos en la tabla 1, pueden ser preparados siguiéndose uno de los procedimientos precedentemente indicados, pero empleándose los productos de partida apropiados.

TABLA 1

Ejemplo	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Punto de fusión (°C)
2	2-Bencil-fenilo	H	220
3	Naftalen-2-ilo	H	226-233
4	Naftalen-1-ilo	H	210
5	2-Etil-fenilo	CH <sub>3</sub>	220
6	2-Butoxi-fenilo	H	210-220
7	2-Propil-fenilo	H	245
8	2-Isopropil-fenilo	H	245-260
9	2,4-Dicloro-fenilo	H	235

Los compuestos descritos en este caso, que son agonistas selectivos del receptor del S1P4 (citados a continuación como compuestos de conformidad con la invención), por ejemplo los compuestos de la fórmula I, en estado libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, presentan propiedades farmacológicas valiosas, por ejemplo propiedades para la modulación de la recirculación de los linfocitos, por ejemplo como se ha indicado en ensayos *in vitro* e *in vivo* y, por lo tanto, están indicados para la terapia. En particular, los compuestos de conformidad con la invención son adecuados como agonistas funcionales de los receptores del S1P4 (EDG6) humanos, como se ha demostrado en los ensayos siguientes.

### Ensayos para la determinación de la farmacología *in vitro* de los compuestos S1P4

#### a) Vector de expresión que codifica receptores humanos de los S1P

Se obtiene un vector de expresión para el gen S1P4 humano (HSEDG4; número de acceso a la GenBank AJ000479) fusionado en el extremo C con la cola péptida c-myc, como se ha descrito en la publicación de Van Brocklyn *et al.* 2000, Blood 95(8), 2624. Se clona el ADN codificante de la proteína de fusión S1P4-myc en el vector de expresión de mamífero pRc/CMV (Invitrogen), que proporciona resistencia a G418 para la selección de las células estables de mamíferos. Se determina en ambos patrones la secuencia de ADN del inserto S1P4. Se encuentran diferencias no

## ES 2 315 838 T3

nucleótidas, que conducirían a cambios de aminoácidos en comparación con la entrada de la GenBank para HSEGD4. Se inserta el S1 P4-myc ADNc en el vector pRc/CMV empleándose HindIII/XbaI.

Son empleados los vectores siguientes:

5

Se inserta en el vector ADNpc 3.1 el S1P1 humano (número de acceso a la GenBank™ M31210) y el S1P3 humano (número de acceso a la GenBank™ X83864) ADNc, que contiene la secuencia myc, delante de las secuencias humanas S1P1 y S1P3. Los vectores son secuenciados para su finalización con objeto de confirmar la exactitud del constructo. El S1P2 humano (GI: 4090955, TREMBL:0195136) es clonado con ayuda de un método, que está basado en la reacción en cadena de polimerasa (RCP). Se obtiene (BD Biosciences Chontech, Palo Alto, CA 94303, USA) ADNc pulmonar (marathon cDNA). Para la reacción RCP se utilizan los siguientes oligonucleótidos: cebador ascendente (en el sentido 3'-hacia-5') CAC CAT GGG CAG CTT GTA CTC GGA GTA CCT GAA CCC CAA CAA GGT CCA G (1 hasta 45, número de acceso a la GenBank™ AF034780) y el cebador descendente (en el sentido 5'-hacia-3') 5'-GAT TCA GAC CAC CGT GTT GCC CTC CAG (1062 hasta 1039, número de acceso a la GenBank™ AF034780), se han subrayado el comienzo de la traducción (ATG) y el codón de terminación. La RCP se lleva a cabo en presencia de 0,2 hasta 0,4  $\mu$ g de ADNc, 1x de tampón de reacción (10 x tampón de PfuTurbo ADN polimerasa, Stratagene, La Jolla, CA 92037, USA), 0,5  $\mu$ M de cebadores, 0,25 mM de los dNTP y 2,5 unidades de PfuTurbo ADN polimerasa (Stratagene), en la primera etapa a 95°C durante 2 minutos, 30 ciclos (30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 90 segundos a 72°C) y etapa final durante 10 minutos a 72°C. El producto amplificado aproximadamente en 1.100 bp se analiza por medio de electroforesis de gel de agarosa normalizada. Tras la clonación del producto de la RCP en el ADNpc 3.1 Topo V (Invitrogen Corporation) se secuenciaron insertos de ADN procedentes de diversas colonias bacterianas. La secuencia final se ensambla a partir de tres preparaciones plásmidas independientes que están secuenciadas en ambos sentidos.

Se clona el S1P5 humano (GI: 30171332 o número de acceso a la GenBank™ AY262689, TREMBL: Q9H228) con ayuda de un método basado en la RCP. Se adquiere ADNc pulmonar y del bazo (marathon cADN) de la firma BD Biosciences Chlontech (BD Biosciences Chlontech, Palo Alto, CA 94303, USA); se aísla el ADN genómico a partir de células HeLa, empleándose procedimientos normalizados. A continuación se utilizan oligonucleótidos procedentes de la reacción RCP: cebador ascendente (en el sentido 3'-hacia-5') CAC CAT GGA GTC GGG GCT GCT GCG (-4 hasta 20, número de acceso a la GenBank™ AY262689) y cebador descendente (en el sentido 5'- hacia-3') 5'-TCA GTC TGC AGC CGG TTC TGA TAC CAG AGT C (1197 hasta 1131, AY262689), se han subrayado el comienzo de la traducción (ATG) y el codón de terminación. La RCP se lleva a cabo en presencia de 0,2 hasta 0,4  $\mu$ g de ADNc, 1x de tampón de reacción (10x de tampón de PfuTurbo ADN polimerasa, Stratagene, La Jolla, CA 92037, USA), 0,5  $\mu$ M de cebadores, 0,25 mM de los dNTP y 2,5 unidades de PfuTurbo ADN polimerasa (Stratagene), una primera etapa a 95°C durante 2 minutos, 30 ciclos (30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 90 segundos a 72°C) y etapa final de 10 minutos a 72°C. Se analiza el producto amplificado aproximadamente en 1.100 bp por medio de la electroforesis de gel de agarosa normalizada. Tras la clonación de los productos de la RCP en el ADNpc 3.1 Topo V (Invitrogen Corporation) se secuencian los insertos de ADN procedentes de diversas colonias bacterianas. La secuencia final está ensamblada a partir de tres preparaciones plásmidas independientes, que están secuenciadas en ambos sentidos.

40 b) *Desarrollo de la línea celular CHO-K1 que expresa de manera estable al S1P4*

Con el fin de desarrollar líneas celulares estables, que expresen el receptor radioisotopizado de S1 P4 c-myc se cortan 5  $\mu$ g del plásmido pRc/CMV myc-S1P4 empleándose la endonucleasa de restricción PvuI, que lleva a cabo un cribado del plásmido. A continuación, se precipita el plásmido linealizado, empleándose una concentración final de 0,3 M de acetato de sodio, pH 5,0 y 66% de etanol. Tras centrifugación y lavado, se disuelve el pellet de ADN en 30  $\mu$ l de agua. Para la transfección se disponen sobre placas células de CHO-K1 (ATCC número: CCL-61) en medio MEM  $\alpha$  (modificación alfa del medio esencial mínimo) que contiene un 10% de FCS (suero de ternera fetal) el día previo a la transfección con una densidad celular de  $1 \times 10^6$  células por pocillo de discos de cultivo de células de 100 mm (Falcon) y se incuban a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas. El día de la transfección se añadieron 5  $\mu$ g del plásmido linealizado pRc/CMV myc-S1 P4 a 270  $\mu$ l de medio RPMI. Tras adición de 60  $\mu$ l de reactivo de transfección SuperFect (Qiagen) a la solución del ADN y realización de la mezcla durante 10 segundos, se incubó la muestra durante 10 minutos para permitir la formación del complejo. El complejo ADN-SuperFect se mezcla con otros 3 ml de RPMI/10% FCS y, a continuación, se transfiere a las monocapas celulares. El medio de transfección se elimina al cabo de 3 horas de incubación y se lavan las células con PBS. Se añade medio RPMI fresco suplementado con un 10% de FCS y se incuban las células durante 72 horas a 37°C y con un 5% de CO<sub>2</sub>. Se lleva a cabo la selección de los clones transformados de manera estable tras adición de 500  $\mu$ g/ml de G418 (Lifetechnologies). Al cabo de 12 a 14 días se obtienen los clones celulares por medio de la clasificación de las células individuales de conformidad con sus características de dispersión ascendente y lateral en pocillos individuales de una placa de cultivo celular con 96 pocillos empleándose un clasificador celular FACStar Plus (BectonDickinson). Los clones individuales, que crecen tras el procedimiento de clasificación y de selección, son expandidos y finalmente se selecciona un clon basado en el nivel de expresión S1P4 ARNm determinado con ayuda del análisis cuantitativo TaqMan por medio de la RCP.

c) *Mantenimiento del cultivo celular*

65 Se mantienen células parenterales CHO-K1 en medio RPMI (Lifetechnologies), suplementado con un 10% de FBS y con 10  $\mu$ g/ml de gentamicina (Lifetechnologies). Se mantienen en medio alfa MEM, suplementado con un 10% de FBS, 10  $\mu$ g/ml de gentamicina y 0,5 mg/ml de G418 (Lifetechnologies) células CHO-K1 transfectadas con S1 P4/myc, que incluyen el clon que ha sido seleccionado finalmente.

## ES 2 315 838 T3

### d) Determinación del nivel de transcripción SIP4 en clones estables CHO

Con ayuda del mini estuche RNeasy (Qiagen) se aísla el ARN total a partir de las células. Tras la disrupción de las células (cultivadas en una monocapa) directamente en discos de cultivo (se usan 350  $\mu$ l de tampón por disco de 35 mm, preparado de conformidad con el protocolo de la firma Qiagen), el lisato es introducido por medio de una pipeta en una columna giratoria QIAshredder y se centrifuga durante 2 minutos a 21.000 xg. Se añaden 350  $\mu$ l de etanol al 70% a la corriente saliente, se mezclan perfectamente, se aplican a una minicolumna RNeasy y se centrifuga durante 15 segundos a 10.000 xg. Se descarga la corriente saliente, se añaden 700  $\mu$ l de tampón RW1 (Qiagen) a la columna RNeasy y se centrifuga durante 15 segundos para enjuagar la columna. A continuación, se lava la columna por medio de dos adiciones de 500  $\mu$ l, cada una, de tampón RPE (Qiagen) y se lleva a cabo una centrifugación durante 15 segundos a 10.000 xg. El ARN es eluido por medio de la adición de 30 hasta 50  $\mu$ l de agua exenta de RNasa directamente en la columna RNeasy y se centrifuga durante 1 minuto a 10.000 xg.

El ARN se somete a un tratamiento con transcriptasa inversa con el estuche Omniscript de la firma Qiagen (Qiagen). Se mezclan aproximadamente 2  $\mu$ g de ARN con 2  $\mu$ l de tampón 10 x, 2  $\mu$ l de dNTP Mix, 1  $\mu$ l de inhibidor de la RNasa (10 unidades/ $\mu$ l), 0,5  $\mu$ g de hexámeros aleatorio, 1  $\mu$ l de transcriptasa inversa Omniscript y agua exenta de RNasa para dar un volumen final de 20  $\mu$ l, e incubación a 37°C durante 60 minutos y durante otros 30 minutos a 42°C. La reacción es inactivada durante 5 minutos a 93°C, se enfría sobre hielo y se almacena a -20°C hasta su utilización.

Para determinar los niveles de transcripción relativa del SIP4 ARNm en los clones seleccionados, se lleva a cabo un análisis en tiempo real por medio de la RCP (reacción en cadena de polimerasa). Se determinan el cebador opcional y las concentraciones de la muestra como se ha descrito en el boletín del usuario proporcionado por la firma PE (Perkin/Elmer) Biosystems empleándose un plásmido que contiene S1 P4 humano como matriz. Se efectúa un seguimiento de los oligonucleótidos S1 P4 humanos, así como de sus concentraciones optimizadas para la RCP en tiempo real (basada en HSEDG4; número de acceso a la GenBank AJ000479):

Cebador muestra	Marcador	Secuencia	Concentración optimizada
Cebador ascendente	Ausente	AACTGCCTGTGCGCCTTT	50 nM
Cebador descendente	Ausente	GAGGATGTAGCGCTTGGAGTAGA	900 nM
Muestra	5'-FAM, 3'TAMRA	ACCGCTGCTCCAGCCTTCTG	100 nM

A continuación, se utiliza la primera hebra de ADNc para la RCP cuantitativa en la máquina AB17700 TaqMan (PE Biosystems). Como un control interno de la cantidad de ARN presente en cada muestra, se utiliza ARN 18S ribosómico por medio de la multiplexación de la reacción RCP del S1 P4 con la RCP de ARN ribosómico en el mismo tubo, empleándose los reactivos de control de ARN ribosómico TaqMan (PE Biosystems, P/N4308310, muestra marcada con VIC). Aún cuando no se ha determinado formalmente una eficiencia similar de las dos amplificaciones independientes para SIP4 y para ARN ribosómico, la determinación semicuantitativa de los niveles de transcripción S1 P4 en los diferentes clones celulares es suficiente para poderse caracterizar, ulteriormente en ensayos funcionales, la selección de los clones celulares.

### e) Preparación de membranas

Se preparan proteínas de membrana a partir del tipo natural CHO-K1 y de clones celulares CHO que expresan el SIP4 humano. Para obtener entre 10 y 30 mg de proteínas de membrana, se cultivan células en un disco de cultivo grande (500 cm<sup>2</sup>) por clon celular con una confluencia comprendida entre el 80 y el 90%. El medio de cultivo se retira

## ES 2 315 838 T3

y las células son recolectadas sobre hielo, a partir del disco, por medio de un raspado en 20 ml de HEPES frío 10 mM (pH 7,5) suplementado con un 0,1% de ácido graso-albúmina de suero bovino libre (BSA) y con cóctel de inhibidores de proteasa (una tableta por cada 50 ml, Roche Diagnostics, Rotkreuz). Las células son centrifugadas a 750 xg durante 10 minutos a 4°C y se vuelven a suspender en 10 ml de tampón de membrana frío (HEPES 20 mM, pH 7,4; NaCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; EDTA 1 mM; BSA 0,1% y cóctel de inhibidores de proteasa). La suspensión de las células se homogeneiza sobre hielo, empleándose un homogeneizador Polytron a 25.000 revoluciones por minuto en tres intervalos de 20 segundos cada uno. El homogenato es centrifugado a 26.900 xg durante 30 minutos a 4°C y el pellet de la proteína de membrana se vuelve suspender por medio de turboagitación en 2 ml de tampón de membrana frío. Se determinan las concentraciones en proteína, empleándose el ensayo para proteínas Bio Rad y empleándose como patrón el IgG humano. El volumen de la suspensión de la proteína de membrana se ajusta para dar como resultado una concentración final comprendida entre 2 y 3 mg de proteína/ml. La solución se homogeneiza entonces una vez más (Polytron) sobre hielo a 25.000 revoluciones por minuto durante 20 segundos como paso previo a ser dividida en partes alícuotas en tubos de Eppendorf con un volumen comprendido entre 0,8 y 1 ml.

15 f) *Medidas de la actividad de las células que expresan hS1 P4*

f1) *Ensayo de enlace de GTPγ<sup>35</sup>S*

20 La selección de los clones, que deben ser ensayados en el ensayo GTPγS, está basada en ensayos de RCP en tiempo real. En este experimento son empleados clones CHO que expresan grandes cantidades de S1P4 humano. Las proteínas de membrana se preparan como se ha descrito precedentemente. El protocolo básico para el ensayo empleado de enlace GTPγ<sup>35</sup>S está descrito en una publicación reciente (Brinkmann *et al.* 2002, J. Biol. Chem, 277, 21453) con las modificaciones que han sido descritas más adelante. Para caracterizar el enlace GTPγ<sup>35</sup>S con las proteínas de membrana procedentes de las células CHO que expresan S1 P, se emplearon perlas de PVT revestidas con WGA (perla SPA, Amersham Biosciences). Puesto que los rayos β del GTPγ<sup>35</sup>S tienen una penetración significativa en solución acuosa, las placas son centrifugadas para minimizar los efectos no específicos provocados por el GTPγ<sup>35</sup>S no enlazado. El ensayo se lleva a cabo en Optiplacas (Packard, Cat. Nº 6005190) con 96 pocillos con un volumen final de 225 μl/pocillo. Tras una breve homogeneización, las proteínas de membrana son suspendidas de nuevo a diversas concentraciones (entre 25 y 150 μg/ml) en HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 20 μg/ml de saponina (Riedel-de-Haen: Cat. Nº 16109), 0,1% de grasa libre BSA (Sigma Cat. Nº A0281) pH 7,4. Las membranas de proteína se mezclan con 1 mg/pocillo de perla SPA, 10 μM de GDP, diversas concentraciones de agonistas y se incuban durante 10 a 15 minutos a la temperatura ambiente. La reacción de enlace GTPγ<sup>35</sup>S se inicia por medio de la adición de 200 pM de GTPγ<sup>35</sup>S (Amersham, Cat. Nº SJ1308, >1000 Ci/mmol). Las Optiplacas son selladas e incubadas a temperatura ambiente durante 110 a 120 minutos con aplicación constante de sacudidas. A continuación se centrifugan las placas durante 10 minutos a 2.000 revoluciones por minuto y se cuentan con un instrumento TopCount (Packard). Se llevan a cabo los cálculos de las EC<sub>50</sub> con un programa de ajuste con regresión no lineal, que está disponible en el paquete de programa informático Origin 7 RS2 (Origin Lab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060, USA).

40 f2) *Ensayo de movilización del calcio*

45 Se distribuyen células CHO en la placa negra Costar (96 o 384 pocillos, 50.000 células o 12.500 células, respectivamente) en α MEM con FCS y se cultivan durante 20 a 24 horas a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub>. Una vez eliminadas del medio de cultivo, las células son incubadas en medio HBSS que contiene 2 μM de Fluo4AM (Molecular Probes, Cat. No, F-1241; 1 mg/ml almacenado en DMSO), 5 mM de probenecida, durante 1 hora a 37°C, se enjuagan con tampón HBSS, 2,5 mM de probenecida y se cubren con el mismo medio (75 μl para placas de 96 pocillos, 50 μl para 384 placas). Las placas son transferidas al FLIPR. Tras la medición de la línea de base durante 40 segundos, se añade el agonista en HBSS y se mide la fluorescencia a intervalos de 2 segundos durante 3 a 5 minutos. En algunos casos las células son sometidas a un tratamiento previo durante 5 horas con 50 ng/ml de la toxina pertussis (Sigma, Cat Nr P2980). Se añade directamente al medio celular, entre 20 y 40 minutos antes de llevarse a cabo las mediciones, borato de 2-aminoetoxidifenilo (2-APB, Calbiochem, Juro Supply, Bleicherstr. 11, Lucerne, Suiza, Cat Nr 100065), que es un bloqueador de la liberación del calcio a partir del retículo endoplásmico (Ascher-Landsberg *et al.*, 1999, Biochem. Biophys. Res. Commun. 264, 979), con una concentración de 50 μM y/o de 150 μM. Los cálculos de la EC<sub>50</sub> se llevan a cabo empleándose un programa con ajuste de regresión no lineal, proporcionado por el paquete de programa informático Origin 7 RS2 (Origin Lab Corporation), que se encuentra a disposición de Novartis.

60 *Determinación in vitro de la especificidad y de la selectividad de los agonistas de S1P4*

65 Los compuestos citados en esta solicitud son ensayados con respecto a la especificidad, es decir con respecto a la actividad que tienen en la línea celular parental, como paso previo a la transformación con el S1 P4 ADNc y con respecto a la selectividad sobre las líneas celulares CHO transformadas con el S1P1, el S1P2, el S1P3 y el S1P5. La generación de líneas celulares estables para los otros receptores del S1 P se lleva a cabo como se ha descrito para el S1P4, empleándose secuencias de ADNc humano publicadas, como se ha descrito precedentemente. De manera preferente, se eligen aquellos compuestos que presenten una selectividad y una especificidad de 100x. A título de ejemplo, los compuestos específicos y selectivos para el S1P4 pueden tener una EC<sub>50</sub> (EC<sub>50</sub> aparente) medida como

## ES 2 315 838 T3

S1P4 que sea 10x, preferentemente 100 x menor que la medida en el tipo natural de las células CHO o en la célula que exprese uno cualquiera de los otros cuatro receptores S1P.

A título de ejemplo, si se mide una  $EC_{50}$  de 200 nM para S1P4, las  $EC_{50}$  en las células CHO o en las células CHO que expresen S1P1,2,3,5 es preferentemente  $\geq 20 \mu M$ . El compuesto del ejemplo 1 tiene una  $EC_{50}$  para S1P4 en este ensayo de 432 nM.

En la tabla 2, siguiente, están indicados los valores  $EC_{50}$  (en  $\mu M$ ) para el compuesto del ejemplo 2 en las células CHO o en las células CHO, que expresen varios receptores de S1P:

TABLA 2

	<u>CHO</u>	<u>S1P1</u>	<u>S1P2</u>	<u>S1P3</u>	<u>S1P4</u>	<u>S1P5</u>
<b>Ensayo de movilización del calcio</b>	>6	>6	>6	>6	0,01	2,4
<b>Ensayo de enlace de <math>GTP\gamma S</math></b>	>10	>10	>10	>10	0,25	>10

Así pues, los compuestos, de conformidad con la invención, son útiles para el tratamiento y/o para la prevención de enfermedades o de desórdenes inducidos por interacciones linfocíticas, por ejemplo en el trasplante, tal como el rechazo agudo o crónico de los aloinjertos o de los xenoinjertos de células, de tejidos o de órganos o en la función de injerto retardada, en el injerto frente a las enfermedades del huésped, de las enfermedades autoinmunes, por ejemplo la artritis reumatoide, el lupus sistémico eritematoso, la tiroiditis de Hashimoto, la esclerosis múltiple, la miastenia grave, las diabetes de tipo I o II y los desórdenes asociados con la misma, la vasculitis, la anemia perniciosa, el síndrome de Sjogren, la uveítis, la psoriasis, la oftalmopatía grave, la alopecia areata y otras, las enfermedades alérgicas, por ejemplo el asma alérgico, la dermatitis atópica, la rinitis/la conjuntivitis alérgica, la dermatitis alérgica por contacto, las enfermedades inflamatorias opcionalmente con reacciones aberrantes subyacentes, por ejemplo las enfermedades inflamatorias del intestino, la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerativa, el asma intrínseco, la lesión pulmonar inflamatoria, la lesión hepática inflamatoria, la lesión glomerular inflamatoria, la aterosclerosis, la osteoartritis, la dermatitis por contacto irritante y otras dermatitis eczematosas, la dermatitis seborreica, las manifestaciones cutáneas de desórdenes inmunodependientes, la enfermedad inflamatoria del ojo, la queratoconjuntivitis, la miocarditis o la hepatitis, la lesión por isquemia/reperfusión, por ejemplo el infarto de miocardio, el ictus, la isquemia benigna, la insuficiencia renal o el choque hemorrágico, el choque traumático, otros, el cáncer, por ejemplo los linfomas de las células T o las leucemias de las células T, las enfermedades infecciosas, por ejemplo el choque tóxico (por ejemplo inducido por superantígenos), el choque séptico, el síndrome de la insuficiencia respiratoria adulta o las infecciones virales, por ejemplo el SIDA, la hepatitis viral o la infección bacteriana crónica. Ejemplos de trasplantes de células, de tejidos o de órganos sólidos incluyen, por ejemplo, las isletas pancreáticas, las células madre, la médula ósea, el tejido corneal, el tejido neuronal, el corazón, el pulmón, el trasplante combinado de corazón y de pulmón, de riñón, de hígado, de intestino, de páncreas, de traquea o de esófago.

La dosis necesaria para los usos, que han sido citados precedentemente, dependerá, naturalmente, del método de administración, de la condición particular que debe ser tratada y del efecto deseado. En general, se ha indicado que se obtienen resultados satisfactorios de manera sistemática con dosis diarias comprendidas entre aproximadamente 0,03 y 2,5 mg/kg de peso corporal. Una dosis diaria indicada en un mamífero superior, por ejemplo en los seres humanos, se encuentra en el intervalo comprendido entre aproximadamente 0,5 mg y aproximadamente 100 mg, administrada de manera conveniente, por ejemplo en dosis individuales cuatro veces al día o de forma retardada. Las formas de dosificación unitaria adecuadas destinadas a la administración oral comprenden desde aproximadamente 1 hasta 50 mg de ingrediente activo.

Los compuestos, de conformidad con la invención, pueden ser administrados por cualquier vía convencional, en particular por vía enteral, por ejemplo oral, por ejemplo en forma de tabletas o de cápsulas, o por vía parenteral, por ejemplo en forma de soluciones inyectables o de suspensiones inyectables, por vía tópica, por ejemplo en forma de lociones, de geles, de ungüentos o de cremas, o en una forma nasal o en una forma de supositorio. Las composiciones farmacéuticas, que comprenden un compuesto de conformidad con la invención, en estado libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, en asociación con, al menos, un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, pueden ser preparadas de manera convencional por mezcla con un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos de conformidad con la invención pueden ser administrados en estado libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo como se ha indicado más arriba. Dichas sales pueden ser preparadas de manera convencional y presentan el mismo orden de actividad que los compuestos libres.

## ES 2 315 838 T3

De conformidad con lo que se ha indicado precedentemente, la presente invención describe:

- 5 1.1 Un procedimiento para la prevención o para el tratamiento de desórdenes o de enfermedades inducidas por los linfocitos, por ejemplo como las que se han indicado precedentemente, en un sujeto que necesite de dicho tratamiento, cuyo procedimiento comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad efectiva de un compuesto de conformidad con la invención, por ejemplo de un compuesto de la fórmula I, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 10 1.2 Un procedimiento para la prevención o para el tratamiento de rechazo agudo o crónico de trasplante o de las enfermedades inflamatorias o autoinmunes inducidas por las células T, por ejemplo como las que se han indicado precedentemente, a un sujeto que necesite de dicho tratamiento, cuyo procedimiento comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad efectiva de un compuesto de conformidad con la invención, por ejemplo de un compuesto de la fórmula I, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 15 2. Un compuesto de conformidad con la invención, por ejemplo un compuesto de la fórmula I, en estado libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable para su utilización como producto farmacéutico, por ejemplo en cualquiera de los procedimientos indicados en los apartados 1.1 o 1.2 precedentes.
- 20 3. Una composición farmacéutica, por ejemplo para ser usada en cualquiera de los procedimientos indicados en los apartados 1.1 o 1.2 precedentes, que comprende un compuesto de conformidad con la invención, por ejemplo un compuesto de la fórmula I, en estado libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, en asociación con un diluyente o excipiente del mismo, farmacéuticamente aceptable.

25 Los compuestos de conformidad con la invención, por ejemplo un compuesto de la fórmula I, pueden ser administrados como único ingrediente activo o en combinación con otros fármacos, por ejemplo a título de adyuvantes, por ejemplo agentes inmunosupresores o inmunomoduladores u otros agentes antiinflamatorios, por ejemplo para el tratamiento o para la prevención del rechazo agudo o crónico del aloinjerto o del xenoinjerto o de los desórdenes inflamatorios o autoinmunes, o un agente quimioterapéutico, por ejemplo un agente antiproliferante de las células malignas. A título de ejemplo, los compuestos de conformidad con la invención pueden ser empleados en combinación  
30 con un inhibidor de la calcineurina, por ejemplo la ciclosporina A o FK 506; con un inhibidor mTOR, por ejemplo la rapamicina, la 40-O-(2-hidroxietyl)-rapamicina, el CCI779 o el ABT578; una ascomicina, que tiene propiedades inmunosupresoras, por ejemplo el ABT-281, el ASM981, etc.; con corticoesteroides; con la ciclofosfamida; con el azatiopreno; con el metotrexato; con la leflunomida; con la mizoribina; con el ácido micofenólico; con el micofenolato mofetil; con la 15-deoxiespergualina o un homólogo, un análogo o un derivado inmunosupresor de los mismos;  
35 con los anticuerpos monoclonales inmunosupresores, por ejemplo con los anticuerpos monoclonales de los receptores de los leucocitos, por ejemplo MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD40, CD45, CD58, CD80, CD86 o con sus ligandos; con otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo con una molécula enlazante de manera recombinante, que tenga, al menos, una porción del dominio extracelular de CTLA4 o un mutante del mismo, por ejemplo una porción, al menos extracelular, de CTLA4 o un mutante del mismo junto con una secuencia proteica no-CTLA4, por ejemplo CTLA4Ig (por ejemplo denominada ATCC 68629) o un mutante de la misma, por ejemplo LEA29Y; con inhibidores de las moléculas de adhesión, por ejemplo los antagonistas de LFA-1, los antagonistas de ICAM-1 o de ICAM-3m, los antagonistas de VCAM-4 o los antagonistas de VLA-4; o con un agente quimioterapéutico, por ejemplo el paclitaxel, la gemcitabina, el cisplatino, la doxorrubicina o el 5-flúoruracilo.

45 Cuando sean administrados los compuestos, de conformidad con la invención, por ejemplo cuando sea administrado un compuesto de la fórmula I, en conjunción con otra terapia inmunosupresora/inmunomoduladora, antiinflamatoria o quimioterapéutica, se efectuarán, naturalmente, las dosificaciones del compuesto inmunosupresor, inmunomodulador, antiinflamatorio o quimioterapéutico, que sea administrado de manera simultánea, en función del tipo del cofármaco empleado, por ejemplo cuando se trate de un esteroide o de un inhibidor de la calcineurina, o del fármaco específico empleado, de la condición que debe ser tratada, etc. De conformidad con lo que se ha indicado precedentemente, la presente invención describe, así mismo, además:

- 55 4. Un procedimiento como se ha definido precedentemente que comprende la coadministración, es decir la administración concomitante o en secuencia una cantidad no tóxica terapéuticamente efectiva de un compuesto de conformidad con la invención, por ejemplo de un compuesto de la fórmula I y de, al menos, una segunda sustancia farmacéutica, por ejemplo un fármaco inmunosupresor, inmunomodulador, antiinflamatorio o quimioterapéutico, por ejemplo como se ha indicado precedentemente;
- 60 5. Una combinación farmacéutica, por ejemplo un estuche, que comprende a) un primer agente, que es un compuesto de conformidad con la invención, por ejemplo un compuesto de la fórmula I, como se ha descrito en esta descripción, en estado libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, y b) al menos un coagente, por ejemplo un fármaco inmunosupresor, inmunomodulador, antiinflamatorio o quimioterapéutico. El estuche puede comprender instrucciones para su administración.

65 El término “coadministración” o “administración combinada” o similar, tal como se ha utilizado en esta descripción, significa la circunscripción de la administración de los agentes terapéuticos seleccionados a un único paciente, e incluye regímenes de tratamiento en los que los agentes no sean administrados necesariamente por la misma vía de administración o al mismo tiempo.

## ES 2 315 838 T3

El término “combinación farmacéutica” como se utiliza en esta descripción significa un producto que resulta de la mezcla o de la combinación de más de un ingrediente activo e incluye tanto las combinaciones fijadas como las combinaciones no fijadas de los ingredientes activos. El término “combinación fijada” significa que los ingredientes activos, por ejemplo un compuesto de conformidad con la invención y un coagente, son administrados a un paciente de manera simultánea en forma de una entidad o de una dosificación individual. El término “combinación no fijada” significa que los ingredientes activos, por ejemplo un compuesto de conformidad con la invención y un coagente, son administrados a un paciente como entidades independientes bien de manera simultánea, bien de manera concurrente o bien de manera secuencial sin límites de tiempo específicos, cuando una administración de este tipo proporcione niveles terapéuticos efectivos de los 2 compuesto en el cuerpo del paciente. Esto último se refiere así mismo a la terapia en forma de cóctel, por ejemplo a la administración de 3 o de más ingredientes activos.

15

20

25

30

35

40

45

50

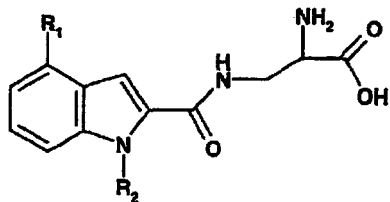
55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula I



I

en la que

R<sub>1</sub> significa fenilo o naftilo, estando substituido el fenilo por uno o por dos halógenos, significa alquilo con 1 hasta 6 átomos de carbono, alcoxi con 1 hasta 6 átomos de carbono o fenil-alquilo con 1 hasta 6 átomos de carbono; y

R<sub>2</sub> significa hidrógeno o alquilo con 1 hasta 6 átomos de carbono;

en estado libre o en forma de hidrato o de sal.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, que se elige entre

la 3-(4-(2-etilfenil)-2-carboxamido-indol)-alanina,

la 3-(4-(2-bencil-fenil)-2-carboxamido-indol)-alanina,

la 3-(4-(naftalen-2-il)-2-carboxamido-indol)-alanina,

la 3-(4-(naftalen-1-il)-2-carboxamido-indol)-alanina,

la 3-(4-(2-butoxi-fenil)-2-carboxamido-indol)-alanina,

la 3-(4-(2-propil-fenil)-2-carboxamido-indol)-alanina,

la 3-(4-(2-isopropil-fenil)-2-carboxamido-indol)-alanina y

la 3-(4-(2,4-dicloro-fenil)-2-carboxamido-indol)-alanina,

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

3. Un compuesto según la reivindicación 2 que está constituido por la 3-(4-(2-etilfenil)-2-carboxamido-indol)-D-alanina, en estado libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

4. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en estado libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, para su utilización como producto farmacéutico.

5. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en estado libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, en asociación con un diluyente o excipiente del mismo, farmacéuticamente aceptable.

6. Utilización de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en estado libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, o una composición farmacéutica según la reivindicación 5 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento o a la prevención de desórdenes o de enfermedades inducidas por linfocitos, el rechazo agudo o crónico de los trasplantes, las enfermedades inflamatorias o autoinmunes inducidas por las células T, la diabetes, las enfermedades alérgicas, la miocarditis, la hepatitis, las lesiones producidas por isquemia/reperusión, la insuficiencia renal, el choque hemorrágico, el choque traumático, el cáncer o las enfermedades infecciosas.

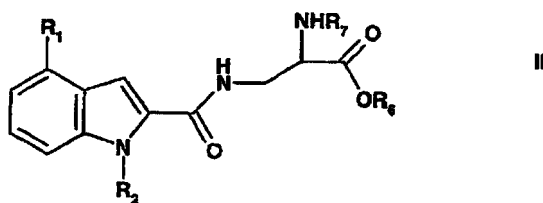
7. Una combinación farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en estado libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable y otro agente elegido entre los agentes farmacéuticos inmunosupresores, inmunomoduladores, antiinflamatorios y quimioterapéuticos.

## ES 2 315 838 T3

8. Un procedimiento para la obtención del compuesto según la reivindicación 1, que comprende la desprotección de un compuesto de la fórmula II

5

10



en la que

15

$R_1$  y  $R_2$  se definen como en la reivindicación 1,

$R_6$  significa alquilo con 1 hasta 6 átomos de carbono o bencilo,

20

$R_7$  significa un grupo protector de amino,

y, de manera opcional, la conversión del compuesto de la fórmula I, obtenido en estado libre en una forma salina o viceversa.

25

9. Un compuesto para el tratamiento o para la prevención de los desórdenes o de las enfermedades inducidas por los linfocitos, el rechazo agudo o crónico de los trasplantes, las enfermedades inflamatorias o autoinmunes inducidas por las células T, la diabetes, las enfermedades alérgicas, la miocarditis, la hepatitis, las lesiones producidas por isquemia/reperfusión, la insuficiencia renal, el choque hemorrágico, el choque traumático, el cáncer o las enfermedades infecciosas, en un sujeto que necesite dicho tratamiento, cuyo compuesto es un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30

35

40

45

50

55

60

65