

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 015 206**

51 Int. Cl.:

C07C 309/14 (2006.01)

A61K 31/205 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2012** **E 19166502 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2025** **EP 3597634**

54 Título: **Ácidos sulfónicos oxigenados que contienen amonio y su uso médico**

30 Prioridad:

26.05.2011 EP 11167731

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

30.04.2025

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 3 015 206 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

Ácidos sulfónicos oxigenados que contienen amonio y su uso médico

La presente invención se refiere a derivados de ácido sulfónico oxigenados que contienen amino o amonio, concretamente los compuestos de fórmula 1a, 1b, 1c, 1d o 1e, y a su uso médico.

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

- 10 Akt a su vez es responsable de la regulación de la función de muchas proteínas celulares implicadas en procesos tales como transcripción, proliferación y apoptosis celular (muerte celular programada), angiogénesis, motilidad celular y metabolismo de la glucosa (Kulik *et al.*, Mol Cell Biol. 17:1595-1606 (1997); Franke *et al.*, Cell 88:435-437 (1997); Kaufmann-Zeh *et al.*, Nature 385:544-548 (1997); Hemmings, Science 275:628-630 (1997); Dudek *et al.*, Science 275:661-665 (1997)). La ruta de PI3K/Akt activada protege a las células de la apoptosis y, actuando como modulador de la señalización antiapoptótica en células tumorales, Akt es una diana para la terapia contra el cáncer. Por tanto, el bloqueo de la ruta de PI3K/Akt podría inhibir simultáneamente la proliferación de células tumorales y sensibilizar hacia agentes proapoptóticos (Falasca, Curr Pharm Des. 16:1410-6 (2010)).

- 25 Estos hallazgos indican que Akt puede ser una diana farmacológica para el tratamiento de inflamación, enfermedades autoinmunitarias y alergia, así como cáncer. Por consiguiente, los compuestos proporcionados en el presente documento son útiles en el tratamiento, la prevención o la mejora de tales enfermedades.

- 30 Los fármacos inmunoestimuladores de acción amplia tales como los corticosteroides, los inhibidores de calcineurina y la ciclosporina son altamente eficaces y se han usado para la terapia de enfermedades inflamatorias celulares y alérgicas, incluyendo enfermedades autoinmunitarias, durante muchos años. Son potentes en la supresión de procesos impulsados tanto por Th1 como por Th2, aunque adolecen de efectos secundarios no deseados, que limitan su ventana terapéutica. Los corticosteroides regulan la expresión de numerosos genes y, en consecuencia, su uso está limitado por efectos adversos graves. Efectos adversos graves típicos del uso de corticosteroides a corto plazo son alteraciones en la retención de agua y sales, metabolismo lipídico, adelgazamiento de la piel y cambios en el comportamiento. Los efectos adversos más graves asociados con la exposición sistémica a largo plazo a corticosteroides incluyen apetito aumentado y aumento de peso, depósitos de grasa en el tórax, la cara, la parte superior de la espalda y el estómago, retención de agua y sales que conduce a hinchazón y edema, tensión arterial alta, diabetes, cicatrización de heridas ralentizada, osteoporosis, cataratas, acné, debilidad muscular, adelgazamiento de la piel, aumento de la susceptibilidad a la infección, úlceras de estómago, aumento de la sudoración, inestabilidad emocional, problemas psicológicos tales como depresión, supresión suprarrenal y crisis.

- 40 Más específicamente, los productos terapéuticos dirigidos, tales como productos biológicos, por ejemplo, anticuerpos contra determinadas citocinas o sus receptores, inhiben una única diana proteica y son eficaces en determinadas situaciones, pero sólo abordan una de las dianas en una cascada inflamatoria altamente redundante y, por tanto, se usan a menudo en terapia de combinación, ya que la resolución eficaz de enfermedades inflamatorias requiere que se aborden simultáneamente varias dianas.

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

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

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

- 5 La AR es una enfermedad inflamatoria crónica, que da como resultado inflamación del revestimiento sinovial y destrucción del cartílago y hueso adyacentes. Los macrófagos, fibroblastos y linfocitos sinoviales son críticos para la patogenia de esta enfermedad, en la que la apoptosis desempeña papeles divergentes. Rutas de señalización, tales como PI3K/Akt, están altamente activadas en la articulación con AR, contribuyendo a la expresión de genes que provocan inflamación y destrucción y expresión de una variedad de moléculas antiapoptóticas. La inducción de apoptosis de macrófagos, linfocitos o fibroblastos sinoviales, a través de la inhibición de la expresión de moléculas antiapoptóticas, podría ser terapéuticamente beneficiosa en AR (Liu y Pope, *Curr Opin Pharmacol.* 3:317-22 (2003)).
- 10 Además, los resultados sugieren que las rutas de transducción de señales dependientes de PI3K/Akt están implicadas en la sobreproducción de la citocina inflamatoria clave IL-17 en pacientes con artritis reumatoide (Kim *et al.*, *Arthritis Res Ther.* 7:R139-148 (2005)).
- 15 Akt está estrechamente relacionada con receptores unidos a la membrana clave y representa un punto de integración convergente para múltiples estímulos implicados en la patogenia de EPOC. Akt también está implicada en las manifestaciones sistémicas de EPOC tales como atrofia del músculo esquelético y alteraciones metabólicas. Como tal, Akt representa una diana terapéutica particularmente atractiva para el tratamiento de EPOC (Bozinovski *et al.*, *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 1:31-38 (2006)).
- 20 Los compuestos proporcionados en el presente documento están posicionados para ser fármacos modificadores de la enfermedad. Los compuestos tienen potencial para su aplicación en una amplia variedad de indicaciones inflamatorias crónicas y, en combinación con una tolerabilidad favorable, puede esperarse que los productos obtengan su adopción por un número significativo de pacientes que padecen efectos secundarios graves de los tratamientos actuales. Además, los compuestos proporcionados en el presente documento serán adecuados no sólo para monoterapia, sino también en combinación con las terapias existentes, que abordan dianas patológicas específicas pero no son suficientes para resolver la enfermedad por sí solos.
- 25

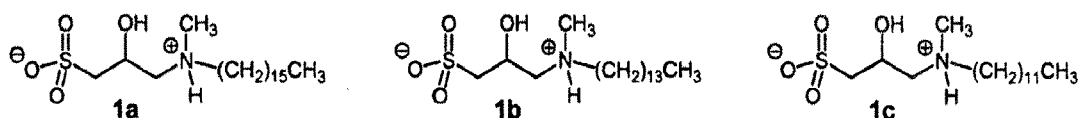
El documento WO 2007/071402 describe el uso de determinados derivados de fosfato, fosfonolípidos y fosfolípidos iónicos internos para el tratamiento o la prevención de enfermedades alérgicas.

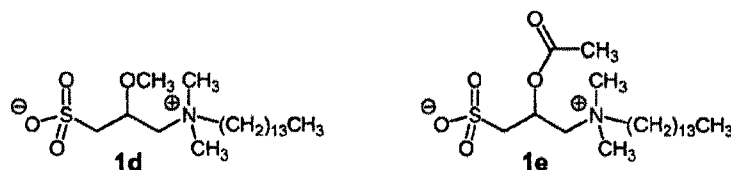
- Además, se dan a conocer compuestos de amonio cuaternario específicos en los documentos US 5.545.667 y US 6.136.857 que son útiles como agentes antineoplásicos. Estos compuestos comprenden un grupo alquileo no sustituido específico que conecta un grupo ácido terminal al átomo de nitrógeno cuaternario y, por tanto, son diferentes de los compuestos de la invención que comprenden, entre otros, un alquileo (R⁴) sustituido con un grupo que contiene oxígeno. Coy EA *et al.* *Int J Immunopharmacol.* 1990; 12(8):871-81 notifican una actividad antiproliferativa generalizada de moléculas anfifílicas específicas sobre linfocitos T y sobre una variedad de líneas de células tumorales y una falta de especificidad para el sistema inmunitario. El documento WO 2009/136396 se refiere a determinadas sulfobetainas que van a usarse en el tratamiento de cáncer, obesidad, degeneración macular asociada a la edad y enfermedades neurodegenerativas. El documento WO 92/16201 se refiere al uso de compuestos de betaina específicos para el tratamiento de determinadas infecciones virales. Yan L, *et al.* *Bioorg Med Chem Lett.* 2004; 14(19):4861-6 describen determinados derivados de ácido aminopropil-fosfónico como agonistas de receptores acoplados a proteínas G de esfingosina-1-fosfato. En el documento WO 2005/000288, se dan a conocer compuestos de ácido aminoalquil-sulfónico específicos para el tratamiento de trastornos de agregación de proteínas. Se dan a conocer compuestos de amonio cuaternario específicos adicionales, por ejemplo, en: Ernst R *et al.* *Toxicology.* 1980; 15(3):233-42; Speijers GJ *et al.* *Vaccine.* 1989; 7(4):364-8; Vian L *et al.* *Toxic in vitro.* 1995; 9(2):185-190; Parris N, *et al.* *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 1973; 50(12):509-512; Germanaud L, *et al.* *Bulletin de la Société Chimique de France.* 1988; 4:699-704; documentos EP 0569028 A; JP 2010-120998 A; US 3.432.408; US 4.085.134; US 6.004.771; y CN 101456810 A.
- 30
- 35
- 40
- 45

Se ha encontrado sorprendentemente que los compuestos de la presente invención tienen una citotoxicidad ventajosamente baja. Por tanto, la presente invención resuelve el problema de proporcionar agentes terapéuticos que tienen un perfil de toxicidad favorable que son eficaces, entre otras cosas, en el tratamiento, la prevención o la mejora de trastornos inflamatorios, autoinmunitarios y/o alérgicos.

50

Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula 1a, 1b, 1c, 1d, o 1e





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

Del mismo modo, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula 1a, 1b, 1c, 1d, o 1e, o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La presente invención también se refiere a un compuesto de fórmula 1a, 1b, 1c, 1d, o 1e, o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico.

La presente invención también se refiere a un compuesto de fórmula 1a, 1b, 1c, 1d o 1e, o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico que se selecciona de psoriasis, dermatitis atópica (eccema atópico), dermatitis por contacto, eccema xerótico, dermatitis seborreica, neurodermitis, dishidrosis, eccema discoide, eccema venoso, dermatitis herpetiforme (enfermedad de Duhring), autoeccematización, dermatomiositis, síndrome de hiper-IgE (Buckley), síndrome de Wiskott-Aldrich, anafilaxia, alergia alimentaria, reacciones alérgicas a picaduras venenosas, urticarias agudas, urticarias crónicas, urticarias físicas incluyendo urticaria acuagénica, urticaria colinérgica, urticaria por frío (urticaria por frío crónica), urticaria por presión retardada, urticaria dermatográfica, urticaria por calor, urticaria solar, urticaria por vibración, urticaria adrenérgica, angioedema por urticaria, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis por desviación (diverticulitis), síndrome de Behçet, colitis indeterminada, enfermedad celiaca, síndrome del intestino irritable, ileo posoperatorio, gastroenteropatía eosinofílica, gastritis, rinitis alérgica crónica, rinitis alérgica estacional (fiebre del heno), conjuntivitis alérgica, conjuntivitis química, conjuntivitis neonatal, síndrome de Sjögren, glaucoma de ángulo abierto, enfermedad de ojo seco (DED; incluyendo, por ejemplo, ojo seco deficiente en lágrimas acuosas (ADDE), ojo seco por síndrome de Sjögren (SSDE), distinto de SSDE, u ojo seco evaporativo (EDE)), edema macular diabético (o retinopatía diabética), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma alérgica, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, fibrosis pulmonar, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia, artritis reactiva, polimialgia reumática, síndrome de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, arteritis temporal, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmunitaria, alopecia areata, una enfermedad de injerto contra huésped, una enfermedad de huésped contra injerto, o un rechazo de trasplante.

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

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

Las respuestas inflamatorias a los antígenos pueden adoptar la forma de respuestas impulsadas por células T auxiliares de diferentes tipos. Las células Th1 median en respuestas celulares que implican células citotóxicas tales como macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, mientras que las células Th2 median en respuestas humerales que implican la secreción de anticuerpos a partir de células B y la activación de mastocitos. También pueden estar implicadas otras respuestas no inmunitarias, tales como aquellas que implican ciclooxigenasa y lipoxigenasa. La liberación incontrolada de citocinas y quimiocinas está en el centro de las enfermedades inflamatorias, tales como enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, dermatitis atópica, urticaria y psoriasis.

Los compuestos según la presente invención proporcionan una nueva estrategia de intervención, modulando ampliamente las actividades de las proteínas dentro de la cascada inflamatoria. A través del enriquecimiento del fármaco en dominios de membrana, se ejerce una inhibición alostérica sobre proteínas diana clave en las cascadas de transducción de señales en la inflamación.

Los compuestos de la presente invención se identificaron como potentes inhibidores de la liberación de mediadores inmunitarios *in vitro* en un modelo de mastocitos, tal como también se demostró en el ejemplo 6. Además, inhibieron la liberación de las citocinas proinflamatorias, TNF- α e interleucina-6, a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) estimuladas con lipopolisacárido, demostrando actividad inmunomoduladora en diferentes tipos de

células.

Se confirmó una amplia actividad antiinflamatoria en modelos animales de inflamación impulsada por Th1 y Th2. En un modelo de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) impulsada por Th1 predominantemente en ratones, los compuestos suprimieron la respuesta inflamatoria en un grado equivalente a la dexametasona, un corticosteroide comercializado caracterizado por efectos secundarios graves, tal como se muestra en el ejemplo 8. En un modelo de dermatitis por contacto alérgica impulsada por Th2 predominantemente, los compuestos eran muy activos después de su aplicación tópica y también mostraron un efecto antiinflamatorio después de la administración oral, tal como se muestra en el ejemplo 9.

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

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

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

La psoriasis es una enfermedad autoinmunitaria crónica que afecta a la piel. Una hipótesis sobre la causa de la psoriasis considera que la enfermedad es un trastorno mediado por el sistema inmunitario en el que la reproducción excesiva de las células de la piel es secundaria a factores producidos por el sistema inmunitario. Las células T se vuelven activas, migran a la dermis y desencadenan la liberación de citocinas que provocan inflamación y la rápida producción de células de la piel.

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

Muchas formas de alergias cutáneas y mucosas, en la mayoría de los casos acompañadas de síntomas inflamatorios, están mediadas en gran medida por los mastocitos. Desempeñan un papel central en asma, eccema, picazón y las diversas formas de rinitis, conjuntivitis y urticaria. Los mastocitos también están implicados en la patología asociada con trastornos tales como artritis reumatoide, penfigoide ampolloso y esclerosis múltiple. Se ha demostrado que están implicados en el reclutamiento de células inflamatorias a las articulaciones y la piel. Además, la mastocitosis es un trastorno que presenta proliferación de mastocitos y existe en una forma cutánea y sistémica.

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

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

La enfermedad de ojo seco (DED) es un trastorno inflamatorio de la unidad funcional lagrimal que conduce a una

enfermedad crónica de la superficie ocular, una calidad de la visión deteriorada, y una amplia gama de complicaciones. Se reconoce que una respuesta inflamatoria crónica desempeña un papel clave en la patogenia de la enfermedad de ojo seco en ser humano (Calonge M, *et al.* Ocul Immunol Inflamm. 2010. 18: 244-253; Stevenson W, *et al.* Arch Ophthalmol. 2012. 130: 90-100; Zoukhri D. Exp Eye Res. 2006. 82: 885-898; Pflugfelder SC. Am J Ophthalmol. 2004. 137: 337-342).

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

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

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

Además, los compuestos de la presente invención han demostrado ser eficaces en la inhibición de la activación de Akt cinasa, tal como también se muestra en el ejemplo 7, y, por tanto, son útiles en el tratamiento, la prevención o la mejora de enfermedades o trastornos proliferativos, neoplásicos o displásicos, que se describirán en más detalle a continuación.

Las evidencias indican que Akt desempeña un papel clave en la progresión del cáncer estimulando la proliferación celular e inhibiendo la apoptosis (Chen *et al.*, Cell Mol Immunol. 2:241-52 (2005)). La activación no regulada de la ruta de PI3K/Akt se produce comúnmente en el cáncer a través de una variedad de mecanismos, incluyendo mutaciones genéticas de cinasas y proteínas reguladoras, alteraciones epigenéticas que alteran la expresión y traducción génicas, y modificaciones postraduccionales. El análisis de los niveles de Akt en tumores humanos mostró que Akt se sobreexpresa en un número significativo de cánceres de ovario (Cheng *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 89:9267-9271(1992)), páncreas (Cheng *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 93:3636-3641 (1996)), mama y próstata (Nakatani *et al.*, J Biol Chem. 274:21528-21532 (1999)) y tumores de tiroides (Saji y Ringel, Mol Cell Endocrinol. 321:20-8 (2010)). Estas observaciones demuestran que la ruta de PI3K/Akt desempeña papeles importantes para regular la supervivencia o apoptosis celular en tumorigénesis. La activación constitutiva de la ruta de PI3K/Akt promueve la supervivencia a largo plazo y el crecimiento de células cancerosas. Por tanto, se prevé el uso de los compuestos de la presente invención, que son inhibidores de la activación de Akt cinasa, en el tratamiento, la prevención o la mejora de una enfermedad o un trastorno proliferativo, neoplásico o displásico, particularmente cáncer.

Los compuestos de la invención, que se ha demostrado que presentan una eficacia en la supresión de la respuesta inflamatoria al menos equivalente a la del corticosteroide dexametasona, tal como también se muestra en los ejemplos 8 y 9, son además ventajosos porque no muestran los efectos adversos observados para los corticosteroides, tales como la reducción del peso de ganglios linfáticos y del número de células que se observó para el corticosteroide diflorasona en el ejemplo 9, lo que los hace particularmente útiles en el tratamiento, la prevención o la mejora de trastornos inflamatorios, autoinmunitarios y/o alérgicos.

Además, los compuestos de la presente invención tienen una citotoxicidad particularmente baja y, por tanto, un perfil de toxicidad ventajoso, tal como también se demuestra en el ejemplo 6.

Tal como se explicó anteriormente, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula 1a, 1b, 1c, 1d o 1e, o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 5 La invención se refiere además a un compuesto de fórmula 1a, 1b, 1c, 1d o 1e, o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las entidades mencionadas anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico.

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

- 30 Además, la divulgación se refiere a un compuesto de fórmula 1a, 1b, 1c, 1d o 1e, o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las entidades mencionadas anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento, la prevención o la mejora de una enfermedad o un trastorno proliferativo, neoplásico y/o displásico.

La enfermedad o el trastorno proliferativo, neoplásico y/o displásico que va a tratarse, prevenirse o mejorarse usando un compuesto según la divulgación es, por ejemplo, una neoplasia benigna o maligna, tal como, por ejemplo, leucemia, carcinoma corticosuprarrenal, un cáncer relacionado con SIDA, cáncer de apéndice, astrocitoma, carcinoma de células basales, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, tumor cerebral, cáncer de mama, un adenoma bronquial, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, linfoma de sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, linfoma cutáneo de células T, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, un trastorno mieloproliferativo crónico, tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, tumor de células germinales extracraneales, cáncer de vías biliares extrahepáticas, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, carcinoide gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor estromal gastrointestinal, tumor de células germinales, glioma, tumor trofoblástico gestacional, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de corazón, cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de hipofaringe, glioma hipotalámico y de la vía óptica, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de células renales, cáncer de laringe, cáncer de labio y cavidad bucal, cáncer de pulmón, macroglobulinemia de Waldenström, osteosarcoma, meduloblastoma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer de boca, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, neoplasia de células plasmáticas, micosis fungoide, una enfermedad mielodisplásica, mieloma múltiple, un trastorno mieloproliferativo, cáncer de cavidad nasal y senos paranasales, carcinoma de nasofaringe, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de orofaringe, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales de ovario, tumor pancreático, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, astrocitoma pineal, germinoma pineal, pineoblastoma, adenoma hipofisario, blastema pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células transicionales, rabdomiosarcoma, cáncer de glándulas salivales, síndrome de Sézary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, sarcoma de partes blandas, cáncer de estómago, tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma, cáncer de tiroides, cáncer uterino, sarcoma uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva, o tumor de Wilms.

- 60 Los compuestos que van a usarse según la presente invención pueden prepararse mediante métodos conocidos en el campo de la química de síntesis.

Los compuestos también pueden prepararse por analogía a las rutas de síntesis descritas en la sección de

ejemplos.

El alcance de la invención abarca todas las formas de sal farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula 1a, 1b, 1c, 1d o 1e, que pueden formarse, por ejemplo, mediante protonación de un átomo que porta un par aislado de electrones que es susceptible de protonación, tal como un grupo amino, con un ácido inorgánico u orgánico, o como una sal de un grupo ácido carboxílico con un catión fisiológicamente aceptable tal como se conocen bien en la técnica. Las sales de adición de base a modo de ejemplo comprenden, por ejemplo, sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio o potasio; sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio o magnesio; sales de amonio; sales de aminas alifáticas, tales como trimetilamina, trietilamina, dicitclohexilamina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, sales de procaína, sales de meglumina, sales de dietanolamina o sales de etilendiamina; sales de aralkilamina tales como sales de N,N-dibenciletilendiamina, sales de benetamina; sales de aminas aromáticas heterocíclicas, tales como sales de piridina, sales de picolina, sales de quinolina o sales de isoquinolina; sales de amonio cuaternario, tales como sales de tetrametilamonio, sales de tetraetilamonio, sales de benciltrimetilamonio, sales de benciltriethylamonio, sales de benciltributilamonio, sales de metiltriocilamonio o sales de tetrabutylamonio; y sales de aminoácidos básicos, tales como sales de arginina o sales de lisina. Las sales de adición de ácido a modo de ejemplo comprenden, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sales de sulfato, sales de nitrato, sales de fosfato (tales como sales de fosfato, hidrogenofosfato o dihidrogenofosfato), sales de carbonato, sales de hidrogenocarbonato o sales de perclorato; sales de ácidos orgánicos tales como sales de acetato, propionato, butirato, pentanoato, hexanoato, heptanoato, octanoato, ciclopentanopropionato, undecanoato, lactato, maleato, oxalato, fumarato, tartrato, malato, citrato, nicotinato, benzoato, salicilato o ascorbato; sales de sulfonato, tales como sales de metanosulfonato, etanosulfonato, 2-hidroxietanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato (tosilato), 2-naftalenosulfonato, 3-fenilsulfonato o alcanforsulfonato; y sales de aminoácidos ácidos, tales como sales de aspartato o glutamato.

Además, el alcance de la invención abarca formas sólidas de los compuestos de fórmula 1a, 1b, 1c, 1d o 1e en cualquier forma solvatada, incluyendo, por ejemplo, solvatos con agua, por ejemplo, hidratos, o con disolventes orgánicos, tales como, por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol o acetonitrilo, es decir, como metanolato, etanolato, isopropanolato o acetonitrilato, respectivamente; o en forma de cualquier polimorfo. La invención también abarca cada uno de los polimorfos del compuesto 1a descritos en el ejemplo 5.

Además, las fórmulas en la presente solicitud pretenden cubrir todos los posibles estereoisómeros, incluyendo enantiómeros y diastereómeros, de los compuestos indicados.

Por tanto, todos los estereoisómeros de los compuestos de la presente invención, en particular los compuestos de fórmula 1a, 1b, 1c, 1d o 1e, se contemplan como parte de la presente invención, o bien en mezcla o bien en forma pura o sustancialmente pura. El alcance de los compuestos según la invención abarca todos los posibles estereoisómeros y sus mezclas. Muy particularmente abarca las formas racémicas y los isómeros ópticos aislados. Las formas racémicas pueden resolverse mediante métodos físicos, tales como, por ejemplo, cristalización fraccionada, separación o cristalización de derivados diastereoméricos o separación mediante cromatografía en columna quiral. Los isómeros ópticos individuales pueden obtenerse a partir de los racematos usando métodos convencionales, tales como, por ejemplo, formación de sal con un ácido ópticamente activo seguido por cristalización.

También se dan a conocer en el presente documento profármacos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención. Tales profármacos son derivados que tienen grupos escindibles química o metabólicamente y que se convierten, mediante solvolisis o en condiciones fisiológicas, en los compuestos de la presente invención que son farmacéuticamente activos *in vivo*. Pueden formarse profármacos de compuestos de la presente invención de una manera convencional con un grupo funcional de los compuestos, tal como con un grupo amino o hidroxilo. La forma de derivado de profármaco ofrece a menudo ventajas de solubilidad, compatibilidad tisular o liberación retardada en un organismo mamífero (véase Bundgaard, H., Design of Prodrugs, págs. 7-9, 21-24, Elsevier, Ámsterdam 1985). Cuando un compuesto de la presente invención tiene un grupo hidroxilo, se ejemplifica como profármaco un derivado de aciloxilo preparado haciendo reaccionar el grupo hidroxilo con un haluro de acilo adecuado o un anhídrido de ácido adecuado. Un derivado de aciloxilo especialmente preferido como profármaco es $-OC(=O)-CH_3$, $-OC(=O)-C_2H_5$, $-OC(=O)-(terc-Bu)$, $-OC(=O)-C_{15}H_{31}$, $-OC(=O)-(m-COONa-Ph)$, $-OC(=O)-CH_2CH_2COONa$, $-O(C=O)-CH(NH_2)CH_3$ u $-OC(=O)-CH_2-N(CH_3)_2$. Cuando un compuesto de la presente invención tiene un grupo amino, se ejemplifica como profármaco un derivado de amida preparado haciendo reaccionar el grupo amino con un haluro de ácido adecuado o un anhídrido mixto adecuado. Un derivado de amida especialmente preferido como profármaco es $-NHC(=O)-(CH_2)_2OCH_3$ o $-NHC(=O)-CH(NH_2)CH_3$.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse como compuestos *per se* en su uso como farmacóforos o composiciones farmacéuticas o pueden formularse como medicamentos. Dentro del alcance de la presente invención están composiciones farmacéuticas que comprenden, como principio activo, un compuesto de fórmula 1a, 1b, 1c, 1d o 1e, tal como se definió anteriormente. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como portadores, diluyentes, cargas, disgregantes, agentes lubricantes, aglutinantes, colorantes, pigmentos, estabilizantes, conservantes, o antioxidantes.

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

Los compuestos según la invención o las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente que comprenden uno o más compuestos de fórmula 1a, 1b, 1c, 1d o 1e pueden administrarse a un sujeto por cualquier vía de administración conveniente, ya sea de manera sistémica/periférica o en el sitio de acción deseada, incluyendo, pero sin limitarse a, una o más de: oral (por ejemplo, como comprimido, cápsula, o como una disolución ingerible), tópica (por ejemplo, transdérmica, intranasal, ocular, bucal, y sublingual), parenteral (por ejemplo, usando técnicas de inyección o técnicas de infusión, e incluyendo, por ejemplo, por inyección, por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intratecal, intraespinal, intracapsular, subcapsular, intraorbital, intraperitoneal, intratraqueal, subcuticular, intraarticular, subaracnoidea, o intraesternal mediante, por ejemplo, implante de un depósito, por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular), pulmonar (por ejemplo, mediante terapia de inhalación o insuflación usando, por ejemplo, un aerosol, por ejemplo, a través de la boca o la nariz), gastrointestinal, intrauterina, intraocular, subcutánea, oftálmica (incluyendo intravítrea o intracameral), rectal, y vaginal.

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

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

Los comprimidos pueden contener excipientes, tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina, disgregantes, tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa de sodio y determinados silicatos complejos, y aglutinantes de granulación, tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábica. Además, pueden incluirse agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, celulosa, azúcar de la leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, el agente puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o saborizantes, materia colorante o tintes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes, tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

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

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

Para aplicación tópica en la piel, dichos compuestos o dichas composiciones farmacéuticas pueden formularse como una pomada adecuada que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con

uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, cera emulsionante y agua. Alternativamente, pueden formularse como una loción o crema adecuada, suspendidos o disueltos en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitano, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Normalmente, un médico determinará la dosificación real que será la más adecuada para un sujeto individual. El nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier sujeto individual particular pueden variarse y dependerán de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular, y el sujeto individual que se somete a terapia.

Una dosis propuesta, pero no limitativa, de los compuestos de fórmula 1a, 1b, 1c, 1d o 1e para su administración a un ser humano (de aproximadamente 70 kg de peso corporal) puede ser de 0,05 a 5000 mg, preferiblemente de 0,1 mg a 1000 mg, del principio activo por dosis unitaria. La dosis unitaria puede administrarse, por ejemplo, de 1 a 4 veces al día. La dosis dependerá de la vía de administración. Se apreciará que puede ser necesario realizar variaciones rutinarias de la dosificación dependiendo de la edad y el peso del paciente/sujeto, así como de la gravedad de la afección que va a tratarse. La dosis precisa y la vía de administración estarán en última instancia a discreción del médico o veterinario encargado.

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

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

Se prevé que uno o más de los compuestos descritos en este documento pueden usarse en combinación con uno o más fármacos inmunomoduladores y/o uno o más fármacos antiinflamatorios.

El uno o más fármacos inmunomoduladores incluyen, sin limitarse a los mismos: antimetabolitos tales como, por ejemplo, azatioprina, ácido micofenólico, leflunomida, teriflunomida, o metotrexato; macrólidos tales como, por ejemplo, tacrólimus, ciclosporina, o pimecrólimus; inhibidores de IL-2 tales como, por ejemplo, abetimús o gusperimús; inhibidores de TNF- α tales como, por ejemplo, talidomida o lenalidomida; antagonistas de receptores de IL-1 tales como, por ejemplo, anakinra; proteínas diana de rapamicina en mamíferos (mTOR) tales como, por ejemplo, sirólimus, deforólimus, everólimus, temsirólimus, zotarólimus, o biólimus A9; anticuerpos monoclonales tales como, por ejemplo, eculizumab, infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, afelimumab, golimumab, mepolizumab, omalizumab, nerelimumab, faralimumab, elsilimumab, lebrizumab, ustekinumab, muronomab-CD3, otelixizumab, teplizumab, visilizumab, clenoliximab, keliximab, zanolimumab, efalizumab, erlizumab, afutuzumab, ocrelizumab, pascolizumab, lumiliximab, teneliximab, toralizumab, aselizumab, galiximab, gavilimumab, ruplizumab, belimumab, ipilimumab, tremelimumab, bertilimumab, lerdelimumab, metelimumab, natalizumab, tocilizumab, odulimumab, basiliximab, daclizumab, inolimumab, zolimomab aritox, atorolimumab, cedelizumab, dorlixizumab, fontolizumab, gantenerumab, gomiliximab, maslimomab, morolimumab, pexelizumab, reslizumab, rovelizumab, siplizumab, talizumab, telimumab aritox, vopaliximab, o vepalimumab; anticuerpos policlonales tales como, por ejemplo, globulina antitímica o globulina antilinfocítica; o proteínas de fusión tales como, por ejemplo, abatacept, belatacept, etanercept, pegsunercept, aflibercept, alefacept, o rilonacept.

Además, el uno o más fármacos antiinflamatorios incluyen, sin limitarse a los mismos: derivados de pirazolidina o butilpirazolidina tales como, por ejemplo, ampirona, clofezona, kebufona, metamizol, mofebutazona, oxifenbutazona, fenazona, fenilbutazona, sulfipirazona, o feprazona; derivados de ácido acético tales como, por ejemplo, aceclofenaco, acemetacina, alclofenaco, bromfenaco, bumadizona, bufexamaco, diclofenaco, difenpiramida, etodolaco, fentiazaco, indometacina, ketorolaco, lonazolaco, oxametacina, proglumetacina, sulindaco, tolmetina, zomepiraco, o amfenaco; derivados de oxicam tales como, por ejemplo, ampiroxicam, droxicam, lornoxicam,

meloxicam, piroxicam, o tenoxicam; derivados de ácido propiónico tales como, por ejemplo, alminoprofeno, benoxaprofeno, dexibuprofeno, dexketoprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, flunoxaprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, ibuproxam, indoprofeno, ketoprofeno, naproxeno, oxaprozina, piroprofeno, suprofen, o ácido tiaprofénico; derivados de ácido fenámico tales como, por ejemplo, ácido flufenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido tolfenámico, ácido niflúmico, morniflumato, o azapropazona; inhibidores de COX-2 tales como, por ejemplo, celecoxib, etoricoxib, lumiracoxib, parecoxib, rofecoxib, o valdecoxib; o nabumetona, glucosamina, bencidamina, glicosaminoglicano, salicilato de magnesio, procuazona, superóxido dismutasa/orgoteína, nimesulida, diacereína, tenidap, oxaceprol, o sulfato de condroitina.

La terapia conjunta usando el/los compuesto(s) de la presente invención, fármaco(s) inmunomodulador(es) y/o fármaco(s) antiinflamatorio(s) puede dar como resultado un efecto sinérgico, es decir, los agentes actuando juntos pueden crear un efecto mayor que el predicho conociendo sólo los efectos por separado de los agentes individuales. Un efecto sinérgico de este tipo podría ser particularmente ventajoso si pueden usarse entonces menos cantidades del/de los compuesto(s), fármaco(s) inmunomodulador(es) y/o fármaco(s) antiinflamatorio(s). Por tanto, podrían disminuirse o evitarse los posibles efectos secundarios del/de los compuesto(s), fármaco(s) inmunomodulador(es) y/o fármaco(s) antiinflamatorio(s).

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

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

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

El tratamiento de un trastorno o una enfermedad puede comprender, entre otras cosas, un tratamiento curativo (que conduce preferiblemente a una respuesta completa y, finalmente, a la curación del trastorno o la enfermedad) y un tratamiento paliativo (que incluye alivio sintomático).

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

El sujeto o paciente, tal como el sujeto que necesita tratamiento, prevención o mejora, puede ser un eucariota, un animal, un animal vertebrado, un mamífero, un roedor (por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), un murino (por ejemplo, un ratón), un canino (por ejemplo, un perro), un felino (por ejemplo, un gato), un equino (por ejemplo, un caballo), un primate, un simio (por ejemplo, un mono u homínido), un mono (por ejemplo, un tití, un babuino), un homínido (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibón), o un ser humano. El significado de los términos "eucariota", "animal", "mamífero", etc., se conoce bien en la técnica y puede deducirse, por ejemplo, de Wehner y Gehring (1995; Thieme Verlag). En el contexto de esta invención, se prevé particularmente que van a tratarse animales que son de importancia económica, agronómica o científica. Los organismos de importancia científica incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, moscas de la fruta tales como *Drosophila*

melagonaster y nematodos tales como *Caenorhabditis elegans*. Los ejemplos no limitativos de animales de importancia agronómica son ovejas, vacas y cerdos, mientras que, por ejemplo, gatos y perros pueden considerarse como animales de importancia económica. Preferiblemente, el sujeto/paciente es un mamífero; más preferiblemente, el sujeto/paciente es un ser humano o un mamífero no humano (tal como, por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón, un conejo, un perro, un gato, un caballo, un mono, un homínido, un títí, un babuino, un gorila, un chimpancé, un orangután, un gibón, una oveja, una vaca, o un cerdo, y en particular un canino, tal como un perro); incluso más preferiblemente, el sujeto/paciente es un ser humano.

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

Figura 1: Inhibición de la desgranulación de mastocitos por los compuestos 1a (figura 1A), 1b (figura 1B), 1c (figura 1C), 1d (figura 1D), 1e (figura 1E) y miltefosina (fig. 1F). Se muestran las curvas de dosis-respuesta para la inhibición de la liberación de β -hexosaminidasa a partir de células RBL-2H3 estimuladas con IgE específica de antígeno y activadas con antígeno (medias $\pm$ error estándar de la media).

Figura 2: Inhibición de la fosforilación de Akt en Ser473 por los compuestos 1a (figura 2A) y 1c (figura 2B). El porcentaje de Akt total fosforilada en Ser473 se expresa como un porcentaje de las células de control sin tratar inducidas con IgE y antígeno durante 15 min (se muestran las medias $\pm$ desviación estándar).

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

Figura 4: Efecto de los compuestos 1a y 1c sobre la hinchazón de la oreja del ratón en el modelo de dermatitis por contacto alérgica en ratones. La figura 4A muestra una comparación de la actividad inhibidora de los compuestos 1a y 1c y miltefosina a diferentes tiempos de administración antes de la exposición a antígeno (los datos son medias $\pm$ EEM de 7 ratones; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente al control de vehículo (prueba *a posteriori* de Dunnett), § $p < 0,05$ frente al control de vehículo (prueba de la t)). Las figuras 4B y 4C muestran una comparación de la actividad inhibidora del compuesto 1a y corticosteroides después de la aplicación sistémica (oral) (figura 4B) o aplicación tópica (figura 4C) (los datos son medias $\pm$ EEM de 7 ratones; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente al control de vehículo (prueba *a posteriori* de Dunnett)). Las figuras 4D y 4E muestran la reacción de los ganglios linfáticos locales, comparando el efecto del compuesto 1a y diflorasona tópica sobre el peso de los ganglios linfáticos locales (figura 4D) y el número de células (figura 4E) (los datos son medias $\pm$ EEM de 7 ratones; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente al control de vehículo (prueba *a posteriori* de Dunnett)).

Figura 5: Efecto del compuesto 1a sobre la artritis inducida por colágeno tipo II (CIA) en ratones. La figura 5A muestra los efectos sobre la puntuación de artritis durante el transcurso de la CIA tipo II del compuesto 1a y dexametasona usando un régimen profiláctico (los datos son medias de 10-11 ratones; * $p < 0,02$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente al control de vehículo (prueba de la t)). La figura 5B muestra los efectos sobre los cambios de peso corporal durante el transcurso de la CIA tipo II del compuesto 1a y dexametasona usando un régimen profiláctico (los datos son medias de 10-11 ratones; * $p < 0,02$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente al control de vehículo (prueba de la t)). La figura 5C muestra los efectos sobre la puntuación de artritis durante el transcurso de la CIA tipo II del compuesto 1a usando un régimen terapéutico (los datos son medias de 11 ratones; * $p < 0,02$ frente al control de vehículo (prueba de la t)). La figura 5D muestra los efectos sobre el peso del bazo y del timo durante el transcurso de la CIA tipo II del compuesto 1a y dexametasona usando un régimen profiláctico (los datos son medias de 10-11 ratones; *** $p < 0,001$ frente al control de vehículo (prueba de la t)).

Figura 6: Perfiles de concentración plasmática media-tiempo (semilogarítmicos) de cinco formas polimórficas del compuesto 1a en ratones Balb/c hembra ($n = 3$) después de una única administración oral de 100 mg/kg en disolución de metilcelulosa al 0,5 %.

La invención se describirá ahora mediante referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de 2-hidroxi-3-(N-metilhexadecilamonio)propanosulfonato 1a, 2-hidroxi-3-(N-metiltetradecilamonio)propanosulfonato 1b y 2-hidroxi-3-(N-metildodecilamonio)propanosulfonato 1c

Se suspenden 3-cloro-2-hidroxi-1-propanosulfonato de sodio (3,83 g, 19,5 mmol), N-metildodecilamina (3 g, 15 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (DIEA) (2,5 g, 19,5 mmol) en 20 ml de dimetilformamida (DMF) seca y se calientan hasta 130 °C bajo atmósfera de argón durante 24 h. Se eliminan los compuestos volátiles a presión reducida y se somete a cromatografía el residuo sobre sílice usando diclorometano/metanol usando un aumento gradual de concentración de eluyente desde 9:1 hasta 4:1. Se obtiene el compuesto 1c como material de color blanco (4,61 g, 91 %).

EM (ESI): 338,2 ($M+H^+$), 675,5 ($2M+H^+$), 697,5 ($2M+Na^+$).

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 0,81$ (t, J = 6,9, 3H), 1,1-1,35 (m, 18H), 1,68 (m, 2H), 2,89 (d/d, J = 4,5/13,1, 3H),

2,95-3,45 (m, 6H), 4,52 (m, 1H), 8,90 (s. a., 1H), 9,17 (s. a., 1H).

Los compuestos 1a y 1b se preparan de un modo similar usando N-metilhexadecilamina (para 1a) o N-metiltetradecilamina (para 1b) en lugar de N-metildodecilamina.

Ejemplos 2 y 3: Preparación de 2-metoxi-3-(N,N-dimetil-N-tetradecilamonio)propano-1-sulfonato 1d y 2-acetoxi-3-(N,N-dimetiltetradecilamonio)propanosulfonato 1e

Se suspenden el compuesto 1b (440 mg, 1,2 mmol), yoduro de metilo (1,36 g, 9,6 mmol) y K_2CO_3 (497 mg, 3,6 mmol) en una mezcla de acetona (10 ml) y diclorometano (2 ml). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminan los compuestos volátiles a presión reducida y se purifica el residuo mediante HPLC preparativa para producir 287 mg de 2-hidroxi-3-(N,N-dimetil-N-tetradecilamonio)propano-1-sulfonato como un sólido de color blanco.

Para la preparación del compuesto 1d, se suspende hidruro de sodio (12 mg, 0,52 mmol) en THF seco (2 ml) bajo atmósfera de argón. Se disuelve el 2-hidroxi-3-(N,N-dimetil-N-tetradecilamonio)propano-1-sulfonato mencionado anteriormente (65 mg, 0,17 mmol) en una mezcla de DMF (1 ml) y THF (1 ml) y se añade gota a gota. Se añade yoduro de metilo (111 mg, 0,78 mmol) y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 4 d. Se extingue la mezcla con 0,5 ml de metanol, se elimina el disolvente a presión reducida y se purifica el residuo mediante HPLC preparativa para producir 57 mg (85 %) de 1d como material de color blanco.

EM (ESI): 394,4 ($M+H^+$), 787,7 ($2M+H^+$).

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 0,81 (t, J = 6,9, 3H), 1,1-1,35 (m, 22H), 1,70 (m, 2H), 2,80 (m, 1H), 3,13 (s, 6H), 3,2-3,45 (m, 4H), 3,33 (s, 3H), 4,18 (m, 2H).

Para la preparación del compuesto 1e, se disuelven el 2-hidroxi-3-(N,N-dimetil-N-tetradecilamonio)propano-1-sulfonato mencionado anteriormente (140 mg, 0,37 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (3,4 mg, 0,028 mmol) en diclorometano (5 ml) bajo atmósfera de argón. Se añaden anhídrido acético (32 mg, 0,31 mmol) y DIEA (40 mg, 0,31 mmol) y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 24 h. Se eliminan los compuestos volátiles a presión reducida y se purifica el residuo mediante HPLC preparativa para dar 123 mg (79 %) de 1e como un material sólido.

EM (ESI): 422,3 ($M+H^+$), 843,6 ($2M+H^+$).

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 0,81 (t, J = 6,9, 3H), 1,1-1,35 (m, 22H), 1,69 (m, 2H), 2,02 (s, 3H), 3,14 (d, J = 5,5, 6H), 3,0-3,3 (m, 4H), 3,69 (m, 1H), 4,30 (d/m, J = 14,4, 1H), 5,64 (m, 1H).

Ejemplo 4: Síntesis a gran escala del compuesto 1a

N-metilhexadecanamida

Se agitó una suspensión de 1775 g de ácido palmítico (6,92 mol) y 12,5 l de tolueno a 20-25 °C y se añadieron 1245 g (1,5 eq., 10,38 mol) de cloruro de tionilo. Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 12 h, luego se enfrió hasta 20-25 °C y se evaporó hasta sequedad en un evaporador rotatorio a vacío (temperatura del baño, 70 °C). El rendimiento de cloruro de palmitoilo en bruto fue de 2475 g.

Se disolvió el cloruro de palmitoilo en bruto en 5,0 l de diclorometano (DCM), se enfrió hasta 0-5 °C y se añadieron gota a gota 3,5 l de metilamina (5,7 eq., 39,44 mol) en 5,8 l de diclorometano a lo largo de un periodo de 105 minutos (manteniendo la temperatura a 5-10 °C). Se permitió que la suspensión se calentara hasta 20-25 °C y se agitó durante la noche y entonces se evaporó la mezcla hasta sequedad en un evaporador rotatorio a vacío (temperatura del baño, 40 °C). Se suspendió el residuo en 3,1 l de agua desionizada y se recogió el producto mediante filtración. Se lavó la torta de filtro con 3,0 l de agua desionizada y 0,5 l de metilciclohexano y luego se secó hasta un peso constante a vacío a 55 °C. El rendimiento fue del 96,0 % (1790 g) de un polvo de color beis; CG: 99,3 % de área, contenido en agua: 0,07 %.

Hexadecil(metil)amina

A una mezcla de 15,75 kg de tetrahidrofurano (THF) y 2,76 kg (1,3 eq., 8,64 mol) de hidruro de litio y aluminio (disolución en THF), se le añadieron 1,79 kg (6,64 mol) de la N-metilhexadecanamida en porciones, a 20-25 °C (desprendimiento de gas). Se agitó la mezcla de reacción (una suspensión de color amarillento-marrón) a reflujo durante 3 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta 5-10 °C y se extinguió mediante la adición gota a gota de 360 ml de agua desionizada, 360 ml de disolución de hidróxido de sodio al 20 % y 1,04 l de agua desionizada. Se añadió Tonsil (Süd-Chemie), 370 g, a la mezcla de reacción y se filtró la suspensión resultante y se lavó la torta de filtro con 2,08 kg de THF. Se evaporó el filtrado hasta sequedad en un evaporador rotatorio a vacío (temperatura del baño, 60 °C). El rendimiento fue del 88,0 % (1495 g) de un polvo de color blanquecino; CG: 98,2 % de área. Se almacenó el material bajo nitrógeno.

2-Hidroxi-3-(N-metilhexadecilamonio)propanosulfonato, sal de sodio/potasio (compuesto 1a)

Lote 1: Se suspendió hexadecil(metil)amina (814 g, 3,18 mol) en 10,7 l de dimetilformamida (DMF). Se agitó la suspensión de color blanquecino a 20-25 °C y se añadieron 847,5 g (1,3 eq., 4,13 mol) de 3-cloro-2-hidroxipropanosulfonato de sodio hemihidratado, 573 g (1,3 eq., 4,13 mol) de carbonato de potasio y 99,4 g (0,2 eq., 0,63 mol) de yoduro de sodio. Se agitó la mezcla a 50-60 °C durante 69 h bajo nitrógeno. La HPLC mostró el 25,1 % de área de producto en la mezcla de reacción. Se eliminó la DMF mediante destilación a vacío (temperatura del baño, 80 °C) y se suspendió el residuo en 4,95 l de THF y se evaporó hasta 1,3 kg de Celite. Se llevó a cabo extracción Soxhlet con 20,0 l de THF:metanol (9:1) durante 4,5 días. Se evaporó el extracto hasta sequedad para dejar un residuo, que se confirmó mediante HPLC que era principalmente productos secundarios y que se desechó. Se retiró la Celite del extractor Soxhlet y se secó hasta peso constante a 60 °C a vacío (3220 g). Se suspendió la Celite en 32,0 l de metanol y se calentó hasta reflujo. Se filtró la mezcla en caliente y se cristalizó el filtrado a 0-5 °C, produciendo 1016 g de polvo de color amarillento (HPLC: 96,6 % de área) de compuesto 1a como sal de sodio/potasio.

Lote 2: Se suspendió hexadecil(metil)amina (480,8 g, 1,88 mol) en 6,25 l de DMF. Se agitó la suspensión de color blanquecino a 20-25 °C y se añadieron 500 g (1,3 eq., 2,44 mol) de 3-cloro-2-hidroxipropanosulfonato de sodio hemihidratado, 338,4 g (1,3 eq., 2,44 mol) de carbonato de potasio y 58,6 g (0,2 eq., 0,37 mol) de yoduro de sodio. Se agitó la mezcla a 50-60 °C durante 82 h bajo nitrógeno. La HPLC mostró el 30,5 % de área de producto en la mezcla de reacción. Se eliminó la DMF mediante destilación a vacío (temperatura del baño, 80 °C) y se cristalizó el residuo en 12,35 l de metanol en ebullición. Se filtró la mezcla en caliente (parte insoluble: 226,0 g) y se cristalizó el filtrado a 0-5 °C, produciendo 562,0 g de polvo de color amarillento (HPLC: 97,6 % de área) de compuesto 1a como sal de sodio/potasio.

2-Hidroxi-3-(N-metilhexadecilamonio)propanosulfonato (compuesto 1a)

Se suspendió la sal de sodio/potasio, 1100 g, obtenida tal como se describió anteriormente, en 11 l de cloroformo:metanol (4:1). Se ajustó el pH a 5 con disolución de HCl saturada en 2-propanol (la cantidad de HCl se determinó mediante valoración de una muestra). La filtración y evaporación hasta sequedad produjeron 990 g de sólido amorfo de color parduzco-amarillo (HPLC: 96,8 % de área). La cristalización de este sólido, tal como se describió anteriormente, en 8,0 l de metanol produce 715,0 g de compuesto 1a (HPLC: 98,6 % de área).

Se purificó adicionalmente material de esta calidad mediante cristalización repetida en metanol en ebullición, con eliminación de compuestos insolubles mediante filtración en caliente si se requería. También puede usarse recristalización en isopropanol:agua (4:1). En un experimento típico, se disolvieron 805 g de compuesto 1a en 2,4 l de isopropanol:agua (4:1) a reflujo, se enfrió lentamente hasta 0-5 °C, se filtró y se secó para producir 730 g (recuperación del 90 %) de compuesto 1a como un polvo de color blanquecino (HPLC: 98,8 % de área). Con el fin de obtener un polimorfo uniforme, se prefiere la recristalización en metanol en condiciones anhidras para la etapa de cristalización final.

Se continúa la purificación hasta que se cumplen los siguientes criterios:

Pureza mediante HPLC: >99 % de área

Residuo en ignición: <0,8 %

Conductividad de suspensión acuosa al 1 %: <50 µS/cm

RMN, EM: conforme con la estructura.

Análisis elemental: consecuente con la composición.

Ejemplo 5: Polimorfismo del compuesto 1a

El compuesto 1a puede cristalizarse en una variedad de disolventes. Desde un punto de vista práctico (facilidad de filtración, baja toxicidad del disolvente), se prefieren metanol, etanol e isopropanol. La adición del 5-25 % de agua a disolventes miscibles con agua aumenta la solubilidad y conduce a un coeficiente de temperatura de solubilidad más pronunciado, reduciendo la cantidad de disolvente requerida. Disolventes menos preferidos para la recristalización son 1-propanol, n-butanol, acetona, acetonitrilo, THF y acetato de etilo. La recristalización en agua es difícil de controlar y conduce frecuentemente a dificultades en la filtración.

Partiendo de material en bruto seco y disolvente, se obtiene el compuesto 1a como anhidrato. Puede obtenerse monohidrato puro mediante cristalización en agua. En un procedimiento típico, se disolvieron 150 g de compuesto 1a (anhidrato) en 2 l de agua desionizada en ebullición, luego se sembró con compuesto 1a hidratado y se permitió que la mezcla se enfriara lentamente hasta temperatura ambiente (TA). Se recogió el precipitado mediante filtración y se secó a 35 °C, 15 mbar, produciendo 134,6 g (recuperación del 86 %) de un sólido de color blanquecino. La valoración de Karl-Fischer y el análisis elemental indicaron la presencia de un monohidrato.

La RMN indica que el compuesto 1a monohidratado permanece asociado con agua incluso en disolución, conduciendo a un patrón inesperadamente complejo de señales. Se observa coalescencia reversible tras el

calentamiento. Esta forma asociada a agua es probable que esté presente en condiciones fisiológicas. El anhidrato muestra el espectro de RMN más sencillo esperado.

Compuesto 1a monohidratado (lote 2338-CF/30): ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3): δ = 0,87 (t, 3H), [1,15-1,35 (m), 1,31 (s. a.), Σ = 26H], 1,74 (s. a., 2H), [2,93 (d, J = 4,5), 2,98 (d, J = 4,7), 2,95-3,35 (m), 3,44 (d. a., J = 12,7), Σ = 12H], 4,58 (s. a., 1H), 9,21 (s. a., 0,5H), 9,48 (s. a., 0,5H).

Compuesto 1a anhidro (lote 2208-CF/1): ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): δ = 0,86 (t, 3H), [1,15-1,35 (m), 1,30 (s. a.), Σ = 26H], 1,73 (s. a., 2H), 2,94 (s, 3H), [3,05-3,25 (m), 3,12 (d, J = 5,7), Σ = 5H], 3,39 (d. a., J = 12,1, 1H), 4,58 (d. a., J = 6,1, 1H). (δ > 5 ppm: sin señales).

Tanto el monohidrato a partir de agua como el anhidrato a partir de metanol forman laminillas delgadas de tamaño micrométrico de forma irregular. La difracción de rayos X de polvo (XRPD) indica una estructura en capas con un periodo base de 27 Å para ambas formas. Ambas formas pueden interconvertirse fácilmente. Según el análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC), el monohidrato pierde su agua entre 60 °C y 90 °C. El anhidrato puede convertirse en monohidrato por exposición a aire del 100 % de humedad relativa durante 4 días. Sólo se toma un equivalente de agua y la consistencia del material permanece sin cambios.

La cristalización en mezclas de agua y disolventes miscibles con agua produjo el anhidrato en la mayoría de los casos. En un experimento con metanol que contenía el 10-25 % de agua, se observó la formación de monohidrato, pero fue poco reproducible. Debido al resultado más predecible, se prefieren condiciones anhidras para las etapas finales de la purificación.

Puede caracterizarse un pseudo-polimorfo cristalizando el compuesto 1a en metanol y analizando el material húmedo por XRPD. En la muestra húmeda de metanol, se observa una estructura en capas en la que el periodo base es de 28,5 Å. Durante el secado a temperatura ambiental, se observan juntos tanto 27 Å (anhidrato) como 28,5 Å. Tras completar el secado a temperatura ambiental, sólo se observa el patrón de difracción del anhidrato. Por tanto, esta cristalización tiene lugar a través de la etapa intermedia de un solvato de metanol inestable en el que el metanol se intercala débilmente entre las capas de la estructura del anhidrato.

En total, pudieron identificarse cuatro polimorfos diferentes por XRPD (tabla 1). Tras el calentamiento, pudieron obtenerse disoluciones transparentes con agua, metanol, etanol, isopropanol y las mezclas de disolvente:agua (9:1). Se obtuvieron polimorfos a partir de otros disolventes mediante equilibrado de las suspensiones de la forma A en los disolventes respectivos.

Tabla 1. Polimorfos del compuesto 1a obtenidos a partir de diversos disolventes.

Sistema de disolventes	Agua de cristalización	Número de lote	Forma cristalina*
Agua; metanol; acetonitrilo:agua (1:1); acetona:agua (1:1); etanol: agua (1:1)		n/a	A
Disolvente:agua (9:1); los disolventes sometidos a prueba fueron metanol, etanol, isopropanol, THF		n/a	A
Agua	Monohidrato	KP-0722.11	A
Metanol	Anhidrato	KP-0726.11	A
Metanol; sal de sodio parcial	Anhidrato (alcalino)	TN-0382.11	A
Metanol:agua (1:1)	Monohidrato	2338-CF/30	A
Metanol, trazas de sal de sodio	Anhidrato	2208-CF/1	A
Etanol; n-butanol; acetato de etilo; THF		n/a	B
Acetonitrilo		n/a	C
Isopropanol		n/a	D

* Nomenclatura arbitraria

Las formas cristalinas A-C son relativamente similares y comparten el mismo periodo base de 27 Å. Mientras que la forma A muestra dos reflexiones amplias a aproximadamente 4,0 y 4,4 Å, la forma B muestra una sola reflexión nítida a aproximadamente 4,5 Å. La forma C muestra la misma reflexión nítida de 4,5 Å que la forma B, más un patrón complejo de cuatro reflexiones medias más amplias entre 3,6 y 4,4 Å.

Sorprendentemente, la cristalización en isopropanol puro produce un polimorfo altamente cristalino que es muy diferente de todas las demás muestras en la tabla 1. En la forma D, el periodo base se reduce hasta 22,8 Å y no

comparte ninguna reflexión importante con la forma A. A diferencia de la forma A a partir de metanol, esta forma no cambia durante el secado. La cristalización en isopropanol que contiene el 10 % de agua es suficiente para producir la forma A en su lugar.

Esto demuestra que va a preferirse el metanol para las etapas finales de la cristalización, porque produce un tipo de red cristalina uniforme (forma A), incluso en presencia de pequeñas cantidades de agua. La facilidad de eliminación y la facilidad de filtración también son mejores para el metanol. De la forma A, tanto el anhidrato como el monohidrato (que puede prepararse por hidratación del anhidrato) son adecuados para uso farmacéutico. El monohidrato de la forma A es ventajoso porque no captará agua adicional durante las pruebas de estrés en las pruebas de estabilidad (tales como, por ejemplo, incubación abierta a 40 °C/80 % de humedad durante de 3 a 6 meses). Por consiguiente, el uso del monohidrato de la forma A puede preferirse en cuanto a estabilidad de almacenamiento.

La presente invención abarca todos los polimorfos de los compuestos dados a conocer en el presente documento, incluyendo los polimorfos descritos anteriormente del compuesto 1a.

Ejemplo 6: Inhibición de la desgranulación de mastocitos.

Introducción

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

Materiales y métodos

Materiales

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

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

Consumibles y equipo: Para procedimientos de manipulación de líquidos de pequeño volumen, se usaron de manera rutinaria pipetas electrónicas Rainin LTS (Mettler-Toledo). Se centrifugaron placas de 24 pocillos Costar-Corning (3337) en una centrífuga Eppendorf 5804R. Se usó una incubadora de sobremesa Heraeus B15 para incubaciones a 37 °C en condiciones no estériles. La fluorescencia se midió en placas negras de 96 pocillos Nunc (237105) usando un lector de microplacas (Tecan Safire) o lector de placas multimodo FlexStation 3 (Molecular Devices). Las células se mantuvieron en incubadoras de CO₂ Hera Cell 240 (Thermo Scientific). Las pipetas serológicas (4487, 4488 y 4489) y los matraces de cultivo celular (431080) eran de Corning-Costar, los tubos de microcentrífuga de 1,5 y 2 ml (0030 120.086 y 0030 120.094) eran de Eppendorf.

Cultivo celular: Se mantuvieron células RBL-2H3 obtenidas de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (ACC312) (Braunschweig, Alemania) en el 70 % de medio esencial mínimo con sales de Earle, el 20 % de medio RPMI 1640, el 10 % de FBS y L-glutamina 2 mM en el 95 % de aire/el 5 % de CO₂ a 37 °C y se comprobaron rutinariamente para detectar la contaminación por micoplasmas. Se realizaron pases de las células cada 3-4 días; después de lavar las células una vez con 35 ml de PBS, se incubaron las células 8 min con 5 ml de disolución de

tripsina-EDTA al 0,05 % a 37 °C. Se retiraron las células de la incubadora, se añadieron 15 ml de medio de cultivo y se resuspendieron las células mediante pipeteo repetido.

5 Siembra celular: Se recogieron las células con tripsina-EDTA tal como se describió y se sembraron 50-100 µl de suspensión celular en placas de agrupación de 24 pocillos Costar CellBind (n.º 3337). Las placas se mantuvieron durante 30 min a TA bajo la campana estéril antes de transferirlas a la incubadora. Las células se usaron en el plazo de uno o dos días después de la siembra.

Medición de la liberación de β-hexosaminidasa

Procedimientos experimentales

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

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

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

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

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

Evaluación del efecto farmacológico

40 Desgranulación (liberación de β-hexosaminidasa): Se calculó la desgranulación como el porcentaje de β-hexosaminidasa liberada con respecto al control máximo (β-hexosaminidasa total) después de restar el control negativo (liberación inespecífica) usando la fórmula;

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

45 Inhibición de la desgranulación (inhibición de la liberación de β-hexosaminidasa): Se calculó la inhibición de la desgranulación como el porcentaje de reducción de la liberación de β-hexosaminidasa con respecto al control positivo (liberación estimulada con antígeno) después de restar el control negativo (liberación inespecífica) usando la fórmula;

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

Medición de la concentración tolerada máxima

50 La concentración tolerada máxima (MTC), es decir, la concentración más alta de compuesto de prueba que no provoca citotoxicidad, tal como se determina por la liberación de lactato deshidrogenasa, se midió a lo largo del intervalo de concentración sometido a prueba. Se usó una prueba de citotoxicidad disponible comercialmente (Promega Cytotox-One, n.º de catálogo 67891).

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

Resultados

- 5 Se determinó la inhibición de la desgranulación dependiente de la concentración para todos los compuestos de prueba a lo largo de un intervalo de concentración, tal como se muestra en la figura 1, y se determinaron los valores de CI50 (concentración a la que se alcanza el 50 % de la inhibición máxima) para cada compuesto junto con los valores de MTC a lo largo del mismo intervalo de concentración (tabla 2). Los resultados se toman de al menos tres experimentos independientes.

Tabla 2. Inhibición de la desgranulación: valores de CI50, MTC y SI

Compuesto	CI50 (μM)	MTC (μM)	SI
1a	6,9	75	10,9
1b	5,1	100	19,6
1c	4,1	200	48,8
1d	3,3	75	22,7
1e	3,9	100	25,6
Miltefosina	4,2	25	6,0

- 10 La MTC de los compuestos de prueba fue de 11 a 50 veces más alta que sus respectivas CI50 y, por tanto, la inhibición de la desgranulación puede atribuirse a un efecto farmacológico y no a un efecto secundario a la citotoxicidad.

- 15 Todas las sustancias explicadas resumidamente en la tabla 2 muestran valores de CI50 en el intervalo micromolar bajo en combinación con valores de MTC altos en comparación con la miltefosina. Por tanto, los compuestos según la invención, en particular los compuestos 1a a 1e, tienen una citotoxicidad ventajosamente baja.

- 20 La desgranulación de mastocitos es un acontecimiento celular clave en reacciones alérgicas e inflamatorias, en particular en acontecimientos patológicos que implican la liberación de mediadores tales como histamina, leucotrienos y prostaglandinas, así como proteasas. Como consecuencia, la inhibición de la desgranulación de mastocitos es una estrategia valiosa para la prevención o el tratamiento de procesos patológicos que implican a los mediadores mencionados anteriormente. Además, el ensayo de desgranulación de mastocitos proporciona una estimación de la actividad de los compuestos de prueba en otras células que desempeñan un papel clave en la respuesta inflamatoria, tales como granulocitos, macrófagos y timocitos, que liberan citocinas y quimiocinas proinflamatorias y proteasas que erosionan los tejidos.

Ejemplo 7: Inhibición de la activación de Akt cinasa

25 Introducción

- El ensayo de desgranulación de mastocitos usando la línea celular RBL-2H3 (véase el ejemplo 6) también se usó para determinar el estado del eje PI3K/Akt. La activación de PI3K conduce a la producción de PIP3 en el lado citosólico de la bicapa lipídica. Se recluta Akt al dominio PIP3 y posteriormente se activa mediante fosforilación en los residuos Ser473 y Thr308 (Franke *et al.*, Cell 81: 727-736, (1995)). Una vez reclutada a la membrana, se fosforila y se activa por otras cinasas (Hemmings, Science 275: 628-630 (1997); Hemmings, Science 276: 534 (1997); Downward, Science 279: 673-674 (1998); Alessi *et al.*, EMBO J. 15: 6541-6551 (1996)). Se usa ampliamente inmunotransferencia de tipo Western del residuo Ser473 fosforilado en Akt (fosfo-Akt Ser473) para evaluar el nivel de activación del eje PI3K/Akt.

Materiales y métodos

35 *Materiales*

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

Equipo

Se usaron pipetas multicanal de 12 pocillos (30-300 μ l) de Eppendorf. Se agitaron las placas de ensayo en un control TiMix 5 (Edmund Bühler). Se realizó la detección de electroquimioluminiscencia en un instrumento SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery).

Medición de fosfo-Akt Ser473

5 Procedimientos experimentales

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

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

Evaluación de los efectos de fosfo-Akt Ser473

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

Resultados

Se determinaron los niveles de fosfo-Akt Ser473 en células sensibilizadas con IgE y estimuladas con antígeno después del tratamiento sin (control positivo) o con compuesto de prueba 1, 5 y 25 μ M y se normalizaron con respecto a los niveles de Akt total. Se demostró la inhibición dependiente de la concentración de la fosforilación de Akt en Ser473, tal como se muestra en la figura 2. La tabla 3 muestra los niveles de fosfo-Akt Ser473 normalizados como porcentaje de los del control positivo.

Tabla 3. Inhibición de la fosforilación de Akt en Ser473 mediante los compuestos 1a y 1c

Compuesto	Nivel de fosfo-Akt Ser473 (% del control positivo)		
	1 μ M	5 μ M	25 μ M
1a	80,8 $\pm$ 17,9	62,4 $\pm$ 16,1	9,7 $\pm$ 4,9
1c	119,7 $\pm$ 35,7	67,9 $\pm$ 17,3	17,4 $\pm$ 6,4

Porcentaje de Akt total fosforilada en Ser473 expresado como porcentaje de células no tratadas de control, después de la inducción con IgE y antígeno durante 15 min.

Se observó una disminución dependiente de la dosis en los niveles de fosfo-Akt Ser473 después del tratamiento con todos los compuestos explicados resumidamente en la tabla 3. Por tanto, los compuestos según la invención pueden usarse para reducir los niveles de Akt activada y, por consiguiente, son útiles en la intervención médica en indicaciones en las que Akt hiperactivada desempeña un papel patógeno, tales como enfermedades inflamatorias y alérgicas, enfermedades hiperproliferativas y otras indicaciones.

Ejemplo 8: Inhibición de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) en ratones.

Introducción

Se evaluaron los efectos antiinflamatorios y antialérgicos de los compuestos 1a y 1c en un modelo de ratón de

reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) de la piel y se compararon con un control de vehículo y con el fármaco de referencia dexametasona. Las reacciones de DTH son respuestas inmunitarias mediadas por células específicas de antígeno, impulsadas principalmente por células T auxiliares tipo 1 (Th1), de manera similar a la respuesta a la inmunización con tuberculina. La reacción inmunitaria inducida por una exposición a ovoalbúmina en animales previamente sensibilizados con ovoalbúmina en adyuvante completo de Freund se caracteriza por hinchazón (edema) en el sitio de la exposición, por ejemplo la oreja del ratón.

La dexametasona, un esteroide antiinflamatorio, reduce las respuestas inmunitarias mediadas por células y se empleó para validar la capacidad de respuesta del ensayo al tratamiento farmacológico.

Materiales y métodos

10 *Materiales*

Ovoalbúmina (fracción V, polvo liofilizado), adyuvante completo de Freund (CFA) y metilcelulosa se obtuvieron de Sigma-Aldrich, dexametasona de Pharmaceutical Works Polfa (Pabianice, Polonia).

Animales

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

Sensibilización y exposición a antígeno

El tamaño del grupo fue de $n = 8$ ratones a menos que se indique lo contrario. Los compuestos de prueba se prepararon recientemente antes de la administración.

20 Sensibilización: Se reconstituyó el antígeno proteico, ovoalbúmina, en PBS a 4 mg/ml. Se preparó una emulsión de ovoalbúmina-CFA mezclando la disolución de proteínas con la suspensión de CFA a una razón de 1:1, usando dos jeringas Luer-lock. Se sometió a prueba la emulsión poniendo una gota de emulsión sobre PBS; si la emulsión permanecía como una gota apretada en PBS, la emulsión se consideraba lista. Los ratones se sensibilizaron inyectando por vía subcutánea 25 μ l de emulsión en cada lado de la cola (100 μ g de ovoalbúmina por ratón).

25 Exposición: El sexto día después de la sensibilización, se provocó DTH exponiendo a los animales por vía subcutánea (aguja de calibre 30, B. Braun Melsungen, Melsungen, Alemania) en las orejas izquierdas a 10 μ l de una suspensión al 1 % de ovoalbúmina agregada por calor (HOVA) (100 μ g de ovoalbúmina por ratón). A las orejas derechas se les administró por vía subcutánea PBS y sirvieron para determinar las diferencias individuales en el grosor de las orejas. La HOVA se preparó calentando una disolución al 5 % de ovoalbúmina en solución salina durante 1 h a 80 °C con agitación ocasional. Después del enfriamiento hasta temperatura ambiente y la centrifugación (400 g, 10 min a 4 °C), se lavó el sedimento dos veces con solución salina, se resuspendió al 2 % en PBS y se almacenaron alícuotas a -30 °C. Antes de la inyección, se diluyó HOVA con un volumen igual de PBS y se sonicó. Se midió el grosor de la oreja con un calibre preciso cargado por resorte (n.º de art. 7309, Mitutoyo, Kawasaki, Japón) antes de la exposición y 24 h después de la exposición.

35 La sensibilidad, la exposición y la medición del grosor de la oreja se realizaron bajo anestesia (ketamina 80 mg/kg más xilacina 8 mg/kg, por vía intraperitoneal).

Administración de compuestos

Se compararon los efectos antiinflamatorios de los compuestos 1a y 1c con un control de vehículo (disolución de metilcelulosa al 0,5 %) y con el fármaco de referencia, dexametasona. Los compuestos de prueba se administraron a 25 ó 100 mg/kg por vía oral mediante sonda (n.º de art. 432093, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Alemania) 16 h y 3 h antes de la sensibilización y luego dos veces al día con la dosis final administrada 3 h antes de la exposición en la oreja (un total de 14 administraciones). Se administró dexametasona a 0,1 ó 1 mg/kg por vía oral mediante sonda 3 h antes de la sensibilización y una vez al día con la dosis final administrada 3 h antes de la exposición al antígeno (un total de 7 administraciones). Todas las administraciones se administraron en un volumen de 10 ml/kg.

Cuantificación de resultados de ensayo

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

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

$$\text{donde } IET = (ET_{24 \text{ h pc}} - ET_{\text{predosis}})_{\text{orejas tratadas con HOVA}} - (ET_{24 \text{ h pc}} - ET_{\text{predosis}})_{\text{orejas tratadas con PBS}}$$

(IET, aumento del grosor de la oreja; ET, grosor de la oreja; pc, tras la exposición)

Evaluación estadística

Se calcularon la media y la desviación estándar (DE) a partir de los valores de edema de oreja individual. La evaluación estadística fue un análisis unifactorial de la varianza (ANOVA) con la prueba *a posteriori* de Dunnett o prueba de la t de Student cuando sea apropiado.

Resultados

En la figura 3 se muestra la supresión de la hinchazón de la oreja del ratón mediante los compuestos 1a y 1c así como dexametasona, en comparación con el control de vehículo. La tabla 4 resume la inhibición de la DTH para los compuestos 1a y 1c.

Tabla 4. Inhibición de la hinchazón de la oreja del ratón mediante los compuestos 1a y 1c en la respuesta de DTH en ratones.

Compuesto	Inhibición de la hinchazón de la oreja del ratón
1a, 25 mg/kg	49*
1a, 100 mg/kg	52*
1c, 100 mg/kg	41*
Dexametasona, 0,1 mg/kg	14
Dexametasona 1,0 mg/kg	53*

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

La dexametasona administrada por vía oral a una dosis de 1 mg/kg una vez al día a lo largo de todo el periodo de sensibilización dio como resultado una respuesta de DTH significativamente reducida, con una inhibición del 53 %. Sin embargo, una dosis tan alta (sobredosis) no es adecuada para el tratamiento de seres humanos debido a los efectos secundarios graves del corticosteroide y sólo se usó para validar la capacidad de respuesta del modelo. Además, en el transcurso del estudio actual, se observó una pérdida significativa en el peso corporal del 9 % (p < 0,01 frente al control de vehículo con la prueba de la t de Student para datos emparejados) en el grupo de dexametasona a dosis alta. Una dosis más clínicamente representativa de dexametasona en el ratón es de 0,1 mg/kg, pero a esta dosis la inhibición fue muy baja (14 %) y no alcanzó significación, lo que indica que en este modelo sólo son activas dosis de esteroides que dan como resultado una pérdida significativa de peso corporal tras la administración repetida.

El compuesto 1a, administrado por vía oral dos veces al día a lo largo de todo el periodo de sensibilización en dos regímenes de dosificación, 25 mg/kg o 100 mg/kg, redujo la respuesta de DTH en un 49 % y un 52 %, respectivamente. La administración de la dosis más alta del compuesto 1c redujo la respuesta de DTH en un 41 %. Por tanto, estos compuestos pudieron producir una inhibición casi equivalente a la de la dosis alta de dexametasona (hasta un 98 % para 1a y un 77 % para 1c). A diferencia de la dexametasona, no se observaron efectos secundarios tóxicos significativos de los compuestos 1a o 1c durante el transcurso del estudio.

La reducción de la respuesta de DTH obtenida mediante el tratamiento con los compuestos 1a y 1c demuestra que los compuestos según la invención, y en particular los compuestos 1a y 1c, son eficaces en la intervención farmacéutica en enfermedades alérgicas e inflamatorias que implican respuestas inmunitarias mediadas por células específicas de antígeno. Incluso a la dosis baja, el compuesto 1a proporcionó la misma alta inhibición de la respuesta de DTH que se obtiene por una sobredosis de dexametasona y, por tanto, representa un compuesto particularmente preferido de la presente invención.

Ejemplo 9: Inhibición de la respuesta inflamatoria de dermatitis por contacto alérgica en ratones.

Introducción

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

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

Materiales y métodos

Materiales

Se obtuvo dihidrogenofosfato de dexametasona (Dexa-Inject) de Mibe GmbH, Jena, Alemania y diacetato de diflorasona de Basotherm, Biberach an der Riss, Alemania.

Animales

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

Sensibilización con TDI, exposición a alérgeno y prueba de hinchazón de la oreja del ratón

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

Administración de compuestos para tratamiento sistémico

El tamaño del grupo fue de n = 7 ratones a menos que se indique lo contrario. Los compuestos de prueba se prepararon recientemente antes de la administración.

Tiempo de administración: Para determinar el tiempo óptimo para la administración, los grupos de tratamiento se trataron por vía oral mediante sonda con 100 mg/kg de compuesto 1a o 1c (suspendido en tilosa al 0,5 %, 10 ml/kg) 1, 4 ó 16 h antes de la exposición tópica a TDI. Se trató un grupo con 100 mg/kg de miltefosina por vía oral, 16 h antes de la exposición (basándose en los datos disponibles para el tiempo de administración óptimo para la miltefosina) y los ratones tratados con vehículo recibieron tilosa (10 ml/kg) por vía oral, 4 h antes de la exposición.

Dosis-respuesta: Se trataron dos grupos de ratones por vía oral con compuesto 1a a 25 mg/kg o 100 mg/kg suspendido en tilosa al 0,5 %, 4 h antes de la exposición tópica a TDI. Los ratones tratados con vehículo recibieron tilosa al 0,5 % por vía oral 4 h antes de la exposición. Como control positivo, se administró dexametasona en solución salina a 1 mg/kg o 3 mg/kg, 2 h y 30 min antes de la exposición y 1 h después de la exposición. La dosis y el esquema de dosificación para la dexametasona se basaron en la experiencia previa que muestra un efecto máximo en este modelo.

Administración de compuestos para tratamiento tópico

Se administró compuesto 1a a dos grupos de ratones por vía tópica en 20 µl de una disolución al 2 % o al 6 % en propilenglicol. La suspensión se calentó hasta 60 °C y se mezcló usando un termomezclador (Eppendorf) hasta que se volvió transparente. Se aplicó la disolución 2 h antes de la exposición tópica a TDI mediante la administración de 10 µl en cada una de las superficies interna y externa de las orejas izquierdas. Un grupo de vehículo (n = 5) se trató con propilenglicol. Como control positivo, se administró diacetato de diflorasona al 0,01 % (dosis baja) y al 0,05 % (dosis alta) en 20 µl de acetona, 2 h antes de la exposición. Un grupo de control basal se dejó sin tratar.

Determinación del peso de ganglios linfáticos locales y recuento celular

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

Evaluación estadística

Se calcularon la media y el error estándar de la media (EEM) a partir de los valores de edema de oreja individual. La evaluación estadística fue un análisis unifactorial de la varianza (ANOVA) (si se pasó la prueba de distribución

normal) o el ANOVA unifactorial por rangos de Kruskal-Wallis (si no se pasó la prueba de distribución normal). A ambos les siguió una prueba *a posteriori* (método de Dunnett o prueba de Dunn, respectivamente). Una $p < 0,05$ se consideró significativa.

Resultados

- 5 En la figura 4A se muestra la supresión de la hinchazón de la oreja del ratón mediante los compuestos 1a y 1c después de la administración oral, en comparación con el control de vehículo. La tabla 5 resume la inhibición de la respuesta de dermatitis por contacto alérgica mediante los compuestos 1a y 1c.

Tabla 5. Efecto de los compuestos 1a y 1c administrados por vía oral sobre la hinchazón de la oreja en la respuesta de dermatitis por contacto alérgica en ratones.

Compuesto	Inhibición de la hinchazón de la oreja del ratón
Tiempo de administración (oral)	
1a, 100 mg/kg, 1 h	72,6***
1a, 100 mg/kg, 4 h	73,4***
1a, 100 mg/kg, 16 h	29,0
1c, 100 mg/kg, 1 h	58,1**
1c, 100 mg/kg, 4 h	68,5***
1c, 100 mg/kg, 16 h	42,7 [§]
Miltefosina, 100 mg/kg, 16 h	47,3 [§]
Dosis-respuesta (oral)	
1a, 25 mg/kg	44,9***
1a, 100 mg/kg	44,4***
Dexametasona, 1 mg/kg	78,6***
Dexametasona, 3 mg/kg	87,1***

- 10 ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente al control de vehículo (prueba *a posteriori* de Dunnett) en comparación con el vehículo, [§] $p < 0,05$ frente al control de vehículo (prueba de la t)

- 15 En el estudio del tiempo de administración con administración oral, los compuestos 1a y 1c redujeron la hinchazón de la oreja significativamente (hasta el 73 % del control de vehículo) cuando se administraron 1 h o 4 h antes de la exposición, tal como también se muestra en la figura 4A. Se ha mostrado anteriormente que la miltefosina tiene una eficacia máxima después de la administración oral cuando se administra 16 h antes de la exposición y también en este estudio redujo significativamente la hinchazón de la oreja (47 % del control de vehículo). Sin embargo, la miltefosina no fue tan eficaz de manera máxima como los compuestos 1a y 1c en su tiempo de administración óptimo de 4 h, alcanzando sólo el 64 % de la eficacia inhibitoria de 1a y el 69 % de la del compuesto 1c.

- 20 En el estudio de dosis-respuesta, el compuesto 1a administrado 4 h antes de la exposición redujo la hinchazón de la oreja significativamente (45 %) a 25 ó 100 mg/kg, tal como se muestra en la figura 4B. En comparación, la dexametasona administrada por vía oral a dosis de 1 y 3 mg/kg inhibió significativamente la hinchazón de la oreja (el 78 y el 87 %, respectivamente). Tal como se comentó en el ejemplo 8 para la respuesta de DTH, tales dosis altas (sobredosis) de dexametasona no son adecuadas para el tratamiento de seres humanos debido a los efectos secundarios graves del corticosteroide y se usaron para validar la capacidad de respuesta del modelo. No obstante,
- 25 el compuesto 1a fue capaz de efectuar una inhibición igual al 52 % de la dosis más alta de dexametasona a dosis de 1a, que no mostró toxicidad.

- 30 Los compuestos 1a (25 mg/kg y 100 mg/kg) y 1c (100 mg/kg) tuvieron un impacto significativo en la reacción inflamatoria inducida por TDI. Por tanto, los compuestos según la invención, y en particular los compuestos 1a y 1c, son particularmente eficaces y, por tanto, útiles para la intervención farmacéutica oral en enfermedades inflamatorias, en particular en dermatitis atópica.

En la figura 4C se muestra la supresión de la hinchazón de la oreja del ratón mediante los compuestos 1a y 1c después de la administración tópica, en comparación con el control de vehículo. La tabla 6 resume la inhibición de la respuesta de dermatitis por contacto alérgica mediante los compuestos 1a y 1c.

Tabla 6. Efecto del compuesto 1a administrado por vía tópica sobre la hinchazón de la oreja en la respuesta de dermatitis por contacto alérgica en ratones.

Compuesto	Inhibición de la hinchazón de la oreja del ratón
1a, 2 %	67,9**
1a, 6 %	63,1**
Diflorasona, 0,1 %	101,1***
Diflorasona, 0,5 %	110,8***

** p <0,01, *** p <0,001 frente al control de vehículo (prueba *a posteriori* de Dunnett) en comparación con el vehículo. El tratamiento con diflorasona redujo el grosor de la oreja por debajo del de los ratones no tratados.

- 5 El compuesto 1a administrado por vía tópica como disolución al 2 % o al 6 % redujo significativamente la hinchazón de la oreja hasta el 68 %, en comparación con el control de vehículo. El control positivo, la diflorasona, eliminó por completo la hinchazón de la oreja e incluso redujo el grosor de la oreja por debajo del nivel de los ratones no tratados. Esto indica que las dosis de diflorasona usadas en este caso no son representativas de un punto de referencia clínico, sino que se usaron para validar la capacidad de respuesta del modelo. También debe enfatizarse que la diflorasona es uno de los corticosteroides dérmicos más fuertes y se toma para el eccema grave.

10 Uno de los efectos secundarios más indeseables de la administración de corticosteroides es la inmunosupresión, que conduce a la incapacidad de abordar eficazmente la infección parasitaria, la cicatrización de heridas y el crecimiento tumoral. En el estudio actual, se determinó la reacción de los ganglios linfáticos locales después de la exposición a TDI (peso de los ganglios linfáticos y número de células) para evaluar la respuesta de los órganos inmunitarios. La diflorasona produjo una reducción altamente significativa en la reacción de los ganglios linfáticos locales tanto al 0,1 % como al 0,5 %, inhibiendo completamente el aumento en el peso de los ganglios linfáticos y el número de células (figuras 4D y 4E), incluso reduciendo esto hasta niveles por debajo de los animales no tratados. En cambio, el tratamiento tópico con compuesto 1a al 2 % o al 6 % no tuvo ningún impacto en la reacción de los ganglios linfáticos locales (figuras 4D y 4E).

20 En vista del fuerte efecto mostrado en el modelo de dermatitis por contacto alérgica, los compuestos de la presente invención, incluyendo el compuesto 1a, son particularmente eficaces y, por tanto, útiles para la intervención farmacéutica tópica en enfermedades inflamatorias, en particular en dermatitis atópica. Además, los compuestos de la presente invención, incluyendo el compuesto 1a, no muestran los efectos adversos típicos de los corticosteroides administrados por vía tópica, tales como la inhibición de la reacción de los ganglios linfáticos y la pérdida de peso corporal.

Ejemplo 10: Inhibición de la artritis inducida por colágeno tipo II (CIA) en el ratón.

Introducción

30 Se evaluó el efecto inhibidor del compuesto 1a para la actividad antiinflamatoria y antiartrítica en el modelo de artritis inducida por colágeno tipo II (CIA) en el ratón. La CIA se ha propuesto como modelo animal pertinente de artritis reumatoide en seres humanos. En este modelo, se provoca una artritis periférica por inyección intradérmica de colágeno tipo II (CII) homólogo o heterólogo (por ejemplo, bovino, de pollo) en adyuvante completo de Freund (CFA) en ratas o ratones (Stuart *et al.*, Ann Rev Immunol. 2: 199-218 (1984); Marty *et al.*, J Clin Invest. 107: 631-640 (2001); Boissier *et al.*, Eur J Immunol. 25: 1184-90 (1995)). El papel central desempeñado por las células T en el desarrollo de CIA tipo II se demuestra por la respuesta proliferativa de células T a CII de ratón en ratones inmunizados, la transferencia adoptiva exitosa de la enfermedad con células inmunitarias del bazo, y la resistencia de ratones atímicos desnudos a la inducción de la patología (Stuart *et al.*, Ann Rev Immunol. 2: 199-218 (1984); Marty *et al.*, J Clin Invest. 107: 631-640 (2001)). Una ventaja de este modelo de artritis en comparación con otros es el desarrollo de una respuesta artrítogénica hacia un antígeno bien definido (CII), que también permite el estudio de fenómenos inmunológicos inducidos por antígenos y su modificación selectiva mediante la intervención inmunofarmacológica.

Materiales y métodos

Materiales

45 Se disolvió colágeno tipo II bovino (Chondrex, Redmond WA, EE.UU.) a 2 mg/ml en ácido acético 0,05 M mediante agitación suave durante la noche a 4 °C. Se preparó CFA añadiendo *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco, Detroit, MI) a 2 mg/ml a IFA (adyuvante incompleto de Freund, Sigma Aldrich, Milán, Italia). Antes de la inyección, se emulsionó CII con un volumen igual de CFA.

Animales

Se adquirieron ratones DBA/1j macho de ocho a 9 semanas de edad de Harlan Laboratories srl (San Pietro al Natisone, Údine, Italia) y se mantuvieron en condiciones de laboratorio convencionales con libre acceso a pienso y agua. Se permitió que los ratones se adaptaran una semana a su entorno antes de comenzar el estudio.

Inducción de artritis inducida por colágeno (CIA)

- 5 El tamaño del grupo fue de $n = 11$ ratones a menos que se indique lo contrario. Los compuestos de prueba se prepararon recientemente antes de la administración. Se les inyectó a los ratones por vía intradérmica en la base de la cola 100 μ l de una emulsión que contenía 100 μ g de CII, IFA y 100 μ g de *Mycobacterium tuberculosis*. El día 21, se administró un refuerzo de CII en IFA.

Tratamiento profiláctico

- 10 Se trataron cinco grupos de ratones bajo un régimen profiláctico desde el día 0 hasta el 47, y un grupo adicional de ratones tratados de manera simulada se trató sólo con el vehículo de CII, los días 0 y 21. Se administró el compuesto 1a como una suspensión en carboximetilcelulosa al 0,5 % (10 ml/kg) y, como control positivo, se administró dexametasona a 0,3 mg/kg tal como se detalla a continuación:

Grupo 1: compuesto 1a a 25 mg/kg, por vía oral mediante sonda, dos veces al día

- 15 Grupo 2: compuesto 1a a 100 mg/kg, por vía oral mediante sonda, dos veces al día

Grupo 3: dexametasona 0,3 mg/kg, por vía intraperitoneal, una vez al día

Grupo 4: vehículo (carboximetilcelulosa), por vía oral mediante sonda

Grupo 5: ratones tratados de manera simulada

Los animales se sacrificaron el día 47 después de la inmunización.

- 20 *Tratamiento terapéutico*

Se trataron grupos de ratones con compuesto 1a desde la aparición de los síntomas artríticos, definida como el primer día en el que se observó una puntuación de enfermedad de 1 o superior, y los ratones que expresaban la puntuación de enfermedad respectiva se asignaron al azar a cada grupo experimental. El tratamiento se continuó durante 20 días consecutivos.

- 25 Grupo 6: compuesto 1a a 100 mg/kg, por vía oral mediante sonda, dos veces al día

Como el tratamiento se basó en la expresión individual de los síntomas de artritis, los ratones se sincronizaron con el primer día de tratamiento para evaluar la progresión de la enfermedad. No se incluyó ningún grupo de vehículo independiente para el régimen de tratamiento terapéutico, por lo que el grupo de vehículo 4 volvió a analizarse después de la sincronización con el primer día en el que se observó una puntuación de enfermedad de 1 o superior.

- 30 Los animales se sacrificaron después de 20 días de tratamiento.

Evaluación clínica

Un observador que no conocía los regímenes de tratamiento evaluó a los ratones diariamente para detectar artritis según un sistema de puntuación macroscópico: 0 = sin signos de artritis; 1 = hinchazón y/o enrojecimiento de la pata o un dedo; 2 = implicación de 2 articulaciones; 3 = implicación de más de 2 articulaciones; 4 = artritis grave de toda la pata y los dedos. Se calculó un índice de artritis para cada ratón sumando las puntuaciones de las patas individuales. También se determinó la gravedad clínica mediante la evaluación del grosor de la pata de las patas delanteras y traseras usando un medidor de grosor. Se calculó un índice para cada ratón sumando el grosor de las patas individuales. Los pesos corporales también se registraron diariamente.

- 35

Evaluación estadística

- 40 Se calcularon la media y la desviación estándar (DE) a partir de los valores de puntuación individuales.

Para la puntuación de artritis se realizaron dos cálculos estadísticos diferentes. Para cada día de tratamiento, se compararon las puntuaciones de artritis de cada grupo con el grupo de control de vehículo mediante la prueba de la t de Student y se consideró significativa una $p < 0,05$.

- 45 Además, se calculó una puntuación de artritis acumulada para cada grupo de tratamiento sumando todas las puntuaciones de artritis a lo largo de todo el periodo de estudio. Las puntuaciones de artritis acumuladas se compararon mediante la prueba de la t de Student y se consideró significativa una $p < 0,05$. La puntuación de artritis acumulada requiere que todos los animales se evalúen durante el mismo periodo de tiempo; para determinar la puntuación de artritis acumulada de los animales que murieron durante el estudio, se sustituyeron los valores que faltaban por la media del grupo para el día del valor que faltaba. La sustitución de los valores que faltaban sólo se

realizó para la puntuación de artritis acumulada y no se usó para otros cálculos.

Resultados

Efectos del tratamiento profiláctico de compuestos de prueba sobre la puntuación artrítica

5 Tal como se esperaba, comenzando 5-6 días después del refuerzo con CII, los signos clínicos de artritis se hicieron observables en los ratones de control tratados con vehículo, que consistían en un aumento progresivo de las puntuaciones artríticas, acompañado de un aumento del grosor de la pata. Se observó una pérdida significativa en el peso corporal de los animales tratados con vehículo en comparación con el grupo tratado de manera simulada después del refuerzo con CII.

10 El compuesto 1a redujo la puntuación de artritis acumulada y el grosor de la pata tanto a 25 como a 100 mg/kg en comparación con los ratones tratados con vehículo, tal como se muestra en la figura 5A. La dexametasona suprimió casi por completo los signos clínicos de artritis, pero también indujo una reducción significativa del peso corporal desde el día 8 hasta el final del estudio, en comparación con ratones tratados con vehículo (figura 5B). Sin embargo, no se observaron efectos sobre el peso corporal en ratones tratados con compuesto 1a a dosis bajas y altas (figura 5B).

Efectos del tratamiento terapéutico de compuestos de prueba sobre la puntuación artrítica

El compuesto 1a a 100 mg/kg redujo significativamente la puntuación de artritis y la puntuación de artritis acumulada en comparación con los ratones tratados con vehículo desde el día 11 hasta el 13 y el día 21, tal como también se muestra en la figura 5C. Además, se observó una tendencia a una reducción en la duración de la enfermedad en comparación con los ratones tratados con vehículo.

Pesos de órganos inmunitarios

En el sacrificio, se recogieron los timos y los bazo y se pesaron para evaluar el efecto sobre estos importantes órganos inmunitarios. En comparación con los ratones tratados de manera simulada, los animales tratados con el vehículo mostraron un aumento significativo en el peso del bazo, debido a la proliferación de linfocitos en respuesta a la provocación mediante inyección de CII. Tal como se esperaba, el tratamiento con el fármaco de control positivo, la dexametasona, redujo notablemente los pesos tanto de los bazo como de los timos en comparación tanto con los grupos tratados con vehículo como con los grupos tratados de manera simulada demostrando el efecto inmunosupresor conocido de los corticosteroides (figura 5D). En cambio, el tratamiento con compuesto 1a no redujo los pesos del timo o del bazo en comparación con los ratones tratados con vehículo (figura 5D).

Los datos demuestran que el compuesto 1a mejoró el transcurso clínico de la CIA tipo II cuando se administró profilácticamente, reduciendo la puntuación de artritis y el grosor de la pata. Cuando se administró bajo el régimen terapéutico, el compuesto 1a evidenció una reducción significativa en la puntuación de enfermedad acumulada. El compuesto 1a no mostró ningún efecto tóxico, mientras que la dexametasona provocó una pérdida significativa en el peso corporal y en los pesos del bazo y del timo. Estos resultados sugieren que los compuestos de la presente invención, incluyendo el compuesto 1a, son particularmente eficaces y, por tanto, útiles para la intervención médica en la artritis reumatoide.

Ejemplo 11: Estudio farmacocinético de cinco lotes diferentes de compuesto 1a después de una única administración oral a ratones.

Introducción

El objetivo del estudio fue evaluar las propiedades farmacocinéticas (PK) de cinco lotes diferentes, incluyendo anhidratos y monohidratos, de la forma cristalina A del compuesto 1a (véase la tabla 1 en el ejemplo 5) después de una única administración oral a ratones. Tres de las formas eran anhidras y dos eran monohidratos.

Materiales y métodos

Se administró el compuesto 1a como una suspensión de metilcelulosa al 0,5 % (Sigma-Aldrich) en agua a una dosis de 100 mg/kg (10 ml/kg) por sonda oral a ratones Balb/c hembra no sometidos a ayuno (n = 3). Se había mostrado anteriormente que esta dosis se toleraba bien. No se demostró toxicidad manifiesta independientemente de la forma cristalina polimórfica.

Se recogió sangre por decapitación a las 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 48 h después de la administración. Se aisló plasma sanguíneo por centrifugación a 4 °C (20.000 x g durante 10 min), se transfirió a microtubos que contenían heparina de litio y se congeló en alícuotas a -70 °C hasta que se sometió a ensayo por espectrometría de masas. En la figura 6 se muestran perfiles de concentración plasmática media-tiempo (semilogarítmicos) de las cinco formas cristalinas polimórficas del compuesto 1a.

Parámetros farmacocinéticos

Para la evaluación PK, estadísticas de resumen y representación gráfica de curvas de concentración/tiempo, todos los valores por debajo del límite inferior de cuantificación (LLOQ) se establecieron en cero. En la tabla 7 se enumeran los parámetros PK para las cinco formas del compuesto 1a.

Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos de las formas polimórficas del compuesto 1a en ratones Balb/c hembra (n = 3) después de una única administración oral de 100 mg/kg en disolución de metilcelulosa al 0,5 %.

Parámetro PK	Forma polimórfica				
	2338-CF/30	2208-CF/1	KP-0722.11	KP-0726.11	TN-0382.11
$C_{\text{máx}}$ (ng/ml)	1063	1003	571	759	627
$t_{\text{máx}}$ (h)	1,0	1,0	2,0	1,0	1,0
$C_{\text{último}}$ (ng/ml)	1,8	1,1	3,8	1,2	3,4
$t_{\text{último}}$ (h)	48,0	48,0	24,0	48,0	24,0
AUC_{0-t} (ng*h/ml)	3118	4400	3162	3744	3535
AUC_{0-inf} (ng*h/ml)	3144	4412	3179	3758	3547
MRT (h)	5,5	5,0	4,8	5,5	5,9
$t_{1/2}$ (h)	9,9	7,3	n.d.	8,2	n.d.

$C_{\text{máx}}$ Concentración plasmática máxima observada

$t_{\text{máx}}$ Tiempo de aparición de $C_{\text{máx}}$

$C_{\text{último}}$ Concentración en el último punto de tiempo de muestreo

$t_{\text{último}}$ Tiempo del último punto de tiempo de muestreo

10 AUC_{0-t} Área bajo la curva de concentración plasmática frente a tiempo desde tiempo cero hasta $t_{\text{último}}$, calculada por la regla trapezoidal

AUC_{0-inf} Área bajo la curva de concentración plasmática frente a tiempo desde tiempo cero hasta el infinito con extrapolación de la fase terminal

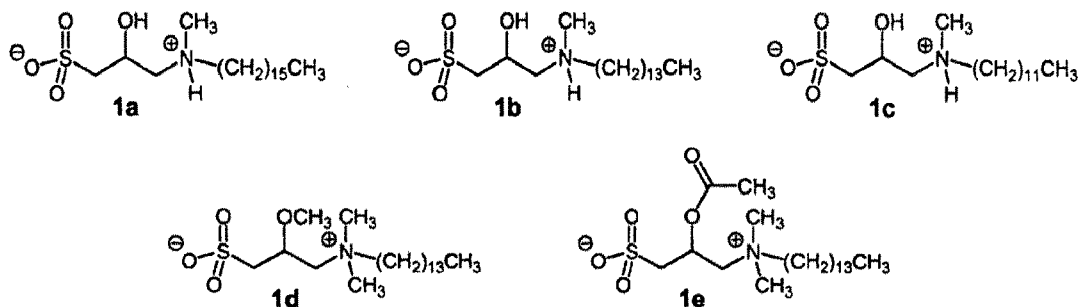
15 MRT Tiempo de residencia medio calculado usando cálculos de área trapezoidal extrapolados hasta el infinito

$t_{1/2}$ Semivida terminal

20 El comportamiento PK fue comparable para todas las formas polimórficas del compuesto 1a. El compuesto se absorbió rápidamente del tracto gastrointestinal (GI), alcanzando una concentración plasmática máxima después de 1-2 h. La exposición global fue máxima con la forma 2208-CF/1. Se observó un segundo pico en plasma a las 8 h después de la administración de las formas KP-0726.11 y TN-0382.11, lo que indica una segunda ventana de absorción que podría estar provocada por la solubilidad mejorada de estos polimorfos en la parte inferior del tracto GI. El tiempo de residencia medio estaba en el mismo intervalo para todas las formas polimórficas sometidas a prueba y las curvas PK y las semividas terminales fueron similares entre 8-24 h, tal como también se muestra en la figura 6. No se determinaron las semividas terminales para KP-0722.11 o TN-0382.11, debido a la falta de valores a las 48 h para estas formas.

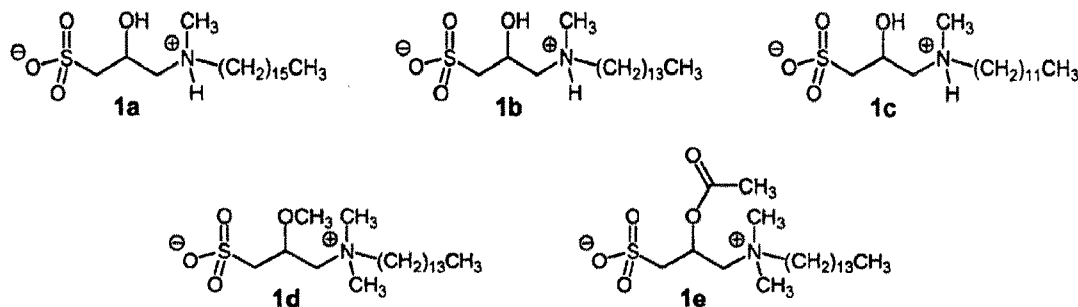
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula 1a, 1b, 1c, 1d, o 1e



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

2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula 1a, 1b, 1c, 1d, o 1e



- 10 o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

3. Un compuesto según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico.

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

5. El compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que el trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico se selecciona de psoriasis, dermatitis atópica (eccema atópico), dermatitis por contacto, eccema xerótico, dermatitis seborreica, neurodermitis, dishidrosis, eccema discoide, eccema venoso, dermatitis

herpetiforme (enfermedad de Duhring), autoeccematización, dermatomiositis, síndrome de hiper-IgE (Buckley), síndrome de Wiskott-Aldrich, anafilaxia, alergia alimentaria, o reacciones alérgicas a picaduras venenosas.

- 5 6. El compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que el trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico se selecciona de urticarias agudas, urticarias crónicas, urticarias físicas incluyendo urticaria acuagénica, urticaria colinérgica, urticaria por frío (urticaria por frío crónica), urticaria por presión retardada, urticaria dermatográfica, urticaria por calor, urticaria solar, urticaria por vibración, urticaria adrenérgica, o angioedema por urticaria.
- 10 7. El compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que el trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico se selecciona de enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis por desviación (diverticulitis), síndrome de Behçet, colitis indeterminada, enfermedad celiaca, síndrome del intestino irritable, íleo posoperatorio, gastroenteropatía eosinofílica, o gastritis.
- 15 8. El compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que el trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico se selecciona de rinitis alérgica crónica, rinitis alérgica estacional (fiebre del heno), conjuntivitis alérgica, conjuntivitis química, conjuntivitis neonatal, síndrome de Sjögren, glaucoma de ángulo abierto, enfermedad de ojo seco, o edema macular diabético.
- 20 9. El compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que el trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico se selecciona de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma alérgica, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, o fibrosis pulmonar.
10. El compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que el trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico se selecciona de artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia, artritis reactiva, o polimialgia reumática.
- 25 11. El compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que el trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico se selecciona de esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, arteritis temporal, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmunitaria, o alopecia areata.
- 30 12. El compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que el trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico se selecciona de una enfermedad de injerto contra huésped, una enfermedad de huésped contra injerto, o un rechazo de trasplante.

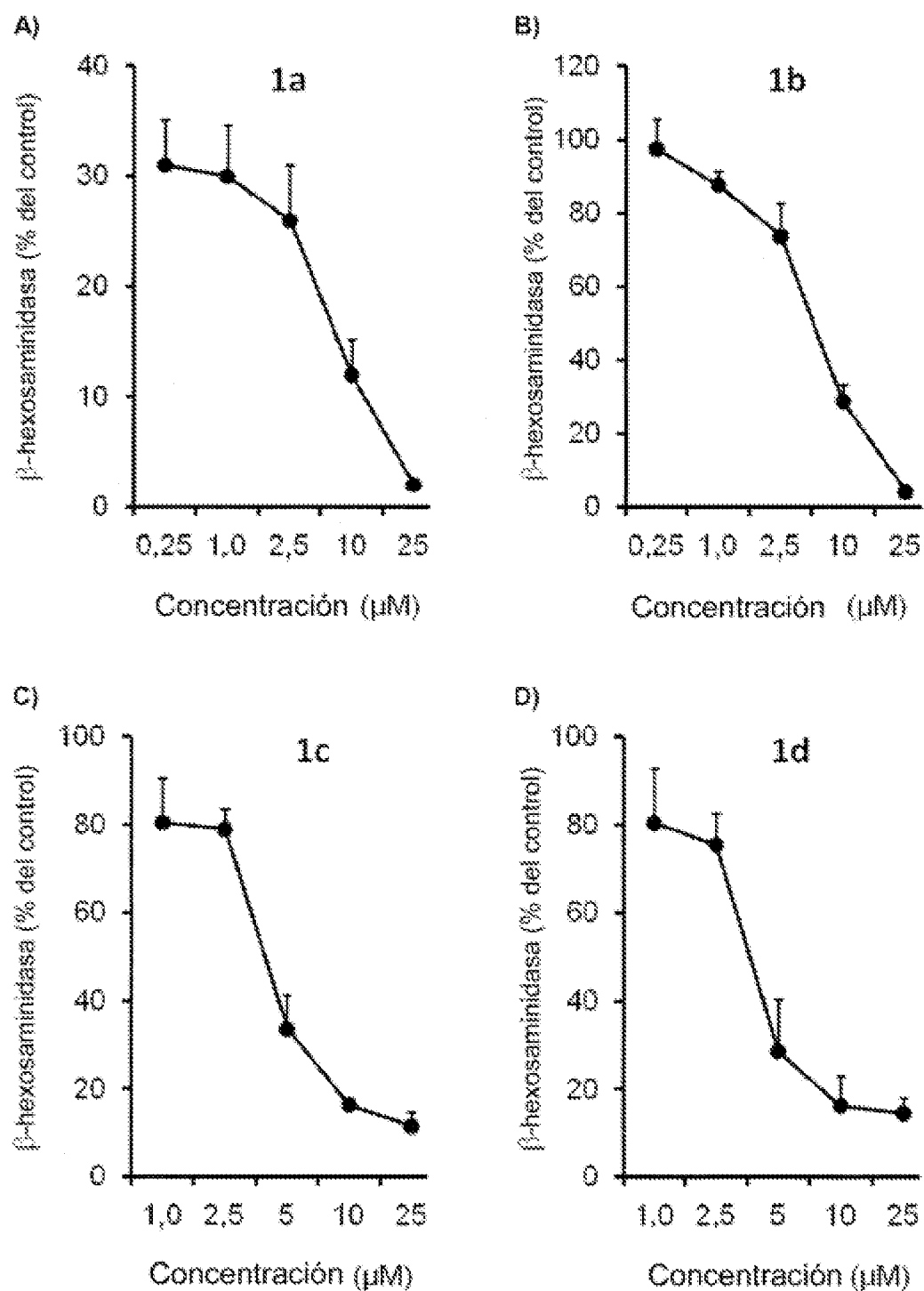
Fig. 1

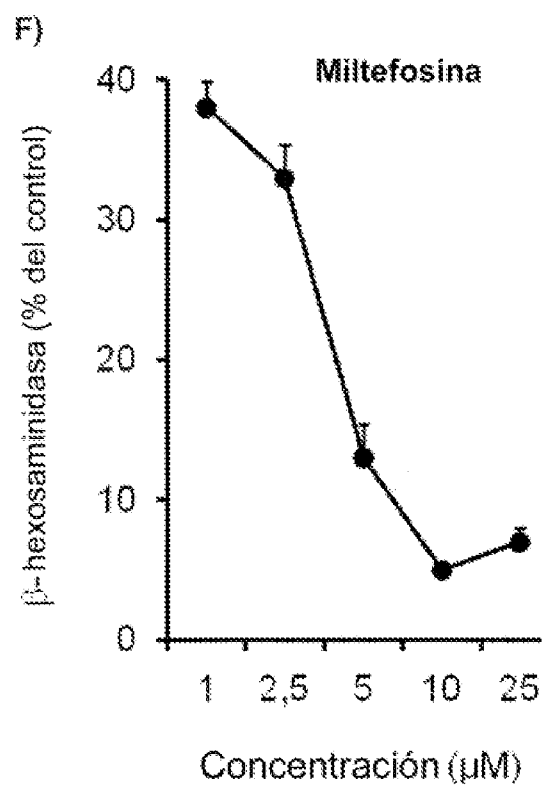
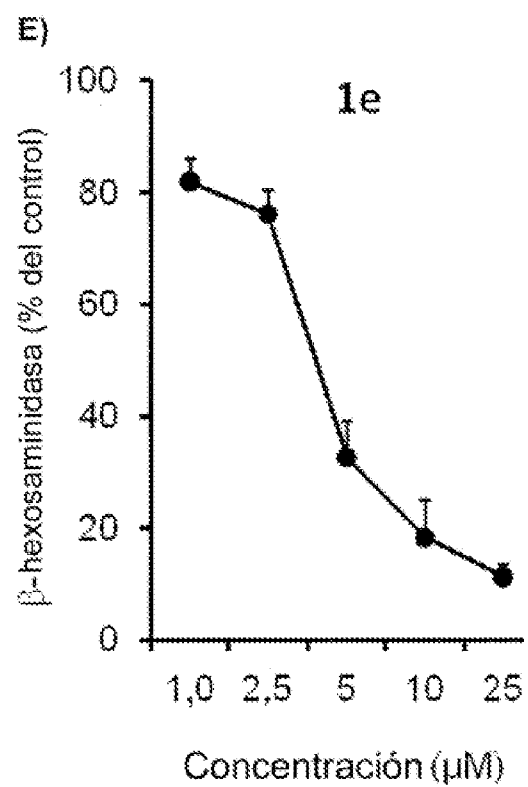
Fig. 1 (cont.)

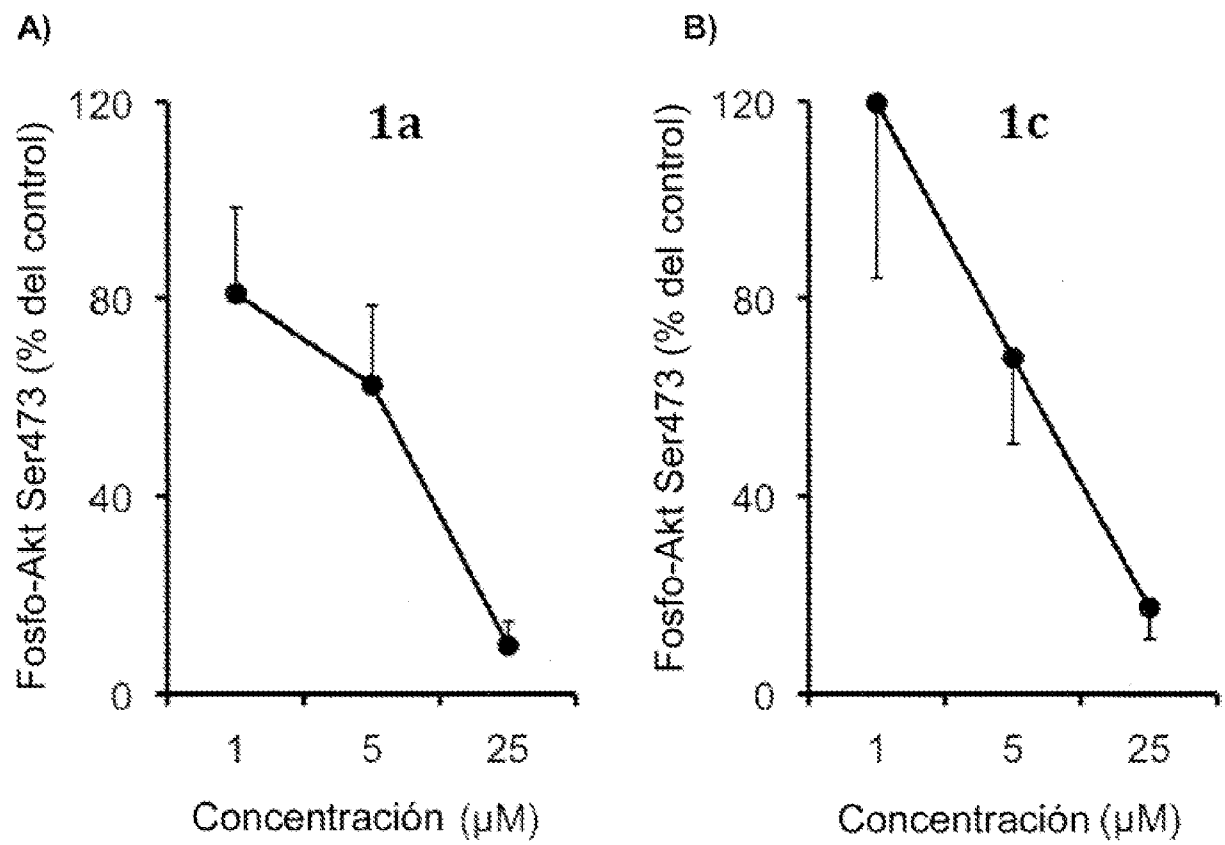
Fig. 2

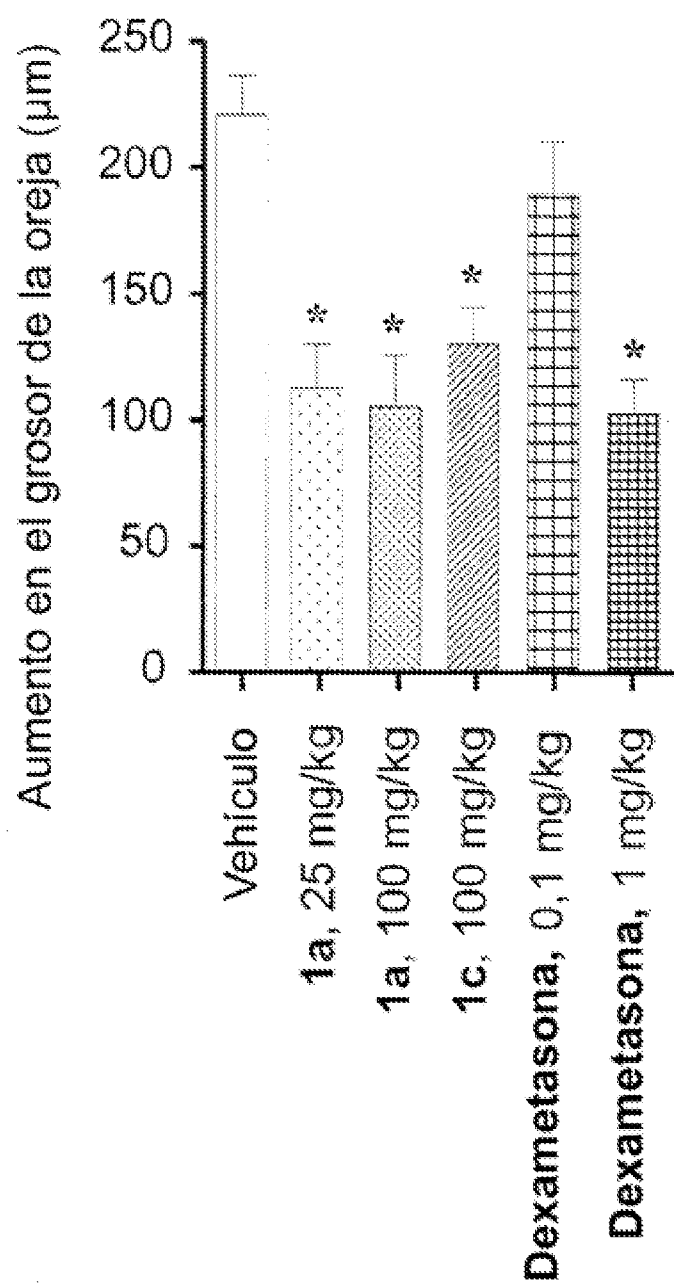
Fig. 3

Fig. 4

(A)

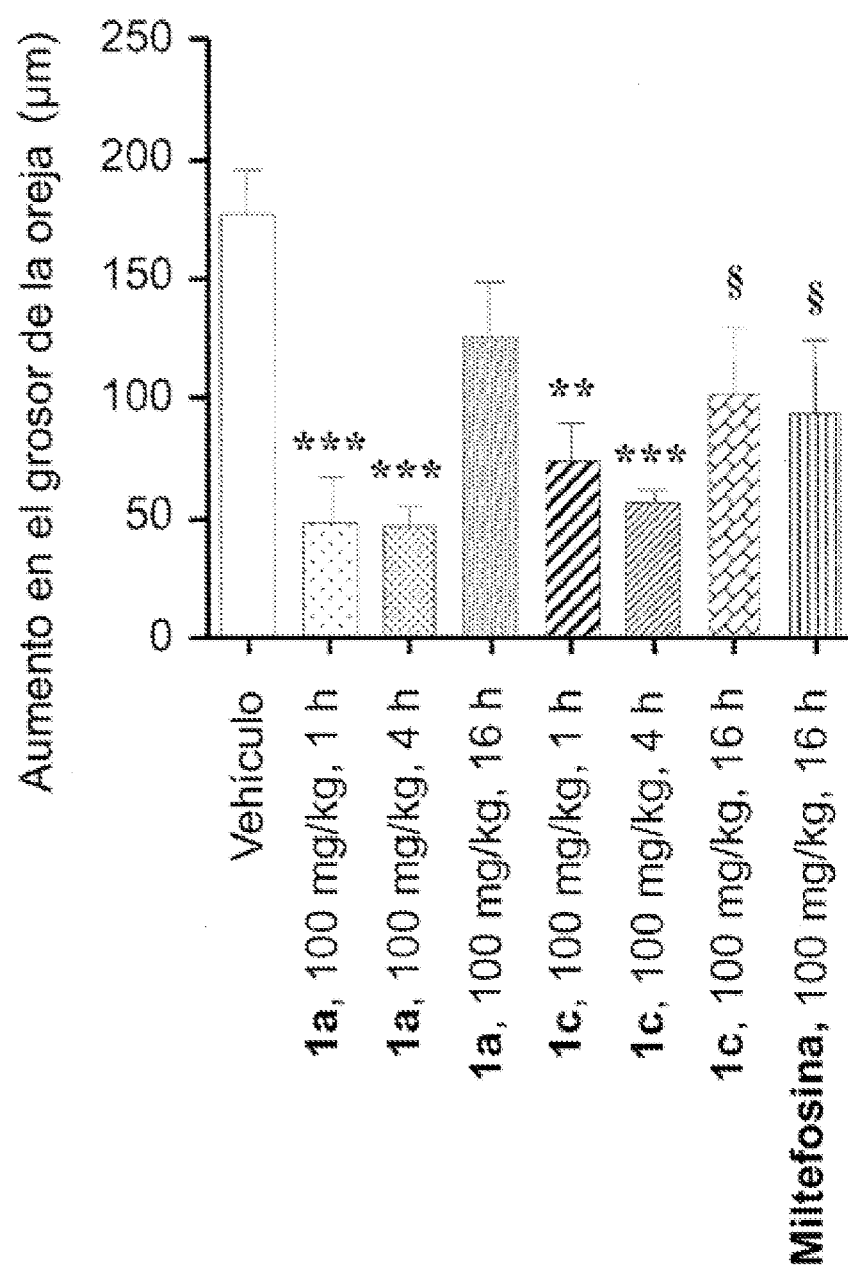


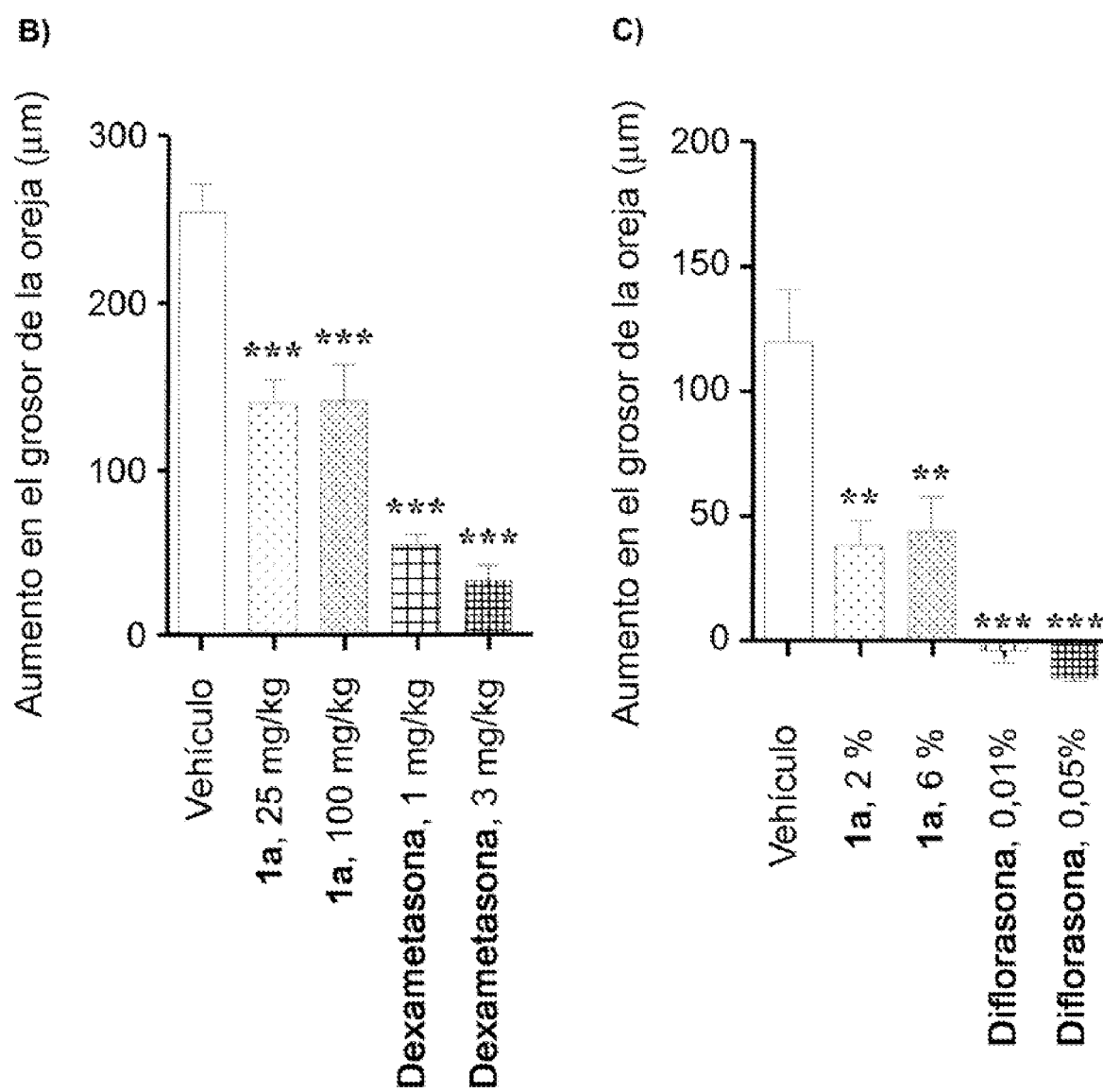
Fig. 4 (cont.)

Fig. 4 (cont.)

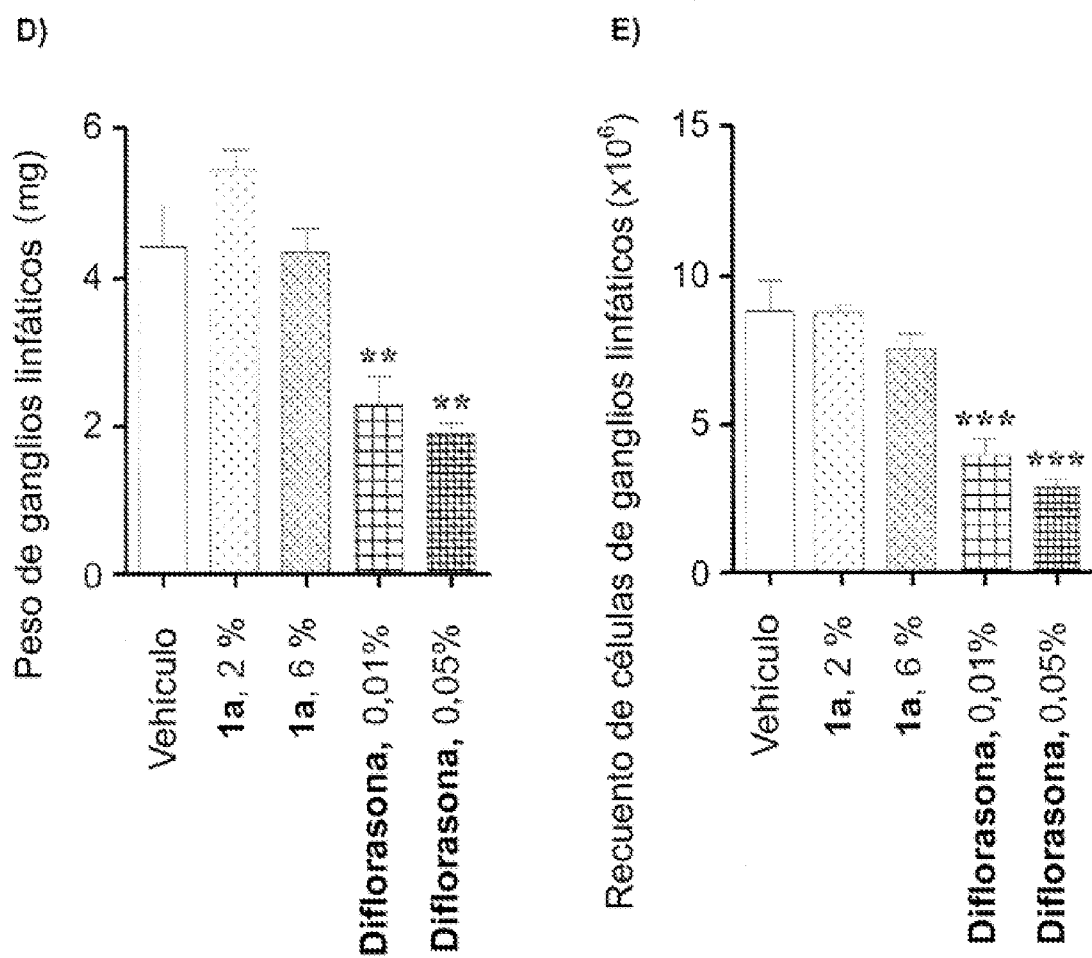


Fig. 5

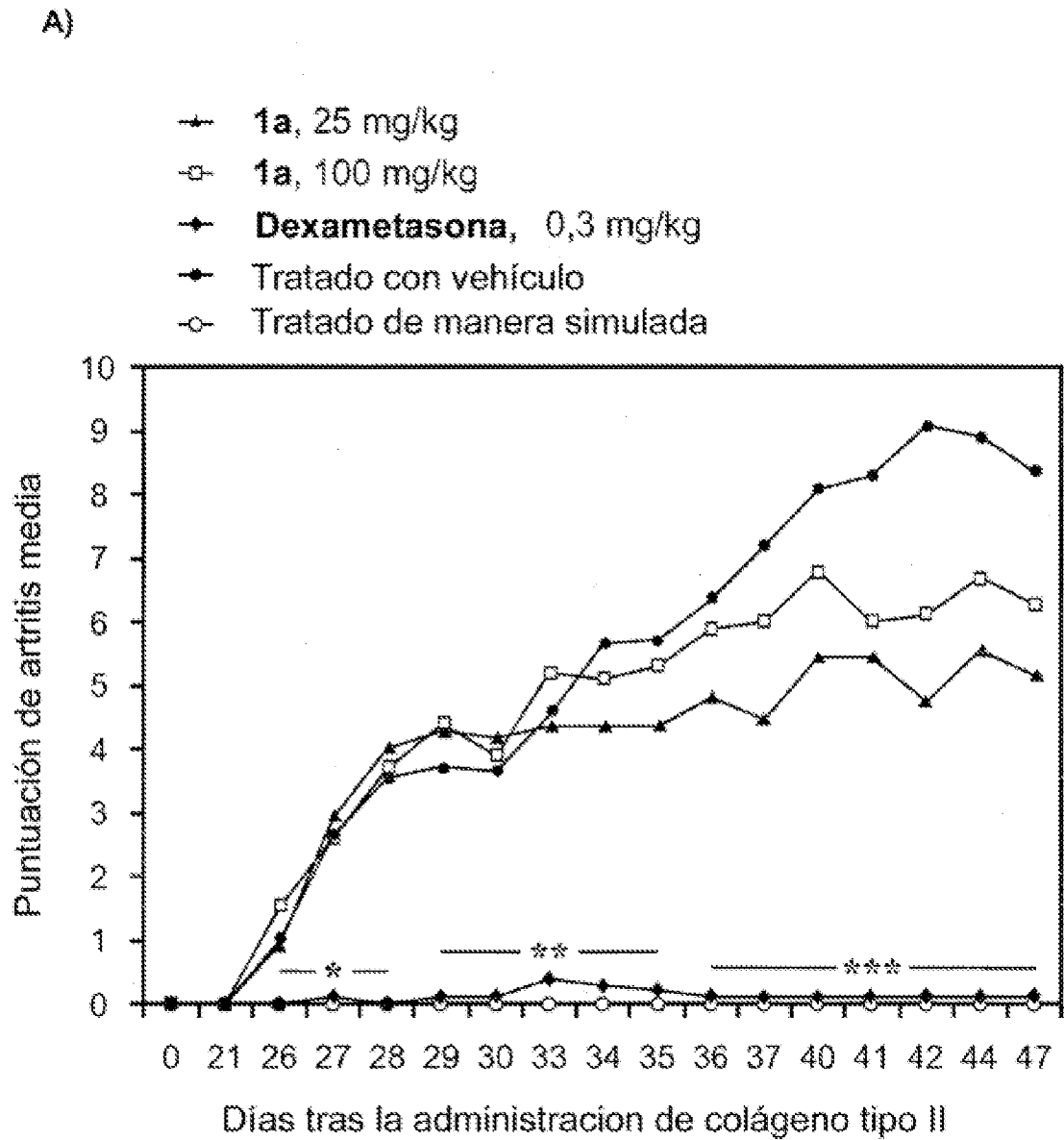


Fig. 5 (cont.)

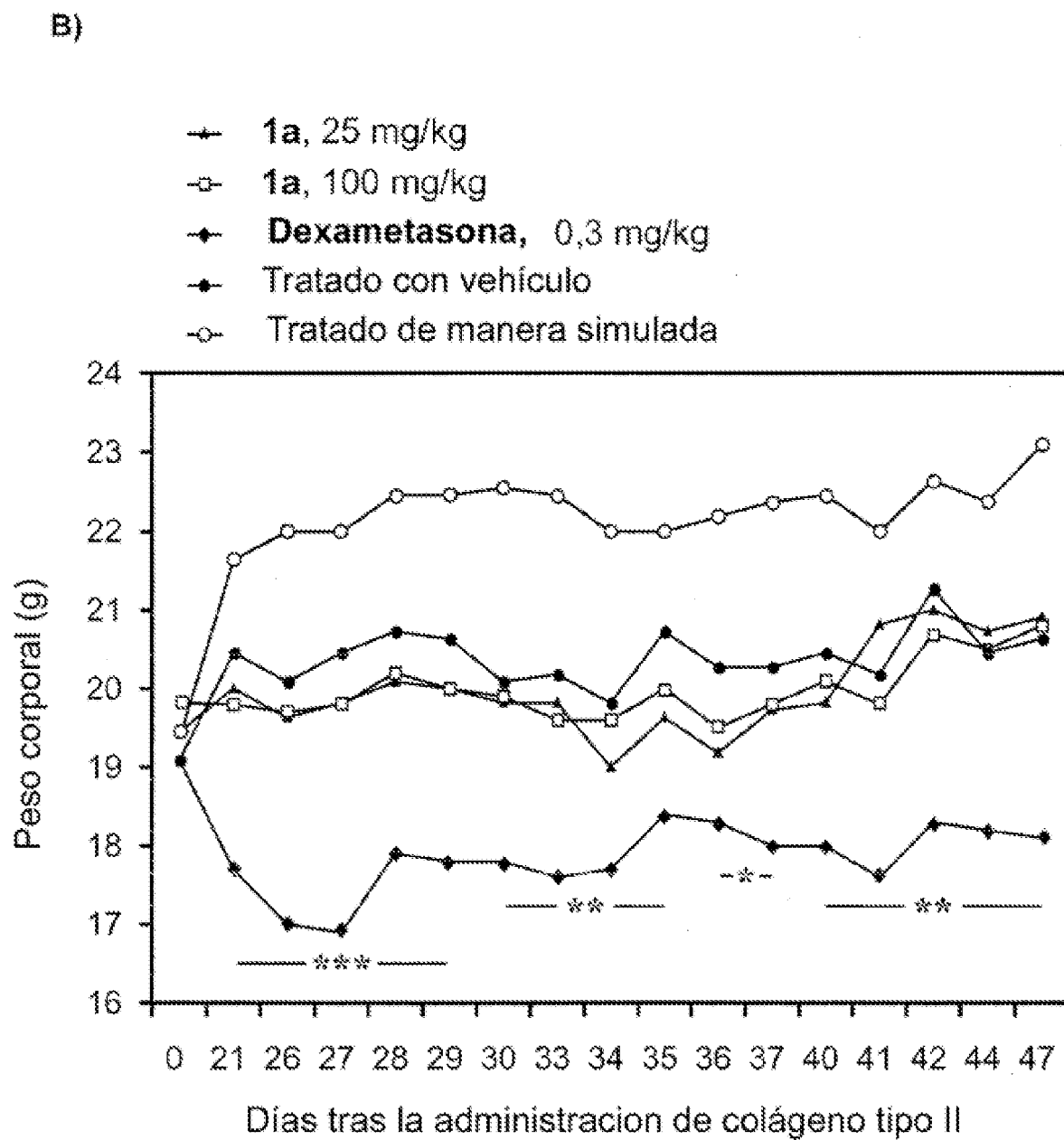


Fig. 5 (cont.)

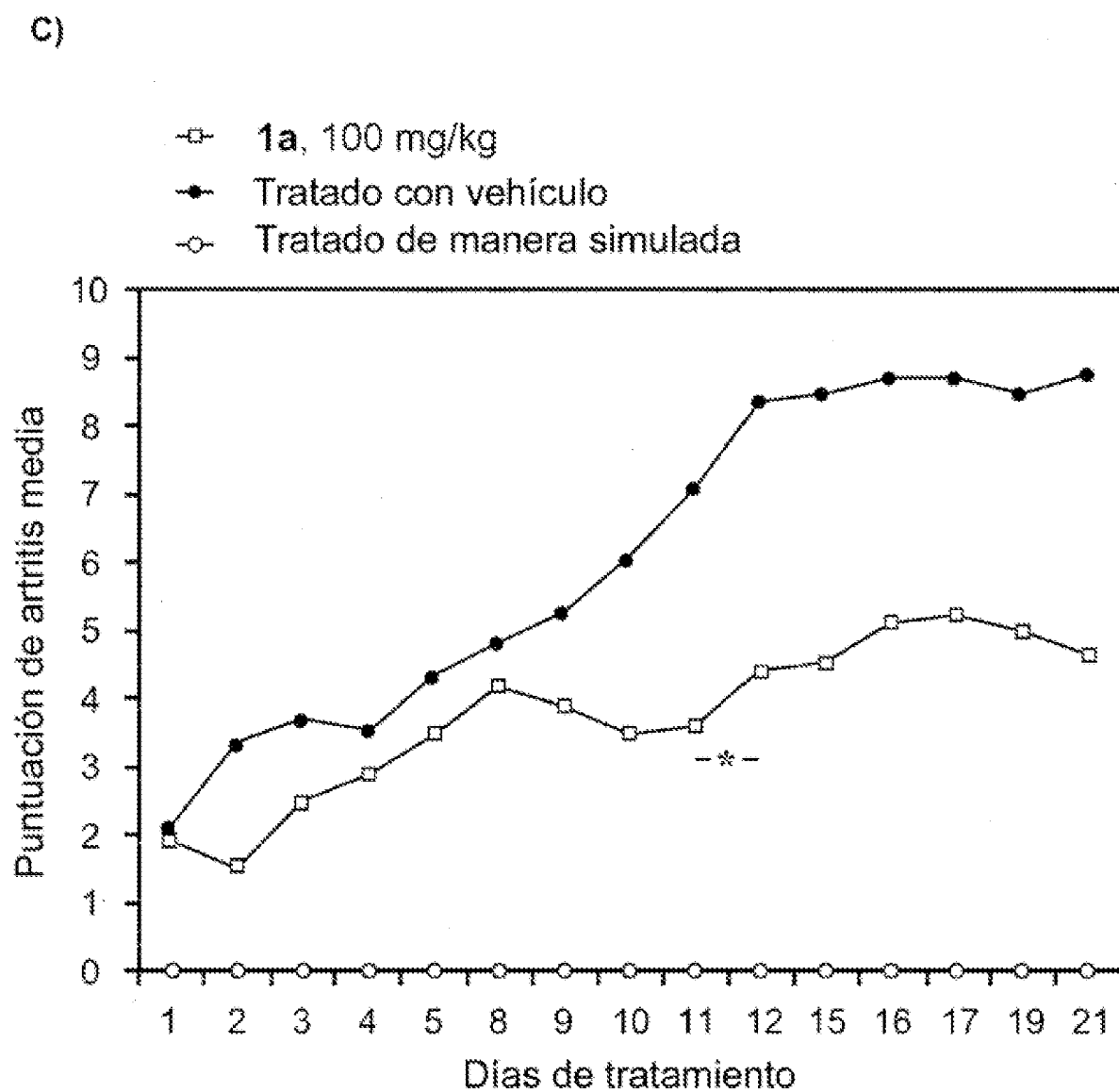


Fig. 5 (cont.)

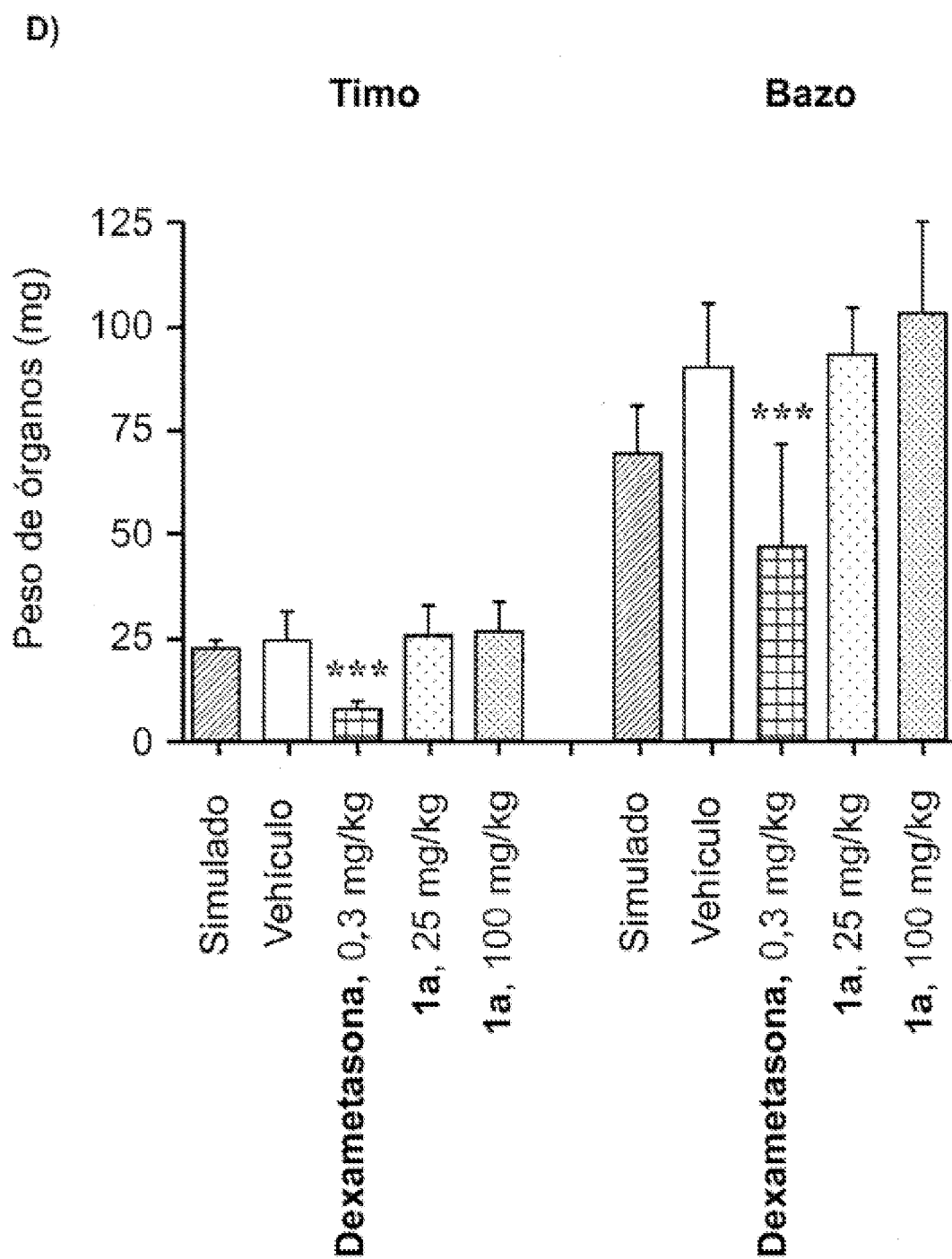


Fig. 6

