

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 836 733**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2019** **E 19192402 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2020** **EP 3613739**

54 Título: **Antagonistas de integrina**

30 Prioridad:

13.09.2018 EP 18194258

17.08.2018 EP 18189615

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

28.06.2021

73 Titular/es:

OXURION NV (100.0%)

Gaston Geenslaan 1

3001 Leuven, BE

72 Inventor/es:

PEDERSEN, OVE y

VERMASSEN, ELKE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 836 733 T3

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

DESCRIPCIÓN

Antagonistas de integrina

Campo de la invención

Esta presente invención se refiere a nuevos antagonistas de integrina y el uso de estos compuestos como medicamento, en particular para inhibir la neovascularización.

Antecedentes de la invención

El edema macular diabético (DME) es una acumulación de líquido en la mácula de pacientes con retinopatía diabética (DR), que puede ocurrir en cualquier etapa de la enfermedad. La DR es una de las complicaciones microvasculares más comunes de la diabetes. La DR que amenaza la visión (es decir, DME y la retinopatía diabética proliferativa (PDR) son la principal causa de la discapacidad visual y ceguera entre los adultos en edad laboral en todo el mundo. A nivel mundial, la prevalencia general de la DR se estima en el 34,6% de las personas con diabetes, mientras que la prevalencia general del DME se estima en aproximadamente el 20% de las personas con DR (Yau *et al.*, 2012). Se espera que la prevalencia del DME aumente aún más debido al aumento de la prevalencia de la diabetes, el envejecimiento de la población y el aumento de la esperanza de vida de las personas con diabetes: el número de adultos con diabetes en todo el mundo se estimó en 425 millones en 2017 y se espera que aumente a 629 millones en 2045.

Aunque los mecanismos exactos por los cuales la diabetes causa retinopatía aún no están claros, varios estudios han demostrado la elevación de especies reactivas de oxígeno, productos finales de glicación avanzada y citoquinas y quimioquinas circulantes y vítreas en relación con la enfermedad. La inflamación en la retina es una importante característica patológica temprana de la DR. Los factores inflamatorios y vasodilatadores pueden modificar la función endotelial, lo que lleva a la ruptura de la barrera hemato-retiniana, lo que da como resultado la acumulación de proteínas y lípidos plasmáticos en la mácula. Cuando el engrosamiento afecta a la fovea o amenaza con afectar a la fovea, el paciente se vuelve sintomático con metamorfopsia y pérdida de la visión.

Se ha descubierto que la interacción entre el vítreo y la retina está implicada en el desarrollo del edema macular. En particular, cuando el vítreo y el área macular de la retina están estrechamente conjugados, el edema macular se puede promover en gran medida. Entre los pacientes con DR, el DME estuvo presente solo en el 20% de los pacientes con desprendimiento del vítreo posterior (PVD) en comparación con el 55% de los pacientes sin PVD, lo que sugiere un fuerte efecto protector del PVD. El mecanismo propuesto para el posible beneficio del PVD es el alivio de la tracción vitreomacular, sin embargo, también se ha sugerido que tanto la oxigenación transvítreal como la difusión mejorada del factor de crecimiento (lejos de la hialoide premacular) tiene efectos potencialmente beneficiosos.

Un buen control de la glucosa en sangre, la presión arterial y los lípidos en sangre es esencial y puede retrasar la aparición de la DR y ralentizar su progresión. En algunos casos, el tratamiento se realiza mediante fotocoagulación con láser focal/en rejilla utilizando pequeñas quemaduras de láser de intensidad de luz (50-100 μm) en microaneurismas o áreas difusas de engrosamiento. Sin embargo, este tratamiento podría dar como resultado complicaciones tales como la pérdida de visión central, escotomas centrales y disminución de la visión del color. Más recientemente, el láser de micropulso subumbral se ha desarrollado como un tratamiento que teóricamente evita dañar la retina neurosensorial interna, reduciendo así las posibles complicaciones.

Varios agentes farmacológicos se encuentran actualmente disponibles para el tratamiento del DME, incluyendo los agentes anti-factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y los corticosteroides. Los VEGF son un potente factor de vasopermeabilidad que contribuyen al engrosamiento macular y al deterioro visual asociado con el DME. Los compuestos anti-VEGF disminuyen la angiogénesis y la permeabilidad vascular, provocando la regresión de la neovascularización y la reducción del edema. Varios estudios clínicos han demostrado que el tratamiento con anti-VEGF es más eficaz que el tratamiento con láser focal/en rejilla para disminuir el grosor del subcampo central (CST) y mejorar la visión en pacientes con DME. Los sucesos adversos (AEs) relacionados con el tratamiento anti-VEGF son raros y se relacionan principalmente con la necesidad de inyecciones intravítreas repetidas (IVT) durante un periodo de tiempo prolongado.

La inflamación juega un importante papel en la patogénesis del DME. Las citoquinas y quimioquinas liberadas por los leucocitos en la sangre aumentan significativamente la permeabilidad vascular, lo que conduce a una mayor acumulación de líquido debajo de la retina. Las terapias con corticosteroides pueden inhibir los mediadores inflamatorios. Varios estudios clínicos han demostrado que los corticosteroides son efectivos para disminuir la CST y mejorar la visión en el DME. Si bien la carga de tratamiento de los implantes de corticosteroides es mucho menor que la de los agentes anti-VEGF, los corticosteroides intraoculares se asocian con mayores riesgos de desarrollo de cataratas y aumento de la presión intraocular. En general, el uso de corticosteroides IVT en pacientes con DME se reserva, por lo tanto, como terapia de segunda línea en aquellos que responden mal a la terapia con anti-VEGF IVT y está contraindicado en pacientes con glaucoma subyacente.

De los posibles tratamientos del DME mencionados anteriormente, los agentes anti-VEGF son actualmente el tratamiento estándar de primera línea para el DME. Sin embargo, la mayoría de los estudios hasta la fecha informan que una proporción sustancial de pacientes con DME, hasta un 40%, tienen edema persistente y pérdida de agudeza visual a pesar del tratamiento anti-VEGF. Estos hallazgos sugieren que otras vías, independientes del VEGF, contribuyen al desarrollo del DME y, por lo tanto, existe una necesidad clínica importante de tratamientos adicionales eficaces para el DME.

Las integrinas constituyen una familia de receptores transmembrana de la superficie celular que pueden mediar en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Las integrinas están implicadas en varios procesos biológicos incluyendo la diferenciación celular, adhesión, forma, migración, motilidad, invasión, proliferación y supervivencia. Debido a su papel en estos procesos biológicos, las integrinas también se han asociado con diversas afecciones patológicas, tales como el cáncer y los trastornos oftálmicos. En el ojo, se ha demostrado que las integrinas juegan un papel importante en la neovascularización, la permeabilidad vascular y la adhesión vitreoretiniana.

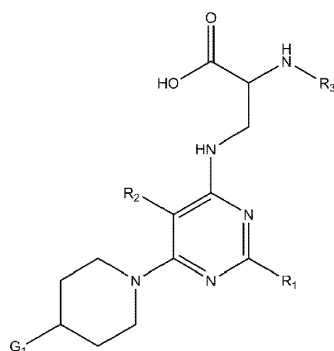
Las integrinas son receptores heterodiméricos obligados que consisten en una subunidad α y β unidas de forma no covalente. Diferentes combinaciones de las subunidades 18 α y las 8 β conocidas constituyen la familia de 24 miembros heterodiméricos de integrinas reconocidos hasta ahora. La familia de receptores de la integrina se puede clasificar, en general, en 4 categorías diferentes dependiendo de su patrón de reconocimiento de ligando: 1) unión del tripeptido L-arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), 2) unión de colágeno, 3) unión de laminina y 4) tipos de integrinas que se unen a leucocitos.

La interacción de integrinas con la matriz extracelular puede conducir a la neovascularización de la superficie retiniana, que eventualmente puede extenderse hacia la región vítrea. La tinción inmunohistológica en tejidos retinianos humanos derivados de pacientes con PDR ha demostrado que las células endoteliales vasculares que proliferan de manera activa expresan las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, que no se expresan en gran medida en las células endoteliales inactivas (Friedlander *et al.*, 1996; Ning *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$ se expresan en las membranas epirretinianas fibrovasculares de pacientes con PDR activa en la etapa fibrótica (Ning *et al.*, 2008; Abu El-Asrar, Missotten y Geboes, 2010), mientras que $\alpha_5\beta_1$ se ha demostrado que se sobreexpresa en un modelo de ratón de CNV inducido por láser (Umeda *et al.*, 2006). En línea con esto, varios estudios no clínicos han demostrado que la inhibición de las integrinas atenúa la leucostasis y la permeabilidad vascular retiniana (Santulli *et al.*, 2008; Iliaki *et al.*, 2009; Rao *et al.*, 2010). El antagonismo de $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ previno la neovascularización retiniana pero no dañó los vasos sanguíneos preexistentes (Friedlander *et al.*, 1996; Hammes *et al.*, 1996; Lahdenranta *et al.*, 2007; Santulli *et al.*, 2008), mientras que la inhibición de $\alpha_5\beta_1$ inhibió la proliferación de células endoteliales y produjo la regresión de las membranas neovasculares coroideas en diferentes modelos animales (Ramakrishnan *et al.*, 2006; Umeda *et al.*, 2006).

El motivo RGD se encuentra muy comúnmente en muchos componentes de la matriz extracelular, incluyendo vitronectina, fibronectina y fibrinógeno. Por lo tanto, las integrinas están fuertemente ligadas a las proteínas de la matriz extracelular, por lo que median la adhesión célula-matriz extracelular, por ejemplo, en la interfaz vitreoretiniana. Se sabe que los análogos del motivo RGD compiten por el motivo RGD de las proteínas de la matriz extracelular para interrumpir las interacciones integrina-matriz extracelular y, por lo tanto, aflojar las uniones en experimentos in vitro (Gehlsen *et al.*, 1988; Pierschbacher y Ruoslahti, 1987; Zhou, Zhang y Yue, 1996). En línea con esto, se ha demostrado que la inyección IVT de péptidos RGD solubles induce PVD en ojos de conejo (Oliveira *et al.*, 2002). Además, en humanos, se ha demostrado que 3 inyecciones IVT del antagonista de la integrina ALG 1001 (Allegro Ophthalmics, LLC) inducen PVD total en 6 de 11 pacientes con DME con PVD parcial o nula al inicio del estudio en un estudio inicial de prueba de concepto (Kuppermann, 2013; Boyer *et al.*, 2014).

Estas observaciones sustentan la preferencia para utilizar un antagonista de pan-integrina que se dirija a los diferentes tipos de integrinas que subyacen a diferentes aspectos de la enfermedad a tratar, más notablemente $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_5\beta_1$. La complejidad es que dichos antagonistas de pan-integrina a menudo también antagonizarán otras integrinas que se unen a RGD, que pueden causar efectos secundarios. La más notable es la integrina plaquetaria, $\alpha_{IIb}\beta_3$, cuyo antagonismo puede interferir con la activación y la agregación plaquetaria.

Las publicaciones de solicitud de patente WO2011/119282 A1, WO2011/094285 A1, US2006/0052398 A1 y US2008/058348 A1 describen compuestos como posibles antagonistas de integrina o como posibles antagonistas del receptor de vitronectina. Los compuestos descritos en estas solicitudes de Patente se pueden resumir como correspondientes generalmente a la Fórmula A



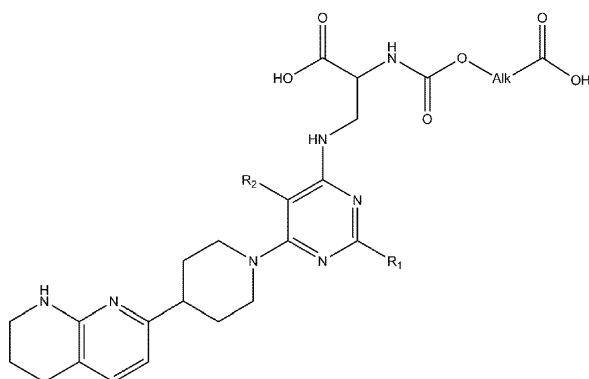
Fórmula A

en donde, generalmente G_1 representa una piridina o tetrahidro naftiridina sustituida, R_1 y R_2 son hidrógeno, metilo o etilo, y R_3 es un grupo terminal hidrófobo. En particular, en los compuestos ejemplificados con actividad confirmada, R_3 comprende un alquilo, cicloalquilo o grupo terminal (hetero)aromático.

- 5 Existe la necesidad de nuevos antagonistas de integrinas, en particular antagonistas de integrinas que actúen simultáneamente sobre los diferentes tipos de integrinas que están implicadas en las vías de la enfermedad, tal como $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_5\beta_1$, pero que tienen un riesgo reducido de interferir con la agregación plaquetaria a través de su efecto sobre $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Compendio de la invención

- 10 La presente invención proporciona compuestos según la fórmula (I) o la sal farmacéuticamente aceptable, el solvato farmacéuticamente aceptable, isómero o mezcla de los mismos.



Fórmula I

en donde

- 15 R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo o etilo; y Alk es un alquilenos C_{1-4} .

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

La presente invención se refiere además a compuestos para su uso como un medicamento. Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar compuestos para inhibir la neovascularización patológica.

- 20 La presente invención se refiere además a compuestos para su uso en el tratamiento y/o prevención de trastornos oftálmicos, tales como el edema macular diabético y la retinopatía diabética.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra las proporciones de EC50 para cpd1, cpd2, cpd3 y los compuestos comparativos cpdA y cpdB para la integrina $\alpha_v\beta_3$ sobre $\alpha_{IIb}\beta_3$ (los valores más bajos indican una mayor especificidad para $\alpha_v\beta_3$).

- 25 La Figura 2 muestra la inhibición de los vasos que aparecen por cpd3 en un ensayo de explante corioideo murino.

Descripción detallada de la invención

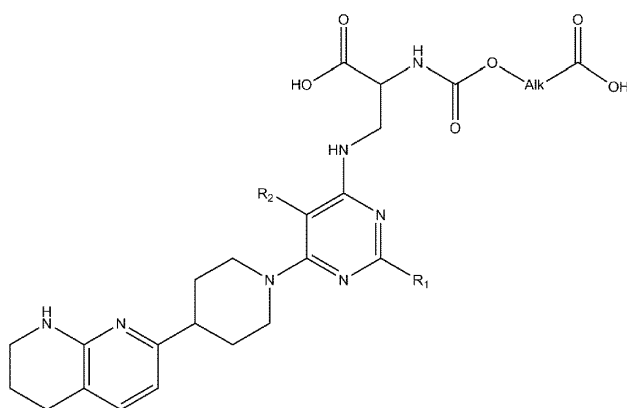
Se entiende además que todas las definiciones y preferencias descritas para los compuestos de la invención anterior se aplican igualmente a esta realización y todas las realizaciones adicionales, como se describe a continuación.

Como se utiliza en lo anterior y en lo sucesivo, las siguientes definiciones se aplican a menos que se indique lo contrario.

El término "alquileo", solo o en combinación significa un diradical derivado de alcano, que puede ser un alquileo de cadena lineal o un alquileo ramificado, que contiene de 1 a 4 átomos de carbono. El grupo alquileo de cadena lineal o ramificada se une en cualquier punto disponible para producir un compuesto estable. Según ciertas realizaciones, el alquileo C_{A-B} define un diradical de alquileo lineal o ramificado que tiene de A a B átomos de carbono, por ejemplo, un alquileo C_{1-4} define un diradical de alquileo lineal o ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, tal como, por ejemplo, metileno, etileno, 1-propileno, 2-propileno, 1-butileno, 2-butileno, 2-metil-1-propileno.

10 Cuando se hace referencia a porcentajes, esto se refiere a porcentajes de peso a peso, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Como se describió anteriormente en la presente memoria, la presente invención proporciona compuestos según la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato farmacéuticamente aceptable, un isómero o una mezcla de los mismos,



Fórmula I

en donde

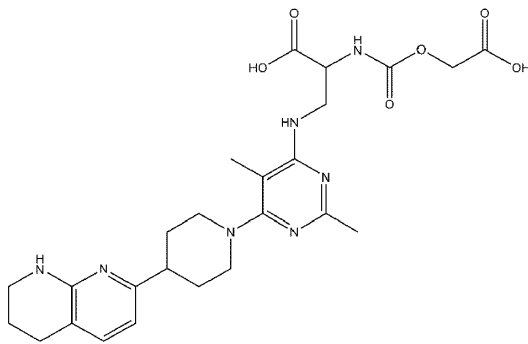
R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo o etilo; y Alk es alquileo C_{1-4} .

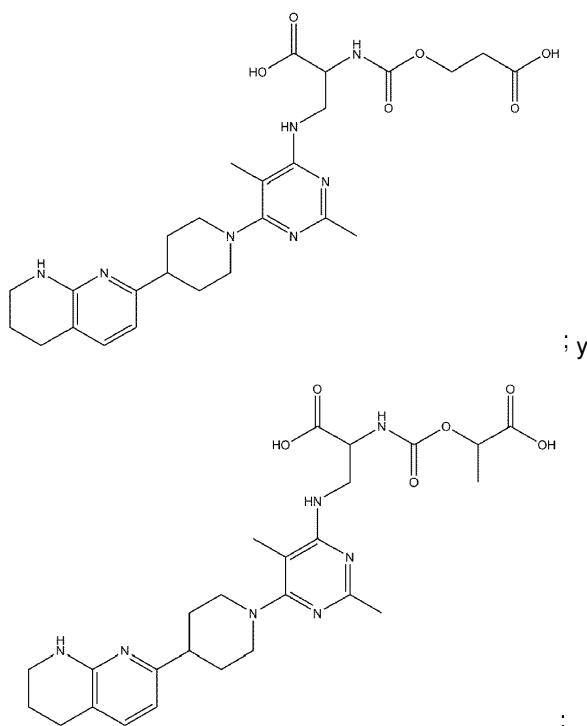
Según una cierta realización de la presente invención, tanto R_1 como R_2 son metilo, o R_1 es hidrógeno y R_2 es etilo.

20 Según una realización preferida, la presente invención proporciona aquellos compuestos en los que R_1 y R_2 son ambos metilos.

Según una determinada realización de la presente invención, Alk es alquileo C_{1-2} .

Según una realización preferida de la presente invención, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en

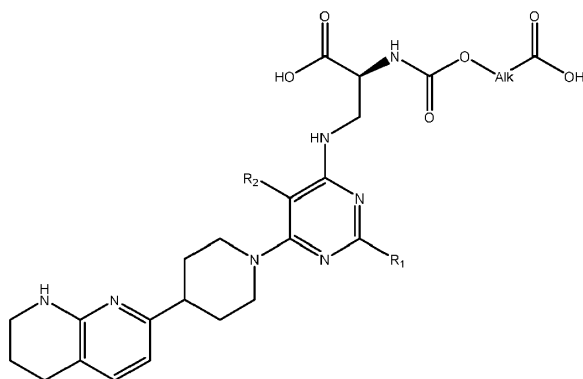




o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato farmacéuticamente aceptable, un isómero o una mezcla de los mismos.

- 5 El compuesto de la presente invención, como se detalló anteriormente, puede tener un centro de quiralidad y existir como formas estereoquímicamente isoméricas. El término “formas estereoquímicamente isoméricas” como se utiliza en la presente memoria define todos los posibles compuestos formados por los mismos átomos unidos mediante la misma secuencia de enlaces pero que tienen diferentes estructuras tridimensionales que no son intercambiables, que el compuesto antiinflamatorio como se especifica en la presente memoria, puede poseer.
- 10 A menos que se mencione o se indique lo contrario, la designación química de los compuestos, como se detalló anteriormente, abarca la mezcla de todas las formas estereoquímicamente isoméricas posibles, que dichos compuestos pueden poseer. Dicha mezcla puede contener todos los diastereómeros y/o enantiómeros de la estructura molecular básica de dichos compuestos para su uso. Se pretende que todas las formas estereoquímicamente isoméricas de los compuestos de la presente invención, tanto en forma pura como mezcladas
- 15 entre sí, se incluyan dentro del alcance de la presente invención.

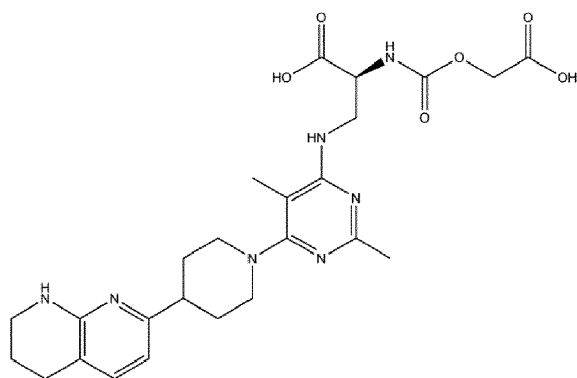
En una realización preferida, la presente invención proporciona las formas enantioméricas (S) de los compuestos según la Fórmula I. Por lo tanto, en una realización particular, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con la Fórmula II,



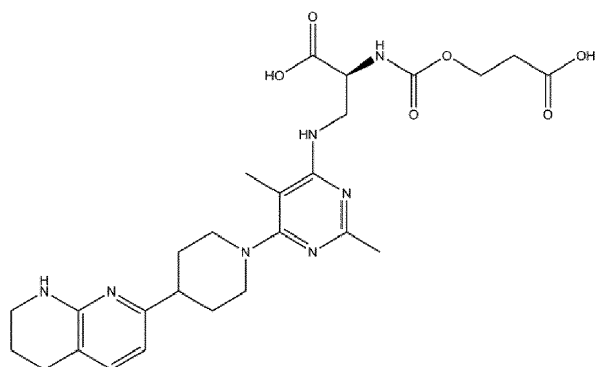
Fórmula II

- 20 en donde R₁, R₂ y Alk son como se definen en la solicitud.

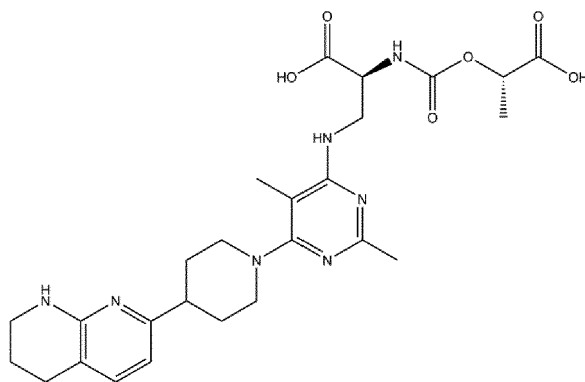
En una realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto seleccionado del grupo que consiste en



;



; y



;

5 o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato farmacéuticamente aceptable, un isómero o una mezcla de los mismos.

Para uso terapéutico, las sales de los compuestos para uso de la presente invención, como se detalla anteriormente, son aquellas en las que el contraión es farmacéuticamente aceptable, cuyas sales pueden denominarse sales de adición de ácido y base farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, las sales de ácidos y bases que no son farmacéuticamente aceptables también pueden encontrar uso, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable. Todas las sales, farmacéuticamente aceptables o no, se incluyen dentro
10 ámbito de la presente invención.

Las sales de adición de ácido y base farmacéuticamente aceptables como se mencionan anteriormente en la presente memoria pretenden comprender las formas de sal de adición de ácido y base no tóxicas terapéuticamente activas que los compuestos para uso de la presente invención, como se detalla anteriormente, pueden formar. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden obtener convenientemente tratando la forma
15 básica con dicho ácido apropiado en una forma de anión. Los aniones apropiados comprenden, por ejemplo, trifluoroacetato, acetato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, camsiato, carbonato, cloruro, citrato, diclorhidrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhidrato, clorhidrato, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbromuro, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, pamoato (embonato), pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teoclato, trietioduro, y similares. El contraión de elección se
20 puede introducir utilizando resinas de intercambio iónico. Por el contrario, dichas formas de sal se pueden convertir

mediante tratamiento con una base apropiada en la forma de base libre. Una sal preferida es la sal de clorhidrato de los compuestos descritos en la presente memoria.

Los compuestos para uso como se especifica en la presente memoria, que contienen un protón ácido también pueden convertirse en sus formas de sal de adición de amina o metal no tóxicas mediante el tratamiento con bases orgánicas e inorgánicas apropiadas en una forma de catión. Las sales básicas apropiadas comprenden aquellas formadas con cationes orgánicos tales como benzatrina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina, procaina, y similares; y aquellas formadas con cationes metálicos tales como aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, zinc, y similares. Por el contrario, dichas formas de sal pueden convertirse por tratamiento con un ácido apropiado en la forma libre.

El término sal de adición, como se utiliza anteriormente en la presente memoria, también comprende los solvatos que pueden formar los compuestos para su uso, como se especifica en la presente memoria, así como las sales de los mismos. Dichos solvatos son, por ejemplo, hidratos, alcoholatos y similares.

Como se entenderá a partir de las descripciones de la presente memoria, la presente invención proporciona particularmente compuestos aislados y composiciones aisladas. Los compuestos se obtienen en particular mediante síntesis in vitro, tal como mediante síntesis química. En una realización adicional, los compuestos de la invención tienen una pureza de al menos el 85%, en particular al menos el 90%, más en particular al menos el 95%. En una realización particular, la presente invención proporciona un método para proporcionar un compuesto de la invención, comprendiendo el método sintetizar químicamente el compuesto de la invención y envasar el compuesto sintetizado en un recipiente estéril. En una realización adicional, la presente invención proporciona un método para proporcionar un compuesto de la invención, comprendiendo el método sintetizar químicamente el compuesto con una pureza de al menos el 85%, en particular al menos el 90%, más en particular al menos el 95%. Preferiblemente, el compuesto sintetizado se envasa posteriormente en un envase estéril.

Composiciones

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica, comprendiendo la composición un compuesto como se define anteriormente y como se define en una cualquiera de las realizaciones presentadas en la presente memoria.

En el resto del texto, se entiende la expresión "compuesto" o "compuesto según la invención", para los fines de la presente invención, tanto en plural como en singular, es decir que la composición de la invención puede comprender uno o más de un "compuesto según la invención".

En una realización particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de formulaciones farmacéuticamente aceptables, así como los métodos para prepararlas se pueden encontrar en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (por ejemplo, 20th Edition; Lippincott, Williams & Wilkins, 2000) o en cualquier manual de Farmacopea (por ejemplo, US-, European- o International Pharmacopeia).

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un tampón acuoso en el que se ha disuelto un compuesto de la invención. En una realización adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un tampón acuoso en el que se ha disuelto un compuesto de la invención y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En otra realización adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que consiste en un tampón acuoso, un compuesto de la invención y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

En una realización particular, la presente invención proporciona una composición que comprende un antagonista de la integrina, en donde al menos el 90% de los compuestos antagonistas de la integrina de la composición es un compuesto según la invención. Preferiblemente al menos el 95%, especialmente al menos el 99% de los compuestos antagonistas de la integrina de la invención es un compuesto según la invención. En otra realización particular, las composiciones de la invención están sustancialmente libres de otro antagonista de la integrina, tal como un compuesto A. En una realización adicional, la proporción del compuesto de la invención con respecto a otros compuestos antagonistas de integrina, tal como el compuesto A, es más del 98:2, particularmente más del 99:1, más particularmente más del 99,9:0,1. En otra realización más, la presente invención proporciona una composición como se describe en la presente memoria, en la que la composición está sustancialmente libre de compuesto A, en particular en la que la composición comprende menos del 3%, especialmente menos del 2%, preferiblemente menos del 1% del compuesto A, más en particular con la condición de que la composición no comprenda el compuesto A.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un primer principio activo y un segundo principio activo, en donde el primer principio activo es un antagonista de la integrina según la invención, y en donde la composición está sustancialmente libre de un antagonista de la integrina distinto del primer principio activo. En una realización adicional, el segundo principio activo es un compuesto que se une a e inhibe la actividad de VEGF o un receptor de VEGF.

Antagonista de la integrina o compuesto antagonista de la integrina en la presente solicitud se refiere preferiblemente a un compuesto que tiene una concentración efectiva media máxima (EC50) frente a receptores de la integrina de menos de 1 μ M, en particular una EC50 frente al receptor de la integrina $\alpha_v\beta_3$. Los expertos en la técnica conocen métodos adecuados para determinar los valores de EC50. Un método particular para determinar el valor de un compuesto en particular es un ensayo ELISA de competición en donde el receptor de la integrina bajo investigación (en particular el receptor de la integrina $\alpha_v\beta_3$ humano) se recubre en una placa de múltiples pocillos utilizando una disolución de 4 μ g/mL y los pocillos se bloquean con albúmina de suero bovino al 5%. La concentración de fibronectina que se va a utilizar en el ensayo se determina experimentalmente en un experimento separado ensayando la unión de varias concentraciones de fibronectina a la integrina recubierta bajo investigación, siendo la concentración de fibronectina para el ensayo la que da el 80% de unión máxima. La concentración determinada de fibronectina humana se añade después a los pocillos recubiertos y bloqueados en presencia de concentraciones crecientes del compuesto. Después de 2 h de incubación a 37°C, se lavan los pocillos y se detecta la fibronectina unida con la ayuda de un reactivo específico, tal como un anticuerpo anti-fibronectina detectable. A continuación, se realiza un análisis cuantitativo de los datos para determinar los valores de EC50, es decir, la concentración del compuesto que reduce la unión de fibronectina al receptor recubierto en un 50%.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un tampón acuoso y un compuesto de la invención. En una realización adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un tampón acuoso, un compuesto de la invención y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En otra realización adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que consiste en un tampón acuoso, un compuesto de la invención y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

En una realización particular, la presente invención proporciona una composición que comprende entre 0,1 y 1000 mg de un compuesto de la invención por ml de la composición, en particular entre 1 y 500 mg/ml, más en particular entre 1 y 100 mg/ml. En una realización adicional, la composición comprende entre 10 y 100 mg/ml, tal como entre 20 y 75 mg/ml.

Compuestos y/o composiciones para su uso como medicamento

La presente invención se refiere además a un compuesto para su uso como medicamento.

En una realización particular, la presente invención se refiere a un compuesto para su uso en la inhibición de la neovascularización.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un compuesto para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer. En particular, para inhibir el crecimiento y/o metástasis del cáncer.

En otra realización, la presente invención se refiere a un compuesto para su uso en el tratamiento y/o prevención de un trastorno oftálmico. En particular para tratar y/o prevenir la neovascularización en el ojo. Más en general, la presente invención proporciona compuestos y composiciones farmacéuticas para tratar, reducir, mejorar, o inhibir la progresión de la neovascularización ocular (patológica). En otro aspecto, la presente invención proporciona compuestos y composiciones farmacéuticas para tratar, reducir, mejorar, o inhibir la progresión de un trastorno oftálmico resultante de, o que tiene una etiología en, la neovascularización ocular.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un compuesto para su uso en el tratamiento y/o prevención de trastornos oftálmicos, en donde dicho trastorno oftálmico se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular húmeda relacionada con la edad, desprendimiento de retina, uveítis posterior, neovascularización de la córnea, neovascularización del iris, edema macular diabético y retinopatía diabética.

En otra realización más, los compuestos de la invención se proporcionan para su uso como antagonista de la integrina, en particular, un antagonista del receptor de vitronectina, in vitro o in vivo. En una realización particular, la integrina es una integrina de unión a RGD. En una realización adicional, la integrina es una integrina que comprende una subunidad α_v , α_5 o α_8 . En una realización más particular, la integrina es un receptor $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ o $\alpha_5\beta_1$.

En otra realización, los compuestos de la invención se utilizan para reducir la permeabilidad vascular, preferiblemente para reducir la permeabilidad vascular retiniana. En una realización adicional, los compuestos de la invención se utilizan en el tratamiento y/o prevención de un edema, en particular de un edema macular, más en particular de un edema macular diabético.

En otra realización, los compuestos de la invención se proporcionan para su uso en la inducción del desprendimiento de vítreo posterior (PVD). En otra realización, los compuestos de la invención se proporcionan para su uso en el tratamiento de la tracción vitreomacular.

Como se mencionó anteriormente, la presente invención se refiere a compuestos nuevos, sus sales farmacéuticamente aceptables, solvatos farmacéuticamente aceptables, isómeros o mezclas de los mismos. El compuesto de la presente invención puede formularse también en diversas formas farmacéuticas para fines de administración. Como composiciones apropiadas, se pueden citar todas las composiciones empleadas

habitualmente para la administración sistemática de fármacos. Para preparar las composiciones farmacéuticas de esta invención, una cantidad eficaz del compuesto particular, opcionalmente en forma de sal de adición o complejo metálico, como el principio activo se combina en una mezcla estrecha con un vehículo farmacéuticamente aceptable, cuyo vehículo puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas se desean en forma de dosificación unitaria adecuada, particularmente, para la administración por vía oral, rectal, percutánea, por inyección parenteral o intravítrea. Por ejemplo, al preparar las composiciones en forma de dosificación oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales tal como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales tal como suspensiones, jarabes, elixires, emulsiones y soluciones; o vehículos sólidos tal como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones mencionadas anteriormente en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria como se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en relación con el vehículo farmacéutico requerido. Ejemplos de dichas formas de dosificación unitaria son comprimidos (incluyendo comprimidos ranurados o recubiertos), cápsulas, píldoras, supositorios, sobres de polvo, obleas, soluciones o suspensiones inyectables y similares, y múltiples segregados de los mismos.

En una realización particular, la presente invención proporciona un envase que comprende un compuesto de la invención y un prospecto con instrucciones para administrar el compuesto a un paciente que tiene un trastorno oftálmico como se enumera en la presente memoria, en particular un paciente que tiene degeneración macular húmeda relacionada con la edad, retinopatía diabética o edema macular diabético, más en particular retinopatía diabética o edema macular diabético.

Para llevar a cabo el tratamiento y/o la prevención, los compuestos o las composiciones como se describen en la presente memoria se pueden administrar a un paciente mediante cualquier método que conduzca a la administración del agente terapéutico al sitio de la afección oftálmica, tal como la administración en el ojo. En otra realización, el uso, tratamiento y/o prevención comprende poner en contacto el humor vítreo y/o acuoso con una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto de la invención. La administración puede ser por vía ocular, tal como tópica, subconjuntival, sub-Tenon, intraocular, implantes oculares, etcétera. La administración tópica puede comprender la administración de una o unas pocas gotas de una composición que comprende un compuesto de la invención al ojo. La administración a áreas dentro del ojo, in situ, se puede lograr mediante inyección, cánula u otro dispositivo invasivo diseñado para introducir cantidades medidas con precisión de una composición oftálmica deseada en un compartimento o tejido particular dentro del ojo (por ejemplo, cámara posterior o retina). Una inyección intraocular puede ser en el vítreo (intravítrea), o debajo de la conjuntiva (subconjuntival), o detrás del ojo (retrobulbar), en la esclerótica o debajo de la Cápsula de Tenon (sub-Tenon). También se contemplan otras vías de administración intraocular y sitios y formas de inyección y están dentro del alcance de la invención. En una realización preferida, el tratamiento y/o prevención comprende la administración del compuesto mediante inyección intravítrea. Preferiblemente, esto se realiza a través de agujas de calibre autosellantes u otro dispositivo de suministro adecuadamente calibrado. La inyección en el ojo puede realizarse a través de la pars plana mediante la aguja autosellante.

Cuando se administra la composición mediante inyección intravítrea, los agentes activos deben concentrarse para minimizar el volumen de inyección. Preferiblemente, el volumen para la inyección es menor de aproximadamente 5 mL. Volúmenes como este pueden requerir un drenaje compensatorio del líquido vítreo para evitar aumentos en la presión intraocular y fugas del líquido inyectado a través de la abertura formada por la aguja de suministro. Más preferiblemente, el volumen inyectado está entre aproximadamente 10 y 200 μ L. Lo más preferiblemente, el volumen para la inyección está entre 30 y 100 μ L, en particular aproximadamente 50 μ L.

Con respecto a las vías de administración preferidas, la sal farmacéuticamente aceptable, el solvato farmacéuticamente aceptable, el isómero o la mezcla de los mismos es también una sal ópticamente aceptable, un solvato ópticamente aceptable, un isómero o una mezcla de los mismos. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende el compuesto y uno o más vehículos ópticamente aceptables. Curiosamente, se encontró que los compuestos de la invención tienen una alta solubilidad en agua de más de 100 mg/ml, mientras que los compuestos de la técnica anterior tienen solubilidades en agua de un solo dígito o más bajas en mg/ml. En una realización preferida, una composición de la invención como se describe en la presente memoria es una disolución acuosa que comprende un compuesto de la invención. En otra realización, la presente invención proporciona un kit de piezas que comprende un envase que comprende un compuesto de la invención y otro envase que comprende un tampón acuoso para disolver el compuesto de la invención.

Como entenderá el experto en la materia, una composición como se describe en la presente memoria es preferiblemente una composición estéril. En una realización particular, la presente invención proporciona un envase estéril que comprende un compuesto o composición de la invención. En una realización adicional, el envase estéril es un vial que comprende un compuesto o composición de la invención. El vial puede comprender el compuesto como un polvo o como una solución, preferiblemente una solución acuosa. En una realización más particular, la

presente invención proporciona un vial estéril que comprende una solución acuosa del compuesto de la invención. En una realización aún más particular, un vial como se describe en la presente memoria comprende una parte que está diseñada para ser perforada por una aguja de jeringa. En una realización alternativa, la presente invención proporciona un kit que comprende un vial con el compuesto de la invención en forma de polvo y un envase que comprende una solución acuosa, particularmente una solución tampón acuosa. En otra realización, el envase estéril es una jeringa precargada con una composición farmacéutica de la invención, particularmente una solución acuosa que comprende el compuesto de la invención. En otra realización más, el envase estéril es un envase que comprende al menos una tableta que comprende una composición farmacéutica de la invención. En particular, un blíster o envase que comprende múltiples comprimidos que comprenden un compuesto de la invención y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, un vial como se describe comprende menos de 5 ml, en particular menos de 4 ml, más en particular menos de 3 ml de una solución que comprende el compuesto de la invención.

En una realización preferida, la presente invención se refiere además al compuesto para su uso, en el que el tratamiento, inhibición y/o prevención de los trastornos mencionados anteriormente comprende además administrar un compuesto que se une a e inhibe la actividad de VEGF o un receptor de VEGF. Este compuesto puede ser un inhibidor de VEGF, un anticuerpo del receptor de VEGF o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo de VEGF o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Ejemplos adecuados de dichos compuestos incluyen bevacizumab, ranibizumab, brolucizumab o conbercept. Otro posible compuesto adicional es una trampa de VEGF, que comprende un dominio de unión a VEGF, tal como aflibercept.

La presente invención se refiere además a una combinación que comprende el compuesto de la presente invención y un compuesto adicional que se une a e inhibe la actividad de VEGF o un receptor de VEGF. Como se especificó anteriormente, este compuesto adicional puede ser un inhibidor de VEGF, un anticuerpo del receptor de VEGF o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo de VEGF o un fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como bevacizumab, ranibizumab, brolucizumab o conbercept. Otro posible compuesto adicional es una trampa de VEGF, que comprende un dominio de unión de VEGF, como aflibercept.

Siempre que se haga referencia a una combinación de principios activos, los principios activos se pueden proporcionar en una composición única o en una composición separada. Además, una combinación de principios activos también abarca principios activos que están enlazados de forma no covalente o covalente.

La presente invención se refiere además a una combinación como se especificó anteriormente para su uso como un medicamento o para inhibir, tratar y/o prevenir la neovascularización patológica, el cáncer o un trastorno oftálmico tal como degeneración macular húmeda relacionada con la edad, desprendimiento de retina, uveítis posterior, neovascularización de la córnea, neovascularización del iris, edema macular diabético y retinopatía diabética.

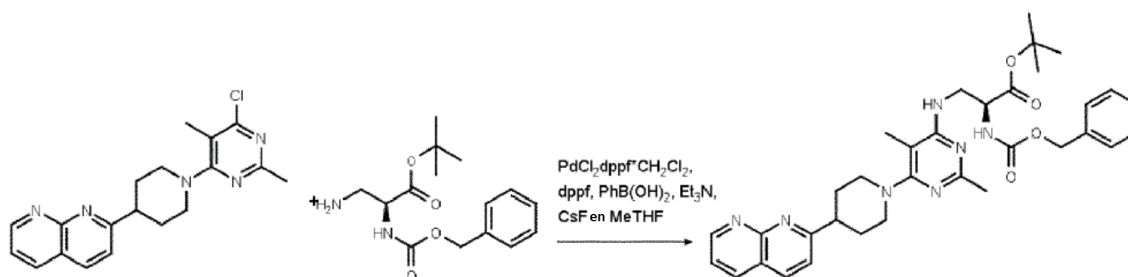
La presente invención también proporciona un método para antagonizar una integrina, en particular un receptor de vitronectina, en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar el compuesto de la invención. Más en particular, la invención proporciona métodos para inhibir la angiogénesis en un sujeto. La presente invención se refiere además a un método para inhibir la neovascularización (patológica) en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar el compuesto de la presente invención. En una realización adicional, la presente invención proporciona un método para inhibir la neovascularización ocular en un sujeto, comprendiendo el método administrar un compuesto de la invención al sujeto. En otra realización más particular, el método comprende la administración del compuesto o composición de la invención al ojo de un sujeto, tal como mediante inyección intravítrea. En particular, el método comprende la inyección intravítrea de una composición como se describe en la presente memoria.

La presente invención proporciona además los compuestos y composiciones descritos en la presente memoria para su uso en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de un trastorno como se describe en la presente memoria.

Ejemplos

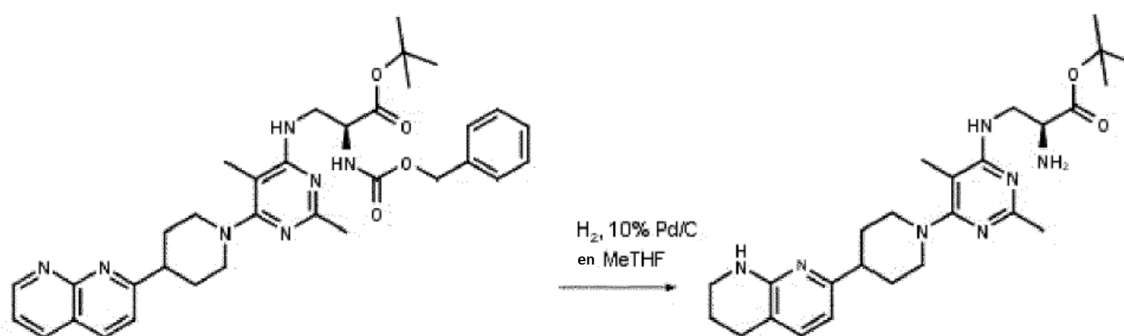
Ejemplo 1 – Síntesis de los compuestos de la invención

Síntesis del N-[(2S)-1-(terc-butoxi)-3-((2,5-dimetil-6-[4-(1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il)amino)-1-hidroxiopropan-2-il]carbamato de bencilo



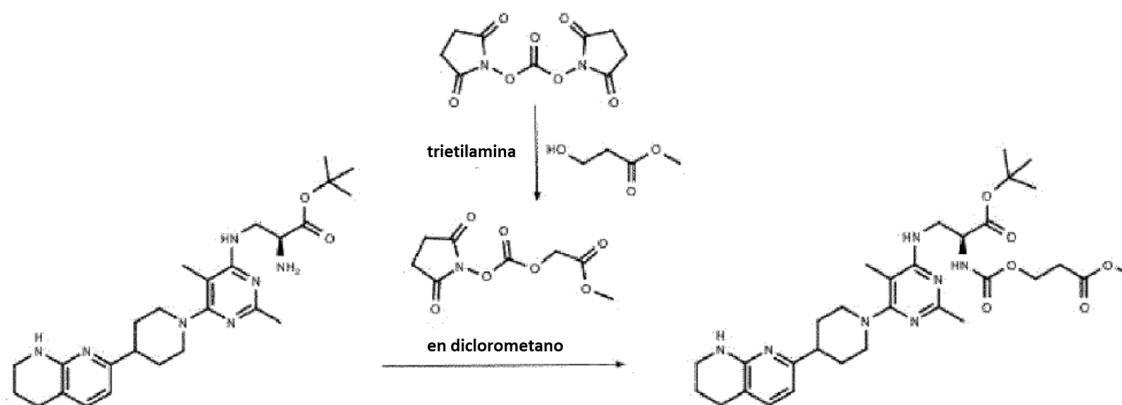
Se prepararon 2-[1-(6-cloro-2,5-dimetilpirimidin-4-il)piperidin-4-il]-1,8-naftiridina y (2S)-3-amino-2-[(benziloxi)carbonil] amino]propanoato de terc-butilo según el método descrito en el documento US2008/0058348 A1, que se incorpora en la presente memoria como referencia. Ambas moléculas se acoplaron en una reacción de aminación de Buchwald-Hartwig catalizada por el complejo dicloro[1,1'-bis(difenilfosfina) ferroceno] paladio (II) diclorometano (1:1), 1,1'-ferrocenodiil-bis difenilfosfina, ácido fenilborónico, trietilamina y fluoruro de cesio en 2-metiltetrahidrofuran. La mezcla de reacción se filtró a través de Celita y se extrajo con ácido clorhídrico acuoso. El extracto acuoso se neutralizó con acetato de sodio acuoso y se extrajo con diclorometano, el cual se lavó con bicarbonato de sodio acuoso y se secó sobre sulfato de sodio para dar un producto crudo que se purificó mediante cromatografía en columna de sílice utilizando tolueno/acetato de etilo como eluyente. El material cromatografiado se disolvió en acetato de etilo y se purificó adicionalmente mediante cristalización como la sal del ácido (-)-dibenzoil-L-tartárico. Se eliminó la sal del ácido tartárico utilizando bicarbonato de sodio acuoso para dar el producto purificado.

Síntesis del (2S)-2-amino-3-({2,5-dimetil-6-[4-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il}amino)propanoato de terc-butilo



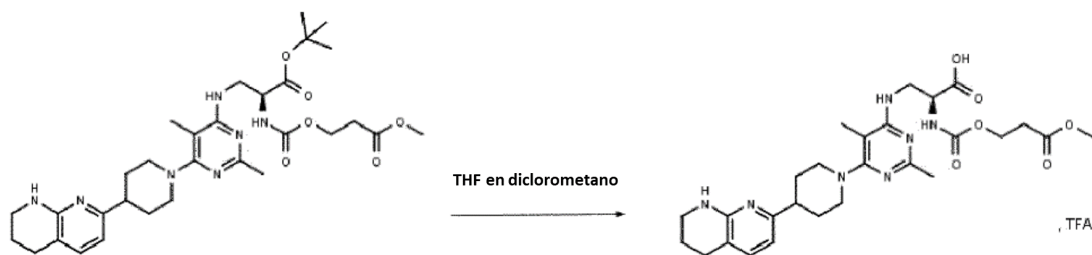
Se hidrogenó N-[(2S)-1-(terc-butoxi)-3-({2,5-dimetil-6-[4-(1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il}amino)-1-hidroxipropan-2-il]carbamato de bencilo sobre paladio en carbón activado en 2-metiltetrahidrofuran. El catalizador se retiró mediante filtración a través de Celita. El disolvente se eliminó por evaporación para dar el producto deseado.

Síntesis de (2S)-3-({2,5-dimetil-6-[4-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il}amino)-2-[(3-metoxi-3-oxopropoxi)carbonyl] amino]n-propanoato de terc-butilo



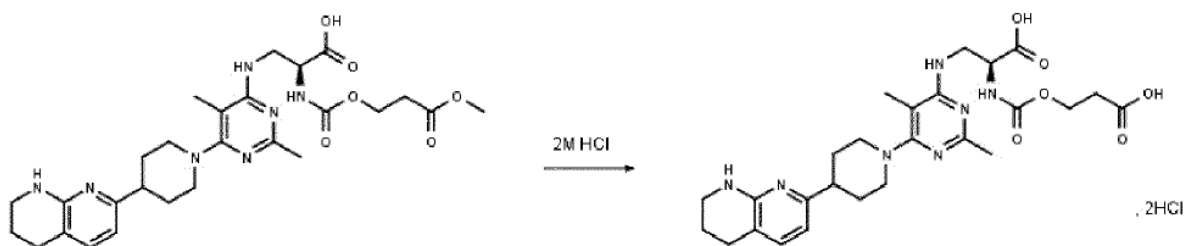
- 5 Se hizo reaccionar carbonato de N,N-disuccinimilo, en presencia de trietilamina, con 3-hidroxipropanoato de metilo en diclorometano para dar 2-(((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)carbonil) oxi)acetato de metilo. Se añadió (2S)-2-amino-3-((2,5-dimetil-6-[4-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il)amino)propanoato de terc-butilo para dar el producto deseado. La mezcla de reacción se lavó con ácido clorhídrico acuoso y bicarbonato de sodio acuoso y después se secó sobre sulfato de sodio para dar el producto crudo que se purificó mediante cromatografía en columna en sílice utilizando acetato de etilo/n-heptano/trietilamina como eluyente.

Síntesis de trifluoroacetato del ácido (2S)-3-((2,5-dimetil-6-[4-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il)amino)-2-(((3-metoxi-3-oxopropoxi)carbonil)amino)propanoico



- 10 (2S)-3-((2,5-dimetil-6-[4-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il)amino)-2-(((2-metoxi-2-oxoetoxi)carbonil)amino)propanoato de terc-butilo se disolvió en diclorometano y se trató con ácido trifluoroacético. La mezcla de reacción se lavó con brine (disolución saturada de cloruro de sodio) y el disolvente se eliminó por evaporación para dar el producto deseado como una sal del ácido trifluoroacético. El compuesto resultante se denomina además como compuesto comparativo A (cpd A).
- 15 MS de baja resolución mediante electrospray (ES) m/z: 556 [(M+1), 100%]

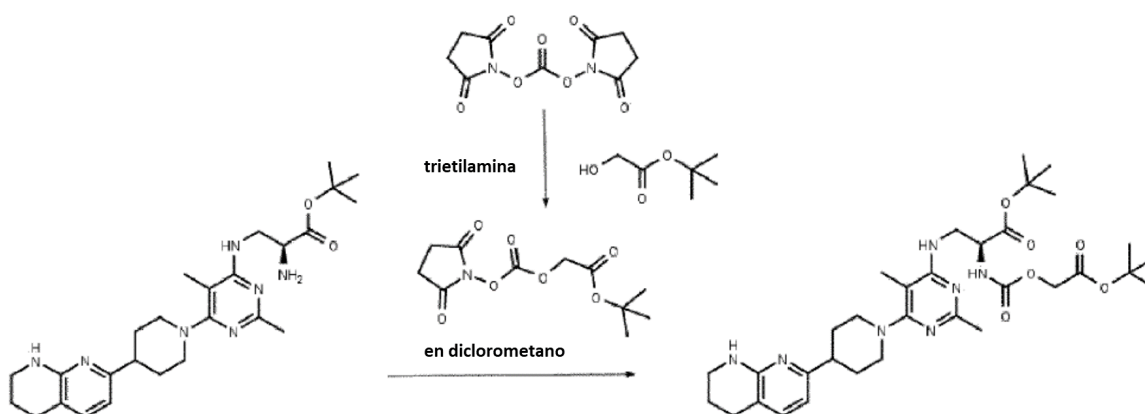
Síntesis del ácido (2S)-2-(((2-carboxietoxi)carbonil)amino)-3-((2,5-dimetil-6-[4-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il)amino)propanoico



- 20 Se disuelve trifluoroacetato del ácido (2S)-3-((2,5-dimetil-6-[4-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il)amino)-2-(((3-metoxi-3-oxopropoxi)carbonil)amino)propanoico en ácido clorhídrico acuoso 2M. Una vez completada la reacción el disolvente se elimina mediante liofilización para dar el producto deseado. El ácido (2S)-2-(((2-carboxietoxi)carbonil)amino)-3-((2,5-dimetil-6-[4-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il)amino)propanoico, se denomina además como compuesto 1 (cpd1).

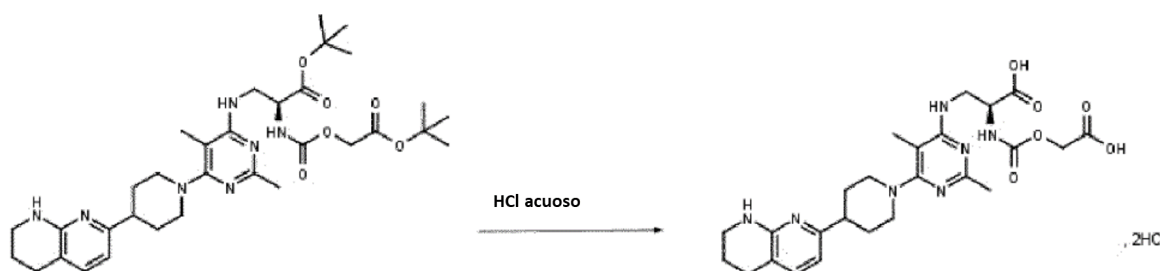
MS de baja resolución mediante electrospray (ES) m/z: 542 [(M+1), 100%]

- 25 Síntesis de (2S)-2-(((2-(terc-butoxi)-2-oxoetoxi) carbonil)amino)-3-((2,5-dimetil-6-[4-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il)amino)propanoato de terc-butilo



Se hizo reaccionar carbonato de N,N-disuccinimidilo, en presencia de trietilamina, con 2-hidroxiacetato de terc-butilo en diclorometano para dar 2-(((2,5-dioxopirrolidin-1-il) oxi) carbonil) oxi acetato de terc-butilo. Se añadió (2S)-2-amino-3-((2,5-dimetil-6-[4-(5,6,7,8-tetrahydro-1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il)amino) propanoato de terc-butilo. Una vez completada la reacción la mezcla de reacción se lavó con ácido clorhídrico acuoso y bicarbonato de sodio acuoso y se secó después sobre sulfato de sodio para dar el producto crudo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna en sílice utilizando acetato de etilo/n-heptano/trietilamina como eluyente.

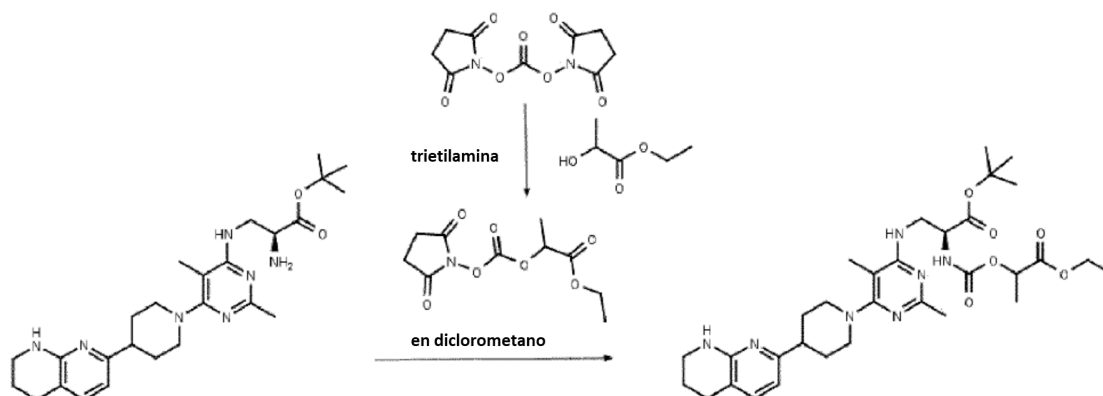
Síntesis de diclorhidrato del ácido (2S)-2-(((carboximetoxi)carbonil)amino)-3-((2,5-dimetil-6-[4-(5,6,7,8-tetrahydro-1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il)amino)propanoico (THR-687)



(2S)-2-(((2-(terc-butoxi)-2-oxoetoxi) carbonil)amino)-3-((2,5-dimetil-6-[4-(5,6,7,8-tetrahydro-1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il)amino)propanoato de terc-butilo se hidrolizó con ácido clorhídrico acuoso. La mezcla de reacción se lavó con n-heptano para dar el compuesto 2 (cpd2) después de la evaporación.

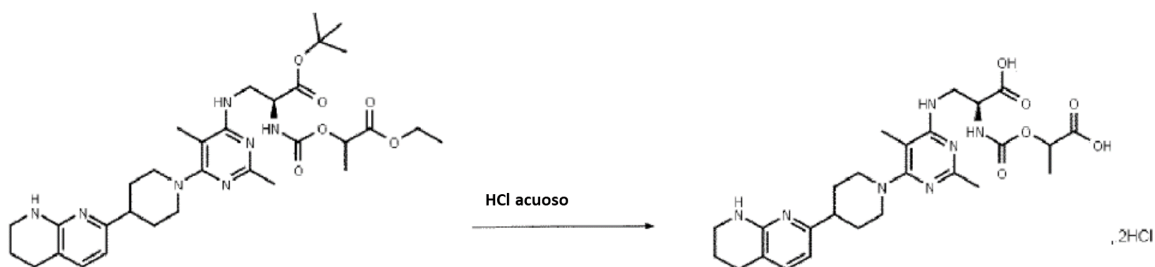
^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7,64 (d 1H), 6,71 (d 1H), 4,63 (d 1H), 4,46 (d 1H), 4,57 (dd 1H), 4,06 (dd 1H), 3,85 (dd 1H), 3,77 (m 2H), 3,53 (dd 2H), 3,27 (m, 2H), 3,01 (tt 1H), 2,84 (dd 2H), 2,58, (s 3H), 2,10 (dd, 2H), 2,07, (s 3H), 1,99 (t, 2H), 1,95 (td 2H)

Síntesis del (2S)-3-((2,5-dimetil-6-[4-(5,6,7,8-tetrahydro-1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il)amino)-2-(((1-etoxi-1-oxopropan-2-il)oxi) carbonil)amino)propanoato de terc-butilo



5 Se hizo reaccionar carbonato de N,N-disuccinimidilo, en presencia de trietilamina, con 2-hidroxi-propanoato de etilo en diclorometano para dar 2-(((2,5-dioxopirrolidin-1-il) oxi] carbonil] oxi) propanoato de etilo. Se añadió (2S)-2-amino-3-((2,5-dimetil-6-[4-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il)amino)propanoato de terc-butilo. Una vez completada la reacción la mezcla de reacción se lavó con ácido clorhídrico acuoso y bicarbonato de sodio acuoso y se secó después sobre sulfato de sodio para dar el producto crudo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna en sílice utilizando diclorometano/metanol como eluyente.

Síntesis del diclorhidrato del ácido (2S)-2-(((1-carboxietoxi)carbonil] amino)-3-((2,5-dimetil-6-[4-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il)amino)propanoico

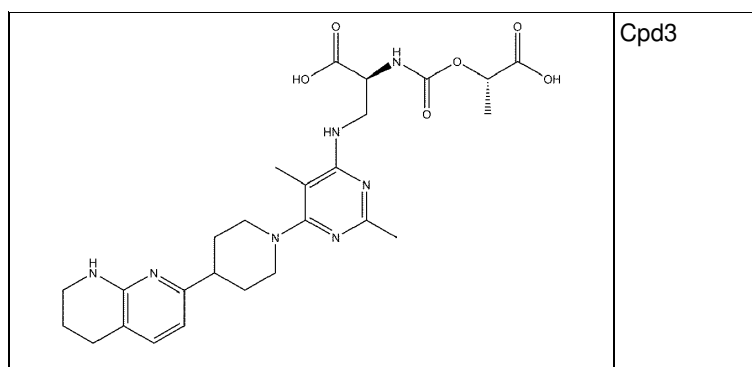


10 (2S)-3-((2,5-dimetil-6-[4-(5,6,7,8-tetrahidro-1,8-naftiridin-2-il)piperidin-1-il]pirimidin-4-il)amino)-2-(((1-etoxi-1-oxopropan-2-il)oxi]carbonil]amino)propanoato de terc-butilo se hidrolizó con ácido clorhídrico acuoso. La mezcla de reacción se lavó con n-heptano para dar el producto después de la evaporación, denominado además como compuesto 3 (cpd3).

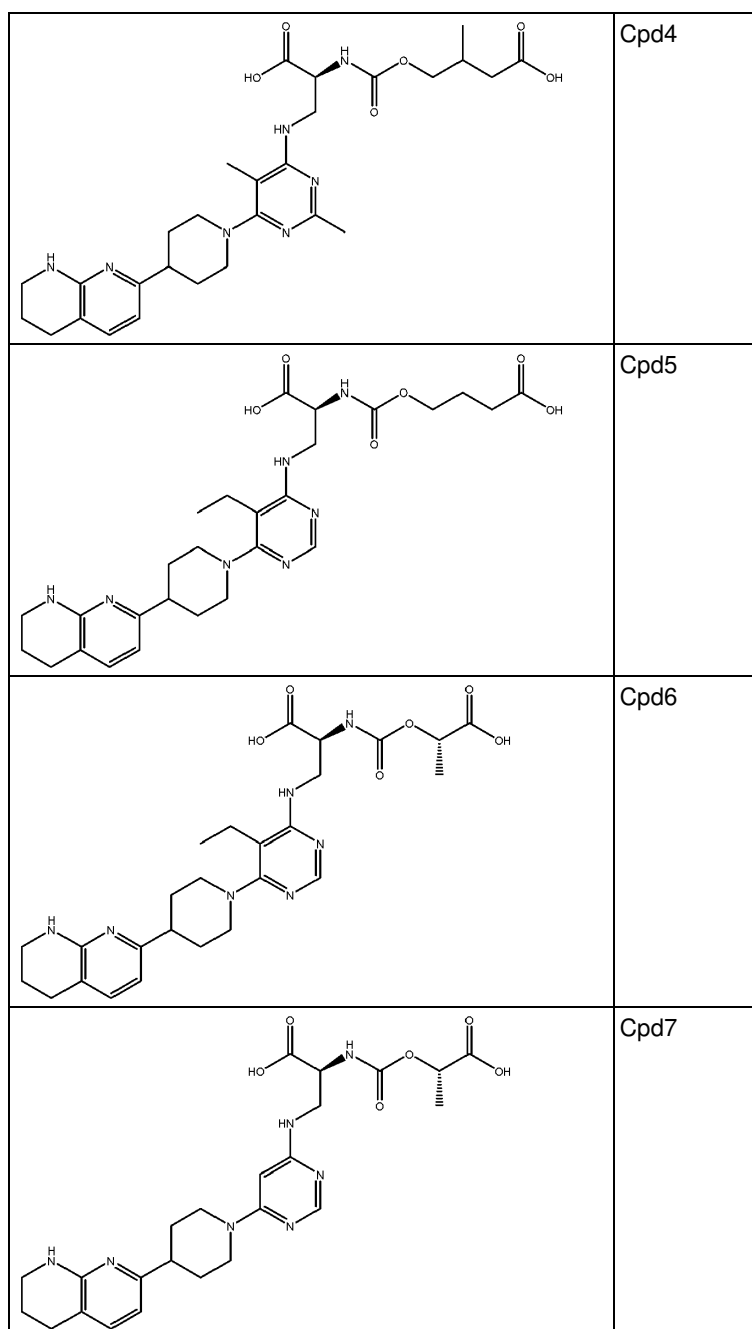
15 ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ: 7,5 (d 1H), 6,5 (d 1H), 4,5 (m 1H), 4,2 (m 1H), 3,9 (dd 1H), 3,5-3,7 (m 3H), 3,4 (t 2H), 3,1 (t 2H), 2,8 (m 1H), 2,7 (t 2H), 2,4 (s 3H), 1,9 (s 3H), 1,9-2,0 (m 3H), 1,7-1,9 (m 4H), 1,3 (d 3H).

Por consiguiente, se han preparado los siguientes compuestos de la invención:

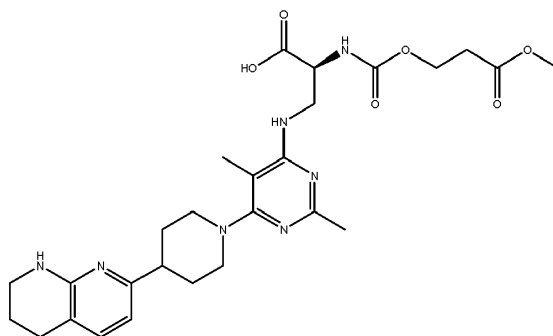
	Cpd1
	Cpd2



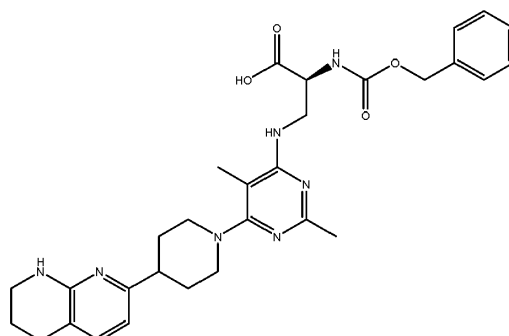
Otros ejemplos de compuestos según la invención son:



El Compuesto A (cpd A) se sintetizó como se describió anteriormente:



El Compuesto B (CpdB) se sintetizó según los procedimientos del documento US2008058348 A1:



Ejemplo 2: antagonismo de integrina

- 5 El principio de los ensayos ELISA de competición utilizados en la presente memoria fue el siguiente: (1) el receptor de integrina bajo investigación se recubrió en placas de 96 pocillos y los pocillos se bloquearon, (2) después se añadió un ligando de integrina (fibronectina) a los pocillos relevantes en presencia de concentraciones crecientes de un antagonista de integrina dado, (3) después de un período de tiempo definido, se lavaron los pocillos y se detectó el ligando unido con la ayuda de un reactivo específico. Después se realizó un análisis cuantitativo de los datos para
- 10 determinar los valores de EC50, es decir, la concentración del antagonista de la integrina que reduce la unión del ligando al receptor recubierto en un 50%.

Tabla 1: EC50 para los diferentes antagonistas de integrinas e integrina humana

	$\alpha_v\beta_3$	$\alpha_v\beta_5$	$\alpha_5\beta_1$	$\alpha_{IIb}\beta_3$
cpd1	+++	+++	+++	+
cpd2	+++	+++	+++	+
cpd3	+++	+++	+++	+
cpdA	+++	+++	+++	+++
cpdB	++	+++	+++	+++

+++ : entre 1 y 10 nM; ++ : entre 10 y 25 nM; + : >25 nM

- 15 El compuesto según la fórmula (I) inhibe las interacciones entre las integrinas y sus ligandos. El compuesto según la fórmula (I) se ha demostrado que antagoniza varios receptores de integrina, incluyendo $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_5\beta_1$, con una afinidad nanomolar de un solo dígito. Estos receptores de integrina se ha demostrado que juegan un papel en la angiogénesis ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_5\beta_1$), la permeabilidad vascular ($\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$) y la adhesión vitreoretiniana ($\alpha_5\beta_1$).

- 20 En particular, los compuestos de la invención muestran un antagonismo significativamente reducido hacia la integrina plaquetaria $\alpha_{IIb}\beta_3$, que está implicada en la agregación plaquetaria. La Figura 1 establece las proporciones determinadas de valores de EC50 para $\alpha_v\beta_3$ con respecto $\alpha_{IIb}\beta_3$. Como se deriva de estos resultados, los compuestos de la presente invención muestran una actividad mucho menor hacia la integrina plaquetaria en comparación con la integrina $\alpha_v\beta_3$. Por el contrario, los compuestos como se describen en la técnica anterior muestran una actividad significativamente mayor hacia la integrina plaquetaria en comparación con la integrina $\alpha_v\beta_3$.

Ejemplo 3 – ensayo de migración celular

La cicatrización de heridas de células endoteliales está mediada por la migración y proliferación de células endoteliales, ambos componentes críticos del proceso de angiogénesis, y se utiliza de forma rutinaria como modelo sustituto del potencial angiogénico *in vitro*. El ensayo de migración celular ORIS™ se utilizó con células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs).

Se cultivaron células HUVEC (SCCE-001, N° Cat 1000519, Merck Chemicals) en matraces T175 (N° Cat 353112, falcon) en un medio de crecimiento EndoGro (SCME-003, Merck Chemicals) y se dividieron cuando alcanzaron una confluencia del 90-100%.

Para el ensayo, las células se utilizaron en los pasos 2 a 4 después de la descongelación y al 80-90% de confluencia. Al comienzo del día, las placas de ensayo de migración celular Oris™ recubiertas con fibronectina (N° Cat #CMAFN.I01, AMS Biotechnology) se retiraron de la refrigeración y se colocaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las Oris Detection Masks se lavaron con etanol y se aplicaron al fondo de las placas de 96 pocillos, alineando la esquina de Al de las carátulas con la esquina de Al de las placas. Las células se recogieron mediante tripsinización (N° Cat 25300, Gibco), se centrifugaron a 250 g durante 5 minutos y se suspendieron a $0,4 \cdot 10^6$ por mL en medio de crecimiento EndoGro completo. 100 μ L de la suspensión celular se añadieron a los pocillos y las placas se incubaron durante 6 horas a 37°C y 5% de CO₂ para permitir que las células se adhieran.

Al final de la incubación, la herramienta de tapón se lavó con etanol y se utilizó para quitar los tapones de todos los pocillos excepto los de referencia. Se añadieron a los pocillos 100 μ L de medio de cultivo que contenía diferentes concentraciones de los compuestos (cpd2, cpd3, cpdB, cilengitide) y las placas se transfirieron durante 24 horas a la incubadora a 37°C y 5% de CO₂ para permitir la migración.

Justo antes del final de la incubación, se preparó una disolución de 4 μ g/mL de calceína AM (N° Cat 354217, Beckton Dickinson) en HBSS precalentado (N° Cat 14025, Gibco). Se retiraron los tapones de los pocillos de referencia y el medio se retiró cuidadosamente de todos los pocillos con un multicanal (sin aspiración al vacío). Los pocillos se lavaron con 100 μ L de DPBS. Después, se añadieron 100 μ L de la disolución de calceína AM y las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C y 5% de CO₂. Después de la incubación, se leyó la fluorescencia a 494 nm de excitación y longitudes de onda de emisión de 517 nm utilizando Flexstation y el software SofiMax Pro 5.4.5 (Molecular Devices). La fluorescencia se leyó desde el fondo de las placas con la tapa puesta para mantenerlas estériles. Después se retiraron las carátulas y se tomaron fotografías con el microscopio de fluorescencia Axiovert (Zeiss) utilizando luz reflejada, GFP y un objetivo de 2,5x.

Los valores de IC50 para cpdB, cpd2 y cpd3 estuvieron todos por debajo de 1 μ M. La IC50 para el control positivo Cilengitide fue de 100 μ M. Se puede concluir que los compuestos de fórmula (I) retienen una fuerte actividad e inhiben la migración celular con valores de IC50 en el rango nanomolar.

Ejemplo 4: Ensayo de explante corioideo murino

El ensayo se basa en un modelo de explante de angiogénesis microvascular murina, que se asemeja mucho a la angiogénesis corioidea *in vivo*. La principal ventaja de este modelo de cultivo organotípico es que las células se mantienen dentro de su entorno normal, preservando así las interacciones célula-célula, mientras se mantiene un mayor nivel de control experimental que en los modelos animales. El modelo de explante corioideo o brevemente el modelo EMCA permite una evaluación rápida de nuevas terapias anti-angiogénicas, con el beneficio adicional de excluir la posible falta de exposición que se encuentra a menudo al probar moléculas pequeñas en ojos de animales. Los explantes de RPE-esclerótica corioidea (en lo sucesivo denominados explantes corioideos) se incrustan en un gel de fibrinógeno/fibrina tridimensional. La adición de un medio que contiene suero induce un extenso crecimiento de células endoteliales en la matriz después de 3 a 4 días en cultivo.

Animales

Todos los experimentos se realizaron utilizando ratones macho C57BL/6J de 4 a 5 semanas de edad (Charles River Laboratories France), alojados en condiciones estándar de laboratorio según un ritmo normal de día/noche con acceso *ad libitum* a comida y agua. Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Institutional Ethical Committee de KU Leuven.

Disección del tejido corioideo y preparación del cultivo de explante

Después de la optimización inicial, se estableció un protocolo general. Brevemente, después de la eutanasia de los ratones utilizando pentobarbital (200 mg/Kg, IP, Dolethal, Vetoquinol) seguido de dislocación cervical, los ojos se enuclearon inmediatamente con unas pinzas curvas y se mantuvieron en DPBS helado (N° Cat 14190-136, Gihco). Bajo un microscopio estereoscópico, el ojo se colocó en una gota de DPBS helado y se mantuvo en su lugar con unas pinzas en una placa de Petri helada. La córnea y el cristalino se extrajeron mediante una incisión circunferencial en el limbo (límite córnea-esclerótica) utilizando tijeras de resorte Vannas (Fine Science Tools). A continuación, se extrajeron los músculos redundantes del globo ocular restante y se hizo un corte desde el borde de la cámara posterior hacia la cabeza del nervio óptico. Después de una cuidadosa separación del complejo RPE-

coroides-esclerótica de la retina, se hicieron de 6 a 8 explantes en la periferia de este complejo utilizando una aguja perforada (750 μm de diámetro, Mediquip Surgical). Los explantes se transfirieron a una placa de 48 pocillos (BD Biosciences), precargada con 350 μL de DMEM sin suero (Nº Cat 11995-065, Gibco) y 1% (v/v) de Pen/Strep (Nº Cat 15140-122, Gibco), y se incubaron durante la noche a 37°C en 5% de CO_2 .

5 Explante de coroides incrustado en gel de fibrinógeno/fibrina y condiciones de cultivo

Se disolvió fibrinógeno bovino (3,1 mg/ml, Nº Cat F863, Sigma-Aldrich) en DMEM (Nº Cat 11995-065, Gibco) que contenía 1% (v/v) de Pen/Strep (Nº Cat 15140-122, Gibco), y se filtró posteriormente a través de un filtro de poros de 0,22 μm (Corning). A continuación, se añadieron 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de aprotina inhibidor de la serina proteasa (Nº Cat A6279, Sigma-Aldrich) a la disolución de fibrinógeno para bloquear la actividad fibrinolítica. Después de la adición de 400 mU/mL de trombina bovina (SRP6555, Sigma-Aldrich), esta disolución de fibrinógeno-aprotinina-trombina se dispensó rápidamente en placas de 48 pocillos (100 μL por pocillo) y se dejó solidificar a 37°C durante al menos 5 minutos. En la parte superior de los pocillos recubiertos de fibrina, se añadieron 175 μL de disolución de fibrinógeno más aprotinina, seguido de la transferencia de explantes de RPE-coroides individuales en 175 μL de medio DMEM utilizando una punta cortada. Finalmente, se añadieron 1,4 μL de trombina (400 mU/nit) a cada pocillo y esta mezcla se dejó gelificar a 37°C y 5% de CO_2 durante 1 hora. Después de la coagulación, se añadieron 350 μL de DMEM que contenía FBS al 10% (SH30071.03, inactivado por calor. HyClone) y la(s) molécula(s) bajo prueba (cpd3, cpdB y cilengitide) en la parte superior del gel y las placas se incubaron a 37°C en 5% de CO_2 .

Cuantificación de la aparición de vasos

Después de 3 a 4 días, se tomaron imágenes de campo brillante a 2,5x aumentos con el microscopio invertido Axio Vert. A1 (Zeiss) utilizando el software de microscopio ZEN lite 2012 (Zeiss). El análisis del área de crecimiento del vaso se realizó manualmente en imágenes ZVI, más específicamente delineando el cuerpo del explante, así como el área de crecimiento total del vaso (incluyendo el cuerpo del explante) utilizando el software Axiovision Rel 4.8 ("Measure>Outline", Zeiss). Se realizaron análisis adicionales en Microsoft Excel, donde se cuantificó el área de aparición del cultivo organotípico endotelial restando el área del explante de tejido del área total ocupada por los brotes. Como las áreas absolutas de brotación entre experimentos independientes son ligeramente diferentes, todos los datos dentro de cada experimento se normalizaron a la condición tratada con vehículo y se calcularon los valores de IC50 (GraphPad Prism 5).

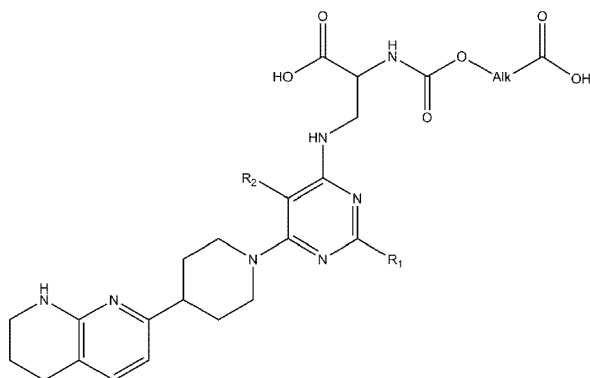
Resultados

Todos los antagonistas de la integrina bloquearon la formación de brotes endoteliales de una manera dependiente de la concentración. Esto está en línea con los estudios que muestran que las células endoteliales pueden asociarse con el fibrinógeno a través de la especificidad de reconocimiento de ROD. De hecho, el fibrinógeno contiene múltiples sitios de unión para las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_5\beta_1$, que se sabe que son expresadas por células endoteliales y reguladores importantes de la angiogénesis (patológica). Cpd3 y cpdB inhibieron el crecimiento de vasos con valores de IC50 alrededor de 1 μM , mientras que para el control positivo Cilengitide, la IC50 medida fue de alrededor de 300 μM . Imágenes de campo brillantes representativas para cpd3 se muestran en la Figura 2. Estos hallazgos están en línea con los resultados del ensayo de migración celular, discutido en el ejemplo 3.

En conclusión, los compuestos de la presente invención son inhibidores de pan-integrina que muestran un fuerte antagonismo frente a múltiples receptores de integrina que se ha demostrado que juegan un papel en la angiogénesis ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_5\beta_1$), permeabilidad vascular ($\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$) y adhesión vitreoretiniana ($\alpha_5\beta_1$). Por otro lado, relacionado con los compuestos comparativos, los compuestos de la invención muestran un antagonismo mucho más bajo de la integrina plaquetaria ($\alpha_{IIb}\beta_3$), reduciendo por lo tanto el riesgo de interferir con la agregación plaquetaria y aumentar la ventana terapéutica. Además, se ha demostrado que los compuestos de la invención inhiben la migración celular y reducen la aparición de vasos. La invención proporciona nuevos antagonistas de integrina que son útiles para, entre otros, el tratamiento de las enfermedades neovasculares.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto según la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato farmacéuticamente aceptable, isómero o una mezcla de los mismos,



Fórmula I

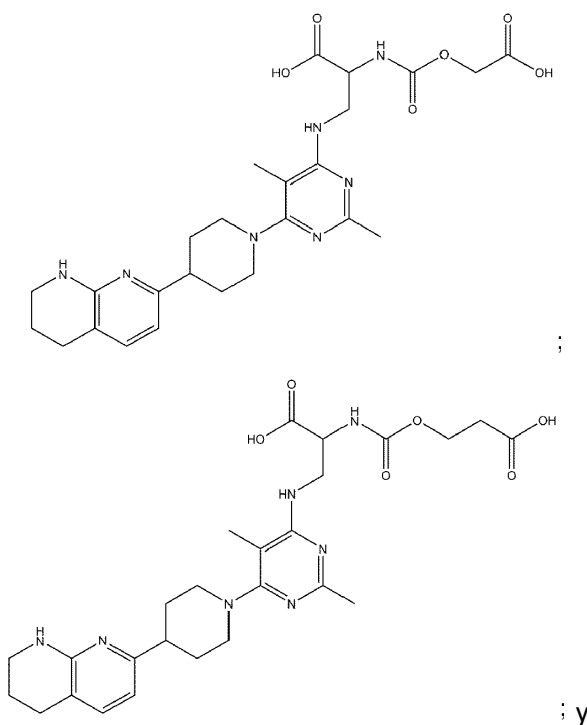
5 en donde

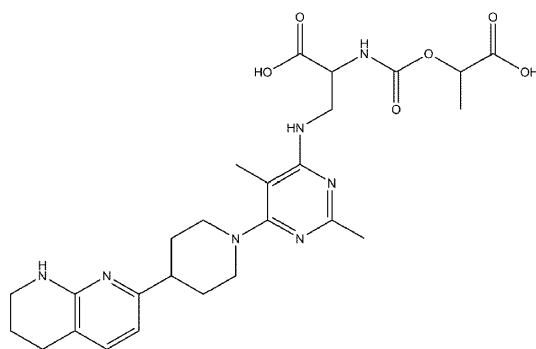
R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y etilo; y Alk es un alquileo C₁₋₄.

2. El compuesto según la reivindicación 1, en donde tanto R₁ como R₂ son metilos.

3. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde Alk es un alquileo C₁ o C₂.

10 4. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:





5. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y uno o más de vehículos farmacéuticamente aceptables.
6. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso como medicamento.
- 5 7. El compuesto para su uso según la reivindicación 6, para su uso en la inhibición de la neovascularización.
8. El compuesto para su uso según la reivindicación 6, para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer.
9. El compuesto para su uso según la reivindicación 6, para su uso en el tratamiento y/o prevención de un trastorno oftálmico.
- 10 10. El compuesto para su uso según la reivindicación 9, en donde dicho trastorno oftálmico se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular húmeda relacionada con la edad, desprendimiento de retina, uveítis posterior, neovascularización de la córnea, neovascularización del iris, edema macular diabético y retinopatía diabética.
11. El compuesto para su uso según la reivindicación 9 o 10, en donde el tratamiento y/o prevención comprende la administración del compuesto mediante una inyección intravítrea.
- 15 12. El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde la inhibición, tratamiento o prevención comprende además la administración de un compuesto que se une a e inhibe la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o un receptor de VEGF.
- 20 13. Una combinación que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y un compuesto que se une a e inhibe la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o un receptor de VEGF.
14. La combinación de la reivindicación 13, para su uso como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11.

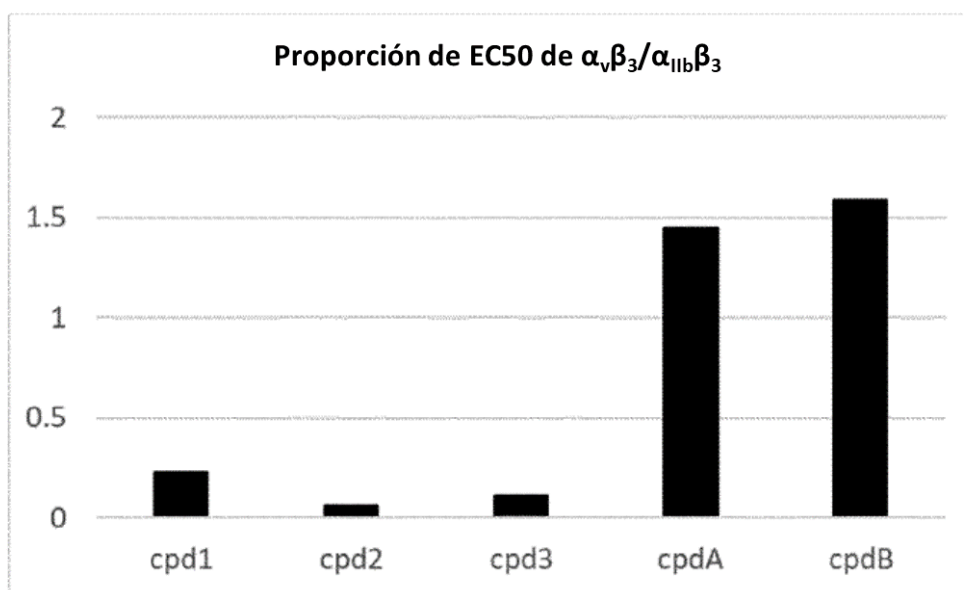


Fig. 1

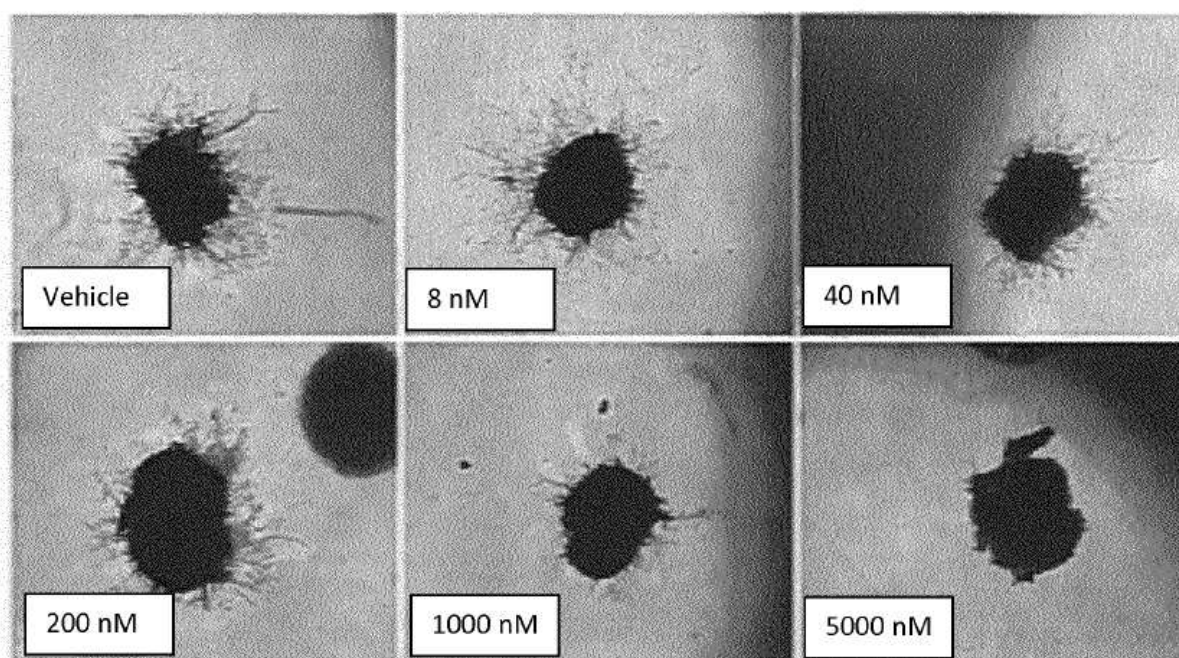


Fig. 2