



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 929**

51 Int. Cl.:

C07D 205/04 (2006.01)

A61K 31/397 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

C07D 401/10 (2006.01)

A61K 31/4427 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08831946 .2**

96 Fecha de presentación : **19.09.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2188252**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2010**

54

Título: **Derivados del ácido 1-(4-(4-bencilbenzamido)-bencil)azetidín-3-carboxílico y compuestos relacionados como moduladores del receptor S1P para el tratamiento de trastornos inmunitarios.**

30

Prioridad: **20.09.2007 US 994812 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.06.2011

73

Titular/es: **AMGEN Inc.**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US
EPIX PHARMACEUTICALS, Inc.

72

Inventor/es: **Neira, Susana, C.;**
Yu, Xiang;
Burli, Roland;
Lanman, Brian y
Cee, Victor

74

Agente: **Miltényi Null, Peter**

ES 2 360 929 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados del ácido 1-(4-(4-bencilbenzamido)-bencil)azetidín-3-carboxílico y compuestos relacionados como moduladores del receptor s1p para el tratamiento de trastornos inmunitarios.

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a compuestos que tienen actividad como agentes que modulan el receptor de S1P y al uso de tales compuestos para tratar enfermedades asociadas con la actividad inapropiada del receptor de S1P.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Se ha demostrado que la esfingosina-1-fosfato (S1P) induce muchos efectos celulares, incluyendo aquellos que dan como resultado la agregación plaquetaria, proliferación celular, morfología celular, invasión de células tumorales, quimiotaxis de células endoteliales y angiogénesis *in vitro* de células endoteliales. Por tanto, los receptores de S1P son buenas dianas para aplicaciones terapéuticas tales como cicatrización de heridas e inhibición del crecimiento tumoral. S1P produce señalización en células en parte mediante un conjunto de receptores acoplados a proteínas G denominados S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 y S1P5 (denominados anteriormente EDG-1, EDG-5, EDG-3, EDG-6 y EDG-8, respectivamente). Estos receptores comparten el 50-55% de los aminoácidos y la identidad de agrupación con otros tres receptores (LPA1, LPA2, y LPA3 (anteriormente EDG-2, EDG-4 y EDG-7) para el ácido lisofosfatídico (LPA) estructuralmente relacionado.

15 Se induce un cambio conformacional en el receptor acoplado a proteína G (GPCR) cuando el ligando se une a ese receptor, lo que provoca que se sustituya GDP por GTP en la subunidad α de las proteínas G asociadas y la posterior liberación de las proteínas G en el citoplasma. Entonces, la subunidad α se disocia de la subunidad $\beta\gamma$, y entonces cada subunidad puede asociarse con proteínas efectoras, que activan segundos mensajeros que conducen a una respuesta celular. Finalmente, se hidroliza el GTP en las proteínas G para dar GDP, y las subunidades de las proteínas G vuelven a asociarse entre sí y luego con el receptor. La amplificación desempeña un papel principal en la ruta general de GPCR. La unión de un ligando a un receptor conduce a la activación de muchas proteínas G, pudiendo asociarse cada una con muchas proteínas efectoras, lo que conduce a una respuesta celular amplificada.

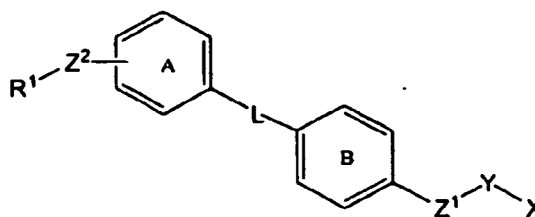
20 Los receptores de S1P constituyen buenas dianas farmacológicas, porque los receptores individuales son específicos tanto de tejido como de respuesta. La especificidad tisular de los receptores de S1P es importante, porque el desarrollo de un agonista o antagonista selectivo para un receptor localiza la respuesta celular en los tejidos que contienen ese receptor, lo que limita efectos secundarios no deseados. La especificidad de la respuesta de los receptores de S1P también es importante porque permite el desarrollo de agonistas o antagonistas que inician o suprimen determinadas respuestas celulares sin afectar a otras cosas. Por ejemplo, la especificidad de la respuesta de los receptores de S1P puede permitir que un mimético de S1P inicie la agregación plaquetaria sin afectar a la morfología celular.

25 S1P se forma como un metabolito de la esfingosina en su reacción con esfingosina quinasa, y se almacena abundantemente en los agregados plaquetarios en los que existen altos niveles de esfingosina quinasa y falta esfingosina liasa. S1P se libera durante la agregación plaquetaria, se acumula en el suero y también se encuentra en ascitis maligna. La biodegradación de S1P se realiza lo más probablemente mediante hidrólisis por ectofosfohidrolasas, específicamente las esfingosina 1-fosfato fosfohidrolasas.

30 El documento WO 2007/061458 da a conocer moduladores del receptor de esfingosina-1-fosfato para el tratamiento del rechazo de trasplantes.

SUMARIO DE LA INVENCION

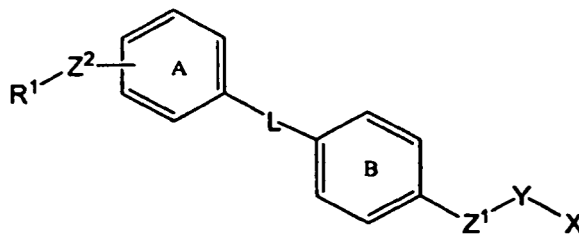
35 La presente invención se refiere al uso de nuevas composiciones que incluyen moduladores de S1P, por ejemplo, agonistas, agonistas parciales, agonistas inversos y antagonistas, y a su uso en el tratamiento, la prevención o la curación de diversos estados relacionados con el receptor de S1P. La invención muestra compuestos que son moduladores del receptor de S1P; en una realización, tales compuestos incluyen aquellos que tienen la fórmula



40 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que R¹, Z², L, B, A, Z¹, Z², Y y X se definen en el presente documento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

5 A es fenilo o un heteroarilo de seis miembros que contiene 1 ó 2 átomos de N, estando sustituidos el fenilo y heteroarilo con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄;

B es fenilo o un heteroarilo de seis miembros que contiene 1 ó 2 átomos de N, estando sustituidos el fenilo y heteroarilo con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄;

L es -C≡C-, -CH₂CH₂- o -N(R^a)C(=O)-;

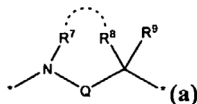
10 n es 0, 1, 2 ó 3;

R^a es, independientemente en cada caso, H o alquilo C₁₋₆;

R¹ se selecciona de alquilo C₁₋₆, O-alquilo C₁₋₅, N(Ra)alquilo C₁₋₅, N(alquilo C₁₋₅)alquilo C₁₋₅, arilo o heteroarilo.

15 X se selecciona de WC(=O)OR^{6a}, WP(=O)R^{6b}R^{6c}, WS(=O)₂OH, WCONHSO₃H o 1H-tetrazol-5-ilo; en el que W es un enlace directo, oxígeno o alquilo C₁₋₄ que tiene uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, OH, ciano, NR^aR^a, arilamino, heteroarilamino, O-alquilo C₁₋₄ y CO₂H; R^{6a} es hidrógeno o alquilo C₁₋₄; y R^{6b} y R^{6c} son independientemente hidrógeno, OH, alquilo C₁₋₄ o haloalquilo C₁₋₄;

Y es un residuo de fórmula (a) en la que los asteriscos izquierdo y derecho indican el punto de unión



en la que

20 Q se selecciona de un enlace directo, C=O, C=S, SO₂, C=ONR^a o (CR¹⁰R¹¹)_m; y m es 0, 1, 2 ó 3;

R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, amino, alquilamino C₁₋₅, OH, ciano, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆(OH), S-alquilo C₁₋₅, O-alquilo C₁₋₅, haloalquilo C₁₋₆ y O-alquilo C₁₋₅; o R⁷ y R⁸ pueden unirse juntos con los átomos a los que están unidos para formar un anillo de 4 a 7 miembros, que tiene opcionalmente un heteroátomo seleccionado de N, O y S; y

25 R⁹ se selecciona de hidrógeno, halógeno, OH, ciano, alquilo C₁₋₆, S-alquilo C₁₋₅, O-alquilo C₁₋₅, haloalquilo C₁₋₆ u O-haloalquilo C₁₋₅;

R¹⁰ y R¹¹ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, OH, ciano, alquilo C₁₋₆, O-alquilo C₁₋₅, S-alquilo C₁₋₅, haloalquilo C₁₋₆ u O-haloalquilo C₁₋₅ y

30 Z¹ y Z² se seleccionan independientemente de O, NR³, S, S(=O), S(=O)₂, S(=O)₂NR³, (CR⁴R⁵)_n, C=O, C=S, C=N-R³, o un enlace directo, en el que

R³ se selecciona de hidrógeno, OH, SO₂, C=O, C=S, C=NH, alquilo C₁₋₆, O-alquilo C₁₋₅, S-alquilo C₁₋₅, haloalquilo C₁₋₆ y O-haloalquilo C₁₋₅, arilo o heteroarilo; o cuando Z² es un enlace directo, R³ es un anillo C₃-C₆ que contiene opcionalmente un heteroátomo; y

35 R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, OH, ciano, alquilo C₁₋₆, O-alquilo C₁₋₅, S-alquilo C₁₋₅, haloalquilo C₁₋₆ y O-haloalquilo C₁₋₅, arilo y heteroarilo o juntos forman C=O.

En otra realización, conjuntamente con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, A es fenilo adicionalmente sustituido con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄.

5 En otra realización, conjuntamente con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, A es 1,4-fenilo adicionalmente sustituido con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄.

En otra realización, conjuntamente con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, A es 1,3-fenilo adicionalmente sustituido con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄.

10 En otra realización, conjuntamente con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, A es 1,2-fenilo adicionalmente sustituido con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄.

15 En otra realización, conjuntamente con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, A es piridinilo adicionalmente sustituido con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄.

En otra realización, conjuntamente con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, A es pirimidinilo adicionalmente sustituido con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄.

20 En otra realización, conjuntamente con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, B es fenilo adicionalmente sustituido con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄.

En otra realización, conjuntamente con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, B es piridinilo adicionalmente sustituido con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄.

25 En otra realización, conjuntamente con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, B es pirimidinilo adicionalmente sustituido con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄.

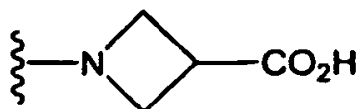
30 En otra realización, conjuntamente con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, A es fenilo adicionalmente sustituido con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄; y B es fenilo adicionalmente sustituido con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄.

En otra realización, conjuntamente con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, L es -N(R^a)C(=O)-.

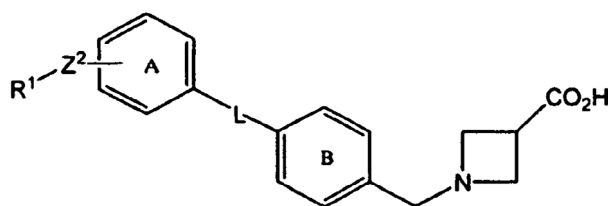
En otra realización, conjuntamente con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, L es -C≡C-.

35 En otra realización, conjuntamente con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, L es -CH₂CH₂-.

En otra realización, conjuntamente con cualquiera de las realizaciones anteriores o siguientes, -Y-X es



Otro aspecto de la invención se refiere a un compuesto que tiene la fórmula



40 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

A es fenilo o un heteroarilo de seis miembros que contiene 1 ó 2 átomos de N, estando sustituidos el fenilo y heteroarilo con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄;

B es fenilo o un heteroarilo de seis miembros que contiene 1 o 2 átomos de N, estando sustituidos el fenilo y heteroarilo con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄;

5 L es -N(R^a)C(=O)-;

n es 0, 1, 2 ó 3;

R^a es, independientemente en cada caso, H o alquilo C₁₋₆;

R¹ se selecciona de alquilo C₁₋₆, O-alquilo C₁₋₅, N(Ra)alquilo C₁₋₅, N(alquilo C₁₋₅)alquilo C₁₋₅, arilo o heteroarilo.

10 Z² se selecciona de O, NR³, S, S(=O), S(=O)₂, S(=O)₂NR³, (CR⁴R⁵)_n, C=O, C=S, C=N-R³, o un enlace directo, en el que

R³ se selecciona de hidrógeno, OH, SO₂, C=O, C=S, C=NH, alquilo C₁₋₆, O-alquilo C₁₋₅, S-alquilo C₁₋₅, haloalquilo C₁₋₆ y O-haloalquilo C₁₋₅, arilo o heteroarilo; o cuando Z² es un enlace directo, R³ es un anillo C₃C₆ que contiene opcionalmente un heteroátomo; y

15 R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, OH, ciano, alquilo C₁₋₆, O-alquilo C₁₋₅, S-alquilo C₁₋₅, haloalquilo C₁₋₆ y O-haloalquilo C₁₋₅, arilo y heteroarilo, o juntos forman C=O.

En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes, R¹ se selecciona de fenilo y heteroarilo; ambos de los cuales están sustituidos opcionalmente con halógeno.

En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes, R¹ es fenilo opcionalmente sustituido con halógeno.

20 En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes, R¹ es heteroarilo opcionalmente sustituido con halógeno.

En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes, R¹ es fenilo.

En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes, R¹ es heteroarilo.

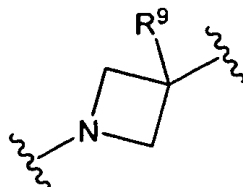
25 En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes, R¹ es anillo insaturado de 5 ó 6 miembros que incluye un átomo seleccionado de N, O y S, y 0, 1, 2 ó 3 átomos de N adicionales.

En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes, R¹ se selecciona de piridinilo, pirimidina, tiazolilo, oxazolilo, furanoilo y tiofenilo.

30 En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes, X es WC(O)OR^{6a}, WP(O)R^{6b}R^{6c}, WS(O)₂OH, WCONHSO₃H o 1H-tetrazol-5-ilo. W es un enlace directo, oxígeno o alquilo C₁₋₄ con sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, hidroxilo, ciano, amino, alquilamino, arilamino, heteroarilamino y alcoxilo C₁₋₄; y R^{6a} es hidrógeno o alquilo C₁₋₄; R^{6b} y R^{6c} se seleccionan independientemente de hidrógeno, hidroxilo, alquilo C₁₋₄ y alquilo C₁₋₄ sustituido con halógeno.

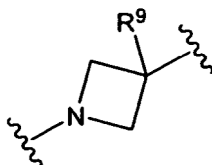
En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes, X es CO₂H.

35 En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes, Y es



en la que R⁹ se selecciona de hidrógeno, halógeno, hidroxilo, ciano, alquilo C₁₋₆, alquiltio C₁₋₅, alcoxilo C₁₋₅, alquilo C₁₋₆ sustituido con halógeno y alcoxilo C₁₋₅ sustituido con halógeno.

En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes, Y es



en el que R^9 se selecciona de hidrógeno, halógeno e hidroxilo.

En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes, R^9 es hidrógeno.

5 En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes, R^9 es hidroxilo.

En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes, Z^1 es CR^4R^5 ; en el que R^4 y R^5 son independientemente hidrógeno, halógeno, hidroxilo, ciano, alquilo C_{1-6} , alcoxilo C_{1-5} , alquiltio C_{1-5} , alquilo C_{1-6} sustituido con halógeno o alcoxilo C_{1-5} sustituido con halógeno.

10 En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes, Z^1 es CR^4R^5 ; en el que R^4 y R^5 son independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo C_{1-6} o alquilo C_{1-6} sustituido con halógeno.

En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes, Z^1 es CH_2 .

En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes,

Z^2 se selecciona de O, NR^3 , S, S(O), S(O)₂, S(O)₂NR³, $(CR^4R^5)_n$, C=O, C=S y C=N-R³;

15 R^3 es hidrógeno, hidroxilo, alquilo C_{1-6} , alcoxilo C_{1-5} , alquiltio C_{1-5} , alquilo C_{1-6} sustituido con halógeno o alcoxilo C_{1-5} sustituido con halógeno;

R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, hidroxilo, ciano, alquilo C_{1-6} , alcoxilo C_{1-5} , alquiltio C_{1-5} , alquilo C_{1-6} sustituido con halógeno y alcoxilo C_{1-5} sustituido con halógeno, o juntos forman "C=O"; y

n es 1, 2 ó 3.

En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes,

20 Z^2 se selecciona de O, NR^3 , S, S(O), S(O)₂, S(O)₂NR³, CR^4R^5 , C=O, C=S y C=N-R³;

R^3 es hidrógeno, hidroxilo, alquilo C_{1-6} , alcoxilo C_{1-5} , alquiltio C_{1-5} , alquilo C_{1-6} sustituido con halógeno o alcoxilo C_{1-5} sustituido con halógeno; y

R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, hidroxilo, ciano, alquilo C_{1-6} , alcoxilo C_{1-5} , alquiltio C_{1-5} , alquilo C_{1-6} sustituido con halógeno y alcoxilo C_{1-5} sustituido con halógeno.

25 En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes, Z^2 se selecciona de O, NR^3 , S, CR^4R^5 , C=O, C=S y C=N-R³;

R^3 es hidrógeno, hidroxilo, alquilo C_{1-6} , alcoxilo C_{1-5} , alquiltio C_{1-5} , alquilo C_{1-6} sustituido con halógeno, alcoxilo C_{1-5} sustituido con halógeno; y

30 R^4 y R^5 se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, hidroxilo, ciano, alquilo C_{1-6} , alcoxilo C_{1-5} , alquiltio C_{1-5} , alquilo C_{1-6} sustituido con halógeno y alcoxilo C_{1-5} sustituido con halógeno.

En otra realización de la invención, conjuntamente con las realizaciones anteriores y siguientes Z^2 se selecciona de O, S, CH_2 , C=O, C=S y C=N-OH.

35 La memoria descriptiva y las reivindicaciones contienen listas de especies que usan las expresiones "seleccionado de... y ..." y "es... o..." (denominadas a veces grupos de Markush). Cuando se usa estas expresiones en esta solicitud, a menos que se establezca otra cosa, pretende incluirse el grupo como un todo, o cualquier miembro individual del mismo, o cualquier subgrupo del mismo. El uso de estas expresiones es meramente para fines de abreviatura y no se pretende de ninguna manera limitar la eliminación de elementos individuales o subgrupos según sea necesario.

40 En un aspecto, la presente invención ilustra métodos para modular la actividad biológica mediada por receptor S1P-1. La presente invención también ilustra métodos para usar moduladores de S1P-1 (es decir, agonistas o antagonistas) en el tratamiento o la prevención de enfermedades tales como cáncer de ovario, cáncer peritoneal, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer uterino, cáncer de estómago, cáncer de intestino delgado, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de páncreas y cáncer de

próstata; enfermedades pulmonares agudas, síndrome de dificultad respiratoria del adulto ("SDRA"), exacerbación inflamatoria aguda de enfermedades pulmonares crónicas tales como asma, lesión de células epiteliales superficiales tal como congelación transcorneal o quemaduras cutáneas, y enfermedades cardiovasculares tales como isquemia en un sujeto que necesita tal tratamiento o prevención.

5 En otro aspecto, la invención ilustra métodos para usar moduladores de S1P-1 en el tratamiento o la prevención de trastornos tales como, pero sin limitarse a, vasoconstricción en arterias cerebrales, trastornos autoinmunitarios y relacionados con la inmunidad incluyendo lupus eritematoso sistémico, enfermedades inflamatorias del intestino tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, diabetes tipo I, uveítis, psoriasis, miastenia grave, artritis reumatoide, nefrosis no glomerular, hepatitis, enfermedad de Behçet, glomerulonefritis, púrpura trombocitopénica crónica, anemia hemolítica, hepatitis y granuloma de Wegner.

10 Todavía en otro aspecto, la invención ilustra métodos para usar moduladores de S1P-1 para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento o prevención una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador de S1P-1, por ejemplo, un agonista, que estimula el sistema inmunitario. En determinadas realizaciones, el sujeto se ve afectado por un agente infeccioso. En otras realizaciones, el sujeto está inmunocomprometido.

15 Todavía en otro aspecto, la presente invención ilustra un método de modulación de una actividad biológica mediada por el receptor S1P-1 en una célula. Una célula que expresa el receptor S1P-1 se pone en contacto con una cantidad de un modulador de receptor S1P-1 suficiente para modular la actividad biológica mediada por el receptor S1P-1.

20 Aún en otro aspecto, la presente invención ilustra un método para modular una actividad biológica mediada por el receptor S1P-1 en un sujeto. En un método de este tipo, se administra al sujeto una cantidad de un modulador del receptor S1P-1 eficaz para modular una actividad biológica mediada por el receptor S1P-1.

25 Aún en otro aspecto, la presente invención ilustra un método para tratar, prevenir o mejorar un estado mediado por el receptor S1P-1 en un sujeto. En un método de este tipo, se administra al sujeto una cantidad de un modulador del receptor S1P-1 eficaz para modular una actividad biológica mediada por el receptor S1P-1. El estado mediado por el receptor S1P-1 puede ser, por ejemplo, rechazo de trasplantes (trasplante de órganos sólidos y células de los islotes); rechazo de trasplantes (tejido); cáncer; enfermedades autoinmunitarias/inflamatorias; artritis reumatoide; lupus; diabetes insulínica (tipo I); diabetes no insulínica (tipo II); esclerosis múltiple; psoriasis; colitis ulcerosa; enfermedad inflamatoria del intestino; enfermedad de Crohn; leucemias linfocíticas agudas y crónicas y linfomas.

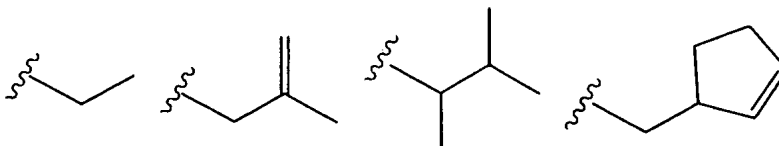
30 Las características y otros detalles de la invención se describirán ahora más particularmente. Se entenderá que las realizaciones particulares descritas en el presente documento se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Las características principales de esta invención pueden emplearse en diversas realizaciones sin apartarse del alcance de la invención. Tal como se reivindica, todas las partes y porcentajes son en peso a menos que se especifique otra cosa.

35 *Definiciones*

Por conveniencia, determinados términos usados en la memoria descriptiva y los ejemplos se recogen en esta sección.

"Tratar", incluye cualquier efecto, por ejemplo, disminución, reducción, modulación o eliminación, que dé como resultado la mejora del estado, enfermedad, trastorno, etc.

40 "Alquilo $C_{\alpha-\beta}$ " significa un grupo alquilo que comprende un mínimo α y un máximo de β átomos de carbono en una relación ramificada, cíclica o lineal o cualquier combinación de las tres, representando α y β números enteros. Los grupos alquilo descritos en esta sección también pueden contener uno o dos enlaces dobles o triples. Una designación de alquilo C_0 indica un enlace directo. Ejemplos de alquilo C_{1-6} incluyen, pero no se limitan a los siguientes:



45 "Halo" o "halógeno" significa un átomo de halógeno seleccionado de F, Cl, Br y I.

"Haloalquilo C_{v-w} " significa un grupo alquilo, tal como se describió anteriormente, en el que cualquier número (al menos uno) de los átomos de hidrógeno unidos a la cadena de alquilo se sustituyen por F, Cl, Br o I.

"Alquilo sustituidos" se refieren a restos alquilo que tienen sustituyentes que sustituyen a un hidrógeno en uno o más carbonos de la estructura principal hidrocarbonada. Tales sustituyentes pueden incluir alquilo, alqueno, alquino,

halógeno, hidroxilo, alquilcarboniloxilo, arilcarboniloxilo, alcoxicarboniloxilo, ariloxicarboniloxilo, carboxilato, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcoxilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino, acilamino, amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfino, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido o heterociclilo.

5 “Arilo” incluye grupos con aromaticidad, incluyendo grupos aromáticos no conjugados de 5 y 6 miembros (es decir, anillos simples) que pueden incluir desde cero hasta cuatro heteroátomos, así como sistemas conjugados (es decir, multicíclicos) que tienen al menos un anillo que es aromático. Ejemplos de grupos arilo incluyen benceno, fenilo, toliolo y similares. Los grupos arilo multicíclicos incluyen sistemas bicíclicos y tricíclicos, por ejemplo, naftaleno, benzoxazol, benzodioxazol, benzotiazol, benzoimidazol, benzotiofeno, metilendioxfenilo, quinolina, isoquinolina, naftidina, indol, benzofurano, purina, benzofurano, deazapurina, indolizina, tetralina y metilendioxfenilo.

10 Grupos arilo que tienen heteroátomos en la estructura de anillo también pueden denominarse “heterociclos de arilo”, “heterociclos”, “heteroarilos” o “heteroaromáticos”; por ejemplo, pirrol, furano, tiofeno, tiazol, isotiazol, imidazol, triazol, tetrazol, pirazol, oxazol, isooxazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina. El anillo aromático puede estar sustituido en una o más posiciones del anillo con, por ejemplo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, alquilcarboniloxilo, arilcarboniloxilo, alcoxicarboniloxilo, ariloxicarboniloxilo, carboxilato, alquilcarbonilo, alquilaminocarbonilo, aralquilaminocarbonilo, alquenilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, aralquilcarbonilo, alquenilcarbonilo, alcoxycarbonilo, aminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino, acilamino, amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfino, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo o un resto aromático o heteroaromático.

20 Un “alquilarilo” o un resto “aralquilo” es un alquilo sustituido con un grupo arilo (por ejemplo, fenilmetil(bencilo)).

A menos que se especifique el número de carbonos de otro modo, “alquilo inferior” incluye un grupo alquilo, tal como se definió anteriormente, pero que tiene desde uno hasta diez, más preferiblemente desde uno hasta seis, átomos de carbono en su estructura principal. El “alquenilo inferior” y “alquinilo inferior” tienen longitudes de cadena de, por ejemplo, 2-5 átomos de carbono.

25 “Acilo” incluye compuestos y restos que contienen el radical acilo ($\text{CH}_3\text{CO}-$) o un grupo carbonilo. “Acilo sustituido” incluye grupos acilo en los que se sustituyen uno o más de los átomos de hidrógeno por, por ejemplo, grupos alquilo, grupos alquinilo, halógenos, hidroxilo, alquilcarboniloxilo, arilcarboniloxilo, alcoxicarboniloxilo, ariloxicarboniloxilo, carboxilato, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcoxilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluyendo alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (incluyendo alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfino, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo, o un resto aromático o heteroaromático.

30 “Acilamino” incluye restos en los que un resto acilo está unido a un grupo amino. Por ejemplo, el término incluye grupos alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido. “Alquilamino” incluye restos en los que un resto alquilo está unido a un grupo amino; “dialquilamino”, “arilamino”, “diarilamino” y “alquilarilamino” se nombran de manera análoga. En algunas realizaciones, “amino” puede incluir grupos acilamino y/o alquilamino.

35 “Alcoxialquilo”, “alquilaminoalquilo” y “tioalcoxialquilo” incluyen grupo alquilo, tal como se describió anteriormente, que además incluyen átomos de oxígeno, nitrógeno o azufre que sustituyen a uno o más átomos de carbono de la estructura principal hidrocarbonada, por ejemplo, átomos de oxígeno, nitrógeno o azufre.

40 “Alcoxilo” incluye grupos alquilo, alquenilo y alquinilo unidos covalentemente a un átomo de oxígeno. Ejemplos de grupos alcoxilo incluyen grupos metoxilo, etoxilo, isopropiloxilo, propoxilo, butoxilo y pentoxilo. Ejemplos de grupos “alcoxilo sustituidos” incluyen grupos alcoxilo halogenados. Grupos alcoxilo sustituidos pueden incluir sustituyentes de alquenilo, alquinilo, halógeno, hidroxilo, alquilcarboniloxilo, arilcarboniloxilo, alcoxicarboniloxilo, ariloxicarboniloxilo, carboxilato, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcoxilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino, acilamino, amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfino, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido o heterociclilo. Ejemplos de grupos alcoxilo sustituidos con halógeno incluyen fluorometoxilo, difluorometoxilo, trifluorometoxilo, clorometoxilo, diclorometoxilo y triclorometoxilo.

45 El término “heterociclilo” o la expresión “grupo heterocíclico” incluyen estructuras de anillo cerradas, por ejemplo, anillos de 3 a 10, de 4 a 7 miembros que incluyen uno o más heteroátomos. Los grupos heterociclilo pueden estar saturados o insaturados e incluyen pirrolidina, oxolano, tiolano, piperidina, piperazina, morfina, lactonas, lactamas tales como azetidinas y pirrolidinas, sultamas, sultonas y similares.

50 Los anillos heterocíclicos pueden estar sustituidos en una o más posiciones con sustituyentes tales como los descritos anteriormente, como por ejemplo, halógeno, hidroxilo, alquilcarboniloxilo, arilcarboniloxilo, alcoxicarboniloxilo, ariloxicarboniloxilo, carboxilato, alquilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcoxilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino, acilamino, amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, o un resto aromático o heteroaromático.

El término “tiocarbonilo” o “tiocarboxilo” incluye compuestos y restos que contienen un carbono conectado con un doble enlace a un átomo de azufre.

El término “éter” incluye compuestos o restos que contienen un oxígeno unido a dos átomos de carbono o heteroátomos diferentes. Por ejemplo, el término incluye “alcoialquilo” que se refiere a un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo unido covalentemente a un átomo de oxígeno que está unido covalentemente a otro grupo alquilo.

El término “éster” incluye compuestos y restos que contienen un carbono o un heteroátomo unido a un átomo de oxígeno que está unido al carbono de un grupo carbonilo. El término “éster” incluye grupos alcocicarboxilo tales como metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, propoxicarbonilo, butoxicarbonilo, pentoxicarbonilo, etc. Los grupos alquilo, alquenilo o alquinilo son tal como se definieron anteriormente.

El término “tioéter” incluye compuestos y restos que contienen un átomo de azufre unido a dos carbonos o heteroátomos diferentes. Ejemplos de tioéteres incluyen, pero no se limitan a alquiltioalquilos, alquiltioalquenilos y alquiltioalquinilos. El término “alquiltioalquilos” incluye compuestos con un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo unido a un átomo de azufre que se une a un grupo alquilo. De manera similar, el término “alquiltioalquenilos” y “alquiltioalquinilos” se refieren a compuestos o restos en los que un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está unido a un átomo de azufre que se une covalentemente a un grupo alquinilo.

El término “hidroxi” o “hidroxilo” incluye grupos con un -OH o -O⁻.

El término “halógeno” incluye flúor, bromo, cloro, yodo, etc. El término “perhalogenado” generalmente se refiere a un resto en el que se sustituyen todos los hidrógenos por átomos de halógeno.

“Heteroátomo” incluye átomos de cualquier elemento distinto de carbono o hidrógeno. Ejemplos de heteroátomos incluyen nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo.

“Sistema de anillo bicíclico al menos parcialmente aromático”, significa un sistema de anillo bicíclico en el que cualquiera o ambos de los anillos que forman el biciclo son aromáticos.

Se observará que la estructura de algunos de los compuestos de la invención incluye átomos de carbono asimétricos. Por consiguiente, ha de entenderse que los isómeros que surgen de tal asimetría (por ejemplo, todos los enantiómeros y diasterómeros) se incluyen dentro del alcance de la invención, a menos que se indique lo contrario. Tales isómeros pueden obtenerse en forma sustancialmente pura mediante técnicas de separación clásicas y mediante síntesis controlada de manera estereoquímica. Además, las estructuras y otros compuestos y restos tratados en esta solicitud también incluyen todos los tautómeros de los mismos. Los alquenos pueden incluir o bien la geometría E o bien la Z, cuando sea apropiado.

“Terapia de combinación” (o “terapia conjunta”) incluye la administración de un modulador del receptor de S1P de la invención y al menos un segundo agente como parte de un régimen de tratamiento específico destinado a proporcionar el efecto beneficioso de la acción conjunta de estos agentes terapéuticos. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero no se limita a, la acción conjunta farmacocinética o farmacodinámica que resulta de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación normalmente se lleva a cabo a lo largo de un periodo de tiempo definido (habitualmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada). La “terapia de combinación” puede pretender abarcar, aunque generalmente no, la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de regímenes de monoterapia separados que casual y arbitrariamente dan como resultado las combinaciones de la presente invención. Se pretende que la “terapia de combinación” abarque la administración de estos agentes terapéuticos de una manera secuencial, es decir, en la que se administra cada agente terapéutico en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de una manera sustancialmente simultánea. La administración sustancialmente simultánea puede lograrse, por ejemplo, administrando al sujeto una cápsula sencilla que tiene una razón fija de cada agente terapéutico o en cápsulas sencillas, múltiples para cada uno de los agentes terapéuticos. La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico puede efectuarse por cualquier vía apropiada incluyendo, pero sin limitarse a, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares y absorción directa a través de tejidos de membrana mucosa. Los agentes terapéuticos pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes. Por ejemplo, un primer agente terapéutico de la combinación seleccionada puede administrarse por inyección intravenosa mientras que los otros agentes terapéuticos de la combinación pueden administrarse por vía oral. Alternativamente, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos pueden administrarse por vía oral o todos los agentes terapéuticos pueden administrarse por inyección intravenosa. La secuencia en la que se administran los agentes terapéuticos no es limitadamente crítica. La “terapia de combinación” también puede abarcar la administración de los agentes terapéuticos tal como se describieron anteriormente en combinación adicional con otros principios biológicamente activos y terapias no farmacológicas (por ejemplo, cirugía o tratamiento por radiación). Cuando la terapia de combinación comprende además un tratamiento no farmacológico, el tratamiento no farmacológico puede llevarse a cabo en cualquier momento adecuado siempre que se logre un efecto beneficioso de la acción conjunta de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento no farmacológico. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso todavía se logra cuando el tratamiento no farmacológico se elimina temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, quizás por días o incluso semanas.

Un "grupo aniónico," tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que está cargado negativamente a pH fisiológico. Grupos aniónicos preferidos incluyen carboxilato, sulfato, sulfonato, sulfinato, sulfamato, tetrazolilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, o fosforotioato o equivalentes funcionales de los mismos. "Equivalentes funcionales" de grupos aniónicos pretenden incluir bioisómeros, por ejemplo, bioisómeros de un grupo carboxilato. Los bioisómeros abarcan tanto equivalentes bioisotéricos clásicos como equivalente bioisotéricos no clásicos. Los bioisómeros clásicos y no clásicos se conocen en la técnica clásica (véase, por ejemplo, Silverman, R. B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Academic Press, Inc.: San Diego, Calif., 1992, págs. 19-23). Un grupo aniónico particularmente preferidos es un carboxilato.

La expresión "grupo heterocíclico" pretende incluir estructuras de anillo cerradas en las que uno o más de los átomos en el anillo es un elemento distinto del carbono, por ejemplo, nitrógeno, u oxígeno o azufre. Los grupos heterocíclicos pueden estar saturados o insaturados y los grupo heterocíclicos tales como pirrol y furano pueden tener carácter aromático. Incluyen estructuras de anillos condensados tales como quinolina e isoquinolina. Otros ejemplos de grupos heterocíclicos incluyen piridina y purina. Los grupo heterocíclicos también pueden estar sustituidos en uno o más átomos constituyentes con, por ejemplo, un halógeno, un alquilo inferior, un alqueno inferior, un alcoilo inferior, un alquilitio inferior, a alquilamino inferior, un alquilcarboxilo inferior, un nitro, un hidroxilo, -CF₃, -CN, o similares.

Un "agente que modula S1P" incluye compuestos o composiciones que pueden inducir un cambio detectable en la actividad del receptor de S1P *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, al menos un 10% de aumento o disminución en la actividad de S1P tal como se mide mediante un ensayo dado tal como el bioensayo descrito a continuación en el presente documento.

La "CE₅₀ de un agente" incluía la concentración de un agente a la que una actividad dada, incluyendo la unión de esfingosina u otro ligando de un receptor de S1P y/o una actividad funcional de un receptor de S1P (por ejemplo, una actividad de señalización), es el 50% de la máxima para ese receptor de S1P. Dicho de manera diferente, la CE₅₀ es la concentración del agente que proporciona una activación del 50%, cuando se establece una activación del 100% a la cantidad de actividad del receptor de S1P que no aumenta con la adición de más ligando/agonista y se establece una activación del 0% a la cantidad de actividad en el ensayo en ausencia de ligando/agonista añadido.

"Purificado" y términos similares se refieren al aislamiento de una molécula o un compuesto en una forma que está sustancialmente libre de contaminantes normalmente asociados con la molécula o el compuesto en un entorno nativo o natural.

Una "cantidad eficaz" incluye una cantidad suficiente para producir un efecto seleccionado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un antagonista de receptor de S1P es una cantidad que disminuye la actividad de señalización celular del receptor de S1P.

"Inmunomodulación" incluye efectos sobre el funcionamiento del sistema inmunitario, e incluye tanto la potenciación de una respuesta inmunitaria así como la supresión de la respuesta inmunitaria.

Los compuestos de la invención y el otro agente farmacológicamente activo pueden administrarse a un paciente de manera simultánea, secuencial o en combinación. Se apreciará que cuando se usa una combinación de la invención, el compuesto de la invención y el otro agente farmacológicamente activo pueden estar en el mismo portador farmacéuticamente aceptable y, por tanto, administrarse simultáneamente. Pueden estar en portadores farmacéuticos separados tales como formas farmacéuticas orales convencionales que se toman simultáneamente. El término "combinación" se refiere además al caso en el que se proporcionan los compuestos en formas farmacéuticas separadas y se administran secuencialmente.

Los compuestos de la invención pueden administrarse a pacientes (animales y seres humanos) que necesitan tal tratamiento en dosificaciones que proporcionarán una óptima eficacia farmacéutica. Se apreciará que la dosis requerida para su uso en cualquier aplicación particular variará de paciente a paciente, no sólo con el compuesto particular o la composición seleccionada, sino también con la vía de administración, la naturaleza del estado que está tratándose, la edad y el estado del paciente, la medicación simultánea o dietas especiales que está siguiendo entonces el paciente, y otros factores que los expertos en la técnica reconocerán, estando en última instancia la dosificación apropiada a la discreción del médico encargado.

Un nivel de dosificación apropiado generalmente será de aproximadamente 0,001 a 50 mg por kg de peso corporal del paciente al día, que puede administrarse en dosis individuales o múltiples. Preferiblemente, el nivel de dosificación será de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 25 mg/kg al día; más preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 10 mg/kg al día. Por ejemplo, en el tratamiento o la prevención de un trastorno del sistema nervioso central, un nivel de dosificación adecuado es de aproximadamente 0,001 a 10 mg/kg al día, preferiblemente de aproximadamente 0,005 a 5 mg/kg al día, y especialmente de aproximadamente 0,01 a 1 mg/kg al día. Los compuestos pueden administrarse en un régimen de 1 a 4 veces al día, preferiblemente una a dos veces al día.

Se apreciará que la cantidad del compuesto de la invención requerida para su uso en cualquier tratamiento variará no sólo con los compuestos particulares o la composición seleccionada sino también con la vía de

administración, la naturaleza del estado que está tratándose, y la edad y el estado del paciente, y en última instancia estará a la discreción del médico encargado.

Las composiciones y las terapias de combinación de la invención pueden administrarse en combinación con una variedad de excipientes farmacéuticos, incluyendo agentes estabilizantes, portadores y/o formulaciones de encapsulación tal como se describen en el presente documento.

Las composiciones acuosas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de los compuestos de la invención, disueltos o dispersados en un medio acuoso o portador farmacéuticamente aceptable.

“Farmacéutica o farmacológicamente aceptable” incluye entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra perjudicial cuando se administra a un animal, o un ser humano, según sea apropiado. “Portador farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para principios activos farmacéuticos se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. En las composiciones también pueden incorporarse principios activos complementarios.

Para su administración a seres humanos, las preparaciones deben cumplir normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según requiere la oficina de normas biológicas de la FDA.

Las composiciones y las terapias de combinación de la invención se formularán generalmente entonces para administración parenteral, por ejemplo, se formularán para inyección mediante las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea, intralesión o incluso intraperitoneal. Los expertos en la técnica conocerán la preparación de una composición acuosa que contiene una composición de la invención o un componente o principio activo a la luz de la presente descripción. Normalmente, tales composiciones pueden prepararse como inyectables, como o bien suspensiones o bien disoluciones líquidas; pueden prepararse también formas sólidas adecuadas para usarlas para preparar disoluciones o suspensiones tras la adición de un líquido antes de la inyección; y las preparaciones también pueden emulsionarse.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuate o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o disoluciones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado de que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Pueden prepararse disoluciones de compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua mezcladas de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las composiciones terapéuticas o farmacológicas de la presente invención generalmente comprenderán una cantidad eficaz del/de los componente(s) de la terapia de combinación, disuelto(s) o dispersado(s) en un medio farmacéuticamente aceptable. Medios o portadores farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para principios activos farmacéuticos se conoce bien en la técnica. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones terapéuticas de la presente invención.

Los expertos en la técnica conocerán la preparación de composiciones farmacéuticas o farmacológicas a la luz de la presente descripción. Normalmente, tales composiciones pueden prepararse como inyectables, como o bien suspensiones o bien disoluciones líquidas; formas sólidas adecuadas para su disolución en o suspensión en líquido antes de la inyección; como comprimidos u otros sólidos para administración oral; como cápsulas de liberación en el tiempo; o en cualquier otra forma usada en la actualidad, incluyendo cremas, lociones, colutorios, inhalantes y similares.

Se preparan disoluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado a vacío y secado por congelación que producen un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo.

También se contempla la preparación de disoluciones más concentradas, o sumamente concentradas, para inyección intramuscular. En este sentido, se prefiere el uso de DMSO como disolvente ya que esto dará como resultado una penetración extremadamente rápida, administrando altas concentraciones del/de los compuesto(s) o agente(s) activo(s) a una pequeña zona.

5 También puede ser particularmente útil el uso de formulaciones estériles, tales como lavados a base de solución salina, por cirujanos, médicos o profesionales sanitarios para limpiar una zona particular en el campo de operación. También pueden reconstituirse formulaciones terapéuticas según la presente invención en forma de colutorios, o conjuntamente con reactivos antifúngicos. También se prevén formas inhalantes. Las formulaciones terapéuticas de la invención también pueden prepararse en formas adecuadas para administración tópica, tal como en cremas y lociones.

10 Conservantes adecuados para su uso en una disolución de este tipo incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, clorobutanol, timerosal y similares. Tampones adecuados incluyen ácido bórico, bicarbonato de sodio y potasio, boratos de sodio y potasio, carbonato de sodio y potasio, acetato de sodio, bifosfato de sodio y similares, en cantidades suficientes para mantener el pH a entre aproximadamente pH 6 y pH 8, y, preferiblemente, entre aproximadamente pH 7 y pH 7,5. Agentes de tonicidad adecuados son dextrano 40, dextrano 70, dextrosa, glicerina, cloruro de potasio, propilenglicol, cloruro de sodio y similares, de manera que el equivalente de cloruro de sodio de la disolución oftálmica está en el intervalo de 0,9 más o menos el 0,2%. Antioxidantes y estabilizantes adecuados incluyen bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, tiosulfito de sodio, tiourea y similares. Agentes humectantes y clarificantes adecuados incluyen polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero 282 y tiloxapol. Agentes que aumentan la viscosidad adecuados incluyen dextrano 40, dextrano 70, gelatina, glicerina, hidroxietilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosa, lanolina, metilcelulosa, vaselina, polietilenglicol, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa y similares.

15 Tras la formulación, los agentes terapéuticos se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad tal que sea farmacológicamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármacos y similares.

20 En este contexto, la cantidad de principio activo y el volumen de la composición que va administrarse dependen del animal huésped que va a tratarse. Las cantidades precisas del compuesto activo requeridas para la administración dependen del criterio del médico y son peculiares para cada individuo.

25 Normalmente, se utiliza un volumen mínimo de una composición requerida para dispersar los compuestos activos. Los regímenes adecuados para su administración también son variables, pero se tipificarían administrando inicialmente el compuesto y monitorizando los resultados y luego dando dosis controladas adicionales a intervalos adicionales. Por ejemplo, para la administración parenteral, se prepararía una disolución acuosa adecuadamente tamponada y, si es necesario, isotónica, y se usaría para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea o incluso intraperitoneal. Una dosificación podría disolverse en 1 ml de disolución de NaCl isotónica y o bien añadirse a 30 1000 ml de líquido de hipodermólisis o bien inyectarse en el sitio de infusión propuesto, (véase por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580).

35 En determinadas realizaciones, pueden administrarse compuestos activos por vía oral. Esto se contempla para agentes que generalmente son resistentes o se han hecho resistentes a la proteólisis por enzimas digestivas. Se contempla que tales compuestos incluyan agentes químicamente diseñados o modificados; péptidos dextrorrotatorios; y formulaciones de péptidos y liposomas en cápsulas de liberación en el tiempo para evitar la degradación por peptidasas y lipasas.

40 El portador también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como 45 lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ocasionarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ocasionarse mediante el uso en las composiciones de agentes retardadores de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

50 Se preparan disoluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes 55 requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado a vacío y secado por congelación que producen un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo.

También se contempla la preparación de disoluciones más concentradas, o sumamente concentradas, para inyección directa, en la que se prevé que el uso de DMSO como disolvente dé como resultado una penetración extremadamente rápida, administrando altas concentraciones de los agentes activos a una zona pequeña.

5 Tras la formulación, se administrarán las disoluciones de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármacos y similares.

10 Para administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y en primer lugar el diluyente líquido debe hacerse isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, los expertos en la técnica conocerán medios acuosos estériles que pueden emplearse a la luz de la presente descripción.

15 Además de los compuestos formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones de liposomas; cápsulas de liberación en el tiempo; y cualquier otra forma usada en la actualidad, incluyendo cremas.

20 Formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de de administración incluyen supositorios. Para los supositorios, los portadores y aglutinantes tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo del 0,5% al 10%, preferiblemente del 1%-2%.

Formulaciones orales incluyen excipientes normalmente empleados tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos.

25 En determinadas realizaciones definidas, las composiciones farmacéuticas orales comprenderán un diluyente inerte o portador comestible asimilable, o pueden estar incluidas en cápsulas de gelatina de vaina dura o blanda, o pueden comprimirse para dar comprimidos, o pueden incorporarse directamente con los alimentos de la dieta. Para administración terapéutica oral, los compuestos activos pueden incorporarse a excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. 30 Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos un 0,1% del compuesto activo. Por supuesto, el porcentaje de las composiciones y preparaciones puede variarse, y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 75% del peso de la unidad, o preferiblemente entre el 25-60%. La cantidad de compuestos activos en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada.

35 Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: un aglutinante, como goma tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz, o gelatina; excipientes, tales como fosfato de dicalcio; un agente disgregante, tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico y similares; un lubricante, tal como estearato de magnesio; y puede añadirse un agente edulcorante, tal como sacarosa, lactosa o sacarina o un agente aromatizante, tal como menta, esencia de gaulteria, o aroma de cereza. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido. Pueden estar presentes 40 otros diversos materiales como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, pueden recubrirse comprimidos, píldoras o cápsulas con laca, azúcar o ambos. Un jarabe de elixir puede contener los compuestos activos, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y aromatizante, tal como aroma de cereza o naranja.

45 Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden usarse en forma de una preparación farmacéutica, por ejemplo, en forma sólida, semisólida o líquida, que contiene uno o más del compuesto de la invención, como principio activo, en mezcla con un portador o excipiente orgánico o inorgánico adecuado para aplicaciones externas, entéricas o parenterales. El principio activo puede estar combinado, por ejemplo, con los portadores farmacéuticamente aceptables, no tóxicos habituales para comprimidos, grageas, cápsulas, supositorios, disoluciones, emulsiones, suspensiones, y cualquier otra forma adecuada para su uso. Los portadores que pueden usarse son agua, glucosa, 50 lactosa, goma arábiga, gelatina, manitol, pasta de almidón, trisilicato de magnesio, talco, almidón de maíz, queratina, sílice coloidal, almidón de patata, urea y otros portadores adecuados para su uso en la fabricación de preparaciones, en forma sólida, semisólida o líquida, y además pueden usarse agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes y colorantes y perfumes. El compuesto objeto activo está incluido en la composición farmacéutica en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado sobre el proceso o el estado de la enfermedad.

55 Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, se mezcla el principio activo principal con un portador farmacéutico, por ejemplo, componentes de preparación de comprimidos convencionales tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio o gomas, y otros

diluyentes farmacéuticos, por ejemplo, agua, para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica del mismo. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, se pretende que el principio activo esté dispersado uniformemente por toda la composición de modo que la composición pueda subdividirse fácilmente en formas farmacéuticas unitarias igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Entonces esta composición de preformulación sólida se subdivide en formas farmacéuticas unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen desde 0,1 hasta aproximadamente 500 mg del principio activo de la invención. Los comprimidos o las píldoras de la composición novedosa pueden recubrirse o combinarse de otro modo para proporcionar una forma farmacéutica que proporcione la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o la píldora pueden comprender un componente de dosificación interno y un componente de dosificación externo, estando este último en forma de una envuelta sobre el primero. Los dos componentes pueden separarse mediante una capa entérica que sirve para resistir la disgregación en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o que se retarde su liberación. Pueden usarse una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, incluyendo tales materiales varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formas líquidas en las que pueden incorporarse las composiciones de la invención para administración por vía oral o mediante inyección incluyen disolución acuosa, jarabes aromatizados adecuadamente, suspensiones acuosas u oleosas, y emulsiones con aceites aceptables tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, o con un agente solubilizante o emulsionante para uso intravenoso, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares. Agentes de dispersión o suspensión adecuados para suspensiones acuosas incluyen gomas naturales y sintéticas tales como tragacanto, goma arábiga, alginato, dextrano, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, polivinilpirrolidona o gelatina.

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen disoluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos, farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados tal como se expuso anteriormente. Preferiblemente, las composiciones se administran por la vía oral o vía respiratoria nasal o para lograr un efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables preferiblemente estériles pueden nebulizarse mediante el uso de gases inertes. Las disoluciones nebulizadas pueden respirarse directamente desde el dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede estar unido a una máscara facial, tienda o máquina de respiración de presión positiva intermitente. Pueden administrarse composiciones en disolución, suspensión o polvo preferiblemente por vía oral o por vía nasal, desde los dispositivos que administran la formulación de una manera apropiada.

Para tratar enfermedades y estados clínicos indicados anteriormente, el compuesto de esta invención puede administrarse por vía oral, por vía tópica, por vía parenteral, mediante aerosol de inhalación o por vía rectal en formulaciones farmacéuticas unitarias que contienen portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales. El término parenteral tal como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, técnicas de infusión o inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal.

Los compuestos de la presente invención son agonistas (o antagonistas) de alta afinidad en diversos receptores de S1P. También se espera que los compuestos de la invención provoquen linfopenia cuando se introducen en roedores, primates no humanos o seres humanos. Por tanto, los compuestos de la invención pueden usarse como inmunomoduladores, y son útiles en el tratamiento o la prevención de patologías mediadas por acciones de linfocitos, incluyendo rechazo agudo o crónico de injertos de tejido tales como trasplantes de órganos, y enfermedades autoinmunitarias. Las enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse con los compuestos de la invención incluyen: lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, enfermedad de Behçet, glomerulonefritis, artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias del intestino tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, diabetes tipo I, uveítis, psoriasis, miastenia grave, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, hepatitis y granuloma de Wegner.

Los compuestos de la invención son útiles también en el tratamiento de trastornos inflamatorios, incluyendo asma atópica, lesión glomerular inflamatoria y lesión por isquemia-reperusión.

Lisofosfolípidos, S1P y ácido lisofosfatídico (LPA), estimulan la proliferación celular y afectan a numerosas funciones celulares mediante señalización a través de receptores codificados por genes de diferenciación endotelial acoplados a proteínas G (S1P). Por consiguiente, se anticipa que los moduladores del receptor de S1P de la invención tienen utilidad en la inmunomodulación, por ejemplo, en la terapia antiangiogénesis, tal como en el tratamiento de enfermedades neoplásicas.

En una realización de la invención, se administra una composición farmacéutica que comprende uno o más de los agonistas del receptor de S1P de la presente invención a una especie de mamífero, incluyendo seres humanos, para potenciar la reparación de heridas, mejorar la función neuronal o potenciar una respuesta inmunitaria de esa especie. También se ha notificado que S1P inhibe la fibrosis en diversos órganos. Por consiguiente, los agonistas del receptor de S1P de la invención pueden usarse para prevenir/tratar enfermedades asociadas con la fibrosis de órganos, tales como

fibrosis pulmonar, neumonía intersticial, hepatitis crónica, cirrosis hepática, insuficiencia renal crónica o esclerosis glomerular renal. En una realización, se usa una composición que comprende un agonista del receptor de S1P de la presente invención para tratar heridas, incluyendo quemaduras, cortes, laceraciones, incisiones quirúrgicas, escaras de decúbito y úlceras de cicatrización lenta tales como las observadas en diabéticos.

5 Además, se cree que los compuestos que modulan S1P de la invención movilizan linfocitos y aumentan su asentamiento en tejidos linfáticos secundarios. Por tanto, pueden usarse los presentes compuestos para dirigir los linfocitos lejos de los órganos trasplantados, por ejemplo, aloinjertos, o células sanas, por ejemplo, islotes pancreáticos como en la diabetes tipo I, vaina de mielina (esclerosis múltiple), u otros tejidos que pueden verse sometidos a una respuesta inmunitaria no deseada, y por tanto disminuir el daño a tales tejidos por parte del sistema inmunitario.

10 En otra realización, se administran los compuestos que modulan el receptor de S1P de la invención a un sujeto para tratar o prevenir un trastorno de diferenciación y crecimiento celular anómalo. Estos trastornos incluyen enfermedad de Alzheimer, formación de cuerpos lúteos aberrantes, osteoporosis, anovulación, enfermedad de Parkinson, y cáncer. En una realización, se administra un antagonista de S1P a un paciente para tratar una enfermedad asociada con crecimiento anómalo.

15 En una realización, los compuestos de la invención se usan como inmunomoduladores para alterar las actividades del sistema inmunitario y prevenir el daño al tejido sano que de lo contrario se produciría en enfermedades autoinmunitarias y en trasplante de órganos. En particular, los compuestos pueden administrarse a pacientes como parte del tratamiento asociado con trasplante de órganos, incluyendo trasplantes de páncreas, islotes pancreáticos, riñón, corazón y pulmón. Los moduladores de S1P pueden administrarse solos o en combinación con inmunosupresores conocidos tales como ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, azatioprina, ciclofosfamida, metotrexato y corticosteroides
20 tales como cortisona, des-oximetasona, betametasona, desametasona, flunisolida, prednisolona, prednisona, amcinomida, desonida, metilprednisolona, triamcinolona y alclometasona.

S1P también actúa como factor de supervivencia en muchos tipos de células. En particular, se anticipa que compuestos de la invención que tienen actividad antagonista de S1P son útiles en la protección de células y tejidos
25 frente a condiciones de hipoxia. Según una realización, los compuestos de la invención se administran a un paciente que se considera que necesita o que realmente necesita el tratamiento, para tratar células y tejidos expuestos a condiciones de hipoxia, incluyendo lesión sostenida como resultado de isquemia. Según una realización, los compuestos de la invención que muestran actividad antagonista del receptor de S1P pueden usarse para tratar una lesión del tipo isquemia-reperusión. La interferencia con el suministro de sangre oxigenada a los tejidos se define como isquemia. Se sabe que los efectos de la isquemia son progresivos, de modo que con el tiempo la vitalidad celular
30 continua deteriorándose y los tejidos se vuelven necróticos. La isquemia persistente total, con perfusión de oxígeno limitada de los tejidos, da como resultado muerte celular y finalmente necrosis inducida por coagulación, a pesar de la reperusión con sangre arterial. Las pruebas indican que una proporción significativa de la lesión asociada con la isquemia es una consecuencia de los acontecimientos asociados con la reperusión de tejidos isquémicos, de ahí el término lesión por reperusión.
35

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención pueden administrarse a un individuo que las necesita mediante cualquiera de varias vías, incluyendo medios tópicos, orales, intravenosos, intramusculares, intraarteriales, intramedulares, intratecales, intraventriculares, transdérmicos, subcutáneos, intraperitoneales, intranasales, entéricos, tópicos, sublinguales o rectales. La vía oral normalmente se emplea para la mayoría de estados que requieren los compuestos de la invención. Se da preferencia a la inyección o infusión intravenosa para los tratamientos agudos. Para los regímenes de mantenimiento se prefieren la vía oral o parenteral, por ejemplo, intramuscular o subcutánea. Según una realización se proporciona una composición que comprende un compuesto de la invención y albúmina, por ejemplo, un compuesto de la presente invención, un portador farmacéuticamente aceptable y el 0,1-1,0% de albúmina. La albúmina funciona como tampón y mejora la solubilidad de los compuestos.
40
45

La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases llenos de uno o más de los componentes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Según una realización, se proporciona un kit para tratar a un paciente que necesita inmunomodulación, que incluye instrucciones para el uso del kit. En esta realización, el kit comprende uno o más de los moduladores de S1P de la invención, y también puede incluir uno o más inmunosupresores conocidos. Estos compuestos farmacéuticos pueden envasarse en una variedad de envases, por ejemplo, viales, tubos, placas con pocillos de microtitulación, botellas y similares. Pueden incluirse otros reactivos en envases separados y proporcionarse con el kit; por ejemplo, muestras de control positivo, muestras de control negativo, tampones, medios de cultivo celular, etc. Preferiblemente, los kits también incluirán las instrucciones para su uso.
50

La actividad de los compuestos de la invención puede determinarse usando un ensayo para detectar la actividad del receptor de S1P (tal como el ensayo de unión a [γ -³⁵S]GTP) y sometiendo a ensayo para detectar la actividad en presencia de S1P y el compuesto de prueba. Más particularmente, en el método descrito por Traynor *et al.*, 1995, Mol. Pharmacol. 47: 848-854, incorporado al presente documento como referencia, el acoplamiento de proteínas G a las membranas puede evaluarse midiendo la unión de GTP marcado.
55

Por ejemplo, pueden incubarse muestras que comprenden membranas aisladas de células que expresan un polipéptido S1P en un tampón que promueve la unión del polipéptido al ligando (es decir S1P), en presencia de GTP radiomarcado y GDP no marcado (por ejemplo, en HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM y MgCl₂ 10 mM, ³⁵S-GTP, S 80 pM y GDP 3 μM), con y sin un modulador candidato. La mezcla de ensayo se incubaba durante un periodo de tiempo adecuado para permitir la unión a y la activación del receptor (por ejemplo, 60 minutos a 30°C), tras lo cual se elimina el GTP marcado no unido (por ejemplo, mediante filtración en filtros GF/B). El GTP marcado, unido puede medirse mediante recuento por centelleo líquido. Una disminución del 10% o más en la unión de GTP marcado tal como se mide mediante recuento por centelleo en una muestra que contiene un modulador candidato, en relación con una muestra sin el modulador, indica que el modulador candidato es un inhibidor de la actividad del receptor de S1P.

Puede realizarse un ensayo de unión de GTP similar sin la presencia del ligando (S1P) para identificar agentes que actúan como agonistas. En este caso, se usa la unión de GTP estimulada por ligando como patrón. Un agente se considera un agonista si induce al menos el 50% del nivel de unión de GTP inducido por S1P cuando el agente está presente a 10 μM o menos, y preferiblemente inducirá un nivel que es el mismo o superior al inducido por el ligando.

La actividad GTPasa puede medirse incubando extractos de membranas celulares que contienen un receptor de S1P con ³²P-GTP. La GTPasa activa liberará el marcador como fosfato inorgánico, que puede detectarse mediante separación de fosfato inorgánico libre en una suspensión al 5% de carbón activado en H₃PO₄ 20 mM, seguido de recuento por centelleo. Los controles incluirían ensayos usando extractos de membranas aislados de células que no expresan un receptor de S1P (por ejemplo, células transfectadas de manera simulada), con el fin de excluir posibles efectos no específicos en el modulador candidato. Con el fin de someter a ensayo para detectar el efecto de un modulador candidato sobre la actividad GTPasa regulada por S1P, pueden incubarse muestras de membranas celulares con el ligando (S1P), con y sin el modulador, y puede realizarse un ensayo de GTPasa tal como se describió anteriormente. Un cambio (aumento o disminución) del 10% o más en el nivel de unión de GTP o la actividad GTPasa en relación con muestras sin modulador es indicativo de modulación de S1P por un modulador candidato.

Protocolo de flujo de Ca²⁺ del receptor de S1P (hS1P1, hS1P3, rS1P1, rS1P3 y célula original)

1. Material

- a. Tampón FLIPR: 1x HBSS; HEPES 10 mM
- b. Medios de crecimiento celular:
 - i. S1P1 y S1P3 de ser humano y de rata: medio F12 de Ham; FBS al 10% (calificado); 1x pen./estrep./glu.; higromicina 300 ug/ml; geneticina 400 ug/ml
 - ii. Célula original: S1P1 y S1P3 de ser humano y de rata: medio F12 de Ham; FBS al 10% (calificado); 1x pen./estrep./glu.; higromicina 300 ug/ml;
- c. Medios de siembra celular; medio F12 de Ham; FBS al 10% (tratado con carbón activo/dextrano); 1x pen./estrep./glu.;
- d. Tampón de disociación celular: Versene de Invitrogen
- e. Tampón de disolución del agonista (S1P): BSA libre de ácidos grasos al 0,4% (p/v) (Sigma n.º A8806) en tampón FLIPR
- f. Colorante FLIPR: el kit de ensayo para calcio BD PBX; n.º de cat. 641077 está compuesto por indicador de calcio (n.º de cat. 850000) y potenciador de la señal de PBX 100x (n.º de cat. 850001). El potenciador de la señal de PBX 100x se diluye en tampón FLIPR 1:100 y entonces se añade el indicador de calcio a una razón de 1:1000.
- g. Placas de células (96 pocillos): Greiner n.º de cat. 655090
- h. Placas de compuesto (96-pocillos): Costar n.º 3365
- i. Preparación de la disolución madre de S1P: se adquirió S1P de CalBioChem (n.º de catálogo 970471 ; vial de 1 mg; preparación personalizada usando metanol, y secado con gas de nitrógeno dentro del vial de vidrio; almacenamiento a -20°C). Disolver 1 vial de S1P en 26,4 ml de agonista disolviendo tampón en un tubo de centrifuga de 50 ml; quitar la etiqueta de la botella de S1P, abrir y verter toda la botella en el tubo. Sonicar a 37° durante ½ hora. Resultará una disolución transparente de 100 μM. Esta disolución madre se distribuye en alícuotas y se almacena a -80°C.

2. Mantenimiento de la línea celular

- a. Se añadieron etiquetas de V5 al extremo N-terminal de hS1P1, hS1P3, rS1P1 y rS1P3. Los cuatros genes se transfectaron en células CHO K1 que expresan de manera estable Gqi5.

- b. hS1P1 y hS1P3 se establecieron como clones estables y rS1P1 y rS1P3 se clasificaron mediante etiqueta anti-V5 y se establecieron como grupos estables tras la clasificación.
- c. Se usó la línea celular original CHO/K1 Gqi5 como control.
- d. Todas las células se mantienen en medios de crecimiento celular y se dividen dos veces por semana usando Versene.
- e. Todas las líneas celulares se usan en el pase 30.

3. Protocolo de ensayo

- a. Siembra de células: Se recogen células del frasco con Versene y se siembran en placas de células a 50K/pocillo en medios de siembra celular. Las células se hacen crecer durante la noche a 37 grados.
- b. Carga de células: Se desechan los medios de siembra celular. Se cargan células con 50 ul de colorante FLIPR a TA durante 90 min. La señal es estable durante 5 h tras cargar el colorante.
- c. Preparación del agonista (S1P): Se descongela la disolución madre congelada de S1P y se sonica a 37°C durante 30 minutos cada vez antes de su uso. Entonces, se diluye la disolución madre en tampón FLIPR a la concentración apropiada.
- d. Preparación del compuesto: Los compuestos se disuelven en DMSO. Se lleva a cabo una dilución de 10 puntos, 3x, de los compuestos en DMSO. Entonces, se diluyen los compuestos en tampón de ensayo 133x de modo que la concentración de DMSO es del 0,75%.
- e. Medición de la actividad: Se monitoriza el cambio de la señal de fluorescencia de las células tras la adición del compuesto en FLIPRtetra. Se transfieren 25 ul de compuesto a las placas de células (50 ul de colorante FLIPR; concentración de DMSO: 0,25%). Se registra la señal durante 90 s tras la adición del compuesto. Entonces, se añaden 50 ul de S1P 500 nM en la placa con células, y se registra la señal durante 90 segundos tras la adición.

4. Análisis de datos

- a. Se calcula el valor pico para cada adición de compuesto/S1P
- b. El valor pico de S1P a 200 nM se usa como control alto (100%), y el valor pico del tampón sólo se usa como control bajo (0%).
- c. Los datos se normalizan frente a los controles alto (HI) y bajo (LO) usando la siguiente ecuación:

$$POC_S = 100 * (RAW-HI)/(HI-LO)$$

- d. El valor pico se representa gráficamente frente a la concentración de compuesto.
- e. La curva se ajusta usando el ajuste de 4 parámetros:

$$Y = (A + (B / (1 + ((x/C)^D))))$$

en la que: Y es POC_S (o POC)

X es la concentración del compuesto

A es el mínimo (CE₅₀min o CI₅₀min)

B es el máximo (CE₅₀max o CI₅₀max)

C es el punto de inflexión (CE₅₀PI o CI₅₀PI)

D es la pendiente (pendiente de CE₅₀ o pendiente de CI₅₀).

Pueden usarse agonistas y antagonistas del receptor de S1P identificados para tratar una variedad de enfermedades y trastornos humanos, incluyendo, pero sin limitarse al tratamiento de infecciones tales como infecciones bacterianas, fúngicas, protozoarias y virales, particularmente infecciones provocadas por VIH-1 o VIH-2; dolor; cánceres; diabetes, obesidad; anorexia; bulimia; asma; enfermedad de Parkinson; insuficiencia cardíaca aguda; hipotensión; hipertensión; retención urinaria; osteoporosis; angina de pecho; infarto de miocardio; accidente cerebrovascular; úlceras; asma; alergia; hipertrofia prostática benigna; migraña; vómitos, trastornos sicóticos y neurológicos, incluyendo ansiedad, esquizofrenia, depresión maníaca, depresión, delirio, demencia y retardo mental grave.

El dolor es una sensación subjetiva compleja que refleja daño tisular real o potencial y la respuesta afectiva al mismo. El dolor agudo es una señal fisiológica que indica una lesión potencial o real. El dolor crónico puede ser o bien somatogénico (orgánico) o bien psicogénico. El dolor crónico frecuentemente se ve acompañado o seguido de signos vegetativos, que a menudo dan como resultado depresión.

5 El dolor somatogénico puede ser de origen nociceptivo, inflamatorio o neuropático. Se considera que el dolor nociceptivo guarda relación con la activación continua de fibras nerviosas sensibles al dolor somático o visceral. El dolor neuropático resulta de disfunción en el sistema nervioso; se cree que se sostiene por procesos somatosensoriales aberrantes en el sistema nervioso periférico, el SNC o ambos. El dolor crónico da como resultado sufrimiento individual y costes socioeconómicos de gran extensión. Las terapias farmacológicas contra el dolor existentes son bastante
10 insatisfactorias tanto en términos de eficacia como de seguridad.

En una realización, se usan moduladores de S1P de la presente invención como inmunomoduladores para suprimir el sistema inmunitario y prevenir el daño al tejido sano que de lo contrario se produciría en enfermedades autoinmunitarias y en trasplante de órganos. Los compuestos pueden administrarse a los pacientes como parte del
15 tratamiento asociado con el trasplante de órganos, incluyendo trasplantes de páncreas, islotes pancreáticos, riñón, corazón y pulmón. Los moduladores de S1P pueden administrarse solos o en combinación con inmunosupresores conocidos tales como ciclosporina, tacrolimus, azatioprina, desoximetasona, ciclofosfamida, cortisona, betametasona, FK 506 (un inmunosupresor macrólido fúngico), desametasona, flunisolida, prednisolona, prednisona, amcinomida, desonida, metilprednisolona, triamcinolona, alclometasona y metotrexato.

Por supuesto, la dosificación que va usarse depende del trastorno específico que va a tratarse, así como de factores adicionales incluyendo la edad, el peso, el estado general de salud, la gravedad de los síntomas, la frecuencia de tratamiento y si compuestos farmacéuticos adicionales acompañan al tratamiento. En general, las dosificaciones se administran varias veces al día y preferiblemente de una o tres veces al día. Las cantidades de los compuestos activos individuales se determinan fácilmente mediante procedimientos de rutina conocidos para los expertos habituales en la
20 técnica.

S1P también actúa como un factor de supervivencia en muchos tipos de células. Se anticipa que los moduladores de receptor de S1P tienen actividad en la protección de células y tejidos frente a condiciones de hipoxia. Según una realización, los compuestos de la invención se administran para tratar células y tejidos expuestos a condiciones de hipoxia, incluyendo lesión sostenida como resultado de isquemia. Según una realización, los
25 moduladores de S1P que tienen actividad antagonista pueden usarse para tratar la lesión de tipo isquemia-reperusión. La interferencia con el suministro de sangre oxigenada a los tejidos se define como isquemia. Se sabe que los efectos de la isquemia son progresivos, de manera que con el tiempo la vitalidad celular continua deteriorándose y los tejidos se vuelven necróticos. La isquemia persistente total, con perfusión de oxígeno limitada de los tejidos, da como resultado muerte celular y finalmente necrosis inducida por coagulación a pesar de la reperusión con sangre arterial.

Los compuestos de la invención y el otro agente farmacológicamente activo pueden administrarse a un paciente de manera simultánea, secuencial o en combinación. Se apreciará que cuando se usa una combinación de la invención, el compuesto de la invención y el otro agente farmacológicamente activo pueden estar en el mismo portador farmacéuticamente aceptable y por tanto administrarse simultáneamente. Pueden estar en portadores farmacéuticos separados tales como formas farmacéuticas orales convencionales que se toman simultáneamente. El término
35 "combinación" se refiere además al caso en el que se proporcionan los compuestos en formas farmacéuticas separadas y se administran secuencialmente.

Los compuestos de la invención pueden administrarse a pacientes (animales y seres humanos) que necesitan tal tratamiento en dosificaciones que proporcionarán una óptima eficacia farmacéutica. Se apreciará que la dosis requerida para su uso en cualquier aplicación particular variará de paciente a paciente, no sólo con el compuesto particular o la composición seleccionada, sino también con la vía de administración, la naturaleza del estado que está tratándose, la edad y el estado del paciente, la medicación simultánea o dietas especiales que esté siguiendo entonces el paciente, y otros factores que los expertos en la técnica reconocerán, estando en última instancia la dosificación apropiada a la discreción del médico encargado.

Un nivel de dosificación apropiado generalmente será de aproximadamente 0,001 a 50 mg por kg de peso corporal del paciente al día, que puede administrarse en dosis individuales o múltiples. Preferiblemente, el nivel de dosificación será de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 25 mg/kg al día; más preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 10 mg/kg al día. Por ejemplo, en el tratamiento o la prevención de un trastorno del sistema nervioso central, un nivel de dosificación adecuado es de aproximadamente 0,001 a 10 mg/kg al día, preferiblemente de aproximadamente 0,005 a 5 mg/kg al día, y especialmente de aproximadamente 0,01 a 1 mg/kg al día. Los compuestos pueden administrarse en un régimen de 1 a 4 veces al día, preferiblemente una o dos veces al
55 día.

Se apreciará que la cantidad del compuesto de la invención requerida para su uso en cualquier tratamiento variará no sólo con los compuestos particulares o la composición seleccionada sino también con la vía de administración, la naturaleza del estado que está tratándose, y la edad y el estado del paciente, y en última instancia estará a la discreción del médico encargado.

Las composiciones y terapias de combinación de la invención pueden administrarse en combinación con una variedad de excipientes farmacéuticos, incluyendo agentes estabilizantes, portadores y/o formulaciones de encapsulación tal como se describen en el presente documento.

5 Las composiciones acuosas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de los compuestos de la invención, disueltos o dispersados en un medio acuoso o portador farmacéuticamente aceptable.

10 “Farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable” incluye entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra perjudicial cuando se administran a un animal, o un ser humano, según sea apropiado. El “portador farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción. El uso de tales medios y agentes para principios activos farmacéuticos se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. En las composiciones, también pueden incorporarse principios activos complementarios.

15 Para administración a seres humanos, las preparaciones deben cumplir normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza tal como requiere la oficina de normas biológicas de la FDA.

20 Las composiciones y terapias de combinación de la invención se formularán entonces generalmente para administración parenteral, por ejemplo, se formularán para inyección por las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea, intralesión o incluso intraperitoneal. Los expertos en la técnica conocerán la preparación de una composición acuosa que contiene una composición de la invención o un componente o principio activo a la luz de la presente descripción. Normalmente, tales composiciones pueden prepararse como inyectables, como o bien suspensiones o bien disoluciones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para usarlas para preparar disoluciones o suspensiones tras la adición de un líquido antes de la inyección; y las preparaciones también pueden emulsionarse.

25 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen dispersiones o disoluciones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o disoluciones inyectables estériles. En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida al grado de que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

30 Pueden prepararse disoluciones de compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua mezclada de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

35 Las composiciones terapéuticas o farmacológicas de la presente invención generalmente comprenderán una cantidad eficaz del/de los componente(s) de la terapia de combinación, disuelto(s) o dispersado(s) en un medio farmacéuticamente aceptable. Los medios o portadores farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antifúngicos y antibacterianos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para principios activos farmacéuticos se conoce bien en la técnica. En las composiciones terapéuticas de la presente invención también pueden incorporarse principios activos complementarios.

40 Los expertos en la técnica conocen la preparación de composiciones farmacéuticas o farmacológicas a la luz de la presente descripción. Normalmente, tales composiciones pueden prepararse como inyectables, como o bien suspensiones o bien disoluciones líquidas; formas sólidas adecuadas para disolución en, suspensión en, líquido antes de la inyección; como comprimidos u otros sólidos para administración oral; como cápsulas de liberación en el tiempo; o en cualquier otra forma usada en la actualidad, incluyendo cremas, lociones, colutorios, inhalantes y similares.

45 Se preparan disoluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado a vacío y secado por congelación que producen un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo.

50 También se contempla la preparación de disoluciones más concentradas, o sumamente concentradas, para inyección intramuscular. En este sentido, se prefiere el uso de DMSO como disolvente ya que dará como resultado una penetración extremadamente rápida, administrando altas concentraciones del/de los compuesto(s) o agente(s) activo(s) a una zona pequeña.

El uso de formulaciones estériles, tales como lavados a base de solución salina por cirujanos, médicos y profesionales sanitarios para limpiar una zona particular en el campo de operación también puede ser particularmente útil. También pueden reconstituirse formulaciones terapéuticas según la presente invención en forma de colutorios, o conjuntamente con reactivos antifúngicos. Se prevén también formas inhalantes. Las formulaciones terapéuticas de la invención también pueden prepararse en formas adecuadas para administración tópica, tal como en cremas y lociones.

Conservantes adecuados para su uso en una disolución de este tipo incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, clorobutanol, timerosal y similares. Tampones adecuados incluyen ácido bórico, bicarbonato de sodio y potasio, boratos de sodio y potasio, carbonato de sodio y potasio, acetato de sodio, bifosfato de sodio y similares, en cantidades suficientes para mantener el pH a entre aproximadamente pH 6 y pH 8, y, preferiblemente, entre aproximadamente pH 7 y pH 7,5. Agentes de tonicidad adecuados son dextrano 40, dextrano 70, dextrosa, glicerina, cloruro de potasio, propilenglicol, cloruro de sodio y similares, de manera que el equivalente de cloruro de sodio de la disolución oftálmica está en el intervalo de 0,9 más o menos el 0,2%. Antioxidantes y estabilizantes adecuados incluyen bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, tiosulfito de sodio, tiourea y similares. Agentes humectantes y clarificantes adecuados incluyen polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero 282 y tiloxapol. Agentes que aumentan la viscosidad adecuados incluyen dextrano 40, dextrano 70, gelatina, glicerina, hidroxietilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosa, lanolina, metilcelulosa, vaselina, polietilenglicol, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa y similares.

Tras la formulación, los agentes terapéuticos se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad tal que sea farmacológicamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármacos y similares.

En este contexto, la cantidad de principio activo y el volumen de la composición que va administrarse dependen del animal huésped que va a tratarse. Las cantidades precisas del compuesto activo requeridas para su administración dependen del criterio del médico y son peculiares para cada individuo.

Normalmente se utiliza un volumen mínimo de una composición requerida para dispersar los compuestos activos. Los regímenes adecuados para su administración también son variables, pero se tipificarían administrando inicialmente el compuesto y monitorizando los resultados y dando luego dosis controladas adicionales a intervalos adicionales. Por ejemplo, para administración parenteral, se prepararía una disolución acuosa adecuada tamponada y, si es necesario, isotónica, y se usaría para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea o incluso intraperitoneal. Una dosificación podría disolverse en 1 ml de disolución de NaCl isotónica y o bien añadirse a 1000 ml de líquido de hipodermólisis o bien inyectarse en el sitio de infusión propuesto, (véase por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580).

En determinadas realizaciones, los compuestos activos pueden administrarse por vía oral. Esto se contempla para agentes que generalmente son resistentes o se han hecho resistentes a la proteólisis por enzimas digestivas. Se contempla que tales compuestos incluyan agentes químicamente diseñados o modificados; péptidos dextrorrotatorios; y formulaciones de péptidos y liposomas en cápsulas de liberación en el tiempo para evitar la degradación por peptidasas y lipasas.

Sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico, bromhídrico, bórico, fosfórico, sulfúrico o ácidos fosfóricos, o ácidos orgánicos tales como ácidos acético, oxálico, tartárico, maleico, fumárico, cítrico, succínico, mesílico, mandélico, succínico, benzoico, ascórbico, metanosulfónico, a-cetoglutarico, a-glicerofosfórico, glucosa-1-fosfórico y similares. También pueden derivarse sales formadas con los grupos carboxilo libres a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Otros ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen derivados cuaternarios, y sales internas tales como N-óxidos.

El portador también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ocasionarse mediante diversos agente antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ocasionarse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan disoluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado a vacío y secado por congelación

que producen un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo.

5 También se contempla la preparación de disoluciones más concentradas, o sumamente concentradas, para inyección directa, en las que se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, administrando altas concentraciones de los agentes activos a una zona pequeña.

Tras la formulación, se administrarán disoluciones de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas, tales como el tipo de disoluciones inyectables descrito anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármacos y similares.

10 Para administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y en primer lugar el diluyente líquido debe hacerse isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, los expertos en la técnica conocerán medios acuosos estériles que pueden emplearse a la luz de la presente descripción.

15 Además de los compuestos formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones de liposomas; cápsulas de liberación en el tiempo; y cualquier otra forma usada en la actualidad, incluyendo cremas.

20 Formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios. Para los supositorios, los aglutinantes y portadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo del 0,5% al 10%, preferiblemente del 1%-2%.

25 Las formulaciones orales incluyen excipientes normalmente empleados tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos.

30 En determinadas realizaciones definidas, las composiciones farmacéuticas orales comprenderán un diluyente inerte o portador comestible asimilable, o pueden incluirse en cápsula de gelatina de vaina dura o blanda, o pueden comprimirse para dar comprimidos, o pueden incorporarse directamente con los alimentos de la dieta. Para administración terapéutica oral, los compuestos activos pueden incorporarse a excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos el 0,1% de compuesto activo. Por supuesto, el porcentaje de las composiciones y preparaciones puede variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 75% del peso de la unidad, o preferiblemente entre el 25-60%. La cantidad de compuestos activos en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada.

35 Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: un aglutinante, como goma tragacanto, goma arábica, almidón de maíz, o gelatina; excipientes, tales como fosfato de dicalcio; un agente disgregante, tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico y similares; un lubricante, tal como estearato de magnesio; y puede añadirse un agente edulcorante, tal como sacarosa, lactosa o sacarina o un agente aromatizante, tal como menta, esencia de gaulteria o aroma de cereza. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido. Pueden estar presentes otros diversos materiales como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, pueden recubrirse comprimidos, píldoras o cápsulas con laca, azúcar o ambos. Un jarabe de 45 elixir puede contener los compuestos activos, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y aroma, tal como aroma de cereza o naranja.

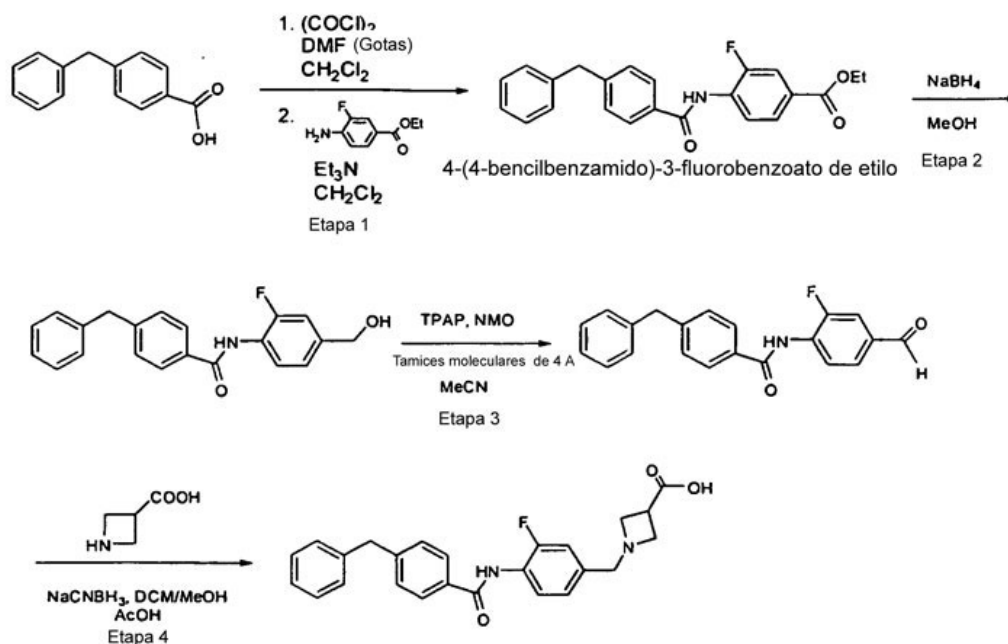
50 Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden usarse en forma de una preparación farmacéutica, por ejemplo, en forma sólida, semisólida o líquida, que contiene uno o más del compuesto de la invención, como principio activo, en mezcla con un portador o excipiente orgánico o inorgánico adecuado para aplicaciones externas, entéricas o parenterales. El principio puede combinarse, por ejemplo, con los portadores farmacéuticamente aceptables no tóxicos habituales para comprimidos, grageas, cápsulas, supositorios, disoluciones, emulsiones, suspensiones, y cualquier otra forma adecuada para su uso. Los portadores que pueden usarse son agua, glucosa, lactosa, goma arábica, gelatina, manitol, pasta de almidón, trisilicato de magnesio, talco, almidón de maíz, queratina, sílice coloidal, almidón de patata, urea y otros portadores adecuados para su uso en la fabricación de preparaciones, en forma sólida, 55 semisólida o líquida, y pueden usarse además agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes y colorantes y perfumes. El compuesto objeto activo se incluye en la composición farmacéutica en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado sobre el proceso o el estado de la enfermedad.

5 Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, se mezcla el principio activo principal con un portador farmacéutico, por ejemplo, componentes de preparación de comprimidos convencionales tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio o gomas, y otros diluyentes farmacéuticos, por ejemplo, agua, para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica del mismo. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, quiere decirse que el principio activo está dispersado uniformemente por toda la composición de modo que la composición puede subdividirse fácilmente en formas farmacéuticas unitarias igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Entonces, esta composición de preformulación sólida se subdivide en formas farmacéuticas unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen desde 0,1 hasta aproximadamente 500 mg del principio activo de la invención. Los comprimidos o las píldoras de la composición novedosa pueden recubrirse o combinarse de otro modo para proporcionar una forma farmacéutica que proporcione la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o la píldora pueden comprender un componente de dosificación interno y un componente de dosificación externo, estando este último en forma de una envuelta sobre el primero. Los dos componentes pueden separarse mediante una capa entérica que sirve para resistir la disgregación en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o que se retarde su liberación. Puede usarse una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, incluyendo tales materiales varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

20 Las formas líquidas en las que pueden incorporarse las composiciones de la invención para administración por vía oral o mediante inyección incluyen disolución acuosa, jarabes adecuadamente aromatizados, suspensiones acuosas u oleosas, y emulsiones con aceites aceptables tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, o con un agente solubilizante o emulsionante adecuado para uso intravenoso, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares. Los agentes de dispersión o suspensión adecuados para suspensiones acuosas incluyen gomas naturales y sintéticas tales como tragacanto, goma arábiga, alginato, dextrano, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, polivinilpirrolidona o gelatina.

30 Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen disoluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos, farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados tal como se expuso anteriormente. Preferiblemente, las composiciones se administran por vía oral o respiratoria nasal para lograr un efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables preferiblemente estériles pueden nebulizarse mediante el uso de gases inertes. Las disoluciones nebulizadas puede respirarse directamente desde el dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede estar unido a una máscara facial, tienda o máquina de respiración de presión positiva intermitente. Pueden administrarse composiciones en disolución, suspensión o polvo, preferiblemente por vía oral o por vía nasal, desde dispositivos que administran la formulación de una manera apropiada.

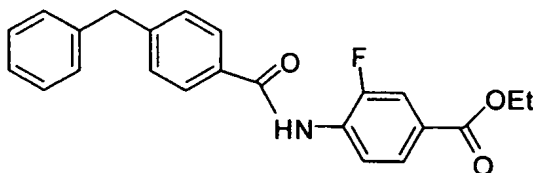
40 Para tratar enfermedades y estados clínicos indicados anteriormente, el compuesto de esta invención puede administrarse por vía oral, por vía tópica, por vía parenteral, mediante aerosol de inhalación o por vía rectal en formulaciones farmacéuticas unitarias que contienen portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales. El término parenteral tal como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, técnicas de infusión o inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal.

Esquema 1**Procedimiento general de aminación reductora**

5 Se agitó una mezcla de aldehído (1,0 mmoles), ácido acético (1,5 mmoles) y ácido azetidín-3-carboxílico o ácido piperidín-4-carboxílico (1,2-1,5 mmoles) en diclorometano (DCM)/MeOH (1:1, 10 ml) a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadió cianoborohidruro de sodio (0,5 mmoles) y se agitó la mezcla de reacción durante 2-3 h a temperatura ambiente. Tras la concentración del disolvente a presión reducida, se disolvió el residuo resultante en DMSO, se filtró y purificó mediante HPLC preparativa en fase inversa (columna Luna 5u C18(2) de fase inversa de Phenomenex, 60 x 21,2 mm de DI, fase móvil: A = TFA al 0,05% en agua; B = ácido trifluoroacético (TFA) al 0,05% en acetonitrilo. La velocidad de flujo fue de 10-12 ml/minuto) produciendo el producto final deseado con una pureza mayor del 95%. Todos los productos finales se obtuvieron como sales de TFA a menos que se establezca otra cosa. Alternativamente, la mezcla bruta de aminación reductora puede purificarse mediante trituración con MeOH y agua.

Ejemplo 1: Ácido 1-(4-(4-bencilbenzamido)-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxílico

4-(4-Bencilbenzamido)-3-fluorobenzoato de etilo:

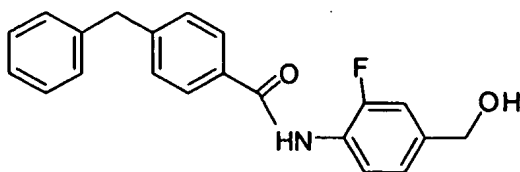


15

20

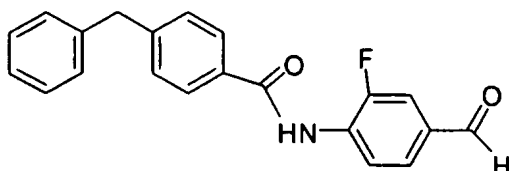
A una disolución de ácido 4-bencilbenzoico (1,06 g, 5 mmoles) en diclorometano (10 ml) se le añadió dicloruro de oxalilo (1 ml) seguido de unas gotas de DMF a 0°C. Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 horas. La eliminación de los disolventes dio el residuo que se disolvió en diclorometano (2 ml) y se añadió a la disolución de trietilamina (1,4 ml, 10 mmoles) y 4-amino-3-fluorobenzoato de etilo (916 mg, 5 mmoles) en diclorometano (50 ml) a 0°C. Tras agitar a temperatura ambiente durante 48 horas, se lavó la mezcla con bicarbonato de sodio saturado y HCl 1 N. Se lavaron los extractos orgánicos combinados con salmuera, se secaron y concentraron a presión reducida dando el residuo que se purificó mediante cromatografía en gel de sílice en el sistema ISCO. Se obtuvo el producto deseado como un sólido de color hueso: ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,63 (t, J = 8,8 Hz, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,83 (m, 4H), 7,18-7,35 (m, 6H), 4,39 (q, J = 7,2 Hz, 1H), 4,07 (s, 2H), 1,40 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

4-Bencil-N-(2-fluoro-4-(hidroximetil)fenil)benzamida:



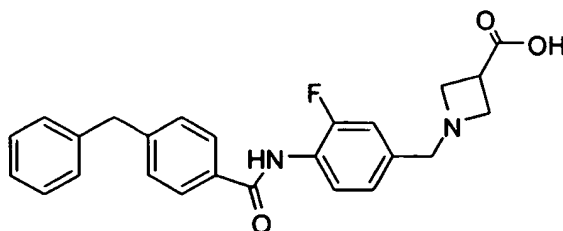
5 A una disolución de etil-4-(4-bencilbenzamido)-3-fluorobenzoato de metilo (100 mg, 0,265 mmoles) en MeOH (10 ml) a temperatura ambiente se le añadió borohidruro de sodio (200 mg, 5,3 mmoles). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 días. La eliminación del disolvente dio el residuo que se diluyó con EtOAc (50 ml) y se lavó con NaOH 1 N y salmuera. Se separó la fase orgánica, se secó y concentró. Se purificó el residuo en el sistema ISCO (metanol al 1% en diclorometano) dando un producto puro como un compuesto cristalino blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,44 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,80 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,15-7,34 (m, 8H), 4,69 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H), 4,06 (s, 2H).

10 4-Bencil-N-(2-fluoro-4-formilfenil)benzamida:



15 Se trató una mezcla de 4-bencil-N-(2-fluoro-4-(hidroximetil)fenil)benzamida (200 mg, 0,60 mmoles), N-óxido de 4-metilmorfolina (140 mg, 1,2 mmoles), y tamices moleculares de 4 Å (1 g) en 10 ml de CH_3CN con perrutenato de tetrapropilamonio (10 mg, 0,03 mmoles) y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 12 horas. Se filtraron los sólidos y se concentró el filtrado. Se purificó el residuo en el sistema ISCO (hexano al 80% en diclorometano) dando un producto puro como un compuesto cristalino blanco: ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 9,93 (s, 1H), 8,80 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 8,25 (s, 1H), 7,84 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H), 7,74 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,69 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H), 7,19-7,37 (m, 6H), 4,07 (s, 2H).

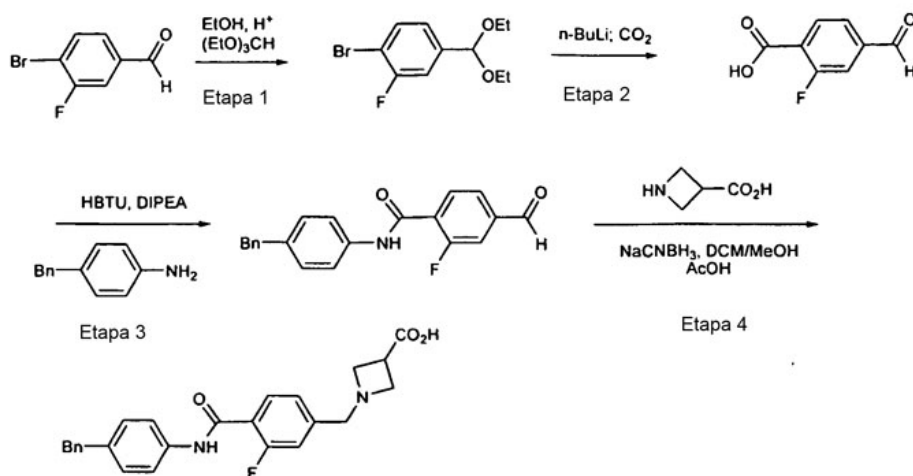
Ácido 1-(4-(4-bencilbenzamido)-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxílico:



20

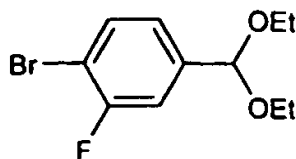
Se preparó el compuesto del título mediante el método general para aminación reductora dando el compuesto del título: ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 7,86-7,94 (m, 4H), 7,17-7,39 (m, 8H), 4,42 (s, 2H), 4,33 (m, 4H), 4,06 (s, 2H), 3,71 (m, 1H). ^{19}F RMN (376 MHz, CD_3OD) δ -77,4 (TFA), -123,4. EM (ESI) m/z : Calculado: 418,46; observado: 419,0 ($\text{M}^+ + 1$).

Esquema 2



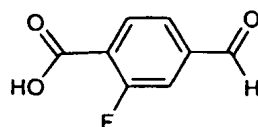
Ejemplo 2: Ácido 1-(4-((4-bencilfenil)carbamoil)-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxílico

1-Bromo-4-(diethoximetil)-2-fluorobenceno



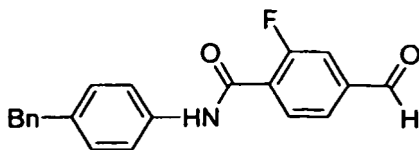
5 A una disolución de 3-fluoro-4-bromobenzaldehído (20,0 g, 98,5 mmoles) en EtOH seco (120 ml) se le añadió cloruro de acetilo (2,04 ml, 29,6 mmoles) seguido de la adición de ortoformiato de trietilo (6,55 ml, 39,4 mmoles) y se calentó el contenido hasta 70°C durante 3 h. Se enfrió el contenido hasta temperatura ambiente y se cambió a un evaporador rotatorio y se sometió a presión reducida (280 mm Hg) con temperatura del baño de 65°C durante 45 min. Se disminuyó más la presión para eliminar todo el disolvente. A esta mezcla, se le añadió etanol nuevo (60 ml), cloruro de acetilo (1,5 ml), ortoformiato de trietilo (5,0 ml) y se calentó hasta 70°C durante 2 h. Se eliminó el disolvente a la presión reducida y se diluyó con EtOAc (200 ml), se lavó con bicarbonato de sodio saturado (3 x 100 ml), salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo mediante columna de gel de sílice (basificada con Et₃N al 5%, eluyente: EtOAc/hexanos, 1/20) proporcionando 1-bromo-4-(diethoximetil)-2-fluorobenceno como un aceite incoloro. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,03 (t, J=8,1 Hz, 1 H), 7,36 - 7,33 (m, 2 H), 5,54 (s, 1 H), 3,63 3,52 (m, 4 H), 1,25 (m, 6 H).

Ácido 2-fluoro-4-formilbenzoico



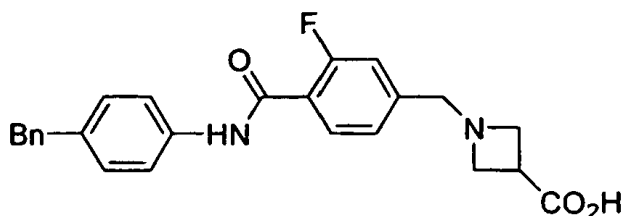
20 A una disolución de 1-bromo-4-(diethoximetil)-2-fluorobenceno (10,12 g, 36,53 mmoles) en THF seco (90 ml) enfriado hasta -78°C, se le añadió *n*-butillitio (2,5 M en hexanos, 16,5 ml, 43,83 mmoles) gota a gota a lo largo de un periodo de 10 min. Se agitó el contenido adicionalmente durante 30 min. y se burbujeo CO₂ a través de la mezcla durante 0,5 h (exotérmico). Se retiró el baño de enfriamiento y se calentó el contenido hasta temperatura ambiente. Se trató la mezcla con NaOH acuoso (1 N, 100 ml) y se lavó con EtOAc. Se acidificó la fase acuosa hasta pH 2 con HCl (5 N) y se extrajo el ácido libre con EtOAc (3 x 75 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua y salmuera, se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron. Se disolvió el residuo en éter (30 ml), TFA (1,5 ml) y agua (2,0 ml) y se agitó durante la noche. Se eliminaron los componentes volátiles a presión reducida y se evaporaron conjuntamente con tolueno. Entonces, se trató el residuo con dietil éter (75 ml) y se filtró. Se secó a vacío la torta del filtro sin purificación adicional dando ácido 2-fluoro-4-formilbenzoico como un sólido blanco. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 13,48 (s, 1 H), 10,06 (s, 1 H), 8,06 (t, J=7,4 Hz, 1 H), 7,84 - 7,79 (m, 2 H). EM (ESI) m/z: Calculado: 168,0; observado: 167,0 (M⁻¹).

N-(4-Bencilfenil)-2-fluoro-4-formilbenzamida



5 A una disolución de 4-bencilbencenamina (0,100 g, 0,55 mmoles), ácido 2-fluoro-4-formilbenzoico (0,092 g, 0,55 mmoles), N,N-dietilpropan-2-amina (0,10 ml, 0,65 mmoles) en DMF (2,00 ml) se le añadió HBTU. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h. Se diluyó la mezcla con EtOAc, se lavó con agua y se secó sobre MgSO₄. Se evaporó el disolvente y se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en un sistema de EtOAc/hexeno dando el compuesto del título. EM (ESI) m/z: Calculado; 333,3: observado; 332,1. ¹H RMN (300 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 10,05 - 10,10 (1 H, m), 8,31 - 8,44 (2 H, m), 7,80 - 7,85 (1 H, m), 7,67 - 7,73 (1 H, m), 7,56 - 7,62 (2 H, m), 7,15 - 7,40 (6 H, m), 3,99 (2 H, s)

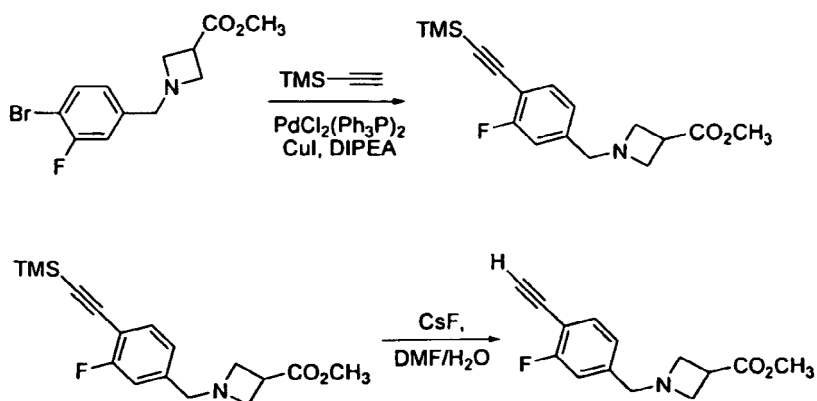
10 Ácido 1-(4-((4-bencilfenil)carbamoil)-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxílico



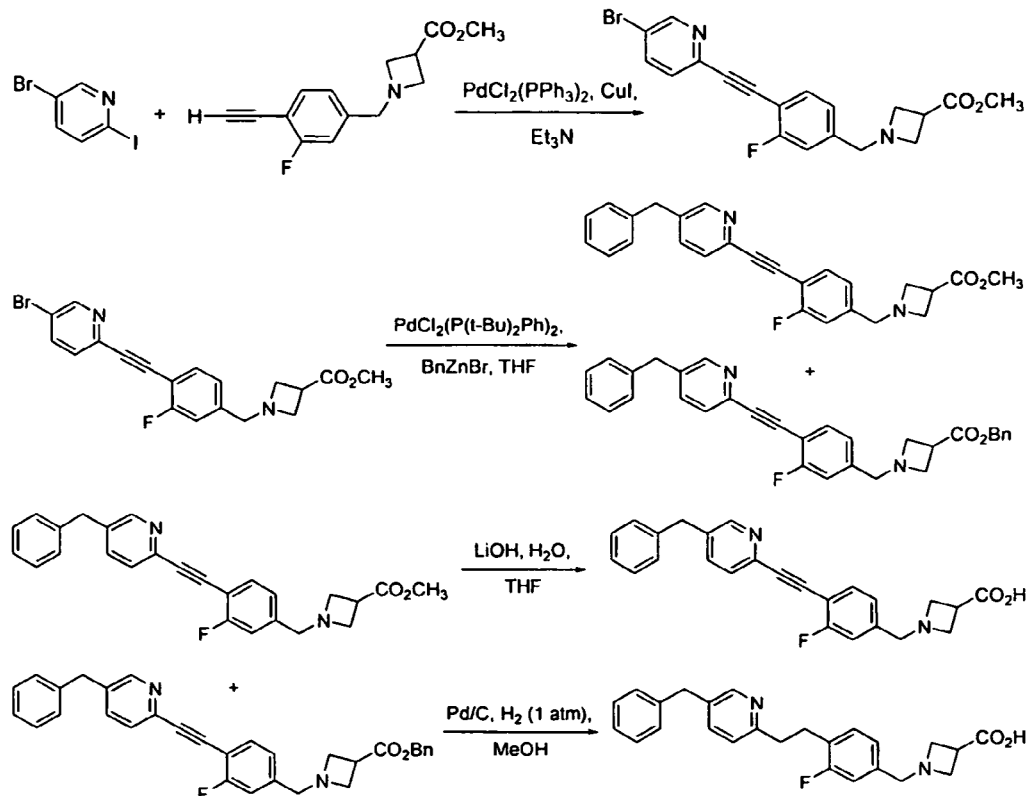
Se preparó el compuesto mediante el método general para aminación reductora dando el compuesto del título. EM (ESI) m/z: Calculado; 418,46: observado; 419,1. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 10,25 - 10,34 (1 H, m), 7,51 - 7,67 (3 H, m), 7,09 - 7,33 (8 H, m), 3,87 - 3,94 (2 H, s), 3,56 - 3,63 (2 H, s), 3,38 (2 H, s. a.), 3,17 (3 H, m.)

15

Esquema 3

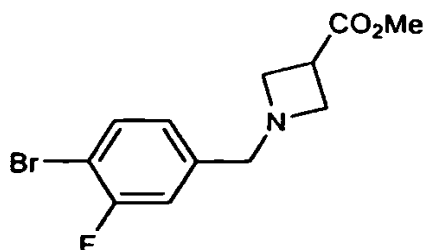


Esquema 4



Ejemplo 3: 1-(4-Etínil-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxilato de metilo

1-(4-Bromo-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxilato de metilo

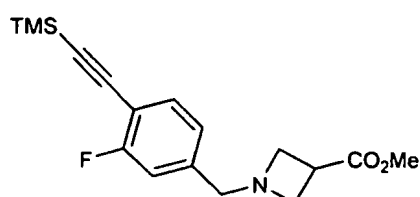


5

10

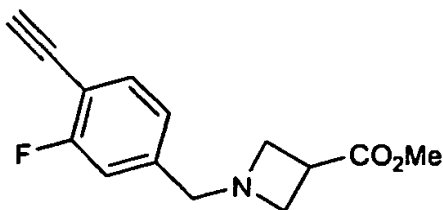
Se añadieron ácido azetidín-3-carboxílico (43 g, 421 mmoles), 4-bromo-3-fluorobenzaldehído (81,4 g, 401 mmoles), ortoformiato de metilo (219 ml, 2005 mmoles), y AcOH (34 ml, 601 mmoles) a DCM (700 ml) a TA bajo una atmósfera de N₂. Se agitó la mezcla durante 15 min., momento en el que se añadió en partes (exotérmico) triacetoxiborohidruro de sodio (127 g, 601 mmoles). Tras 2 h, se cambió el disolvente a MeOH (257 g, 8019 mmoles), y se añadió lentamente ácido sulfúrico (79 g, 802 mmoles) (exotérmico). Se calentó la mezcla a reflujo durante 18 h. Se eliminó el disolvente y se extrajo la mezcla usando DCM y agua. Se purificó la fase orgánica usando una columna Biotage (isopropanol/heptano), proporcionando 1-(4-bromo-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxilato de metilo como un aceite claro. EM (ESI) m/z: Calculado: 301,0; observado: 302,0 (M⁺ + 1).

1-(3-Fluoro-4-(2-(trimetilsilil)etínil)bencil)azetidín-3-carboxilato de metilo



5 Se combinaron 1-(4-bromo-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxilato de metilo (25,00 g, 82,7 mmoles), yoduro de cobre (I) (3,14 g, 16,5 mmoles), (trimetilsilil)acetileno (81,9 ml, 579 mmoles), cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio(II) (5,81 g, 8,27 mmoles) y base de Hunig (115 ml, 662 mmoles) en un tubo sellable junto con 100 ml de THF. Se selló el tubo y se calentó hasta 80°C con agitación vigorosa durante 24 h. Entonces se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente, se filtró y se evaporó. Se purificó el aceite resultante con Biotage (75 l, EtOAc al 0-50%/hexanos), dando 1-(3-fluoro-4-

1-(4-Etínil-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxilato de metilo

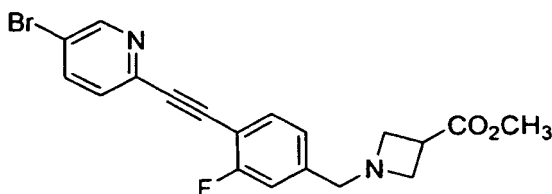


10 Se añadieron 1-(3-fluoro-4-(2-(trimetilsilil)etínil)bencil)azetidín-3-carboxilato de metilo (20,9 g, 65 mmoles) y fluoruro de cesio (11 g, 72 mmoles) a DMF (50 ml). Se añadió MeOH (100 ml). Tras 2 h, se eliminó el MeOH y se extrajo la mezcla con DCM y agua. Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. Se eliminó el disolvente y se purificó el material mediante Biotage (75 l, EtOAc al 7-100%/hexanos), dando 1-(4-etínil-3-

15 fluorobencil)azetidín-3-carboxilato de metilo como un aceite de color amarillo claro. EM (ESI) m/z: Calculado: 247,1; observado: 248,0 ($M^+ + 1$).

Ácido 1-(4-(2-(5-bencilpiridin-2-il)etínil)-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxílico y ácido 1-(4-(2-(5-bencilpiridin-2-il)etínil)-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxílico

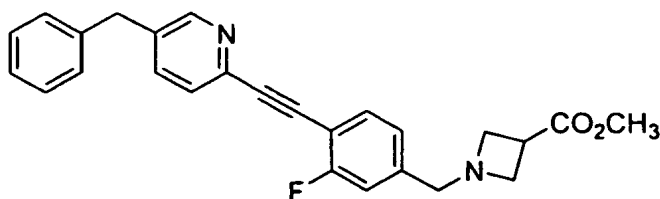
1-(4-(2-(5-Bromopiridin-2-il)etínil)-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxilato de metilo



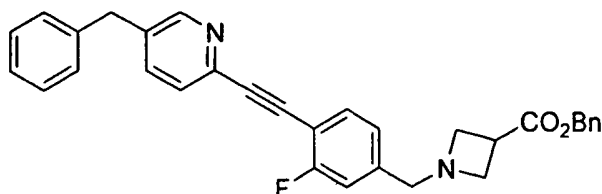
20 Se roció con argón una disolución de 5-bromo-2-yodopiridina (800 mg, 2818 μ moles), 1-(4-etínil-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxilato de metilo (704 mg, 2846 μ moles) y yoduro de cobre(I) (21,5 mg, 113 μ moles) en trietilamina (9,4 ml) (30 s), y entonces se añadió $PdCl_2(PPh_3)_2$ (79,1 mg, 113 μ moles) en una parte a 25°C. Se enfrió la mezcla de reacción hasta 0°C y se agitó durante 40 min., y después se dejó en agitación a 25°C durante 1,5 h.

25 Posteriormente, se diluyó la mezcla con EtOAc (120 ml) y se lavó secuencialmente con agua (4 x 30 ml) y salmuera (30 ml). Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio, se filtró y concentró a vacío. La purificación cromatográfica del residuo (gel de sílice, EtOAc al 0-100%/hexanos) proporcionó 1-(4-(2-(5-bromopiridin-2-il)etínil)-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxilato de metilo como un aceite de color amarillo claro. EM (ESI) m/z: Calculado: 402,0/404,0; observado: 402,8/404,8 ($M^+ + 1$).

1-(4-(2-(5-Bencilpiridin-2-il)etínil)-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxilato de metilo

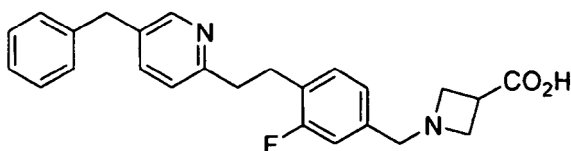


1-(4-(2-(5-Bencilpiridin-2-il)etil)3-fluorobencil)azetidín-3-carboxilato de bencilo

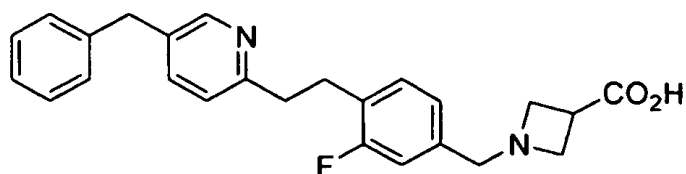


5 Se combinaron 1-(4-(2-(5-bromopiridin-2-il)etil)3-fluorobencil)azetidín-3-carboxilato de metilo (340,0 mg, 843 μ moles), $\text{PdCl}_2(\text{P}(\text{t-Bu})_2\text{Ph})_2$ (37 mg, 59 μ moles) y THF (4,0 ml) bajo una atmósfera de argón. Se añadió bromuro de bencilzinc(II) (0,5 M en THF; 1,92 ml, 961 μ moles) mediante jeringuilla, y se agitó la disolución resultante a 25°C durante 1 h. Entonces, se añadió bromuro de bencilzinc(II) adicional (0,5 M en THF; 1,92 ml), y se agitó la disolución resultante durante 1 h a 25°C. Entonces, se añadió una tercera parte de bromuro de bencilzinc(II) (0,5 M en THF; 1,92 ml), y se agitó la disolución resultante durante 1 h a 25°C. Posteriormente, se repartió la mezcla entre NaHCO_3 acuoso saturado a la mitad (50 ml) y EtOAc (100 ml). Se separó la fase orgánica, se lavó con salmuera (30 ml), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a vacío. La purificación cromatográfica del residuo (gel de sílice, 0-100% de EtOAc/hexanos) proporcionó por separado 1-(4-(2-(5-bencilpiridin-2-il)etil)3-fluorobencil)azetidín-3-carboxilato de bencilo (EM (ESI) m/z: Calculado: 490,2; observado: 490,8 (M^+ +1)) y 1-(4-(2-(5-bencilpiridin-2-il)etil)3-fluorobencil)azetidín-3-carboxilato de metilo (EM (ESI) m/z: Calculado: 414,2; observado: 414,8 (M^+ +1)) como un aceite amarillo.

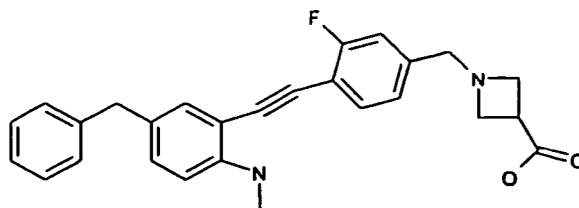
Ácido 1-(4-(2-(5-bencilpiridin-2-il)etil)3-fluorobencil)azetidín-3-carboxílico



15 Se agitó una mezcla de hidróxido de litio hidratado (28,4 mg, 677 μ moles) y 1-(4-(2-(5-bencilpiridin-2-il)etil)3-fluorobencil)azetidín-3-carboxilato de metilo (77,9 mg, 188 μ moles) en THF (2,7 ml) y agua (0,69 ml) a 25°C durante 3 h. Entonces, se concentró la mezcla de reacción parcialmente a vacío (para eliminar THF), se añadió agua (1,5 ml), y se sonicó la disolución resultante durante 1 min. Posteriormente se acidificó la disolución de reacción con HCl 0,1 N (670 μ l), se llevó hasta pH 6 con tampón fosfato $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 1 M (1,0 ml), y se sonicó. Se recogió el precipitado resultante mediante filtración a vacío, se lavó con agua (3,0 ml), y se secó a vacío proporcionando ácido 1-(4-(2-(5-bencilpiridin-2-il)etil)3-fluorobencil)azetidín-3-carboxílico como un sólido de color amarillo claro. EM (ESI) m/z: Calculado: 400,2; observado: 401,1 (M^+ +1).

Ejemplo 4: Ácido 1-(4-(2-(5-bencilpiridin-2-il)etil)3-fluorobencil)azetidín-3-carboxílico

25 Se sometió a ciclación una mezcla de 1-(4-(2-(5-bencilpiridin-2-il)etil)3-fluorobencil)-azetidín-3-carboxilato de bencilo (103,0 mg, 210 μ moles) y paladio al 10% sobre carbono (22 mg, 21 μ moles) en MeOH (4,0 ml) bajo una atmósfera de H_2 (alternativamente, evacuando el matraz hasta 1 Torr, luego rellenando con H_2 (1 atm); se repitió 3x), entonces se agitó bajo H_2 (1 atm) a 25°C durante 5 h. Posteriormente se filtró la suspensión de reacción a través de Celite (lavando con MeOH (10 ml)), y se concentró el filtrado a vacío. La purificación por HPLCfi del residuo (C18, CH_3CN al 0-100%/ H_2O + TFA al 0,1%) proporcionó ácido 1-(4-(2-(5-bencilpiridin-2-il)etil)3-fluorobencil)azetidín-3-carboxílico, sal de bis(ácido trifluoroacético) como un aceite incoloro. EM (ESI) m/z: Calculado: 404,2; observado: 405,1 (M^+ +1).

Ejemplo 5: Ácido 1-(4-(2-(5-bencil-2-(metilamino)fenil)etininil)-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxílico

Puede prepararse el compuesto del título usando métodos similares a los del ejemplo 3. EM m/z: Calculado 428,19; observado: 429,2.

Actividad de los compuestos de la invención

5 Los compuestos de la invención preparados según la síntesis indicada anteriormente pueden someterse a ensayo para determinar su capacidad para modular el receptor S1P-1. Los compuestos pueden evaluarse para determinar su capacidad para inducir la internalización de receptores específica de S1P1 usando ensayos de internalización de receptores *in vitro* y puede demostrarse su utilidad como agentes inmunoreguladores mediante su actividad como agonistas del receptor S1P1 medida en el ensayo de internalización de receptores (>50% del control de S1P a 10 nM o 300 nM). Por consiguiente, se espera que los compuestos sean útiles como moduladores del receptor S1P-1, por ejemplo, en el tratamiento de una variedad de estados clínicos mediados por el receptor S1P-1. Tales estados incluyen rechazo de trasplantes (trasplante de órganos sólidos y células de los islotes); rechazo de trasplantes (tejido); cáncer; enfermedades autoinmunitarias/inflamatorias; artritis reumatoide; lupus; diabetes insulín dependiente (tipo I); diabetes no insulín dependiente (tipo II); esclerosis múltiple; psoriasis; colitis ulcerosa; enfermedad inflamatoria del intestino; enfermedad de Crohn; leucemias linfocíticas agudas y crónicas y linfomas.

Para demostrar además la idoneidad de los compuestos de la invención como moduladores del receptor S1P-1 para tratar estados tales como rechazo de trasplantes; cáncer; enfermedades autoinmunitarias/inflamatorias; artritis reumatoide; lupus; diabetes; esclerosis múltiple; psoriasis; colitis ulcerosa; enfermedad inflamatoria del intestino; enfermedad de Crohn; leucemias linfocíticas agudas y crónicas y linfomas en los que la inmunosupresión es fundamental (de los cuales la reducción de la linfopenia es, por tanto, un indicador bien establecido), los compuestos de la invención pueden evaluarse en animales de laboratorios tal como se describe a continuación.

PROTOCOLO**Ratones**

25 Pueden mantenerse ratones C57BL/6J (B6, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) en un entorno libre de patógenos específicos con un sistema de contención en microaislamiento. Pueden usarse ratones adultos de la misma edad tanto machos como hembras para todos los experimentos, que pueden revisarse y aprobarse en el Comité de cuidado y uso de animales en la Universidad de Virginia. Siempre que el protocolo lo establecía, se anestesiaron los ratones mediante inyecciones intraperitoneales de clorhidrato de ketamina (125 mg/kg; Sanofi Winthrop Pharmaceuticals, Nueva York, NY), xilazina (12,5 mg/kg TranquiVed; Phoenix Scientific, St. Joseph, MO) y sulfato de atrofina (0,025 mg/kg; Fujisawa USA, Deerfield, IL).

Preparación y análisis por citometría de flujo

35 Puede recogerse sangre de al menos seis ratones para cada punto de tiempo de 0, 4, 8, 24, 48, 72 h tras la dosificación diaria de un día, 3 días o 7 días con el compuesto de prueba. Tras hemorragias terminales, pueden recogerse cerebro y otros tejidos de todos los animales que se someten al tratamiento. Pueden determinarse los recuentos celulares de sangre completa, produciendo recuentos celulares en miles de células por microlitro (K/1 l).

Para identificar y cuantificar subgrupos de linfocitos, se analizaron suspensiones celulares mediante citometría de flujo. Tras la lisis de glóbulos rojos, se tiñeron las células con anticuerpos monoclonales anti-ratón contra CD3, CD4, CD8, CD19 y NK1.1 (BD Biosciences, San Jose, CA). Se analizaron las células mediante citometría de flujo de cuatro colores en un instrumento FACSCalibur (BD Biosciences) en el Cancer Center Core Facility de la Universidad de Virginia. Se analizaron los subgrupos de linfocitos, que incluyen células B, células T totales, células T CD4, células T CD8, timocitos doble positivos, timocitos doble negativos, células NK y células NK/T. Se calculó el tamaño de cada población celular como el producto del recuento de linfocitos totales registrado por el Hemavet o hemocitómetro y el porcentaje de linfocitos positivos registrado por el citómetro de flujo. Todos los datos se analizaron con el software de análisis Cell Quest de BD Biosciences.

45 Se espera que los compuestos de la invención sean fármacos útiles para tratar estados tales como rechazo de trasplantes; cáncer; enfermedades autoinmunitarias/inflamatorias; artritis reumatoide; lupus; diabetes; esclerosis

múltiple; psoriasis; colitis ulcerosa; enfermedad inflamatoria del intestino; enfermedad de Crohn; leucemias linfocíticas agudas y crónicas y linfomas en los que la inmunosupresión es fundamental.

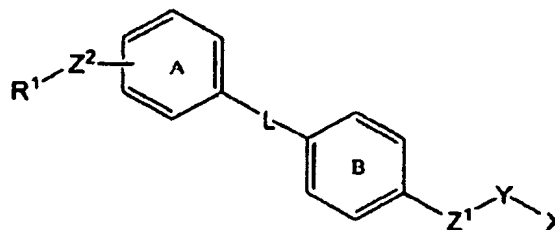
Protocolo de estudio de la linfopenia en ratas

Animales:

- 5 Se reciben ratas Lewis hembra (150-175 g, 6-8 semanas) de Charles River Laboratories y se dejan aclimatar durante al menos una semana antes de colocarse en el estudio.
- Procedimiento:
- 1) Se administra a las ratas (n = 4/grupo) un compuesto o vehículo (captisol al 12,5% en agua) por vía oral (v.o., 10 ml/kg) a tiempo 0.
- 10 2) A diversos puntos de tiempo tras la dosificación (1, 4, 8 ó 24 horas), se sacrifican los animales mediante inhalación de CO₂.
- 3) Usando una aguja 20G y una jeringuilla de 1 cc, se recoge sangre mediante punción cardiaca.
- 4) Se colocan aproximadamente 500 µl de sangre en un tubo Microtainer que contiene EDTA (BD n.º 365973), y se mezcla la muestra vigorosamente.
- 15 5) Se realizan recuentos celulares diferenciales usando un sistema de hematología Advia 120 de Bayer.

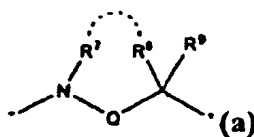
REIVINDICACIONES

1. Compuesto que tiene la fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

- 5 A es fenilo o un heteroarilo de seis miembros que contiene 1 ó 2 átomos de N, estando sustituidos el fenilo y heteroarilo con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄;
- B es fenilo o un heteroarilo de seis miembros que contiene 1 ó 2 átomos de N, estando sustituidos el fenilo y heteroarilo con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄;
- L es -C≡C-, -CH₂CH₂- o -N(R^a)C(=O)-;
- 10 R^a es, independientemente en cada caso; H o alquilo C₁₋₆; R¹ se selecciona de alquilo C₁₋₆, O-alquilo C₁₋₅, N(Ra)alquilo C₁₋₅, N(alquilo C₁₋₅)alquilo C₁₋₅, arilo o heteroarilo.
- X se selecciona de WC(=O)OR^{6a}, WP(=O)R^{6b}R^{6c}, WS(=O)₂OH, WCONHSO₃H o 1H-tetrazol-5-ilo; en el que W es un enlace directo, oxígeno o alquilo C₁₋₄ que tiene uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, OH, ciano, NR^aR^a, arilamino, heteroarilamino, O-alquilo C₁₋₄ y CO₂H; R^{6a} es hidrógeno o alquilo C₁₋₄; y
- 15 R^{6b} y R^{6c} son independientemente hidrógeno, OH, alquilo C₁₋₄ o haloalquilo C₁₋₄;
- Y es el residuo de fórmula (a) en la que los asteriscos izquierdo y derecho indican el punto de unión



en la que

- Q se selecciona de un enlace directo, C=O, C=S, SO₂, C=ONR^a o (CR¹⁰R¹¹)_m; y m es 0, 1, 2 ó 3;
- 20 R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, amino, alquilamino C₁₋₅, OH, ciano, alquilo C₁₋₆, alquilo C₁₋₆(OH), S-alquilo C₁₋₅, O-alquilo C₁₋₅, haloalquilo C₁₋₆ y O-alquilo C₁₋₅; o R⁷ y R⁸ pueden unirse junto con los átomos a los que están unidos para formar un anillo de 4 a 7 miembros, que tiene opcionalmente un heteroátomo seleccionado de N, O y S; y
- 25 R⁹ se selecciona de hidrógeno, halógeno, OH, ciano, alquilo C₁₋₆, S-alquilo C₁₋₅, O-alquilo C₁₋₅, haloalquilo C₁₋₆ u O-haloalquilo C₁₋₅;
- R¹⁰ y R¹¹ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, OH, ciano, alquilo C₁₋₆, O-alquilo C₁₋₅, S-alquilo C₁₋₅, haloalquilo C₁₋₆ u O-haloalquilo C₁₋₅ y
- Z¹ y Z² se seleccionan independientemente de O, NR³, S, S(=O), S(=O)₂, S(=O)₂NR³, (CR⁴R⁵)_n, C=O, C=S, C=N-R³, o un enlace directo, en el que
- 30 n es 0, 1, 2 ó 3;
- R³ se selecciona de hidrógeno, OH, SO₂, C=O, C=S, C=NH, alquilo C₁₋₆, O-alquilo C₁₋₅, S-alquilo C₁₋₅, haloalquilo C₁₋₆ y O-haloalquilo C₁₋₅, arilo o heteroarilo; o cuando Z² es un enlace directo, R³ es un anillo C₃C₆ que contiene opcionalmente un heteroátomo; y
- 35 R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, OH, ciano, alquilo C₁₋₆, O-alquilo C₁₋₅, S-alquilo C₁₋₅, haloalquilo C₁₋₆ y O-haloalquilo C₁₋₅, arilo y heteroarilo o juntos forman C=O.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que A es fenilo adicionalmente sustituido con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄.

3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que B es fenilo adicionalmente sustituido con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄.

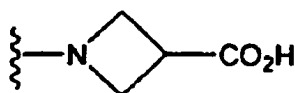
5 4. Compuesto según la reivindicación 1, en el que

A es fenilo adicionalmente sustituido con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄; y

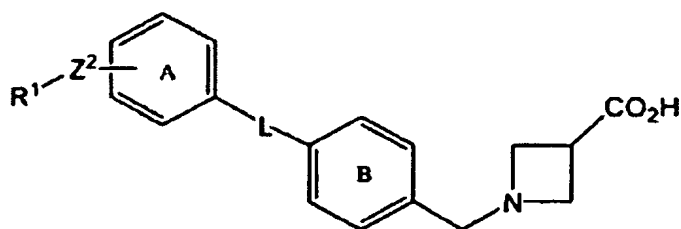
B es fenilo adicionalmente sustituido con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄.

10 5. Compuesto según la reivindicación 1, en el que L es -N(R^a)C(=O)-.

6. Compuesto según la reivindicación 1, en el que -Y-X es



7. Compuesto que tiene la fórmula



15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

A es fenilo o un heteroarilo de seis miembros que contiene 1 ó 2 átomos de N, estando sustituidos el fenilo y heteroarilo con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄;

B es fenilo o un heteroarilo de seis miembros que contiene 1 ó 2 átomos de N, estando sustituidos el fenilo y heteroarilo con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, O-alquilo C₁₋₄, alquilo C₁₋₄ y haloalquilo C₁₋₄;

20 L es -N(R^a)C(=O)-;

n es 0, 1, 2 ó 3;

R^a es, independientemente en cada caso, H o alquilo C₁₋₆;

R¹ se selecciona de alquilo C₁₋₆, O-alquilo C₁₋₅, N(R^a)alquilo C₁₋₅, N(alquilo C₁₋₅)alquilo C₁₋₅, arilo o heteroarilo.

25 Z² se selecciona de O, NR³, S, S(=O), S(=O)₂, S(=O)₂NR³, (CR⁴R⁵)_n, C=O, C=S, C=N-R³, o un enlace directo, en el que R³ se selecciona de hidrógeno, OH, SO₂, C=O, C=S, C=NH, alquilo C₁₋₆, O-alquilo C₁₋₅, S-alquilo C₁₋₅, haloalquilo C₁₋₆ y O-haloalquilo C₁₋₅, arilo o heteroarilo; o cuando Z² es un enlace directo, R³ es un anillo C₃-C₆ que contiene opcionalmente un heteroátomo; y

R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, OH, ciano, alquilo C₁₋₆, O-alquilo C₁₋₅, S-alquilo C₁₋₅, haloalquilo C₁₋₆ y O-haloalquilo C₁₋₅, arilo y heteroarilo, o juntos forman C=O.

30 8. Composición farmacéutica que comprende:

un compuesto según la reivindicación 1; y

un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

35 9. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento del rechazo de trasplantes relacionado con trasplante de órganos sólidos y células de los islotes; rechazo de trasplantes relacionado con tejido; artritis reumatoide; lupus; diabetes insulino dependiente; diabetes no insulino dependiente;

esclerosis múltiple; psoriasis; colitis ulcerosa; enfermedad inflamatoria del intestino; enfermedad de Crohn; o leucemias linfocíticas agudas y crónicas y linfomas.

5 10. Compuesto según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de rechazo de trasplantes relacionado con trasplante de órganos sólidos y células de los islotes; rechazo de trasplantes relacionado con tejido; artritis reumatoide; lupus; diabetes insulino dependiente; diabetes no insulino dependiente; esclerosis múltiple; psoriasis; colitis ulcerosa; enfermedad inflamatoria del intestino; enfermedad de Crohn; o leucemias linfocíticas agudas y crónicas y linfomas.

11. Compuesto según la reivindicación 1 seleccionado de ácido 1-(4-((4-bencilfenil)carbamoyl)-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxílico; y ácido 1-(4-(2-(5-bencilpiridin-2-il)etil)-3-fluorobencil)azetidín-3-carboxílico.