

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 004**

51 Int. Cl.:
A61K 31/4458 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)
A01N 43/40 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06719144 .5**
96 Fecha de presentación: **20.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1845780**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.10.2007**

54 Título: **USOS DE DERIVADOS DE METILFENIDATO.**

30 Prioridad:
20.01.2005 US 645778 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.01.2012

73 Titular/es:
**INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.
3531 SOUTH LOGAN STREET, SUITE D318
ENGLEWOOD CO 80110, US**

72 Inventor/es:
**BAR-OR, David y
MELAMED, Isaac**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 372 004 T3

DESCRIPCIÓN

Usos de derivados de metilfenidato

Campo de la invención

La invención se refiere a usos de derivados de metilfenidato. Estos usos incluyen inhibir las respuestas inmunes e inhibir la inflamación.

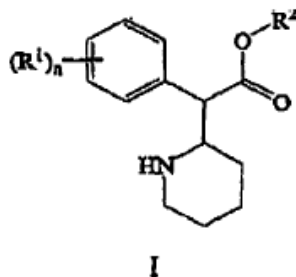
Antecedentes

Metilfenidato es el tratamiento de elección para niños y adultos a los que se les diagnostica déficit de atención/trastorno de hiperactividad (ADHD), incluyendo su subtipo sin atención (anteriormente conocido como trastorno por déficit de atención o ADD). También se han propuesto ciertos derivados de metilfenidato para el tratamiento de ADD (véase la Patente Estadounidense Núm. 6.025.502) y para el tratamiento de otros trastornos y afecciones neurológicas (véase las Patentes Estadounidenses Núm. 5.859.249, 6.025.502 y 6.486.177 y solicitud PCT WO 99/36403).

Se han realizado experimentos para examinar los efectos del metilfenidato en el sistema inmune, y se han informado resultados contradictorios. Véase Auci et al., J. Am. Acad Child Ado/esc. Psychiatry, 36, 1015-1016 (agosto de 1997) y la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense Núm. 2005/0192290.

Resumen de la invención

La invención proporciona un compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para el uso en el tratamiento de una enfermedad o afección según lo detallado en las reivindicaciones, en el que la fórmula I es:



en la que n es 1 R¹ es arilo C₆ a C₁₄ o ariloxi C₆ a C₁₄ y R² es metilo.

Específicamente, en una primera realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en la inhibición de una respuesta inmune en un animal.

En una segunda realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en la inhibición de la activación de células T en un animal.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección mediada por células T en un animal.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en la inhibición de la activación de monocitos en un animal.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en la inhibición de la producción y/o liberación de una citocina proinflamatoria en un animal.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en la inhibición de la producción y/o liberación de IL-8 en un animal.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en la inhibición de la producción y/o liberación de IL-13 en un animal.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en la inhibición de la producción y/o liberación de interferón gamma (IFNγ) en un animal.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en la inhibición de la producción y/o liberación de factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) en un animal.

Aún en otra realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en la inhibición de

inflamación en un animal.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección inflamatoria en un animal.

5 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en la inhibición de la proliferación no deseada de linfocitos en un animal.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en la inhibición de la adhesión no deseada de linfocitos en un animal.

10 Se cree que los compuestos de fórmula I son estimulantes del sistema nervioso central e inhibidores de la captación de dopamina. Por consiguiente, en otra realización que no está en conformidad con la invención, la invención proporciona un procedimiento para tratar un animal que sufre de enfermedades o afecciones comórbidas, en el que (1) una de las enfermedades o afecciones es una enfermedad o afección neurológica que es tratable con un estimulante del sistema nervioso central o un inhibidor de captación de dopamina y (2) una segunda enfermedad o afección es una enfermedad o afección inflamatoria o inmune.

"Inhibir" se utiliza en la presente memoria para significar reducir (totalmente o parcialmente) o prevenir.

15 "Mediada" se utiliza en la presente memoria para significar que involucra, causada por o exacerbada por.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-C son gráficos de DO a 530 nm para diversos aditivos para cultivos de linfocitos de sangre periférica (PBL) estimulados con 2 µg/ml, 5 µg/ml y 20 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA), respectivamente.

20 La Figura 2 es un gráfico de DO a 530 nm para diversos aditivos para cultivos de PBL estimulados con 2 µg/ml de PHA.

La Figura 3 es un gráfico de concentración de IL-13 para diversos aditivos para cultivos de PBL estimulados con 2 µg/ml de PHA.

La Figura 4 es un gráfico de concentración de IFNγ para diversos aditivos para cultivos de PBL estimulados con 2 µg/ml PHA.

25 Las Figuras 5A-B son gráficos de DO a 530 nm para diversos aditivos para cultivos de PBL estimulados con 2 µg/ml y 5 µg/ml de PHA, respectivamente.

La Figura 6 es un gráfico de concentración de IL-13 para diversos aditivos para cultivos de PBL estimulados con 5 µg/ml de PHA.

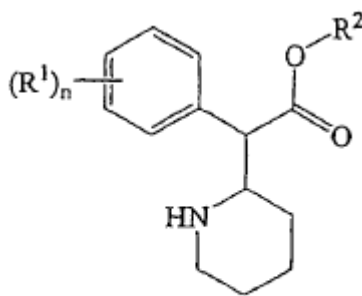
30 La Figura 7 es un gráfico de concentración de TNFα para diversos aditivos para cultivos de PBL estimulados con 2 µg/ml de PHA.

La Figura 8 es un gráfico de concentración de IL-8 para diversos aditivos para cultivos de PBL estimulados con 2 µg/ml de PHA.

35 Las Figuras 9A-B son gráficos de DO para diversos aditivos para cultivos de monocitos THP-1 estimulados con lipopolisacárido (LPS). En la Figura 9B, la barra gris oscuro superior en cada caso es c-Jun y la barra gris claro inferior es NFκB.

Descripción detallada de la invención

Los compuestos de fórmula I se utilizan en la práctica de la presente invención.



I

En la Fórmula I, n es 1.

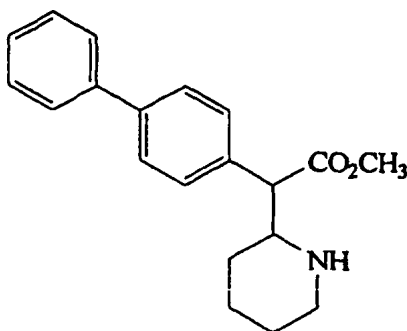
R¹ es arilo C₆ a C₁₄, o ariloxi C₆ a C₁₄,

Mucho más preferentemente R¹ es fenilo.

5 En la fórmula I,

R² es -CH₃.

En una realización específica, el compuesto de fórmula II es particularmente útil en la presente invención:



II

"Acilo" significa un resto de la fórmula -C(O)-R³, en el que R³ es H, alquilo, cicloalquilo o arilo.

10 "Amino" significa un resto de la fórmula -NR⁴R⁵, en el que cada uno de R⁴ y R⁵ es independientemente H o alquilo, preferentemente alquilo inferior.

"Alcoxi" significa un resto de la fórmula -OR⁶, en el que R⁶ es un alquilo. Un ejemplo de un grupo alcoxi es metoxi (-O-CH₃).

15 "Alquilo" significa un hidrocarburo ramificado o de cadena lineal saturado monovalente que contiene 1-8 átomos de carbono. Cada alquilo puede, opcionalmente, sustituirse con uno o más grupos amino, hidroxilo o sulfhidrilo.

"Arilo" significa un resto de hidrocarburo aromático mono, bi o tricíclico monovalente de 6 a 14 átomos de carbono anulares. Fenilo es preferente.

"Arioxi" significa un resto de la fórmula -OR⁷, en el que R⁷ es un arilo. Un ejemplo de un grupo arioxi es fenoxi.

"Carboxilo" significa un resto de la fórmula -C(O)-O-R³, en el que R³ es H, un alquilo, cicloalquilo o arilo.

20 "Cicloalquilo" significa un resto de hidrocarburo mono o bicíclico, monovalente, saturado de tres a diez átomos de carbono anulares. Preferentemente el cicloalquilo contiene 4-8 átomos de carbono anulares. El cicloalquilo mucho más preferente es ciclohexilo.

"Halógeno" significa cloro, flúor, bromo o yodo. Cloro o bromo es preferente.

25 "Heteroarilo" significa un resto aromático monocíclico o bicíclico, monovalente de 5 a 12 átomos anulares que contiene uno, dos, o tres heteroátomos anulares cada uno de los que independientemente se selecciona de N, O y S, en el que los átomos anulares restantes son C.

"Hidroxilo" significa -OH.

"Alquilo inferior" significa un hidrocarburo ramificado o de cadena lineal saturado que contiene 1-4 átomos de carbono.

"Nitro" significa -NO₂.

5 "Sulfhidrilo" significa -SH.

"Sulfo" significa -SO₃H.

"Profármaco" significa cualquier compuesto que libera un fármaco padre activo de acuerdo a la fórmula I in vivo cuando dicho profármaco se administra a un individuo mamífero. Los profármacos de un compuesto de fórmula I que no son de acuerdo a la invención se preparan mediante la modificación de uno o más grupos funcionales presentes en el compuesto de fórmula I de tal manera que la/s modificación/es puede/n escindirse in vivo para liberar el compuesto padre. Los profármacos incluyen los compuestos de fórmula I en los que un grupo hidroxí, amino, o sulfhidrilo en un compuesto de fórmula I está unido a cualquier grupo que puede ser escindido in vivo para generar el grupo hidroxilo, amino, o sulfhidrilo libre, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan a, ésteres (por ejemplo, derivados de acetato, formiato, y benzoato), carbumatos (por ejemplo, N,N-dimetilaminocarbonilo) de grupos funcionales hidroxí en compuestos de fórmula I, y similares.

"Tratar" o "tratamiento" de una enfermedad o afección incluye: (1) prevenir la enfermedad o afección, es decir, hacer que los síntomas clínicos de la enfermedad o afección no se desarrollen en un mamífero que puede estar expuesto a o predispuesto a la enfermedad o afección, pero aún no experimenta o muestra los síntomas de la enfermedad o afección; (2) inhibir la enfermedad o afección, es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o afección o sus síntomas clínicos; o (3) aliviar la enfermedad o afección, es decir, causar la regresión de la enfermedad o afección o sus síntomas clínicos, incluyendo curar la enfermedad o afección.

Una "cantidad efectiva" significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un animal para tratar una enfermedad o afección o hacer que un efecto sea suficiente para hacerlo. La "cantidad efectiva" puede y muy posiblemente variará dependiendo del compuesto, la enfermedad o afección y su severidad, o el efecto que se busca causar, y la edad, peso, etc., del animal que debe ser tratado.

Los procedimientos para sintetizar los compuestos de fórmula I útiles en la presente invención son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Núm. 5.859.249 y 6.025.502, solicitud PCT WO 99/36403, Pan et al., Eur. J Pharmacol., 264, 177-182 (1994), Gatley et al., Life Sci., 58, 231-239 (1996), Deutsch et al. J. Med. Chem., 39, 1201-1209 (1996), Thai et al., J. Med. Chem., 41, 591-601 (1998), y Wayment et al., J. Neurochem., 72:1266-1274 (1999), Krim, Lori, Thesis (Ph.D. in Chemistry) (2001), University Of Pennsylvania, Chemistry Library Reading Room (Call No. QD001 2001.K92), University Microfilms Order No. 3031684, ISBN 0-493-44179-4.

Si el compuesto de la presente invención contiene uno o más centros quirales, el compuesto puede sintetizarse enantioselectivamente o puede prepararse y separarse una mezcla de enantiómeros y/o diastereómeros. La resolución de los compuestos de la presente invención, sus materiales de etapas y/o los intermedio puede llevarse a cabo mediante procedimientos conocidos, por ejemplo, según lo que se describe en el compendio volumen cuatro Optical Resolution Procedures for Chemical Compounds: Optical Resolution Information Center, Manhattan College, Riverdale, N.Y., y en Enantiomers, Racemates and Resolutions, Jean Jacques, Andre Collet y Samuel H. Wilen; John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1981, que se incorporan en la presente memoria en su totalidad. Básicamente, la resolución de los compuestos se basa en las diferencias en las propiedades físicas de diastereómeros mediante unión, ya sea químicamente o enzimáticamente, de un resto enantioméricamente puro, dando como resultado formas que son separables mediante cristalización fraccionaria, destilación o cromatografía.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I también pueden utilizarse en la práctica de la invención. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales convencionales no tóxicas, tales como sales obtenidas de ácidos inorgánicos (tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, y similares), ácidos orgánicos (tales como ácido acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, glutámico, aspártico, benzoico, salicílico, oxálico, ascórbico, y similares) o bases (tales como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un cation metálico farmacéuticamente aceptable o cationes orgánicos obtenidos de N,N-dibenciletilendiamina, D-glucosanina, o etilendiamina). Las sales se preparan en una forma convencional, por ejemplo, mediante la reacción de la forma de base libre del compuesto con un ácido.

Se debe entender que el ámbito de la presente invención abarca no sólo el uso de los mismos compuestos de fórmula I, sino también las sales de los mismos. Además, la presente invención contempla el uso de los isómeros de los compuestos de fórmula I, y de las sales de los mismos, incluyendo isómeros puros y diversas mezclas de isómeros.

55 Los compuestos de fórmula I, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden utilizarse como inmunosupresores. Estos compuestos inhiben una amplia variedad de respuestas inmune.

Por ejemplo, un compuesto de fórmula I puede utilizarse para inhibir la activación de células T y para tratar enfermedades mediadas por células T. Las enfermedades mediadas por células T tratables de acuerdo a la invención incluyen rechazo de injerto, enfermedad de injerto versus huésped, reacciones por hipersensibilidad de tipo retardadas no deseadas (tales como reacciones alérgicas de tipo retardadas), enfermedades pulmonares mediadas por células T, enfermedades autoinmunes e inflamación mediada por células T. Las enfermedades pulmonares mediadas por células T incluyen sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, neumonitis intersticial aguda, alveolitis, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática y otras enfermedades caracterizadas por daño pulmonar inflamatorio. La enfermedades autoinmunes incluyen esclerosis múltiple, neuritis, polimiositis, psoriasis, vitiligo, síndrome de Sjogren, artritis reumatoidea, diabetes tipo 1, pancreatitis autoinmune, enfermedades inflamatorias de intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa), enfermedad celíaca, glomerulonefritis, escleroderma, sarcoidosis, enfermedades autoinmunes tiroideas (por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Graves), miastenia grave, enfermedad de Addison, uveoretinitis autoinmune, pénfigo vulgar, cirrosis biliar primaria, anemia perniciosa, y lupus eritematoso sistémico.

Un compuesto de fórmula I también puede utilizarse para inhibir la producción, liberación, o ambos, de las citocinas, incluyendo interleucina-8 (IL-8), IL-13, interferón gamma (IFN γ) y factor alfa de necrosis tumoral (TNF α). IL-8 es una citocina proinflamatoria y un potente quimioatrayente y activador de neutrófilos. También se ha informado que es un quimioatrayente y activador de linfocitos T y eosinófilos. IL-8 se produce mediante células inmunes (incluyendo linfocitos, neutrófilos, monocitos y macrófagos), fibroblastos y células epiteliales. IL-13 se produce mediante las células T_{H2} activadas, y las dianas primarias de IL-13 son las células B y los monocitos. IL-13 estimula las respuestas inmunes humorales, y ha estado implicada en la patogénesis de asma. IFN γ y TNF α son ambas citocinas proinflamatorias producidas por células T activadas y otras células. TNF α rápidamente activa los factores de transcripción NF κ B y AP-1, hace que las células endoteliales expresen moléculas de adhesión, y puede tener un papel en el reclutamiento de células inmunes a los sitios de inflamación. IFN γ puede activar neutrófilos, células endoteliales y macrófagos, así como causar un incremento en la expresión de moléculas MHC. IFN γ impulsa la respuesta inmune mediada por células.

Un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede utilizarse para inhibir la inflamación y para tratar enfermedades y afecciones inflamatorias. Una enfermedad o afección inflamatoria es una enfermedad o afección que incluye, o es causada o exacerbada por, inflamación. Las enfermedades y afecciones inflamatorias específicas tratables con un compuesto de la presente invención incluyen síndrome de dificultad respiratoria aguda, alergias, artritis, asma, autismo, enfermedades autoinmunes (por ejemplo, esclerosis múltiple y lupus eritematoso sistémico), bronquitis, cáncer, enfermedad de Crohn, fibrosis quística, enfisema, endocarditis, gastritis, infecciones (bacteriana, viral, por levaduras, micótica y parasitaria), enfermedad inflamatoria del intestino, trastornos inflamatorios de piel, isquemia, reperusión, síndrome de disfunción orgánica múltiple, falla orgánica múltiple, nefritis, enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson y demencia), pancreatitis, psoriasis, infecciones respiratorias virales, sepsis, conmoción cerebral, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, trauma, colitis ulcerativa y otras enfermedades, afecciones y trastornos inflamatorios. Los compuestos de la presente invención, incluyendo sus sales farmacéuticamente aceptables, serán especialmente útiles para tratar enfermedades y afecciones neurológicas inflamatorias, tales como autismo, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, demencia senil y demencia asociada a infecciones por HTV.

Un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede utilizarse para inhibir la proliferación no deseada de linfocitos. La proliferación no deseada de linfocitos se produce en, por ejemplo, ciertos tipos de cáncer (por ejemplo, timomas, linfomas y leucemias) e inflamación.

Un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede utilizarse para inhibir la adhesión no deseada de linfocitos. La adhesión no deseada de linfocitos está incluida en, por ejemplo, inflamación, enfermedades y afecciones inflamatorias, y respuestas inmunes.

Además de las actividades descritas más arriba, se cree que los compuestos de la presente invención son estimulantes del sistema nervioso central e inhibidores de la captación de dopaminas. Por consiguiente, los mismos serán especialmente útiles para tratar un animal que sufre de enfermedades o afecciones comórbidas que no están en conformidad con la invención en el que (1) una de las enfermedades o afecciones es una enfermedad o afección neurológica tratable con un estimulante del sistema nervioso central o un inhibidor de captación de dopamina y (2) una segunda enfermedad o afección es una enfermedad o afección inmune o inflamatoria. Las enfermedades y afecciones neurológicas tratables con un estimulante del sistema nervioso central incluyen ADHD, depresión, disforia, narcolepsia, fatiga (por ejemplo, debido a la quimioterapia o tratamiento con analgésicos narcóticos), hipersomnia, trastornos cognitivos, trastorno de compra compulsiva. Las enfermedades y afecciones neurológicas tratables con un inhibidor de captación de dopamina incluyen abuso o adicción de cocaína y enfermedad de Parkinson (solo o en combinación con dopa, levodopa u otro precursor de dopamina). Las enfermedades y afecciones inflamatorias e inmunes incluyen aquellas descritas más arriba. En una realización particularmente preferente, los compuestos de la presente invención y sus sales farmacéuticamente aceptables se utilizarán para tratar ADHD comórbido y alergias.

Para tratar un animal que necesita tratamiento, un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra al animal. Preferentemente, el animal es un mamífero, tal como un conejo, cabra, perro, gato, caballo o ser humano. Mucho más preferentemente, el animal es un ser humano.

Las formas de dosificación efectivas, modos de administración y cantidades de dosificación para los compuestos de la invención pueden determinarse empíricamente, y tomar dichas determinaciones está dentro de la destreza de la técnica. Aquellos expertos en la técnica entienden que la cantidad de dosificación variará con el compuesto particular empleado, la enfermedad o afección que debe ser tratada, la severidad de la enfermedad o afección, la/s vía/s de administración, la tasa de excreción del compuesto, la duración del tratamiento, la identificación de cualquier otro ingrediente activo que esté siendo administrado al animal, la edad, tamaño y especie del animal, y factores similares conocidos en la técnica médica y veterinaria. En general, una dosis diaria apropiada de un compuesto de la presente invención será esa cantidad del compuesto que sea la menor dosis efectiva para producir un efecto terapéutico. Sin embargo, la dosificación diaria será determinada por el médico o veterinario tratante dentro del ámbito del juicio médico sensato. Si se desea, la dosis diaria efectiva puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sub-dosis, administradas en forma separada en intervalos apropiados en todo el día. La administración del compuesto debe ser continua hasta que se logre una respuesta aceptable.

Los compuestos útiles en la presente invención (es decir, los compuestos de fórmula I y las sales farmacéuticamente aceptables) pueden administrarse a un paciente animal para terapia mediante una vía de administración apropiada, incluyendo por vía oral, nasal, rectal, vaginal, parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa, intraespinal, intraperitoneal, subcutánea, o intramuscular), intracisternal, transdérmica, intracranial, intracerebral, y tópica (incluyendo por vía bucal y sublingual). La vía de administración preferente es por vía oral.

Si bien es posible que un compuesto útil en la presente invención sea administrado solo, es preferente administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición). Las composiciones farmacéuticas útiles en la invención comprenden uno o más compuestos de fórmula I, sales farmacéuticamente aceptables como ingrediente/s activo/s en mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, con uno o más otros compuestos, ingrediente/s activo/s u otros materiales. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de que sea compatible con los otros ingredientes de la formulación y no dañino para el animal. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Sin importar la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención son formulados para generar formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos convencionales conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences.

Las formulaciones de la invención apropiadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, polvos, gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o una emulsión de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (mediante la utilización de una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia), y similares, en los que cada uno contiene una cantidad predeterminada de un compuesto o compuestos útiles en la presente invención como ingrediente activo. Un compuesto o compuestos útiles en la presente invención también pueden administrarse como bolo, electuario o pasta.

En las formas de dosificación sólidas para la administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el/los ingrediente/s activo/s se mezcla/n con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: (1) agentes de carga o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinil pirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato de sodio; (5) agentes retardadores de solución, tales como parafina; (6) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monosterato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato sódico, y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tampones. Las composiciones sólidas de un tipo similar pueden emplearse como agentes de carga en cápsulas de gelatina con relleno blandas o duras mediante la utilización de dichos excipientes como lactosa o azúcares de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Un comprimido puede fabricarse mediante compresión o moldeo opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos obtenidos por compresión pueden prepararse mediante la utilización de agente aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato de almidón sódico o carboximetilcelulosa sódica reticulada), tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse mediante el moldeo en una máquina apropiada de una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos, y otras formas de dosificación sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, opcionalmente pueden lograrse o prepararse con

revestimientos y envolturas, tales como revestimientos entéricos y otros revestimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. También pueden formularse para proporcionar la liberación lenta o controlada del ingrediente activo en el mismo mediante la utilización de, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas.

Los mismos pueden esterilizarse mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención bacteriana. Estas composiciones también pueden opcionalmente contener agentes opacificantes y pueden tener una composición de manera que liberen solamente el ingrediente activo, o preferencialmente, en una cierta porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, en una forma retardada. Los ejemplos de composiciones incorporadas que pueden utilizarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El ingrediente activo también puede estar en forma microencapsulada.

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral de los compuestos de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de el/los ingrediente/s activo/s, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, semilla de algodón, maní, maíz, germen, oliva, aceites de castor y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitan, y mezclas de los mismos.

Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, aromatizantes y conservantes.

Las suspensiones, además de el/los compuesto/s activo/s (s), pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isosteáricos etoxilados, ésteres de polioxietileno sorbitol y sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas para la administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio, que puede prepararse mediante la mezcla de uno o más compuestos de la invención con uno o más excipientes o vehículos no irritantes apropiados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera para supositorio o salicilato, y que es sólida a temperatura ambiente, pero líquida a temperatura corporal y, por ello, se derretirá en el recto o cavidad vaginal y liberará el compuesto activo. Las formulaciones de la presente invención que son apropiadas para la administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de sprays que contienen dichos vehículos que son conocidos en la técnica por ser apropiados.

Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de los compuestos útiles en la presente invención incluyen polvos, sprays, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches, gotas e inhalantes. El/los ingrediente/s activo/s puede/n mezclarse en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier tampón, o propulsor que pueda requerirse.

Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de el/los ingrediente/s activo/s, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos.

Los polvos y sprays pueden contener, además de el/los ingrediente/s activo/s, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y poliamida en polvo o mezclas de estas sustancias. Los sprays adicionalmente pueden contener propulsores usuales tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar la administración controlada de los compuestos de la invención al cuerpo. Dichas formas de dosificación pueden fabricarse mediante la disolución, dispersión o de otra manera la incorporación de uno o más compuestos de la invención en un medio adecuado, para incrementar el flujo del compuesto en toda la piel. La velocidad de dicho flujo puede controlarse mediante la provisión de una membrana controladora de velocidad o la dispersión del compuesto en una matriz polimérica o gel.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen aquellas apropiadas para la administración mediante inhalación o insuflación o para la administración nasal o intraocular. Para la administración al tracto respiratorio inferior o superior (nasal) mediante inhalación, los compuestos de la invención convenientemente se administran desde un insuflador, nebulizador o un pack presurizado u otro medio conveniente para administrar spray en aerosol. Los packs presurizados pueden comprender un propulsor apropiado tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono, u otro gas apropiado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse mediante la provisión de una válvula para administrar una cantidad medida.

Alternativamente, para la administración mediante inhalación o insuflación, la composición puede tomar la forma de un polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo de uno o más compuestos de la invención y una base en polvo apropiada, tal como lactosa o almidón. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosificación unitaria

en, por ejemplo, cápsulas o cartuchos, o, por ejemplo, gelatina o packs de blister de los que el polvo puede administrarse con la ayuda de un inhalador, insuflador o un inhalador de dosis medida.

Para la administración intranasal, los compuestos útiles en la invención pueden administrarse mediante gotas nasales o un spray líquido, tal como mediante un atomizador de botella de plástico o inhalador de dosis medida. Los atomizadores típicos son Mistometer (Wintrop) y Medihaler (Riker).

Las gotas, tales como gotas de ojos y gotas nasales, pueden formularse con una base acuosa o no acuosa que también comprende uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes o agentes de suspensión. Los sprays líquidos convenientemente se administran a partir de packs presurizados. Las gotas pueden administrarse mediante una simple botella tapada con gotero para ojos o mediante una botella de plástico para administrar contenidos líquidos en gotas y mediante un cierre con forma especial.

Las composiciones farmacéuticas apropiadas para las administraciones parenterales comprenden uno o más compuestos útiles en la invención en combinación con una o más soluciones acuosas o no acuosas isotónicas estériles, dispersiones, suspensiones o emulsiones, o polvos estériles farmacéuticamente aceptables que pueden ser reconstituídos en soluciones inyectables estériles o dispersiones justo antes del uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes.

Los ejemplos de vehículos acuoso y no acuosos apropiados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas apropiadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede lograrse mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monosterato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, para prolongar el efecto de el/los ingrediente/s activo/s, es deseable disminuir la velocidad de la absorción de el/los ingrediente/s activo/s de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción de el/los ingrediente/s activo/s después depende de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño de cristal y forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de un ingrediente activo administrado por vía parenteral se logra mediante la disolución o suspensión de el/los ingrediente/s activo/s en un vehículo aceitoso.

Las formas de depósito inyectables se fabrican mediante la formación de matrices de microcápsula de el/los ingrediente/s activo/s en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación de ingrediente/s activo/s y polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, la velocidad de liberación de el/los ingrediente/s activo/s puede controlarse. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones de depósito inyectables también se preparan atrapando el/los ingrediente/s activo/s en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido del cuerpo. Los materiales inyectables pueden esterilizarse por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriana.

Las formulaciones pueden presentarse en recipientes sellados de múltiples dosis o dosis unitarias, por ejemplo, ampollas y viales, y pueden almacenarse en una condición liofilizada que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente previo al uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito más arriba.

Los objetos, ventajas y nuevas características de la presente invención serán evidentes para aquellos con experiencia en la técnica con el examen de los siguientes ejemplos de los mismos, que no tienen como objeto ser restrictivos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se extrajo sangre completa de GR283, un voluntario humano con alergias conocidas, en un tubo de vacutainer de vidrio que no contenía ningún anticoagulante. Se dejó que esta sangre coagule, y se eliminó el suero mediante centrifugación y después se inactivó con calor mediante la colocación de la misma en un baño de agua a 56°C durante 30 minutos. También se extrajo sangre completa de GR283 en un tubo de vacutainer de vidrio que contenía heparina y se utilizó para el aislamiento de linfocitos de sangre periférica (PBL) de la siguiente manera. La sangre

completa se colocó en capas sobre solución Histopaque 1077 a temperatura ambiente y se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se eliminaron las células en la interfaz de plasma-Histopaque y se lavaron con medio de cultivo (medio IMDM con suero de GR283 inactivado con calor al 10% más penicilina/estreptomicina al 1%) a 37 °C.

- 5 Se añadieron el compuesto de fórmula II (véase más arriba) y metilfenidato (ambos obtenidos de Dr. Jeffrey D. Winkler, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania) en medio de cultivo a pocillos de una placa de 96 pocillos para dar las concentraciones finales de 5 µg/ml, 15 µg/ml y 50 µg/ml del compuesto de fórmula II de metilfenidato. Se utilizaron agua de 18 MΩ estéril, el disolvente para el compuesto de fórmula II, y dexametasona (obtenida de Sigma) (concentración final de 10 µg/ml en agua) como controles. Después, Se añadieron los PBL de GR283 en medio de cultivo a los pocillos para dar una concentración final de 150.000 células por pocillo, y se incubaron las placas a 37°C, CO₂ al 5% durante 24 horas. Después de esta incubación, se añadió fitohemaglutinina (PHA) en medio de cultivo para dar concentraciones finales de 2 µg/ml, 5 µg/ml o 20 µg/ml, volumen final total de 200 µl/pocillo, y se incubaron las células durante 72 horas adicionales a 37°C, CO₂ al 5%. Todos los cultivos se realizaron por triplicado.
- 10
- 15 Al final de esta incubación, se examinó la agregación celular mediante el fotografiado de pocillos representativos con una cámara digital montada a un microscopio invertido. El compuesto de fórmula II redujo la cantidad de agregación celular inducida por 5 µg/ml de PHA en forma dependiente de la dosis. El compuesto de fórmula II atenuó la agregación celular, presumiblemente, como resultado de una disminución en la expresión de moléculas de adhesión celular en las superficies de las células.
- 20 Se ensayó la proliferación celular mediante la adición de 20 µl de solución de titulación celular Promega a cada pocillo y mediante la incubación de la placa durante 4 horas adicionales. La solución de titulación celular Promega es una solución que contiene una tintura de tetrazolio que es reducida por las células vivientes a una tintura de formazano, y esta reducción es proporcional al número de células vivientes presentes en el pocillo. Después de la incubación de 4 horas, se midió la densidad óptica (DO) a 530 nm de cada pocillo. La DO a 530 nm para los pocillos para el blanco que no contenían ninguna célula se sustrajo de la DO de los pocillos experimentales. Los resultados de los ensayos de proliferación se presentan en las Figuras 1A-C. Tal como puede observarse a partir de las Figuras 1A-C, el compuesto de fórmula II (Comp. II) y dexametasona (Dex) inhibieron significativamente la proliferación de PBL estimulados con PHA en una forma dependiente de la dosis. El metilfenidato (MP) mostró un efecto significativo en su dosis más alta y la dosis más baja de PHA. Por el contrario, el metilfenidato no redujo significativamente la proliferación de PBL estimulados con PHA.
- 25
- 30

Ejemplo 2

- Se extrajo sangre completa de GR467, un voluntario humano con alergias conocidas, y se procedió según lo que se describe en el Ejemplo 1 para dar suero inactivado con calor y PBL. El compuesto de fórmula II y el metilfenidato en medio de cultivo (fabricado mediante la utilización de suero de GR467 inactivado con calor) se añadieron a los pocillos de una placa de 96 pocillos para dar concentraciones finales de 5 µg/ml, 15 µg/ml y 25 µg/ml del compuesto de fórmula II y 15 µg/ml de metilfenidato. Se utilizaron agua y dexametasona (concentración final de 10 µM) como controles. Después, se añadieron los PBL de GR467 en medio de cultivo a los pocillos para dar una concentración final de 150.000 células por pocillo, y se incubaron las placas a 37°C, CO₂ al 5% durante 24 horas. Después de esta incubación, se añadió PHA para dar una concentración final de 2 µg/ml, volumen final total de 200 µl/pocillo, y se incubaron las células durante 72 horas adicionales a 37°C, CO₂ al 5%. Todos los cultivos se realizaron por triplicado.
- 35
- 40

Al final de esta incubación, se determinó la proliferación celular según lo que se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se presentan en la Figura 2. Tal como puede observarse a partir de la Figura 2, el compuesto de fórmula II (Comp. II) y dexametasona (Dex) inhibieron significativamente la proliferación de PBL, ambos no estimulados y estimulados con PHA, mientras que el metilfenidato no lo hizo.

- 45 La liberación de citocinas mediante los PBL también se midió mediante el cultivo de PBL en tubos de 1 ml, a 1,3 x 10⁶ células por ml, con 15 µg/ml del compuesto de fórmula II, 15 µg/ml de metilfenidato o 10 µM de dexametasona a 37°C, CO₂ al 5% durante 24 horas. Después de esta incubación, se añadió PHA para dar una concentración final de 2 µg/ml, y se incubaron las células durante 96 horas adicionales a 37°C, CO₂ al 5%. Todos los cultivos se realizaron por triplicado. Después se eliminaron las células mediante centrifugación a 1000 r.p.m. durante 10 minutos, y se recolectó el medio de cultivo.
- 50

- Se midió la liberación de IL-13 e interferón gamma (IFNγ) en el medio de cultivo mediante ELISA. Para llevar a cabo ELISA, se compraron pares apareados de anticuerpos contra IL-13 e IFNγ humana en Pierce Biotechnology y Biosource, respectivamente. Las placas de pocillos con tira para ELISA se revistieron con 10 µg/ml de anticuerpo (en solución salina tamponada con fosfato (PBS)) contra IL-13 y 4 µg/ml de anticuerpo contra IFNγ (en PBS) durante toda la noche a temperatura ambiente. Después se bloquearon las placas mediante la utilización de una solución de BSA al 4% en PBS durante una hora, seguido por la adición de 50 µl de medio de cultivo experimental por pocillo por duplicado. Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante una hora y después se lavaron mediante la utilización de 50 mM de Tris pH 8,0 con Tween 20 al 0,1%. Después, soluciones de 400 ng/ml del segundo anticuerpo biotinilado contra IL-13 y 500 ng/ml segundo anticuerpo biotinilado contra IFNγ se convirtieron en tampón
- 55

de bloqueo, y se añadieron 100 µl por pocillo. Se incubaron las placas durante 1 hora y se lavaron nuevamente. Un conjugado de dilución 1:8000 de estreptavidina HRP (Pierce Biotechnology) se convirtió en tampón de bloqueo, y se añadieron 100 µl a los pocillos y la incubación continuó durante 30 minutos. Se llevó a cabo una etapa de lavado final, después del que se añadieron 100µl de sustrato TMB de Pierce Biotechnology a cada pocillo. Se desarrolló el color durante 30 minutos y se interrumpió mediante la adición de 100 µl de H₂SO₄ 0,18 N. Se determinó la DO mediante la utilización de lector de microplaca con filtro a 450 nM.

Los resultados para IL-13 se muestran en la Figura 3. Tal como puede observarse, el compuesto de fórmula II (Comp. II) y la dexametasona (Dex) inhibieron significativamente la liberación de IL-13 inducida por PHA. El metilfenidato (MP) no inhibió la liberación de IL-13. En efecto, el metilfenidato incrementó la liberación de IL-13 mediante células estimuladas con PHA.

Los resultados para IFN γ se muestran en la Figura 4. Tal como puede observarse, el compuesto de fórmula II (Comp. II) y la dexametasona (Dex) inhibieron significativamente la liberación de IFN γ tanto en células no estimuladas como en células estimuladas con PHA. El metilfenidato (MP) tuvo algún efecto en la liberación de IFN γ mediante las células no estimuladas, pero no suprimió significativamente la liberación de IFN γ de las células estimuladas con PHA. En efecto, el metilfenidato incrementó la liberación de IFN γ mediante las células estimuladas con PHA.

Ejemplo 3

Se extrajo sangre completa de GR191, un voluntario humano normal, y se procedió según lo que se describe en el Ejemplo 1 para dar suero inactivado con calor y PBL. Se añadieron el compuesto de fórmula II y metilfenidato en medio de cultivo (fabricado mediante la utilización de suero de GR191 inactivado con calor) a pocillos de una placa de 96 pocillos para dar concentraciones finales de 5 µg/ml, 15 µg/ml, 25 µg/ml y 50 µg/ml del compuesto de fórmula II y 50 µg/ml de metilfenidato. Se utilizaron agua, factor de crecimiento nervioso de ratón (Upstate Biotechnology, Inc) (NGF) (concentración final de 250 ng/ml) y dexametasona (concentración final de 10 µM) como controles. Después, se añadieron PBL de GR191 en medio de cultivo a los pocillos para dar una concentración final de 150.000 células por pocillo, y se incubaron las placas a 37°C, CO₂ al 5% durante 24 horas. Después de esta incubación, se añadió PHA para dar concentraciones finales de 2 µg/ml y 5 µg/ml, volumen final total de 200 µl/pocillo, y se incubaron las células durante 72 horas adicionales a 37°C, CO₂ al 5%. Todos los cultivos se realizaron por triplicado.

Al final de esta incubación, se determinó la proliferación celular según lo que se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se presentan en las Figuras 5A-B. Tal como puede observarse a partir de las Figuras 5A-B, el compuesto de fórmula II (Comp. II) y dexametasona (Dex) inhibieron significativamente la proliferación de PBL, tanto no estimulados como estimulados con PHA, mientras que el metilfenidato (MP) no lo hizo.

También se midió la liberación de citocinas mediante los PBL mediante el cultivo de PBL en tubos de 1 ml, a 1×10^6 células por ml, con 15 µg/ml y 50 µg/ml del compuesto de fórmula II o 10 µM de dexametasona a 37°C, CO₂ al 5% durante 24 horas. Después de esta incubación, se añadió PHA para dar una concentración final de 5 µg/ml, y se incubaron las células durante 72 horas adicionales a 37°C, CO₂ al 5%. Todos los cultivos se realizaron por triplicado. Después se eliminaron las células mediante centrifugación a 1000 r.p.m. durante 10 minutos.

Se recolectaron los sobrenadantes, y se midieron las concentraciones de IL-13 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en los sobrenadantes mediante ELISA. ELISA de IL-13 se llevó a cabo según lo que se describe en el Ejemplo 2. Los resultados se presentan en la Figura 6. Tal como puede observarse en la Figura 6, el compuesto de fórmula II (Comp. II) y dexametasona (Dex) inhibieron significativamente la liberación de IL-13 de los PBL estimulados con PHA.

ELISA para TNF α se llevó a cabo según lo que se describe en el Ejemplo 2 mediante la utilización de anticuerpos de pares apareados de Pierce Endogen (2 µg/ml para el anticuerpo de revestimiento y 250 ng/ml para el segundo anticuerpo). Los resultados se presentan en la Figura 7. Tal como puede observarse en la Figura 7, el compuesto de fórmula II (Comp. II) y dexametasona (Dex) inhibieron significativamente la liberación de TNF α de los PBL estimulados con PHA.

Las células además se analizaron mediante citometría de flujo. Se utilizó anexina para determinar las poblaciones de células muertas o que estén muriendo. Se utilizó anticuerpo anti-CD69 para establecer el nivel de activación celular. También se utilizó el anticuerpo contra el receptor $\alpha\beta$ de células T (TCR). Se compraron anexina 5 recombinantes (conjugados de PE y FITC) y los anticuerpos en Caltag (Burlingham, CA) y se utilizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se observaron los siguientes resultados.

Muerte celular:

El tñido con anexina de las células TCR positivas aumentó de 7,3% (fondo) a 45% y 23% con 50 µg/ml y 15 µg/ml del compuesto de fórmula II, respectivamente, significando un incremento en la muerte celular en la población de células T. La estimulación con PHA en 5 µg/ml incrementó el tñido con anexina de las células TCR positivas a 67%. Esto indica que PHA también puede inducir la muerte celular en la población de células T. La muerte celular disminuyó levemente como resultado del tratamiento con PHA más 15 µg/ml del compuesto de fórmula II (62% de

las células TCR positivas teñidas para anexina con PHA y IMM 0001 versus 67% con PHA solo). PHA más 50 µg/ml del compuesto de fórmula II causó 87% de muerte celular en el subconjunto TCR positivo de células según lo observado por el teñido con anexina. Estos resultados muestran que la mayor concentración de 50 µg/ml del compuesto de fórmula II causó la muerte significativa de las células T, mientras que la concentración inferior de 15 µg/ml no lo hizo. La dexametasona rescató el incremento inducido por PHA en el teñido con anexina de las células TCR positivas (disminuyó de 84% a 48%), demostrando que el compuesto de control está funcionando adecuadamente.

Activación de células T:

El teñido con CD69 + TCR (células T activadas) no se detectó en ninguno de los controles (nil, el compuesto de fórmula II solo y dexametasona sola). PHA incrementó el teñido con CD69 + TCR al 84%. Solamente PHA causó la activación de células T según lo detectable por el incremento en el teñido de CD69. El teñido con CD69 + TCR de las células estimuladas con PHA cayó de 84% a 54% con 50 µg/ml del compuesto de fórmula II y a 64% con 15 µg/ml del compuesto de fórmula II. La dexametasona fue menos efectiva que el compuesto de fórmula II en la reducción del teñido con CD69 + TCR de las células estimuladas con PHA. De ese modo, el compuesto de fórmula II es más efectivo en la disminución de la activación de células T que la dexametasona, un potente antiinflamatorio.

Ejemplo 4

Se extrajo sangre completa de GR-192, un voluntario humano normal, y se procesó según lo que se describe en el Ejemplo 1 para dar suero inactivado con calor y PBL. Después, los PBL de GR-192 se cultivaron en tubos de 1 ml, a $1,3 \times 10^6$ células por ml, con 15 µg/ml del compuesto de fórmula II (en medio de cultivo fabricado mediante la utilización de suero de GR-192 inactivado con calor al 10%) o 10 µM de dexametasona, a 37°C, CO₂ al 5% durante 24 horas. Después de esta incubación, se añadió PHA para dar una concentración final de 2 µg/ml, y se incubaron las células durante 96 horas adicionales a 37°C, CO₂ al 5%. Todos los cultivos se realizaron por triplicado. Después se eliminaron las células mediante centrifugación a 1000 r.p.m. durante 10 minutos, y se recolectó el medio de cultivo.

La liberación de IL-8 en el medio de cultivo se midió mediante ELISA. Para llevar a cabo ELISA, se compraron pares apareados de anticuerpo contra IL-8 humana en Pierce Biotechnology y Biosource, respectivamente. Las placas de pocillos con tira de ELISA se revistieron con 2 µg/ml de anticuerpo contra IL-8 (en solución salina tamponada con fosfato (PBS)) durante toda la noche a temperatura ambiente. Las placas después se bloquearon mediante la utilización de una solución de BSA al 4% en PBS durante una hora, seguido por la adición de 50 µl de medio de cultivo experimental por pocillo por duplicado. Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante una hora y después se lavaron mediante la utilización de 50 mM de Tris pH 8,0 con Tween 20 al 0,1 %. Después, se fabricaron soluciones de 100 ng/ml del segundo anticuerpo biotinilado contra IL-8 en tampón de bloqueo, y se añadieron 100 µl por pocillo. Se incubaron las placas durante 1 hora y se lavaron nuevamente. Se hizo una dilución de 1:8000 de conjugado de estreptavidina HRP (Pierce Biotechnology) en tampón de bloqueo, y se añadieron 100 µl a los pocillos y la incubación continuó durante 30 minutos. Se llevó a cabo una etapa de lavado final, después de la que se añadieron 100 µl de sustrato TMB de Pierce Biotechnology a cada pocillo. Se desarrolló el color durante 30 minutos y se interrumpió mediante la adición de 100 µl de H₂SO₄ 0,18 N. Se determinó la DO mediante la utilización de lector de microplaca con un filtro 450 nm.

Los resultados se muestran en la Figura 8. Tal como puede observarse, el compuesto de fórmula II (Comp. II) y dexametasona (Dex) inhibieron significativamente la liberación de IL-8 inducida por PHA.

Una línea celular de linfocitos T humanos CD4 positivos (TRiPS), que se aisló de un dador inmunizado contra la influenza y es específica para el péptido de hemaglutinina 307-319, se estimuló para el pasaje mediante la utilización de aproximadamente 4×10^5 células el día 18-20 después de una estimulación previa. Se lavaron las células una vez en Medio Esencial Mínimo modificado por Dulbecco de Iscove frío (IMDM, Sigma) más suero fetal bovino al 10% (FCS; American Type Culture Collection (ATCC)) y se resuspendieron en 1,0 ml de medio IMDM frío que contenía una dilución de 1:500 de anticuerpo monoclonal anti-CD3 OKT3 (preparado de líquido ascítico de ratón). Se incubaron las células con anticuerpo durante 30 minutos en hielo, después se lavaron con medio frío sin FCS y se combinaron con aproximadamente 2×10^6 leucocitos de sangre periférica (PBL) de dador humano normal irradiado con 4000R, como células nutrientes, en medio más 50 U/ml de IL-2 humana (Xenometrix). Los cultivos se expandieron mediante la adición de medio IMDM fresco con FCS más IL-2 el día 3. Se midió el día de cultivo desde el día de estimulación con OKT3. Pueden utilizarse células para los experimentos que comienzan el día 7 (en máxima proliferación), típicamente el día 14 (mucho más sensible a la reestimulación) y hasta el día 21 (células en reposo alcanzando la senectud).

Se llevaron a cabo experimentos de activación mediante el retiro de una alícuota de células y lavando dos veces con IMDM calentado (37°C). Para cada ensayo específico, 2×10^5 células viables se preincubaron en un volumen total de 0,9 ml de medio IMDM calentado que contenía 15 µg/ml del compuesto de fórmula II o 10 µM de dexametasona durante 15 minutos a 37°C. Después se añadió una alícuota de 2×10^5 de CD3/CD28 Dynabeads (Dyna), como estímulo activador, en 0,1 ml de IMDM calentado, y los cultivos se incubaron durante 24 horas a 37°C. Los sobrenadantes de los cultivos celulares se cosecharon después de peletizar las células mediante centrifugación.

Se ensayó el contenido de citocina mediante ELISA de IL-8 específico según lo que se describe más arriba. Se descubrió que el compuesto de fórmula II no tuvo ningún efecto en la producción de IL-8 mediante la línea celular TRiPS.

Ejemplo 5

- 5 THP-1 es una línea celular de monocitos obtenidos de American Type Culture Collection (ATCC) (catálogo Núm. TIB-202). Las células THP-1 se colocaron en medio (RPML que contenía suero fetal bovino al 10 % (FCS) (obtenido de ATCC) y 8 ng/ml de monoglicérol (obtenido de Sigma)) en una concentración de 250.000 células por ml y se incubaron con 15 µg/ml del compuesto de fórmula II o 10 µM de dexametasona durante una hora a 37°C y CO₂ al 5%. Después de 1 hora, se añadió lipopolisacárido (LPS) (obtenido de Sigma) a los cultivos para dar una
- 10 concentración final de 200 ng/ml, y las células después se incubaron durante 4 horas adicionales o durante 24 horas adicionales. Después de la incubación, las células se centrifugaron, y se recolectaron los sobrenadantes. Las concentraciones de IL-8 y TNFα en los sobrenadantes se determinaron mediante ELISA.

- Las concentraciones de IL-8 en los sobrenadantes se determinaron mediante ELISA llevado a cabo según lo que se describe en el Ejemplo 4. Los resultados se presentan en la Tabla 1 más abajo. Tal como puede observarse en la
- 15 Tabla 1, el compuesto de fórmula II (Comp. II) y la dexametasona (Dex) inhibieron significativamente la liberación de IL-8 de los monocitos estimulados con LPS.

ELISA de TNFα se llevó a cabo según lo que se describe en el Ejemplo 2. Los resultados se presentan en la Tabla 2 más abajo. Tal como puede observarse en la Tabla 2, el compuesto de fórmula II (Comp. II) y la dexametasona (Dex) inhibieron significativamente la liberación de TNFα de los monocitos estimulados con LPS.

20 TABLA 1

Muestra	Tiempo de incubación	Concentración media de IL-8 (pg/ml)	% de inhibición
Control (sin aditivos)	4 horas	75,96 ± 12,73	N/A
LPS	4 horas	2844,60 ± 180,55	N/A
LPS+ Comp. II	4 horas	2185,00 ± 78,30	23%
LPS + Dex	4 horas	2102,18 ± 52,20	26%
Control (sin aditivos)	24 horas	46,09 ± 22,42	N/A
LPS	24 horas	6653,20 ± 193,18	N/A
LPS + Comp. II	24 horas	4490,20 ± 264,46	33%
LPS + Dex	24 horas	2300,00 ± 283,41	66%

TABLA 2

Muestra	Tiempo de incubación	Concentración media de TNFα (pg/ml)	% de inhibición
Control (sin aditivos)	24 horas	1,415 ± 1,464	N/A
LPS	24 horas	138,655 ± 0,601	N/A
LPS + Comp. II	24 horas	65,370 ± 0,891	53%
LPS + Dex	24 horas	94,759 ± 8,755	32%

Ejemplo 6

- 25 Las células de la línea celular de fibroblatos murinos MC/9 (obtenida de ATCC, catálogo Núm. CRL- 8305) se colocaron en los pocillos de una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos a 25.000 células /pocillo. El medio de cultivo era Medio de Eagle Modificado por Delbecco (DMEM) (obtenido de Cambrex) que contenía suero fetal bovino al 10% (FCS) (obtenido de ATCC). Los pocillos de control Nil no contenían aditivos. Los pocillos restantes contenían 25 ng/ml de factor de crecimiento nervioso murino (NGF) (obtenido de Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) o 25
- 30 ng/ml de NGF y TSTIM al 5% (un complemento de cultivo preparado a partir de ratas y que contenía concanavalina

A que se obtuvo de BD Biosciences). Además, se añadieron los siguientes aditivos a las células: agua (control de vehículo); 5 gg/mL del compuesto de fórmula II (Comp. II); 15 µg/ml de Comp. II; o 30 µg/ml de Comp. II. Después de 72 horas de cultivo a 37 °C y CO₂ al 5%, se evaluó la proliferación celular mediante el ensayo de titulación celular de Promega según lo que se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 3 más abajo.

5

TABLA 3

Aditivo	DO media 530 nm
Sin aditivos	0,058 ± 0,008
NGF	0,116 ± 0,029
NGF + agua	0,101 ± 0,022
NGF + 1 µg/ml de Comp. II	0,117 ± 0,015
NGF + 5 µg/ml de Comp. II	0,108 ± 0,012
NGF + 15 µg/ml de Comp. II	0,049 ± 0,016
NGF + TSTIM	0,490 ± 0,047
NGF + TSTIM + agua	0,365 ± 0,026
NGF + TSTIM + 1 µg/ml de Comp. II	0,428 ± 0,027
NGF + TSTIM + 5 µg/ml de Comp. II	0,373 ± 0,016
NGF + TSTIM + 15 µg/ml de Comp. II	0,326 ± 0,024

Ejemplo 7

Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) de Pasaje 4 (es decir, cuatro duplicaciones de población celular), lote número 9713 de fuente humana (obtenido de ATCC), se colocaron en los pocillos de la placa de cultivo de tejido de 48 pocillos a 20.000 células/pocillo en 500 µl de medio completo de medio de crecimiento endotelial 2 (EGM-2) (pero sin suero o ascorbato) (obtenido de Cambrex) complementado con ITSS (insulina, transferina y selenita de sodio) (obtenido de Sigma). También, las HUVECs de pasaje 4, lote número 7016 de fuente humana (obtenido de ATCC), se colocaron en los pocillos de la placa de cultivo de tejido de 48 pocillos a 20.000 células/pocillo en 500 µl de medio completo de EGM-2 (pero sin suero o ascorbato) complementado con ITSS. Los siguientes aditivos se añadieron a las células: agua (control de vehículo) y 15 µg/ml del compuesto de fórmula II (Comp. II). Después de la incubación durante 1 hora a 37 °C y CO₂ al 5%, se añadió lipopolisacárido (LPS) (obtenido de Sigma) para dar una concentración final de 200 ng/ml, y se incubaron las células durante toda la noche a 37°C y CO₂ al 5%. Después de esta incubación, los sobrenadantes se recolectaron, y se determinó la cantidad de IL-8 en los sobrenadantes mediante ELISA según lo que se describe en el Ejemplo 4.

Los resultados se muestran en la Tabla 4 más abajo. Tal como puede observarse en la Tabla 4, el Comp. II eliminó por completo la liberación de IL-8 mediante las HUVECs 7016 y disminuyó la liberación de IL-8 en un 90% en las HUVECs 9713.

TABLA 4

Células	Tratamiento	IL-8 (pg/ml)
HUVECs 7016	Control (LPS solamente)	53,3
HUVECs 7016	LPS + 15 µg/ml de Comp. II	Por debajo de la detección
HUVECs 9713	Control (LPS solamente)	485,0
HUVECs 9713	LPS + 15 µg/ml de Comp. II	49,8

25

Ejemplo 8

Las HUVECs del pasaje 4, lote número 8710 de fuente humana (obtenido de ATCC), se colocaron en los pocillos de una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos a 5.000 células/pocillo en medio EGM-2 (obtenido de Cambrex) y se

cultivaron durante 72 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Después, el medio se reemplazó con medio fresco, y se añadieron los siguientes aditivos a las células: agua (control de vehículo); 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml o 30 µg/ml del compuesto de fórmula II (Comp. II); 15 g/ml de metilfenidato (MP); 10 µM de LY 294002 (un inhibidor de quinasa PI3 obtenido de Sigma); o 10 µM de dexametasona (Dex). Después de la incubación durante 1 hora a 37°C y CO₂ al 5%, se añadió TNFα (obtenido de Pierce) para dar una concentración final de 10 ng/ml, y se incubaron las células durante 18 horas adicionales a 37°C y CO₂ al 5%. Después de esta incubación, los sobrenadantes se recolectaron, y la cantidad de IL-8 en los sobrenadantes se determinó mediante ELISA según lo que se describe en el Ejemplo 4.

Los resultados se muestran en la Tabla 5 más abajo. Tal como puede observarse en la Tabla 5, el Comp. II disminuyó la liberación de IL-8 estimulada por TNFα en forma dosis dependiente, aunque pareció que hubo alguna muerte celular causada por la dosis más alta (30 µg/ml). Dex y MP levemente disminuyeron la liberación de IL-8 y LY 294002 redujo significativamente la liberación de IL-8.

TABLA 5

Tratamiento	IL-8 media (pg/ml)	Valor p	% de inhibición
Sin aditivos	207,15 ± 66,17		
30 µg/ml de Comp. II	0		
15 µg/ml de Comp. II	400,35		
10 ng/ml de TNFα	34695 ± 301,9		
10 ng/ml de TNFα + agua	35572 ± 967,74		
10 ng/ml de TNFα + 30 µg/ml de Comp. II	4829,8 ± 214,13		86,93%
10 ng/ml de TNFα + 15 µg/ml de Comp. II	20817 ± 674,63	0,002	41,72%
10 ng/ml de TNFα + 10 µg/ml de Comp. II	22050 ± 727,27	0,003	38,24%
10 ng/ml de TNFα + 5 µg/ml de Comp. II	34482 ± 2127,22	0,124	3,08%
10 ng/ml de TNFα + 1 µg/ml de Comp. II	53657 ± 3935,18	0,011	(-51,1%)
10 ng/ml de TNFα + 15 µg/ml de MP	30183 ± 3448,01	0,051	15,24%
10 ng/ml de TNF a + 10 µM LY 294002	9196,1 ± 150,97		74,58%
10 ng/ml de TNFα + 10 µM de Dex	35952 ± 2197,14	0,072	6,88%

Ejemplo 9

El factor de transcripción NFxB (factor nuclear xB) está implicado en la regulación de la expresión de una amplia variedad de genes que codifican los mediadores de las respuestas inflamatoria, de fase aguda e inmune. Existen cinco subunidades de la familia de NF xB en mamíferos: p50, p65 (RelA), c-Rel, p52 y RelB. Los heterodímeros p50/p65 y los homodímeros p50 son los dímeros más comunes encontrados en la vía de señalización NF xB. NF xB puede ser activado mediante un número de estímulos, incluyendo componentes de paredes celulares bacterianas, tales como lipopolisacárido, o citocinas inflamatorias, tales como TNFα o IL-1β.

La proteína 1 activadora (AP-1) es un factor de transcripción que puede ser activado durante el ciclo celular para promover la supervivencia celular, diferenciación y respuestas adaptativas. Las proteínas AP-1 desempeñan un papel en la expresión de muchos genes involucrados en la proliferación y progreso del ciclo celular. Por ejemplo, la transformación celular mediante oncogenes que funcionan en la vía de transducción del factor de crecimiento, tales como ras, rasF y mek, da como resultado un alto incremento en la expresión proteica del componente AP-1. Por ello, los genes regulados con AP-1 soportan el proceso invasivo observado durante la malignidad y metástasis. AP-1 pertenece a una gran familia de factores de transcripción estructuralmente relacionados que incluyen ATF1-4, c-Fos, c-Jun, c-Myc y C/EBP. AP-1 está compuesto de una mezcla de complejos heterodiméricos de proteínas obtenidos de las familias Fos y Jun, incluyendo c-Fos, FosB, Fra- 1, Fra-2, c-Jun, JunB y JunD. Básicamente, los dímeros de AP-1 se unen al ADN en un elemento de respuesta a TPA (TRE). La expresión de AP-1 está inducida por múltiples estímulos tales como suero, factores de crecimiento, ésteres forbol, oncogenes, citocinas del TGF-β, familias de TNF e interferón, depolarización neuronal y estrés celular.

HUVECs de pasaje 5, lote número 8750 de fuente humana (obtenido de ATCC), se hicieron crecer a confluencia en frascos de 25 cm² en medio EGM-2. Los siguientes aditivos se añadieron a los frascos (volumen total de 5 ml/frasco)

en medio EGM-2 que contenía FCS al 2%, GA1000 (gentamicina), heparina y ácido ascórbico (todo de Cambrex): 1 µg/ml del compuesto de fórmula II (Comp. II); 5 µg/ml de Comp. II; 15 µg/ml de Comp. II; 15 µg/ml de metilfenidato (MP); o 10 µM de LY 294002. Los frascos se incubaron durante toda la noche a 37 °C, CO₂ al 5%. Después de esta incubación, se añadió factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (obtenido de Sigma) para dar una concentración final de 10 ng/ml, y los frascos se incubaron durante 30 minutos adicionales.

Después, se determinó la cantidad de NFκB mediante la utilización de un Kit de Ensayo de Transcripción de NFκB p65/NFκB p50 TransAM™ y un Kit de Extracto Nuclear de Active Motif North America, Carlsbad, CA, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En resumen, se preparó un extracto nuclear de las células mediante la utilización del Kit de Extracto Nuclear. Después, el extracto nuclear se añadió a los pocillos de la placa de 96 pocillos del kit de TransAM™. Se inmovilizó el oligonucleótido que contenía un sitio de unión al consenso NFκB en los pocillos, y el NFκB activado contenido en el extracto nuclear se unió al oligonucleótido. Después, se añadió un anticuerpo dirigido contra la subunidad p65 o p50 de NFκB, y se detectó el complejo NFκB unido al oligonucleótido. Después se añadió un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) para proporcionar una lectura colorimétrica que se cuantificó mediante espectrofotometría (medición a 450 nm).

La cantidad de c-Jun se determinó mediante la utilización de un Kit de Ensayo de Transcripción de la familia AP-1 m TransAM™ y un Kit de Extracto Nuclear de Active Motif North America, Carlsbad, CA, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En resumen, se preparó un extracto nuclear de las células mediante la utilización del Kit de Extracto Nuclear. Después, el extracto nuclear se añadió a los pocillos de una placa de 96 pocillos en la que se inmovilizó el oligonucleótido que contenía un elemento de sensible a TPA (TRE). Los dímeros de la proteína-1 activadora (AP-1) contenidos en el extracto nuclear se unieron a este oligonucleótido y se detectaron mediante la utilización de un anticuerpo específico para c-Jun. Después se añadió un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) para proporcionar una lectura colorimétrica que se cuantificó mediante espectrofotometría (medición a 450 nm).

Los resultados se muestran en las Tablas 6 y 7 más abajo. Tal como puede observarse a partir de la Tabla 6, el tratamiento VEGF de HUVECs causó casi una duplicación de NFκB activado según lo detectado por el ensayo TransAM. El Comp. II en 15 µg/ml y 5 µg/ml redujo la cantidad de NFκB activado de nuevo a los niveles basales. Tal como puede observarse a partir de la Tabla 7, el tratamiento VEGF de HUVECs causó un incremento de c-Jun. El Comp. II en 15 µg/ml y 5 µg/ml eliminó completamente el incremento en la cantidad de c-Jun.

TABLA 6

Muestra	DO media 450 nm (NFκB)
Control (sin aditivos)	0,070 ± 0,002
VEGF solamente	0,111 ± 0,007
VEGF + 15 µg/ml de Comp. II	0,060 ± 0,008
VEGF + 5 µg/ml de Comp. II	0,065 ± 0,010
VEGF + 1 µg/ml de Comp. II	0,097 ± 0,013
VEGF + 15 µg/ml de MP	0,093 ± 0,011
VEGF + 10 µM de LY 294002	0,138 ± 0,008

TABLA 7

Muestra	DO media 450 nm (c-Jun)
Control (sin aditivos)	0,204 ± 0,016
VEGF solamente	0,261 ± 0,013
VEGF + 15 µg/ml de Comp. II	0,204 ± 0,010
VEGF + 5 µg/ml de Comp. II	0,185 ± 0,025
VEGF + 1 µg/ml de Comp. II	0,221 ± 0,008
VEGF + 15 µg/ml de MP	0,230 ± 0,016
VEGF + 10 µM de LY 294002	0,340 ± 0,020

Ejemplo 10

Las células endoteliales de arteria ilíaca humana (HIAECs) de pasaje 8 (obtenidas de ATCC; catálogo Núm. CC-2545) se hicieron crecer a confluencia en frascos de 25 cm² en medio EGM-2. Dieciocho horas previo al experimento, el medio se reemplazó con medio EGM-2 que contenía FCS al 0,1% más heparina, GA1000 (gentamicina) y extracto pituitario bovino (todo de Cambrex) para colocar las células en un estado de reposo. Para llevar a cabo el experimento el medio se aspiró de los frascos, y se añadieron los siguientes aditivos a los frascos en medio fresco (volumen total de 5 ml/frasco): 15 µg/ml del compuesto de fórmula II (Comp. II) o 10 µM de LY 294002. Los frascos se incubaron 2 horas a 37°C CO₂ al 5%. Después de esta incubación, se añadió VEGF o TNFα para dar una concentración final de 10 ng/ml, y los frascos se incubaron durante 30 minutos adicionales. Después, la cantidad de NFκB se determinó mediante la utilización de un Kit de Ensayo de Transcripción de NFκB p65/NFκB p50TransAM™ y un Kit de Extracto Nuclear de Active Motif North America, Carlsbad, CA, según lo que se describe en el Ejemplo 9.

Los resultados se muestran en la Tabla 8 más abajo. Tal como puede observarse a partir de la Tabla 8, el tratamiento con TNFα de HUVECs causó un incremento extremadamente grande en la cantidad de NFκB activado según lo detectado por el ensayo de TransAM. El Comp. II en 15 µg/ml redujo la cantidad de NFκB activado en aproximadamente un 82%. El tratamiento con VEGF no dio como resultado un incremento tan grande en el NFκB activado como lo que se logró con TNFα, pero la cantidad incrementada se redujo en un 70% por el Comp. II.

TABLA 8

Muestra	DO Media 450 nm (NFκB)	Porcentaje de inhibición
Control (sin aditivos)	0,174 ± 0,004	
TNFα solamente	0,881 ± 0,021	
TNFα + 15 µg/ml de Comp. II	0,302 ± 0,003	81,89%
TNFα + 10 Mm de LY 294002	0,810 ± 0,007	10,04%
VEGF solamente	0,220 ± 0,007	
VEGF + 15 µg/ml de Comp. II	0,066 ± 0,005	70,00%

Ejemplo 11

Las células TRiPS del día 18, 1x10⁶, se incubaron durante 30 minutos a 37°C, con nada añadido ("Nil"), con 1 µl de Dynabeads CD3/CD28 (Dyna, Oslo, Norway) ("perlas CD3/CD28 ") por 100.000 células, o con perlas CD3/CD28 y 15 µg/ml del compuesto de fórmula II (Comp. II). Después de la incubación, las células se lisaron en Reactivo de Extracción Celular de Mamífero Lítico celular (Sigma). Después de la centrifugación hasta desechos celulares en pélets se obtuvieron los sobrenadantes (extractos celulares).

Los extractos celulares (supernadantes) después se analizaron mediante la utilización de Custom AntibodyArray™ fabricado por Hypromatrix Inc., Worcester, MA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Custom AntibodyArray™ es una membrana de nylon con transferencia de anticuerpos contra las proteínas detalladas más abajo. En resumen, los extractos celulares se incubaron con Custom AntibodyArray™ por duplicado durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación lenta, seguido por tres lavados con tampón Tris (NaCl 150 mM, Tris 25 mM, Tween-20 al 0,05%, pH 7,5). Se añadieron los anticuerpos etiquetados con HRP específicos de la tirosina fosforilada, serina fosforilada y treonina fosforilada en tampón Tris, y los arreglos se incubaron durante 2 horas. Después de tres lavados más con tampón Tris, se añadió un sustrato luminiscente reactivo a la peroxidasa. Los arreglos se visualizaron mediante la exposición a película radiográfica. La densitometría de las películas radiográficas se midió mediante escaneado y análisis informático. Los resultados se resumen en la Tabla 9 más abajo.

TABLA 9

Proteína	Efecto del Comp. II en la proteína en células TriPS estimuladas con CD3/CD28
RAP 1	Activado
RAP2	Activado

(continuación)

Proteína	Efecto del Comp. II en la proteína en células TriPS estimuladas con CD3/CD28
JAK2	Activado
STAT4	Activado
STAT5b	Activado
P13quinasaP85	Activado
MEK1	Disminuyó el nivel hasta debajo de los niveles basales (control Nil)
JNK1	Disminuyó el nivel de nuevo a los niveles basales (control Nil)
JNK2	Disminuyó el nivel de nuevo a los niveles basales (control Nil)
JNK3	Disminuyó el nivel de nuevo a los niveles basales (control Nil)
MEKK1	Disminuyó el nivel de nuevo a los niveles basales (control Nil)
IκB-β	Disminuyó el nivel de nuevo a los niveles basales (control Nil)
IκB-r	Disminuyó el nivel de nuevo a los niveles basales (control Nil)
IL-2	Disminuyó el nivel de nuevo a los niveles basales (control Nil)
IL-4	Disminuyó el nivel de nuevo a los niveles basales (control Nil)
IL-7γ	Disminuyó el nivel de nuevo a los niveles basales (control Nil)
14-3-3	Disminuyó levemente el nivel
STAT6	Disminuyó levemente el nivel
IκB-ε	Disminuyó levemente el nivel
IκB-α	Disminuyó levemente el nivel
VAV	Ningún efecto
STAT2	Ningún efecto

Ejemplo 12

- 5 Las células THP-1 se colocaron en medio (RPMI que contenía FCS al 10 % y 8 ng/ml de monotiglicerol) en una concentración de 250.000 células por ml y se incubaron con 5 µg/ml del compuesto de fórmula II (Comp. II) o 15 µg/ml de Comp. II durante una hora a 37 °C y CO₂ al 5%. Después de 1 hora, se añadió lipopolisacárido (LPS) a los cultivos para dar una concentración final de 200 ng/ml, y las células después se incubaron durante 24 horas adicionales. Después de la incubación, se determinó la cantidad de NFκB y c-Jun según lo que se describe en el
- 10 Ejemplo 9. También, se determinó la cantidad de c-Fos mediante la utilización de un Kit de Ensayo de Transcripción de la familia AP-1 m de TransAM™ y un Kit de Extracto Nuclear de Active Motif North America, Carlsbad, CA, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En resumen, se preparó un extracto nuclear de las células mediante la utilización del Kit de Extracto Nuclear. Después, el extracto nuclear se añadió a los pocillos de una placa de 96 pocillos en el que el oligonucleótido que contenía un elemento sensible a TPA (TRE) se inmovilizó. Los dímeros de la proteína-1 activadora (AP-1) contenidos en el extracto nuclear se unieron a este oligonucleótido y se detectaron
- 15 mediante la utilización de un anticuerpo específico para c-Fos. Después se añadió un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) para proporcionar una lectura colorimétrica que se cuantificó mediante espectrofotometría (medición a 450 nm). Los resultados se muestran en las Figuras 9A-B.

Ejemplo 13

Las células TRiPS del día 10, 1×10^6 , se incubaron con 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del compuesto de fórmula II (Comp. II) durante 1 hora a 37°C. Después, se incubaron las células con perlas CD3/CD28 (1 μl por 100.000 células) (obtenido de Dynal) durante 10 minutos a 37°C. Las células después se lisaron con un tampón suave (suministrado con kit de activación Pierce EZ-Detect descrito más abajo) para producir los extractos celulares. Las concentraciones de proteína de los extractos resultantes se determinaron mediante ensayo de ácido bicinoninico (BCA) (Pierce) y se colocaron en hielo para uso inmediato.

Se llevaron a cabo ensayos de Pulldown mediante la utilización de kits de activación de Pierce EZ-Detect de acuerdo a las instrucciones del fabricante mediante la utilización de GST-RAF-1-RBD y GST-RalGDS-RBD para RAS y RAP-1 respectivamente. En resumen, 400 μg de proteína total de cada extracto se combinaron con proteína recombinantes y resina de glutatión y se incubaron a 4°C durante una hora con agitación suave. La resina después se lavó para eliminar la proteína no unida y las proteínas RAS y RAP activadas se eliminaron mediante ebullición en presencia de tintura de carga de SDS-PAGE que contenía agente reductor. Las transferencias western de RAS y RAP-1 se llevaron a cabo para visualizar las proteínas mediante la utilización de anticuerpos suministrados con el kit. Se realizó la densitometría de las películas radiográficas mediante el escaneado y análisis informático.

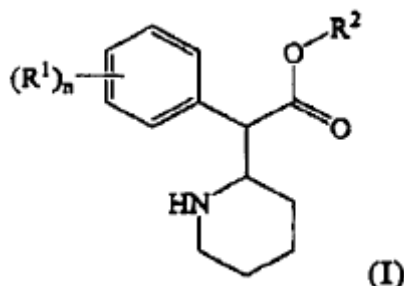
Los resultados se muestran en la Tabla 11. Tal como puede observarse a partir de la Tabla 11, la incubación de las células TRiPS con el Comp. II dio como resultado una inhibición muy fuerte de la proteína RAS. La estimulación de las células con perlas CD3/CD28 no incrementó la cantidad de proteína RAP-1 según lo esperado, pero el Comp. II también pareció inhibir RAP-1.

TABLA 11

Tratamiento	Densidad óptica integrada para el ensayo RAS	Densidad óptica integrada para el ensayo RAP-1
Ningún tratamiento	66,83	259,27
Perlas CD3/CD28 solamente	245,91	213,66
Perlas CD3/CD28 + 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Comp. II	84,98	87,26

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección que comprende inhibir una respuesta inmune, en el que la fórmula I es:



5 en la que

n es 1;

R¹ es arilo C₆ a C₁₄, o ariloxi C₆ a C₁₄; y

R² es metilo.

10 2. El compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en conformidad con la reivindicación 1, en el que inhibir una respuesta inmune comprende inhibir la activación de células T.

3. El compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la enfermedad o afección es una enfermedad o afección mediada por células T.

4. El compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en conformidad con la reivindicación 3, en el que la enfermedad o afección mediada por células T es una enfermedad o afección autoinmune.

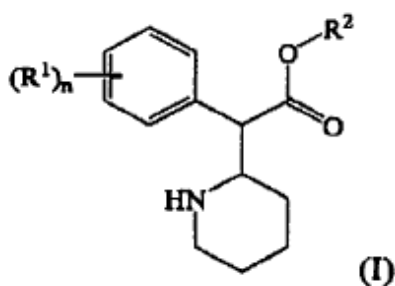
15 5. El compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en conformidad con la reivindicación 4, en el que la enfermedad o afección autoinmune es esclerosis múltiple.

6. El compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en conformidad con la reivindicación 4, en el que la enfermedad o afección autoinmune es lupus eritematoso sistémico.

20 7. El compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en conformidad con la reivindicación 3, en el que la enfermedad o afección mediada por células T es una enfermedad pulmonar mediada por células T.

8. El compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en conformidad con la reivindicación 1, en el que inhibir una respuesta inmune comprende inhibir la activación de monocitos.

9. Un compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección que comprende inhibir la producción, liberación o ambos de una citocina proinflamatoria, en el que la fórmula I es:



25

en la que

n es 1;

R¹ es arilo C₆ a C₁₄, o ariloxi C₆ a C₁₄; y

R² es metilo.

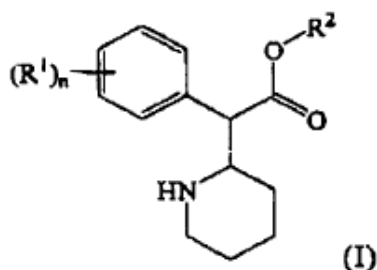
10. El compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en conformidad con la reivindicación 9, en el que la citocina es interleucina 8 (IL-8).

11. El compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en conformidad con la reivindicación 9, en el que la citocina es interleucina 13 (IL-13).

5 12. El compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en conformidad con la reivindicación 9, en el que la citocina es interferón gamma (IFN- γ).

13. El compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en conformidad con la reivindicación 9, en el que la citocina es factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α).

10 14. Un compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección que comprende inhibir la inflamación, en el que la fórmula I es:



en la que

n es 1;

R¹ es arilo C₆ a C₁₄, o ariloxi C₆ a C₁₄; y

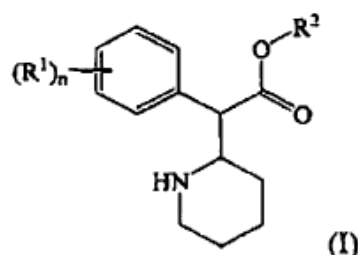
15 R² es metilo.

15. El compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en conformidad con la reivindicación 14, en el que la enfermedad o afección es una enfermedad o afección inflamatoria.

16. El compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en conformidad con la reivindicación 15, en el que la enfermedad o afección inflamatoria es asma.

20 17. El compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en conformidad con la reivindicación 15, en el que enfermedad o afección inflamatoria es una enfermedad o afección inflamatoria neurológica.

18. Un compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección que comprende inhibir la proliferación no deseada de linfocitos, en el que la fórmula I es:

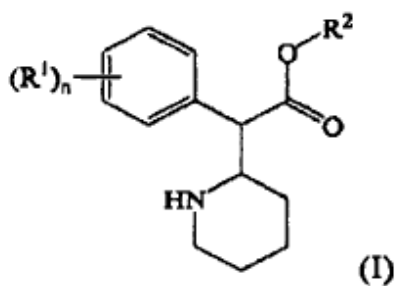


25 en la que n es 1;

R¹ es arilo C₆ a C₁₄, o ariloxi C₆ a C₁₄; y

R² es metilo.

19. Un compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección que comprende inhibir la adhesión no deseada de linfocitos, en el que la fórmula I es:



en la que

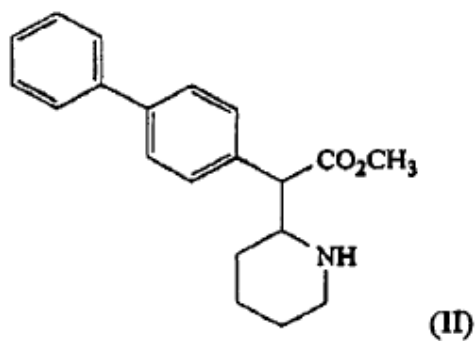
n es 1;

R¹ es arilo C₆ a C₁₄, o ariloxi C₆ a C₁₄; y

5 R² es metilo.

20. Un compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que R¹ es fenilo o fenoxi.

21. Un compuesto de fórmula I, o una sal del mismo, para su uso de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que el compuesto es:



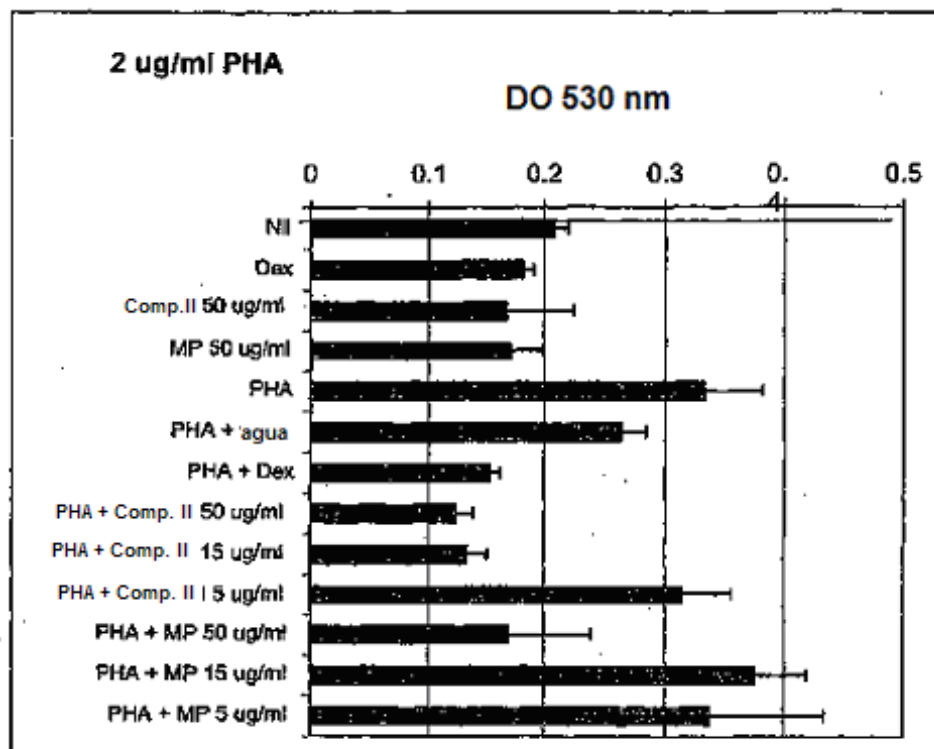


Figura 1A

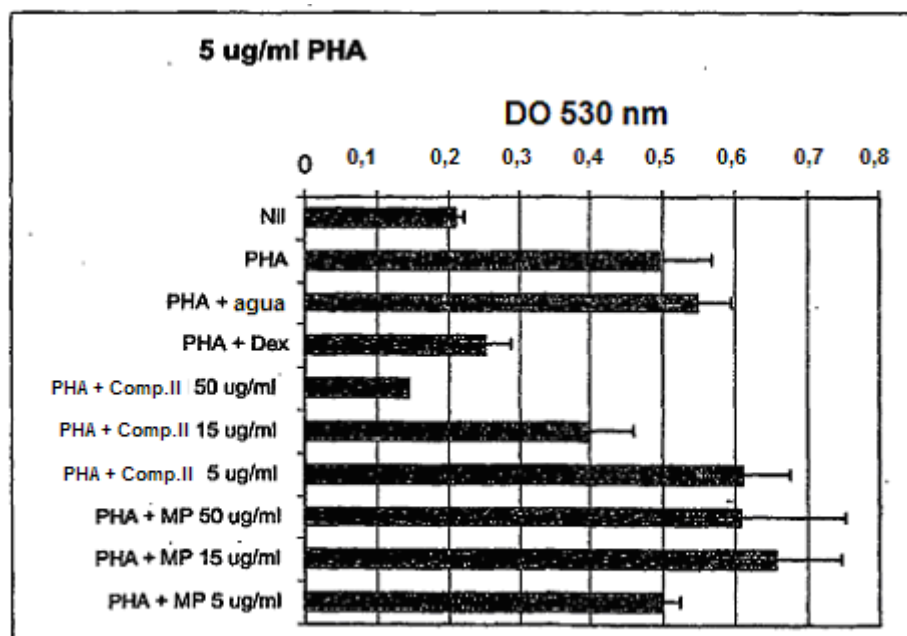


Figura 1B

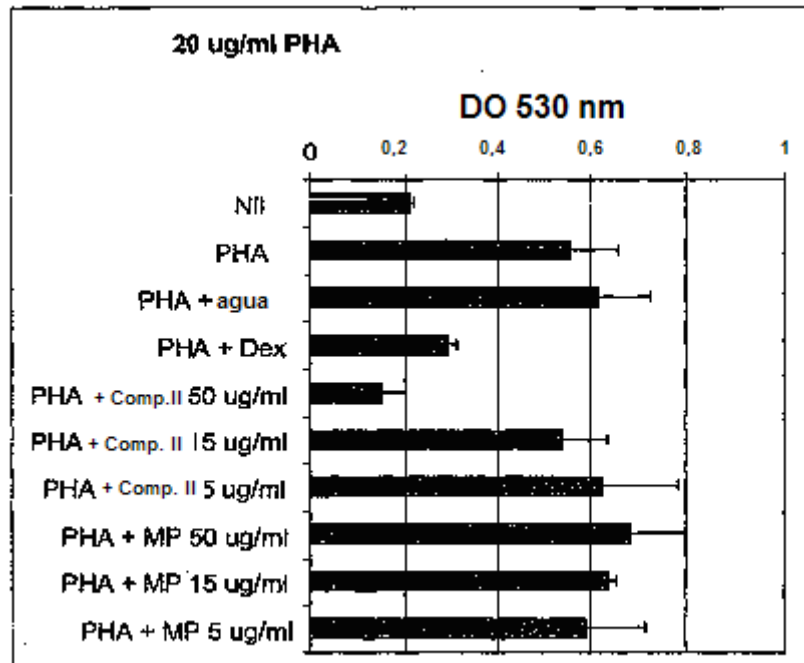


Figura 1C

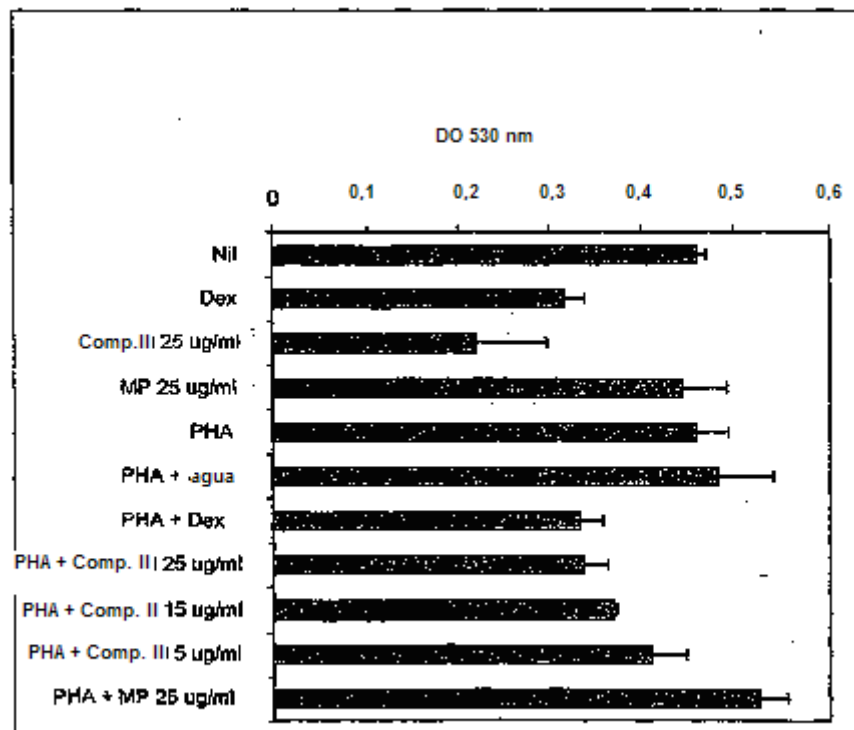


Figura 2

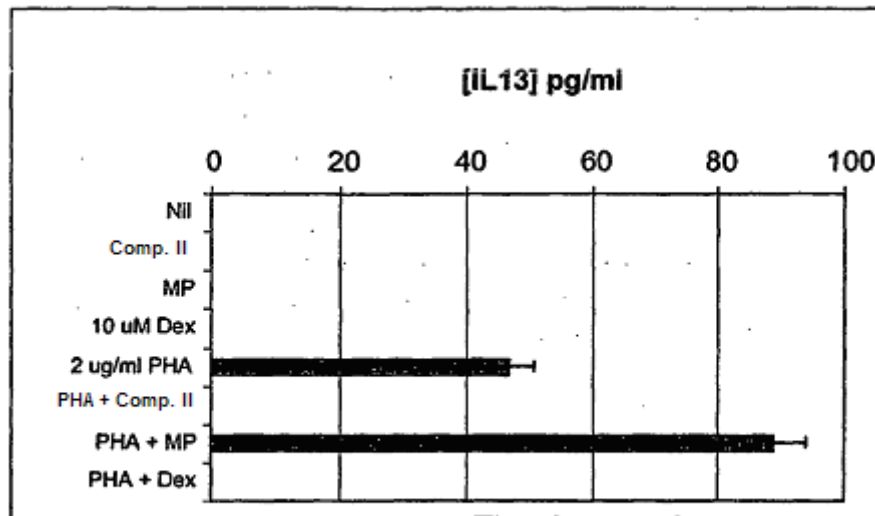


Figura 3

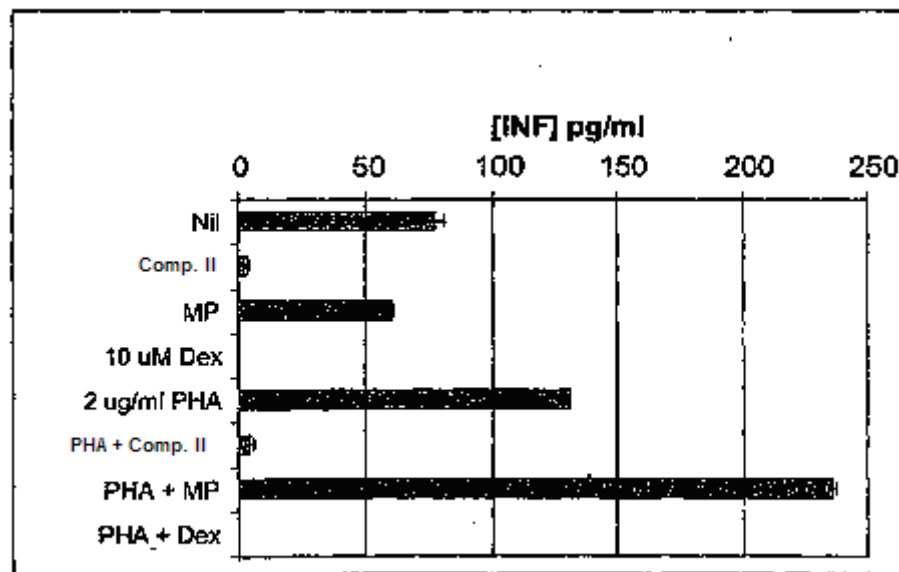


Figura 4

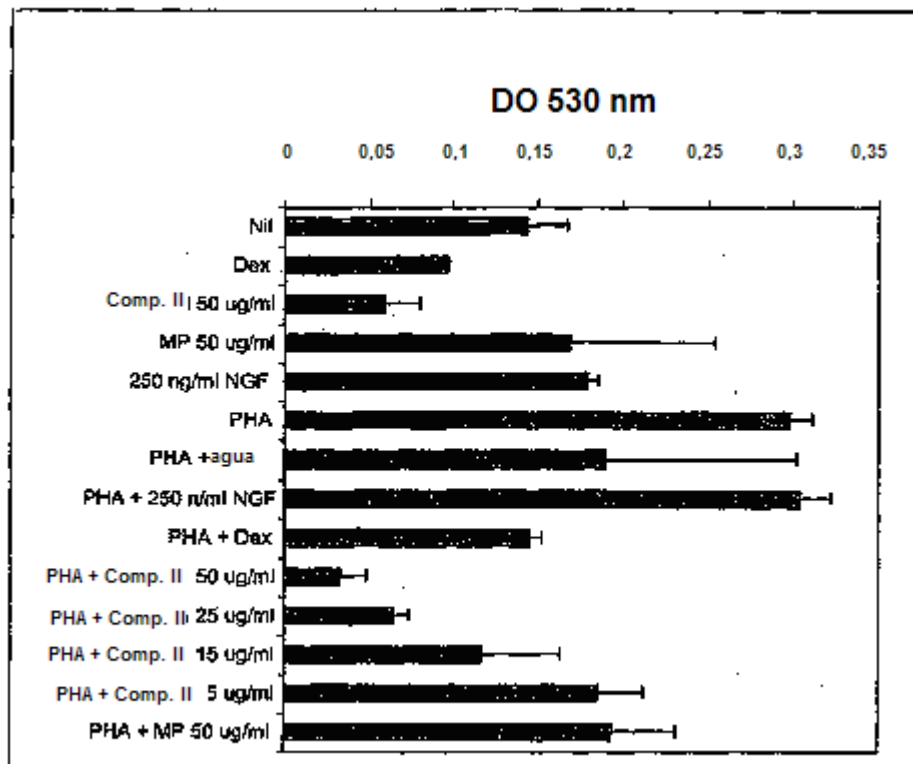


Figura 5A

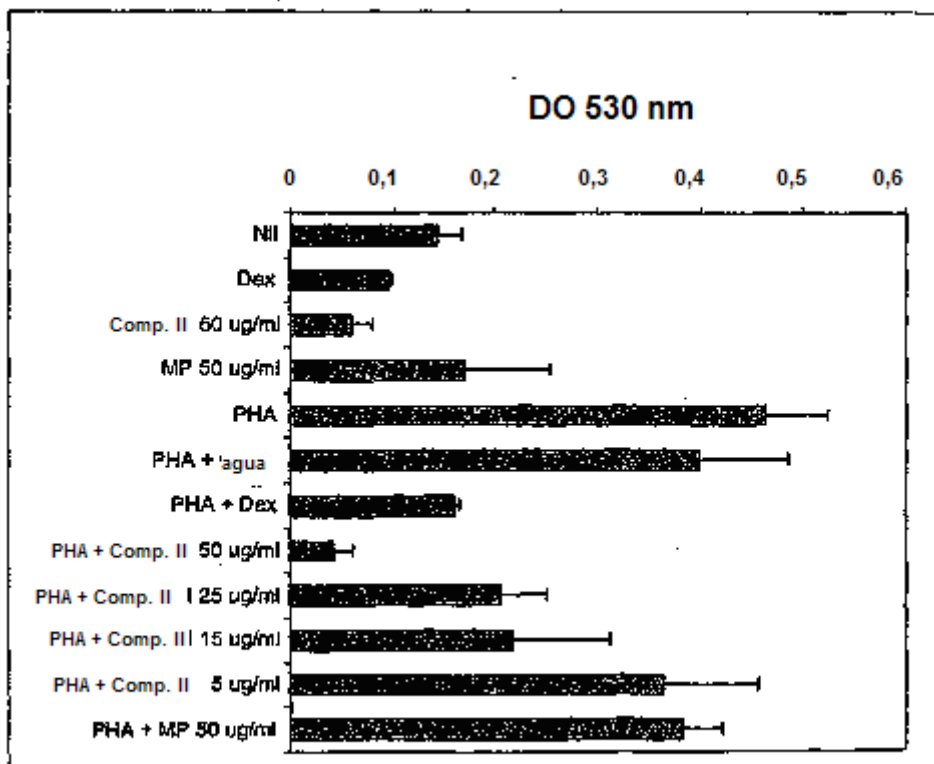


Figura 5B

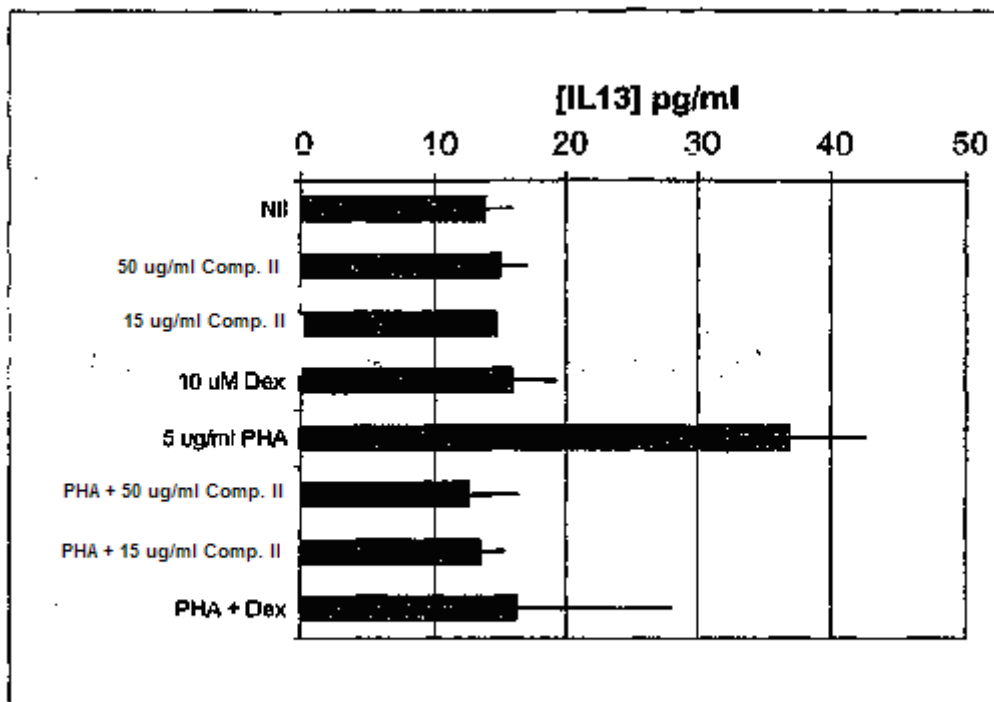


Figura 6

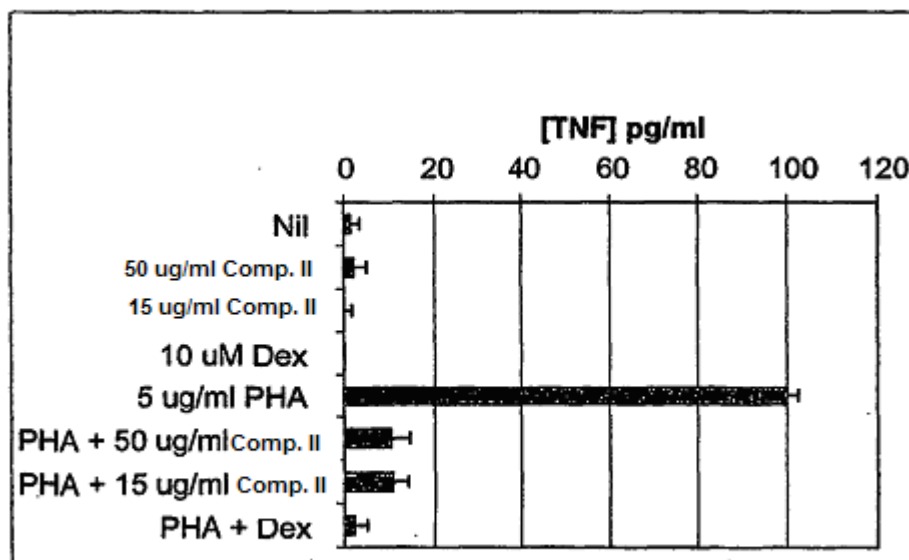


Figura 7

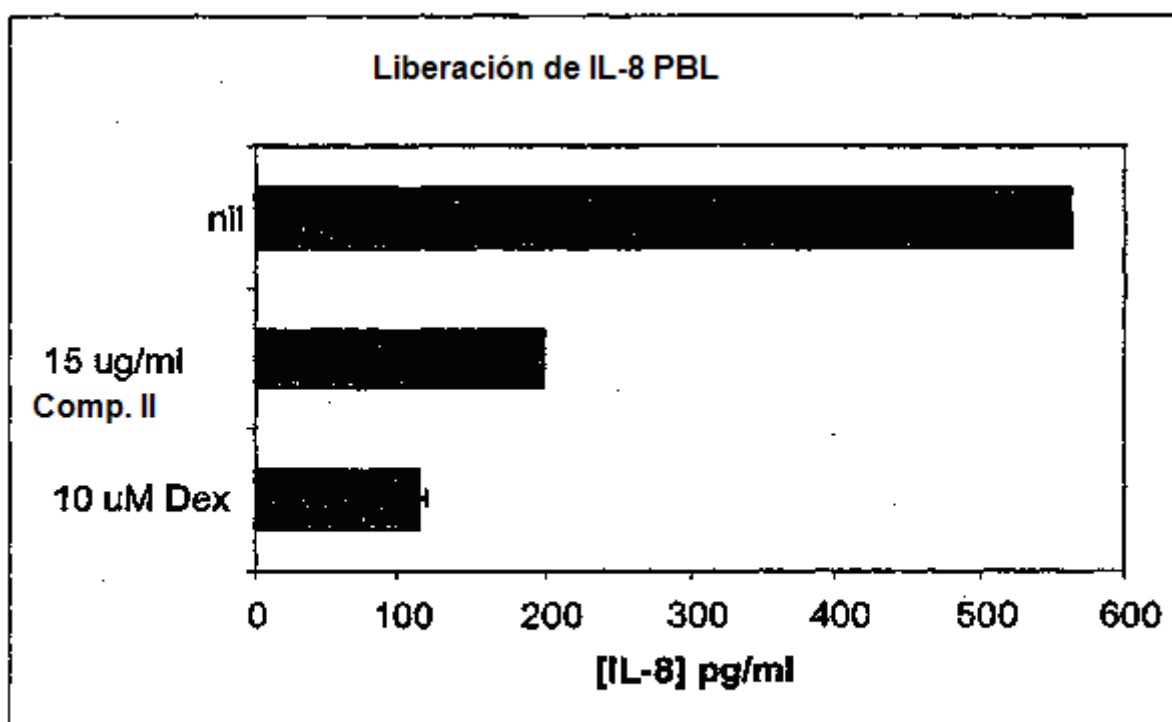


Figura 8

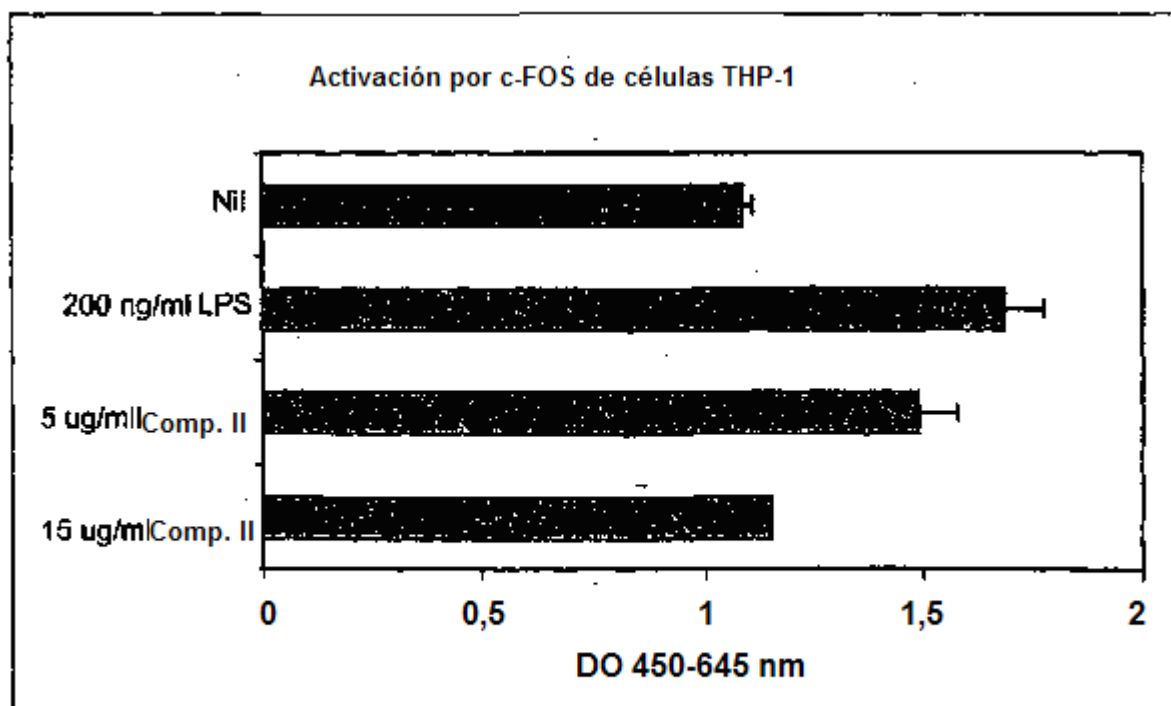


Figura 9A

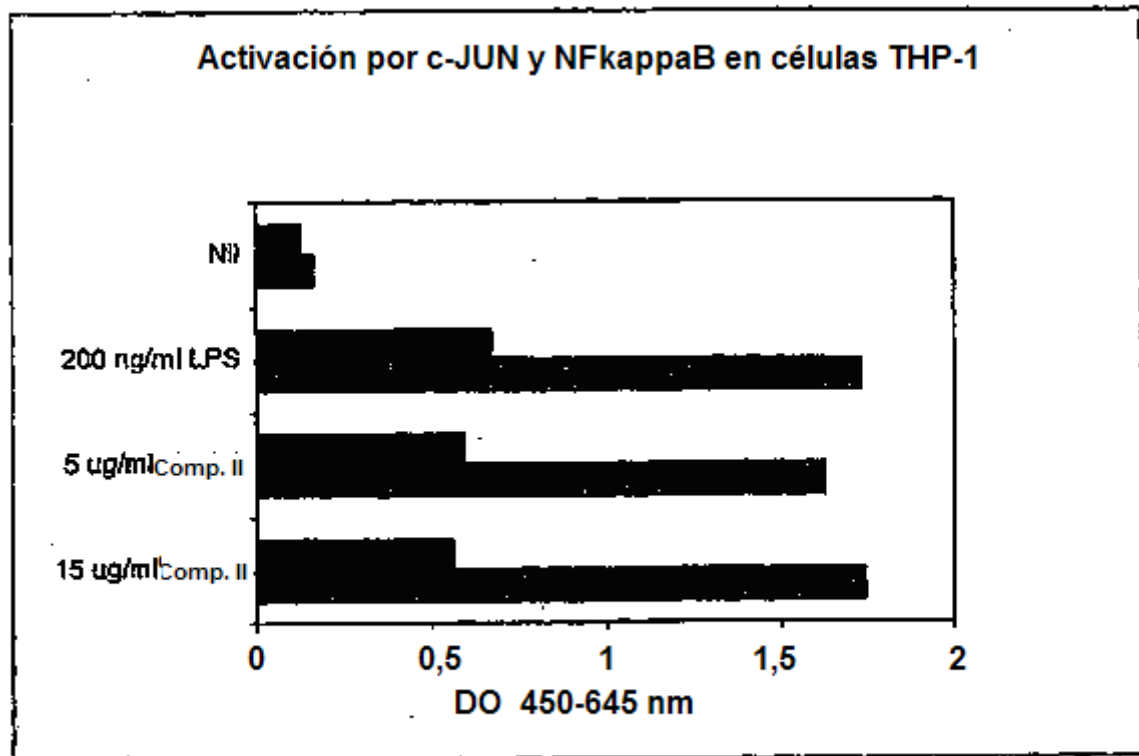


Figura 9B