

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 186**

51 Int. Cl.:

C07D 211/46 (2006.01)

C07D 491/04 (2006.01)

A61K 31/4353 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2002 E 10012138 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2012 EP 2286811**

54 Título: **Antagonistas de receptores de quimioquinas y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

21.11.2001 US 989086

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2013

73 Titular/es:

MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139, US y
KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

LULY, JAY, R.;
NAKASATO, YOSHISUKE;
OSHIMA, ETSUO;
HARRIMAN, GERALDINE, C.B.;
CARSON, KENNETH, G.;
GHOSH, SHOMIR;
ELDER, AMY, M. y
MATTIA, KAREN, M.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 396 186 T3

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

DESCRIPCIÓN

Antagonistas de receptores de quimioquinas y métodos de uso de los mismos

Antecedentes de la Invención

5 Las citoquinas quimioatrayentes o quimioquinas son una familia de mediadores proinflamatorios que promueven el reclutamiento y la activación de múltiples linajes de leucocitos y linfocitos. Pueden liberarse por muchos tipos de células de tejidos después de la activación. La liberación continua de quimioquinas en sitios de inflamación media la migración continuada de células efectoras en la inflamación crónica. Las quimioquinas caracterizadas hasta la fecha están relacionadas en su estructura primaria. Comparten cuatro cisteínas conservadas, que forman enlaces disulfuro. Basándose en este motivo de cisteínas conservadas, la familia se divide en dos grupos principales, que se conocen
10 como las quimioquinas C-X-C (quimioquinas α) y las quimioquinas C-C (quimioquinas β), en las que las dos primeras cisteínas conservadas están separadas por un resto intermedio o son adyacentes respectivamente (Baggiolini, M. y Dahinden, C. A., *Immunology Today*, 15: 127-133 (1994)).

15 Las quimioquinas C-X-C incluyen varios quimioatrayentes potentes y activadores de neutrófilos tales como la interleuquina 8 (IL-8), PF4 y el péptido 2 activador de neutrófilos (NAP-2). Las quimioquinas C-C incluyen RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted (regulada tras la expresión, expresada y secretada en células T normales)), las proteínas inflamatorias de macrófagos 1α y 1β (MIP- 1α y MIP- 1β), eotaxina y las proteínas 1-3 quimiotácticas de monocitos humanos (MCP-1, MCP-2 y MCP-3) que se han caracterizado como quimioatrayentes y activadores de monocitos o linfocitos pero no parecen ser quimioatrayentes de neutrófilos. Ciertas quimioquinas tales como RANTES y MIP- 1α se han implicado en una amplia serie de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas
20 humanas incluyendo enfermedades respiratorias tales como asma y trastornos alérgicos.

25 Los receptores de quimioquinas son miembros de una superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) que comparten características estructurales que reflejan un mecanismo de acción común de la transducción de señales (Gerard, C. y Gerard, N.P., *Annu Rev. Immunol.*, 12: 775-808 (1994); Gerard, C. y Gerard, N. P., *Curr. Opin. Immunol.*, 6: 140-145 (1994)). Las características conservadas incluyen siete dominios hidrófobos que atraviesan la membrana plasmática, que están conectados por bucles extracelulares e intracelulares hidrófilos. La mayor parte de la homología de la secuencia primaria tiene lugar en las regiones transmembrana hidrófobas, siendo las regiones hidrófilas más diversas. El primer receptor para las quimioquinas C-C que se clonó y se expresó se une a las quimioquinas MIP- 1α y RANTES. Por consiguiente, este receptor de MIP- 1α /RANTES se denominó receptor 1 de quimioquinas C-C (también denominado CCR-1; Neote, K., et al., *Cell*, 72: 415-425 (1993); Horuk, R et al., documento WO 94/11504, 26 de mayo de 1994; Gao, J.-I. et al., *J. Exp. Med.*, 177: 1421-1427 (1993)). Se han caracterizado tres receptores que se unen y/o proporcionan señales en respuesta a RANTES: CCR3 media la unión y señalización de quimioquinas incluyendo eotaxina, RANTES y MCP-3 (Ponta et al., *J. Exp. Med.*, 183: 2437 (1996)), CCR4 se une a quimioquinas incluyendo RANTES, MIP- 1α y MCP-1 (Power, et al., *J. Biol. Chem.*, 270: 19495 (1995)) y CCR5 se une a quimioquinas incluyendo MIP- 1α , RANTES y MIP- 1β (Samson, et al., *Biochem. J.* 35: 3362-3367 (1996)). RANTES es una quimioquina quimiotáctica para una diversidad de tipos celulares, incluyendo monocitos, eosinófilos y una subserie de células T. Es posible que no todas las respuestas de estas diferentes células estén mediadas por el mismo receptor, y es posible que los receptores CCR1, CCR4 y CCR5 muestren alguna selectividad en la distribución y función de receptores entre los tipos de leucocitos, como se ha demostrado en el caso de CCR3 (Ponath *et al.*). En particular, la capacidad de RANTES de inducir la migración directa de monocitos y una población de memoria de células T circulantes (Schall, T. et al., *Nature*, 347: 669-71 (1990)) sugiere que esta quimioquina y su receptor (receptores) pueden tener un papel crítico en enfermedades inflamatorias crónicas, ya que estas enfermedades se caracterizan por infiltrados destructivos de células T y monocitos.

35 Se han creado muchos fármacos existentes como antagonistas de los receptores de aminas biogénicas, por ejemplo, como antagonistas de los receptores de dopamina e histamina. Aún no se han desarrollado antagonistas satisfactorios para los receptores para las proteínas de mayor tamaño tales como quimioquinas y C5a. Los antagonistas de molécula pequeña de la interacción entre los receptores de quimioquinas C-C y sus ligandos, incluyendo RANTES y MIP- 1α , proporcionarían compuestos útiles para inhibir procesos inflamatorios perjudiciales "inducidos" por una interacción receptor-ligando, así como herramientas valiosas para la investigación de las interacciones receptor-ligando. En el documento WO 01/09138 se describen compuestos que con antagonistas del receptor de quimioquina y útiles para
45 tratar una enfermedad asociada con el reclutamiento y/o activación de leucocitos aberrantes.

Sumario de la invención

55 Ahora se ha descubierto que una clase de moléculas orgánicas pequeñas son antagonistas de la función de receptores de quimioquinas y pueden inhibir la activación y/o reclutamiento de leucocitos. Un antagonista de la función de receptores de quimioquinas es una molécula que puede inhibir la unión y/o activación de una o más quimioquinas, incluyendo quimioquinas C-C tales como RANTES, MIP- 1α , MCP-2, MCP-3 y MCP-4 a uno o más receptores de quimioquinas en leucocitos y/u otros tipos celulares. Como consecuencia, con estas moléculas orgánicas pequeñas pueden inhibirse procesos y respuestas celulares mediadas por receptores de quimioquinas. Basándose en este descubrimiento, se describe un método de tratamiento de una enfermedad asociada con el reclutamiento y/o activación aberrante de leucocitos, así como un método de tratamiento de una enfermedad mediada por la función de

receptores de quimioquinas. El método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto o molécula orgánica pequeña que es un antagonista de la función de receptores de quimioquinas. Los compuestos o moléculas orgánicas pequeñas que se han identificado como antagonistas de la función de receptores de quimioquinas se describen con detalle más adelante y pueden usarse para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad asociada con el reclutamiento y/o activación aberrante de leucocitos.

La invención también se refiere a los compuestos y moléculas orgánicas pequeñas descritos para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con el reclutamiento y/o activación aberrante de leucocitos. La invención también incluye composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los compuestos o moléculas orgánicas pequeñas que se han identificado en el presente documento como antagonistas de la función de quimioquinas y un vehículo farmacéutico adecuado. La invención además se refiere a nuevos compuestos que pueden usarse para tratar a un individuo con una enfermedad asociada con el reclutamiento y/o activación aberrante de leucocitos y a métodos para su preparación.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el enantiómero (S) y el enantiómero (R) de 4-(4-clorofenil)-1-{3-[7-(1-hidroxi-1-metil-etil)-11H-10-oxa-1-aza-dibenzo[a,d]ciclohepten-5-ilideno]-propil}-3,3-dimetil-piperidin-4-ol, o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, en el que la proporción del enantiómero (S) con respecto al enantiómero (R) (p/p) en la composición es al menos aproximadamente 2:1.

En una realización, la proporción del enantiómero (S) con respecto al enantiómero (R) (p/p) en la composición es al menos aproximadamente 5:1.

En otra realización, la proporción del enantiómero (S) con respecto al enantiómero (R) (p/p) en la composición es al menos aproximadamente 10:1.

En una realización más, la proporción del enantiómero (S) con respecto al enantiómero (R) (p/p) en la composición es al menos 20:1.

En una realización adicional, la proporción del enantiómero (S) con respecto al enantiómero (R) (p/p) en la composición es al menos aproximadamente 50:1.

Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable.

También se proporciona una composición farmacéutica de la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con el reclutamiento, activación o reclutamiento y activación de leucocitos aberrantes, en la que dicha enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en artritis, aterosclerosis, arteriosclerosis, reestenosis, lesión por isquemia/reperfusión, diabetes mellitus, psoriasis, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, rechazo de un órgano o tejido trasplantado, enfermedad de injerto contra huésped, alergia y asma.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un esquema que muestra la preparación de los compuestos representados por la Fórmula Estructural (I).

La Figura 2 es un esquema que muestra la preparación de los compuestos representados por el Compuesto (VI-b).

La Figura 3 es un esquema que muestra la preparación de los compuestos representados por la Fórmula Estructural (I).

La Figura 4 es un esquema que muestra la preparación de los compuestos representados por la Fórmula Estructural (I), en la que Z se representa por la Fórmula Estructural (III) y en la que el Anillo B en Z está sustituido con R⁴⁰.

La Figura 7 muestra la preparación de compuestos representados por la Fórmula Estructural (I), en la que Z se representa por las Fórmula Estructural (III) y en la que el Anillo B en Z está sustituido con R⁴⁰.

La Figura 8A es un esquema que muestra la preparación de 4-(4-clorofenil)-4-fluoropiperidina.

La Figura 8B es un esquema que muestra la preparación de 4-4-azido-4-(4-clorofenil)piperidina.

La Figure 8C es un esquema que muestra la preparación de 4-(4-clorofenil)-4-metilpiperidina.

La Figura 9C es un esquema que muestra la preparación de 2-(4-clorofenil)-1-(N-metil)etilamina.

La Figura 9D es un esquema que muestra la preparación de 3-(4-clorofenil)-3-cloro-1-hidroxipropano.

La Figura 9E es un esquema que muestra la preparación de 3-(4-clorofenil)-1-N-metilaminopropano.

La Figura 10A es un esquema que muestra la preparación de 3-(4-clorofenil)-3-hidroxil-3-metil-1-N-metilaminopropano.

La Figura 10B es un esquema que muestra la preparación de 1-(4-clorobenzoil)-1,3-propilendiamina.

La Figura 10D es un esquema que muestra la preparación de 4-(4-clorofenil)-4-piridina.

La Figura 18 es un esquema que muestra un procedimiento para la preparación del Ejemplo I.

La Figura 23 muestra las estructuras de compuestos ejemplares de la invención.

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de molécula pequeña que son moduladores de la función de receptores de quimioquinas. En una realización preferida, los compuestos de molécula pequeña son antagonistas de la función de receptores de quimioquinas. Por consiguiente, pueden inhibirse (reducirse o prevenirse, en su totalidad o en parte) procesos o respuestas celulares mediadas por la unión de una quimioquina a un receptor, incluyendo la migración de leucocitos, activación de integrinas, aumentos transitorios en la concentración de calcio libre intracelular $[Ca^{++}]_i$ y/o liberación de gránulos de mediadores proinflamatorios.

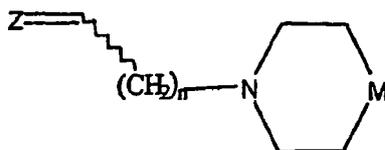
La invención también se refiere al tratamiento, incluyendo tratamientos profilácticos y terapéuticos, de una enfermedad asociada con el reclutamiento y/o activación aberrante de leucocitos o mediada por quimioquinas o por la función de receptores de quimioquinas, incluyendo trastornos inflamatorios crónicos caracterizados por la presencia de RANTES, células T que responden a MIP-1 a, MCP-2, MCP-3 y/o MCP-4, monocitos y/o eosinófilos, incluyendo pero sin limitación enfermedades tales como artritis (por ejemplo, artritis reumatoide), aterosclerosis, arteriosclerosis, reestenosis, lesión de isquemia/reperfusión, diabetes mellitus (por ejemplo, diabetes mellitus de tipo 1), psoriasis, esclerosis múltiple, enfermedades inflamatorias del intestino tales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, rechazo de órganos y tejidos trasplantados (es decir, rechazo de aloinjerto agudo, rechazo de aloinjerto crónico), enfermedad de injerto contra hospedador, así como alergias y asma. Otras enfermedades asociadas con el reclutamiento y/o activación aberrante de leucocitos que pueden tratarse (incluyendo tratamientos profilácticos) con los métodos descritos en el presente documento son enfermedades inflamatorias asociadas con la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), por ejemplo, encefalitis asociada con el SIDA, erupción cutánea macropapular relacionada con el SIDA, neumonía intersticial relacionada con el SIDA, enteropatía relacionada con el SIDA, inflamación hepática periportal relacionada con el SIDA y glomerulonefritis relacionada con el SIDA. El tratamiento comprende administrar al sujeto que necesita tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto (es decir, uno o más compuestos) que inhibe la función de los receptores de quimioquinas, inhibe la unión de una quimioquina a leucocitos y/u otros tipos celulares y/o que inhibe la migración de leucocitos, y/o la activación, en sitios de inflamación.

La invención también se refiere a métodos para antagonizar un receptor de quimioquinas, tal como CCR1, en un mamífero, que comprende administrar al mamífero un compuesto como se describe en el presente documento.

De acuerdo con el método, puede inhibirse la quimiotaxis y/o activación mediada por quimioquinas de células proinflamatorias que llevan receptores de quimioquinas. Como se usa en el presente documento, "células proinflamatorias" incluye, pero sin limitación, leucocitos, ya que los receptores de quimioquinas pueden expresarse en otros tipos celulares tales como neuronas y células epiteliales.

Aunque no se desea limitación por ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que los compuestos de la invención son antagonistas del receptor de quimioquinas CCR1 y que los efectos terapéuticos beneficiosos derivados del método de la invención son el resultado del antagonismo de la función de CCR1. De esta manera, el método y los compuestos de la invención pueden usarse para tratar una patología en la que están implicadas células que expresan CCR1 en su superficie y que responden a señales transducidas a través de CCR1, así como las afecciones específicas mencionadas anteriormente.

En una realización, en antagonista de la función receptora de quimioquina se representa por la Fórmula Estructural (I):



y sales fisiológicamente aceptables de la misma.

45 En dichos compuestos:

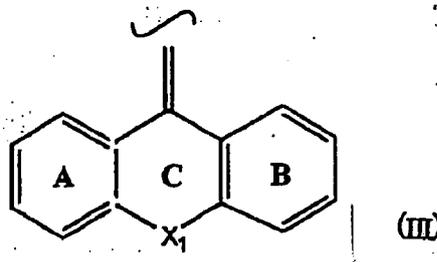
n es dos;

M es $>C(OH)R^2$;

R² es 4-clorofenilo;

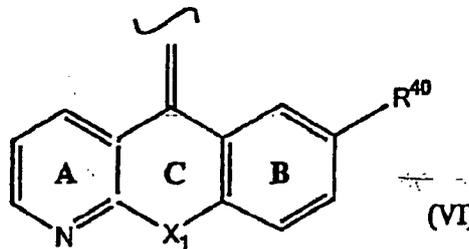
el anillo que contiene M está sustituido; y

Z es un sistema de anillos tricíclico proporcionado por la Fórmula Estructural (III)

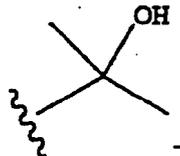


- 5 en la que X₁ es -CH₂-O-, el Anillo A es un grupo piridilo, el Anillo B es un grupo fenilo y el Anillo B está para sustituido con respecto al Anillo B que está enlazado a X₁ del Anillo C.

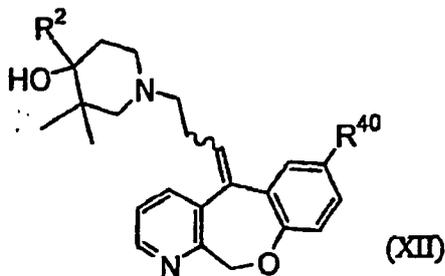
Por tanto, Z puede representarse por la Fórmula Estructural (VI):



en la que X es -CH₂-O- y R⁴⁰ es

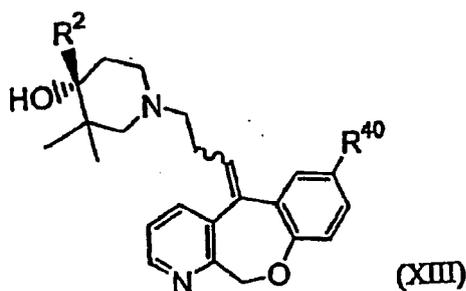


- 10 A este respecto, los compuestos de la invención se representan adicionalmente mediante la fórmula:



o una sal fisiológicamente aceptable de la misma, en la que R² es 4-clorofenilo y R⁴⁰ es como se describe en el presente documento.

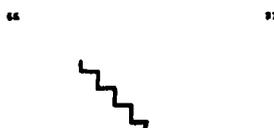
- 15 En una realización particularmente preferida el compuesto es el enantiómero (S) del compuesto de Fórmula (XII) y tiene la estructura:



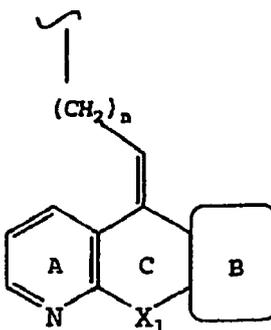
o una sal fisiológicamente aceptable, en la que R² es 4-clorofenilo y R⁴⁰ es



- 5 Los compuestos descritos en el presente documento pueden obtenerse como isómeros configuracionales E y Z. Se señala especialmente que la invención incluye compuestos de la configuración E y la configuración Z entorno al doble enlace que conecta al Anillo C de Z con el resto de la molécula, y un método para tratar un sujeto con compuestos de la configuración E, la configuración Z, y mezclas de las mismas. Por consiguiente, en las fórmulas estructurales presentadas en el presente documento, el símbolo:



- 10 se usa para representar tanto la configuración E como la configuración Z. Preferiblemente, el Anillo A y la cadena de alqueno enlazada al Anillo C están en la configuración. Por ejemplo, los compuestos pueden tener la configuración de:



- 15 Se entiende que una configuración puede tener una actividad mayor que otra. La configuración deseada puede determinarse por detección selectiva de la actividad, empleando los métodos descritos en el presente documento.

- Además, determinados compuestos de la invención pueden obtenerse como estereoisómeros diferentes (por ejemplo, diastereómeros y enantiómeros). Los compuestos de la invención pueden prepararse en forma de racematos o en forma de estereoisómeros sustancialmente puros. Los estereoisómeros de la invención (por ejemplo, enantiómeros (S) y (R)) pueden prepararse usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, los enantiómeros pueden resolverse a partir del racemato usando cromatografía quiral o recristalización. Preferiblemente, los estereoisómeros (por ejemplo, enantiómeros (S) y/o (R)) se preparan por síntesis estereoespecíficas como se describe en el presente documento.
- 20

La configuración óptica de los estereoisómeros de la invención se asigna usando el método (R),(S) de Cahn-Ingold-Prelog. (Véase, J. March, "Advanced Organic Chemistry," 4ª Edición, Wiley Interscience, Nueva York, pp.109-111 (1992)).

- 25 La invención incluye todas las formas isoméricas y mezclas racémicas de los compuestos descritos y un método para tratar un sujeto con isómeros puros y mezclas de los mismos, incluyendo mezclas racémicas. Pueden separarse y aislarse estereoisómeros usando cualquier método adecuado, tal como cromatografía. De nuevo, se entiende que un estereoisómero puede tener más actividad que otro. El isómero deseado se determina por detección selectiva.

También se incluyen en la presente invención sales fisiológicamente aceptables de los compuestos descritos en el presente documento. Pueden obtenerse sales de compuestos que contengan una amina u otros grupos básico, por ejemplo, haciendo reaccionar con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, tal como cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido acético, ácido cítrico, ácido perclórico y similares. Los compuestos con un grupo amonio cuaternario también pueden contener un contraión, tal como cloruro, bromuro, yoduro, acetato, perclorato y similares. Pueden prepararse sales de compuestos que contengan un ácido carboxílico u otro grupo funcional ácido, haciendo reaccionar con una base adecuada, por ejemplo, una base hidróxido. Las sales de grupos funcionales ácidos contienen un contraión, tal como sodio, potasio, amonio, calcio y similares. (Véase, por ejemplo, Berge S.M. et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharma. Sci., 66:1 (1977).)

En las fórmulas estructurales representadas en el presente documento, en enlace simple o doble mediante el que un grupo o resto químico está conectado al resto de la molécula o compuesto se indica mediante el siguiente símbolo:



Por ejemplo, el símbolo correspondiente en la Fórmula Estructural (III) indica el doble enlace mediante el que el anillo central del sistema de anillos tricíclico está conectado al resto de la molécula representada por la Fórmula Estructural (I).

Un "sujeto" es preferiblemente un pájaro o un mamífero, tal como un ser humano, pero puede ser también un animal que necesita tratamiento veterinario, por ejemplo animales domésticos (por ejemplo, perros, gatos y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, aves de corral, cerdos, caballos y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas y similares).

Una "cantidad eficaz" de un compuesto es una cantidad que ocasiona la inhibición de uno o más procesos mediados por la unión de una quimioquina a un receptor en un sujeto con una enfermedad asociada con un reclutamiento o activación aberrante de leucocitos. Los ejemplos de tales procesos incluyen migración de leucocitos, activación de integrinas, aumentos transitorios en la concentración de calcio libre intracelular [Ca^{2+}], y liberación de gránulos de mediadores proinflamatorios. Como alternativa, una "cantidad eficaz" de un compuesto es una cantidad suficiente para conseguir un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, tal como una cantidad que produce la prevención o una disminución de los síntomas asociados con una enfermedad relacionada con un reclutamiento y/o activación aberrante de leucocitos.

La cantidad de compuesto administrado al individuo dependerá del tipo y gravedad de la enfermedad y de las características del individuo, tales como salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a fármacos. También dependerá del grado, gravedad y tipo de enfermedad. El especialista en la técnica será capaz de determinar las dosis apropiadas dependiendo de estos y otros factores. Típicamente, una cantidad eficaz del compuesto puede variar de aproximadamente 0,1 mg al día a aproximadamente 100 mg al día para un adulto. Preferiblemente, la dosis varía de aproximadamente 1 mg al día a aproximadamente 100 mg al día. Un antagonista de la función del receptor de quimioquinas también puede administrarse junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo teofilina, broncodilatadores β -adrenérgicos, corticosteroides, antihistamínicos, agentes antialérgicos, agentes inmunosupresores (por ejemplo, ciclosporina A, FK-506, prednisona, metilprednisolona), hormonas (por ejemplo, hormona adrenocorticotrópica (ACTH)), citoquinas (por ejemplo, interferones (por ejemplo IFN β -1a, IFN β -1b)) y similares.

El compuesto puede administrarse por cualquier vía adecuada incluyendo, por ejemplo, por vía oral en cápsulas, suspensiones o comprimidos o por administración parenteral. La administración parenteral puede incluir, por ejemplo, administración sistémica, tal como por inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. El compuesto también puede administrarse por vía oral (por ejemplo, en la dieta), transdérmica, tópica, por inhalación (por ejemplo, intrabronquial, intranasal, inhalación oral o gotas intranasales) o por vía rectal, dependiendo de la enfermedad o afección a tratar. Son modos preferidos de administración la administración oral o la administración parenteral.

El compuesto puede administrarse al individuo en conjunto con un vehículo farmacéutico o fisiológico aceptable como parte de una composición farmacéutica para el tratamiento de una infección por VIH, enfermedad inflamatoria o las otras enfermedades que se han analizado anteriormente. La formulación de un compuesto a administrar variará de acuerdo con la vía de administración seleccionada (por ejemplo, solución, emulsión, cápsula). Los vehículos adecuados pueden contener ingredientes inertes que no interaccionan con el compuesto. Pueden emplearse técnicas de formulación farmacéuticas convencionales tales como las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Los vehículos adecuados para administración parenteral incluyen, por ejemplo, agua estéril, solución salina fisiológica, solución salina bacteriostática (solución salina que contiene aproximadamente un 0,9% de alcohol bencílico), solución salina tamponada con fosfato, solución de Hank, lactato de Ringer y similares. Los métodos para encapsular composiciones (tal como en un recubrimiento de gelatina dura o

ciclodextrano) se conocen en la técnica (Baker, et al., "Controlled Release of Biological Active Agents", John Wiley and Sons, 1986).

La cantidad de ingrediente activo (uno o más compuestos de la invención) en la composición puede variar de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 99,9% en peso. Preferiblemente, la cantidad de ingrediente activo es de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 90%, o de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 80% en peso. Una preparación de dosis unitaria puede contener de 1 mg a aproximadamente 1000 mg de ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg de ingrediente activo. La composición, si se desea, también puede contener otros agentes terapéuticos compatibles tales como teofilina, broncodilatadores β -adrenérgicos, corticosteroides, antihistamínicos, agentes antialérgicos, agentes inmunosupresores (por ejemplo, ciclosporina A, FK-506, prednisona, metilprednisolona), hormonas (por ejemplo, hormona adrenocorticotrópica (ACTH)), citoquinas (por ejemplo, interferones (por ejemplo, IFN β -1a, IFN β -1b)) y similares.

En una realización, la composición farmacéutica comprende el enantiómero (S) de un compuesto de la invención (por ejemplo, un compuesto de Fórmula Estructural (XIII)) y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. Por ejemplo, en una realización, la composición comprende (S)-4-(4-cloro-fenil)-1-{3-[7-(1-hidroxi-1-metil-etil)-1H-10-oxa-1-aza-dibenzo[a,d]ciclohepten-5-ilideno]-propil}-3,3-dimetil-piperidin-4-ol y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende el enantiómero (S) de un compuesto de la invención (por ejemplo, un compuesto de Fórmula Estructural (XIII)) y carece sustancialmente del enantiómero (R) correspondiente (que contiene al menos aproximadamente el 98% o al menos aproximadamente el 99% de exceso enantiomérico del enantiómero (S)). En otra realización, la composición comprende el enantiómero (S) de un compuesto de la invención (por ejemplo, un compuesto de Fórmula Estructural (XII)), el enantiómero (R) correspondiente y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. En una realización más particular, la composición comprende un compuesto racémico de Fórmula Estructural (XII), por ejemplo, 4-(4-cloro-fenil)-1-{3-[7-(1-hidroxi-1-metil-etil)-11H-10-oxa-1-aza-dibenzo[a,d]ciclohepten-5-ilideno]-propil}-3,3-dimetil-piperidin-4-ol racémico. En otras realizaciones, la proporción de enantiómero (S):enantiómero (R) (p/p) en las composiciones es al menos aproximadamente 2:1 o aproximadamente 5:1 o aproximadamente 10:1 o aproximadamente 20:1 o aproximadamente 50:1.

La actividad de los compuestos de la presente invención puede evaluarse usando ensayos adecuados, tales como ensayos de unión a receptores y ensayos de quimiotaxis. Por ejemplo, como se describe en la Sección de Ejemplos, se han identificado antagonistas de molécula pequeña de la unión a RANTES y MIP-1 α utilizando células THP-1 que se unen a RANTES y manifiestan quimiotaxis en respuesta a RANTES y MIP-1 α como modelo de quimiotaxis de leucocitos. Específicamente, se usó un ensayo de unión a receptores de alto rendimiento, que controla la unión de ¹²⁵I-RANTES y ¹²⁵I-MIP-1 α a membranas de células THP-1, para identificar antagonistas de molécula pequeña que bloquean la unión de RANTES y MIP-1 α . Los compuestos de la presente invención también pueden identificarse gracias a su capacidad de inhibir las etapas de activación inducidas por la unión de una quimioquina a su receptor, tal como quimiotaxis, activación de integrinas y liberación de mediadores de gránulos. También pueden identificarse gracias a su capacidad de bloquear la respuesta quimiotáctica de HL-60, células T, células mononucleares de sangre periférica y eosinófilos mediada por RANTES y MIP-1 α .

Los compuestos que se han descrito en este documento pueden prepararse de acuerdo con los esquemas que se han mostrado en las Figuras 1-5 y 7. Los esquemas se describen con más detalle a continuación.

La Figura 1 muestra la preparación de compuestos representados por la Fórmula Estructural (I). L¹ es PPh₃Cl, PPh₃Br, PPh₃I o (EtO)₂P(O). L² es un grupo saliente adecuado tal como halógeno, p-tolueno sulfonato, mesilato, alcoxi y fenoxi; Pg es un grupo protector adecuado tal como tetrahidropiraniolo; y los otros símbolos son como se han definido anteriormente.

En la Etapa 1 de la Figura 1, se realiza una reacción de Wittig en un disolvente tal como éter o tetrahidrofurano (THF) en presencia de una base tal como hidruro sódico, n-butil litio o diisopropilamida de litio (LDA) a 0°C hasta la temperatura de reflujo para el disolvente usado durante 5 minutos a 72 h. Los compuestos representados por la Fórmula II en la Figura 1 pueden prepararse por métodos que se han descrito en el documento JP 61/152673, Patente de Estados Unidos 5089496, documentos WO 89/10369, WO 92/20681 y WO 93/02081, cuyas enseñanzas enteras se incorporan en este documento como referencia.

En la Etapa 2 de la Figura 1, la desprotección se realiza con un ácido en un disolvente tal como metanol a temperatura ambiente hasta la temperatura de reflujo para el disolvente usado durante 5 minutos a 72 h. Como alternativa, un compuesto de los representados por la Fórmula V en la Figura 1 puede prepararse directamente a partir de la etapa 1 sin aislar un intermedio. La mezcla de reacción obtenida después del tratamiento de la reacción que se ha descrito en la etapa 1 puede disolverse en el disolvente y hacerse reaccionar con el ácido.

En la Etapa 3 de la Figura 1, el grupo hidroxilo puede convertirse en un grupo saliente por métodos conocidos. Los compuestos representados por la Fórmula VI en la Figura 1 pueden prepararse por métodos que se han descrito en J. Med. Chem., 1992 (35) 2074-2084 y el documento JP 61/152673.

En la Etapa 4 de la Figura 1, se realiza una reacción de alquilación en un disolvente tal como acetona, metil etil cetona, acetato de etilo, tolueno, tetrahidrofurano (THF) o dimetilformamida (DMF) en presencia de una base tal como carbonato potásico o hidruro sódico y un catalizador tal como un yoduro de metal alcalino a temperatura ambiente hasta la temperatura de reflujo para el disolvente usado durante 5 minutos a 72 h.

5 La Figura 2 muestra la preparación de compuestos representados por el Compuesto (VI-b). En la Etapa 1 de la Figura 2, puede realizarse una reacción de Grignard en un disolvente tal como éter o tetrahidrofurano (THF) a 0°C hasta la temperatura de reflujo para el disolvente usado, durante 5 minutos a 72 h. El Compuesto VII está disponible en el mercado.

10 En la Etapa 2 de la Figura 2, puede realizarse la bromación con agentes de bromación tales como ácido bromhídrico, bromotrimetilsilano o complejo de tribromuro de boro-sulfuro de metilo en un disolvente tal como ácido acético, diclorometano o dicloroetano a temperatura ambiente hasta la temperatura de reflujo para el disolvente usado, durante 5 minutos a 72 h.

15 La Figura 3 muestra la preparación de compuestos representados por la Fórmula Estructural (I). En la Figura 3, puede realizarse una aminación reductora con agentes reductores tales como cianoborohidruro sódico, acetoxiborohidruro sódico o borohidruro sódico en un disolvente tal como metanol, etanol, tetrahidrofurano (THF), diclorometano o dicloroetano a temperatura ambiente hasta la temperatura de reflujo para el disolvente usado, durante 5 minutos a 72 h.

20 La Figura 4 muestra la preparación de compuestos representados por la Fórmula Estructural (I), donde Z se representa por la Fórmula Estructural (II) y en la que el Anillo A y/o el Anillo B en Z está sustituido con R⁴⁰. En la Figura 4, la reacción de alquilación puede realizarse en un disolvente tal como acetona, metil etil cetona, acetato de etilo, tolueno, tetrahidrofurano (THF) o dimetilformamida (DMF) en presencia de una base tal como carbonato potásico o hidruro sódico y un catalizador tal como un yoduro de metal alcalino a temperatura ambiente hasta la temperatura de reflujo para el disolvente usado, durante 5 minutos a 72 h.

25 La Figura 7 muestra la preparación de compuestos representados por la Fórmula Estructural (I), donde Z se representa por la Fórmula Estructural (III) y en la que el Anillo B en Z está sustituido con R⁴⁰. L⁴ es un grupo saliente adecuado, tal como halógeno o sulfonato de trifluorometilo. En la Figura 7, puede realizarse una reacción de acoplamiento de paladio, tal como acoplamiento de Stille, acoplamiento de Suzuki, reacción de Heck o carboxilación, usando monóxido de carbono, usando un catalizador de paladio, tal como tetraquis(trifenilfosfina)paladio, cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio y acetato de paladio, en un disolvente, tal como tetrahidrofurano (THF), 1,4-dioxano, tolueno, dimetilformamida (DMF) o dimetilsulfóxido (DMSO), en presencia de un aditivo (cuando sea necesario), tal como trifenilfosfina, 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno, trietilamina, bicarbonato sódico, cloruro de tetraetilamonio o cloruro de litio de temperatura ambiente hasta la temperatura de reflujo para el disolvente usado de 5 minutos a 72 h.

30 A lo largo de las Figuras 1-4 y 7 se muestra la preparación de compuestos en los que los Anillos A y B son anillos fenilo, pueden prepararse compuestos análogos con grupos heteroarilo para los Anillos A y B usando materiales de partida con grupos heteroarilo en las posiciones correspondientes. Estos materiales de partida pueden prepararse de acuerdo con métodos descritos en los documento JP 61/152673, Patente de Estados Unidos 5089496, WO 89/10369, WO 92/20681 y WO 93/ 02081.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1:

40 4-(4-Cloro-fenil)-1-{3-[7-(1-hidroxi-1-metil-etil)-11H-10-oxa-1-azadibenzo[a,d]ciclohepten-5-ilideno]-propil}-3,3-dimetil-piperidin-4-ol

Etapa 1: 1-Bencil-3,3-dimetil-piperidin-4-ona

45 A una solución de 1 -Bencil-3-metil-piperidin-4-ona (2,03 g, 10 mmol) en THF (10 ml) se le añadieron t-butóxido potásico (1,1 g, 10 mmol) y yoduro de metilo (0,62 ml, 10 mmol). Después, la solución se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 72 horas. La reacción se interrumpió con salmuera y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se concentraron al vacío, después se purificaron por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (35 g de SiO₂, gradiente de elución de hexano al 100% a acetato de etilo al 100%) para producir el compuesto del título en forma de un aceite incoloro. ¹H RMN (CDCl₃) δ: 1,12 (6H, s), 2,41 (2H, s), 2,52 (2H, m), 2,73 (2H, m), 3,56 (2H, s), 7,20-7,40 (5H, m). ESI-MS m/z: 218 (M +1).

50 Etapa 2: Éster terc-butílico del ácido 3,3-dimetil-4-oxo-piperidina-1-carboxílico

A una solución de 1-bencil-3,3-dimetil-piperidin-4-ona (2,48 g, 11 mmol) en etanol (100 ml) se le añadió dicarbonato de di-terc-butilo (2,18, 10 mmol) e hidróxido de paladio (0,10 g). Después, la suspensión se agitó en una atmósfera de hidrógeno (275,79 kPa (40 PSI)) a temperatura ambiente durante aproximadamente 12 horas más. La reacción se filtró a través de celite y se evaporó al vacío para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco.

^1H RMN (CDCl_3) δ : 1,12 (6H, s a), 1,48 (9H, s), 2,45-2,80 (3H, m), 3,12 (1H, m), 3,42 (1H, s a), 3,70 (1 H, m).

Etapa 3: Éster terc-butílico del ácido 4-(4-cloro-fenil)-4-hidroxi-3,3-dimetil-pip- eridine-1-carboxílico

A una solución enfriada con hielo de éster terc-butílico del ácido 3,3-dimetil-4-oxo-piperidin-1-carboxílico (1,6 g, 7,2 mmol) en THF (20 ml) se le añadió bromuro de 4-clorofenilmagnesio (1 M en éter, 15 ml, 15 mmol). La solución se dejó calentar a aproximadamente temperatura ambiente, después se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 22 horas. La reacción se interrumpió con cloruro de amonio acuoso y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se concentraron al vacío, después se purificaron por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (35 g SiO_2 , gradiente de elución de hexano al 100% a acetato de etilo al 100%) para producir el compuesto del título en forma de un aceite incoloro. ^1H RMN (CDCl_3) δ : 1,12 (6H, s), 1,50 (11H, m), 2,60 (1 H, m), 3,20 (2H, m), 3,56 (1 H, m), 4,20 (1 H, m), 7,20- 7,40 (4H, m). ESI-MS m/z: 218 (M + 1).

Etapa 4: 4-(4-Cloro-fenil)-3,3-dimetil-piperidin-4-ol

Se disolvió éster terc-butílico del ácido 4-(4-clorofenil)- 4-hidroxi- 3,3-dimetil-piperidin-1-carboxílico (0,25 g, 0,73 mmol) se disolvió en HCl 4 M/Dioxano (2 ml, 8 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 horas. El disolvente se retiró al vacío. El residuo se inactivó con hidróxido sódico acuoso, se extrajo con acetato de etilo y las capas orgánicas secaron sobre sulfato sódico y se evaporó al vacío para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillento. La mezcla se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.

4-(4-Cloro-fenil)-1-{3-[7-(1-hidroxi-1-metil-etil)-11H-10-oxa-1-aza-dibenzo[a,d]ciclohepten-5-ili-dene]-propil}-3,3-dimetil-piperidin-4-ol

A una solución de la mezcla de amino alcohol (0,17 g, 0,7 mmol) en isopropanol (5 ml) se le añadieron 2,6-lutidina (0,23 ml, 2,0 mmol) y yoduro potásico catalítico. Esta mezcla se calentó a aproximadamente 80 °C y se trató con 2-[5-(3-bromo-propilideno)-5,11-dihidro-10-oxa-1-aza-dibenzo[a,d]ciclohepten-7-il]-propan-2-ol (0,19 g, 0,5 mmol), añadido en porciones durante aproximadamente 2 horas. Después, la solución se agitó a aproximadamente 80 °C durante 2 horas más. La reacción se concentró al vacío, después se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (10 g de SiO_2 , gradiente de elución de acetato de etilo al 100% a acetato de etilo al 87%:metanol al 10%:trietilamina al 3%) para producir el compuesto del título en forma de un semisólido de color pardo. RMN ^1H (CDCl_3) δ : 0,78 (3H, s), 0,90 (3H, s), 1,45 (2H, m), 1,53 (6H, s), 2,28-2,80 (9H, m), 5,30 (2H, s a), 6,15 (1 H, t, J = 1,4 Hz), 6,79 (2H, d, J = 8,4 Hz), 7,18-7,45 (7H, m), 7,59 (1 H, d, J = 8 Hz), 8,45 (1 H, m). ESI-MS m/z: 533 (M + 1).

Ejemplo 2

5-4-(4-Cloro-fenil)-1-{3-[7-(1-hidroxi-1-metil-etil)-11H-10-oxa-1-aza-dibenzo[a,d]ciclohepten-5-ilideno]-propil}-3,3-dimetil-piperidin-4-ol

Etapa 1

En un matraz de fondo redondo de 2 bocas y 2 l, equipado con un agitador magnético, un condensador y un baño de agua grande a 10 °C, se le añadió éster terc-butílico del ácido 4-oxo-piperidina-1-carboxílico (125 g, 628 mmol) y tetrahidrofurano anhidro (1 l). A la solución de color amarillo resultante se le añadió yoduro de metilo (85 ml, 1365 mmol). Después, se le añadió en porciones t-butóxido sódico (150 g, 1560 mmol) durante 30 minutos. Se detectó una exortermia, especialmente al comienzo de la adición. Se realizó el calentamiento de la mezcla de reacción a un reflujo suave, la tasa se controló mediante la velocidad de adición de la base. La mezcla se agitó durante 30 minutos más. El disolvente se retiró al vacío. El residuo oleoso se trató con NH_4Cl /agua (500 ml) y se extrajo con éter (3 x 200 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se filtraron a través de un lecho corto de gel de sílice. El disolvente se retiró al vacío y el aceite de color amarillo resultante había comenzado a cristalizarse. Éste se dejó a alto vacío durante una noche. La mezcla se suspendió en hexano (50-100 ml) y se sometió a ultrasonidos durante un minuto. El sólido de color amarillo se recogió por filtración y se lavó con hexano (100 ml). El primer cultivo de éster terc-butílico del ácido 3,3-dimetil-4-oxo-piperidina-1-carboxílico produjo un sólido de color amarillo. (Véase, preparación de (37) en Vice, S. et al., J. Org. Chem., 66:2487- 2492 (2001).)

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1,13 (s, 6 H), 1,49 (s, 9 H), 2,49 (t, 2 H), 3,43 (s a, 2 H), 3,73 (t, 2 H).

Etapa 2

Un matraz de fondo redondo de 2 l y 2 bocas se equipó con 2 embudos de goteo de 125 ml y una barra de agitación. El conjunto se secó a la llama en una atmósfera de nitrógeno seco. El matraz se cargó con THF (700 ml) y 4-bromo-clorobenceno (33,7 g, 176 mmol, 2,5 equiv.). La solución resultante se enfrió a -78 °C en un baño de hielo seco/acetona. A uno de los embudos de goteo se le añadió butillitio (2,5 M en hexanos, 70 ml, 175 mmol, 2,5 equiv.) mediante una cánula. La solución de butillitio se añadió lentamente a la solución de THF frío durante 1 h. Se continuó agitando durante 0,5 h más, proporcionando una suspensión de color blanco. Una solución de éster terc-butílico del ácido 3,3-dimetil-4-oxo- piperidina-1-carboxílico (16,0 g, 70,5 mmol, 1 equiv.) en THF (100 ml) se preparó y se añadió a la mezcla de reacción mediante el segundo embudo de gotero durante 1,75 h. La mezcla resultante se agitó a -78 °C durante 2 h, momento en el que la reacción pareció estar esencialmente completa según análisis TLC. Se añadió

NH₄Cl acuoso saturado (150 ml) y la reacción se dejó calentar a ta. Se añadió agua (150 ml) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 + 1 l). Los extractos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron. El residuo sólido se trituro con acetato de etilo y se filtró. El sobrenadante se concentró y se trituro con éter. Después, el sobrenadante resultante se trituro con éter/éter de petróleo. Los sólidos resultantes se combinaron para proporcionar éster terc-butílico del ácido 4-(4-cloro-fenil)-4-hidroxi-3,3-dimetil-piperidin-1-carboxílico (17,52 g, 51,6 mmol, 73%) en forma de un sólido de color blanquecino.

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 0,82 (s, 6 H), 1,34 -1,44 (m, 2H), 1,49 (s, 9 H), 2,67 (ddd, 1 H), 3,10 - 3,70 (m, 3 H), 4,00 - 4,30 (m, 1 H), 7,31 (d, 2 H), 7,39 (d, 2 H).

10 Etapa 3

A una solución enfriada (0 °C) del compuesto preparado en la etapa 2 (10,42 g, 30,7 mmol) en cloruro de metileno (300 ml) se le añadió lentamente ácido trifluoroacético (60 ml) durante 1,25 h. La solución de color amarillo resultante se agitó a 0 °C durante 1,5 h más. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en acetato de etilo (1,2 l), se lavó con hidróxido sódico acuoso (1 N, 150 ml). La fase acuosa se extrajo con más cantidad de acetato de etilo (200 ml) y los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron. El residuo sólido resultante se trituro con éter para proporcionar 4-(4-clorofenil)-3,3-dimetil-piperidin-4-ol (6,94 g, 29,0 mmol, 94%) en forma de un sólido de color blanquecino. ¹H RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ: 0,73 (s, 3 H), 0,85 (s, 3 H), 1,42 (ddd, 1 H), 2,36 (d, 1 H), 2,61 (ddd, 1 H), 2,91 (dd a, 1 H), 3,08 - 3,19 (m, 2 H), 7,26 - 7,32 (m, 2 H), 7,44 - 7,50 (m, 2 H). MS m/z: 240 (M + 1).

20 Etapa 4

Un matraz de 3 bocas y 5 l visiblemente limpio se equipó con un agitador en su parte superior y se lavó abundantemente con nitrógeno durante 20 min. Se añadieron 4-(4-cloro-fenil)-3,3-dimetil-piperidin-4-ol (202 g, 843 mmol), ácido L-(+)-tartárico (114 g, 759 mmol) y 4040 ml de una mezcla 9:1 de butanona:agua en el matraz. La mezcla se calentó a reflujo. Se añadió en porciones agua (202 ml) durante 45 min (proporción de butanona a agua: 6:1) para disolver por completo la mezcla sólida. Se continuó calentando a reflujo durante 45 min más, después la fuente de calor se apagó y el matraz se dejó enfriar lentamente a ta durante una noche. Los sólidos se retiraron con filtración por succión y se secaron durante 3 d al vacío para proporcionar el enantiómero S (134,4 g, 41%) en forma de la sal L-(+) tartrato.

La sal anterior se repartió entre NaOH 1 M y cloruro de metileno (lavado con salmuera y secado con sulfato sódico) para proporcionar la base libre. ¹H RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ: 0,73 (s, 3 H), 0,85 (s, 3 H), 1,42 (ddd, 1 H), 2,36 (d, 1 H), 2,61 (ddd, 1 H), 2,91 (dd a, 1 H), 3,08 - 3,19 (m, 2 H), 7,26 = 7,32 (m, 2 H), 7,44 - 7,50 (m, 2 H). MS m/z: 240 (M + 1).

Etapa 5

A una solución del producto homoquiral de la etapa 4 (2,40 g, 10 mmol) en acetonitrilo (80 ml) y agua (20 ml) se le añadió carbonato potásico (1,39 g, 10 mmol), seguido de 2-[5-(3-bromo-propilideno)-5,11-dihidro-10-oxa-1-aza-dibenzo[a,d]ciclohepten-7-il]-propan-2-ol (2,49 g, 6,67 mmol). La mezcla bifásica se agitó a ta durante 48 h. Se acetonitrilo por evaporación rotatoria y la suspensión resultante se repartió entre acetato de etilo y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró para proporcionar un sólido oleoso que se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (cloruro de metileno - gradiente de 90/10 de cloruro de metileno/metanol) para proporcionar el compuesto del título en forma de un polvo de color blanquecino (2,63 g, 74%).

¹H RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ: 0,71 (s, 3 H), 0,84 (s, 3 H), 1,4-1,55 (m, 9 H), 2,18 - 2,81 (m, 9 H), 5,15 - 5,40 (s a, 2 H), 6,23 (t, 1 H), 6,74 (d, 1 H), 7,23 - 7,31 (m, 3 H), 7,42 - 7,50 (m, 4 H), 7,80 (dd, 1 H), 8,47 (dd, 1 H). MS m/z: 533 (M + 1).

Ejemplo 3

R-4-(4-Cloro-fenil)-1-{3-[7-(1-hidroxi-1-metil-etil)-11H-10-oxa-1-aza-dibenzo[a,d]ciclohepten-5-ilideno]-propil}-3,3-dimetil-piperidin-4-ol

Etapa 1

Se disolvió 4-(4-cloro-fenil)-3,3-dimetil-piperidin-4-ol racémico (0,500 g, 2,086 mmol) en una cantidad mínima de alcohol isopropílico caliente (aprox. 5 ml). La solución caliente se filtró a través de un lecho de algodón y se transfirió a una solución de ácido (1S)-(+)-10-canforsulfónico (0,484 g, 2,086 mmol) en alcohol isopropílico (aprox. 3 ml). La mezcla se agitó vigorosamente durante varios minutos, tiempo durante el cual se formó un precipitado espeso y se dejó enfriar a ta durante 0,25 h. Los sólidos se retiraron por filtración por succión y se secaron al vacío. La sal secada se disolvió en alcohol isopropílico caliente (aprox. 50 ml), se filtró a través de un lecho de algodón y se dejó enfriar lentamente a ta, sin cambios, durante una noche. Los sólidos que se formaron después de la refrigeración (95 mg, 19% del teórico) se retiraron por filtración por succión y mostraron por HPLC analítica que eran enantioméricamente puros. La sal se suspendió en acetato de etilo y se neutralizó con hidróxido sódico (1 N). La fase orgánica homogénea se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se secó para proporcionar R-4-(4-cloro-fenil)-3,3-dimetil-piperidin-4-ol.

¹H RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ: 0,73 (s, 3 H), 0,85 (s, 3 H), 1,42 (ddd, 1H), 2,36 (d, 1 H), 2,61 (ddd, 1 H), 2,91 (dd a, 1 H), 3,08 - 3,19 (m, 2 H), 7,26 - 7,32 (m, 2 H), 7,44 - 7,50 (m, 2 H). MS m/z: 240 (M + 1).

Etapa 2

5 El compuesto del título se preparó siguiendo el procedimiento en la etapa 5 del Ejemplo 502, sustituyendo S-4-(4-cloro-fenil)-3,3-dimetil-piperidin-4-ol por R-4-(4-cloro-fenil)-3,3-dimetil-piperidin-4-ol. ¹H RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ: 0,71 (s, 3 H), 0,84 (s, 3 H), 1,4-1,55 (m, 9 H), 2,18-2,81 (m, 9 H), 5,15-5,40 (s a, 2 H), 6,23 (t, 1 H), 6,74 (d, 1 H), 7,23 - 7,31 (m, 3 H), 7,42 - 7,50 (m, 4 H), 7,80 (dd, 1 H), 8,47 (dd, 1 H). MS m/z: 533 (M + 1).

Ejemplo 4: Preparaciones de Membrana para la Unión y Ensayos de Unión de Quimioquinas

10 Se prepararon membranas a partir de células THP-1 (ATCC N° TIB202). Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con PBS (solución salina tamponada con fosfato) y los sedimentos celulares se congelaron a una temperatura de -70°C a -85°C. El sedimento congelado se descongeló en tampón de lisis enfriado con hielo consistente en HEPES (ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etano-sulfónico) 5 mM, pH 7,5, EDTA (ácido etilendiaminatetraacético) 2 mM, 5 µg/ml de cada uno de los siguientes: aprotinina, leupeptina y quimostatina (inhibidores de proteasa) y 100 µg/ml de PMSF (sulfonil fluoruro de fenil metano - también un inhibidor de proteasa), a 15 una concentración de 1 a 5 x 10⁷ células/ml. Este procedimiento tiene como resultado la lisis celular. La suspensión se mezcló bien para resuspender todo el sedimento celular congelado. Los núcleos y desechos celulares se retiraron por centrifugación de 400 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y los fragmentos de membrana se recogieron por centrifugación a 25.000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se aspiró y el sedimento se resuspendió en tampón de congelación consistente en HEPES 10 mM, pH 7,5, sacarosa 300 mM, 1 µg/ml de cada uno de los siguientes: aprotinina, leupeptina y quimostatina, y 10 µg/ml de PMSF (aproximadamente 0,1 ml por cada 10⁸ células). Todos los bloques se eliminaron usando un minihomogeneizador, y la concentración total de proteínas se determinó usando un kit de ensayo de proteínas (Bio-Rad, Hercules, CA, n° cat 500-0002). Después se cogieron alícuotas de la solución de membrana y se congelaron a una temperatura de -70 a -85°C hasta que se necesitaron.

25 Los ensayos de unión utilizaron las membranas descritas anteriormente. Se incubó proteína de membrana (de 2 a 20 µg de proteína de membrana total) con una concentración de 0,1 a 0,2 nM de RANTES o MIP-1α marcados con ¹²⁵I con o sin competidor no marcado (RANTES o MIP-1α) o diversas concentraciones de compuestos. Las reacciones de unión se realizaron en 60-100 µl de tampón de unión consistente en HEPES 10 mM, pH 7,2, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM y BSA (albúmina de suero bovino) al 0,5%, durante 60 min a temperatura ambiente. Las reacciones de unión se 30 terminaron recogiendo las membranas por filtración rápida a través de filtros de fibra de vidrio (GF/B o GF/C, Packard) que se habían humedecido previamente en polietilenimina al 0,3%. Los filtros se aclararon con aproximadamente 600 µl de tampón de unión que contenía NaCl 0,5 M, se secaron y la cantidad de radiactividad unida se determinó por recuento de centelleo en un contador de placas beta Topcount.

35 Las actividades de los compuestos de ensayo se presentan en la siguiente Tabla como valores de CI₅₀ o la concentración de inhibidor necesaria para la inhibición del 50% de la unión específica en los ensayos de unión a receptores usando ¹²⁵I-RANTES o ¹²⁵I-MIP-1α como ligando y membranas de células THP-1. La unión específica se define como la unión total menos la unión no específica; la unión no específica es la cantidad de cpm que se detecta en presencia de un exceso de Rantes o MIP-1α sin marcar.

Tabla de Datos Biológicos

Ejemplo	CI50 (µM)
2	<1
3	<1

40

REIVNDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende el enantiómero (S) y el enantiómero (R) de 4-(4-clorofenil)-1-{3-[7-(1-hidroxi-1-metil-etil)-11H-10-oxa-1-aza-dibenzo[a,d]ciclohepten-5-ili-deno]-propil}-3,3-dimetilpiperidín-4-ol, o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, en el que la proporción del enantiómero (S) con respecto al enantiómero (R) (p/p) en la composición es al menos aproximadamente 2:1.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la proporción del enantiómero (S) con respecto al enantiómero (R) (p/p) en la composición es al menos aproximadamente 5:1.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la proporción del enantiómero (S) con respecto al enantiómero (R) (p/p) en la composición es al menos aproximadamente 10:1.
- 10 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la proporción del enantiómero (S) con respecto al enantiómero (R) (p/p) en la composición es al menos aproximadamente 20:1.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la proporción del enantiómero (S) con respecto al enantiómero (R) (p/p) en la composición es al menos aproximadamente 50:1.
- 15 6. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable.
- 20 7. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con el reclutamiento aberrante de leucocitos, la activación aberrante de leucocitos o el reclutamiento y la activación aberrantes de leucocitos, donde dicha enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en artritis, aterosclerosis, arteriosclerosis, reestenosis, lesión por isquemia/reperfusión, diabetes mellitus, psoriasis, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, rechazo de un órgano o tejido trasplantado, rechazo frente a enfermedad de huésped, alergia y asma.

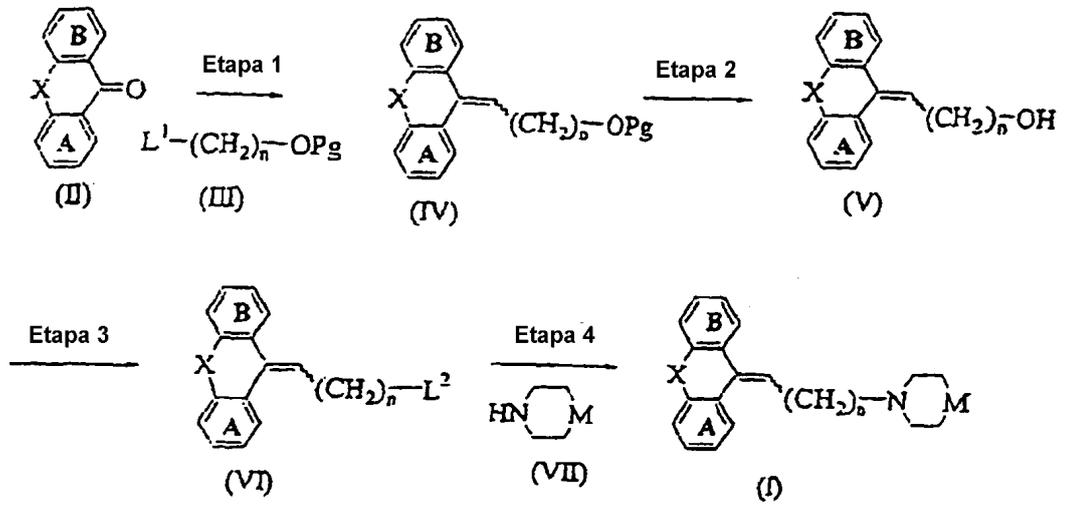


Figura 1

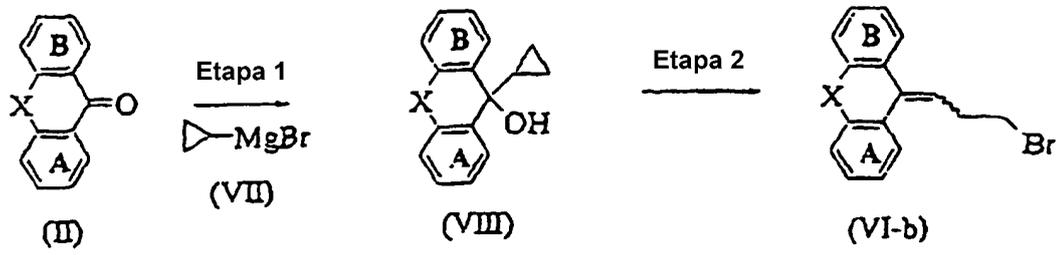


Figura 2

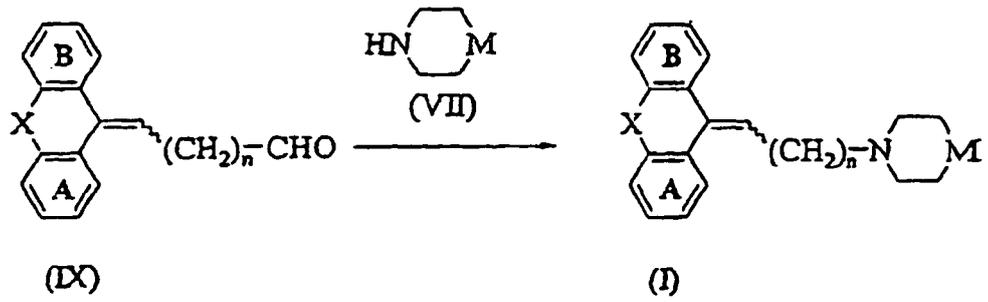


Figura 3

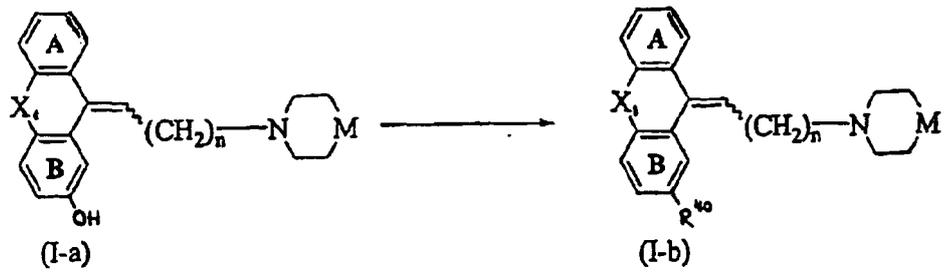


Figura 4

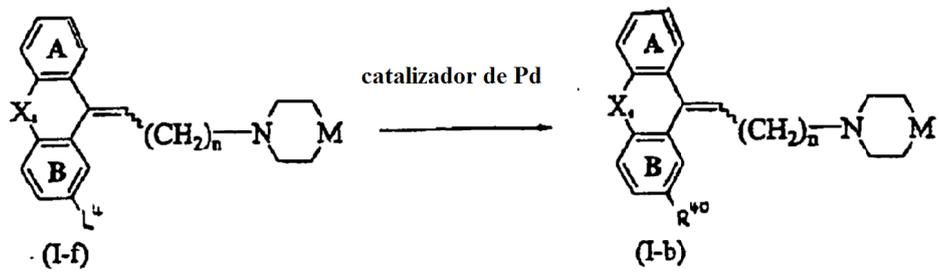


Figura 7

Fig. 8a

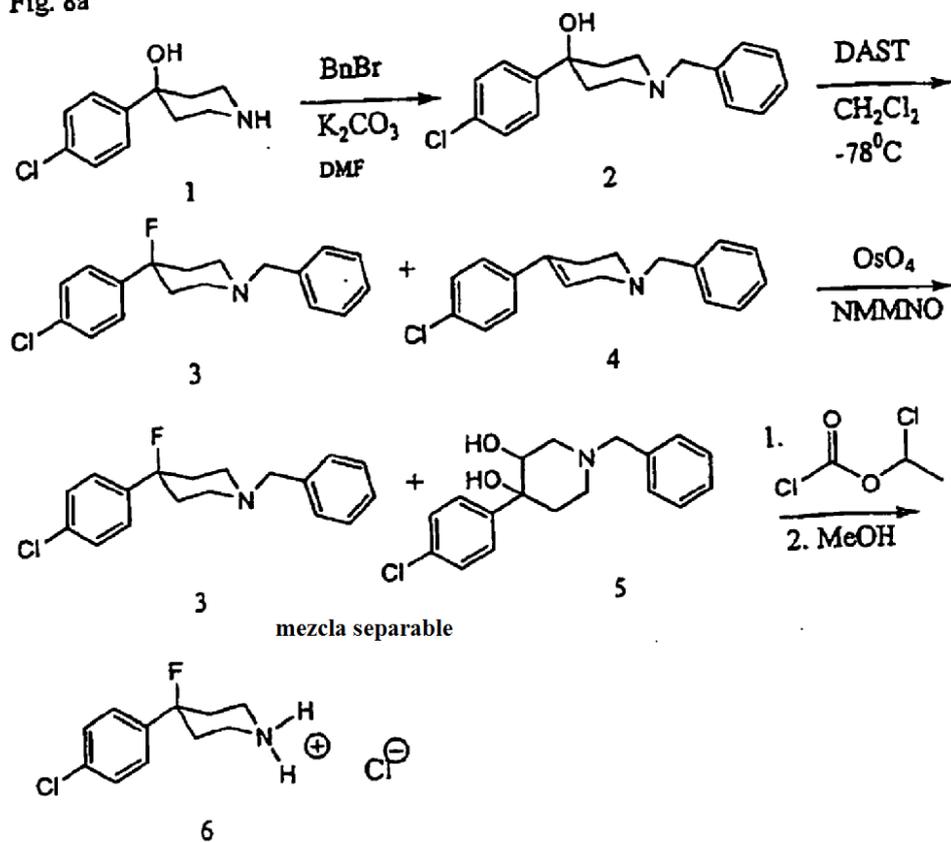


Fig. 8b

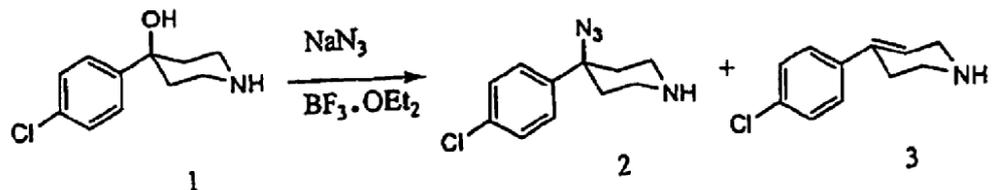


Fig 8c.

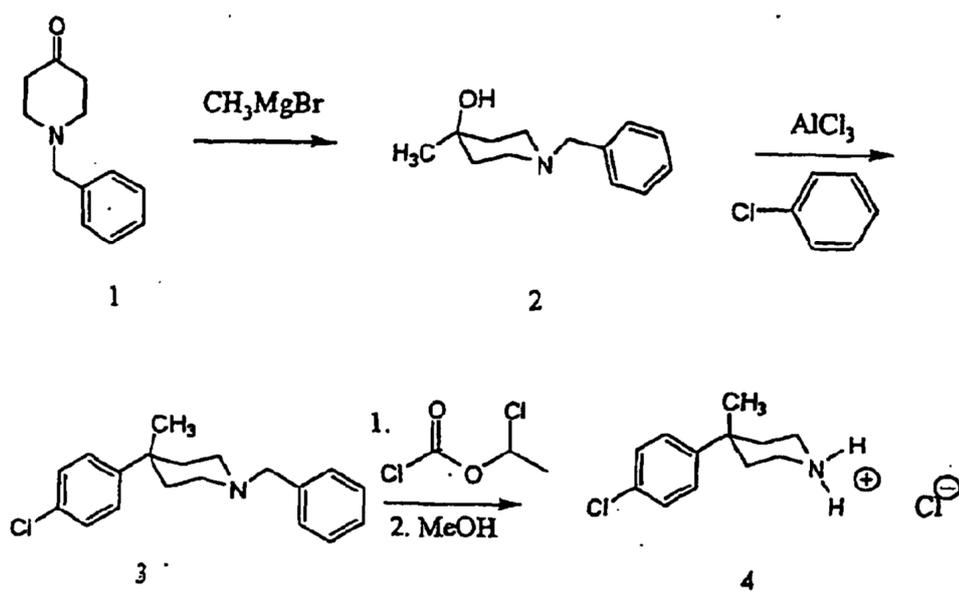


Fig. 9c

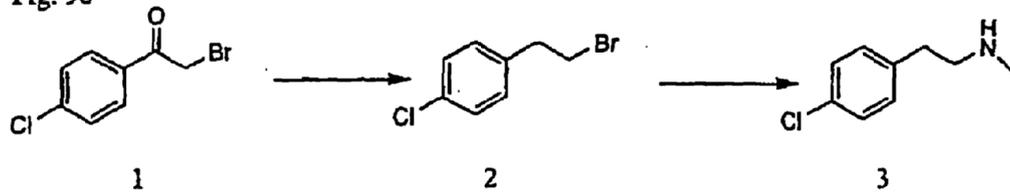


Fig. 9d

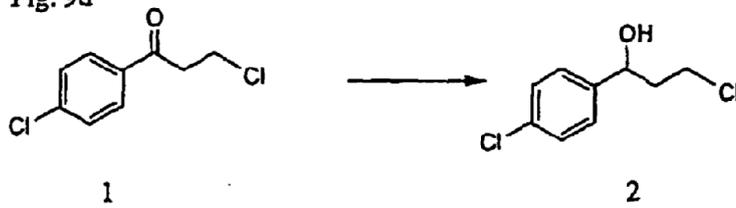
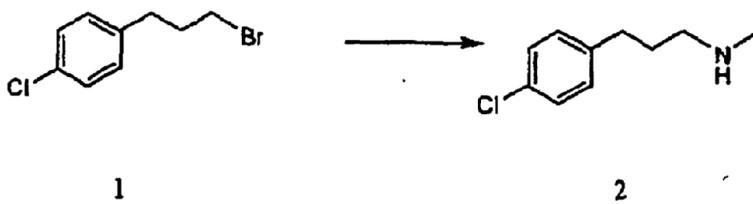


Fig. 9e



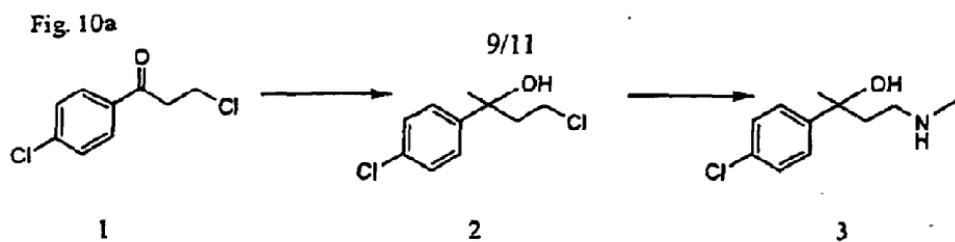


Fig. 10b

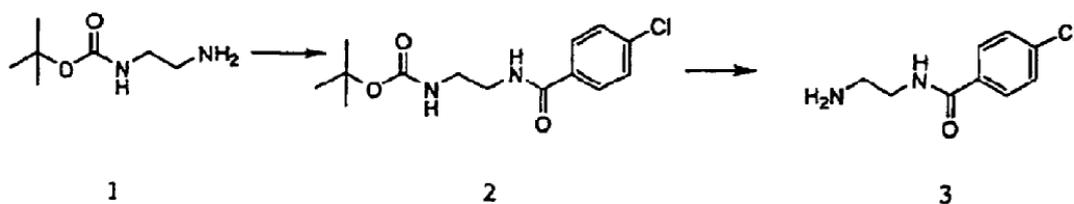
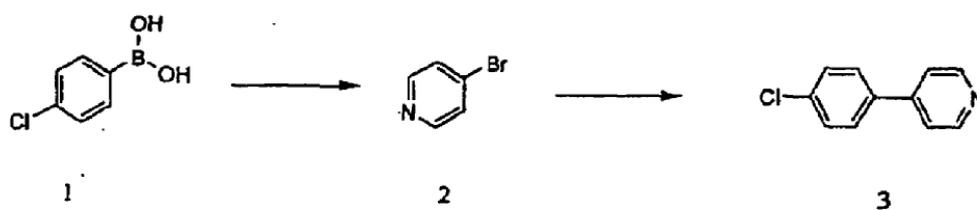


Fig. 10d



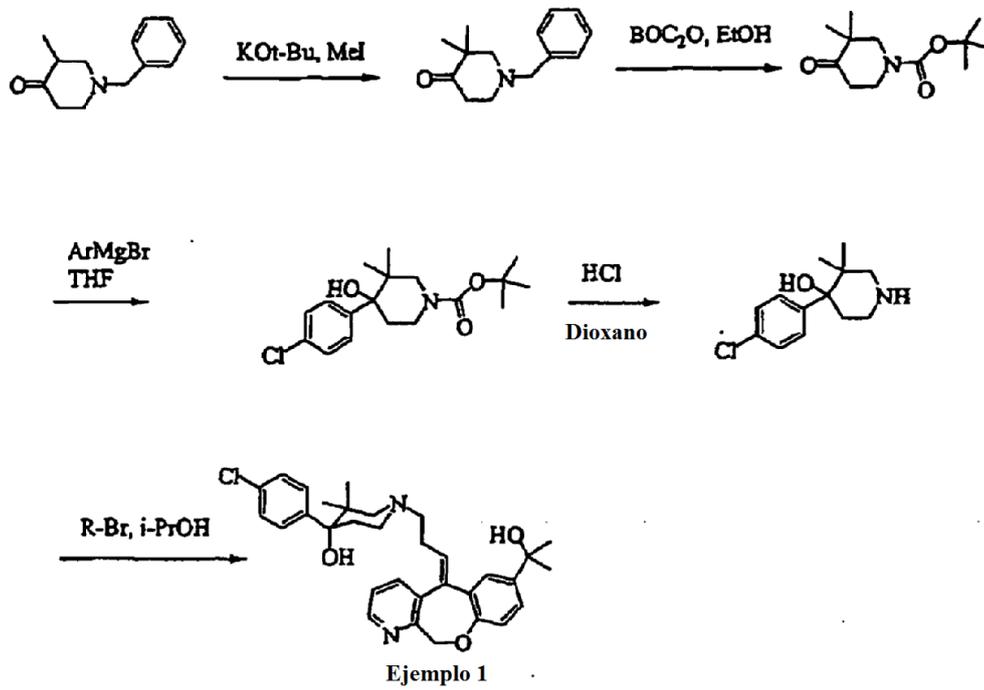
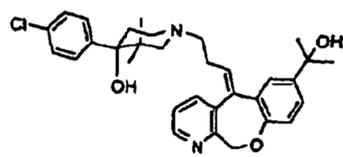
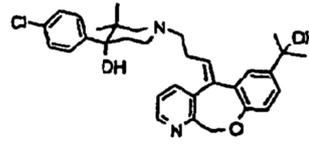


Figura 18



Ejemplo 2



Ejemplo 3

Figura 23