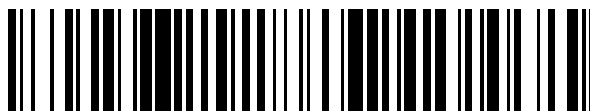


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 333**

51 Int. Cl.:

C07D 211/76 (2006.01)

C07D 405/06 (2006.01)

A61K 31/45 (2006.01)

A61K 31/4525 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2003 E 03753187 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 1551805**

54 Título: **γ -Fenil- Δ -lactamas sustituidas y usos relacionados con las mismas**

30 Prioridad:

01.10.2002 US 263336

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

26.06.2013

73 Titular/es:

DART NEUROSCIENCE (CAYMAN) LTD (100.0%)
10 Market Street, PO Box 774, Camana Bay
Grand Cayman KY1-9006 , KY

72 Inventor/es:

SHEN, YAPING;
BURGOYNE, DAVID, L.;
LAUENER, RONALD, W.;
ZHOU, YUANLIN;
REBSTEIN, PATRICK y
ABRAHAM, SAMUEL, D., M.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 409 333 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

γ -Fenil- Δ -lactamas sustituidas y usos relacionados con las mismas.

Campo de la invención

5 Esta invención se dirige a compuestos Δ -lactámicos, y en particular a γ -fenil- Δ -lactamas sustituidas, y a usos terapéuticos relacionados con las mismas.

Antecedentes de la invención

La respuesta inflamatoria (inflamación)

10 La inflamación es una respuesta localizada esencial del hospedante a los microorganismos invasores o daño de tejidos, que implica células del sistema inmunitario. Los signos de inflamación clásicos incluyen enrojecimiento (eritema), hinchamiento (edema), dolor y una mayor producción de calor (pirexia) en el sitio del daño. La respuesta inflamatoria permite que el cuerpo reconozca y elimine específicamente un organismo invasor y/o repare el daño del tejido. Muchos de los cambios agudos en el sitio de la inflamación se pueden atribuir directa o indirectamente al influjo masivo de leucocitos (p. ej., neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, monocitos) que es intrínseco a esta respuesta. La infiltración de leucocitos y la acumulación en el tejido produce su activación y posterior liberación de mediadores de inflamación, tales como LTB₄, prostaglandinas, TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-5, IL-6, histamina, proteasas y especies de oxígeno reactivas, por ejemplo.

20 La inflamación normal es un proceso muy regulado que está estrechamente controlado en varios niveles por cada uno de los tipos de células implicados en la respuesta. Por ejemplo, la expresión de la citoquina proinflamatoria TNF- α es controlada a nivel del gen de expresión, traducción, modificación postraduccional y liberación de la forma madura de la membrana celular. Muchas proteínas reguladas por aumento durante la inflamación son controladas por el factor de transcripción NF- κ . Las respuestas proinflamatorias normalmente son contrarrestadas por mecanismos antiinflamatorios endógenos tales como la generación de IL-10 o IL-4. Una característica de una respuesta inflamatoria normal es que es de naturaleza temporal y es seguida por una fase de resolución que devuelve el estado del tejido a su estado original. Se cree que la fase de resolución implica la regulación por aumento de mecanismos antiinflamatorios, tales como la IL-10, así como la regulación por disminución de los procesos proinflamatorios.

Enfermedades inflamatorias

30 La enfermedad inflamatoria se produce cuando se inicia una respuesta inflamatoria que no es adecuada y/o no se resuelve de forma normal si no que más bien persiste y produce un estado inflamatorio crónico. La enfermedad inflamatoria puede ser sistémica (p. ej. lupus) o localizada en tejidos u órganos particulares, y supone una enorme carga personal y económica en la sociedad. Los ejemplos de algunas de las enfermedades inflamatorias más comunes y problemáticas son la artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, asma, enfisema, colitis y lesión por isquemia-reperusión.

35 Un asunto subyacente común en la enfermedad inflamatoria es una perturbación de la respuesta inmunitaria celular que da como resultado el reconocimiento de proteínas del hospedante (antígenos) como extrañas. Por lo tanto, la respuesta inflamatoria se convierte en mal dirigida a tejidos del hospedante dirigiéndose las células efectoras a órganos o tejidos específicos, produciendo con frecuencia un daño irreversible. El aspecto de autorreconocimiento de la enfermedad autoinmunitaria a menudo se refleja en la expansión clonal del subconjunto de linfocitos T caracterizada por un subtipo de receptor de linfocitos T (TCR) particular en la enfermedad. A menudo la enfermedad inflamatoria también se caracteriza por un desequilibrio en los niveles de subconjuntos de linfocitos T cooperadores (Th) (es decir, linfocitos Th1 frente a linfocitos Th2).

45 Las estrategias terapéuticas dirigidas a curar las enfermedades inflamatorias normalmente están en una de dos categorías: (a) modulación por disminución de procesos que en la enfermedad son regulados por aumento, o (b) regulación por aumento de rutas antiinflamatorias en las células o tejidos afectados. La mayoría de los regímenes normalmente usados en clínica están en la primera categoría. Algunos ejemplos de estos son corticosteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

50 Se han elucidado muchos de los procesos tisulares, celulares y bioquímicos que son alterados en la enfermedad inflamatoria y esto ha permitido el desarrollo de modelos experimentales o ensayos para imitar el estado de la enfermedad. Estos ensayos in vitro permiten la selección y cribado de compuestos con una alta probabilidad de eficacia terapéutica en la enfermedad inflamatoria relevante. Por lo tanto, los ensayos usados actualmente como modelo de la importancia de los leucocitos activados en el desarrollo de la inflamación aguda y mantenimiento del estado inflamatorio crónico, son ensayos que hacen el seguimiento de la quimiotaxis de leucocitos y desgranulación celular y ensayos de síntesis de citoquinas y producción de especies de oxígeno reactivas (ROS) in vitro. Puesto que un resultado de la activación de neutrófilos aguda o crónica es la liberación de ROS con daño tisular resultante, un ensayo de depuradores de ROS permite la detección de compuestos con potencial eficacia terapéutica. Los ensayos celulares para detectar inhibidores de la liberación de TNF- α de macrófagos o células monocíticas

estimuladas, son un componente importante de un modelo in vitro para la inflamación puesto que esta citoquina es regulada por aumento y se ha mostrado que contribuye a la patología en muchas enfermedades inflamatorias. Puesto que se ha mostrado que el cAMP elevado en las células afectadas modula o desestimula la respuesta inflamatoria, el seguimiento de los niveles de AMP cíclico (cAMP) celular y la actividad de las rutas que controlan los niveles de cAMP, permiten la detección de potenciales compuestos antiinflamatorios. Los ensayos pueden incluir el seguimiento del nivel del propio cAMP, la actividad de fosfodiesterasa, o cambios en la actividad del elemento de respuesta al cAMP (CRE)-luciferasa.

Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR), la forma más común de artritis inflamatoria, es un trastorno autoinmunitario de etiología desconocida que afecta al 1% de la población adulta y se caracteriza por sinovitis (inflamación del revestimiento sinovial de las articulaciones) erosiva, simétrica, crónica e implicación multiorgánica frecuente. Es interesante que es 3-6 veces más frecuente en mujeres que en hombres. La mayoría de los pacientes presentan una evolución de la enfermedad fluctuante crónica que, si se deja sin tratar, produce una destrucción progresiva de las articulaciones, deformidad, incapacidad y muerte prematura. Los síntomas indicativos de AR incluyen dolor e hinchamiento de las articulaciones (normalmente simétrica), rigidez matinal de las articulaciones y los músculos, debilidad/fatiga general y fiebre y pérdida de peso. La AR produce más de 9 millones de visitas al médico y más de 250.000 hospitalizaciones al año en EE.UU. cada año. Con frecuencia afecta a pacientes en sus años más productivos, y por lo tanto la incapacidad produce una pérdida económica importante.

El entendimiento reciente ha establecido que los antecedentes genéticos, en especial la estructura de los genes de histocompatibilidad mayor de clase II (MHC), tienen una función crítica en la susceptibilidad de un individuo y la gravedad de la enfermedad. La comprensión actual de las redes de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión ha conducido al reconocimiento de que las rutas dependientes de linfocitos T e independientes de linfocitos T contribuyen al inicio y perpetuación de la artritis reumatoide. Además, se ha aprendido mucho sobre los sucesos celulares y bioquímicos específicos responsables de la destrucción de hueso y cartílago que caracterizan este trastorno. A nivel del tejido, la AR se caracteriza por la hiperplasia sinovial, hipertrofia, angiogénesis y unión e invasión de fibroblastos sinoviales en el cartílago y hueso adyacentes. En la AR activa hay mayores niveles de citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 e IL-6 con respecto a las citoquinas antiinflamatorias en las articulaciones afectadas.

Tratamientos actuales de la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias

Actualmente no hay cura ni prevención (profiláctica) disponible para la artritis reumatoide, solo regímenes que se dirigen a los síntomas tales como el dolor y la rigidez. Las cinco modalidades de tratamiento principales para esta enfermedad incluyen la medicación (farmacológica), tratamiento físico (ejercicio), protección de las articulaciones y cambios del estilo de vida y cirugía.

Los tratamientos terapéuticos para la artritis reumatoide se pueden dividir en 3 grupos: fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) también conocidos como agentes de segunda línea y corticoesteroides.

Los AINE reducen el dolor con dosis bajas y alivian algunos síntomas inflamatorios (hinchamiento y rigidez) en dosis más altas por la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Los ejemplos de AINE sin receta incluyen ácido acetilsalicílico (ASA®, Aspirina®, Anacin®, etc.) e ibuprofeno (Motrin®, Advil®, etc.). Los ejemplos de AINE que requieren receta incluyen Naprosyn®, Relafen®, Indocid®, Voltaren®, Feldene® y Clinoril®. Aunque estos medicamentos se dirigen eficazmente al componente inflamatorio agudo de la artritis reumatoide, solamente tratan los síntomas y no cambian la evolución de la enfermedad subyacente. Los efectos secundarios perjudiciales de los AINE pueden ser graves con la administración prolongada y son principalmente gastrointestinales (ardor de estómago, hemorragia o úlceras).

Los FARME se prescriben con frecuencia si la inflamación persiste durante más de 6 semanas o cuando la artritis afecta a muchas articulaciones simultáneamente. Normalmente se administran además de un AINE o esteroide. Muchos FARME trabajan suprimiendo las células inmunitarias implicadas en la respuesta inflamatoria ralentizando así el avance de la enfermedad. Sin embargo, no pueden invertir el daño permanente de las articulaciones. Los fármacos más comunes de esta clase son las sales de oro, metotrexato, azatioprina, sulfasalazina, hidroxicloroquina, pencilamina y cloroquina. A menudo se tarda varias semanas en observar los efectos beneficiosos de los FARME y en muchos casos no se conoce el modo exacto de la eficacia en la artritis reumatoide. Los efectos secundarios son numerosos incluyendo llagas en la boca, erupciones, diarrea y náuseas. Los efectos secundarios más graves que necesitan un seguimiento cuidadoso mediante pruebas de sangre y orina frecuentes incluyen daño hepático y renal, disminución excesiva del recuento de glóbulos blancos (inmunosupresión) y del recuento de plaquetas (coagulación de la sangre).

Los corticoesteroides se prescriben con frecuencia en paciente con AR con una inflamación extrema acompañada de dolor grave, hinchamiento y rigidez de las articulaciones. También se usan en el tratamiento de la artritis reumatoide sistémica que puede afectar al revestimiento de los pulmones y los vasos sanguíneos. La vía de

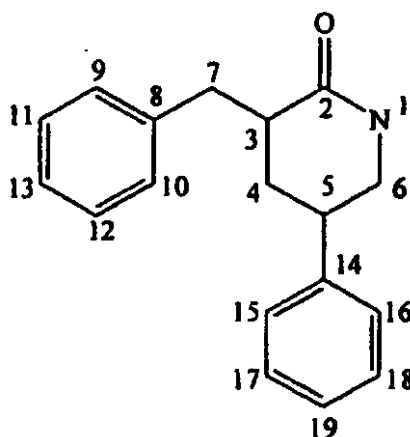
administración normalmente es oral (es decir, prednisona) pero el fármaco también se puede inyectar directamente en la articulación, vena, músculo o sitio alternativo de inflamación afectado. Los efectos secundarios del uso de esteroides a largo plazo en la artritis reumatoide son graves e incluyen cataratas, hipertensión, desgaste muscular, equimosis, adelgazamiento de la piel y huesos, ganancia de peso, diabetes y susceptibilidad a la infección.

- 5 Incluso aunque solo 5% de los pacientes diagnosticados de artritis reumatoide desarrollarán la enfermedad más grave (que implica el debilitamiento y daño irreversible de las articulaciones), estos no tienen un conjunto ideal de tratamientos terapéuticos disponibles para tratar y/o curar satisfactoriamente la enfermedad. Los AINE actualmente disponibles (incluso inhibidores de COX-2 selectivos) pueden mejorar con éxito los síntomas agudos de la artritis reumatoide, tales como el hinchamiento, dolor y rigidez de las articulaciones. Sin embargo, no afectan ni al avance de la destrucción de las articulaciones ni producen ninguna inversión de la erosión articular u ósea. Los fármacos de segunda línea como los FARME o los corticoesteroides pueden ralentizar temporalmente el avance de la enfermedad y reducir los síntomas, pero normalmente tienen un perfil de efectos secundarios inaceptable o una respuesta del paciente variable y no pueden invertir el daño que existe en las articulaciones. Hay una necesidad significativa de agentes terapéuticos que detengan o inviertan eficazmente el avance de la enfermedad en la artritis reumatoide.

El documento WO00/14083A describe γ -fenil- Δ -lactamas y análogos de las mismas, con los usos farmacéuticos relacionados con las mismas.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona compuestos de la siguiente fórmula:



- 20 en la que:
- el nitrógeno en la posición 1 está sustituido con hidrógeno;
- las posiciones 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11 y 18 están sustituidas con hidrógeno;
- las posiciones 17 y 19 están sustituidas con OR^8 donde R^8 es un grupo hidrocarbilo C_{1-10} ;
- 25 cada uno de los carbonos en las posiciones 5, 13, 15 y 16 está independientemente sustituido en cada caso con H, -W o $-R^7(W)_n$, en los que:
- W se selecciona de $-NH_2$, $-CN$, $-X$, $-OH$, $-NO_2$, $-SH$, $-NHR^8$, $-NR^8R^8$, $-OR^8$ y $-SR^8$;
- 30 cada R^7 es independientemente un grupo hidrocarbilo, halogenocarbilo o hidrohalogenocarbilo $C_{1-C_{30}}$, en el que n de los átomos de hidrógeno o halógeno de R^7 se sustituyen por un número igual de grupos W independientemente seleccionados en cada posición;
- cada R^8 es independientemente un grupo hidrocarbilo, halogenocarbilo o hidrohalogenocarbilo $C_{1-C_{30}}$;
- n se selecciona de 0, 1, 2, 3, 4 y 5; y
- X se selecciona de $-Br$, $-Cl$, $-F$ y $-I$;
- en la que la posición 12 está sustituida con hidrocarbilo C_{1-6} ,
- 35 o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable, como un estereoisómero aislado o una mezcla de los mismos.

En otro aspecto, esta invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la

invención como se ha descrito antes y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se ha descrito antes, para usar en el tratamiento o prevención de una afección o enfermedad inflamatoria en un paciente.

5 En otro aspecto, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se ha descrito antes, para usar en la modulación de los niveles de 5'-monofosfato de adenosina cíclica intracelular en un paciente.

En otro aspecto, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se ha descrito antes, para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección en un paciente, en el que la enfermedad o afección está asociada con afecciones patológicas que son moduladas por inhibición de enzimas asociadas con mensajeros celulares secundarios.

10 En otro aspecto, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se ha descrito antes, para usar en el tratamiento o prevención de la proliferación celular no controlada en un paciente.

En otro aspecto, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se ha descrito antes, para usar en el tratamiento o prevención del rechazo de trasplante en un paciente.

15 En otro aspecto, esta invención proporciona un compuesto de la invención como se ha descrito antes, para usar en el tratamiento o prevención de afecciones asociadas con el sistema nervioso central en un paciente.

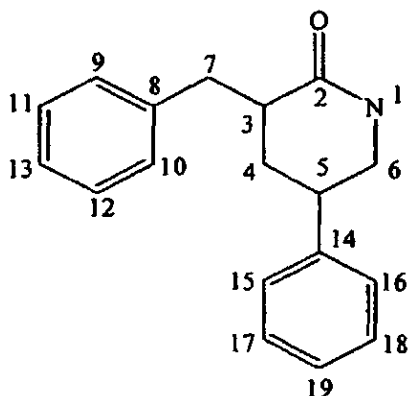
La presente invención proporciona además los otros compuestos y usos expuestos en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

20 Estos y otros aspectos y realizaciones de la presente invención serán evidentes por referencia a la siguiente descripción detallada. Para este fin, se exponen diferentes referencias en la presente memoria que describen con más detalle algunos procedimientos, compuestos y/o composiciones.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención proporciona compuestos, composiciones y compuestos para usar en el tratamiento y/o prevención de diferentes enfermedades. Por ejemplo, en un aspecto, la presente invención proporciona compuestos para usar en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad inflamatoria. El uso incluye administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, o una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que contiene un compuesto de la invención o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

Por consiguiente, como se expone en el resumen de la invención, esta invención se dirige a compuestos de la siguiente fórmula:



30 en la que

el nitrógeno en la posición 1 está sustituido con hidrógeno;

las posiciones 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11 y 18 están sustituidas con hidrógeno;

las posiciones 17 y 19 están sustituidas con OR^8 donde R^8 es un grupo hidrocarbilo C_{1-10} ;

35 cada uno de los carbonos en las posiciones 5, 13, 15 y 16 está independientemente sustituido en cada caso con H, -W o $-R^7(W)_n$, en los que:

W se selecciona de $-NH_2$, $-CN$, $-X$, $-OH$, $-NO_2$, $-SH$, $-NHR^8$, $-NR^8R^8$, $-OR^8$ y $-SR^8$;

cada R^7 es independientemente un grupo hidrocarbilo, halogenocarbilo o hidrohalogenocarbilo $C_{1-C_{30}}$, en el

que n de los átomos de hidrógeno o halógeno de R^7 se sustituyen por un número igual de grupos W independientemente seleccionados en cada posición;

cada R^8 es independientemente un grupo hidrocarbilo, halogenocarbilo o hidrohalogenocarbilo C_1-C_{30} ;

n se selecciona de 0, 1, 2, 3, 4 y 5; y

5 X se selecciona de -Br, -Cl, -F y -I;

en la que la posición 12 está sustituida con hidrocarbilo C_{1-6} ,

o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable, como un estereoisómero aislado o una mezcla de los mismos.

10 En otro aspecto, el compuesto de la invención tiene la configuración S en el carbono 3. En otro aspecto, el compuesto de la invención tiene la configuración R en el carbono 3. En otro aspecto, el compuesto de la invención tiene la configuración S en el carbono 5. En otro aspecto, el compuesto de la invención tiene la configuración R en el carbono 5.

En otros aspectos, en el compuesto de la invención, así como en las composiciones que comprenden el compuesto de la invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable:

15 el carbono en la posición 13 está independientemente sustituido con hidrógeno y -W;

el carbono en la posición 13 está sustituido con NH_2 , $-NHR^8$ o $-NR^8R^8$;

el carbono en la posición 13 está sustituido con -CN, -X, -OH, $-NO_2$, -SH, o $-OR^8$;

el carbono en la posición 13 está sustituido con $-R^7(W)_n$;

En otro aspecto, exactamente dos de los carbonos en las posiciones 11, 12 y 13 están sustituidos con hidrógeno.

20 En otro aspecto, como máximo uno de los átomos de carbono en las posiciones 11, 12 y 13 está sustituido con hidrógeno.

En otro aspecto de la presente invención que se proporciona un compuesto de la invención, se pueden usar los siguientes criterios solos o en cualquier combinación en la descripción adicional del o de los compuestos de la invención, donde estos criterios son solo ilustrativos y se pueden encontrar otros criterios en otra parte en la presente memoria: el carbono en la posición 13 está sustituido con $-R^7(W)$; exactamente dos de los carbonos en las posiciones 11, 12 y 13 están sustituidos con hidrógeno; W es $-OR^8$; R^7 es un grupo hidrocarburo C_1-C_{10} en el que n de los átomos de hidrógeno o halógeno de R^7 están sustituidos por un número igual de grupos W independientemente seleccionados en cada posición; R^7 se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, alquilarilo, arilo sustituido con alquenilo, alquenilo sustituido con arilo, arilo sustituido con alquinilo, alquinilo sustituido con arilo, biarilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, bicicloalquilo, bicicloalquenilo, alquilocicloalquilo, alquencilicloalquilo, alquincicloalquilo, cicloalquilo sustituido con arilo, arilo sustituido con cicloalquilo, cicloalquenilo sustituido con arilo, arilo sustituido con cicloalquenilo, cicloalquilo y policicloalquilo condensado con arilo; R^8 es un grupo hidrocarbilo C_1-C_{10} ; R^8 es un grupo ciclohidrocarbilo C_1-C_{10} ; R^8 se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, alquilarilo, arilo sustituido con alquenilo, alquenilo sustituido con arilo, arilo sustituido con alquinilo, alquinilo sustituido con arilo, biarilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, bicicloalquilo, bicicloalquenilo, alquilocicloalquilo, alquencilicloalquilo, alquincicloalquilo, cicloalquilo sustituido con arilo, arilo sustituido con cicloalquilo, cicloalquenilo sustituido con arilo, arilo sustituido con cicloalquenilo, cicloalquilo y policicloalquilo condensado con arilo; n es 0; el carbono 3 tiene la configuración S; el carbono 3 tiene la configuración R; el carbono 5 tiene la configuración S; el carbono 5 tiene la configuración R; las posiciones 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 16 y 18 están sustituidas con hidrógeno, y la posición 12 está sustituida con hidrocarbilo C_1 , y la posición 17 está sustituida con -O-ciclopentilo, y la posición 19 está sustituida con -O-metilo, donde opcionalmente las posiciones 3 y 5 tienen ambas la estereoquímica S. Cualquiera de estos compuesto puede estar en forma de una sal o solvato farmacéuticamente aceptable, de acuerdo con la presente invención.

45 En los compuestos de la invención, el anillo que contiene N es monocíclico y saturado, como se muestra en el resumen de la invención.

En realizaciones preferidas de los compuestos de la invención, W se selecciona de $-NH_2$, $-NHR^8$ y $-NR^8R^8$;

W se selecciona de $-NH_2$, -CN, -X, -OH, $-NO_2$, -SH, $-NHR^8$, $-NR^8R^8$, $-OR^8$ y $-SR^8$; o W es $-OR^8$.

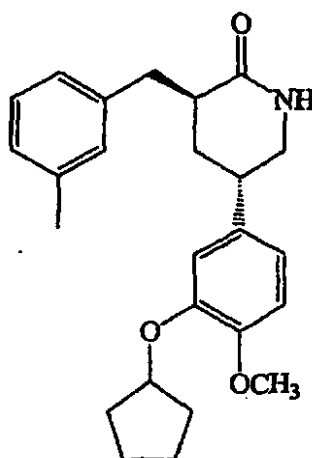
50 En otras realizaciones preferidas de los compuestos de la invención, R^7 es un grupo hidrocarbilo C_1-C_{30} en el que n de los átomos de hidrógeno o halógeno de R^7 se sustituyen por un número igual de grupos W independientemente seleccionados en cada posición; R^7 es un grupo hidrocarbilo C_1-C_{10} en el que n de los átomos de hidrógeno o halógeno de R^7 se sustituyen por un número igual de grupos W independientemente seleccionados en cada

posición; o R^7 se selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, alquilarilo, arilo sustituido con alquenilo, alquenilo sustituido con arilo, arilo sustituido con alquinilo, alquinilo sustituido con arilo, biarilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, bicicloalquilo, bicicloalquenilo, alquilcicloalquilo, alquenilcicloalquilo, alquinilcicloalquilo, cicloalquilo sustituido con arilo, arilo sustituido con cicloalquilo, cicloalquenilo sustituido con arilo, arilo sustituido con cicloalquenilo, cicloalquilo y policicloalquilo condensado con arilo.

En otras realizaciones preferidas del compuesto de la invención, R^8 es un grupo hidrocarbilo C_1-C_{30} ; R^8 es un grupo hidrocarbilo C_1-C_{10} ; o R^8 se selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, alquilarilo, arilo sustituido con alquenilo, alquenilo sustituido con arilo, arilo sustituido con alquinilo, alquinilo sustituido con arilo, biarilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, bicicloalquilo, bicicloalquenilo, alquilcicloalquilo, alquenilcicloalquilo, alquinilcicloalquilo, cicloalquilo sustituido con arilo, arilo sustituido con cicloalquilo, cicloalquenilo sustituido con arilo, arilo sustituido con cicloalquenilo, cicloalquilo y policicloalquilo condensado con arilo.

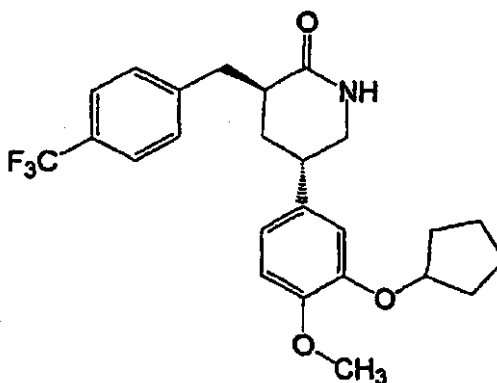
En otras realizaciones preferidas del compuesto de la invención, n es 0; n es 1; n es 2; n es 3; n es 4; n es 5; n es mayor que 0; n es 1 ó 2; y n es 1 ó 2 ó 3.

Un compuesto preferido de la invención es un compuesto de la siguiente fórmula:



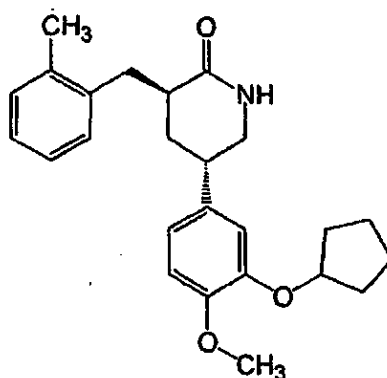
como un solo estereoisómero o una mezcla de los mismos, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable.

Otro compuesto preferido de la invención es un compuesto de la siguiente fórmula:



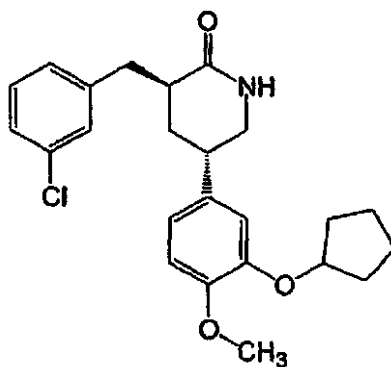
o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable, como un solo estereoisómero o una mezcla de los mismos.

Otro compuesto preferido de la invención es un compuesto de la siguiente fórmula:



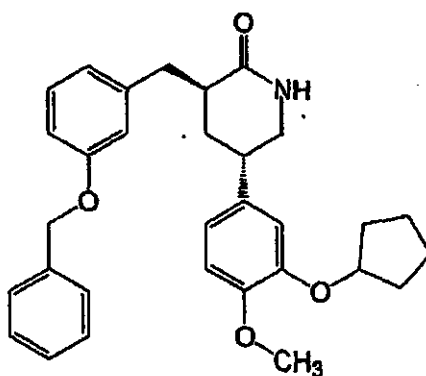
o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable, como un solo estereoisómero o una mezcla de los mismos.

También se menciona en la presente memoria un compuesto de la siguiente fórmula:



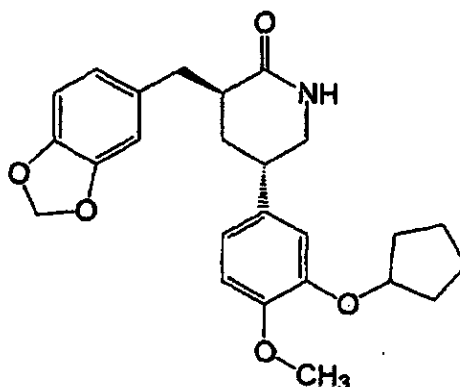
5 o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable, como un solo estereoisómero o una mezcla de los mismos.

Otro compuesto preferido de la invención es un compuesto de la siguiente fórmula:



10 o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable, como un solo estereoisómero o una mezcla de los mismos.

Otro compuesto preferido de la invención es un compuesto de la siguiente fórmula:



o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable, como un solo estereoisómero o una mezcla de los mismos.

- 5 En los compuestos anteriores, una sal farmacéuticamente aceptable incluye sales de adición de ácido y sales de adición de base.

Las sales de adición de ácido se refiere a aquellas sales formadas a partir de los compuestos de la invención y ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y/o ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares.

- 10 Las sales de adición de base incluyen las sales derivadas de los compuestos de la invención y bases inorgánicas tales como sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, cinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Las sales adecuadas incluyen sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio derivadas de bases orgánicas no tóxicas, farmacéuticamente aceptables, que incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaínas, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, y similares.

- 25 En los compuestos y composiciones anteriores, un grupo hidrocarbilo está formado exclusivamente de carbono e hidrógeno, e incluye, por ejemplo, cualquiera de alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, alquilarilo, arilo sustituido con alquenilo, alquenilo sustituido con arilo, arilo sustituido con alquinilo, alquinilo sustituido con arilo, biarilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, bicicloalquilo, bicicloalquenilo, alquilcicloalquilo, alquenilcicloalquilo, alquinilcicloalquilo, cicloalquilo sustituido con arilo, arilo sustituido con cicloalquilo, cicloalquenilo sustituido con arilo, cicloalquenilo sustituido con arilo, cicloalquilo y policicloalquilo condensado con arilo. Un grupo ciclohidrocarbilo está formado también exclusivamente de carbono e hidrógeno, e incluye al menos un anillo, donde los grupos ciclohidrocarbilo de ejemplo incluyen cualquiera de arilo, aralquilo, alquilarilo, arilo sustituido con alquenilo, alquenilo sustituido con arilo, arilo sustituido con alquinilo, alquinilo sustituido con arilo, biarilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, bicicloalquilo, bicicloalquenilo, alquilcicloalquilo, alquenilcicloalquilo, alquinilcicloalquilo, cicloalquilo sustituido con arilo, arilo sustituido con cicloalquilo, cicloalquenilo sustituido con arilo, cicloalquenilo sustituido con arilo, cicloalquilo y policicloalquilo condensado con arilo. En un aspecto de la invención, el grupo ciclohidrocarbilo se selecciona de ciclopentilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. En otro aspecto, el grupo ciclohidrocarbilo es ciclopentilo.

- 35 Un grupo halogenocarbilo está formado exclusivamente de carbono y halógeno, e incluye los grupos hidrocarbilo identificados antes, en los que cada hidrógeno se sustituye por un halógeno seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo, preferiblemente flúor y cloro. Un grupo hidrohalogenocarbilo, que se puede denominar también un grupo halogenohidrocarbilo, está formado exclusivamente de carbono, hidrógeno y halógeno, e incluye los grupos hidrocarbilo específicos indicados antes, en los que algunos, pero no todos, los átomos de hidrógeno se sustituyen por átomos de halógeno seleccionados de flúor, cloro, bromo y yodo, preferiblemente flúor y/o cloro. A continuación se proporcionan definiciones representativas de estos grupos hidrocarbilo (que pueden estar sustituidos con átomos de halógeno para proporcionar derivados halogenocarbilo e hidrohalogenocarbilo de los mismos).

- 45 "Alquilo" se refiere a una cadena acíclica de átomos de carbono que puede ser ramificada o no ramificada (lineal). Metilo, etilo, propilo (incluyendo *n*-propilo e *iso*-propilo), butilo (incluyendo *n*-butilo, *iso*-butilo, *sec*-butilo, y *t*-butilo), pentilo (incluyendo numerosos isómeros) y hexilo (incluyendo numerosos isómeros), son grupos alquilo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono (denominados normalmente grupos alquilo inferior), y son ejemplos de grupos alquilo de la invención.

"Alquenilo" se refiere a un grupo alifático insaturado que tiene al menos un doble enlace.

"Alquinilo" se refiere a un hidrocarburo insaturado que puede ser de cadena lineal o ramificada y tiene uno o más triples enlaces. Los grupos preferidos no tienen más de aproximadamente 12 átomos de carbono y pueden ser etilo, propinilo, 4-metilpentinilo etc., y estructuras isómeras de los mismos.

"Aralquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido por un radical arilo. Por ejemplo, bencilo.

- 5 "Aralquinilo" se refiere a un grupo alquinilo sustituido con un anillo de arilo. Por ejemplo, $\text{ArC}\equiv\text{C}$ -, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$ - etc.

10 "Cicloalquilo" se refiere a una disposición cíclica de átomos de carbono, donde ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo son grupos cicloalquilo de la invención que tienen 3-6 átomos de carbono. Grupos adicionales dentro del alcance de "cicloalquilo" como se define en la presente memoria son grupos policicloalquilo, definidos a continuación.

"Cicloalquenilo" se refiere a un grupo alquenilo cíclico. Los grupos cicloalquenilo adecuados incluyen, por ejemplo, ciclopentenilo y ciclohexenilo.

15 Un grupo policicloalquilo es una disposición de átomos de carbono en la que al menos un átomo de carbono es una parte de al menos dos anillos identificables por separado. El grupo policicloalquilo puede contener puentes entre dos átomos de carbono, de los que son ejemplos representativos biciclo[1.1.0]butilo, biciclo[3.2.1]octilo, biciclo[5.2.0]nonilo, triciclo[2.2.1.0¹]heptilo, norbornilo y pinanilo. El grupo policicloalquilo puede contener uno o más sistemas de anillos condensados, donde son ejemplos representativos decalinilo (radical de la decalina) y perhidroantracenilo. El grupo policicloalquilo puede contener una unión espiro, en la que un solo átomo es el único miembro común de dos anillos. Son ejemplos representativos espiro[3.4]octilo, espiro[3.3]heptilo y espiro[4.5]decano.

20 "Halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

Grupo "heterociclilo" se refiere a un sistema de anillos estable de 3 a 15 miembros condensado al grupo fenilo al que está unido R^7 , que consiste en átomos de carbono y de 1 a 5 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. Para los propósitos de esta invención, el grupo heterociclilo puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico, que puede incluir sistemas de anillos condensados o con puente; y los átomos de nitrógeno, carbono o azufre en el grupo heterociclilo pueden estar opcionalmente oxidados; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado; y el grupo heterociclilo puede ser aromático o parcial o totalmente saturado. El grupo heterociclilo puede estar unido al grupo fenilo al que está unido R^7 en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que produzca la creación de un compuesto estable. Los ejemplos de dichos grupos heterociclilo incluyen, pero sin limitar, azepinilo, acridinilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, benzopirranilo, benzopirranonilo, benzofuranilo, benzofuranonilo, benzotienilo, carbazolilo, cinolinilo, decahidroisoquinolilo, dioxolanilo, furanilo, furanonilo, isotiazolilo, imidazolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, isotiazolidinilo, indolilo, isoindolilo, indolinilo, isoindolinilo, indolizínilo, isoxazolilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, naftiridinilo, oxadiazolilo, octahidroindolilo, octahidroisoindolilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, 2-oxoazepinilo, oxazolilo, oxazolidinilo, oxiranilo, piperidinilo, piperazinilo, 4-piperidonilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, pteridinilo, purinilo, pirrolilo, pirrolidinilo, pirazolilo, pirazolidinilo, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, quinolinilo, quinucidinilo, isoquinolinilo, tiazolilo, tiazolidinilo, tiadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, tetrahidrofurilo, triazinilo, tetrahidropirranilo, tienilo, tiamorfolinilo, sulfóxido de tiamorfolinilo, y tiamorfolinil-sulfona.

Como se usa en la presente memoria, las siguientes abreviaturas tienen los significados indicados:

Abreviatura	Nombre completo
5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico
Ab	Anticuerpo
ABTS	2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina-sulfonato]
ACD	Ácido-citrato-dextrosa
AcOH	Ácido acético
ACVP	Colegio americano de patología veterinaria
ANOVA	Análisis de varianza
Ar	Argón
BCR-ABL	Oncogén en la traslocación de cromosoma 9:22 en CML
BINAP	2,2'-Bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo
Bn	Bencilo
BnBr	Bromuro de bencilo
BOC	terc-Butoxicarbonilo
cAMP	3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
cat	Catalítico
CD	Cúmulo de diferenciación
CFA	Adyuvante completo de Freund

cGMP	3',5'-monofosfato cíclico de guanosina
CIA	Artritis inducida por colágeno
CLL	Leucemia linfocítica crónica
CML	Leucemia mielógena crónica
SNC	Sistema nervioso central
Con A	Concanavalina A
COX	Ciclooxigenasa
cPent	Ciclopentilo
cPentBr	Bromuro de ciclopentilo
CRE	Elemento de respuesta de cAMP
CsA	Ciclosporina A
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMARD	Fármaco antirreumático modificador de la enfermedad
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dppf	1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno
dppp	1,3-Bis(difenilfosfino)propano
CE ₅₀	Concentración a la que se nota un 50% del efecto máximo observable
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Alcohol etílico
FBS	Suero bovino fetal
FCS	Suero de ternero fetal
fMLP	Formil-metionil-leucina-fenilalanina
g.i.	Gastrointestinal
HyE	Haematoxilina y eosina
HARBS	Sitio de unión al rolipram de alta afinidad
HBSS	Disolución salina de Hanks equilibrada
HMPA	Hexametilfosforamida
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
i.p.	Intraperitoneal
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
IBMX	3-Isobutil-1-metilxantina
CI	Concentración de inhibición
CI ₅₀	Concentración a la que se observa 50% de inhibición
FA	Adyuvante incompleto de Freund
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleuquina
LAH	Hidruro de litio y aluminio
LDA	Diisopropilamiduro de litio
LN	Ganglio linfático
LPS	lipopolisacárido
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
luc	luciferasa
Me	Metilo
MeOH	Alcohol metílico
MHC	Clase principal de histocompatibilidad
MLR	Reacción mixta de linfocitos
MPO	Mieloperoxidasa
Ms	Metanosulfonilo
MsCl	Cloruro de metanosulfonilo
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimida
n-BuLi	<i>n</i> -Butil-litio
n-BuSH	<i>n</i> -Butanotiol
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
AINÉ	Fármaco antiinflamatorio no esteroideo
p.t	Post-trasplante
PBS	Disolución salina tamponada con fosfato
Pcc	Citocromo C de paloma
PDE	Fosfodiesterasa
PEG	Polietilenglicol

PG	Prostaglandina
PMS	Metosulfato de fenazina
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
pTsOH	Ácido <i>p</i> -toluenosulfónico monohidrato
Py	Piridina
AR	Artritis reumatoide
RF	Factor reumatoide
R _f	Factor de retardo
ROS	Especies de oxígeno reactivas
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RTX	Resiniferitoxina
SAR	Relación estructura actividad
TBAF	Fluoruro de tetrabutylamonio
TBDMS	terc-Butildimetilsililo
TBDMSCI	Cloruro de terc-butildimetilsililo
TCR	Receptor de linfocitos T
TEA	Trietilamina
Tf	Trifluorometanosulfonilo
TFA	Ácido trifluoroacético
Th	Linfocitos T cooperadores
THF	Tetrahidrofurano
TNBS	Ácido trinitrobencenosulfónico
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Trolox®	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
TsOH	Ácido <i>p</i> -toluenosulfónico monohidrato
XTT	Sal interna de 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolio-5-carboxanilida
μ M	Micromolar

Cuando cualquier variable aparece más de una vez en cualquier constituyente o en compuestos de la invención, su definición en cada caso es independiente de su definición en cualquier otro caso. Las combinaciones de sustituyentes y/o variables están permitidas solo si dichas combinaciones dan como resultado compuestos estables.

5 Los compuestos útiles en los métodos y composiciones de la presente invención, así como los compuestos de la presente invención, pueden tener centros asimétricos y aparecer como racematos, mezclas racémicas y como diastereoisómeros o enantiómeros individuales, estando todas las formas isómeras incluidas en la presente invención. Un racemato o mezcla racémica no implica una mezcla 50:50 de los estereoisómeros.

En otra realización, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de la invención como se ha expuesto antes, en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones se pueden usar para el tratamiento de la inflamación u otras afecciones descritas en la presente memoria. Estas composiciones también pueden formar un medicamento, que se puede usar en el tratamiento, por ejemplo, de la inflamación.

Estas composiciones son útiles, por ejemplo, como referencias en ensayos, medios convenientes para hacer envíos a granel, o composiciones farmacéuticas. Una cantidad ensayable de un compuesto de la invención es una cantidad que se puede medir fácilmente mediante procedimientos de ensayo y técnicas estándar bien conocidos para los expertos en la técnica. Las cantidades ensayables de un compuesto de la invención, en general variarán de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 80% en peso del peso total de la composición. Los vehículos inertes incluyen cualquier material que no se degrade o reaccione covalentemente de otra forma con un compuesto de la invención. Los ejemplos de vehículos inertes adecuados son agua; tampones acuosos, tales como los que en general son útiles en análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC); disolvente orgánicos, tales como acetonitrilo, acetato de etilo, hexano y similares; y vehículos farmacéuticamente aceptables.

Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica de la farmacia, y se describen, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*. Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985). Por ejemplo, se puede usar disolución salina estéril y disolución salina tamponada con fosfato a pH fisiológico. Se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes de sabor en la composición farmacéutica. Por ejemplo, se pueden añadir benzoato sódico, ácido sórbico y ésteres de ácido *p*-hidroxibenzoico como conservante. Véase antes en 1449. Además, se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión. Véase antes.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica o veterinaria (en lo sucesivo denominada simplemente una composición farmacéutica) que contiene un compuesto de la invención como se ha descrito antes, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona además una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, que contiene una cantidad eficaz de un compuesto de

(1-4) como se ha descrito antes, asociado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar en cualquier forma que permita administrar la composición a un paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un sólido, líquido o gas (aerosol). Las rutas típicas de administración incluyen, sin limitación, la vía oral, tópica, parenteral, sublingual, rectal, vaginal e intranasal. El término parenteral como se usa en la presente memoria, incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal o técnicas de infusión. Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan de modo que permitan que los principios activos contenidos en las mismas estén biodisponibles después de la administración de la composición a un paciente. Las composiciones que se administrarán a un paciente tendrán la forma de una o más unidades de dosificación, donde, por ejemplo, un comprimido puede ser una sola unidad de dosificación, y un envase de un compuesto de la invención en forma de aerosol puede contener una pluralidad de unidades de dosificación.

Los materiales usados para preparar las composiciones farmacéuticas deben ser puros y no tóxicos en las cantidades usadas. Será evidente para el experto en la técnica, que la dosificación óptima del o de los principios activos en la composición farmacéutica dependerá de una variedad de factores. Los factores relevantes incluyen, sin limitación, el tipo de sujeto (p. ej. ser humano), la forma particular del principio activo, la forma de administración y la composición usada.

En general, la composición farmacéutica incluye un (donde "un" y "una" se refiere aquí y a lo largo de esta memoria descriptiva, a uno o más) compuesto activo de la invención como se describe en la presente memoria, mezclado con uno o más vehículos. El o los vehículos pueden estar en partículas, de modo que las composiciones están, por ejemplo, en forma de comprimido o de polvo. El o los vehículos pueden ser líquidos, siendo las composiciones, por ejemplo, un jarabe oral o un líquido inyectable. Además, el o los vehículos pueden ser gaseosos, para proporcionar así una composición en aerosol útil, por ejemplo, en la administración por inhalación.

Cuando se dirige a la administración oral, la composición preferiblemente está en forma de sólido o líquido, donde están incluidas las formas semisólida, semilíquida, suspensión y gel dentro de las formas consideradas en la presente memoria como sólidas o líquidas.

Como una composición sólida para la administración oral, la composición se puede formular en forma de un polvo, gránulo, comprimido por presión, píldora, cápsula, goma de mascar, oblea o similares. Dicha composición sólida típicamente contendrá uno o más diluyentes inertes o vehículos comestibles. Además, pueden estar presentes uno o más de los siguientes adyuvantes: aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina, o gelatina; excipientes tales como almidón, lactosa o dextrinas, agentes disgregantes tales como ácido algínico, alginato sódico, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio o Sterotex; deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina, un agente de sabor tal como menta, salicilato de metilo o sabor de naranja y un agente colorante.

Cuando la composición está en forma de una cápsula, p. ej., una cápsula de gelatina, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como polietilenglicol, ciclodextrina o un aceite graso.

La composición puede estar en forma de un líquido, p. ej., un elixir, jarabe, disolución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser para la administración oral o para el suministro por inyección, como dos ejemplos. Cuando está dirigida a la administración oral, la composición preferida contiene, además de los presentes compuestos, uno o más de un agente edulcorante, conservantes, colorantes y potenciadores del sabor. En una composición dirigida a la administración por inyección, se pueden incluir uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizante y agente isotónico.

Las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención, estén en forma de disoluciones, suspensiones u otras formas similares, pueden incluir uno o más de los siguientes adyuvantes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, disolución salina, preferiblemente disolución salina fisiológica, disolución de Ringer, cloruro sódico isotónico, aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, ciclodextrina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajustar la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiple hechos de vidrio o plástico. La disolución salina fisiológica es un adyuvante preferido. Una composición farmacéutica inyectable preferiblemente es estéril.

Una composición líquida dirigida a la administración parenteral u oral debe contener una cantidad de compuesto de la invención de modo que se obtenga una dosificación adecuada. Típicamente, esta cantidad es al menos 0,01% de un compuesto de la invención en la composición. Cuando se dirige a la administración oral, esta cantidad se puede variar para que esté entre 0,1% y aproximadamente 70% del peso de la composición. Las composiciones orales preferidas contienen entre aproximadamente 4% y aproximadamente 50% del compuesto activo de la invención. Las composiciones y preparaciones preferidas de acuerdo con la presente invención se preparan de modo que una unidad de dosificación parenteral contenga entre 0,01% y 1% en peso del compuesto activo.

- La composición farmacéutica puede estar dirigida a la administración tópica, en cuyo caso el vehículo puede comprender de forma adecuada una base de disolución, emulsión, pomada o gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: vaselina, lanolina, polietilenglicoles, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol, y emulsionantes y estabilizantes. En una composición farmacéutica para administración tópica pueden estar presentes agentes espesantes. Si se dirige a la administración transdérmica, la composición puede incluir un parche transdérmico o dispositivo de iontoforesis. Las formulaciones tópicas pueden contener una concentración del compuesto de la invención de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 10% en p/v (peso por unidad de volumen).
- La composición puede estar dirigida a la administración rectal, en forma, por ejemplo, de un supositorio que se fundirá en el recto y liberará el fármaco. La composición para administración rectal puede contener una base oleaginosa como un excipiente no irritante adecuado. Dichas bases incluyen, sin limitación, lanolina, manteca de cacao y polietilenglicol.
- La composición puede incluir diferentes materiales que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que forman una cubierta de revestimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que forman la cubierta de revestimiento típicamente son inertes, y se pueden seleccionar, por ejemplo, de azúcar, laca, y otros agentes de revestimiento entéricos. Alternativamente, los principios activos se pueden encerrar en una cápsula de gelatina.
- La composición en forma sólida o líquida puede incluir un agente que se une al o a los componentes activos y de esta forma ayuda al suministro de los componentes activos. Los agentes adecuados que pueden actuar de esta forma incluyen un anticuerpo monoclonal o policlonal, una proteína o un liposoma.
- La composición farmacéutica de la presente invención puede consistir en unidades de dosificación gaseosa, p. ej., puede estar en forma de un aerosol. El término aerosol se usa para indicar una variedad de sistemas que van desde los de naturaleza coloidal a sistemas que consisten en envase presurizados. El suministro puede ser mediante un gas licuado o comprimido o mediante un sistema de bomba adecuado que dispensa los principios activos. Los aerosoles de los compuestos de la invención se pueden suministrar en sistemas de una fase, bifásicos o trifásicos, con el fin de suministrar el o los principios activos. El suministro del aerosol incluye el envase necesario, activadores, válvulas, subenvases, espaciadores y similares, que juntos pueden formar un kit. Los aerosoles preferidos los puede determinar el experto en la técnica sin excesiva experimentación.
- Sea en forma sólida, líquida o gaseosa, la composición farmacéutica de la presente invención puede contener uno o más agentes farmacológicos conocidos usados en el tratamiento de la inflamación (incluyendo la artritis).
- Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar por metodología bien conocida en la técnica farmacéutica.
- Una composición dirigida a ser administrada por inyección, se puede preparar combinando el compuesto de la invención con agua para así formar una disolución. Se puede añadir un tensioactivo para facilitar la formación de una disolución homogénea o suspensión. Los tensioactivos son compuestos que interaccionan de forma no covalente con el compuesto de la invención, para así facilitar la disolución o suspensión homogénea del compuesto activo en el sistema de suministro acuoso.
- Los compuestos de la invención descritos en la presente memoria, o las composiciones que comprenden uno o más de esos compuestos y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, se pueden usar en el tratamiento o la prevención de una afección o enfermedad inflamatoria en un paciente, donde el tratamiento comprende administrar al paciente que lo necesite una cantidad de un compuesto o composición según la presente invención, donde la cantidad es eficaz para tratar o prevenir la afección o enfermedad inflamatoria del paciente.
- La afección o enfermedad inflamatoria puede ser una afección o enfermedad autoinmunitaria; la afección o enfermedad inflamatoria puede implicar inflamación aguda o crónica de compartimentos óseos y/o de cartílago de las articulaciones; la afección o enfermedad inflamatoria puede ser una artritis seleccionada de artritis reumatoide, artritis gotosa o artritis reumatoide juvenil; la afección o enfermedad inflamatoria puede ser asma, la afección o enfermedad puede estar asociada con la desregulación de linfocitos T; la afección o enfermedad puede estar asociada con niveles elevados de citoquinas inflamatorias (p. ej., en la que la citoquina inflamatoria es la IL-2; o en la que la citoquina inflamatoria es el IFN- γ ; o en la que la citoquina inflamatoria es el TNF- α); la afección o enfermedad inflamatoria puede ser la esclerosis múltiple; la afección o enfermedad inflamatoria puede ser la sarcoidosis pulmonar; la afección o enfermedad inflamatoria puede ser inflamación ocular o alergia; la afección o enfermedad inflamatoria puede ser una enfermedad inflamatoria intestinal (p. ej., enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa); y la afección o enfermedad inflamatoria puede ser una enfermedad inflamatoria cutánea (p. ej., psoriasis o dermatitis).
- Además, la presente invención proporciona compuestos para usar en la modulación de los niveles de 5'-monofosfato cíclico de adenosina intracelular en un paciente, que comprende administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad de un compuesto o composición según la presente invención, en el que la cantidad es eficaz para modular los niveles de 5'-monofosfato cíclico de adenosina intracelular del paciente. El paciente puede tener una afección o enfermedad inflamatoria.

- Además, la presente invención proporciona compuestos para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección en un paciente, en el que la enfermedad o afección está asociada con afecciones patológicas que son moduladas por inhibición de enzimas asociadas con los segundos mensajeros celulares, comprendiendo el método administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad de un compuesto o una composición de la presente invención, en el que la cantidad es eficaz para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con afecciones patológicas que se pueden modular por inhibición de enzimas asociadas con segundos mensajeros celulares. La enzima puede ser una AMP cíclico fosfodiesterasa; o la enzima puede ser una fosfodiesterasa 4; o la enzima puede ser una fosfodiesterasa 3; o las enzimas pueden ser tanto la fosfodiesterasa 4 como la fosfodiesterasa 3; o la enzima puede ser una GMP cíclico fosfodiesterasa.
- Además, la presente invención proporciona un compuesto para usar en el tratamiento o prevención del rechazo de trasplante en un paciente, que comprende administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad de un compuesto o composición de la presente invención, donde la cantidad es eficaz para tratar o prevenir el rechazo de trasplante en el paciente. El rechazo puede deberse a la enfermedad de injerto contra huésped.
- Además, la presente invención proporciona un compuesto para usar en el tratamiento o prevención de la proliferación celular no controlada en un paciente, que comprende administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad de un compuesto o composición según la presente invención, donde la cantidad es eficaz para tratar o prevenir la proliferación celular no controlada en el paciente. La proliferación celular no controlada puede estar causada por un cáncer seleccionado de leucemia y tumores sólidos.
- Además, la presente invención proporciona un compuesto para usar en el tratamiento o prevención de afecciones asociadas con el sistema nervioso central (SNC) en un paciente, que comprende administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad de un compuesto o composición según la presente invención, donde la cantidad es eficaz para tratar o prevenir afecciones asociadas con el sistema nervioso central (SNC) en el paciente. La afección asociada con el sistema nervioso central (SNC) puede ser la depresión.
- En un uso de la presente invención, un compuesto de la invención, o una composición que comprende uno o más compuestos de la invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, puede, aunque no es necesario, lograr uno o más de los siguientes resultados deseados en el sujeto al que se ha administrado el compuesto de la invención como se ha definido antes, o una composición que contiene uno de esos compuestos de la invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable:
1. Inhibición de la generación de especies de oxígeno reactivas de los neutrófilos primarios;
 2. Inhibición de quimiotaxia de neutrófilos;
 3. Inhibición de la producción de TNF- α ;
 4. Inhibición de edema;
 5. Depuración de radicales del oxígeno;
 6. Inhibición de AMP cíclico fosfodiesterasa 1, 3 y/o 4, y PDE relacionadas tales como PDE7;
 7. Potenciación de la inducción de la actividad de transcripción mediada por CRE en células monocíticas humanas;
 8. Inhibición de PDE, preferiblemente PDE4, PDE3, o PDE3 y PDE4;
 9. Inhibición de la producción de citoquinas por subgrupos de linfocitos T activados;
 10. Inhibición de la liberación de mieloperoxidasa por neutrófilos;
 11. Relación baja de CI_{50} PDE4(cat): CI_{50} PDE4(HARBS);
 12. Inhibición de rechazo de injerto;
 13. Inhibición de parámetros clínicos e histopatológicos de enfermedad en la enfermedad inflamatoria intestinal; y
 14. Inhibición de parámetros clínicos e histopatológicos de artritis en un modelo de artritis inducida por colágeno murino.
- Por lo tanto, los compuestos de la invención se pueden usar en el tratamiento de la inflamación, incluyendo la inflamación tanto aguda como crónica, así como algunos trastornos proliferativos (cánceres). Como se usa en la presente memoria, la inflamación incluye, sin limitación, la espondilitis anquilosante, artritis (donde este término abarca más de 100 tipos de enfermedades reumáticas), asma, enfermedad de Crohn, síndrome de fibromialgia, gota, inflamaciones del cerebro (incluyendo esclerosis múltiple, demencia por SIDA, encefalopatía de Lyme, encefalitis por herpes, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, y toxoplasmosis cerebral), enfisema, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome de intestino irritable, lesión por isquemia-reperfusión, sarcoidosis pulmonar

eritematosa juvenil, enfermedad de Kawasaki, osteoartritis, enfermedad inflamatoria pélvica, artritis psoriásica (psoriasis), artritis reumatoide, psoriasis, trasplante de tejido/órgano, esclerodermia, espondiloartropatías, lupus eritematoso sistémico, sarcoidosis pulmonar, y colitis ulcerosa. Como se usa en la presente memoria, los trastornos proliferativos incluyen, sin limitación, todas las leucemias y tumores sólidos que son susceptibles de experimentar diferenciación o apoptosis tras interrupción de su ciclo celular.

La invención describe un método para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, incluyendo sus sales, composiciones, etc. Como se usa en la presente memoria, la cantidad real abarcada por la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" dependerá de la vía de administración, del tipo de animal de sangre caliente que se va a tratar y de las características físicas del animal de sangre caliente específico que se esté considerando. Estos factores y sus relaciones para determinar esta cantidad son bien conocidos para los expertos en medicina. Esta cantidad y el método de administración se pueden adaptar para alcanzar la eficacia óptima, pero dependerán de factores tales como el peso, dieta, medicación simultánea y otros factores que los expertos en medicina reconocerán.

Una cantidad eficaz de un compuesto o composición de la presente invención, serán suficientes para tratar la inflamación en un animal de sangre caliente, tal como un ser humano. Los métodos de administración de cantidades eficaces de agentes antiinflamatorios son bien conocidos en la técnica, e incluyen la administración de formas de inhalación, orales o parenterales. Dichas formas de dosificación incluyen, pero sin limitar, disoluciones parenterales, comprimidos, cápsulas, implantes de liberación sostenida y sistemas de suministro transdérmico; o sistemas de dosificación para inhalación que usan inhaladores de polvo seco o dispositivos de inhalación presurizados de múltiples dosis.

La cantidad y frecuencia de la dosificación se seleccionan para crear un nivel eficaz del agente sin efectos dañinos. En general estará en el intervalo de una dosificación de aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg/día, y típicamente de aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg/día, cuando se administra por vía oral o intravenosa. El intervalo de dosificación también será típicamente de aproximadamente 0,01 a 1 mg/kg/día cuando se administra por vía intranasal o inhalación.

Los compuestos de la invención, incluyendo los compuestos usados en los usos y composiciones expuestos antes, se pueden preparar de acuerdo con el conjunto de esquemas expuesto en los siguientes ejemplos. Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no como limitación.

Salvo que se indique otra cosa, la cromatografía ultrarrápida y cromatografía en columna se pueden llevar a cabo usando gel de sílice 60 de Merck (nº de malla 230-400). La cromatografía ultrarrápida se puede llevar a cabo de acuerdo con el procedimiento expuesto en "Purification of Laboratory Chemicals", 3ª. edición, Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford (1988), Eds. D. D. Perrin and W. L. F. Annarego, page 23. La cromatografía en columna se refiere al procedimiento por el que el caudal de eluyente a través de un material empaquetado está determinado por la gravedad. En todos los casos, cromatografía ultrarrápida y cromatografía radial se pueden usar de forma intercambiable. La cromatografía radial se lleva a cabo usando gel de sílice en un Chromatotron modelo nº 7924T (Harrison Research, Palo Alto, California). Salvo que se indique otra cosa, los valores de R_f citados se obtienen por cromatografía en capa fina usando gel de sílice 60 F_{254} (Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Alemania).

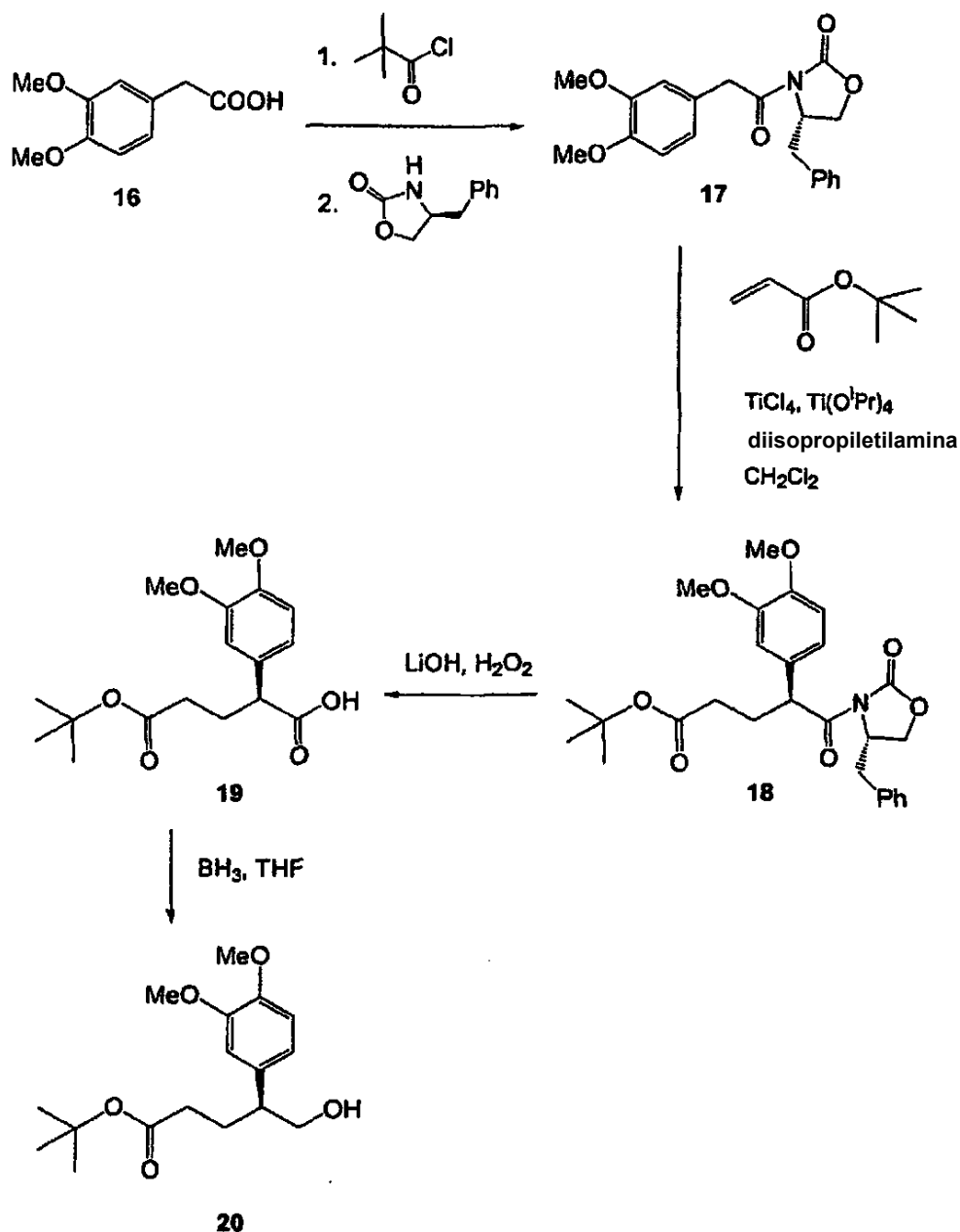
También, salvo que se indique otra cosa, los reaccionantes y reactivos químicos se obtuvieron de proveedores químicos convencionales, tales como Aldrich (Milwaukee, WI; www.aldrich.sial.com); EM Industries, Inc. (Hawthorne, NY; www.emscience.com); Fisher Scientific Co. (Hampton, NH; www.fischer1.com); y Lancaster Synthesis, Inc. (Windham, NH; www.lancaster.co.uk). Los gases se obtuvieron de Praxair (Vancouver, B.C.). Las líneas celulares, salvo que se indique otra cosa, se obtuvieron de fuentes públicas o comerciales, p. ej, la American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD).

Ejemplos sintéticos y de referencia

Síntesis de compuestos intermedios de los compuestos de la invención y ejemplos de referencia.

Los compuestos intermedios usados en la preparación de los compuestos de la invención se pueden preparar por los métodos descritos en el siguiente esquema de reacción 1. Por ejemplo, el anhídrido mixto obtenido a partir del ácido (3,4-dimetoxifenil)acético **16** (Aldrich) y cloruro de trimetilacetilo disponibles en el comercio, se hace reaccionar con el anión de litio de la (S)-(-)-4-bencil-2-oxazolidinona para dar el compuesto **17**. La adición de Michael enantioselectiva del enolato de titanio de la oxazolidinona **17** quiral al acrilato de terc-butilo proporcionó el compuesto **18** que tiene el grupo funcional carboxilato con un grupo protector adecuado. La hidrólisis del auxiliar quiral con hidróxido de litio y peróxido de hidrógeno da el ácido carboxílico **19**. La reducción selectiva del compuesto **19** con BH_3 -THF da el compuesto **20** que contiene el alcohol primario.

Esquema 1 de reacción



La síntesis de los compuestos **17-20** en este esquema de reacción se describe específicamente a continuación.

Síntesis del compuesto **17**

- 5 Disolución 1: Se añadieron trietilamina (12,8 ml, 91,7 mmol) seguido de cloruro de trimetilacetilo (10,4 ml, 84,2 mmol) a una disolución de ácido (3,4-dimetoxifenil)acético **16** (15,0 g, 76,5 mmol) en THF (120 ml) a 0°C y la mezcla se agitó durante 1 h.

- Disolución 2: En un segundo matraz, se añadió n-butil-litio (2,5 M en hexanos, 33,7 ml, 84,2 mmol) a una disolución de (S)-(-)-4-bencil-2-oxazolidinona (14,9 g, 84,2 mmol) en THF seco (75 ml) a -78°C . Esta disolución se agitó durante 1 h y después se añadió a la disolución 1 a 0°C mediante cánula. La mezcla resultante se calentó de 0°C a temperatura ambiente, se agitó durante 24 h, después se diluyó con disolución saturada de NaHCO_3 (300 ml) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 200 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con disolución saturada de NaCl (2 x 150 ml), se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (hexanos/ EtOAc , 4:1) para dar el compuesto **17** (19,04 g, 70%) en forma de un sólido blanco.
- 10
- 15

Síntesis de los compuestos **18** y **19**

Se añadió lentamente isopropóxido de titanio (0,42 ml, 1,41 mmol) a una disolución de tetracloruro de titanio (0,50 ml, 4,50 mmol) en diclorometano seco (10 ml) a 0°C. La mezcla resultante se agitó a 0°C durante 5 min y después se añadió diisopropiletilamina (1,04 ml, 5,91 mmol). Después de 15 minutos, se añadió una disolución del compuesto **17** (2,0 g, 5,63 mmol) en diclorometano (10 ml). La mezcla se agitó durante 90 min a 0°C, y después se añadió acrilato de terc-butilo (1,24 ml, 8,45 mmol). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 36 h y después se diluyó con disolución saturada de cloruro amónico (50 ml). La capa acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 50 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con HCl 1 N (2 x 75), agua (2 x 75 ml) y disolución saturada de NaCl (2 x 75 ml). Después de secar sobre MgSO₄, la filtración y evaporación del filtrado a vacío dieron el compuesto **18** bruto (2,69 g) que se usó sin más purificación.

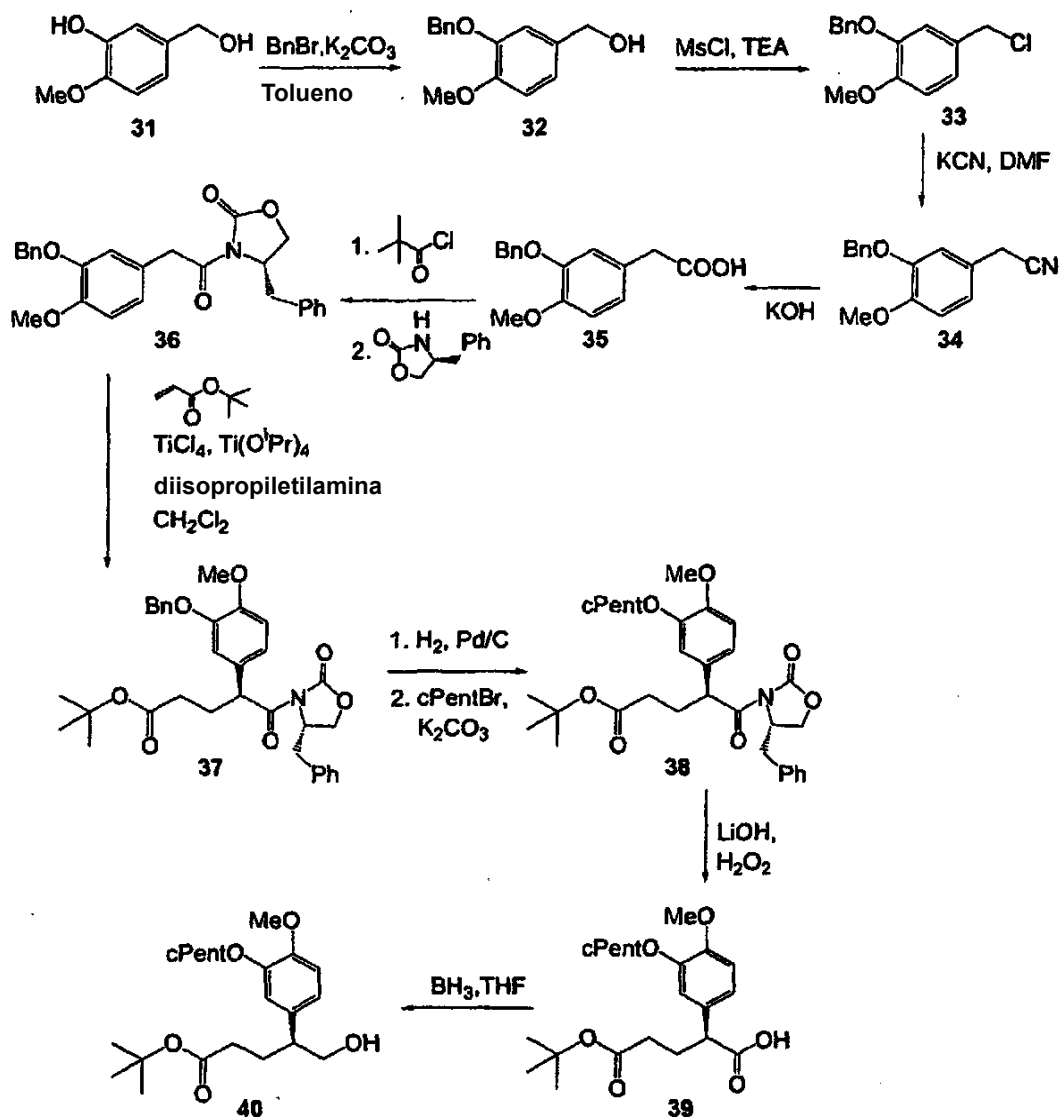
El compuesto **18** bruto (2,69 g) se disolvió en una mezcla de THF/agua 3:1 (85 ml) y se enfrió a 0°C. Se añadieron hidróxido de litio monohidrato (466,6 mg, 11,12 mmol) y peróxido de hidrógeno al 30% (2,5 ml, 22,25 mmol) y la mezcla se agitó a 0°C durante 3 h. Se añadió una disolución de sulfito sódico (3,06 g, 24,46 mmol) seguido de bicarbonato sódico 0,5 N (41 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y después se concentró a vacío. La fase acuosa se diluyó con HCl al 5% a pH = 2 y después se extrajo con EtOAc (3 x 75 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el filtrado se concentró a vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando ácido acético al 0,2% en acetato de etilo/hexanos al 20% para dar el compuesto **19** (1,09 g, 60% en dos etapas) en forma de un aceite amarillo claro.

Síntesis del compuesto **20**

Se añadió gota a gota BH₃-THF (disolución 1,0 M en THF, 37,6 ml, 0,0376 moles) a lo largo de 20 min a una disolución del compuesto **19** (12,18 g, 0,0376 moles) en THF seco (50 ml) a -18°C. Después se retiró el baño de enfriamiento, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Se añadió disolución saturada de NaHCO₃ (50 ml), y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 75 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con disolución saturada de NaCl (2 x 75 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y el filtrado se evaporó a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna, eluyendo con EtOAc al 50% en hexanos para dar el compuesto **20** (10,52 g, 91%)

Alternativamente, los compuestos intermedios de los compuestos de la invención que tienen diferentes grupos alcoxi en el anillo de fenilo, se pueden sintetizar por los métodos descritos a continuación en el esquema de reacción 2. Por ejemplo, el alcohol 3-hidroxi-4-metoxibencílico **31** disponible en el comercio se protege selectivamente como el derivado benciloxi **32** por tratamiento del compuesto **31** con bromuro de bencilo y carbonato de potasio en tolueno calentado a reflujo para dar 89% del producto deseado después de cristalización. Después, el compuesto **32** se hace reaccionar con cloruro de metanosulfonilo en presencia de trietilamina y CH₂Cl₂ para dar el compuesto **33** que se usa sin más purificación. El producto bruto **33** después se pone en DMF y se trata con cianuro potásico en presencia de 18-corona-6. Después de tratamiento y purificación, se aísla el nitrilo **34** con 91% de rendimiento en dos etapas. Después se realiza la hidrólisis del nitrilo **34** con hidróxido potásico para dar el ácido carboxílico **35** deseado con 95% de rendimiento. El tratamiento del compuesto **35** con cloruro de trimetilacetilo da un anhídrido mixto que se hace reaccionar con el anión de litio de la (S)-(-)-4-bencil-2-oxazolidinona para proporcionar el compuesto **36** con 75% de rendimiento. La adición de Michael enantioselectiva del enolato de titanio de la oxazolidinona **36** quiral al acrilato de terc-butilo proporciona el compuesto **37** que tiene el grupo funcional carboxilato con un grupo protector adecuado. La hidrogenación del compuesto **37** da el alcohol con rendimiento cuantitativo, el cual se convierte en el derivado de ciclopentiloxi **38** con 64% de rendimiento por tratamiento con bromuro de ciclopentilo, carbonato de potasio y yoduro de potasio en DMF. Por consiguiente, se puede preparar cualquier serie de derivados de alcoxi en el anillo de fenilo usando el correspondiente bromuro de alquilo o bromuro de alquilo funcionalizado. La hidrólisis del auxiliar quiral con hidróxido de litio y peróxido de hidrógeno da el ácido carboxílico **39** con 91% de rendimiento. La reducción selectiva del compuesto **39** con BH₃-THF da el compuesto **40** (89% de rendimiento) que contiene el alcohol primario.

Esquema 2 de reacción



La síntesis de los compuestos **32-40** en este esquema de reacción se describe específicamente a continuación.

Síntesis del compuesto **32**

- 5 A una suspensión agitada rápidamente del alcohol 3-hidroxi-4-metoxibencílico **31** (30,0 g, 195 mmol), carbonato de potasio (62,2 g, 450 mmol), y 18-corona-6 (0,40 g, 1% en moles) en tolueno (350 ml) se añadió una disolución de bromuro de bencilo (25,6 g, 150 mmol) en tolueno (150 ml) a lo largo de 20 min. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 16 h, después de lo cual la mezcla se diluyó con éter dietílico (400 ml) y se lavó sucesivamente con NaOH (1 N, 2 x 250 ml), disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (2 x 250 ml), y salmuera (2 x 300 ml). La capa de éter dietílico se secó sobre MgSO_4 anhidro y el disolvente se separó para proporcionar un sólido amarillo pálido (42,1 g) que se cristalizó en EtOAc y hexanos para dar el compuesto **32** (32,7 g, 89%) en forma de un sólido cristalino blanco.
- 10

Síntesis del compuesto **33**

- 15 El compuesto **32** (30,0 g, 122,8 mmol) se disolvió en diclorometano (300 ml) y se enfrió a 0°C , y después se añadieron Et_3N (20,4 ml, 147,36 mmol) y cloruro de metanosulfonilo (11,40 ml, 147,36 mmol). Se retiró el baño de hielo, y la disolución se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Después la mezcla se diluyó con diclorometano (700 ml), se lavó sucesivamente con disolución acuosa saturada NaHCO_3 (2 x 300 ml) y H_2O (2 x 300 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y el filtrado se concentró para dar el compuesto **33** (33,08 g) en forma de un sólido amarillo pálido que se usó en la siguiente etapa sin más purificación.

Síntesis del compuesto **34**

A una disolución del compuesto **33** bruto (33,08 g) en DMF seca (200 ml) se añadió KCN (15,99 g, 245,6 mmol) y 18-corona-6 (5,19 g, 19,65 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h y después se vertió en agua (1,5 litros). El precipitado se recogió y disolvió en EtOAc (600 ml), se lavó con H₂O (2 x 200 ml) y salmuera (2 x 200 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, filtró y el filtrado se concentró para dar el compuesto **34** (28,5 g, 91% de rendimiento a lo largo de dos etapas) en forma de un sólido blanquecino.

Síntesis del compuesto **35**

Una mezcla del compuesto **34** (28,0 g, 110,5 mmol) y KOH (94,0 g, 167,5 mmol) en H₂O (170 ml) se calentó a reflujo durante 12 h. Después la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con H₂O (1,6 litros) y se acidificó con HCl 12 N a pH=2. El precipitado resultante se recogió y se secó sobre P₂O₅ para dar el compuesto **35** (28,8 g, 95%) en forma de un sólido blanco.

Síntesis del compuesto **36**

Disolución 1: Se añadieron trietilamina (17,7 ml, 126,92 mmol) seguido de cloruro de trimetilacetilo (14,3 ml, 116,35 mmol) a una disolución de del compuesto **35** (28,8 g, 105,77 mmol) en THF (250 ml) a 0°C y la mezcla se agitó durante 1 h.

Disolución 2: En un segundo matraz, se añadió n-butil-litio (2,5 M en hexanos, 46,5 ml, 116,35 mmol) a una disolución de (S)-(-)-4-bencil-2-oxazolidinona (20,6 g, 116,35 mmol) en THF seco (145 ml) a -78°C. Esta disolución se agitó durante 1 h y después se añadió a la disolución 1 a 0°C. La mezcla resultante se calentó de 0°C a temperatura ambiente, se agitó durante 24 h, después se diluyó con disolución saturada de NaHCO₃ (400 ml) y se extrajo con CH₂Cl₂ (4 x 300 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (200 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (hexanos/EtOAc, 4:1) para dar el material de partida (15,93 g) y el compuesto **36** (15,30 g, 75% basado en la recuperación del material de partida) en forma de un sólido blanco.

Síntesis del compuesto **37**

Se añadió lentamente isopropóxido de titanio (2,6 ml, 8,69 mmol) a una disolución de tetracloruro de titanio (3,1 ml, 27,8 mmol) en diclorometano seco (100 ml) a 0°C. La mezcla resultante se agitó a 0°C durante 5 min y después se añadió diisopropiletilamina (6,7 ml, 38,24 mmol). Después de 15 minutos, se añadió una disolución del compuesto **36** (15 g, 34,76 mmol) en diclorometano (100 ml). La mezcla se agitó durante 90 min a 0°C, y después se añadió acrilato de terc-butilo (15,3 ml, 104,28 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 días a 0°C y después se diluyó con disolución saturada de cloruro amónico (300 ml). La capa acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 300 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con HCl al 5% (2 x 400 ml), agua (2 x 300 ml) y disolución saturada de NaCl (400 ml). Después de secar sobre MgSO₄, la filtración y evaporación del filtrado a vacío dieron el compuesto **37** bruto (21,0 g). Una parte del compuesto **37** bruto (2,1 g) se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluida con EtOAc/Hexanos (1:2) para proporcionar el compuesto **37** puro (1,55 g) en forma de un jarabe.

Síntesis del compuesto **38**

Una mezcla del compuesto **37** (1,55 g, 2,77 mmol) y Pd/C al 10% (150 mg) en EtOAc/AcOH (5:1, 60 ml) se agitó en atmósfera de hidrógeno H₂ (globo) durante 18 h. La mezcla se filtró sobre Celite y el filtrado se evaporó hasta sequedad para proporcionar el compuesto fenólico intermedio (1,30 g, 100%).

Una suspensión del compuesto fenólico (0,30 g, 0,639 mmol), K₂CO₃ anhidro (0,132 g, 0,958 mmol) y KI (5 mg) en DMF seca (1,5 ml) se agitó y se calentó a 65°C, y después se añadió gota a gota bromuro de ciclopentilo (0,10 ml, 0,958 mmol). La mezcla agitada se calentó a 65°C durante 21 h adicionales. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con Et₂O (50 ml) y se lavó con H₂O (2 x 25 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y se evaporó el disolvente. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice con hexanos/EtOAc (4:1) como eluyente para dar el compuesto **38** (0,22 g, 64%) en forma de un jarabe incoloro.

Síntesis del compuesto **39**

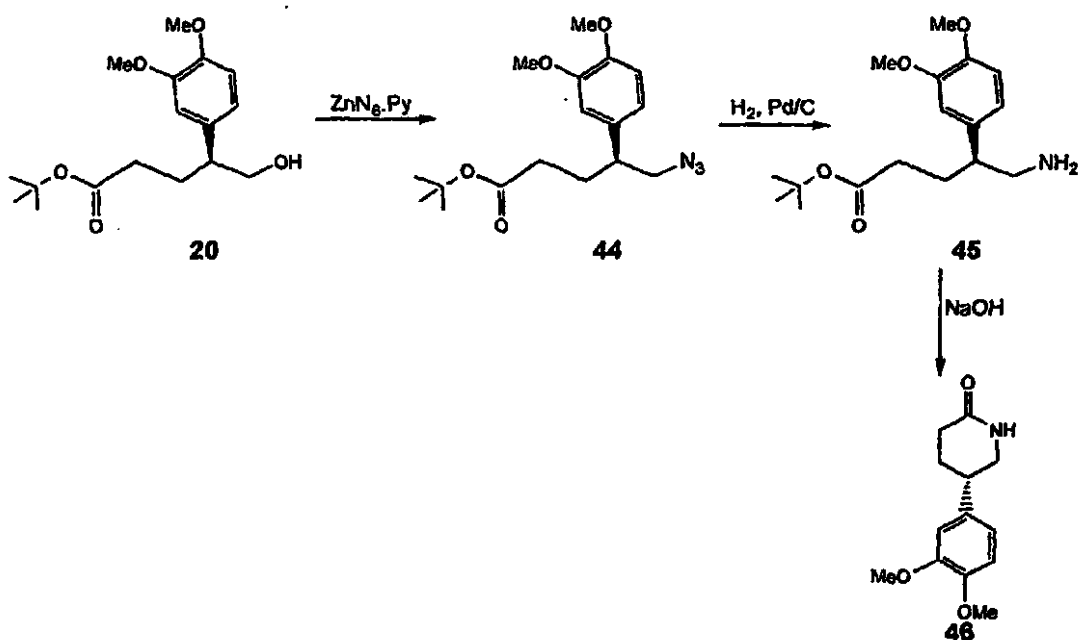
El compuesto **38** (3,5 g, 6,51 mmol) se disolvió en THF/H₂O (3:1, 60 ml) y se enfrió a 0°C. Se añadieron hidróxido de litio monohidrato (0,546 g, 13,02 mmol) y peróxido de hidrógeno al 30% (2,98 ml, 26,04 mmol) y la mezcla se agitó a 0°C durante 3 h. Se añadió una disolución de sulfito sódico (3,61 g, 28,64 mmol) en agua (19 ml), seguido de bicarbonato sódico 0,5 N (35 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y después se concentró a vacío. La fase acuosa se diluyó con HCl al 5% a pH = 2 y después se extrajo con EtOAc (3 x 75 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el filtrado se concentró a vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice usando ácido acético al 0,2% en acetato de etilo/hexanos (1:4) como eluyente para dar el compuesto **39** (2,24 g, 91%) en forma de un sólido blanco.

Síntesis del compuesto **40**

Se añadió gota a gota $\text{BH}_3\text{-THF}$ (disolución 1,0 M en THF, 2,70 ml, 2,70 mmol) a lo largo de 40 min a una disolución del **39** (2,23 g, 2,64 mmol) en THF seco (15 ml) a -18°C . Se retiró el baño de enfriamiento, y la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente durante 18 h. Se añadió disolución acuosa saturada NaHCO_3 (15 ml), y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con disolución saturada de NaCl (2 x 50 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y el filtrado se evaporó a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con EtOAc al 25% en hexanos para dar el compuesto **40** (1,91 g, 89%) en forma de un aceite incoloro.

Los compuestos intermedios adicionales usados para preparar los compuestos de la invención se pueden preparar como se describe a continuación en el esquema de reacción 3. En general, la conversión del compuesto **20** en el compuesto intermedio **46** clave se logró por una secuencia de cinco etapas como sigue: El tratamiento del compuesto **20** con complejo de azida de cinc/bis-piridina, trifenilfosfina y azodicarboxilato de diisopropilo en tolueno proporciona de forma suave la correspondiente azida **44** con 91% de rendimiento. Después el compuesto **44** se hidrogena en presencia de Pd-C al 10% y la amina **45** resultante se convierte en el compuesto **46** (63% a lo largo de dos etapas) por tratamiento con NaOH en DMF.

Esquema 3 de reacción.



La síntesis de los compuestos **44-46** en este esquema de reacción se describe específicamente a continuación.

Síntesis del compuesto **44**

Preparación del complejo de $\text{ZnN}_6\cdot 2\text{Py}$: A una disolución agitada de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3,57 g, 12,0 mmol) en H_2O (6 ml) se añadió gota a gota una disolución de NaN_3 (1,56 g, 24,0 mmol) en H_2O (12 ml). La suspensión blanca se llevó a 50°C en un baño de aceite, después se añadió gota a gota piridina (2,0 ml, 24,7 mmol) formando un precipitado blanco denso. Se continuó agitando mientras la mezcla se enfriaba lentamente a temperatura ambiente. Se filtró la sal, se lavó con agua helada y se secó a vacío para dar el $\text{ZnN}_6\cdot 2\text{Py}$ (2,99 g, 81%) en forma de un sólido blanco.

Se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (1,30 ml, 6,59 mmol) a una suspensión del compuesto **20** (1,0 g, 3,30 mmol), $\text{ZnN}_6\cdot 2\text{Py}$ (0,76 g, 2,47 mmol) y Ph_3P (1,73 g, 6,59 mmol) en tolueno anhidro (20 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice eluida con hexanos/EtOAc (9:1) para dar el compuesto **44** (1,01 g, 91 %) en forma de un aceite incoloro.

Síntesis del compuesto **45**

Una mezcla del compuesto **44** (1,00 g, 2,98 mmol) y Pd/C al 10% (100 mg) en EtOAc (30 ml) se agitó en atmósfera de H_2 (globo) durante 18 h. La mezcla se filtró sobre Celite y el filtrado se evaporó hasta sequedad para dar el compuesto **45** (0,923 g, 100%) en forma de un jarabe incoloro.

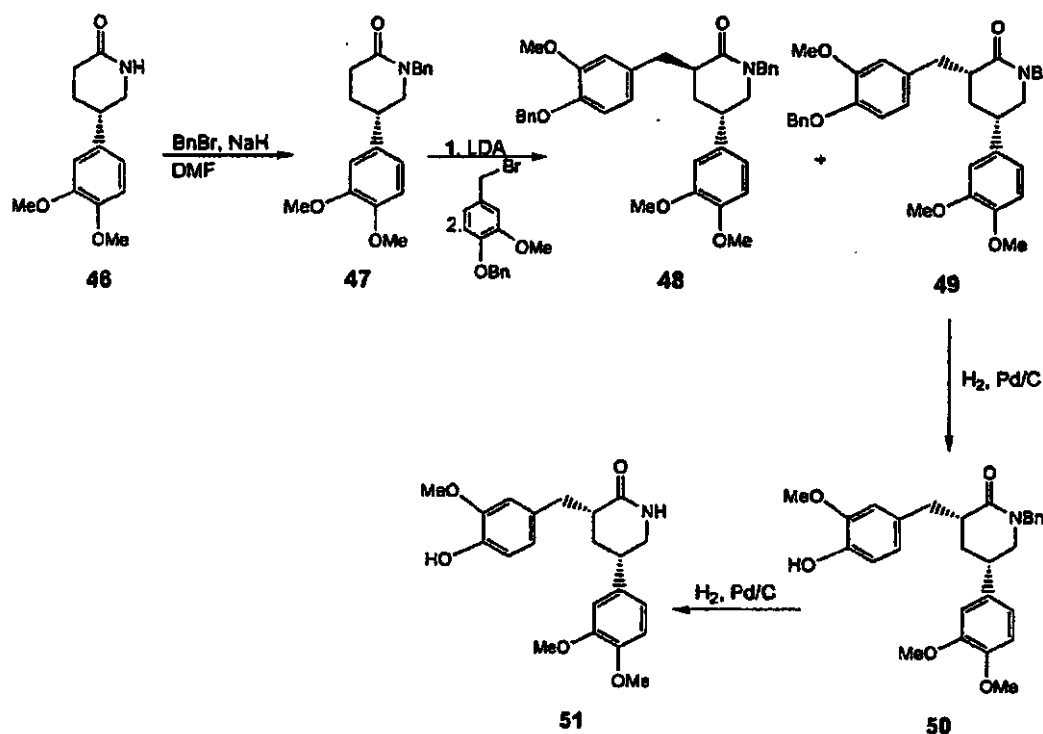
Síntesis del compuesto **46**

Se añadió hidróxido sódico (5 N, 0,14 ml, 0,70 mmol) a una disolución del compuesto **45** (0,21 g, 0,68 mmol) en THF (1 ml) y MeOH (1 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla se concentró, y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice eluida con hexanos/EtOAc (9:1) para dar el compuesto **46** (0,091 g, 63%) en forma de un sólido blanco.

Síntesis de los compuestos de la invención y ejemplos de referencia

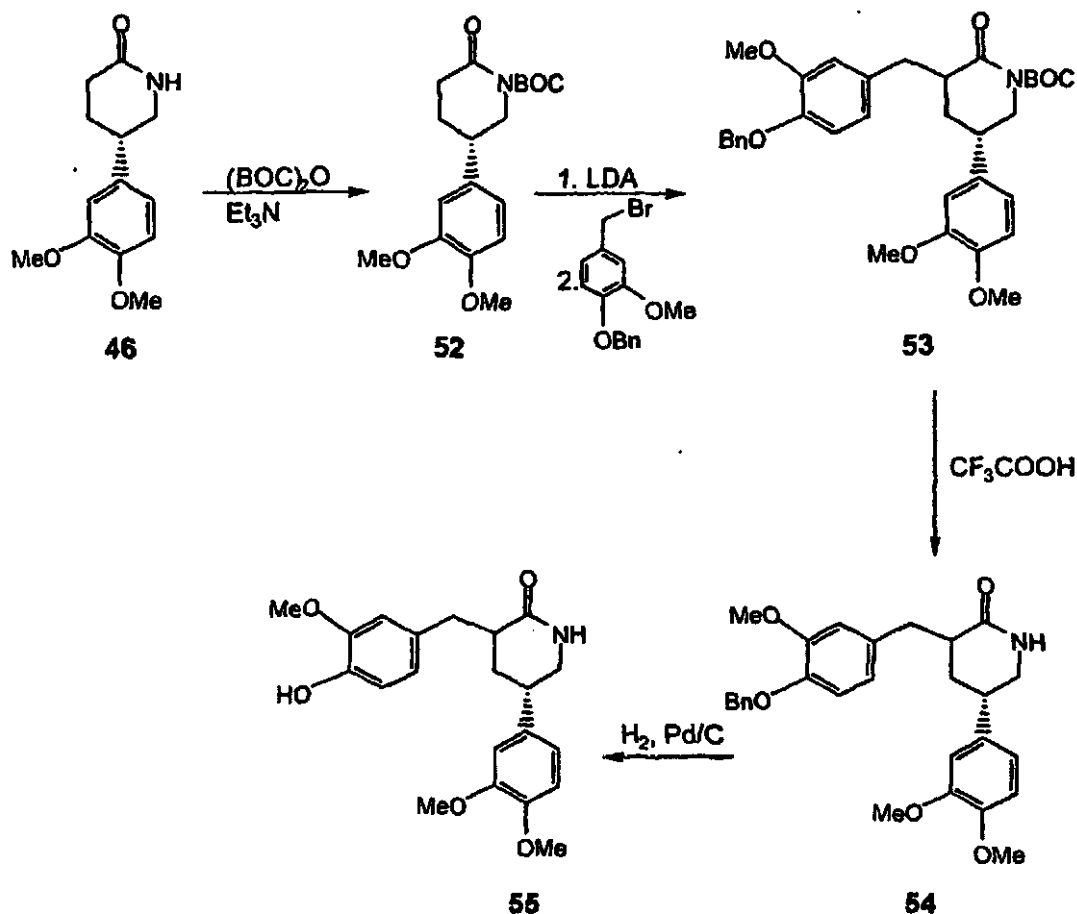
Los compuestos de la invención se pueden preparar por métodos descritos a continuación en el esquema de reacción 4. En este planteamiento, el compuesto **46** se trata con NaH y bromuro de bencilo en DMF para dar el compuesto **47** con 80% de rendimiento. El compuesto **47** después se pone en THF y se alquila con bromuro de 4-(benciloxi)-3-metoxibencilo para dar los productos de acoplamiento deseados **48** y **49** en una relación de 7,2:1 con 86% de rendimiento. Estos dos isómeros se pueden separar por cromatografía en columna de gel de sílice. La des-O-bencilación del compuesto **49** usando Pd/C al 10% como catalizador se desarrolla fácilmente y el fenol **50** se aísla con 98% de rendimiento. La posterior hidrogenolisis a alta presión puede proporcionar el compuesto **51**.

Esquema 4 de reacción



También se pueden usar métodos alternativos para proteger el nitrógeno lactámico como se representa en el siguiente esquema de reacción 5. Por ejemplo, la N-protección del compuesto **46** como la N-t-butoxicarbonilamida se puede lograr usando dicarbonato de di-terc-butilo y trietilamina en diclorometano para dar el derivado **52** con 95% de rendimiento. La alquilación del compuesto **52** con bromuro de 4-(benciloxi)-3-metoxibencilo da el compuesto **53** con 67% de rendimiento. El compuesto **53** es una mezcla de diastereoisómeros. La eliminación del grupo protector N-BOC en el compuesto **53** con ácido trifluoroacético en diclorometano da el producto **54** con 74% de rendimiento. La hidrogenolisis del compuesto **54** usando Pd/C al 10% como catalizador proporciona la mezcla de diastereoisómeros **55** con 81% de rendimiento.

Esquema de 5 reacción



La síntesis de los compuestos **47-55** en los esquemas de reacción 6 y 7 se describe específicamente a continuación.

Síntesis del compuesto **47**

- 5 El compuesto **46** (0,184 g, 0,782 mmol) se disolvió en DMF (5 ml) y se enfrió a 0°C , y se añadió NaH (0,0344 g, al 60% en aceite mineral, 0,860 mmol). Después de 2 h, se añadió lentamente bromuro de bencilo (0,14 ml, 1,173 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante otras 18 h. El disolvente se evaporó y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice eluida con EtOAc para dar el compuesto **47** (0,203 g, 80%) en forma de un sólido blanco.

10 Síntesis de los compuestos **48** y **49**

- A una disolución del compuesto **47** (0,23 g, 0,707 mmol) en THF seco (4 ml) en atmósfera de argón, se añadió lentamente LDA [0,85 mmol, preparado a partir de $n\text{-BuLi}$ (0,34 ml, disolución 2,5 M en hexano, 0,85 mmol) y diisopropilamina (0,12 ml, 0,85 mmol)] en THF (2 ml) a -78°C . La mezcla se agitó a -78°C durante 1 h y después se añadió HMPA (0,18 ml, 1,06 mmol) a la mezcla anterior mediante jeringa. Después de 15 min, se añadió bromuro de 4-(benciloxi)-3-metoxibencilo (0,434 g, 1,41 mmol) en THF (1 ml). La mezcla resultante se agitó durante 2 h adicionales a -78°C . El exceso de base se neutralizó a 0°C con disolución acuosa saturada de NH_4Cl (10 ml), y la disolución resultante se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 x 40 ml), se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y el filtrado se evaporó hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice eluida con hexanos/ EtOAc (3:2) para dar los compuestos **49** (0,295 g, 75,6%) y **48** (0,041 mg, 10,5%) en forma de espumas blancas.

Síntesis de los compuestos **50** y **51**

- Una mezcla del compuesto **49** (0,25 g, 0,453 mmol) y Pd/C al 10% (50 mg) en EtOAc (20 ml) se agitó en atmósfera de H_2 (globo) durante 48 h. La mezcla se filtró sobre Celite y el filtrado se evaporó hasta sequedad para dar el compuesto **50** (0,204 g, 98%) en forma de una espuma blanca. La hidrogenólisis adicional del compuesto **50** a alta presión proporciona el compuesto **51**.

Síntesis del compuesto **52**

Se añadió dicarbonato de di-terc-butilo (0,724 g, 3,32 mmol) una disolución del compuesto **46** (0,39 g, 1,66 mmol), Et₃N (0,46 ml, 3,22 mmol) y DMAP (0,040 g) en CH₂Cl₂ (12 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla se concentró, y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice eluida con hexanos/EtOAc (2:1) para dar el compuesto **52** (0,543 g, 98%) en forma de un sólido blanco.

Síntesis del compuesto **53**

A una disolución del compuesto **52** (0,54 g, 1,61 mmol) en THF seco (7 ml) en atmósfera de argón, se añadió lentamente LDA [1,93 mmol, preparado a partir de n-BuLi (0,77 ml, disolución 2,5 M en hexano, 1,93 mmol) y diisopropilamina (0,27 ml, 1,93 mmol)] en THF (4 ml) a -78°C. La mezcla se agitó a -78°C durante 1 h, y después se añadió HMPA (0,42 ml, 2,42 mmol) a la mezcla anterior mediante jeringa. Después de 15 min, se añadió bromuro de 4-(benciloxi)-3-metoxibencilo (0,989 g, 3,22 moles) en THF (2 ml). La mezcla resultante se agitó durante 4 h adicionales a -78°C. El exceso de base se neutralizó a 0°C con disolución acuosa saturada de NH₄Cl (20 ml), y la disolución resultante se extrajo con EtOAc (4 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera saturada (2 x 50 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el filtrado se evaporó hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice eluida con hexanos/EtOAc (4:1) para dar el compuesto **53** (0,604 g, 67%) en forma de una espuma blanca.

Síntesis del compuesto **54**

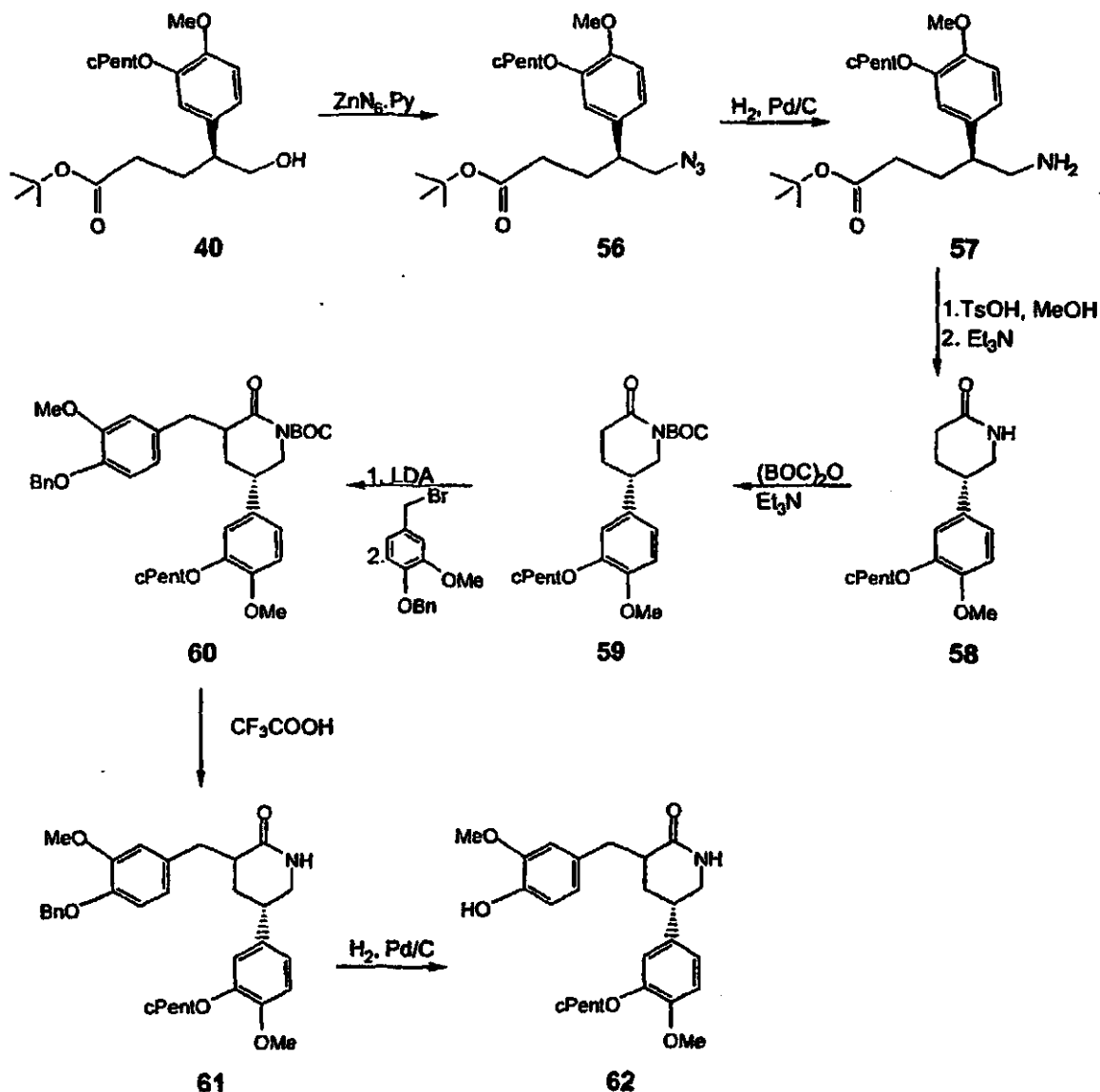
Se añadió ácido trifluoroacético (10 ml) a una disolución del compuesto **53** (0,557 g, 0,990 mmol) en CH₂Cl₂ (10 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y después se concentró a vacío. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (100 ml) y se lavó con disolución saturada de NaHCO₃ (3 x 20 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y el filtrado se concentró a vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice usando MeOH al 5% en acetato de etilo como eluyente, para dar el compuesto **54** (0,349 g, 76%) en forma de una espuma blanca.

Síntesis del compuesto **55**

Una mezcla del compuesto **54** (0,30 g, 0,65 mmol) y Pd/C al 10% (30 mg) en EtOAc/AcOH (1:1,10 ml) se agitó en atmósfera de H₂ (globo) durante 5 h. La mezcla se filtró sobre Celite y el filtrado se evaporó hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice eluida con EtOAc/MeOH (9:1) para dar el compuesto **55** (0,195 g, 81 %) en forma de un sólido blanco.

Alternativamente, los compuestos de la invención se pueden preparar por los métodos descritos en el esquema de reacción 6. En general, el tratamiento del compuesto **40** con complejo de azida de cinc/bis-piridina, trifenilfosfina y azodicarboxilato de diisopropilo en tolueno da la correspondiente azida **56**. Después el compuesto **56** bruto se hidrogena en presencia de Pd-C al 10% para dar el compuesto **57** con 76% de rendimiento a lo largo de dos etapas. La etapa de ciclación a la lactama implica una secuencia de reacciones de tres etapas en un solo recipiente, usando la solvolisis del éster terc-butílico con ácido p-toluenosulfónico monohidrato, esterificación en metanol, y ciclación a la lactama tras adición de trietilamina para proporcionar el compuesto **58** con un rendimiento de 96% a lo largo de 3 etapas. La N-protección del compuesto **58** resultante con dicarbonato de di-terc-butilo y trietilamina en diclorometano proporciona el derivado de N-t-butoxicarbonilamida **59** con 84% de rendimiento. La alquilación del compuesto **59** con LDA y bromuro de 4-(benciloxi)-3-metoxibencilo da el compuesto **60** con 74% de rendimiento. El compuesto **60** es una mezcla de diastereoisómeros con una relación de R/S de 1:1. La eliminación del grupo protector N-BOC en el compuesto **60** con ácido trifluoroacético en diclorometano da el producto objetivo **61** con 74% de rendimiento. La hidrogenolisis del compuesto **61** usando Pd/C al 10% como catalizador proporciona el producto final **62** con 81% de rendimiento.

Esquema 6 de reacción



La síntesis de los compuestos **56-62** en este esquema de reacción se describe específicamente a continuación.

Síntesis del compuesto **56**

- 5 Se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (1,62 ml, 8,24 mmol) a una suspensión del compuesto **40** (1,5 g, 4,12 mmol), $\text{ZnN}_6 \cdot 2\text{Py}$ (0,95 g, 3,09 mmol) y Ph_3P (2,16 g, 8,24 mmol) en tolueno anhidro (20 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. Después la mezcla se concentró, y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice eluida con EtOAc al 15% en hexanos para dar el compuesto **56** (1,59 g) en forma de un aceite incoloro.

10 Síntesis del compuesto **57**

Una mezcla del compuesto **56** bruto (1,59 g) y Pd/C al 10% (80 mg) en EtOAc (20 ml) se agitó en atmósfera de H_2 (globo) durante 20 h. La mezcla se filtró sobre Celite y el filtrado se evaporó hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice eluida con EtOAc/MeOH/ Et_3N (85:14:1) para dar el compuesto **57** (1,14 g, 76% a lo largo de dos etapas) en forma de un aceite incoloro.

15 Síntesis del compuesto **58**

El compuesto **57** (0,301 g, 0,825 mmol) se disolvió en tolueno (18 ml) y MeOH (2 ml) y se trató con $p\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,472 g, 2,48 mmol). La disolución se calentó a reflujo durante 1,5 h usando un aparato Dean-Stark. Después se retiró el aparato Dean-Stark y se añadió Et_3N (0,35 ml, 2,48 mmol) a la disolución, que se calentó a reflujo durante 4

h más. Se evaporó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluida con AcOH al 2% en EtOAc para proporcionar el compuesto **58** (0,228 g, 96%) en forma de un sólido blanco.

Síntesis del compuesto **59**

- 5 Se añadió dicarbonato de di-terc-butilo (0,935 g, 4,28 mmol) a una disolución del compuesto **58** (0,62 g, 2,14 mmol), Et₃N (0,60 ml, 4,28 mmol) y DMAP (0,060 g) en CH₂Cl₂ (20 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla se concentró, y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice eluida con hexanos/EtOAc (3:1) para dar el compuesto **59** (0,696 g, 84%) en forma de un sólido blanco.

Síntesis del compuesto **60**

- 10 A una disolución del compuesto **59** (0,60 g, 1,54 mmol) en THF seco (5 ml) en atmósfera de argón se añadió lentamente LDA [1,85 mmol, preparado a partir de n-BuLi (0,74 ml, disolución 2,5 M en hexano, 1,85 mmol) y diisopropilamina (0,26 ml, 1,85 mmol)] en THF (2 ml) a -78°C. La mezcla se agitó a -78°C durante 1 h, y después se añadió HMPA (0,40 ml, 2,30 mmol) a la mezcla anterior mediante jeringa. Después de 15 min, se añadió bromuro de 4-(benciloxi)-3-metoxibencilo (0,71 g, 2,30 mmol) en THF (2 ml). La mezcla resultante se agitó durante 4 h adicionales a -78°C. El exceso de base se neutralizó a 0°C con disolución acuosa saturada de NH₄Cl (20 ml), y la disolución resultante se extrajo con EtOAc (3 x 60 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera saturada (2 x 50 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el filtrado se evaporó hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice eluida con hexanos/EtOAc (7:3) para dar el compuesto **60** (0,693 g, 74%) en forma de una espuma blanca.

Síntesis del compuesto **61**

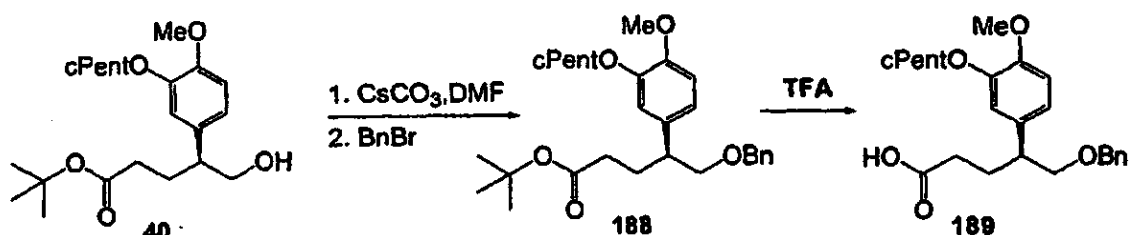
- 20 Se añadió ácido trifluoroacético (3 ml) a una disolución del compuesto **60** (0,63 g, 1,02 mmol) en CH₂Cl₂ (3 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, se diluyó con tolueno (20 ml) y después se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice usando MeOH al 5% en acetato de etilo como eluyente para dar el compuesto **61** (0,39 g, 74%) en forma de un sólido blanco.

Síntesis del compuesto **62**

- 25 Una mezcla del compuesto **61** (0,28 g, 0,54 mmol) y Pd/C al 10% (27 mg) en EtOAc/AcOH (1:1, 6 ml) se agitó en atmósfera de H₂ (globo) durante 5 h. La mezcla se filtró sobre Celite y el filtrado se evaporó hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice eluida con EtOAc/MeOH (97:3) para dar el compuesto **62** (0,20 g, 84%) en forma de una espuma blanca.

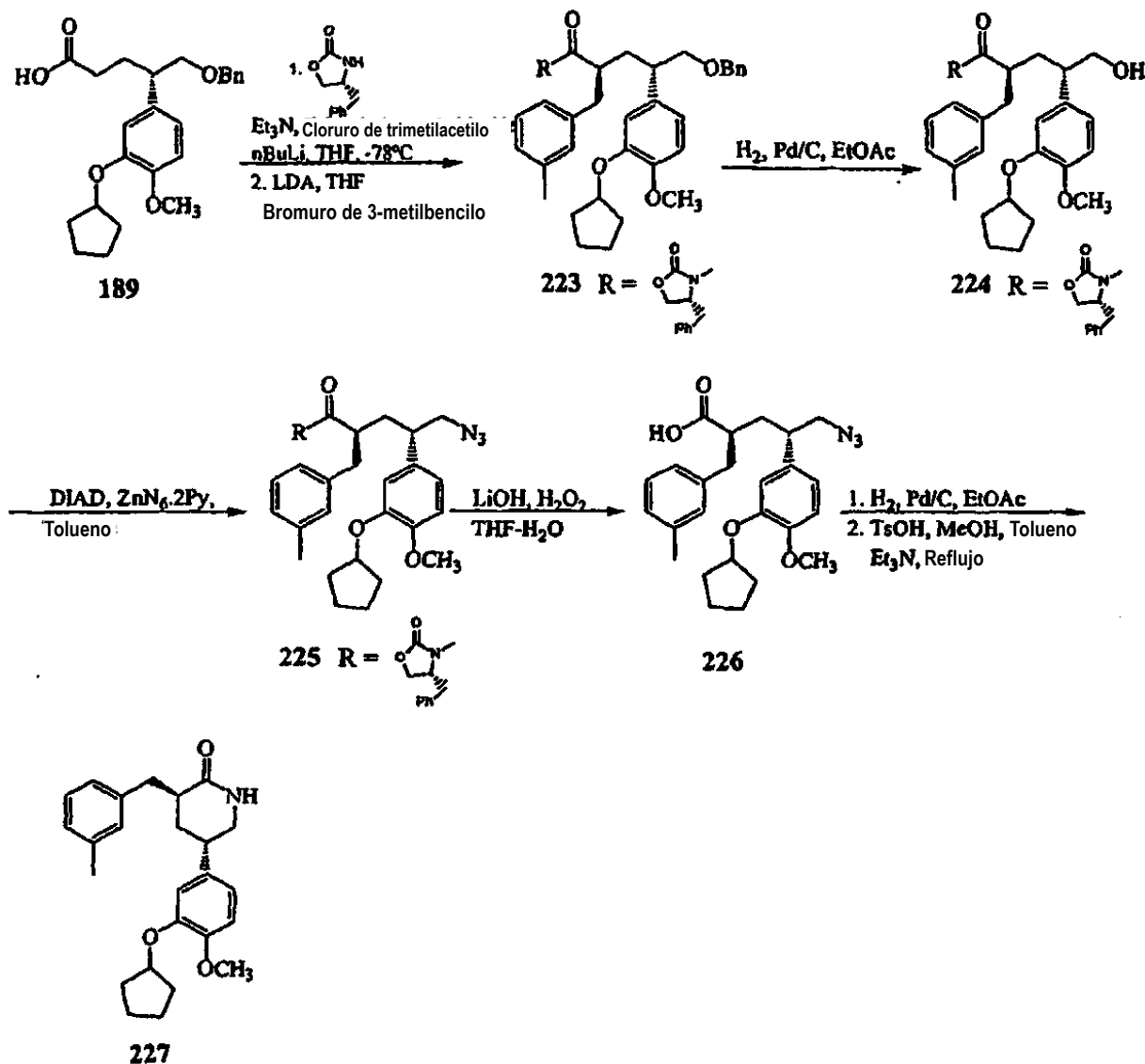
- 30 Alternativamente, los compuestos de la invención se pueden preparar por métodos similares a los descritos a continuación en los esquemas de reacción 7 y 8. Por ejemplo, en el esquema de reacción 8, la protección del alcohol primario en el compuesto **40** se puede lograr usando bromuro de bencilo (BnBr) y carbonato de cesio en DMF para dar el derivado benciloxi **188**. Después el compuesto **188** se puede convertir en su correspondiente ácido **189** haciendo reaccionar el compuesto **188** con ácido trifluoroacético.

Esquema 7 de reacción



- 35 El compuesto **189** después se puede usar para preparar los compuestos de la invención como se expone a continuación en el esquema de reacción 8.

Esquema 8 de reacción



La síntesis de los compuestos **223-227** en este esquema de reacción se describe específicamente a continuación.

Síntesis del compuesto **223**

- 5 A. Las siguientes disoluciones (disolución 1 y disolución 2) se prepararon independientemente. Disolución 1: Se añadieron trietilamina seguido de cloruro de trimetilacetilo a una disolución del compuesto **189** en THF a 0°C, y la mezcla se agitó durante 1 h. Disolución 2: Se añadió n-butil-litio a una disolución de (R)-(-)-4-bencil-2-oxazolidinona en THF seco a -78°C, y la mezcla se agitó durante 1 h.
- 10 B. Se añadió la disolución 2 a la disolución 1 mediante cánula. La mezcla resultante a 0°C se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 24 h, la mezcla se diluyó con una disolución saturada de NaHCO₃, y se extrajo con CH₂Cl₂. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con H₂O, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el filtrado se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice para dar el derivado de (R)-(-)-4-bencil-2-oxazolidinona deseado.
- 15 C. Se añadió lentamente n-butil-litio a una disolución de diisopropilamina en THF seco a -78°C. La mezcla de reacción se agitó a -78°C en atmósfera de argón durante 1 h a -78°C. Se añadió el derivado de (R)-(-)-4-bencil-2-oxazolidinona en THF a -78°C y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h. Después se añadió una disolución de bromuro de 3-metilbencilo en THF en una porción a la mezcla de reacción. La mezcla resultante se calentó 0°C y se agitó durante 2 h adicionales. El exceso de base se neutralizó a 0°C con disolución acuosa saturada de NH₄Cl, y la disolución resultante se extrajo con CH₂Cl₂. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron sucesivamente con
- 20 disolución saturada de NaHCO₃ y H₂O, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el filtrado se concentró a vacío. El

residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice para dar el compuesto **223**.

Síntesis del compuesto **224**

El compuesto **223** y Pd/C al 10% en EtOAc se agitaron en atmósfera de H₂ (globo) durante 20 h. La mezcla se filtró a través de Celite y el filtrado se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice para dar el compuesto **224**.

Síntesis del compuesto **225**

Se añadió azodicarboxilato de diisopropilo a una suspensión del compuesto **224** mezclado con ZnN₆.2Py y Ph₃P en tolueno anhidro. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla se concentró a vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice para dar el compuesto **225**.

Síntesis del compuesto **226**

Se añadieron LiOH.H₂O y H₂O₂ (al 30% en H₂O) a una disolución del compuesto **225** en THF/H₂O (3:1) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 3 h. Después se añadió una disolución de Na₂SO₃ en agua seguido de una disolución de NaHCO₃ 0,5 N. La mezcla se agitó durante 2 h y después el THF se evaporó a vacío. Esta disolución acuosa se diluyó con HCl 2N a pH = 2 y después se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el filtrado se evaporó hasta sequedad. El aceite resultante se purificó usando cromatografía en columna de gel de sílice para dar el compuesto **226**.

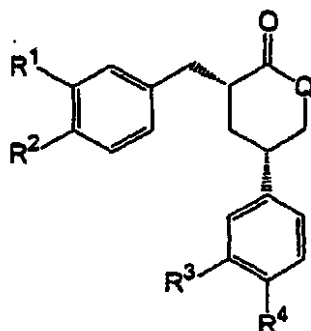
Síntesis del compuesto **227**

El compuesto **226** y Pd/C al 10% en EtOAc se agitaron en atmósfera de H₂ (globo) durante 20 h. La mezcla se filtró a través de Celite y el filtrado se evaporó hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice para dar el compuesto ácido deseado.

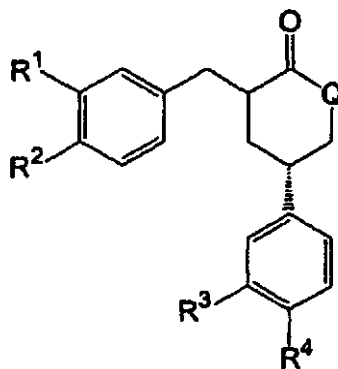
El compuesto ácido se disolvió en tolueno y MeOH y se trató con *p*TsOH.H₂O. La disolución se calentó a reflujo durante 1,5 h usando un aparato Dean-Stark. Después se retiró el aparato Dean-Stark y se añadió Et₃N a la disolución, la cual se calentó a reflujo durante 4 h adicionales. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice para dar el compuesto **227** deseado.

Como se ha descrito en secciones previas, los compuestos de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden contener uno o más centros asimétricos y, por lo tanto, pueden dar lugar a enantiómeros, diastereoisómeros y otras formas estereoisómeras que se pueden definir, en términos de la estereoquímica absoluta, como (*R*) o (*S*), o como (*D*) o (*L*) para los aminoácidos. Se entiende que la presente invención incluye todos dichos posibles isómeros, así como sus formas racémicas, ópticamente enriquecidas y ópticamente puras. Los isómeros ópticamente activos (+) y (-), (*R*) y (*S*), o (*D*) y (*L*) se pueden preparar usando sintones quirales o reactivos quirales, o se pueden resolver usando técnicas convencionales, tales como HPLC de fase inversa usando una fase estacionaria quiral. Cuando los compuestos descritos en la presente memoria contienen dobles enlaces olefinicos, u otros centros de asimetría geométrica, y salvo que se especifique otra cosa, se pretende que los compuestos incluyan los isómeros geométricos tanto *E* como *Z*. Igualmente, también se pretende que estén incluidas todas las formas tautómeras.

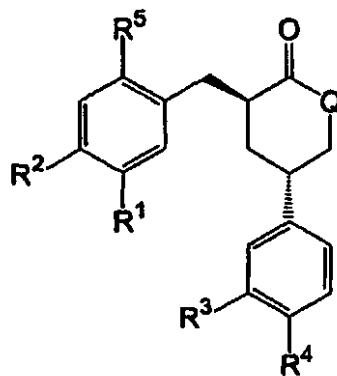
Las siguientes tablas se proporcionan para definir las estructuras de los compuestos de la invención y los ejemplos de referencia listados en los ejemplos de utilidad. Todos los compuestos en estas tablas se prepararon usando la metodología descrita en la presente memoria o metodología descrita para compuestos similares proporcionados en la presente memoria. Las abreviaturas usadas en las tablas son las siguientes: Ac es acetilo, Bn es bencilo, Me es metilo, Et es etilo, Bu es butilo, Hex es hexilo, Ph es fenilo, Pent es pentilo, Pr es propilo, Hept es heptilo, 4-ClPh es 4-clorofenilo, BOC es benciloxycarbonilo, cPent es ciclopentilo, iBu es isobutilo, y iPr es isopropilo.



Estructura	Nº de compuesto
$R^1=\text{OMe}$, $R^2=\text{OBn}$, $R^3=\text{OMe}$, $R^4=\text{OMe}$, $Q=\text{NBn}$	49
$R^1=\text{OMe}$, $R^2=\text{OH}$, $R^3=\text{OMe}$, $R^4=\text{OMe}$, $Q=\text{NBn}$	50
$R^1=\text{OMe}$, $R^2=\text{OH}$, $R^3=\text{OMe}$, $R^4=\text{OMe}$, $Q=\text{NH}$	51

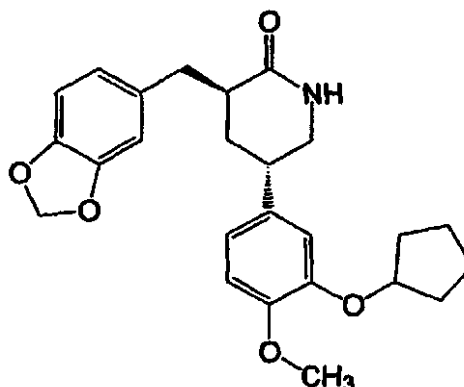


Estructura	Nº de compuesto
$R^1=\text{OMe}$, $R^2=\text{OBn}$, $R^3=\text{OMe}$, $R^4=\text{OMe}$, $Q=\text{NBoc}$	53
$R^1=\text{OMe}$, $R^2=\text{OBn}$, $R^3=\text{OMe}$, $R^4=\text{OMe}$, $Q=\text{NH}$	54
$R^1=\text{OMe}$, $R^2=\text{OH}$, $R^3=\text{OMe}$, $R^4=\text{OMe}$, $Q=\text{NH}$	55
$R^1=\text{OMe}$, $R^2=\text{OBn}$, $R^3=\text{OcPent}$, $R^4=\text{OMe}$, $Q=\text{NBOC}$	60
$R^1=\text{OMe}$, $R^2=\text{OBn}$, $R^3=\text{OcPent}$, $R^4=\text{OMe}$, $Q=\text{NH}$	61
$R^1=\text{OMe}$, $R^2=\text{OH}$, $R^3=\text{OcPent}$, $R^4=\text{OMe}$, $Q=\text{NH}$	62



Estructura	N° de compuesto
$R^1=OMe, R^2=OBn, R^3=OMe, R^4=OMe, R^5=H, Q=NbN$	48
$R^1=Me, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	227
$R^1=H, R^2=F, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	228
$R^1=H, R^2=CF_3, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	229
$R^1=H, R^2=H, R^3=O/Pr, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	230
$R^1=H, R^2=F, R^3=OEt, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	231
$R^1=OPh, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	232
$R^1=H, R^2=Me, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	233
$R^1=H, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	234
$R^1=OMe, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	235
$R^1=H, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=Me, Q=NH$	236
$R^1=H, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=Cl, Q=NH$	237
$R^1=CF_3, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	238
$R^1=Cl, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	239
$R^1=O(4-ClPh), R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	240
$R^1=H, R^2=iPr, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	241
$R^1=H, R^2=OBu, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	242
$R^1=H, R^2=OPh, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	243
$R^1=CF_3, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=Cl, Q=NH$	244
$R^1=H, R^2=OCF_3, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	245
$R^1=OEt, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	246
$R^1=OPr, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	247
$R^1=OBu, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	248
$R^1=OPent, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	249
$R^1=OHex, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	250
$R^1=OHept, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	251
$R^1=Me, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NAC$	252
$R^1=Me, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NC(O)Ph$	253
$R^1=Me, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=N/Bu$	254
$R^1=H, R^2=CF_3, R^3=O/Pr, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	255
$R^1=OBn, R^2=H, R^3=OEt, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	256
$R^1=OBn, R^2=H, R^3=O/Pr, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	257
$R^1=H, R^2=H, R^3=OEt, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	258
$R^1=F, R^2=F, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	259
$R^1=OBn, R^2=H, R^3=OcPent, R^4=OMe, R^5=H, Q=NH$	260

Además de los compuestos anteriores, el siguiente compuesto **261** se preparó con los materiales de partida adecuados usando metodología descrita en la presente memoria.



5 Ejemplos de utilidad

Los ensayos biológicos in vitro e in vivo mostraron que los compuestos de la invención presentan un conjunto de potentes actividades biológicas contra dianas relevantes para la artritis reumatoide, otras enfermedades inflamatorias y enfermedades no relacionadas con la inflamación como se describe a continuación.

10 Como se usa en la presente memoria, "tratar la inflamación" se refiere tanto a la terapia para la inflamación como para la prevención del desarrollo de la respuesta inflamatoria. Se usa una cantidad eficaz de un compuesto o

composición de la presente invención para tratar la inflamación en un animal de sangre caliente, tal como un ser humano. Los métodos de administración de cantidades eficaces de agentes antiinflamatorios son bien conocidos en la técnica, e incluyen la administración de formas de inhalación, orales y parenterales. Dichas formas de dosificación incluyen, pero sin limitar, disoluciones parenterales, comprimidos, cápsulas, implantes de liberación sostenida y sistemas de suministro transdérmico; o sistemas de dosificación para inhalación que usan inhaladores de polvo seco o dispositivos de inhalación presurizados de múltiples dosis. En general, se prefiere la administración oral o tópica para el tratamiento de la inflamación. La cantidad y frecuencia de la dosificación se seleccionan para crear un nivel eficaz del agente sin efectos dañinos. En general estará en el intervalo de una dosificación de aproximadamente 0,01 a 10 mg/kg/día, cuando se administra por vía oral o intravenosa. El intervalo de dosificación también será típicamente de aproximadamente 0,01 a 1 mg/kg/día cuando se administra por vía intranasal o inhalación.

La administración de compuestos o composiciones de la presente invención se puede llevar a cabo en combinación con la administración de otros agentes. Por ejemplo, se puede desear coadministrar un glucocorticoide por su efecto en la artritis.

Generación de especies de oxígeno reactivas por neutrófilos activados

Los neutrófilos comprenden alrededor de 90% del infiltrado leucocitario en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR) y se cree que contribuyen tanto a las fases agudas como a las crónicas de esta y muchas otras enfermedades inflamatorias mediante la liberación de mediadores proinflamatorios, enzimas de degradación de la matriz y radicales de oxígeno tóxicos que producen daño tisular. Un mecanismo patógeno propuesto es que las células no son capaces de fagocitar sustancias proinflamatorias grandes tales como los complejos inmunitarios insolubles o endotelio dañado presente en la articulación. Por consiguiente, los gránulos de los neutrófilos se condensan con la membrana plasmática en el sitio de la activación, en lugar de internamente con las vacuolas fagocíticas, permitiendo la liberación extracelular de especies de oxígeno reactivas proinflamatorias (ROS) y otras sustancias tóxicas.

La activación de neutrófilos se puede medir por la cuantificación de las ROS generadas in vitro. La medición de las ROS permite la cuantificación específica de una especie proinflamatoria y también es una medida general de la activación de neutrófilos. El método más sensible para medir la producción de ROS por los neutrófilos es la quimioluminiscencia potenciada con luminol. El sistema de ensayo usado para evaluar la capacidad de los compuestos para inhibir la generación de ROS en los neutrófilos es indicativo de la actividad antiinflamatoria que puede ser eficaz en enfermedades, incluyendo, pero sin limitar, la artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria intestinal.

Neutrófilos humanos primarios recién aislados (5×10^6 células/ml) se incubaron con las concentraciones requeridas de compuesto o vehículo durante 30 min a 37°C en tampón de HBSS (pH 7,4) que contenía Ca^{2+} . Se usó wortmanina (100 nM) como control positivo. Se transfirieron partes alícuotas de cada muestra a una placa de microvaloración a las que añadió luminol (1 μM); obtenido de Sigma; n° de catálogo A8511. La activación de los neutrófilos se inició inmediatamente por adición de fMLP (1 μM); obtenido de Sigma, n° de catálogo F3506. Se registró la producción de luz de cada pocillo durante 30 min en un luminómetro de microplaca. Se determinó para cada pocillo la producción de luz total (integral de tiempo-desarrollo). Las actividades inhibitoras de los fármacos de ensayo contra la generación de ROS de los neutrófilos se expresan como la actividad en porcentaje con respecto a un control sin fármaco (activación o generación de ROS 100%) que contiene DMSO al 0,25%. La concentración del compuesto de ensayo necesaria para inhibir la generación de ROS al 50% de los valores de control (CI_{50}) se determinó a partir de las curvas de concentración-respuesta por análisis de regresión no lineal. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Inhibición de la desgranulación de neutrófilos por compuestos de ensayo, medido por la producción de ROS

NÚMERO DE COMPUESTO	INTERVALO DE CI_{50} (μM)			
	<1	1-10	10-100	>100
54		X		
61				X
62			X	
55		X		

Como se muestra en la tabla 1, los compuestos representativos de la presente invención demuestran CI_{50} en el intervalo de 1-100 μM . Este resultado muestra que estos compuestos bloquean potencialmente la generación de especies de oxígeno reactivas proinflamatorias por los neutrófilos in vitro. Este resultado puede surgir de la inhibición de la fosfodiesterasa y/o depuración química. Esta propiedad predice la actividad antiinflamatoria in vivo debido a la función establecida de la lesión tisular mediada por las ROS, p. ej., en la artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias intestinales y psoriasis.

Desgranulación de neutrófilos (liberación de mieloperoxidasa)

Los granulocitos neutrófilos contienen varios tipos de orgánulos conocidos como gránulos. Estos cuerpos subcelulares contienen un conjunto diverso de agentes bactericidas incluyendo proteasas y otras enzimas hidrolíticas que son esenciales para la respuesta inflamatoria normal, pero contribuyen a la lesión tisular aguda cuando los neutrófilos son activados de forma crónica y/o inadecuada en la enfermedad. Una de las enzimas características de los gránulos es la mieloperoxidasa (MPO) que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en hipohaluro. La MPO es liberada al medio extracelular por la estimulación de la desgranulación y es un índice fiable de la activación de neutrófilos. El siguiente sistema de ensayo se puede usar para evaluar la capacidad de un compuesto de la invención para inhibir la liberación de MPO por los neutrófilos, que es indicativa de la actividad antirreumatoide así como de otras enfermedades en las que está implicada la activación de neutrófilos inadecuada.

Se recogen dos tubos de sangre humana (12 ml) en tubos anticoagulantes ACD (Fisher, N° de catálogo 02-684-29). La sangre se mezcla con 4 ml de dextrano al 6% en disolución salina. La mezcla de sangre se recoge en una jeringa de 60 cc. La jeringa se inclina hacia arriba sobre una mesa de laboratorio durante 30 min. La capa superior de suero se superpone sobre 4 ml de Histopaque (Sigma; N° de catálogo 1077-1) en un tubo de centrifuga de 15 ml. El tubo se centrifuga durante 30 min a 2000 rpm. El líquido sobrenadante se descarta. El sedimento se mezcla con 3 ml de H₂O destilada fría, seguido de 1 ml de NaCl 6 N después de 30 segundos. El tubo se centrifuga durante 5 min a 1100 rpm. El sedimento de cada tubo se combina y se lava dos veces con 10 ml (HBSS); disolución salina equilibrada de Hank (Stem Cell Ltd.; N° de catálogo LMC 75). Se cuentan las células y se diluyen hasta 2x10⁶ células/ml.

Las células (0,3 ml) se añaden mediante pipeta a tubos de microcentrifuga previamente etiquetados. Las células se incuban con citocalasina B 5 µg/ml, PGE₂ 10 nM y la concentración deseada del compuesto de ensayo o vehículo (DMSO al 0,5%) durante 5 min a 37°C. Se usa wortmanina o rolipram como control positivo. Se añade fMLP 100 nM a cada tubo excepto el control. Después de 30 min de incubación, las células se ponen sobre hielo y se centrifugan a 13.000 rpm durante 3 min. Se añaden mediante pipeta 50 µl de líquido sobrenadante a los pocillos adecuados de una placa de 96 pocillos (por triplicado). Se añaden 100 µl de sustrato a cada pocillo (o-dianisidina 0,53 mM; Sigma, N° de catálogo D 3252, H₂O₂ 0,147 mM en tampón de fosfato pH 6,0). La placa se incuba durante 30 min a 37°C. La reacción se termina por adición de 50 µl de H₂SO₄ 4 N a cada pocillo. Para preparar una curva de referencia, se añaden mediante pipeta 200 µl de peroxidasa de rábano picante 1, 0,1, 0,01 y 0,001 mg/ml, a los pocillos (por triplicado). La placa se lee mediante un lector de ELISA a 405 nm.

Quimiotaxia de neutrófilos

El proceso de quimiotaxia (migración leucocitaria dirigida hacia un gradiente de quimioquinas) es esencial para la acumulación de números altos de neutrófilos asociados con manifestaciones patológicas de la inflamación (p. ej., deterioro en la articulación reumatoide). La quimiotaxia es un mecanismo principal por el cual los neutrófilos migran del lumen de los vasos sanguíneos al sitio de la inflamación, y por lo tanto es un proceso común asociado con el daño tisular mediado por neutrófilos en muchas enfermedades inflamatorias. La inhibición específica de la migración de neutrófilos a la articulación inflamada es un objetivo terapéutico válido en la artritis reumatoide y en muchas enfermedades inflamatorias. El siguiente sistema de ensayo in vitro se puede usar para evaluar la capacidad de los compuestos de la invención para inhibir la quimiotaxia, que indica la actividad antirreumatoide in vivo y la actividad contra enfermedades inflamatorias en las que los neutrófilos están implicados en el daño tisular asociado.

Se añade tampón de quimiotaxia que contiene el quimioatractor fMLP (10 µM) a cada pocillo de una placa de quimiotaxia y se inserta un filtro asegurando el contacto entre el filtro y el tampón de quimiotaxia en el pocillo. Se usa una concentración submáxima de quimioatractor. Para determinar la migración celular espontánea, algunos pocillos no reciben quimioatractor, sino que reciben solo tampón. Se incuban neutrófilos recién aislados (1x10⁶) con vehículo (DMSO al 0,125%) ± compuesto de ensayo durante 1 h a 37°C. Después se vuelven a suspender suavemente las suspensiones celulares de tratamiento y de control y se añaden 20 µl a las células en el lado superior del filtro de cada pocillo. La placa se incuba durante 1,5 h a 37°C con CO₂ al 5%. Después las células se retiran del lado superior del filtro por aspiración y se centrifuga la placa entera. Se retira el filtro y se añaden concentraciones conocidas de células a los pocillos no usados para preparar una curva de referencia. Se añade disolución XTT (Sigma; N° de catálogo X 4251) / PMS (Sigma; N° de catálogo P 7626) preparada en tampón a cada pocillo y las células se incuban 1-2 h más y se mide la absorbancia a 450 nm. Los valores de absorbancia se convierten en número de células usando la curva de referencia. Los valores de CI₅₀ son medias de al menos tres experimentos separados con determinaciones por triplicado.

Inhibición de la producción de TNF-α en linfocitos T CD4+ humanos primarios estimulados con concanavalina A.

Se sabe que los linfocitos T activados producen TNF-α y pueden constituir una fuente significativa de este mediador inflamatorio importante en regiones localizadas de la inflamación, tales como la membrana sinovial reumatoide o lesiones psoriásicas. Se analizó en los líquidos sobrenadantes de los linfocitos T CD4+ humanos primarios estimulados con conA que se habían incubado en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo, el TNF-α usando un sistema de ELISA. (Pharigen; recomendado conjunto de anticuerpos anti-TNF 18631-D y 18642-D). Se indujeron cantidades sustanciales de TNF-α en linfocitos T tratados con vehículo y estimulados con conA.

Como se muestra en la tabla 2, los compuestos representativos de la invención eran capaces de inhibir potencialmente la producción de TNF- α derivada de linfocitos T. Este resultado contrasta con la menor potencia de estos compuestos en la inhibición de la liberación de TNF- α inducida por LPS en sangre entera humana. Esto puede deberse a la diferente sensibilidad de los monocitos/macrófagos frente a los linfocitos T a las elevaciones del cAMP intracelular con respecto a las rutas reguladoras que impactan en la producción de TNF- α . Este resultado sugiere que los compuestos de la invención se pueden usar en el tratamiento de enfermedades que implican la producción de TNF- α .

Tabla 2

Efectos de los compuestos de ensayo en la producción de TNF- α en linfocitos T CD4+ humanos estimulados con conA

COMPUESTO	INTERVALO DE CI_{50} TNF- α (μ M)		
	<2	2,0-20	>20
54	X		
55		X	
62	X		
ROLIPRAM	X		
ZARDAVERINA	X		

Inhibición de la función de los linfocitos T cooperadores humanos

Introducción y fundamento

Muchas enfermedades inflamatorias con una etiología autoinmunitaria incluyendo la artritis reumatoide y la psoriasis, se caracterizan por un desequilibrio en la función de linfocitos T cooperadores de subconjuntos de linfocitos T autorreactivos, que produce el inicio y mantenimiento de un estado proinflamatorio. Este desequilibrio se pone de manifiesto a menudo como la expresión excesiva de un fenotipo Th1 y/o la eliminación de un fenotipo Th2. Los linfocitos T que segregan IL-2 y INF- γ se denominan células Th1 o de tipo 1. Estas células están implicadas en la inmunidad mediada por células directa por activación de macrófagos y rutas celulares citotóxicas. Las células que producen IL-4, IL-5 e IL-10 se denominan células Th2 o de tipo 2 y regulan la respuesta inmunitaria humoral. Los compuestos representativos de la presente invención inhibían la función de Th1 de forma más potente que la función de Th2 in vitro en linfocitos T CD4+ humanos primarios estimulados con concanavalina A. Por lo tanto, estos compuestos pueden tener valor terapéutico al ser capaces de eliminar selectivamente células Th1 sin afectar a las células Th2 en ningún grado significativo, produciendo, por lo tanto, la corrección de un desequilibrio en la enfermedad inflamatoria autoinmunitaria caracterizada por respuestas de Th1 elevadas.

El ensayo en los linfocitos T humanos primarios implica su activación con concanavalina A (conA); (Sigma, N° de catálogo C 5275), seguido de la detección por ELISA de citoquinas para cualquier perfil. En el caso de perfiles de Th1, se usan la IL-2 e INF- γ como referencias, mientras que la IL-10 es el indicador para un perfil de Th2. Biológicamente, estos indicadores son útiles en cuanto que la IL-2 es el principal mitógeno para linfocitos T, mientras que la IL-10 representa un poderoso agente inmunosupresor todavía selectivo.

Métodos

Se recogieron aproximadamente 60 cc de sangre humana entera en tubos vacutainer anticoagulantes ACD. Se repartieron en partes alícuotas 15 ml de Ficoll Paque 1077 en 6 tubos cónicos de 50 ml estériles. Se aplicó en una capa una parte alícuota de sangre (10 ml) sobre la parte superior del Ficoll Paque manteniendo el tubo en vertical y dejando reposar la punta de la pipeta en el borde interior del tubo y dejando que la sangre bajara lentamente por la pared del tubo. Los tubos se centrifugaron a 1700 rpm durante 30 min a temperatura ambiente. La capa de plasma encima de la banda de leucocitos se separó por aspiración y se usó una pipeta pasteur para despegar la banda de leucocitos y transferirla a un tubo cónico de 50 ml estéril. Las células de cada tubo de gradiente de leucocitos se transfirieron a un tubo cónico de 50 ml separado. Se añadió PBS estéril pH 7,4 a cada tubo cónico de 50 ml que contenía células de la banda de leucocitos hasta un volumen de 50 ml. Los tubos se centrifugaron a 1100 rpm durante 10 min. Se separó por aspiración el líquido sobrenadante y las células se volvieron a suspender en 50 ml de PBS pH 7,4. Los tubos se volvieron a centrifugar a 1100 rpm durante 10 min. Se separó por aspiración el líquido sobrenadante y las células se volvieron a suspender en medio adecuado con una densidad de 5×10^7 células/ml o 2×10^6 células/ml.

Preparación de linfocitos brutos: las células de la preparación leucocitaria se volvieron a suspender en medio BASAL (AcitCyte™) o RPMI 1640 con FBS al 10% + glutamina 2 mM con una densidad de 1×10^6 células/ml.

Preparación de linfocitos T CD4+: las células de la preparación leucocitaria se volvieron a suspender en PBS estéril pH 7,4 complementado con suero bovino fetal (FBS) al 2-6% con una densidad de 5×10^7 células/ml. Las células estaban entonces listas para el aislamiento.

Aislamiento de linfocitos T CD4+ (StemStep™):

I) Marcaje inmunomagnético:

Se añadió cóctel de anticuerpo (100 µl; Stem Cell Technologies, nº de catálogo 14062) por cada ml de células y se mezclaron bien. Después de 30 min de incubación sobre hielo, se añadieron 60 µl de coloide magnético por cada ml de células, y se mezclaron bien. Después de una incubación final de 30 min sobre hielo, las células estaban listas para la separación celular magnética.

II) Procedimiento de separación (alimentación por gravedad):

La muestra se cargó en la parte superior de una columna. Se giró la llave de paso para permitir el flujo de medio hacia abajo de la columna, y el medio se recogió en un tubo de recolección. Se añadió PBS complementado con FBS al 2-6% a la columna hasta que se habían recogido 3 volúmenes de columna (sin incluir el volumen de la muestra inicial). Las células se lavaron, se contaron y se volvieron a suspender en RPMI 1640 con FBS al 10% + L-glutamina 2 mM con una densidad de 1×10^6 células/ml.

Método de ensayo de IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-10

Los linfocitos T CD4+ se aislaron como se ha descrito antes. Las células se suspendieron en medio RPMI 1640 (Stem Cell Technologies Inc.; nº de catálogo 36750) con FBS al 10% + L-glutamina 2 mM con una densidad de 1×10^6 células/ml. Las células se mantuvieron sobre hielo cuando se prepararon los compuestos de ensayo. Los compuestos de ensayo se prepararon en una placa de ensayo de 96 pocillos estéril con 50X la concentración de ensayo final deseada; todos los pocillos contenían una cantidad igual de vehículo dimetilsulfóxido. Se añadieron linfocitos T CD4+ (500 µl) a cada pocillo de una placa de ensayo de 24 pocillos. Se añadió una sola parte alícuota (10 µl) de cada disolución de trabajo de compuesto de ensayo a los pocillos adecuados; se dejaron dos pocillos como controles estimulados y no estimulados. Se añadió concanavalina A (10 µl) (50X la concentración final) 10 µg/ml a cada pocillo con excepción de los pocillos de control no estimulados. Las células se incubaron a 37°C durante 48 horas. Después se ensayó en el medio condicionado por ELISA la cantidad de IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-10 presente.

Resultados y discusión

Las tablas 3A, 3B y 3C representan una sinopsis de los datos particulares con respecto a la potencia de los compuestos de la invención y su capacidad para inhibir citoquinas que es probable que promuevan o depriman una respuesta Th1 o Th2. En las tablas 3A, 3B y 3C, se observa el efecto de los compuestos representativos de la presente invención en la producción de IL-2, IFN- γ , e IL-10 en los linfocitos T CD4+ humanos periféricos estimulados con concanavalina A 10 µg/ml durante 48 h. Las CI_{50} son las medias de al menos tres experimentos separados realizados por triplicado. El aislamiento de los linfocitos T CD4+, las condiciones de incubación y detección por ELISA de las linfocinas se discute en la sección anterior de Métodos.

Algunos miembros de esta serie de compuestos (en particular los que inhiben tanto la PDE4 como la PDE3) producen un perfil de citoquinas de linfocitos T activados que potencialmente puede reparar el desequilibrio de células Th1 frente a Th2 observado en la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias tales como la psoriasis. La tabla 3A muestra ejemplos de un miembro de esta serie que ha demostrado una inhibición selectiva de un perfil de Th1 de las células seleccionadas CD4+ estimuladas con conA, en particular.

Aunque la potencia absoluta de los compuestos varía dependiendo del análogo usado, el efecto es claramente diferente del mostrado por rolipram (Sigma; nº de catálogo R 6520). Se ha visto que rolipram inhibe tanto la síntesis de IL-2 como de IL-10 en 48 h. En cambio, la estimulación con conA de la IL-10 no es inhibida por varios compuestos de la invención, mientras que los mismos líquidos sobrenadantes presentan niveles reducidos de IL-2. La depresión de un perfil de citoquinas Th1 necesita la potenciación de las células Th2 en el sitio de la inflamación. El beneficio añadido de inhibir la producción de IL-2, en las circunstancias correctas, puede volver reactivos los linfocitos T anérgicos (es decir, los linfocitos T que no pueden responder a sus estímulos mitógenos habituales por la TCR en el contexto del MHC II). Alternativamente, también podría producir la apoptosis de los linfocitos T autorreactivos. Por lo tanto, esta propiedad de inhibir Th1 manteniendo Th2 de los compuestos de la invención, proporcionaría el potencial de producir una mejora terapéutica en las enfermedades mediadas por Th1 tales como la artritis reumatoide, psoriasis y enfermedad inflamatoria intestinal, entre otras enfermedades.

Tabla 3A

Efectos de los compuestos de ensayo en los perfiles de Th1 en linfocitos T CD4+ humanos primarios estimulados con concanavalina A

COMPUESTO	INTERVALO de CI_{50} IL-2 (μ M)			
	0,02-0,2	0,2-2,0	2,0-20	>20
54	X			
55		X		
62		X		
ROLIPRAM			X	
ZARDAVERINA		X		

Tabla 3B

Efectos de los compuestos de ensayo en los perfiles de Th1 en linfocitos T CD4+ humanos primarios estimulados con concanavalina A

COMPUESTO	INTERVALO de CI_{50} INF-gamma (μ M)			
	0,02-0,2	0,2-2,0	2,0-20	>20
54		X		
55		X		
62		X		
ROLIPRAM		X		
ZARDAVERINA		X		

Tabla 3C

Efectos de los compuestos de ensayo en los perfiles de Th2 en linfocitos T CD4+ humanos primarios estimulados con concanavalina A

COMPUESTO	INTERVALO de CI_{50} IL-10 (μ M)			
	0,02-0,2	0,2-2,0	2,0-20	>20
54		X		
55		X		
62	X			
ROLIPRAM			X	
ZARDAVERINA		X		

Depuración de radicales de oxígeno

10 Los radicales libres y oxidantes producidos por los neutrófilos y otras células, se cree que contribuyen a la patogénesis de la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias. De acuerdo con esta participación, los compuestos capaces de inactivar los radicales libres (antioxidantes) tienen actividades antiinflamatorias en la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias.

15 Los compuestos representativos de la presente invención inhibían la formación de radicales libres en un ensayo in vitro estándar usado para medir la actividad antioxidante de los materiales biológicos. La base del ensayo (un kit de ensayo de RANDOX: Total Antioxidant status) es la capacidad de los antioxidantes en una muestra para suprimir la formación de color debida al catión radical estable, $ABTS^{*+}$. El cromógeno ABTS (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina-sulfonato] (Sigma; n° de catálogo A 1888)) (610 μ M) se incubaba con disolución de sustrato (peroxidasa (metmioglobina) (6,1 μ M) y H_2O_2 (250 μ M)) junto con un compuesto de la invención disuelto en DMSO durante exactamente 3 min a 37°C. La producción del catión radical $ABTS^{*+}$ que tiene un color verde-azul relativamente estable se midió a 600 nm. La actividad antioxidante del compuesto de ensayo 100 μ M se determinó como se ha descrito antes. El control positivo usado era un potente antioxidante biológico Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). La inhibición de la formación de color (actividad antioxidante) por los compuestos de ensayo se expresa con respecto al control positivo, Trolox® (100% de inhibición). Los resultados se muestran en la

20

25 Tabla 4. La supresión de color en este ensayo puede deberse a la inhibición de la producción, o inactivación, del radical $ABTS^{*+}$.

Tabla 4

Actividad antioxidante de los compuestos

Número de compuesto	Intervalo de actividad antioxidante (% del control)			
	1-25	25-50	50-75	75-100
54		X		
55				X

Las características antioxidantes de estos compuestos podrían contribuir a las actividades antiinflamatorias in vivo y tener eficacia terapéutica en enfermedades inflamatorias que implican radicales de oxígeno. Por lo tanto, la actividad antioxidante de los compuestos de la invención podría constituir un mecanismo adicional de la acción antiinflamatoria además de la inhibición de la cAMP fosfodiesterasa.

Inflamación aguda-edema auricular inducido por resiniferitoxina en el ratón

Una de las principales características de la inflamación es un aumento de la dilatación y permeabilidad vascular que conducen a la extravasación y recogida de fluidos en el intersticio produciendo enrojecimiento e hinchamiento. La artritis reumatoide en particular, se caracteriza por edema pronunciado de las articulaciones afectadas que produce dolor y rigidez significativos. El modelo de inflamación auricular en el ratón es un ensayo convencional in vivo para la inflamación, que se basa en un aumento del peso de la oreja que se puede atribuir al edema inducido por los mediadores inflamatorios. La RTX (resiniferitoxina; Sigma; n° de catálogo R 8756)) es un diterpeno aislado de la planta *Euphorbia poissonii* y es un análogo ultrapotente de la capsaicina. La RTX actúa estimulando selectivamente las terminaciones nerviosas nociceptivas y termosensibles en el tejido, produciendo edema neurogénico. Un compuesto representativo de la invención, cuando se administraba por vía oral, inhibía el desarrollo del edema inducido por la aplicación tópica de RTX. El edema inducido en este modelo es inhibido por inhibidores de la PDE4 y por lo tanto es un sistema in vivo útil para diferenciar la eficacia de los compuestos de ensayo que tienen potencias in vitro comparables.

Los ratones (CD1, Charles River Laboratories) se separaron en grupos (n=5-8) y se marcaron. Para la administración oral (p.o.) se administró a los animales el compuesto de ensayo 10 mg/kg en 100 µl de PEG-200, y después se indujo el edema usando RTX 0,1 µg/oreja después de un periodo de espera de 1,5 h. Después de la inducción del edema, los ratones se sacrificaron y se quitó un disco estándar de tejido de la oreja. Cada disco de tejido se pesó inmediatamente lo más cercano a 1/10 de mg. Se analizaron los datos tomando la diferencia de cada oreja izquierda respecto a la oreja derecha, calculando la media +/- ETM. La significancia estadística se contrastó por una prueba t de 2 muestras sobre las diferencias de peso de la oreja izquierda/derecha del grupo de control frente al grupo experimental.

Tabla 5

Inhibición del edema auricular de ratón inducido por resiniferitoxina por administración oral del compuesto de ensayo

Número de compuesto	% de inhibición del edema
62	30

Inhibición de nucleótido cíclico fosfodiesterasas

Inhibición de la cAMP fosfodiesterasa 4

La elevación del cAMP en las células implicadas en la inflamación tales como neutrófilos, células endoteliales, macrófagos, eosinófilos, basófilos, linfocitos T, etc., en general conduce a la regulación por disminución de un perfil de citoquina inflamatoria, tal como la inhibición de la expresión del factor de necrosis tumoral (TNF- α). La expresión de la citoquina antiinflamatoria interleuquina-10 (IL-10) es regulada positivamente por el cAMP en muchas células en el sitio de la inflamación. Puesto que la degradación del cAMP en la célula es efectuada por las cAMP fosfodiesterasas (PDE), los inhibidores específicos de estas enzimas son de interés. Estos compuestos tendrían el efecto de elevar el cAMP intracelular en las células que expresan las isoenzimas PDE que inhiben específicamente. Aunque hay al menos 9 familias diferentes de nucleótido cíclico PDE, la familia de la PDE4 tiene un interés particular. Esto se debe a que muchos de los tipos de células críticas que llevan a cabo la respuesta inflamatoria expresan predominantemente la PDE4 frente a otras PDE. Los inhibidores de la PDE4 tales como el rolipram han mostrado que elevan específicamente el cAMP en las células inflamatorias tales como neutrófilos y eosinófilos e inactivan su fenotipo inflamatorio. Un inhibidor de PDE4 terapéuticamente eficaz tiene convenientemente efectos secundarios mínimos, incluyendo la inducción de la secreción de ácido gástrico, emesis y efectos en el SNC. Los inhibidores de la PDE4 sin efectos secundarios dañinos son una gran promesa como una nueva generación de compuestos terapéuticos antiinflamatorios para enfermedades que incluyen asma, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, psoriasis y trasplante alogénico entre otros.

Los compuestos de la invención se cribaron según su actividad contra 5 de las clases principales de nucleótido cíclico fosfodiesterasas de mamífero (denominadas de PDE1 a 5). Las PDE 1 a 4 usan cAMP como sustrato

mientras que la PDE5 usa cGMP. Se usó el inhibidor de PDE de especificidad amplia 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX; Sigma; n° de catálogo 17018) como control positivo en todos los ensayos. Las PDE para los diferentes ensayos se purificaron parcialmente de las siguientes células/tejidos; PDE1 (corazón bovino), PDE2 (plaquetas humanas), PDE3 (plaquetas humanas), PDE4 (células U937 promonocíticas humanas) y PDE5 (plaquetas humanas).

Los extractos citoplasmáticos de U937 se prepararon tratando con ultrasonidos las células U937 (ATCC: n° de catálogo CRL-159) en tampón de lisis (Tris Cl 20 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, pepstatina 1 μ M, leupeptina 1 μ g/ml, benzamidina 1 mM y PMSF 0,1 mM). Los extractos de las células tratadas con ultrasonidos después se centrifugaron a 70.000 g durante 30 min y se separaron los líquidos sobrenadantes. Se añadió sacarosa hasta una concentración final de 0,25 M, se dividió en partes alícuotas y se almacenó a -80°C.

Las reacciones de PDE se llevaron a cabo durante 30 min a 37°C en volúmenes de 20 μ l de [3 H]-cAMP 1 μ M (página web de Amersham <http://www.apbiotech.com>), 5'-nucleotidasa 0,5 U/ml (Sigma), Tris Cl 50 mM, MgCl 10 mM pH 7,5. Se añadió extracto de U937 de modo que se consumió menos de 10% de sustrato. Se añadió el compuesto de ensayo o vehículo en la concentración deseada. Típicamente, los compuestos se ensayaron en 6 diluciones de 10 veces en el intervalo de 100 μ M a 1 nM. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado. Las reacciones se terminaron por la adición de 200 μ l de resina de intercambio de aniones Cl⁻ Dowex 1-8 400 en una relación de resina 1: metanol 2: H₂O 1. Las muestras se mezclaron por inversión y después se dejaron reposar durante 2-3 h. Se separó una parte alícuota de 65 μ l, se secó en una placa Lumaplate (Packard; n° de catálogo 6005165) y se hizo el recuento en un contador de centelleo Packard (TopCount™) durante 1,5 min.

La tabla 6 muestra la actividad inhibidora de los compuestos de la invención contra la PDE4 aislada de la línea celular promonocítica humana, U937. Usando las condiciones de ensayo de la PDE4 descritas aquí, los inhibidores de PDE4 típicos tales como rolipram y Ro-20-1724 (Calbiochem: n° de catálogo 557502) dieron valores de IC_{50} de acuerdo con los encontrados en la bibliografía (revisado en Schudt et al., 1996). Además, el uso de IBMX (Sigma; n° de catálogo 17018) que inhibe las PDE 1, 3 y 4 no presenta ninguna inhibición adicional (no se muestran los datos), lo que está de acuerdo otra vez con el descubrimiento de que la PDE predominante en las células U937 es la PDE4.

La inhibición de la PDE4 (o más precisamente, de isoformas específicas de la PDE4) con la posterior elevación del cAMP intracelular y activación de la proteína quinasa A es un objetivo terapéutico en las enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias, en las que las células o tejidos causales implicados predominantemente, expresan esta isoforma de PDE. Con respecto a la artritis reumatoide, el inhibidor de PDE4 rolipram se ha mostrado que es activo en modelos animales de la enfermedad tales como la artritis inducida por colágeno en la rata (Nyman et al., *Clin. Exp. Immunol.* 108(3), 415-419, 1997).

Tabla 6

Inhibición de la cAMP fosfodiesterasa 4 de células U937 humanas

Número de compuesto	Intervalo de CI_{50} (μM)	
	0,1-1	1-10
54		X
61	X	
62		X
55		X
227	X	
228	X	
229	X	
230	X	
231	X	
232		X
233		X
234	X	
235	X	
236	X	
237	X	
238	X	
239	X	
261	<0,1	
240		X
241	X	
242	X	
243	X	
244	X	
245		X
246	X	
247	X	
248	X	
249	X	
250	X	
251	X	
252	X	
253		>10
254		X
255	X	
256	<0,1	
257	<0,1	
258	X	
259	X	
260	<0,1	

Inhibición de la cAMP fosfodiesterasa 3

- 5 Se evaluó en los compuestos de la invención la actividad inhibidora contra la PDE3 de plaquetas humanas para determinar si la inhibición de la PDE4 y la inhibición de la PDE3 eran separables, y también el farmacóforo necesario para cada uno. Los inhibidores de PDE3/4 combinados pueden ser especialmente eficaces como agentes terapéuticos en enfermedades en las que los tipos de células causativas/contributivas expresan tanto PDE4 como PDE3, por ejemplo linfocitos T en enfermedades inflamatorias tales como la artritis, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis y trasplante alogénico. En dichas enfermedades, los inhibidores de PDE3/4 combinados pueden tener ventajas frente a un inhibidor selectivo de PDE4 tal como el rolipram.

- 10 Se prepararon extractos celulares de plaquetas como se ha descrito antes para las células U937. El ensayo de la PDE3 se llevó a cabo usando el extracto celular de plaquetas como se ha descrito antes para el ensayo de la PDE4. Las plaquetas contienen PDE 2, 3 y 5. Sin embargo, la PDE 2 y 5 usan con preferencia el cGMP, por lo tanto en un ensayo con cAMP como sustrato no son detectadas. Además, en las condiciones usadas en este ensayo, el rolipram no tiene efecto y el inhibidor conocido de PDE3 trequinsina (Calbiochem; nº de catálogo 382425) es un potente inhibidor que confirma que el ensayo es específico para la PDE3.

La tabla 7 muestra las CI_{50} para los compuestos de la invención para la inhibición de PDE3. Las actividades de PDE3 y PDE4 parece que son separables y los compuestos presentan un amplio intervalo de selectividad por la PDE4 frente a la PDE3. Algunos compuestos son específicos para la PDE4, algunos compuestos son más potentes

contra la PDE4 que la PDE3, y algunos compuestos son aproximadamente equipotentes contra la PDE 3 y PDE4. Por consiguientes, los compuestos de la invención se pueden seleccionar por su selectividad por PDE3/4 para permitir la potencia máxima contra diferentes tipos de células.

Tabla 7

5 Inhibición de la cAMP fosfodiesterasa 3 de plaquetas humanas

Número de compuesto	Intervalo de CI_{50} (μ M)		
	1-10	10-100	>100
54	X		
61		X	
62	X		
55	X		
227		X	
228		X	
229		X	
231		X	
255		X	
256	X		
257		X	
259		X	
260		X	

Especificidad de la isozima PDE

Se puede ensayar en los compuestos de la invención la especificidad por la isozima PDE mediante el siguiente ensayo. Los compuestos de ensayo (100 μ M) se criban según su actividad contra la PDE 1, 2 y 5, usando métodos bioquímicos estándar. Se usa el inhibidor de PDE de especificidad amplia 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) como control positivo en todos los ensayos. Las PDE para los diferentes ensayos se purificaron parcialmente de las siguientes células/tejidos; PDE1 (corazón bovino), PDE2 (plaquetas humanas) y PDE5 (plaquetas humanas).

Desplazamiento del rolipram de su sitio de unión de alta afinidad (HARBS) en la cAMP fosfodiesterasa 4

Son necesarios inhibidores de la fosfodiesterasa 4 que no tengan efectos secundarios indeseables, incluyendo náuseas y vómitos. Los modelos animales han mostrado que esta actividad está muy correlacionada con la capacidad de un compuesto de desplazar [3 H]-Rolipram de un sitio de unión de alta afinidad de células en el cerebro y el sistema nervioso central (SNC) [Duplantier 1996, Bamette 1996]. Se usa un ensayo de desplazamiento del sitio de unión de rolipram de alta afinidad (HARBS) para predecir el potencial emético de un compuesto de la presente invención. Los compuestos representativos de la presente invención presentaban una baja afinidad por el cónfórmero HARBS de la PDE4, sugiriendo que no es probable que estos compuestos sean afectados por efectos secundarios asociados al mecanismo, asociados con los inhibidores de PDE4 de primera generación tales como el rolipram.

Se sacrificaron ratones CD1 hembra por inyección intraperitoneal de 100 μ l de etanol, y los tejidos de cerebro se homogeneizaron en 5 ml de Tris-HCl enfriado con hielo, pH 8,00, complementado con $MgCl_2$ 1,2 mM, benzamidina 1 mM (Sigma; n° de catálogo B 6506) y PMSF 0,1 mM (Sigma; n° de catálogo P 7626). La suspensión se centrifugó dos veces a 30.000 x G a 4°C y el líquido sobrenadante se descartó. El sedimento se volvió a suspender en tampón, y se ajustó a una concentración de proteína de 0,5 mg/ml. Los fármacos que se iban a ensayar se disolvieron en DMSO y se añadieron con pipeta por triplicado a una microplaca de 96 pocillos en concentraciones en el intervalo de 1 a 30.000 nM. Se complementaron 10 ml de preparación de membrana con 100 μ l de [3 H]-Rolipram 0,235 μ M en DMSO, y se dispensaron 100 μ l en cada pocillo de la microplaca. La placa se incubó a 4°C durante 1 h. Los contenidos de la placa se aspiraron a través de una placa de filtro Whatman GF/C y se lavaron con 4x200 μ l de tampón helado. La placa se secó durante la noche, se añadieron a cada pocillo 30 μ l de Microscint 20 (Packard; n° de catálogo 6013621), y la placa se leyó en un contador de centelleo con un tiempo de muestreo de 2 min/pocillo. Se restaron de todos los puntos de datos los valores que representaban la unión no específica (definida por el recuento obtenido usando rolipram 20 μ M). Se llevaron a cabo las determinaciones por triplicado en cada concentración. Los resultados se muestran en la tabla 8. PDE4:HARBS indica la relación de la concentración CI_{50} necesaria para inhibir la actividad catalítica a la concentración necesaria para desplazar 50% de rolipram del sitio de unión de alta afinidad.

En estas condiciones de ensayo, rolipram es capaz de desplazar el 3 H-rolipram de un sitio de unión de alta afinidad en el cerebro de ratón con una CI_{50} de aproximadamente 10 nM (no se muestran los datos). Por lo tanto, el rolipram se une con una afinidad 20-40 veces mayor a su sitio de alta afinidad que la concentración necesaria para la mitad de la inhibición máxima de la actividad catalítica de la PDE4. Esta afinidad preferida para el HARBS frente al cónfórmero catalítico se ha correlacionado con los efectos secundarios negativos de los inhibidores de PDE4 de primera generación; en particular la emesis y efectos en el SNC.

Los datos mostrados en la tabla 8 indican que los compuestos de ensayo son mucho menos potentes en la unión a este sitio que el rolipram. Por ejemplo, el rolipram y el compuesto 243 tienen CI_{50} muy similares contra la actividad catalítica de la PDE4 (280 y 250 nM, respectivamente), sin embargo, sus actividades en HARBS son 10 nM y 210 nM, respectivamente. Por lo tanto, el compuesto 243 es aproximadamente 28 veces menos potente que el rolipram para la interacción con el confórmer de HARBS de la PDE4. La relación de CI_{50} para PDE4_{catalítico} a PDE4_{HARBS} para el rolipram y el compuesto 234 es 28 y 1,2 respectivamente. Esta relación para el compuesto 243 se compaa muy faroalmente con los valores descritos para los inhibidores de PDE4 de segunda generación donde la actividad de HARBS se ha reducido por los esfuerzos en la SAR. Por ejemplo, las relaciones descritas para SB 207499 (Ariflo) y RP 73401 (piclamilast), dos inhibidores de PDE4 específicos que se han ensayado en ensayos en fase II para el asma, son 1 y 3 respectivamente. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención pueden presentar efectos emetogénicos in vivo que son mucho menores que en el rolipram, Ro 20-1724 u otros inhibidores de PDE4 de primera generación.

Tabla 8

Afinidad de los compuestos de ensayo por el sitio de unión del rolipram de alta afinidad de la PDE4 en cerebro de ratón

Número de compuesto	50% de desplazamiento de rolipram (μ M)				PDE4:HARBS (relación)
	0,01-0,1	0,1-1	1-10	>10	
54			X		>1
61			X		<1
62		X			>1
55		X			>1
227		X			<1
228		X			<1
229		X			<1
230		X			>1
231		X			<1
234		X			>1
235		X			>1
236		X			>1
261		X			<1
246		X			>1
247		X			>1
248		X			<1
249		X			<1
250			X		<1
251			X		<1
252			X		<1
253				X	>1
254				X	<1
255		X			<1
256	X				>1
257		X			<1
258		X			>1
259		X			<1
260		X			<1

Potenciación de la actividad de luciferasa-elemento de respuesta a cAMP inducida por forskolin en células monocíticas humanas U937

Con el fin de demostrar la capacidad de los compuestos de la presente invención para elevar el cAMP en células intactas, se usó la transfección de células con una construcción de plásmido que contenía un elemento de respuesta al cAMP (CRE) en un promotor que dirige la expresión de un gen indicador de la luciferasa (Stratagene; Path Detect™: n° de catálogo 219076) para permitir el seguimiento de la sensibilidad de los niveles de cAMP intracelular por la detección de la producción de luz en un luminómetro. El tratamiento farmacológico de las células transfectadas con un compuesto que proporciona una combinación de inhibidor de PDE y agonista de adenilil ciclase (receptor o activador intracelular) produce niveles elevados de cAMP intracelular detectables por el aumento de la producción de luz. Se ha mostrado que la cAMP PDE4 es la actividad predominante de nucleótido cíclico fosfodiesterasa en células U937, y por lo tanto este tipo de célula transfectada con la construcción de CRE-luciferasa puede servir como un ensayo de cribado celular conveniente para los compuestos con actividad inhibidora de PDE4. Por lo tanto, se mostró que los compuestos de la presente invención proporcionaban la expresión de luciferasa potenciada en las células U937 tratadas con el activador de adenilil ciclase forskolin.

Las células U937 promonocíticas humanas se mantuvieron en medio RPMI que contenía FCS al 10% y glutamato 2

mM. Las células U937 se transfectaron de forma transitoria como se describe en *Biotechniques* Vol. 17(6):1058, 1994. Brevemente, las células se cultivaron en medio que contenía suero hasta una densidad de 5×10^6 células/ml y después se volvieron a suspender en medio que contenía suero hasta una densidad de 1×10^7 células/ml. Se transfirieron 400 μ l de células a una cubeta de electroporación que contenía 10 μ g del vector indicador (pCRE-luc) en un volumen de 40 μ l de H₂O. El vector de ADN indicador se preparó a partir de *E. Coli* DH5 α usando el kit de ADN endonucleasa (Qiagen) según las instrucciones de los fabricantes. Las células U937 se electroporaron a temperatura ambiente usando un electroporador BIORAD. La capacitancia se fijó en 150 μ F y la tensión era 280 V. Se anotó la constante de tiempo después de cada electroporación. Después, las células se diluyeron en 4 ml de medio y suero y se cultivaron 200 μ l de células por pocillo. Se dejó que las células se recuperaran durante 16-18 horas. Después las células se trataron con un compuesto de ensayo o vehículo en presencia o ausencia de forskolin 10 μ M durante 4 h a 37°C.

El ensayo de luciferasa se llevó a cabo según las instrucciones de los fabricantes (Tropix). Brevemente, las células se centrifugaron durante 4 min a 1200 rpm y se separó el medio sobrenadante. Los sedimentos celulares se lisaron en 15 μ l de tampón de lisis (Tropix). El ensayo de luciferasa se llevó a cabo usando 10 μ l de lisato celular con 10 μ l de tampón A y 25 μ l de tampón B. La actividad de la luciferasa se obtuvo usando un luminómetro con un retraso de 5 segundos seguido por un tiempo de lectura de 10 s.

Como se muestra en la tabla 9, los compuestos representativos de la invención potencian la inducción de la actividad de la luciferasa en células U937 tratadas con forskolin 10 μ M. Ninguno de los compuestos de ensayo por sí mismo inducía actividad de luciferasa significativa indicando una actividad de adenilil ciclasa basal baja en estas células. Este resultado demuestra que estos compuestos son capaces de elevar los niveles de cAMP en una línea celular que expresa predominantemente PDE4, de acuerdo con las observaciones en los ensayos enzimáticos.

Hay una amplia correlación entre la actividad inhibidora de PDE4 in vitro y la potencia de inducción de CRE-luciferasa.

El ensayo de la CRE-luciferasa o variantes del mismo (diferentes tipos de células o características de la construcción) sirven como ensayo de respaldo/validación de la SAR celular conveniente para los ensayos enzimáticos de PDE4 in vitro, para la optimización de la eficacia para los compuestos de la presente invención.

Tabla 9

Potenciación de la actividad de CRE-luciferasa por compuestos de ensayo en células U937 coincubadas con el activador de adenilil ciclasa forskolin

Número de compuesto	Intervalo de CE ₅₀ (μ M)		
	0,1-1	1-25	>25
54		X	
61		X	
62		X	
55		X	
227	X		
228		X	
229		X	
231	X		
255		X	
256		X	
257	X		
259		X	
260		X	

Efectos de los compuestos de la invención en el crecimiento de células transformadas - potenciales actividades anticancerosas

Introducción

La línea celular derivada de leucemia mielógena humana transformada por BCR-ABL, K562 (ATCC; n° de catálogo CRL 243) se puede usar para determinar cómo afectan los compuestos de la presente invención al crecimiento de células transformadas. La elevación del cAMP intracelular es una forma de producir una detención del ciclo celular o apoptosis en una serie de tumores malignos, en particular en algunas clases de leucemias (p. ej., CLL). Se ha descrito que dichos mecanismos intracelulares (es decir, cAMP) llevan a cabo la diferenciación de los clones leucémicos indiferenciados. En particular, se ha mostrado que la elevación de cAMP intracelular (usando un análogo del AMP cíclico) en células de leucemia mielógena transformadas por BCR-ABL p210, es antiproliferativa por la inhibición de la ciclina dependiente de quinasa 4 y posterior regulación por disminución de *c-myc*. Por lo tanto, la capacidad antiproliferativa de los compuestos de la presente invención en células K562 cultivadas, se puede comparar con varios inhibidores de fosfodiesterasa convencionales usando un ensayo de absorción de ³H-timidina.

Métodos

Se siembran células K562 (células de leucemia mielógena crónica humana) (90 μ l) en placas de ensayo de 96 pocillos estériles con una densidad de 1×10^5 células/ml en RPMI 1640 complementado con FBS al 10%/ L-glutamina 2 mM. Las muestras que se van a ensayar se preparan en una placa de ensayo de 96 pocillos estéril con 10X la concentración final deseada. Todas las diluciones de muestra contienen cantidades iguales de DMSO para compensar el % de DMSO en la muestra de mayor concentración usada. Se examinan con 9 concentraciones de compuesto de ensayo los efectos en el crecimiento hasta una concentración máxima de 100 μ M. Se añaden 10 μ l de las muestras y los controles (DMSO/control de crecimiento normal) a las células en partes alícuotas. Las células se incuban a 37°C/5% de CO₂ durante 48 h. Después de la incubación de 48 h, se añaden 20 μ l de ³H-timidina a cada pocillo para una concentración final de 1 μ Ci/ml. Después las células se incuban a 37°C/5% de CO₂ durante 4 a 6 h. Después de un pulso de timidina de 4-6 h, las placas se envuelven en plástico y se congelan a -20°C en un refrigerador sin escarcha durante la noche. Las células se recogen y se determinan los recuentos de ³H-timidina. Con el fin de distinguir entre la citotoxicidad y la actividad citostática, se preparan curvas de crecimiento en las que se representa gráficamente el valor medio de CPM de la densidad de siembra de las células en la misma curva que el valor medio de la proliferación máxima alcanzada después de 48 h (células de control de crecimiento con DMSO). Las células se diluyen 1:2 para un intervalo de concentración de $7,8 \times 10^3$ células/ml a 2×10^6 células/ml. Se siembran 90 μ l de cada dilución celular en placa de ensayo de 96 pocillos estéril y se deja equilibrar durante aproximadamente 4 h a 37°C/5% de CO₂ antes del pulso de ³H-timidina. Las células K562 se siembran en placas de 96 pocillos con 1×10^5 células/ml en RPMI 1640 complementado con FBS al 10%/ L-glutamina 2 mM. Se añaden diferentes concentraciones de compuesto de ensayo o vehículo (DMSO) y las células se incuban a 37°C/5% de CO₂ durante 48 horas. Después las células se pulsan a 37°C/5% de CO₂ durante 4-6 horas con ³H-timidina 1 μ Ci/ml. Se determina la radiactividad incorporada en el ADN después de recolección sobre filtros de fibra de vidrio y recuento de centelleo.

Eficacia en modelos animales específicos de enfermedad inflamatoria y autoinmunidad

Se llevaron a cabo estudios para probar el concepto en modelos de enfermedad específicos en animales, para demostrar mejor la actividad enzimática, celular y antiinflamatoria general de los compuestos de lactona y lactama de la presente invención. Los estudios de la bibliografía han mostrado que la elevación del cAMP intracelular por la administración de inhibidores de fosfodiesterasa, activadores de adenilil ciclasa, o ambos, puede reducir la enfermedad establecida y/o prevenir el desarrollo de enfermedades en diferentes modelos animales de enfermedad inflamatoria. La eficacia de los compuestos de la invención se puede demostrar en modelos animales de la enfermedad de Crohn, artritis reumatoide y rechazo de trasplante. Con respecto a la enfermedad de Crohn, se puede usar un modelo preclínico establecido; el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) induce colitis en la rata. Para la artritis reumatoide se puede usar la artritis inducida por colágeno (CIA) en el ratón. Para imitar el rechazo de trasplante humano, se puede usar un modelo de trasplante de aloinjerto de piel de la cola murina.

Enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn)

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un término general para enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal actualmente incurables, crónicas y que fluctúan, que incluyen la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa. Los síntomas de estos trastornos incluyen dolor abdominal (normalmente en la parte inferior derecha del abdomen) y diarrea con hemorragia rectal, pérdida de peso y fiebre cuando la afección avanza. La etiología de la EII es desconocida, sin embargo, los estudios epidemiológicos sugieren una asociación entre la enfermedad y la infección vírica (en particular el sarampión) en el útero o temprano en la vida. La Crohn's and Colitis Foundation of America (CCFA) calcula que 1-2 millones de personas en los Estados Unidos padecen enfermedad de Crohn y EII relacionadas con mayor riesgo para los de ascendencia europea. Las tasas de incidencia han aumentado significativamente en 60 años desde que se describió por primera vez (Crohn). En Estados Unidos solo, los costes económicos de estas enfermedades se calcula que son 1,8-2,6 mil millones de dólares al año.

Un tratamiento común para la EII consiste en la administración oral o intracolónica de ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), un derivado de AINE que es escindido a ASA (el fármaco activo) en el tracto g.i. inferior. Otros tratamientos fundamentales de la EII incluyen corticoesteroides e inmunosupresores (p. ej., 6-mercaptopurina o azotiopirina) o combinaciones de los mismos. Recientemente, se ha aprobado una terapia anti-TNF- α para el tratamiento de la enfermedad de Crohn grave que es resistente a terapias convencionales. Este enfoque terapéutico valida la importancia del factor de necrosis tumoral en la EII. Incluso con los enfoques anti-TNF- α sigue habiendo mucho espacio para la mejora de las modalidades de tratamiento actuales tanto desde el punto de vista de los efectos secundarios como de la eficacia.

Los compuestos de la presente invención se pueden ensayar en el modelo de colitis inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) en la rata (Morris et al., *Gastroenterology* 96:795-803, 1989; Kim, H.-S. y Berstad, A., *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 27:529-537, 1992; Ward, *Lancet ii*: 903-905, 1977; y Shorter et al., *Am. J. Dig. Dis.* 17:1024-1032, 1972)). Las ventajas de este modelo de EII particular incluyen (a) el desarrollo de la enfermedad en la rata es inmunomediado con linfocitos T Th1 que tienen una función importante, como se cree que es el caso en la enfermedad humana, (b) una única instilación de TNBS induce la enfermedad de gravedad y persistencia constantes, (c) el modelo es barato, (d) larga duración de la inflamación (hasta 8 semanas), (e) una

variante del modelo en el que la colitis es reactivada, imita la naturaleza de recidiva/remisión de la enfermedad humana, (f) las lesiones son histopatológicamente similares a las de los seres humanos, (g) la patología clínica imita las enfermedades humanas tales como necrosis, formación de úlceras, infiltración granulocítica, edema del intestino, diarrea y adherencias, y (h) muchos fármacos usados para tratar la EI humana son activos en el modelo de TNBS. El modelo de rata de TNBS de la inflamación gastrointestinal es un modelo preclínico aceptado para la EI humana. Las manifestaciones clínicas e histopatológicas de la enfermedad muestran una buena similitud con la enfermedad humana y muchos fármacos usados actualmente para el tratamiento de la EI en seres humanos tienen eficacia en este modelo. La eficacia de un compuesto de la invención en este modelo implicaría que el compuesto se puede usar en terapia de la enfermedad inflamatoria humana, incluyendo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa entre otras.

Artritis reumatoide

Introducción y fundamento

El modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) en ratones es un modelo adecuado para evaluar potenciales fármacos activos en la artritis reumatoide humana (Trentham, D.E., *Arthritis Rheum.* 25:911-916, 1982; Brahn, E., *Clin. Orthop.* 265:42-53, 1991; Holmdahl, R. et al., *Arthritis Rheum.* 29:106, 1986). Comparte muchos de los cambios moleculares, celulares e histopatológicos identificados como distintivos de la enfermedad humana; estos incluyen (a) proliferación pronunciada de las células que comprenden la membrana sinovial de la articulación, (b) formación de un tejido de tipo paño invasivo, (c) infiltración de macrófagos, granulocitos y linfocitos, y (d) destrucción de hueso y cartílago. Como en la artritis reumatoide, los animales con CIA presentan niveles elevados en el suero de complejos de inmunoglobulina tales como el factor reumatoide (RF) y anticuerpos anti-colágeno y citoquinas inflamatorias en la membrana sinovial tales como el factor de necrosis tumoral (TNF- α). Además, se ha demostrado la implicación de la expansión clonal/activación de linfocitos T cooperadores restringidos por el MHC de clase II en la membrana sinovial. Las radiografías de las articulaciones afectadas con frecuencia muestran cambios erosivos similares a los observados en la AR humana y la artritis progresiva con frecuencia da como resultado la deformidad y disfunción de la articulación de tipo AR. Además, muchos compuestos que reducen los síntomas de la enfermedad humana, tales como compuestos biológicos anti-TNF, corticoesteroides y FARME son eficaces en este modelo animal. El desarrollo/avance de la enfermedad en el modelo de CIA se produce tanto en la fase inmunitaria (temprano) como en la inflamatoria, permitiendo así la evaluación de una amplia variedad de fármacos con diferentes modos de acción farmacológicos.

Rechazo de trasplante

Ensayo in vitro: activación, diferenciación y función de linfocitos T CD4+

Métodos

Se usan ratones transgénicos AND-TCR (Kaye J. et al., *Nature* 341:746-749, 1989) para proporcionar una fuente de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno indiferenciados. El receptor de antígeno del linfocito T-AND reconoce un péptido derivado de citocromo C de paloma (pcc) en el contexto de la molécula de MHC de clase II I-E^k.

Para examinar la función de un compuesto de ensayo en la activación y proliferación de linfocitos T CD4+ indiferenciados, se cultivan 1×10^5 linfocitos T de ganglios linfáticos-AND con 1×10^6 células de bazo B10.BR irradiadas, en presencia de diferentes concentraciones del péptido pcc (0-10 μ M) en placas de 96 pocillos. La proliferación se evalúa por la incorporación de ³H-timidina. Todas las condiciones de ensayo se llevan a cabo por triplicado. El fenotipo de activación de superficie celular de linfocitos T se evalúa por análisis de citometría de flujo.

La diferenciación de linfocitos T CD4+ indiferenciados hacia linajes de Th1 y Th2 se lleva a cabo como sigue: se cultivan 1×10^5 linfocitos T de ganglios linfáticos-AND con 10^7 células de bazo B10.BR irradiadas en 2 ml de medio de cultivo con los siguientes complementos: para la diferenciación de células Th1, IFN- γ 100 U/ml, IL-2 25 U/ml y anti-IL-4 10 μ g/ml; para la diferenciación de células Th2, IL-4 150 U/ml, IL-2 25 U/ml y anti-IFN- α 10 μ g/ml. Después de 3-4 días, los pocillos se dividen en 1:4 con las mismas adiciones. Después de 7 días las células se recogen y se lavan 3 veces para separar las citoquinas en los líquidos sobrenadantes. Las células cultivadas (1×10^5) se vuelven a estimular con 5×10^5 células de bazo B10BR irradiadas en presencia del péptido pcc 5 μ M en 250 μ l de medio de cultivo sin ninguna citoquina añadida. Los líquidos sobrenadantes se recogen después de 40 h y se evalúan la IL-2, IL-4 e IFN- γ por ELISA. Los compuestos de ensayo se añaden durante la diferenciación del cultivo.

Se ensaya en las células Th1 y Th2 cultivadas generadas en ausencia de los compuestos de ensayo, la proliferación y actividad de citoquinas como se ha descrito antes durante la estimulación con antígeno en presencia de compuesto.

Ensayo in vitro: activación, diferenciación y función de linfocitos T CD8+

Métodos

Se usan ratones transgénicos 2C-TCR (Sha W. C. et al., *Nature* 335:271-274, 1988) para proporcionar una fuente de

linfocitos T CD8⁺ específicos de antígeno indiferenciados. El receptor de antígeno del linfocito T-2C reconoce el péptido 2C derivado de la enzima alfa-cetoglutarato deshidrogenasa mitocondrial en el contexto de la molécula de MHC de clase I Db.

5 Para ensayar la eficacia de un compuesto de ensayo en la activación y proliferación de linfocitos T CD8⁺ indiferenciados, se aíslan suspensiones individuales celulares de linfocitos T de ganglios linfáticos (LN) 2C de ratones transgénicos 2C-TCR. Los linfocitos T-2C se estimulan con esplenocitos TAP^{-/-} H-2^d irradiados o la línea celular T2 TAP^{-/-} transfectada con L^d en presencia de diferentes concentraciones del péptido 2C (0-10 μ M). La proliferación se evalúa por la incorporación de ³H-timidina. El fenotipo de activación de superficie celular de linfocitos T se lleva a cabo por análisis de citometría de flujo.

10 Los linfocitos T citotóxicos se generan por activación de linfocitos T-2C con esplenocitos H-2^d irradiados. Las células se cultivan durante 7-10 días en presencia de IL-2 25 U/ml. La actividad citolítica citotóxica de las células de cultivo se ensaya con un ensayo de liberación de Cr⁵¹ usando células diana T2-L^d en presencia de diferentes concentraciones del péptido 2C. El efecto de los compuestos de ensayo en la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ indiferenciados en linfocitos citotóxicos se evalúa por adición de los compuestos de ensayo durante la activación primaria y el periodo de cultivo. El efecto de los compuestos de ensayo en la activación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y función efectora se mide usando el ensayo de liberación de Cr⁵¹ y el ensayo de incorporación de ³H-timidina en presencia de las concentraciones establecidas de compuesto.

Ensayo in vivo: modelo de trasplante de aloinjerto de piel de cola murina

El compuesto 54 se evaluó en el siguiente modelo de trasplante in vivo.

20 Métodos

Se trasplantó la piel de la cola de ratones C57BL/6 H-2^b donantes a ratones BALB/c H-2^d hembra receptoras (Lagodzinski, Z. et al., *Immunology* 7,7:148-150 (1990)). Se incluyeron 5 ratones por grupo. Se incluyeron en el estudio 7 grupos de ratones que consistían en 4 grupos de ensayo tratados con compuesto de ensayo y 3 grupos de control que incluían grupos sin tratamiento, tratado solo con vehículo y con ciclosporina A (CsA; Sigma; n° de catálogo C 3662). El compuesto de ensayo y la CsA se administraron dos veces al día por vía intraperitoneal con una dosis de 10 mg/kg empezando un día antes del trasplante y durante 15 días después del trasplante, incluyendo el día del trasplante. Se hizo el seguimiento de los ratones y se puntuaron diariamente a lo largo de 15 días después del trasplante, según el rechazo de injerto.

Resultados y discusión

30 El rechazo de aloinjerto de piel es mediado principalmente por linfocitos T con pocas pruebas de que los anticuerpos tengan una función principal en la mayoría de las circunstancias. El rechazo de aloinjerto de piel requiere la activación de poblaciones de linfocitos T cooperadores y efectores citotóxicos. El rechazo de injerto se evaluó mediante el seguimiento de la necrosis del aloinjerto. Debido a que la piel de la cola es visiblemente distinta de la piel de alrededor del tronco del ratón, se puede seguir fácilmente la evolución del rechazo. Los injertos totalmente intactos se puntuaron como 100%. El rechazo completo del injerto se definió como necrosis del injerto >90%. El rechazo de injerto agudo generalmente procede por una serie de eventos visualmente obvios que empiezan con el hinchamiento y eritema del injerto. A estos eventos les sigue la desecación del injerto y formación de costra sobre la mayor parte o todo el injerto, señalando la pérdida de tejido de injerto viable. A la formación de costra le sigue posteriormente la contracción y formación de cicatriz.

40 Un compuesto representativo de la invención, el compuesto 54, demostró una potenciación significativa de la supervivencia del injerto comparado con el grupo de control (solo vehículo; β -ciclodextrina; Sigma; n° de catálogo C 4767) (Tabla 10).

Tabla 10

Efecto de los compuestos en el rechazo de injerto en un modelo de trasplante de aloinjerto de piel de cola murina

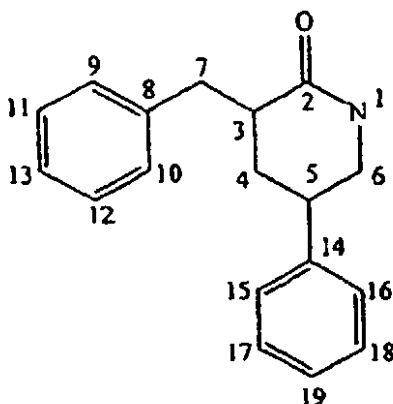
Compuesto	Supervivencia media del injerto (días)	Tasa de supervivencia del aloinjerto (% 9 días después del trasplante)	n° de injertos que sobreviven más de 16 días p.t.
Sin tratar	8 $\pm$ 1	0	0
Vehículo	8,5 $\pm$ 1	0	0
Rolipram	11,5 $\pm$ 3,7	50	1
Ciclosporina	13,5 $\pm$ 3,3	75	2
54	11,5 $\pm$ 3,3	75	0

45 La media del grupo de control fueron 8,5 días de supervivencia de los aloinjertos de piel, mientras que en los grupos tratados con el compuesto **54** fueron 11,5 días de supervivencia. Por comparación con la ciclosporina A, los

compuestos de la invención, de los cuales el **54** es representativo, también se pueden usar en todas las indicaciones en las que se usa la ciclosporina A. Las actividades diferenciales de estos compuestos así como su selectividad en las citoquinas inhibidas defienden un mecanismo que no dará como resultado inmunosupresión sino inmunomodulación. La capacidad del compuesto **54** para suprimir el rechazo de injerto en este modelo implica que pueden tener utilidad terapéutica en enfermedades tales como la esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, psoriasis, trasplante de órganos y todos los trastornos autoinmunitarios. Por ejemplo, muchos fármacos para el tratamiento de la psoriasis se usan en el trasplante de órganos o han demostrado eficacia en este marco. Por lo tanto, la eficacia de los fármacos inmunomoduladores o inmunosupresores en el trasplante de órganos parece que predice la eficacia en la psoriasis, siendo un buen presagio para esta serie de compuestos como productos terapéuticos para la psoriasis.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula:



en la que:

el nitrógeno en la posición 1 está sustituido con hidrógeno;

5 las posiciones 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11 y 18 están sustituidas con hidrógeno;

las posiciones 17 y 19 están sustituidas con OR^8 donde R^8 es un grupo hidrocarbilo C_{1-10} ;

cada uno de los carbonos en las posiciones 5, 13, 15 y 16 está independientemente sustituido en cada caso con H, -W o $-R^7(W)_n$, en los que:

W se selecciona de $-NH_2$, $-CN$, $-X$, $-OH$, $-NO_2$, $-SH$, $-NHR^8$, $-NR^8R^8$, $-OR^8$ y $-SR^8$;

10 cada R^7 es independientemente un grupo hidrocarbilo, halogenocarbilo o hidrohalogenocarbilo C_1-C_{30} , en el que n de los átomos de hidrógeno o halógeno de R^7 se sustituyen por un número igual de grupos W independientemente seleccionados en cada posición;

cada R^8 es independientemente un grupo hidrocarbilo, halogenocarbilo o hidrohalogenocarbilo C_1-C_{30} ;

n se selecciona de 0, 1, 2, 3, 4 y 5; y

15 X se selecciona de $-Br$, $-Cl$, $-F$ y $-I$;

en la que la posición 12 está sustituida con hidrocarbilo C_{1-6} ,

o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable, como un solo estereoisómero o una mezcla de los mismos.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que

20 exactamente dos de los carbonos en las posiciones 11, 12 y 13 están sustituidos con hidrógeno;

W es $-OR^8$;

R^7 es un grupo hidrocarbilo C_1-C_{10} en el que n de los átomos de hidrógeno o halógeno de R^7 están sustituidos por un número igual de grupos W independientemente seleccionados en cada posición;

25 R^7 se selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, alquilarilo, arilo sustituido con alquenilo, alquenilo sustituido con arilo, arilo sustituido con alquinilo, alquinilo sustituido con arilo, biarilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, bicicloalquilo, bicicloalquenilo, alquilcicloalquilo, alquenilcicloalquilo, alquinilcicloalquilo, cicloalquilo sustituido con arilo, arilo sustituido con cicloalquilo, cicloalquenilo sustituido con arilo, arilo sustituido con cicloalquenilo, cicloalquilo y policicloalquilo condensado con arilo;

R^8 es un grupo hidrocarbilo C_1-C_{10} ;

30 R^8 es un grupo ciclohidrocarbilo C_1-C_{10} ;

R^8 se selecciona de alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, alquilarilo, arilo sustituido con alquenilo, alquenilo sustituido con arilo, arilo sustituido con alquinilo, alquinilo sustituido con arilo, biarilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, bicicloalquilo, bicicloalquenilo, alquilcicloalquilo, alquenilcicloalquilo, alquinilcicloalquilo, cicloalquilo sustituido con

arilo, arilo sustituido con cicloalquilo, cicloalquenilo sustituido con arilo, arilo sustituido con cicloalquenilo, cicloalquilo y policicloalquilo condensado con arilo;

n es 0;

el compuesto tiene la configuración S en el carbono 3; o

5 el compuesto tiene la configuración R en el carbono 3;

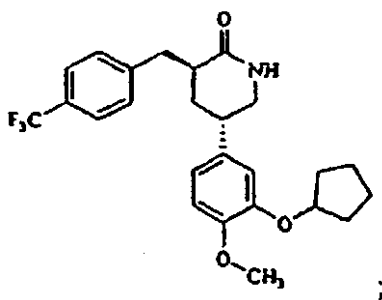
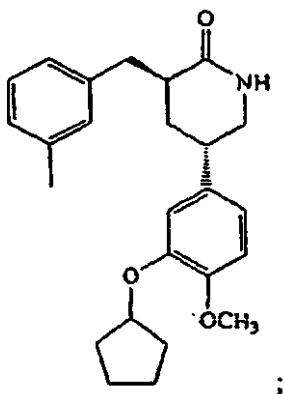
el compuesto tiene la configuración S en el carbono 5; o

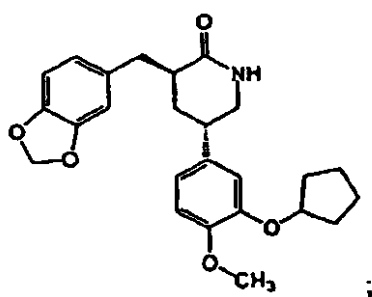
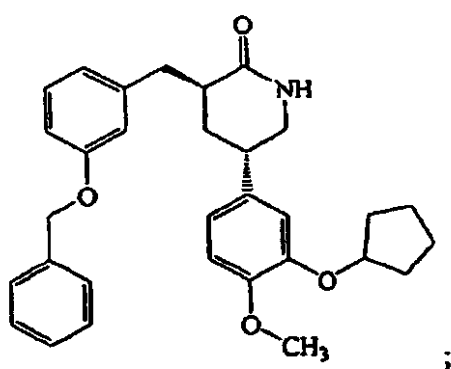
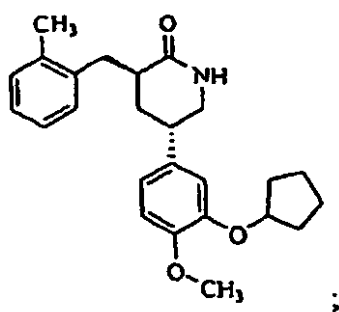
el compuesto tiene la configuración R en el carbono 5;

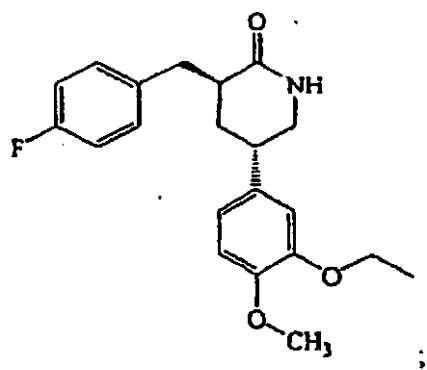
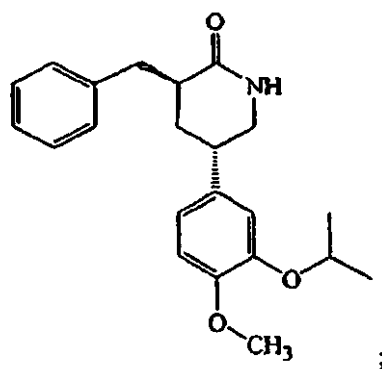
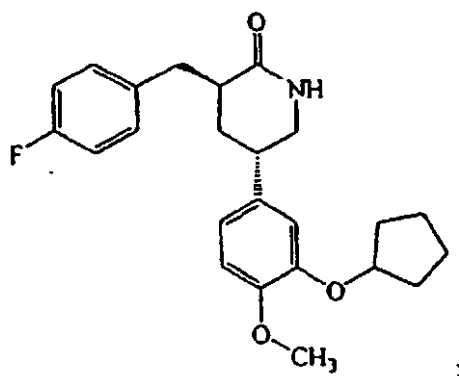
10 las posiciones 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 16 y 18 están sustituidas con hidrógeno, y la posición 12 está sustituida con hidrocarbilo C_1 ; la posición 17 está sustituida con -O-ciclopentilo, y la posición 19 está sustituida con -O-metilo, donde opcionalmente las posiciones 3 y 5 tienen ambas la estereoquímica S.

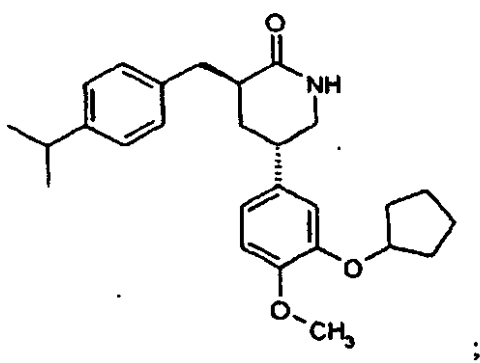
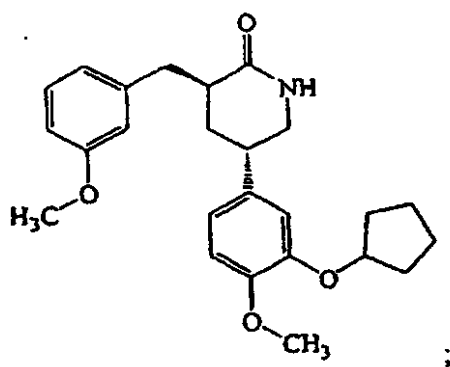
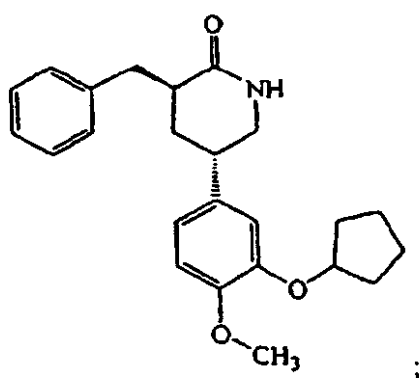
3. La sal o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto de la reivindicación 1.

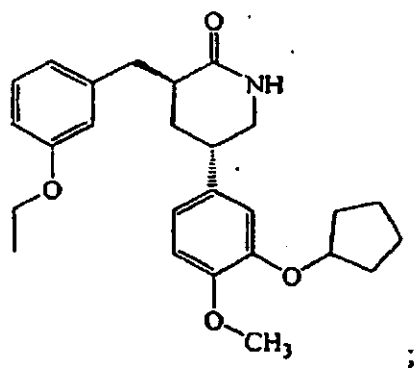
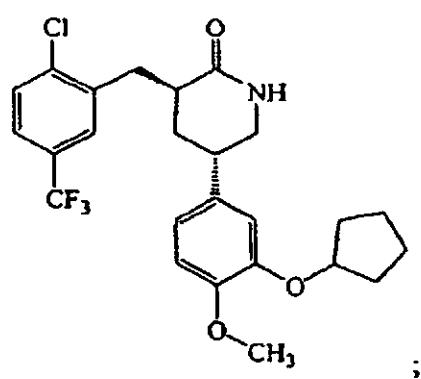
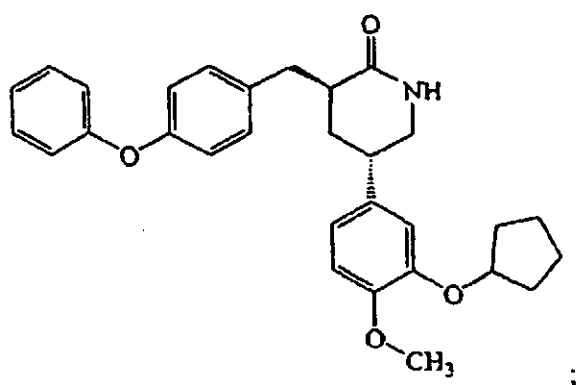
4. El compuesto:

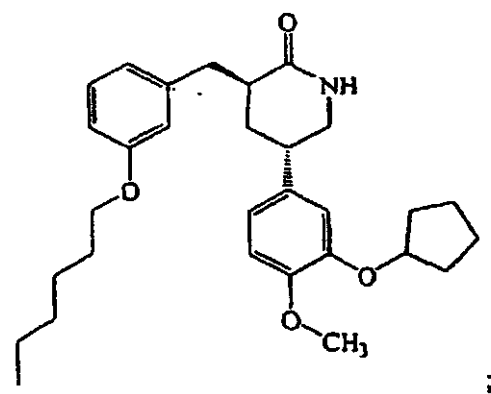
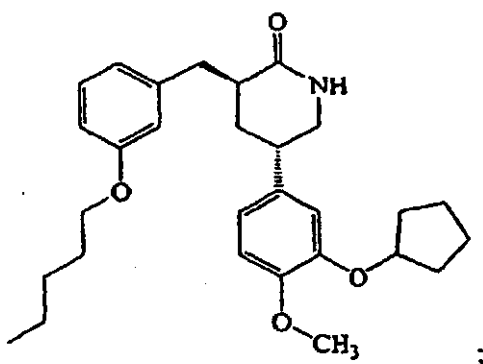
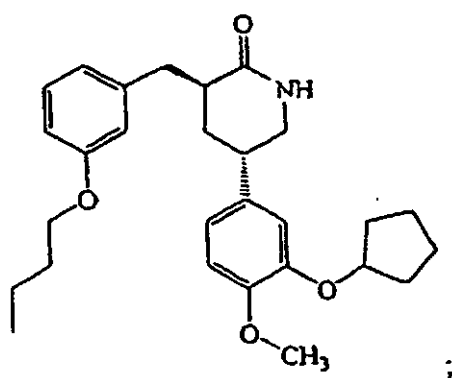


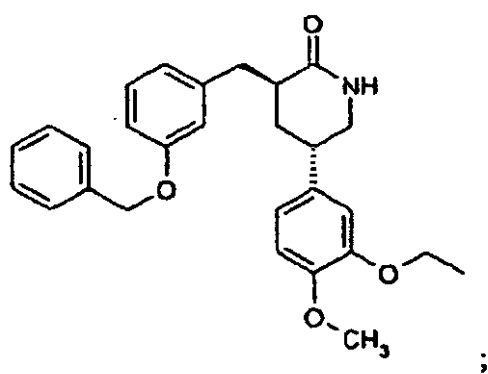
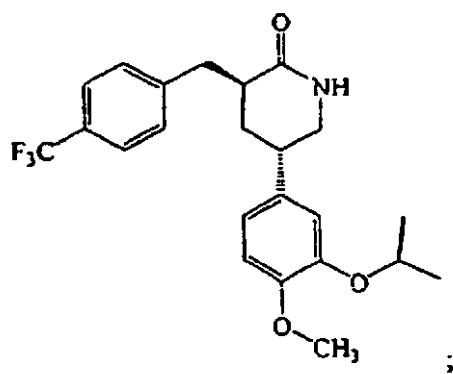
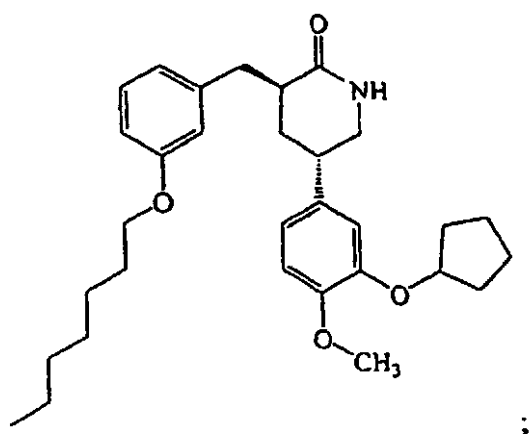


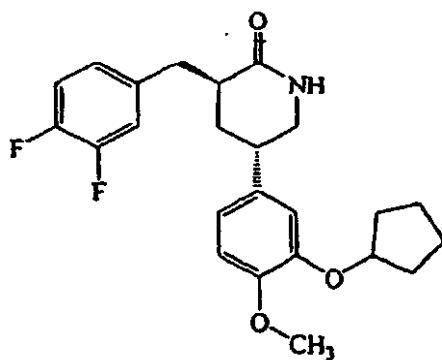
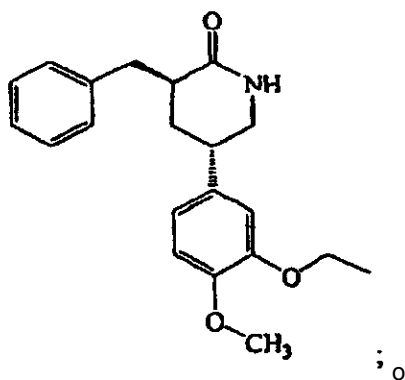
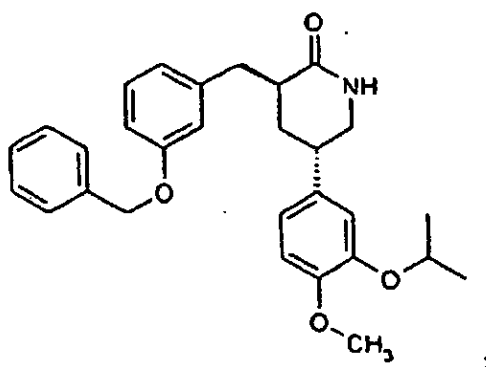






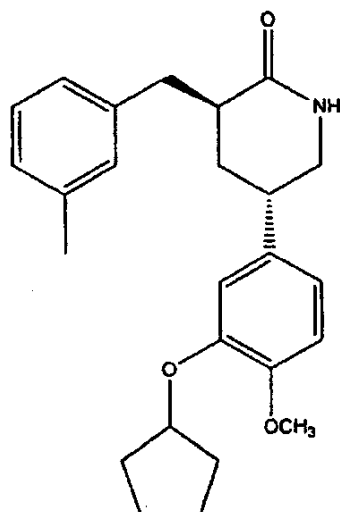






5 o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable.

5. El compuesto de la reivindicación 4, en el que el compuesto es



o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable.

6. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 5 7. Un uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable, en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una afección o enfermedad inflamatoria en un paciente.
8. Un uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable, en la preparación de un medicamento para modular los niveles de 5'-monofosfato de adenosina cíclica intracelular en un paciente.
- 10 9. Un uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable, en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad o afección en un paciente, en el que la enfermedad o afección está asociada con afecciones patológicas que son moduladas por inhibición de enzimas asociadas con mensajeros celulares secundarios.
- 15 10. Un uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable, en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir el rechazo de trasplante en un paciente.
11. Un uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable, en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir la proliferación celular no controlada en un paciente.
- 20 12. Un uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable, en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir afecciones asociadas con el sistema nervioso central (SNC) en un paciente.
- 25 13. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptable, para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección según la reivindicación 7, 9 ó 12, para modular los niveles de 5'-monofosfato cíclico de adenosina intracelular en un paciente según la reivindicación 8, para tratar o prevenir el rechazo de trasplante según la reivindicación 10, o para tratar o prevenir la proliferación celular no controlada según la reivindicación 11.