

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 243**

51 Int. Cl.:

A61K 31/45 (2006.01)

C07D 211/76 (2006.01)

C07D 223/12 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2008** **E 08776116 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014** **EP 2185151**

54 Título: **Composición antiinflamatoria**

30 Prioridad:

02.08.2007 GB 0715068

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

21.07.2014

73 Titular/es:

**CAMBRIDGE ENTERPRISE LTD. (100.0%)
THE OLD SCHOOLS TRINITY LANE
CAMBRIDGE, CAMBRIDGESHIRE CB2 1, GB**

72 Inventor/es:

**GRAINGER, DAVID, JOHN y
FOX, DAVID**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 478 243 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

Composición antiinflamatoria

[0001] La presente invención se refiere a 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetrahidropiridin-2-ona, y sus composiciones farmacéuticas y su uso para preparar un medicamento destinado a prevenir o tratar trastornos inflamatorios.

[0002] La inflamación es un componente importante de la defensa fisiológica del huésped. Cada vez más, sin embargo, está claro que las respuestas inflamatorias temporal o espacialmente inapropiadas juegan un papel en una amplia gama de enfermedades, incluyendo aquellas con un componente obvio de leucocitos (tales como, enfermedades autoinmunes, asma o aterosclerosis), pero también en enfermedades que no han sido considerado tradicionalmente por implicar leucocitos (tal como, la osteoporosis o la enfermedad de Alzheimer).

[0003] Las quimiocinas son una gran familia de moléculas de señalización con homología con la interleucina-8, que se han implicado en la regulación del tráfico de leucocitos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Con más de cincuenta ligandos y veinte receptores implicados en la señalización de quimiocinas, el sistema presenta la densidad de información necesaria para dirigir los leucocitos a través de los complejos procesos de regulación inmune de la médula ósea, a la periferia, y a continuación de vuelta a través de los órganos linfoides secundarios. Sin embargo, esta complejidad del sistema de quimiocinas en primer lugar ha obstaculizado las estrategias farmacológicas para la modulación de las respuestas inflamatorias a través del bloqueo de receptores de quimiocinas. Se ha demostrado que es difícil determinar qué receptor o receptores de quimiocinas deben inhibirse para producir un beneficio terapéutico en una enfermedad inflamatoria determinada.

[0004] Más recientemente, se ha descrito una familia de agentes que bloquean la señalización por una amplia gama de quimiocinas de manera simultánea: Reckless y otros, *Biochem J.* (1999) 340:803-811. El primero de dichos agentes, un péptido denominado "péptido 3", se encontró que inhibe la migración de leucocitos inducida por 5 quimiocinas diferentes, mientras que deja la migración en respuesta a otros factores quimiotácticos (tales como, fMLP o TGF-beta) inalterada. Este péptido, y sus análogos, tales como NR58-3.14.3 (es decir SEQ ID No.1 c(DCys-DGln-Dlle-DTrp-DLys-DGln-DLys-DPro-DAsp-DLeu-DCys)-NH₂), se denominan colectivamente "inhibidores de quimiocinas de amplio espectro" (BSCI). Grainger et al., *Biochem. Pharm.* 65 (2003) 1027-1034 han demostrado posteriormente que los BSCI tienen una actividad antiinflamatoria potencialmente útil en una variedad de modelos animales de enfermedades. De manera destacada, el bloqueo simultáneo de múltiples quimiocinas no está aparentemente asociado con la toxicidad aguda o crónica, lo que sugiere que esta estrategia puede ser una estrategia útil para el desarrollo de nuevos medicamentos antiinflamatorios con beneficios similares a los esteroides pero con efectos secundarios reducidos

[0005] Sin embargo, los péptidos y derivados peptoides, tales como NR58-3.14.3, pueden no ser óptimos para su uso in vivo. Son bastante caros de sintetizar y tienen propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas poco relativamente desfavorables. Por ejemplo, NR58-3.14.3 no es biodisponible por vía oral y se elimina del plasma de la sangre con un período de vida media de menos de 30 minutos después de la inyección intravenosa

[0006] Se han adoptado dos estrategias paralelas para identificar nuevas preparaciones que retienen las propiedades antiinflamatorias del péptido 3 y NR58-3.14.3, pero con características mejoradas para su uso como producto farmacéutico. En primer lugar, se han desarrollado una serie de análogos de péptidos, algunos de los cuales tienen vida medias más largas en plasma que NR58-3.14.3 y que son considerablemente más baratos de sintetizar. En segundo lugar, una estructura: se ha llevado a cabo un análisis de la actividad de los péptidos para identificar farmacóforos a fin de proponer las pequeñas estructuras no peptídicas que puedan retener las propiedades beneficiosas del péptido original.

[0007] Esta segunda estrategia produjo varias series estructuralmente distintas de compuestos que retienen las propiedades antiinflamatorias de los péptidos, incluyendo derivados 16-amino y 16-aminoalquilo del alcaloide yohimbina, así como una gama de 3-aminoglutarimidas N-sustituidas. (Referencia: Fox y otros, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 360-370; el documento WO 99/12968 y WO 00/42071.). Todos estos compuestos son inhibidores de quimiocinas de amplio espectro que retienen una selectividad sobre quimioatrayentes que no son quimiocinas, y se ha observado que un conjunto de ellos bloquean la inflamación aguda in vivo

[0008] El más potente y selectivo de estos compuestos era la (S)-3-(undec-10-enoil)-aminoglutarimida (NR58.4), que inhibió la migración inducida por quimiocinas in vitro con una ED₅₀ de 5 nM. Sin embargo, estudios posteriores revelaron que el anillo de aminoglutarimida era susceptible a la apertura enzimática del anillo en el suero. Por consiguiente, para algunas aplicaciones (por ejemplo, cuando la inflamación bajo tratamiento es crónica, tal como en enfermedades autoinmunes) estos compuestos pueden no tener propiedades óptimas, y un compuesto más estable con propiedades antiinflamatorias similares puede ser superior.

[0009] Como estrategia para la identificación de dichos análogos estables, se han probado diversos derivados de (S)-3-(undec-10-enoil)-aminoglutarimida por su estabilidad en el suero. Uno de dichos derivados, el análogo 6-desoxo (S)-3-(undec-10-enoil)-tetrahidropiridin-2-ona, es completamente estable en suero humano durante al menos 7 días a 37°C, pero tiene una potencia considerablemente reducida en comparación con la molécula parental.

[0010] Una familia de dichos inhibidores de quimiocinas estables de amplio espectro (BSCI) son las 3-aminocaprolactamas, con un anillo monolactama de siete miembros (véanse, por ejemplo, WO2005/053702 y WO2006/016152). Sin embargo, también se han generado compuestos antiinflamatorios útiles adicionales a partir de otras 3-aminolactamas con diferente tamaño del anillo (véase, por ejemplo, WO2006/134385). Otras modificaciones en el anillo de lactama, incluyendo la introducción de heteroátomos y sistemas de anillos de bicilolactama, también producen compuestos con actividad de BSCI (véanse, por ejemplo, WO2006/018609 y WO2006/085096).

[0011] Hasta la fecha, la identificación de amplias clases de agentes con actividad de BSCI, y por lo tanto propiedades antiinflamatorias in vivo, se ha basado en la optimización de la potencia de la actividad de BSCI. Por ejemplo, las divulgaciones anteriores enseñan que la introducción de una disustitución en 2,2 (en el átomo de carbono alfa o clave en la cadena lateral de acilo de acil-3-aminolactamas) conduce a un aumento considerable de la potencia como BSCI, tanto in vitro como in vivo en modelos de inflamación aguda, ya sea el grupo acilo 2,2 disustituido de cadena abierta (véase WO2005/053702), monocíclico (véase WO2006/134384) o policíclico (véase WO2006/016152).

[0012] Sin embargo, la potencia del efecto farmacológico deseado es sólo un factor en la determinación de si un agente producirá un producto farmacéutico humano útil, aunque sea un factor importante. En particular, la farmacocinética (o disposición del agente dentro del cuerpo) ejerce un efecto importante sobre la utilidad de un agente particular. La farmacocinética (definida en su sentido más amplio como el estudio de los efectos del cuerpo sobre un fármaco, a diferencia de la farmacodinámica, que es el estudio de los efectos del fármaco sobre el cuerpo) depende de una multitud de procesos fisiológicos complejos, incluyendo (pero sin limitación) la absorción, la estabilidad en el plasma, el volumen de distribución (y, en particular, la velocidad de equilibrio en tejidos "diana"), la transformación metabólica (incluyendo el metabolismo hepático, tal como la oxidación mediada por isoenzimas del citocromo P450, y el metabolismo de la fase II, tal como sulfatación y glucuronidación, y el metabolismo extrahepático, tal como la modificación enzimática en suero), y la excreción (por ejemplo, la eliminación renal por orina y la eliminación fecal). Estos procesos a menudo se conocen colectivamente como las propiedades "ADME" del agente (ADME es un acrónimo de Absorción, distribución, metabolismo y excreción).

[0013] Otro factor importante en la determinación de la utilidad de un agente como producto farmacéutico humano es la seguridad. Muchos, si no todos, los compuestos administrados producen múltiples efectos en el cuerpo de los cuales los efectos farmacológicos deseables son habitualmente sólo un subconjunto. Los efectos restantes pueden dar lugar en daños (efectos tóxicos) o inconvenientes (efectos secundarios) en el paciente. El estudio de estas propiedades de los agentes farmacéuticos candidatos se llama toxicología o Seguridad farmacológica. Los efectos no deseados se pueden clasificar en dos tipos. Los *efectos de clase* están íntimamente vinculados con la acción farmacológica deseada, y (en mayor o menor medida) son una consecuencia inevitable de la manipulación de la diana molecular elegida. Por ejemplo, los agentes diseñados para prevenir la inflamación patológica pueden, hasta cierto punto, dar lugar a la inmunosupresión y a un mayor riesgo de infección. Esto es debido a que el daño tisular inflamatorio y la infección están ambos inextricablemente ligados al grado de actividad del sistema inmune. Como resultado, todas las moléculas que comparten la misma diana farmacológica compartirán, en mayor o menor medida, los efectos de clase. En cambio, los *efectos del compuesto* se asocian específicamente con una estructura de compuesto particular, habitualmente como resultado de una interacción (a menudo inesperada) con una diana distinta de la diana farmacológica pretendida. En principio, es posible encontrar otra molécula con los mismos efectos farmacológicos pretendidos, pero que esté completamente desprovista de los efectos secundarios específicos para el compuesto. Algunos efectos del compuesto son comunes (tales como la interacción de hERG, lo que puede dar lugar a una prolongación peligrosa del intervalo QT durante el ritmo cardíaco, dando como resultado arritmias cardíacas potencialmente fatales), mientras que otros efectos del compuesto pueden ser aparentemente únicos para el compuesto particular.

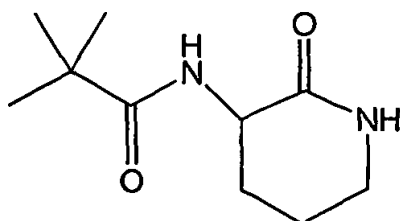
[0014] Significativamente, a pesar de décadas de experiencia en el desarrollo farmacéutico, aún no existe un método generalmente aceptado para predecir la ADME y las propiedades farmacocinéticas de un agente, o su toxicología y Seguridad farmacológica. Es por esta razón que las pruebas explícitas, primero utilizando sistemas de ensayo in vitro (tales como líneas celulares que expresan hERG), a continuación en animales y, finalmente, en ensayos clínicos de fase I en el hombre, es un requisito reglamentario en todo el mundo para el desarrollo de un nuevo producto farmacéutico.

[0015] Se han descrito métodos para predecir ciertos aspectos de ADME a partir de la inspección de la estructura molecular, y hay pocas dudas de que los químicos medicinales experimentados pueden excluir de manera fiable muchas estructuras por razones puramente teóricas. Un ejemplo de dicha "regla general" (pues no es más fiable que eso) serían las "Reglas de cinco" de Lipinsky, basadas en la observación de que los productos farmacéuticos más autorizados cumplen determinados criterios relacionados con el peso molecular, el número de enlaces giratorios y la polaridad. De manera similar, es generalmente bien conocido que las moléculas con grupos hidrófobos grandes son más propensas a mostrar una interacción indeseable con el canal hERG.

[0016] Dichas directrices generales, incluso cuando se aplican en conjunto, pueden ser útiles para la eliminación de moléculas inadecuadas, pero muchas moléculas muy inadecuadas (por diversas razones) seguirían colándose.

Actualmente, nadie consentiría seriamente la selección de un candidato a fármaco de una clase de compuestos activos sobre bases puramente teóricas. Como resultado, el descubrimiento de un compuesto particular de dentro de una clase que tiene propiedades de ADME, farmacocinéticas, toxicológicas y farmacológicas de seguridad particularmente ventajosas, requiere una considerable experimentación práctica entre los buenos candidatos, y es un nuevo hallazgo que no podía predecirse incluso por los expertos en la materia.

[0017] En el presente documento se describe el compuesto nuevo 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetrahidropiridin-2-ona (**I**), que no se ha descrito anteriormente.

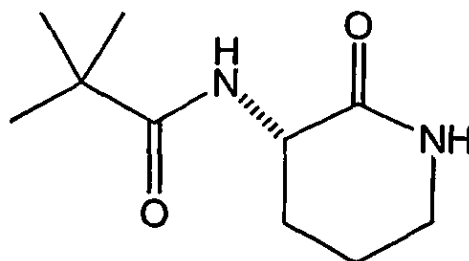


(I)

[0018] Este compuesto es un miembro específico de la clase genérica amplia de BSCI que se han descrito previamente (por ejemplo, véase WO2006/134385). Sin embargo, se demuestra en el presente documento que mientras que todas las moléculas de la clase tienen actividad de BSCI, los compuestos (**I**) tienen propiedades significativamente superiores para su uso como un producto farmacéutico humano como resultado de su combinación de propiedades de ADME, farmacocinética, toxicología y Seguridad farmacológica, cuando se comparan experimentalmente con otros miembros de la clase.

[0019] El átomo de carbono en la posición 3 del anillo de lactama es asimétrico y, por consiguiente, los compuestos según la presente invención tienen al menos dos posibles formas individuales, es decir, las configuraciones "S" y "R". La presente invención abarca las dos formas enantioméricas y todas las combinaciones de estas formas, incluyendo las mezclas racémicas "RS". Con el fin de simplificar, cuando no se muestre ninguna configuración específica en la fórmula estructural, se debe entender que se representan las dos formas enantioméricas individuales y sus mezclas. Dado que la inversión enantiomérica no tiene ningún efecto sobre las propiedades de ADME claves responsables de la superioridad del compuesto (y, además, tiene sólo un pequeño efecto sobre la potencia del compuesto como BSCI), ambas formas enantioméricas, así como sus mezclas, representan ejemplos específicos que son materialmente superiores a la clase en general.

[0020] Preferiblemente, el compuesto de fórmula (**I**), según la presente invención, será el compuesto de fórmula (**I'**).



(I')

[0021] El compuesto (**I'**), que tiene la configuración (S) en el estereocentro, es 5-25 veces más potente como BSCI que el enantiómero (R).

[0022] También se proporcionan composiciones farmacéuticas, que comprenden, como principio activo, un compuesto de fórmula general (**I**) o (**I'**), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable.

[0023] Por sal farmacéuticamente aceptable se entiende, en particular, las sales de adición de ácidos inorgánicos, tales como clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, fosfato, difosfato y nitrato, o de ácidos orgánicos, tales como acetato, maleato, fumarato, tartrato, succinato, citrato, lactato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato, palmoato y estearato. También dentro del alcance de la presente invención, cuando se pueden utilizar, se encuentran las sales formadas a partir de bases, tales como hidróxido de sodio o de potasio. Para otros ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables, se puede hacer referencia a que "Salt selection for basic drugs", Int. J. Pharm. (1986), 33:201-217.

[0024] La composición farmacéutica puede estar en forma de un sólido, por ejemplo polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas de gelatina, liposomas o supositorios. Los soportes sólidos apropiados pueden ser, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidina y cera. Otros excipientes y/o portadores farmacéuticamente aceptables apropiados serán conocidos por los expertos en la materia.

[0025] Las composiciones farmacéuticas según la presente invención también se pueden presentar en forma líquida, por ejemplo, soluciones, emulsiones, suspensiones o jarabes. Los soportes líquidos apropiados pueden ser, por ejemplo, agua, disolventes orgánicos, tales como glicerol o glicoles, así como sus mezclas, en proporciones variables, en agua.

[0026] La presente invención también proporciona la utilización de un compuesto de fórmula (I) o (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno inflamatorio.

[0027] La presente invención incluye compuestos, composiciones y utilizaciones de los mismos tal como se ha definido, en la que el compuesto está en forma hidratada o solvatada.

[0028] En comparación con la técnica anterior, la mejora de la presente invención reside en la observación inesperada de que la 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetrahidropiridin-2-ona tiene propiedades de ADME superiores en comparación con las clases generales de BSCI de lactama que se han descrito previamente (tal como, por ejemplo, las solicitudes internacionales *supra*). Aunque dichos compuestos fueron descritos como poseedores de propiedades farmacodinámicas aceptables (es decir, que tienen un efecto antiinflamatorio potente in vivo como resultado de su actividad de BSCI), y se dedujo que deben tener una farmacocinética aceptable, y por lo tanto, propiedades de ADME, sin embargo, la evaluación directa de las propiedades de ADME sugieren que la 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetrahidropiridin-2-ona es notablemente e inesperadamente superiores (véanse los ejemplos siguientes).

[0029] En particular, mientras que los estudios de estabilidad in vitro anteriores en suero sugirieron que los BSCI de lactama eran considerablemente mejores que los BSCI de imida anteriores (véase, por ejemplo, WO99/12968), según se ha descrito en la literatura (por ejemplo, Fox et al. J. Med. Chem. 2005 48:867-74), ahora está claro que muchos (o incluso la mayoría) de la clase lactama de BSCI están sujetos a un metabolismo no deseado in vivo. Se han producido y probado más de una docena de BSCI de la clase acilaminolactama, y con la excepción de la 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetrahidropiridin-2-ona, todos los BSCI de clase lactama probados hasta la fecha están sujetos a un metabolismo hepático rápido (la hidroxilación mediada por el citocromo P450 y/o el metabolismo de la fase II).

[0030] Al menos en parte como consecuencia de la reducción en el metabolismo in vivo, la eliminación global de 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetrahidropiridin-2-ona es notablemente menor que para los otros BSCI de lactama probados. Como resultado, la exposición después de una dosis oral individual es más de 10 veces más elevado para 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetrahidropiridin-2-ona. La 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetrahidropiridin-2-ona, por tanto, es más adecuado para su uso como un producto farmacéutico humano, especialmente cuando se requiere la exposición oral crónica por eficacia, que la mayoría (si no todos) los BSCI de lactama descritos previamente.

[0031] Los péptidos de la técnica anterior (tales como NR58-3.14.3) tienen las desventajas de que: (a) son caros y requieren la síntesis en fase sólida (al menos para los más largos) y (b) se eliminan muy rápidamente a través de los riñones y (c) son generalmente mucho menos potentes (> 25 veces menos potente in vitro y >10.000 veces menos potente in vivo).

[0032] Las aminoglutarimidias de la técnica anterior son baratos, no se eliminan rápidamente a través de los riñones y son más potentes in vitro pero son extremadamente inestables en suero (como resultado de la abertura enzimática del anillo de imida; véase, por ejemplo, de Fox et al., J. Med. Chem. 2005 48:867-74). Como resultado los BSCI de aminoglutarimida, tales como la (S)-3-(undec-10-enoilamino)glutarimida, son al menos 250 veces menos potentes in vivo que la 2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetrahidropiridin-2-ona, incluso en modelos de inflamación aguda (tales como la endotoxemia inducida por LPS marcada por la producción sistémica TNF- α , donde el impacto de las propiedades de estabilidad y ADME del compuesto es menos claro).

[0033] Otra serie de compuestos estructuralmente relacionados (pero funcionalmente bastante distintos) que han sido descritos en la literatura son compuestos autoinductores bacterianos habitualmente basados alrededor de la estructura de homoserinalactona de 6 miembros, habitualmente con un cadena lateral de 3-oxoacilo (por ejemplo, véase Bycroft et al. US 5, 969,158 que reivindica una amplia gama de dichos compuestos). De manera destacada, a pesar de que dichas descripciones incluyen fórmulas genéricas que abarcan lactamas, así como lactonas, pocos o ninguno de los compuestos ejemplificados con propiedades autoinductoras bacterianas tienen grupos principales lactámicos. Todos de dichos compuestos (pero en particular aquellos con un grupo principal de lactona y/o un grupo de cola 3-oxoacilo) son conocidos por ser relativamente inestables limitando así sus aplicaciones como medicamentos.

[0034] La mejora aquí descrita, la 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetrahidropiridin-2-ona, es barata de sintetizar (y el método descrito aquí permite la síntesis sencilla incluso a escala de Kg), y muestra una excelente estabilidad metabólica no sólo en suero aislado in vitro (una propiedad compartida con toda la clase lactama de BSCI descritos anteriormente), sino también in vivo. Como resultado, los compuestos de la presente invención están (entre los compuestos estudiados ampliamente hasta la fecha) optimizado de forma única para el tratamiento de enfermedades inflamatorias en el hombre en cuanto a la eficacia, potencia y propiedades farmacéuticas, tales como ADME, farmacocinética, toxicología y Seguridad farmacológica.

[0035] Según la presente invención, los trastornos inflamatorios destinados a prevenir o tratar por los compuestos de fórmula (I) o (I') o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos o composiciones farmacéuticas o medicamentos que los contienen como principios activos incluyen de manera destacada:

- enfermedades autoinmunes, por ejemplo, tales como la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn;
- trastornos vasculares que incluyen la apoplejía, enfermedades de las arterias coronarias, infarto de miocardio, angina de pecho inestable, aterosclerosis o vasculitis, por ejemplo, el síndrome de Behçet, arteritis de células gigantes, polimialgia reumática, granulomatosis de Wegener, vasculitis por síndrome de Churg-Strauss, púrpura de Henoch-Schönlein y la enfermedad de Kawasaki;
- infección o replicación viral, por ejemplo, infecciones debido a virus o la replicación de los mismos, que incluyen el virus de la viruela, virus del herpes (por ejemplo, virus Herpes samiri), citomegalovirus (CMV), virus de la hepatitis o lentivirus (incluyendo el VIH);
- asma y trastornos respiratorios relacionados, tales como la rinitis alérgica y la EPOC;
- osteoporosis; (baja densidad mineral ósea);
- crecimiento de tumores;
- rechazo de trasplantes de órganos y/o funcionamiento retrasado del injerto u órgano, por ejemplo, en pacientes con trasplante renal;
- trastorno caracterizado por un nivel elevado de TNF- α ;
- psoriasis;
- heridas de la piel y otros trastornos fibróticos, que incluyen cicatrices hipertróficas (formación de queloides), formaciones de adhesión después de la cirugía general o ginecológica, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática (incluyendo la enfermedad hepática alcohólica) o fibrosis renal, ya sea idiopática o como consecuencia de una enfermedad subyacente, tal como diabetes (nefropatía diabética);
- trastornos causados por parásitos intracelulares, tales como malaria o tuberculosis;
- dolor neuropático (tal como el dolor posoperatorio del miembro fantasma, neuralgia posherpética, etc)
- alergias; o
- enfermedad de Alzheimer.

[0036] Según la presente invención, enfermedades inflamatorias adicionales incluyen:

- ELA;
- respuesta de memoria inducida por antígeno
- supresión de la respuesta inmune.

[0037] Estas indicaciones clínicas se encuentran bajo la definición general de trastornos inflamatorios o trastornos caracterizados por niveles elevados de TNF α .

[0038] Cabe indicar, para evitar dudas, que el principal mecanismo de acción de los BSCI, incluyendo los compuestos reivindicados en el presente documento, es sobre el sistema inmune. En consecuencia, los efectos beneficiosos reivindicados sobre enfermedades, tales como la infección y/o la replicación viral y el crecimiento tumoral (afecciones que, por sí mismas, no son principalmente enfermedades del sistema inmunológico) se debe a los efectos que son consecuencia de la modulación del sistema inmune en los patrones de infección y/o replicación del virus, o en el crecimiento y la propagación del tumor. Dado que los BSCI, incluyendo los compuestos reivindicados en el presente documento, no afectan directamente (en general) a la replicación viral o al crecimiento tumoral, se esperara que no tengan ningún efecto en un sistema aislado (por ejemplo, en una infección in vitro de una línea celular cultivada, o en un ensayo de proliferación de líneas celulares tumorales), donde un sistema inmune intacto y en funcionamiento está ausente. En consecuencia, la información anterior relacionada con los efectos de cualquiera de los compuestos en dichos sistemas aislados no puede informar sobre el desarrollo de los BSCI que actúan sobre el sistema inmune.

[0039] La administración de un medicamento según la presente invención se puede llevar a cabo mediante una ruta tópica, oral, parenteral, mediante inyección intramuscular, etc.

[0040] La dosis de administración prevista para un medicamento, según la presente invención, está comprendida entre 0,1 mg y 10 mg dependiendo de la formulación y la ruta de administración utilizada.

[0041] Según la presente invención, los compuestos de la fórmula general (I) o (I') se pueden preparar utilizando los procesos descritos a continuación.

Preparación de los compuestos de fórmula general (I) o (I')

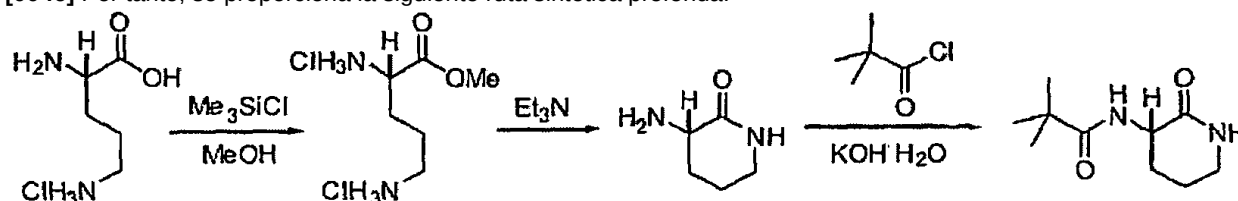
[0042] Todos los compuestos de fórmula general (I) o (I') se pueden preparar fácilmente según los métodos generales conocidos por el experto en la materia.

[0043] El compuesto (I) es un compuesto cristalino incoloro que se puede producir a partir de ornitina y cloruro de 2,2-dimetilpropionilo. Para la síntesis de (I') se utilizaría la (S)-ornitina enantioméricamente pura. Es posible un cierre de anillo a partir de ornitina o su éster de metilo. El aminoácido se puede esterificar en metanol anhidro mediante generación *in situ* de HCl usando cloruro de trimetilsililo. Alternativamente, se puede cerrar el anillo del éster aislado, en cualquiera de los casos utilizando trietilamina. El producto bruto puede acilarse a continuación después de un intercambio de disolventes.

[0044] El producto acilaminolactama (I) tiene una solubilidad en agua significativa y, como resultado, las condiciones de acilación utilizados para productos relacionados más hidrófobos, (véase, por ejemplo, WO2006/134385) no eran satisfactorias. El uso de tres equivalentes de carbonato de sodio como base dio lugar a la formación de una precipitación significativa del subproducto hidrogenocarbonato de sodio a menos que se utilizara una gran cantidad de agua (> 4 ml/mmol de ornitina). A estas concentraciones la extracción del producto en diclorometano no es eficiente. Por lo tanto los tres equivalentes de carbonato de sodio se sustituyeron por 2,5 equivalentes de hidróxido de potasio (que neutraliza los 2,5 equivalentes de clorhidrato de trietilamina generados en la etapa de cierre del anillo). Con esta base se puede utilizar significativamente menos agua (menos de 1 ml/mmol de ornitina) (pH final 8-9). La extracción de la fase acuosa con EtOAc (3 x 2 ml/mmol de ornitina) y la recrystalización a partir de EtOAc (0,5 ml/mmol, caliente) y éter de petróleo 40-60 (5 ml/mmol) produjo una primera recogida con un rendimiento del 43% (4,25 g a partir de de 50 mmoles de ornitina).

[0045] Cabe indicar que si el pH de la fase acuosa es demasiado bajo durante el "work-up", entonces se extraerán pequeñas cantidades de clorhidrato de trietilamina en la capa de EtOAc. Los intentos de lavar esta solución de EtOAc con agua extraerán cantidades significativas del producto de lactama (I) junto con el clorhidrato de amina. Esto puede evitarse aumentando el pH de la fase acuosa hasta 12 (por ejemplo, mediante la adición de aproximadamente un equivalente de KOH con respecto al cloruro de ácido) antes de intentar la extracción de EtOAc, entonces sólo se extrae la base libre de trietilamina junto con el producto de lactama (I), que se puede extraer más fácilmente por evaporación o durante la recrystalización.

[0046] Por tanto, se proporciona la siguiente ruta sintética preferida:



Se suspende monoclóhidrato de (S)-ornitina (50 mmol) en metanol anhidro (100 ml) y se añade cloruro de trimetilsililo (75 mmol). La reacción se calienta a reflujo durante 24 horas. Se añade a continuación trietilamina (150 mmol) y la reacción se calienta a reflujo durante 48 horas. El metanol se elimina a continuación a presión reducida (opcionalmente, puede añadirse tolueno en las últimas etapas para facilitar la eliminación), y el residuo se disuelve en agua (20 ml), con KOH añadido (125 mmol).

[0047] La mezcla se enfría a 0°C, a continuación se añade lentamente cloruro de 2,2-dimetilpropionilo (50 mmol) y la reacción se agita durante 18 horas, mientras se calienta hasta temperatura ambiente. A continuación, se añade KOH sólido (50 mmoles) y una vez que se haya disuelto se extrae la reacción con EtOAc (3 x 100 ml). Las fases orgánicas combinadas se secan rápidamente sobre una combinación de K₂CO₃ y Na₂SO₄, y se reducen a baja presión. El residuo sólido se recrystaliza a continuación a partir de EtOAc (25 ml)/éter de petróleo 40-60 (200-250 ml) para producir la lactama (I') como un sólido cristalino (rendimiento superior al 50%).

[0048] A continuación, se confirmó la identidad y pureza (> 95%) del producto mediante espectroscopía de RMN de protón (δ H (400 MHz, CDCl₃) 6,63 (1H, br s, NH), 6,01 (1H, br s, NH), 4,20 (1H, dt, J 11, 5,5, CHNH), 3,40-3,31 (2H, m, CH₂NH), 2,61 (1H, dq, J 13, 4,5, CH₂), 1,97-1,88 (2H, m, CH₂), 1,50 (1H, dddd, J 13, 12, 9,5, 7,5, CH₂), 1,22 (9H, s, 3 x CH₃).

DEFINICIONES

[0049] El término "aproximadamente" se refiere a un intervalo alrededor del valor considerado. Tal como se utiliza en esta solicitud de patente, "aproximadamente X" significa un intervalo desde X menos un 10% de X hasta X más un 10% de X, y preferiblemente un intervalo desde X menos un 5% de X hasta X más un 5% de X.

[0050] El uso de un intervalo numérico en esta descripción está destinado de forma inequívoca a incluir dentro del alcance de la invención todos los números enteros individuales dentro del intervalo y todas las combinaciones de las cifras de los límites superior e inferior dentro del alcance más amplio del intervalo determinado. Por lo tanto, por ejemplo, el intervalo de 0,1 mg a 10 g específico con respecto a (entre otras) la dosis de 3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetrahidropiridin-2-ona a utilizar pretende incluir todas las dosis entre 0,1 mg y 10 g y todos los subintervalos de cada combinación de las cifras superior e inferior, tanto si se ejemplifica de forma explícita como si no.

[0051] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "que comprende" debe entenderse en el sentido de que comprende y que consiste en. Por consiguiente, cuando la invención se refiere a una "composición farmacéutica que comprende como principio activo" un compuesto, esta terminología pretende cubrir ambas composiciones en las que otros principios activos pueden estar presentes y también composiciones que consisten sólo de un principio activo tal como se define.

[0052] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un especialista habitual en el campo al que pertenece la presente invención. Del mismo modo, todas las publicaciones, solicitudes de patentes, todas las patentes y todas las demás referencias citadas en el presente documento se incorporan a modo de referencia (cuando la ley lo permita).

[0053] Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar los procedimientos anteriores y no debe considerarse en ningún caso que limitan el alcance de la invención.

FIGURAS

[0054]

La figura 1 (paneles A a E) muestra las gráficas de concentración-tiempo para los cinco compuestos (I') a (V) analizados, después de la administración de una dosis única de 3 mg/kg en CMC al 1% a través de la ruta oral a ratas. Las tres líneas para cada compuesto representan tres réplicas de animales. El eje Y representa la concentración en unidades de ng/ml (0-3000); el eje X representa el tiempo en unidades de minutos (0-480).

La figura 2 muestra los principales metabolitos identificados por LC-MS-MS (en el modo de barrido completo) en la orina recogida durante 24 horas de ratas expuestas a una dosis oral única de cada uno de los cinco compuestos (I') a (V) analizados, administrados en CMC al 1% a 3 mg/kg. Cabe indicar que se ha identificado un metabolito principal del compuesto (IV), pero su estructura no se ha dilucidado por comparación de los patrones de fragmentación/redistribución en las bases de datos de identificación de metabolitos disponibles públicamente. Aunque no se determinaron las concentraciones de los metabolitos individuales, se muestran en orden cualitativo de la abundancia en la orina con la especie más abundante en el lado izquierdo de cada fila.

La figura 3 (paneles A-F) muestra los gráficos de corriente frente al tiempo para las células que expresan el producto génico de hERG, cuando se exponen a cualquier vehículo o a los cinco compuestos (I') a (V), cada uno en un experimento separado. En cada experimento, se expusieron las réplicas de células al compuesto de control positivo, que bloquea completamente la corriente inducida por hERG. El eje Y representa la corriente en unidades de nA; el eje X representa el tiempo en unidades de segundos. El panel G muestra la corriente de cola de hERG (el área bajo los gráficos de tiempo frente a corriente en los paneles A-F) para réplicas de células expuestas a cada compuesto o a 0,1% de vehículo DMSO solo (Veh) o al compuesto E-4031 de control positivo (+ ve). El eje Y del histograma en el panel G representa el porcentaje de inhibición de la corriente de cola de hERG relativa a las células no tratadas.

La figura 4 muestra una curva de unión típica para el compuesto (I'). En este experimento, cada reacción recibió 10 nM de BN83250 marcada (una BSCI de lactama que se une al mismo receptor que el compuesto (I'), junto con diversos competidores (100 μ M-1 pM). La unión específica total era la cantidad desplazada por un gran exceso (100 μ M). Cada barra representa la media de tres determinaciones de réplicas, con los "bigotes" representando SEM. El eje Y representa el recuento radiactivo unido en cada uno de los experimentos en unidades de recuentos por minuto (cpm). La línea discontinua superior representa la unión total en las condiciones del experimento, mientras que la

línea inferior punteada representa la unión no específica; la unión específica se representa por la distancia entre las líneas discontinuas.

La Figura 5 muestra el perfil de reactividad cruzada para cada uno de los cinco compuestos (I') a (V) (Panel A: (II), B: (III); C: (V); D: (I') y E: (IV)) frente a un panel de 75 receptores diferentes que componen el panel CEREP (ver texto). Los compuestos se ensayaron a una concentración única (10 μ M), y se indica la inhibición de la unión (eje Y de cada histograma) para un ligando conocido para cada uno de los 75 receptores (-100%, por tanto, representa un incremento de 2 veces en la unión del ligando específico en presencia del compuesto de prueba). Todas las reacciones se realizaron por duplicado, y las barras representan la media (no se muestra la estimación del error de replicación para simplificar los gráficos). Sólo una inhibición (o estimulación) del 50% o superior de la unión (que representa una ED50 por debajo de 10 μ M para la interacción del compuesto de prueba con el receptor en particular) se consideró estadísticamente y biológicamente significativa en este ensayo de cribado. Para los cinco compuestos analizados en el presente documento, sólo una interacción (la del compuesto (II) con el receptor NK2, marcada por la punta de flecha en el panel A) se considera potencialmente significativa, aunque incluso esta interacción era débil (ED50 estimada 5-10 10 μ M).

La figura 6 (paneles A-E) muestra las curvas representativas de dosis-respuesta para la inhibición de la migración de leucocitos inducida por quimiocinas in vitro, para cada uno de los cinco compuestos (I') a (V) en el ensayo de migración entre pocillos ChemoTxTM. En cada experimento, se indujeron células THP-1 para migrar usando una dosis máximamente efectiva de la quimiocina MCP-1 en presencia o ausencia de diversas dosis (de 10 μ M a 1 μ M) de cada compuesto. Se utilizó en cada experimento un vehículo de control apropiado. El porcentaje de inhibición de la migración inducida por MCP-1 (calculado como el número de células migradas en presencia de MCP-1 menos el número de células migradas sin MCP-1 en la cámara inferior) a cada concentración de cada compuesto de prueba se muestra como la media de determinaciones por triplicado, con los "bigotes" representando SEM. La ED50 se estimó mediante interpolación lineal de los gráficos presentados. El eje Y de cada gráfico representa el porcentaje de inhibición de la migración inducida por MCP-1; el eje X representa la concentración del compuesto de prueba presente en unidades de nM (0,01-1000).

La Figura 7 muestra las curvas representativas de dosis-respuesta para la inhibición de la producción de TNF- α inducida por LPS in vivo en un modelo murino de endotoxemia subletal. En cada experimento, grupos de seis ratones recibieron un tratamiento previo con los cinco compuestos (Panel A: (II), B: (III); C: (V); D: (I') y E: (IV)) a distintas dosis, ya sea por vía oral (círculos) o ruta subcutánea (triángulos). 30-60 minutos más tarde, se estimularon los animales con LPS por vía intraperitoneal, y se preparó el suero a partir de sangrado terminal 3 horas más tarde. El nivel de TNF- α en la sangre se midió mediante ELISA, y el grado de inhibición de la producción de TNF- α inducida por LPS (calculada como la concentración de TNF- α en ratones expuestos a LPS menos la concentración de TNF- α en ratones que recibieron una exposición simulada a PBS libre de endotoxina) se muestra en el eje Y de cada gráfico como la media de seis animales, con los "bigotes" representando SEM. La concentración de TNF- α en ratones que recibieron LPS, pero sin tratamiento con BSCI, fue habitualmente de 5.000 a 6.000 pg/ml de promedio (en comparación con <10 pg/ml en ratones sin estimulación). La ED50 se estimó mediante interpolación lineal de los gráficos presentados. El eje X de cada gráfico representa la dosis de cada compuesto administrado a cada ratón en el grupo en unidades de mg (1E-07 a 1).

La figura 8 muestra el efecto del compuesto (I') en la inflamación pulmonar en un experimento representativo, evaluado mediante el recuento de células en el fluido BAL en un modelo de roedor de asma. Las barras representan el promedio del recuento de células, mostradas en el eje Y en unidades de 10⁶ células, para grupos de 5 animales con los "bigotes" representando SEM; *p <0,01 frente a "sensibilizada" utilizando el test t de Student no apareado asumiendo una igualdad de varianza, con dos colas). La línea horizontal representa el número promedio de leucocitos presentes en el fluido BAL de los pulmones de ratas no estimuladas. Todas las ratas en los tres grupos restantes recibieron el mismo régimen de sensibilización y estimulación, pero fueron tratados sólo con vehículo ("Sensibilizada"), o con el compuesto (I') a 0,3 mg/kg de peso corporal o con monteleukast ("SingulairTM") a 30 mg/kg de peso corporal, todas administradas diariamente mediante sonda oral.

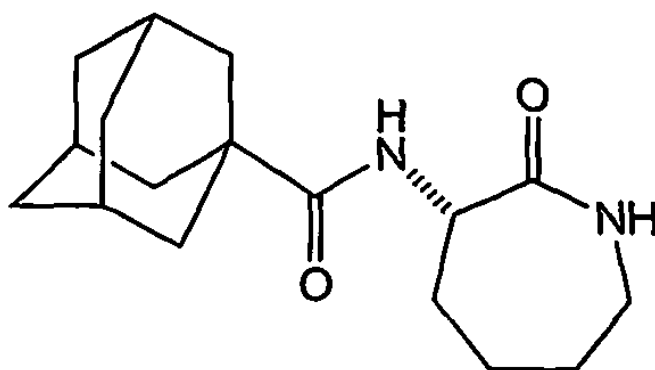
La figura 9 muestra el efecto del compuesto (I') en la polarización de las células T auxiliares en un experimento representativo, evaluado mediante la determinación por citometría de flujo de la producción de IFN- γ (una citoquina marcadora de Th1) e IL-4 (una citoquina marcadora de Th2) por esplenocitos CD4+ en un modelo de roedor de asma. Las barras representan relaciones los promedios de las relaciones Th1/Th2, que se muestran en el eje Y, para grupos de 10 animales, los "bigotes" representan SEM; * P <0,05 frente a ratas no estimuladas; † p <0,05 frente a ratas sensibilizadas y estimuladas, en ambos casos utilizando el test t de Student no apareado asumiendo igualdad de varianza, con dos colas). Todas las ratas (excepto el grupo 'ratas BN, que no se expusieron a ovoalbúmina) recibieron el mismo régimen de sensibilización y estimulación, pero fueron tratados sólo con vehículo ("Sensibilizada + vehículo"), o con el compuesto (I') a 0,3 mg/kg de peso corporal o con monteleukast ("SingulairTM") a 30 mg/kg de peso corporal, todas administradas diariamente mediante una sonda oral.

La figura 10 es una representación de la vida media en plasma (en minutos) frente a la exposición oral para una gama de diferentes compuestos BSCI en rata. En cada caso, la vida media se estimó utilizando un modelo estándar

de un compartimiento de concentraciones en plasma a 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6 y 8 horas después de una dosis de bolo iv única del compuesto a 1 mg/kg disuelto en CMC al 1%, DMSO al 0,9% en solución salina. La exposición oral (AUC_{0-t} en unidades de min.ng/ml) se calculó después de una dosis oral única del compuesto a 3 mg/kg disuelto en CMC al 1%, DMSO al 0,9% en solución salina. El enantiómero R del compuesto (I), que es la inversión del compuesto (I') y se identifica como "(R)-(I)" está marcado con un círculo abierto.

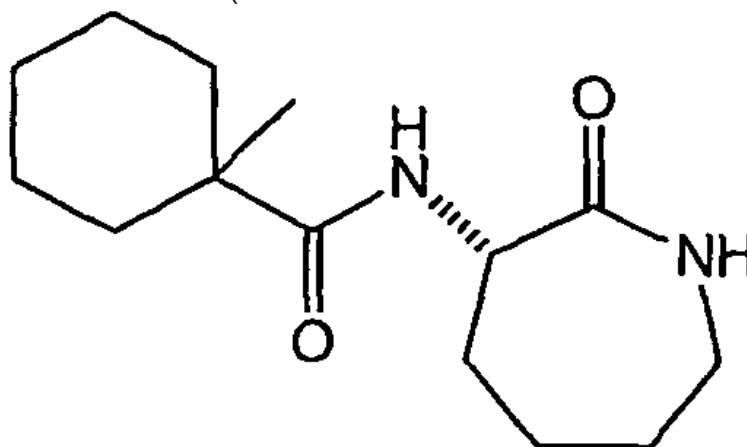
EJEMPLOS

[0055] En cada uno de los siguientes ejemplos 1 a 6, se ha comparado la (S)-3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-tetrahidropiridin-2-ona (compuesto I') con una gama de otros BSCI de lactama que han sido seleccionados por ser representativos de las diferentes subclases. Por ejemplo, se seleccionó la 3-(adamantano-1-carbonilamino)-caprolactama (II) como típica de la subclase de BSCI de policicloacil lactama (tales como las descritas anteriormente en WO2006/016152).



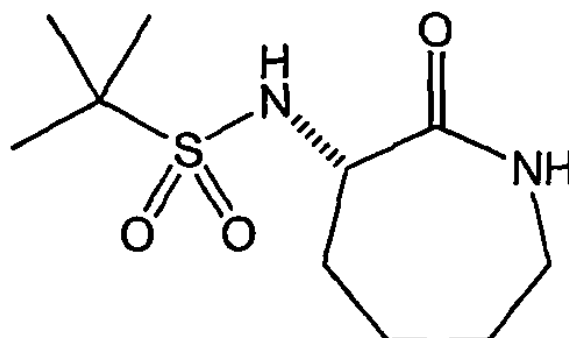
(II)

[0056] De manera similar, se seleccionó la 3-(1'-metilciclohexilcarbonilamino)-caprolactama (III) como típica de la subclase de BSCI de monocicloacil lactama (tales como las descritas anteriormente en WO2006/134384).



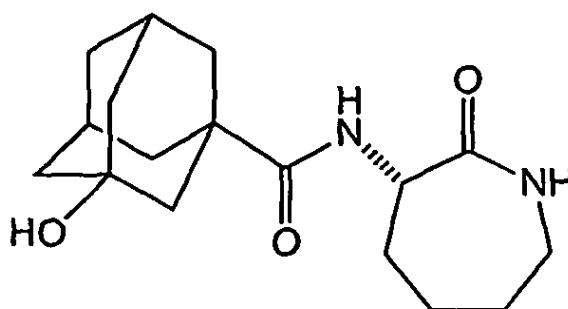
(III)

[0057] Se seleccionó el compuesto 3-(1',1'-dimetiletilsulfonilamino)-caprolactama (IV) como típica de la subclase de BSCI con cadenas laterales alquílicas simples (no cíclicas) (tales como las descritas anteriormente en WO2005/053702), así como aquellas con un enlazador sulfonilamino (a diferencia del enlazador de carbonamida en los compuestos restantes seleccionados).



(IV)

[0058] El compuesto final seleccionado, 3-(3'-hidroxiadamantil-1-carbonilamino)-caprolactama (V) era típico de los BSCI con una cadena lateral de acilo sustituida (ya sea una estructura de monociclo o policiclo, lineal simple o ramificada).



(V)

[0059] Es importante tener en cuenta que todos estos compuestos BSCI (II) a (V) se han descrito específicamente anteriormente, y todos tienen una actividad de BSCI potente in vitro ($ED_{50} < 1$ nM para la inhibición de la migración de células THP-1 inducida por MCP-1). Todos tienen una excelente estabilidad en suero, in vitro, y desde una perspectiva teórica son todos excelentes candidatos para el desarrollo como productos farmacéuticos humanos con propiedades antiinflamatorias in vivo.

[0060] Todos los compuestos anteriores (I', II, III, IV y V) se analizaron en la configuración (S) en el estereocentro de la lactama.

Ejemplo 1 Farmacocinética después de una dosis única

[0061] Los compuestos se administraron como una dosis única (ya sea 1 mg/kg de peso corporal en DMSO al 5% por vía intravenosa o 3 mg/kg en carboximetilcelulosa al 1% por vía oral) a tres ratas adultas (utilizando diferentes ratas para cada compuesto y cada vía de administración).

[0062] A continuación, se tomaron muestras de sangre en diversos puntos de tiempo (incluyendo justo antes de la administración de la dosis) hasta las 24 horas después de la dosis, y se evaluó el nivel de los diversos compuestos utilizando un ensayo de LC-MS/MS validado. Brevemente, se aplicaron 3-5 μ l de la muestra desproteinizada a una columna de cromatografía de fase inversa Waters Atlantis (C18 20x2,1 mm, tamaño de partícula de 3 μ m) equilibrada en ácido fórmico al 0,1% en 95:5 de agua:acetonitrilo. Sobre los 3,5 minutos, se eluyó en gradiente el material unido alcanzando el ácido fórmico al 0,1% en 5:95 de agua:acetonitrilo, seguido de una etapa de gradiente inverso a ácido fórmico al 0,1% en 95:5 de agua:acetonitrilo. A continuación, el eluyente de la columna se dirigió a un espectrómetro de masas Applied Biosystems API 4000/3200 QTrap MS/MS, con una fuente de iones Turbolonspray™ trabajando en modo de iones positivos. La temperatura de la interfase se fijó a 650°C, con un tiempo de permanencia de 40 ms para cada transición de MRM, con el seguimiento de los siguientes iones:

Analito	Masa Q1 (uma)	Masa Q3 (uma)
(II)	291,14	135,1
(III)	253,16	97,0
(V)	307,15	151,1
(I')	199,15	57,2
(IV)	249,15	129,3
Patrón interno	213,19	57,1

[0063] El patrón interno en cada determinación fue el compuesto relacionado (S)-3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-caprolactama, que se añadió a la muestra antes de la desproteinización. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) para este ensayo fue de 2,4 ng/ml para cada compuesto, excepto (I'), donde era 38,1 ng/ml.

[0064] Tras el análisis LC-MS/MS de cada muestra recogida, se modeló la disposición farmacocinética del compuesto utilizando el software Kinetica, un paquete de software conocido para tales aplicaciones.

Resultados

[0065] Los gráficos de concentración individual frente a tiempo para cada rata tratada con cada compuesto a través de la vía oral se muestran en la figura 1. Es inmediatamente obvio que de estos cinco BSCI de lactama estructuralmente diversos, sólo (IV), (V) y (I') consiguen alguna exposición oral apreciable, y que de éstos (I') es sustancialmente mejor que los otros

[0066] En la tabla 1 se muestran los parámetros de un modelo farmacocinético simple de un compartimento. En primer lugar, esto demuestra la exposición superior lograda con (I') - casi 20 veces superior que el siguiente mejor compuesto, (V). La razón de esta exposición superior (que se calcula como el área bajo la curva de concentración frente al tiempo, en las unidades de min.ng/ml) también es evidente: la eliminación de (I'), que se define como el volumen teórico de sangre que se elimina completamente de fármaco cada minuto en las unidades de ml/min/kg, es más de 10 veces inferior a la de los otros BSCI de lactama.

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos para BSCI de lactama estructuralmente diversos

	F (%)	t1/2 (min)	Eliminación (ml/min/kg)	Vss (L/kg)	Exposición (min.ng/ml)
(I')	69	196	2,6	0,7	939.000
(II)	< 1	16	84	0,8	477
(III)	5	11	55	0,6	2.900
(IV)	45	19	32	0,6	41.400
(V)	59	24*	31	1,4	57.100

[0067] La biodisponibilidad oral (F,%), la vida media en plasma dominante (t1/2, min), eliminación (ml/min/kg), volumen de distribución (Vss, L/kg) y la exposición (AUC 0->infinito, min.ng/ml) de modelo farmacocinético simple de un compartimento para cada compuesto, promediado en tres ratas. * 24 min es la vida media dominante (V) que representa la eliminación de más del 95% de la dosis inyectada; el t1/2β menor fue de 110 min. En todos los casos, la Cmax se alcanzó en 30 minutos en concordancia con la absorción óptima.

[0068] La eliminación de (II) y (III) se aproxima al flujo sanguíneo del hígado de la rata, lo que sugiere fuertemente que estos dos compuestos se metabolizan casi por completo en el primer paso a través del hígado. Del mismo modo, la eliminación de (IV) y (V) excede el flujo sanguíneo renal en la rata en 3-4 veces, lo que sugiere de nuevo la eliminación metabólica sustancial presumiblemente también mediada por el hígado. En cambio de forma destacada, la eliminación de (I') a 2,6 ml/min/kg es inferior a la mitad del flujo sanguíneo renal (generalmente mencionado como 7-9 ml/min/kg), lo que sugiere una eliminación metabólica mínima. Dado que (I') es extremadamente soluble en agua, con un volumen de distribución consistente con el equilibrio libre en el agua corporal total (0,7 l/kg), es probable que la eliminación por debajo del flujo sanguíneo renal represente la reabsorción de agua en el túbulo distal renal (en lugar de, por ejemplo, la exposición reducida al riñón debido a la retención en compartimentos lipófilos).

[0069] En concordancia con la eliminación mucho menor para (I'), en comparación con los otros compuestos, (I') tiene una vida media en plasma sustancialmente más larga (más de 3 horas, en comparación con menos de media hora para los otros cuatro compuestos).

[0070] Se observa que no todos los BSCI tienen una biodisponibilidad oral, a pesar de que se sabía que los cinco de los compuestos seleccionados tenían bioactividad oral sobre los puntos finales de inflamación aguda. Esto probablemente refleja el rápido metabolismo mediado por el hígado de (II) y (III), que se absorben de manera eficiente, pero convertida, en la primera pasada a través del hígado a metabolitos que conservan cierta actividad como BSCI (véase el ejemplo 2).

[0071] En base a este análisis farmacocinético, será obvio para los expertos en la materia que a pesar de la estabilidad química similar y la estabilidad in vitro en suero aislado de estos cinco compuestos, así como sus propiedades predichas similares en una base teórica, sin embargo, (I') es notablemente superior a todos los otros. En particular, la eliminación del compuesto es mucho más inferior, lo que probablemente refleja una propensión reducida al metabolismo mediado por el hígado, dando lugar a una vida media en plasma 10 veces más larga y una exposición casi 20 veces mejor que el siguiente mejor compuesto examinado.

[0072] En un experimento separado, se comparó (I') con el segundo mejor compuesto (V) para los parámetros farmacocinéticos en una especie diferente (no roedor), el perro. Se administraron dosis únicas (1 mg/kg DMSO al 5% por vía intravenosa o 3 mg/kg en CMC al 1% por vía oral) a un único perro para cada compuesto en un diseño cruzado sencillo con lavado de 1 semana entre las dos vías de administración.

[0073] Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Comparación de los parámetros farmacocinéticos para las dos mejores lactamas

PK intravenosa (1 mg/kg)					
Compuesto	Especie		Vida media (min)	Eliminación (ml/min/kg)	Vss (L/kg)
(V)	Rata		24	33	0,8
	Perro		66	7,4	0,6
(I')	Rata		196	2,6	0,7
	Perro		236	1,9	0,6
PK oral (3 mg/kg)					
Compuesto	Especie	Tmax (min)	Vida media (min)	Biodisponibilidad (%)	AUC (min.ng/ml)
(V)	Rata*	15	24	59	57100
	Perro	60	67	59	240000
(I')	Rata	15-120	226	81	939000
	Perro	60	217	75	1210638

[0074] BSCI en rata y perro. La farmacocinética en perro es ampliamente similar a rata. En ambas especies, el compuesto (I') que tiene una eliminación considerablemente inferior, una vida media en plasma más larga y por tanto una mayor exposición (AUC en min.ng/ml). En cada caso, la vida media predominante (la $t_{1/2\alpha}$ más rápida) es responsable de la eliminación de más del 95% de la dosis inyectada.

[0075] Estas observaciones indican que las propiedades farmacocinéticas superiores de (I') no son específicas de especie y en consecuencia es muy probable también que también se observen en humanos.

Ejemplo 2 Identificación de los metabolitos primarios

[0076] Se recogió la orina de ratas expuestas a una única dosis oral (3 mg/kg en CMC al 1%) de cada compuesto durante un período de 24 horas en jaulas metabólicas. A continuación, las muestras de orina combinadas se sometieron a un análisis de espectro de masas de barrido completo, usando las mismas condiciones de LC-MS descritas en el ejemplo 1 anterior. A continuación, se realizó un análisis adicional de MS-MS de los iones producto y se asignaron las probables fragmentaciones/redistribuciones a partir de la base de datos de metabolitos Metabolite ID disponible públicamente.

[0077] Para los metabolitos principales, las estructuras asignadas se confirmaron mediante la síntesis de muestras auténticas utilizando métodos bien conocidos en la técnica, se sometieron a análisis por LC-MS-MS en las mismas condiciones que las muestras de orina.

[0078] Cabe indicar que los estudios de identificación de metabolitos (metabolite ID) proporcionan sólo estimaciones cualitativas de las cantidades relativas de los diferentes metabolitos presentes, y serían necesarios ensayos validados por separado con las normas internas apropiadas para cuantificar cada especie de metabolitos.

Resultados

[0079] Los metabolitos detectados, en orden de concentración detectada, se muestran en la figura 2 para los cinco compuestos analizados. Es importante indicar que la metodología utilizada aquí no es necesariamente exhaustiva, y también pueden estar presentes metabolitos adicionales (especialmente secundarios) que estaban por debajo de los límites de detección para los métodos aplicados aquí. Como regla general, se puede suponer que se detectarán los metabolitos que representan el 10% o más de la dosis inyectada (aunque no necesariamente identificados estructuralmente mediante los métodos utilizados en el presente documento).

[0080] Para los compuestos (II) y (III) la principal ruta de metabolismo es la hidroxilación mediada por el citocromo P450, consistente con la rápida eliminación a una tasa cercana al flujo sanguíneo hepático (véase el ejemplo 1 anterior). El sitio principal de hidroxilación en ambos compuestos está en el grupo de cola cicloalquilo, con una segunda hidroxilación (más lenta) que tiene lugar en el grupo de cabeza lactama. Cabe indicar que los productos de hidroxilación de la lactama aparecieron en el MS-MS a -2 uma (a diferencia de +16 uma) debido a la inestabilidad de los aductos de 7-hidroxi en la fuente de electrospray.

[0081] Para el compuesto (II) el producto dihidroxilado estaba presente en cantidad suficiente para ser detectado en la orina, mientras que para el compuesto (III) no se detectó ningún producto de dihidroxilación. En ambos casos, es probable que también se formen productos secundarios adicionales por debajo del nivel de detección del método aplicado (por ejemplo, los derivados 3,5-dihidroxiadamantilo y 3,5,7-trihidroxiadamantilo de (II), así como la aductos con glucurónidos de ambos hidroxi-(II) e hidroxi-(III), particularmente dado que se detectó el aducto con glucurónido de (V)).

[0082] Para el compuesto (V) el compuesto con glucurónido era el metabolito principal, aunque en rata sólo se elimina una fracción minoritaria del glucuronato en la orina, pasando la mayoría a las heces (en contraste destacado con los seres humanos, donde este aducto con glucurónido se excreta principalmente en la orina). Es posible que también se formaran otros metabolitos de fase II (tales como la 3'-O-sulfato), pero sólo a niveles (por lo menos en la orina) demasiado bajos para ser detectada por los métodos utilizados en el presente documento. En cuanto a los compuestos (II) y (III), también se detectó una pequeña cantidad de producto hidroxilado en el grupo de cabeza lactama (de nuevo principalmente como un ion del producto -2 uma).

[0083] Para el compuesto (IV) el principal metabolito no pudo ser identificado, aunque la pérdida de compuesto parental (véase la Tabla 3) era claramente consistente con la formación de un metabolito no identificado (menos de 10% de la dosis inyectada de (IV) se recuperó inalterada). Dado que el compuesto (IV) era el único agente que contenía un enlace sulfonamida es plausible, pero en la actualidad aún no probado, que se producía la escisión metabólica (u otra modificación) del enlazador. Una vez más, se observó también una pequeña cantidad de hidroxilación en el grupo de cabeza lactama.

[0084] En marcado contraste con todos los otros compuestos, no se detectaron metabolitos significativos de (I') en la orina, consistente con la aparición de la mayoría de la dosis inyectada en la orina en forma inalterada (véase la tabla 3) y el tasas de eliminación en el flujo sanguíneo renal o por debajo del mismo (ver ejemplo 1 anterior). Esta falta de formación de metabolitos es una ventaja importante, e inesperada, de (I') sobre los otros compuestos probados aquí para el desarrollo como producto farmacéutico humano y es, al menos en parte, responsable de las propiedades farmacocinéticas superiores descritas en el ejemplo 1 anterior.

[0085] Para proporcionar una estimación cuantitativa del grado de metabolismo sufrido por cada uno de los compuestos probados, se midió la cantidad de compuesto parental inalterado en orina utilizando el mismo ensayo LC-MS validado descrito en el ejemplo 1, utilizando (S)-3-(2',2'-dimetilpropanoilamino)-caprolactama como patrón interno. Los resultados se muestran en la tabla 3. Además, también se determinó el nivel de compuestos en varios tejidos diana.

Tabla 3. Distribución de compuestos en varios tejidos 24 horas después de una dosis individual en rata

<i>nd = no detectado; LLOQ = 2,4 ng/g</i>							
Compuesto	Corazón	Pulmón	Riñón	Hígado	Músculo	Cerebro	Orina (ng/ml)
(II)	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
(III)	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
(V)	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	16300
(I')	5,3	21,9	5,1	3,6	3,1	1,6	24567
(IV)	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	1010

[0086] Solamente los compuestos (I'), (V) y (IV) son detectables en la orina a las 24 horas después de una única dosis oral (3 mg/kg en CMC al 1%). De éstos, el compuesto (I') experimentó un metabolismo significativamente menor (se recuperó en la orina más del 60% de la dosis inyectada). Además, sólo se pudo detectar el compuesto (I') en cualquiera de los otros tejidos examinados 24 horas después de una única dosis. Esto probablemente refleja tanto la distribución superior como una mayor exposición asociada con (I') en comparación con los otros compuestos probados aquí.

[0087] La tasa mucho más baja de metabolismo de (I') en comparación con los otros compuestos demuestra que, de forma inesperada, (I') es notablemente superior a la amplia gama de BSCI de lactama previamente descritos para el desarrollo como producto farmacéutico humano. Este metabolismo reducido (y por tanto propiedades de ADME mejoradas) probablemente representa las propiedades farmacocinéticas drásticamente superiores mostradas en el

ejemplo 1 anterior. Además, dado que los BSCI están destinados al desarrollo como agentes antiinflamatorios que reconocen el reclutamiento inapropiado de leucocitos en una amplia gama de tejidos, el hallazgo inesperado de que (I') se encuentra en todos los tejidos del cuerpo probados 24 horas después de una única dosis, mientras que todos los otros BSCI de lactama probados no lo hacían, demuestra inequívocamente la utilidad particular de este nuevo compuesto.

Ejemplo 3. Seguridad farmacológica

[0088] Los cinco compuestos se sometieron a una prueba estándar AMES para evaluar la probable genotoxicidad. Se trataron tres cepas auxótrofas de His de *S. Typhimurium* (TA102, TA98 y Taloo) con cada uno de los compuestos a 5 concentraciones (hasta 5 mg/ml) en presencia y ausencia del sistema de metabolización microsomal de hígado de rata S9. A continuación, se determinó el número de colonias revertientes mediante el emplacado en medio mínimo con trazas de His.

[0089] Los resultados (tabla 4) muestran que ninguno de los cinco compuestos incrementa significativamente la formación de colonias revertientes (con o sin activación metabólica) en ninguna de las cepas analizadas.

Tabla 4. Formación de colonias revertientes en la prueba AMES

Compuesto	TA100	TA100+S9	TA102	TA102+S9	TA98	TA98+S9
(II)	0,59*	0,73	0,50*	0,93	0,58*	0,60*
(III)	0,79	0,81	0,69	0,88	0,68	0,55
(V)	0,78	0,88	0,93	1,09	0,96	0,91
(I')	0,97	0,95	0,82	0,93	2,00**	1,23
(IV)	0,89	0,90	0,85	0,88	0,82	0,90
+ve control	6,89	7,18	5,97	2,65	9,68	19,05
A 5 mg/ml: * = césped base bacteriano escaso ** = valor de control bajo en este experimento = incremento significativo en colonias revertientes						

[0090] Ninguno de los compuestos probados provocó un aumento significativo en la formación de colonias revertientes a cualquiera de las concentraciones probadas (sólo se muestran los datos para la dosis superior). Cabe indicar que el compuesto (II) provocó la inhibición del crecimiento de césped bacteriano a 5 mg/ml.

[0091] En un experimento separado, los cinco compuestos se probaron por la interacción con el canal de iones de hERG. Los compuestos que interactúan con hERG están en riesgo de causar la prolongación del intervalo QT y una arritmia cardíaca potencialmente fatal. Los compuestos que inhiben la corriente de cola de hERG en más de un 50% a 10 μ M son generalmente considerados de alto riesgo para el desarrollo como productos farmacéuticos humanos.

[0092] Se perfundieron células HEK239 transfectadas de forma estable para expresar hERG con una solución de un baño que contenía los compuestos a 10 μ M (DMSO al 0,1%). A continuación, se registraron las corrientes de cola de hERG de tres células mediante análisis "patch-clamp" después de la polarización hasta +20 mV durante 5s. La potencia de la interacción con hERG se determinó a continuación en una curva de dosis-respuesta de 4 puntos para cualquier compuesto que mostraba una modulación significativa a 10 μ M.

[0093] Los resultados (figura 3) muestran que ninguno de los cinco compuestos interaccionó significativamente con el canal hERG a 10 μ M.

[0094] Se concluye que, desde una perspectiva de seguridad farmacológica, los cinco compuestos, incluyendo (I') son igualmente adecuados para el desarrollo como productos farmacéuticos humanos. En particular, las propiedades de ADME y propiedades farmacocinéticas considerablemente superiores de (I'), ilustradas en los ejemplos 1 y 2 anteriores, no están acompañadas de los perfiles de seguridad farmacológica correspondientemente peores.

Ejemplo 4. Farmacología general

[0095] Se evaluó la farmacología general de los cinco compuestos, tanto contra el receptor diana específico como contra una amplia variedad de otros receptores, muchos relacionados en la estructura con el receptor diana. La unión específica al receptor diana se evaluó mediante la competición por la unión de [³H]-BN83250 (BN83250 es (S)-3-(2',2'-dimetildodecanoilamino)-caprolactama; Fox et al J Med Chem. . 200; 48 (3): 867-74; un agente conocido por unirse al mismo receptor diana que los BSCI de lactama aquí descritos). La unión a los receptores no diana se evaluó mediante la competición por la unión de diversos ligandos radioactivos específicos a otros receptores que son bien conocidos en la técnica.

[0096] Para la unión específica de la línea celular mielomonocítica humana se resuspendió en tampón de unión (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4; 10^6 células por reacción) en 4°C en presencia de [3 H]-BN83250 10 nM (de una solución madre 1 μ M en etanol al 100%; 30 Ci/mmol) y varios competidores (concentración máxima del vehículo de DMSO al 1%). Las reacciones se incubaron durante 2 horas en hielo, después se filtraron a través de filtros GF/C previamente empapados en polietilenimina al 0,5%. El material no unido se separó por lavado con 5 x 5 ml de tampón de lavado enfriado en hielo (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) a un vacío lento. Se ha observado previamente que estas condiciones alcanzan la unión en equilibrio, con al menos el 80% de la unión específica (que compete con BN83250 frío 10 μ M).

[0097] La competición para el [3 H]-BN83250 específico con los compuestos (I'), (II) y (V) se determinó a continuación a varias concentraciones desde 1 pM a 10 μ M. Los compuestos (III) y (IV) no se examinaron en estos experimentos. En la figura 4 se muestra una curva de unión de competición típica para (I').

[0098] A continuación, el modelado no lineal se aplicó a la curvas de unión por competición para los diversos compuestos, con el fin de comparar sus propiedades como agentes de unión al receptor diana (definido como el sitio de interacción específica de BN83250). Los parámetros de los modelos resultantes se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Modelado no lineal de curvas de unión competitiva

Compuesto	ED50 funcional vs MCP-1 (pM)	Ka en el receptor diana (pM)	Pendiente Hill
(II)	80	8.200	-0,5
(III)	80	No analizado	No analizado
(V)	120	10.000	-0,5
(I')	50	50	-1,0
(IV)	80	No analizado	No analizado

[0099] Es importante indicar que el compuesto (I'), en marcado contraste con los BSCI de lactama (II) y (V), mostró una unión ideal y predecible al receptor diana. En particular, la aparente afinidad por la unión al receptor fue de una magnitud similar a la del valor de ED50 funcional en ensayos de inhibición de la migración. Del mismo modo, la pendiente de Hill fue de aproximadamente -1,0 (el valor esperado teóricamente para un modelo simple de unión competitiva no cooperativa), mientras que los otros BSCI de lactama mostraron pendientes de Hill considerablemente más profundas. La causa del alejamiento de la unión ideal al receptor diana para los compuestos (II) y (V) no se sabe, pero esta diferencia subraya adicionalmente la superioridad inesperada del compuesto (I').

[0100] La unión a los receptores no diana se evaluó utilizando protocolos similares, explotando radioligandos específicos para cada receptor que son bien conocidos en la técnica. Se probó cada compuesto por competición contra la unión específica de cada ligando sólo a una única concentración (10 μ M). Cuando la inhibición de unión fue entre el 20% y el 80%, se estimó el Ka para la interacción. Cuando la inhibición fue inferior al 20%, se suponía que el compuesto no tenía ninguna interacción competitiva con el receptor. Cuando la inhibición fue superior al 80% se describió la Ka inferior a 1 μ M. Los detalles de los receptores cribados, y los tipos de radioligandos utilizados en los ensayos están disponibles en www.cerep.fr.

[0101] Los resultados (figura 5) demuestran que todos los compuestos BSCI de lactama analizados están desprovistos de las principales reactividades cruzadas en base a este panel de 75 receptores (no se observaron interacciones con una Ka estimada inferior a 1 mM). Sólo se observó una reacción cruzada débil (pero estadísticamente significativa) (compuesto (II) con el receptor NK2). Sobre esta base, el compuesto (I') fue ligeramente más específico para el receptor diana que (II), pero todos la compuestos BSCI de lactama probados fueron adecuados para el desarrollo como productos farmacéuticos humanos en base a su falta de unión fuera de las dianas identificadas en este formato de ensayo de cribado de alto rendimiento.

Ejemplo 5. Actividad de inhibición de quimiocinas de amplio espectro in vitro

[0102] La actividad biológica de los compuestos de la presente invención puede demostrarse usando cualquiera de una amplia gama de ensayos funcionales de migración de leucocitos in vitro, incluyendo, pero sin limitación, la cámara de Boyden y ensayos de migración de transpocillo "transwell" relacionados, ensayos de migración bajo agarosa y las cámaras de visualización directa, tales como la Cámara de Dunn.

[0103] Por ejemplo, para demostrar la inhibición de la migración de los leucocitos en respuesta a quimiocinas (pero no a otros factores quimiotácticos) se ha utilizado el sistema de ensayo micro transpocillo en formato de 96 pocillos ChemoTx™ de Neuroprobe (Gaithersburg, MD, EE.UU.). En principio, este ensayo consiste en dos cámaras separadas por una membrana porosa. El factor quimiotáctico se coloca en el compartimiento inferior y las células se colocan en el compartimiento superior. Después de la incubación durante un período a 37°C, las células se mueven hacia el factor quimiotáctico, y el número de células en el compartimiento inferior es proporcional a la actividad del factor quimiotáctico (en relación con una serie de controles).

[0104] Este ensayo se puede utilizar con una variedad de diferentes poblaciones de leucocitos. Por ejemplo, se pueden utilizar leucocitos de sangre periférica humana recién preparada. Alternativamente, se pueden preparar subconjuntos de leucocitos, incluyendo células polimorfonucleares o linfocitos o monocitos, utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la materia, tales como centrifugación en gradiente de densidad o separaciones con partículas magnéticas. Alternativamente, se pueden usar líneas celulares inmortales que han sido ampliamente validadas como modelos de leucocitos de sangre periférica humana, incluyendo, pero sin limitación, células THP-1 como modelo de monocitos o células Jurkat como modelo de células T sin tratar.

[0105] Aunque son aceptables un conjunto de condiciones para el ensayo para demostrar la inhibición de la migración de leucocitos inducida por quimiocinas (véase, por ejemplo, el consejo proporcionado por Frow et al. Med Res Rev. 2004;24(3):276-98 sobre las condiciones requeridas para interpretar los ensayos de migración in vitro), en el presente documento se proporciona un ejemplo específico.

Materiales

[0106] Los sistemas de migración de transwells ("transwell") están fabricados por Neuroprobe, Gaithersburg, MD, USA. Las placas utilizadas son placas ChemoTx™ (Neuroprobe 101-8) y placas claras de 30 µl (Neuroprobe MP30).

[0107] La solución salina tamponada de Geys se adquiere de Sigma (Sigma G-9779). La BSA libre de ácidos grasos se adquiere de Sigma (Sigma A-8806). MTT, es decir, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio se adquiere de Sigma (Sigma M-5655). RPMI-1640 sin rojo fenol se adquiere de Sigma (Sigma R-8755).

[0108] Se utilizó la línea celular THP-1 (European Cell Culture Collection) como población de células de leucocitos.

Protocolo de prueba

[0109] Se utiliza el siguiente protocolo para analizar la capacidad del compuesto de la presente invención para bloquear específicamente la migración de leucocitos inducida por quimiocinas:

[0110] En primer lugar, se prepara la suspensión celular a colocar en el compartimento superior. Las células THP-1 se agrupan mediante centrifugación (770 x g; 4 minutos) y se lavan con solución salina tamponada de Geys con BSA 1 mg/ml (GBSS + BSA). A continuación, se repite este lavado y las células se vuelven a agrupar antes de volverse a suspender en un pequeño volumen de GBSS + BSA para el recuento, por ejemplo, utilizando un hemocitómetro estándar.

[0111] El volumen de GBSS + BSA se ajusta a continuación dependiendo del número de células presentes, de manera que las células están a una densidad final de $4,45 \times 10^6$ células por ml de GBSS + BSA. Esto asegura que hay 100.000 células THP-1 en cada 25 ml de la solución que se colocará en la cámara superior de la placa.

[0112] Para analizar un compuesto individual por su capacidad de inhibir quimiocinas, es necesario preparar dos lotes de células. La suspensión de células THP-1 a $4,45 \times 10^6$ células/ml se divide en dos recipientes. A un recipiente se añade el inhibidor de prueba a una concentración final apropiada, en un vehículo apropiado (por ejemplo a 1 µM en DMSO a no más del 1%). Al segundo recipiente se añade un volumen igual de GBSS + BSA más vehículo según sea apropiado (por ejemplo, no más de DMSO a no más del 1%) para actuar como control.

[0113] A continuación, se prepara la solución de factor quimiotáctico a colocar en el compartimento inferior. Por ejemplo, se diluye MCP-1 en GBSS + BSA para proporcionar una concentración final de 25 ng/ml. Se divide en dos recipientes como para la suspensión de células. A un recipiente, se añade el compuesto de prueba a la misma concentración final a la que se añadió a la suspensión celular, mientras que al otro recipiente se añade un volumen igual de GBSS + BSA más vehículo según sea apropiado (por ejemplo, DMSO a no más del 1%). Alternativamente, se pueden usar otras quimiocinas (SDF-1α a 7,5 ng/ml; RANTES a 50 ng/ml; IL-8 a 10 ng/ml usando neutrófilos como la población de células diana). En cada caso, es importante para determinar (en un experimento separado) la concentración de cada quimiocina que causa la estimulación máxima de la migración de la población de leucocitos diana elegida. Esta concentración máxima debe utilizarse a continuación en experimentos para probar la actividad inhibidora de los compuestos de la invención. Debido a que las quimiocinas inducen habitualmente la migración de leucocitos con una curva de dosis-respuesta en forma de campana, el uso de una concentración submáxima o supramáxima de quimiocinas puede conducir a resultados falsos (por ejemplo, un compuesto que es un inhibidor de quimiocinas puede producir una estimulación paradójica de la migración de leucocitos si se selecciona incorrectamente una concentración supramáxima de factor quimiotáctico para la experimentación. Otras ilustraciones de este importante factor en el diseño de los experimentos de migración de leucocitos in vitro se proporcionan por Frow y colegas (Med Res Rev. 2004; 24 (3) :276-98). Además, los factores quimiotácticos no quimiocinas también se pueden usar para demostrar la selectividad por quimiocina de la actividad biológica de los compuestos de la invención (por ejemplo, C5a a 25ng/ml usando neutrófilos como la población de células diana o TGF-β1 a 10 ng/ml utilizando células THP-1 como la población diana).

[0114] Cabe indicar que el volumen de líquido que se necesita añadir con la adición del compuesto de prueba debe tenerse en cuenta, cuando se establece la concentración final de MCP-1 en la solución para el compartimiento inferior y la concentración final de células en el compartimiento superior.

[0115] Una vez se han preparado las soluciones de factores quimiotácticos para los pocillos inferiores y las soluciones de células para las cámaras superiores, debe ensamblarse la cámara de migración. Se colocan 29 µl de la solución de factores quimiotácticos apropiados en el pocillo inferior de la cámara. Los ensayos deben realizarse con determinaciones por lo menos por triplicado de cada condición. Una vez que todas las cámaras inferiores se han llenado, se aplican la membrana porosa a la cámara de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por último, se aplican 25 µl de la solución de células apropiada a cada cámara superior. Se coloca una tapa de plástico sobre todo el aparato para evitar la evaporación.

[0116] La cámara ensamblada se incuba a 37°C, 5% CO₂ durante 2 horas. También se incuba una suspensión de células en GBSS + BSA bajo las mismas condiciones en un tubo: estas células se utilizarán para construir una curva estándar para determinar el número de células que han migrado hasta la cámara inferior bajo cada condición.

[0117] Al final de la incubación, la suspensión celular líquida se extrae suavemente de la cámara superior y se añaden 20 ml de EDTA 20 mM enfriado en hielo en PBS a la cámara superior y el aparato se incuba a 4°C durante 15 minutos. Este procedimiento provoca que cualquier célula que se adhiera a la parte inferior de la membrana caiga a la cámara inferior.

[0118] Después de esta incubación, el filtro se enjuaga con GBSS + BSA para separar por lavado el EDTA y a continuación se extrae el filtro.

[0119] A continuación, se puede determinar el número de células que migraron a la cámara inferior bajo cada condición mediante un conjunto de métodos, incluyendo el recuento directo, el marcaje con marcadores fluorescentes o radiactivos o mediante el uso de un colorante vital. Normalmente, se utiliza el colorante vital MTT. Se añaden 3 µl de solución madre de MTT a cada pocillo, y a continuación, la placa se incuba a 37°C durante 1-2 horas tiempo durante el cual las enzimas deshidrogenasa dentro de las células convierten el MTT soluble en un producto formazán azul insoluble que se puede cuantificar espectrofotométricamente.

[0120] En paralelo, se establece una curva estándar de 8 puntos. Empezando con el número de células añadidas a cada una de las cámaras superiores (100.000) y bajando en diluciones en serie de 2 veces en GBSS + BSA, se añaden las células a una placa en 25 µl añadiendo 3 µl de una solución madre de MTT.

[0121] Al final de esta incubación, el líquido se extrae con precaución de las cámaras inferiores, cuidando de no alterar el producto de formazán precipitado. Después de permitir un breve secado al aire, se añaden 20 ml de DMSO a cada una de las cámaras inferiores para solubilizar el colorante azul y se determina la absorbancia a 595 nm utilizando un lector de placas de 96 pocillos. A continuación, se interpola la absorbancia de cada pocillo a la curva estándar para estimar el número de células en cada una de las cámaras inferiores.

[0122] La migración estimulada por factores quimiotácticos se determina restando el número promedio de células que alcanzan el compartimiento inferior en pocillos donde no se añadieron factores quimiotácticos del número promedio de células que alcanzan el compartimiento inferior donde estaban presentes los factores quimiotácticos.

[0123] El impacto de la sustancia de prueba se calcula comparando la migración inducida por factores quimiotácticos que tuvo lugar en presencia o ausencia de varias concentraciones de la sustancia de prueba. Habitualmente, la inhibición de la migración se expresa como un porcentaje de la migración total inducida por factores quimiotácticos que fue bloqueada por la presencia del compuesto. Para la mayoría de los compuestos, se construye un gráfico de dosis-respuesta mediante la determinación de la inhibición de la migración inducida por factores quimiotácticos que se produce en un intervalo de diferentes concentraciones del compuesto (habitualmente variando desde 1 nM a 1 µM o mayor en el caso de compuestos poco activos). La actividad inhibidora de cada compuesto se expresa a continuación como la concentración de compuesto requerida para reducir la migración inducida por factores quimiotácticos en el 50% (la concentración ED₅₀). Habitualmente, se ha utilizado la migración inducida por MCP-1 de células THP-1 como el sistema de ensayo normalizado para la comparación de la actividad biológica de una amplia gama de compuestos (véase, por ejemplo, Reckless & Grainger Biochem J. 1999 Jun 15;340 (Pt 3):803-11; Reckless et al. Immunology. 2001 Jun; 103(2):244-54; Fox et al. J Med Chem. 2002 Jan 17;45(2): 360-70; Fox et al. J Med Chem. 2005 Feb 10;48(3):867-74; las solicitudes internacionales *supra*). Los compuestos que inhiben la migración de leucocitos inducida por más de una quimiocina, pero no por factores quimiotácticos que no son quimiocinas (tales como TGF-β o C5a), se definen como de Inhibidores de quimiocinas de amplio espectro (BSCI; véase, por ejemplo Grainger y Reckless Biochem Pharmacol. 2003 Apr 1;65(7):1027-34; Grainger et al. Mini Rev Med Chem. 2005 Sep;5(9):825-32).

Resultados

[0124] En la figura 6 se muestra una curva de dosis-respuesta típica para el compuesto (I') que inhibe la migración de células THP-1 inducida por MCP-1, junto con curvas de dosis-respuesta comparables para los otros BSCI de lactama seleccionados por tener una potencia particularmente elevada (es decir, < 1 nM). En la tabla 6 se muestra la potencia del compuesto (I') frente a varias quimiocinas y factores quimiotácticos que no son quimiocinas, expresada como valores ED50, y se compara con otros BSCI de lactama descritos previamente.

[0125] Está claro a partir de estos datos que el compuesto (I') se puede clasificar como un BSCI (ya que inhibe poderosamente y potentemente la migración de leucocitos inducida por una variedad de quimiocinas, pero no tiene efecto sobre la migración de leucocitos inducida por un factor quimiotáctico que no es quimiocina, en este caso la anafilatoxina C5a). Además, es evidente que el compuesto (I') es al menos tan potente y poderoso como un BSCI in vitro como los BSCI de lactama seleccionados que han sido previamente descritos (por ejemplo, el compuesto (II) en WO2006/016152 o el compuesto (IV) en WO2005/053702). Todos los BSCI de lactama aquí examinados son considerablemente más potentes que cualquiera de los BSCI no de lactama que se han descrito hasta la fecha (incluyendo imidas, tales como NR58, 4, yohimbamidas, lisergamidas y péptido 3 y estructuras relacionadas, tales como NR58-3.14.3). De hecho, el compuesto (I') es más potente como BSCI in vitro (al menos contra la migración inducida por MCP-1) que cualquier otro compuesto descrito o divulgado previamente. Aunque esta potencia como BSCI es cuantitativamente superior a los BSCI en la técnica anterior (aunque en un grado pequeño), esta propiedad no es la que marca principalmente el compuesto (I) como inesperadamente superior a los BSCI de la técnica anterior. En cambio, esto demuestra que se han logrado las propiedades de ADME y farmacocinéticas inesperadas, y sustancialmente superiores, del compuesto (I) en comparación con una amplia gama de BSCI descritos previamente, sin pérdida de poder o potencia como BSCI in vitro.

Tabla 6. Efecto de BSCI de lactama seleccionados en la migración de leucocitos in vitro.

Compuesto	MCP-1	SDF-1 α	RANTES	neutrófilos IL-8	neutrófilos C5a
(II)	80	100	100	600	> 1.000.000
(III)	80	No analizado	No analizado	No analizado	No analizado
(V)	120	200	250	500	> 1.000.000
(I')	50	50	80	600	> 1.000.000
(IV)	800	No analizado	No analizado	No analizado	No analizado

[0126] En cada caso se muestra la dosis del compuesto (en pM) requerida para inhibir la migración de leucocitos en respuesta a una dosis máxima del factor quimiotáctico indicado en un 50% (la ED50). A menos que se indique lo contrario, los datos se indican para las líneas celulares THP-1. Para la migración inducida por C5a, ninguno de los compuestos probados inhibió la migración de neutrófilos en ningún grado incluso a la concentración más elevada probada (1 μ M).

Ejemplo 6. Actividad antiinflamatoria in vivo

[0127] Se ha utilizado el ensayo de la endotoxemia inducida por LPS subletal para demostrar las propiedades antiinflamatorias generalizadas in vivo de BSCI descritos previamente (véase, por ejemplo, Fox et al. J Med Chem. 2002; 45 (2) :360-70; Fox et al. J Med Chem. 2005; 48 (3): 867-74). En este ensayo, se administraron a los ratones una estimulación proinflamatoria no específica utilizando endotoxina bacteriana (LPS), y el grado de respuesta inflamatoria sistémica (medido por los niveles en suero de la citoquina proinflamatoria central TNF- α , que está esencialmente ausente de la sangre en condiciones normales, pero se eleva rápidamente en respuesta a una amplia gama de estímulos inflamatorios). Se ha seleccionado este modelo a pesar de que no es por sí mismo un modelo particularmente próximo a cualquier enfermedad inflamatoria humana, sino porque se sabe que el TNF- α es importante en muchas enfermedades (incluyendo la artritis reumatoide, trastornos autoinmunes, enfermedad de Crohn, aterosclerosis, asma y muchas más). En consecuencia, los agentes que suprimen la producción de TNF- α ya se utilizan clínicamente (por ejemplo, EnbrelTM y otros productos de anticuerpos anti-TNF- α) para tratar una amplia gama de dichas enfermedades. Por lo tanto, la demostración de la actividad supresora de TNF- α en este modelo es altamente predictivo de un efecto antiinflamatorio clínicamente útil en una amplia gama de enfermedades.

[0128] Los ratones (en grupos de 6) se trataron previamente con varias dosis de cada compuesto, ya sea por vía subcutánea 30 minutos antes del estímulo con LPS, o por vía oral (a través de sonda) 60 minutos antes de la LPS. Los ratones se estimularon a continuación con una inyección intraperitoneal de 750 μ g de LPS bacteriana y se sacrificaron 3 horas más tarde. El suero se preparó a partir del sangrado terminal por punción cardíaca, y se determina la concentración de TNF- α mediante ELISA (R & D Systems). En cada experimento, un grupo de 6 ratones no reciben LPS para actuar como control negativo, y un segundo grupo recibe sólo LPS (sin inhibidor del candidato). El nivel de TNF- α en el suero de estos animales, que recibieron LPS sin tratamiento previo con fármaco, se fija arbitrariamente a 100% (y es habitualmente del orden de 6.000 pg/ml, en comparación con los niveles inferiores a 10 pg/ml entre el grupo de control negativo). Se ha demostrado anteriormente que el corticosteroide sintético, la dexametasona, (en sí misma un medicamento anti-inflamatorio conocido activo en una amplia gama de

enfermedades inflamatorias) inhibe el la producción de TNF- α inducida por LPS en al menos un 90% en este modelo, mientras que la talidomida (otro inhibidor de la producción de TNF- α publicado, que actúa a nivel de la producción de TNF- α celular en lugar de como un inhibidor de reclutamiento de leucocitos como los BSCI descritos aquí) inhibe la producción de TNF- α inducida por LPS en aproximadamente un 60%.

[0129] En la figura 7 se muestra el efecto del compuesto (I') a varias dosis, así como otros BSCI de lactama seleccionados. Tal como se esperaba, el compuesto inhibe poderosamente la producción de TNF- α inducida por LPS tanto si el compuesto se administra por vía subcutánea (círculos) como por vía oral (triángulos). A dosis por encima de 1 μ g/ratón, los niveles de TNF- α inducidos por LPS se suprimieron en general en más del 90%, en comparación con los efectos del corticosteroide dexametasona.

[0130] Los otros BSCI de lactama probados también inhibían la TNF- α inducida por LPS de una manera dependiente de la dosis (figura 7), aunque la potencia in vivo de (I') era superior que cualquiera de los otros compuestos probados (y, de hecho, mayor que la potencia de otros BSCI de lactama previamente descritos en la literatura que han sido probados en este ensayo). Este incremento cuantitativo (aunque pequeño) en la potencia no es la razón principal de que se reivindique en el presente documento el compuesto (I) como inesperadamente superior a los BSCI de la técnica anterior. En cambio, esto demuestra que se han logrado las propiedades de ADME y farmacocinéticas, inesperadas y sustancialmente superiores, del compuesto (I) en comparación con una amplia gama de BSCI descritos previamente, sin pérdida de poder o potencia como agente antiinflamatorio in vivo. Además, estos resultados demuestran claramente la utilidad de (I) como agente antiinflamatorio in vivo, en un modelo de inflamación que indica la utilidad en una amplia variedad de enfermedades inflamatorias donde el aumento de la producción de TNF- α es un componente del mecanismo patogénico.

[0131] Es importante indicar que la inflamación hiperaguda observado en este modelo es particularmente insensible a las propiedades de ADME y farmacocinéticas de los agentes antiinflamatorios probados. Dado que la estimulación con LPS se administra sólo 30 minutos después del fármaco, incluso agentes con tiempos de residencia en plasma muy cortos (tales como los compuestos (II) y (III)) permanecen presentes en el plasma a concentraciones suficientes para provocar un efecto antiinflamatorio potente. Por tanto, mientras que una prueba de este tipo no hace hincapié en la superioridad de los compuestos reivindicados sobre la técnica anterior, demuestra, no obstante, la utilidad del compuesto.

[0132] La utilidad del compuesto reivindicado se demuestra adicionalmente mediante estudios en un modelo animal de la enfermedad de asma humana (la respuesta inflamatoria hiperaguda observada en respuesta a la exposición a LPS puede no ser típica de cualquier enfermedad humana particular, aunque es claramente un sistema de modelo útil de inflamación aguda en general). En estos estudios, los roedores (normalmente ratas) están expuestos a ovoalbúmina, de acuerdo con el siguiente diseño experimental;

[0133] Se sensibilizaron ratas adultas marrón de Noruega (200-300 g de peso corporal, n = 10 por grupo) mediante una única inyección intraperitoneal de 0,1 mg de ovoalbúmina en el día 0. Cada rata recibió a continuación un estímulo intratraqueal con una solución de ovoalbúmina al 1% (p/v) en el día 8, y ovoalbúmina al 2% (p/v) en los días 15, 18 y 21. Los animales se sacrificaron entonces 3 horas después de la estimulación final en el día 21. Cabe indicar que la ovoalbúmina (Sigma; grado más puro disponible) se liberó de endotoxinas mediante el paso por columnas Red EndoTrapTM (adquiridas de Cambrex; utilizadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante), y el nivel de endotoxina se confirmó como inferior a 5 EU/mg de proteína usando el ensayo de LAL (QCL-1000TM; Cambrex; realizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante; 1 mg de endotoxina estándar contiene ~900.000 EU/mg). Esto asegura que la respuesta a la inflamación del pulmón resulta de la respuesta alérgica a la proteína ovoalbúmina, en lugar de la estimulación con LPS no deseada que se produce incluso con los preparados comerciales de ovoalbúmina de grado de pureza más elevado, y por lo tanto asegura el modelo que más estrechamente representa la patología molecular subyacente del asma humana .

[0134] Un grupo de ratones (que actúan como control de línea de base) no recibieron estimulaciones de ovoalbúmina, sino que fueron tratados de forma idéntica. Un segundo grupo (control positivo) recibió las estimulaciones, pero sin tratamiento con fármacos. Un tercer grupo se trató de forma idéntica, pero recibió una dosificación diaria con el compuesto (I') a una dosis de 0,3 mg/kg a través de una sonda oral desde el día 8 hasta el día 21, administrando la dosis 1 hora antes de realizar cualquier estimulación posterior con ovoalbúmina en el mismo día. El compuesto (I') se administró como una solución estéril en solución salina tamponada con fosfato libre de endotoxinas. Un cuarto grupo recibió monteleukast (el componente activo de la medicación para el asma disponible comercialmente SingulairTM) a 30 mg/kg por vía oral, en un programa de tratamiento idéntico al compuesto (I').

[0135] En el sacrificio, se evaluó el reclutamiento total de leucocitos pulmonares mediante la realización de un lavado bronqueoalveolar (BAL) con 4 lotes de 3 ml de solución salina tamponada con fosfato estéril introducida a través de una cánula traqueal. Para cada animal, se combinaron los lavados BAL, y se contó la población total de células (usando un hemocitómetro). Además, se estimaron los tipos de leucocitos presentes utilizando un citómetro de flujo de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica.

[0136] También se extrajo el bazo de cada ratón y se colocó en RPMI + 10% FCS + antibióticos. A continuación, el bazo se presionó a través de mallas finas (100 µm) de nylon en una copa de tamiz estéril colocada en una placa de Petri estéril para producir suspensiones de una sola célula. A continuación, la suspensión celular resultante se centrifugó (328 g; 5 minutos) y se lavó en RPMI + 10% de FCS + antibióticos, antes de ser resuspendida en medio fresco y se contaron usando un hemocitómetro.

[0137] Se cultivaron 4×10^6 esplenocitos (excluyendo los glóbulos rojos) en total (37°C, 5% CO₂) en RPMI + 10% FCS + antibióticos, durante la noche en presencia de 2 U/ml (10 ng/ml) de IL-2 murina en 4 pocillos de una placa de 96 pocillos (volumen de 100 µl por pocillo/ 1×10^6 células/pocillo) de cada ratón. Aproximadamente 24 horas más tarde, los 4 pocillos se dividieron en dos grupos de 2 pocillos: un grupo se dejó sin tratar, mientras que el segundo grupo se estimuló con 500 ng/ml de ionomicina y 50 ng/ml de PMA durante 4 horas a 37°C. Durante las últimas dos horas de esta incubación, se añadió Brefeldina A (solución madre de 1 mg/ml en EtOH) 10 µg/ml a un pocillo de cada grupo. La Brefeldina A bloquea el transporte de proteínas a Golgi y por lo tanto permite la acumulación de proteínas en el ER.

[0138] Los pocillos sin Brefeldina A se incubaron durante 48 horas adicionales a 37°C. Al final de la incubación, las suspensiones celulares se centrifugaron (328 g; 5 min) y el sobrenadante se sometió a ensayos ELISA (R&D Systems; realizados de acuerdo con las instrucciones del fabricante) para IL-4 murina (un marcador de células Th2) e interferón-γ murino (IFN-γ; un marcador de células Th1).

[0139] Los pocillos con Brefeldina A se tiñeron para la IL-4 y el IFN-g intracelular inmediatamente al final de las cuatro horas de incubación de la siguiente manera: las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD4-FITC (IgG2b de rata eBioscience, Código del catálogo 11-0041) durante 30 minutos sobre hielo, a continuación se lavaron en PBS de Dulbecco y se fijaron con paraformaldehído al 2% (concentración final) en PBS de Dulbecco durante 20 minutos. Después de la fijación las células se permeabilizaron con PBS de Dulbecco/BSA al 1%/saponina al 0,5% (Sigma S7900) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células de cada pocillo se dividieron a continuación en tres tubos FACS separados y se incubaron con:

- IFN-g-PE (IgG1 de rata eBioscience, Código del catálogo 12-7311-82, 100 µg) O
- IL-4-PE (IgG1 de rata eBioscience, Código del catálogo 12-7041-82, 100 µg) O
- Controles isotipo (una mezcla IgG2b-FITC de rata, eBioscience, Código del catálogo 11-4031 y IgG1-PE de rata, eBioscience, Código del catálogo 12-4301)

durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron (dos veces con PBS/BSA/saponina y a continuación con PBS/BSA sin saponina para permitir el cierre de la membrana) y se resuspendieron en PBS de Dulbecco listas para el análisis por citometría de flujo.

[0140] Se analizaron las células con tinción específica para CD4 en el canal FITC (se las identifica como células T auxiliares) por la presencia de la tinción específica para cualquiera de IL-4 o IFN-g en el canal de PE. A continuación, se indicó la proporción de células CD4+ con tinción positiva para IFN-g con respecto a células CD4+ con tinción positiva para IL-4 como la relación Th1/Th2. Las ratas marrones de Noruega no tratadas tienen una relación Th1/Th2 de aproximadamente 2,7 en el bazo (es decir, aproximadamente 2,7 veces más células CD4+ en el bazo están sintetizando INF-g como IL-4). Después de sensibilización y estimulación repetida con ovalbúmina, la relación se había reducido a menos de 1,5 lo que demuestra la polarización de Th2 marcada que acompaña a los cambios asmáticos en roedores y seres humanos (una relación inferior de Th1/Th2 indica la polarización de Th2 relativa, mientras que una relación de Th1/Th2 creciente indica una polarización de Th1 relativa).

[0141] La dosificación diaria con el compuesto (I') y el compuesto comparador de control positivo monteleukast redujo significativamente el número de leucocitos en los lavados BAL (reducción del 70% con el compuesto (I'); $p < 0,01$ test t de Student no apareado; figura 8).

[0142] Esto demuestra inequívocamente que el compuesto de la invención tiene un efecto antiinflamatorio útil en un modelo de asma humano, resultante de su capacidad de bloquear la migración de leucocitos en respuesta a quimiocinas. La magnitud de dicho efecto es al menos comparable con el de medicamentos comercialmente disponibles destinados al tratamiento del asma humano (tal como Singular™), mientras que los excelentes parámetros farmacocinético y de biodistribución del compuesto (I') se ilustran por la potencia considerablemente incrementada en comparación con monteleukast (es necesaria una dosis de 30 mg/kg de monteleukast para generar una reducción similar en el recuento de leucocitos BAL en comparación con una dosis de sólo 0,3 mg/kg del compuesto (I')).

[0143] La dosificación diaria con el compuesto (I'), pero no con el compuesto comparador de control positivo monteleukast, invirtió significativamente la polarización de Th2 (figura 9), que se considera un importante inductor de la patogénesis del asma tanto en el modelo de inflamación pulmonar inducida por ovalbúmina usado aquí, como en el asma humana. El tratamiento con el compuesto (I'), incluso a dosis bajas, tales como 0,3 mg/kg, a través de la vía oral, suprime completamente la polarización de Th2 causada por la exposición crónica a alérgenos, tales como la ovalbúmina, de tal manera que el equilibrio Th1/Th2 en los animales tratados con compuesto (I') es esencialmente indistinguible de ratas marrones de Noruega no estimuladas.

[0144] Es interesante indicar que otras enfermedades inflamatorias crónicas, tales como la aterosclerosis, se asocian con la polarización de Th1 (en oposición a Th2). En ambos tipos de enfermedades, el desequilibrio en el perfil de citocinas de células T auxiliares ha sido descrito como una causa principal patogénica del componente inflamatorio crónico de la enfermedad. En los modelos de una enfermedad asociada con una polarización de Th1 (tal como en la aterosclerosis) se ha observado previamente un cambio destacado hacia Th2 en el tratamiento con BSCI, tal como el compuesto (I') reivindicado en el presente documento. Los ratones con una delección homocigota del gen que codifica apoE (ratones apoE^{-/-}) desarrollan varias lesiones vasculares lipídicas, incluso en una dieta de pienso normal, y tienen una relación Th1/Th2 de aproximadamente 8 (en comparación con 3,2 en la cepa de tipo salvaje C57B16 de base). Sin embargo, después del tratamiento con BSCI durante un periodo de 3 meses (de 12 semanas de edad a 24 semanas de edad, el período durante el cual se produce la mayor parte del desarrollo de la lesión lipídica) se normaliza la relación Th1/Th2 (e incluso provoca una polarización de Th2 a dosis muy altas en este modelo). Tomados en conjunto con los datos en el modelo de inflamación pulmonar inducida por ovoalbúmina de asma, se ha demostrado que los BSCI son capaces de normalizar o reequilibrar el perfil de producción de citoquinas de células T auxiliares con independencia de si el defecto patogénico subyacente es una polarización de Th2 (como en el asma) o una polarización de Th1 (como en la aterosclerosis). Se cree que los BSCI son actualmente los únicos agentes descritos que tienen este efecto de "reequilibrio" sobre la población de células T auxiliares. Estas ideas mecanicistas apoyan adicionalmente (junto con los datos de eficacia en numerosos modelos animales de diferentes enfermedades con un componente inflamatorio) la afirmación de que los BSCI, y, en particular, el compuesto (I) reivindicado en el presente documento (como resultado de sus propiedades farmacocinéticas y de biodistribución inesperadamente superiores) son útiles como medicamentos para tratar una gama inusualmente amplia de enfermedades con un componente inflamatorio.

Ejemplo 7. Comparación del compuesto (I') con análogos estructuralmente relacionados

[0145] Habiendo identificado el compuesto (I) por tener propiedades farmacéuticas sorprendentemente superiores, particularmente con respecto a su farmacocinética, en comparación con otros BSCI de acilaminolactama, a continuación se comparó directamente con los análogos estructuralmente más similares que se han descrito previamente.

[0146] El panel original de compuestos comparados en los ejemplos 1 a 6 se habían ensamblado para ser tan estructuralmente diversos como fuera posible, dentro de los límites de las BSCI de acilaminolactama descritos previamente. El compuesto (I) aseguró de que los "grupos de cabeza" lactama de 6 miembros fueran incluidos en el panel, aunque no hay ninguna razón especial para suponer que son generalmente superiores (o de hecho inferiores) a los compuestos con anillos lactámicos de 7 miembros (véase WO2006/134385 para una amplia comparación de análogos con acilaminolactama de diferentes tamaños de anillo con respecto a la potencia como BSCI in vitro). Del mismo modo, el panel incluye un solo ejemplo de una unión sulfonamida (IV) a diferencia del enlazador de amida en las moléculas restantes.

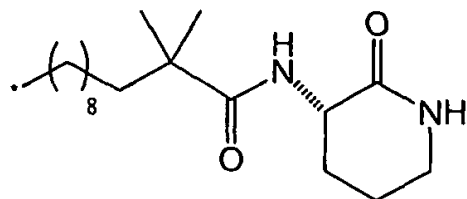
[0147] Con respecto a los 'grupos de cola', el panel incluía dos grupos alquilo simples (ambos pivófilo) y tres grupos alquilo cíclicos (un grupo metilciclohexilo, y dos adamantanos, uno de los cuales estaba sustituido). Los cinco compuestos compartían la disustitución 2'2 bien establecida con ángulos de enlace tetraédricos en el carbono clave (en la posición 2 con respecto al carbonilo del amidocarbonilo, con 4 átomos de carbono unidos a este carbono clave en una disposición tetraédrica). Esta característica de disustitución 2'2' en el átomo de carbono clave ya se ha descrito (WO2006/016152) por conferir una potencia adicional en BSCI en comparación con 'grupos de cola' de alquilo lineal, u otras estructuras que carecen de cuatro átomos de carbono unidos a este carbono clave en un disposición esencialmente tetraédrica.

[0148] Como resultado, se seleccionaron los 'grupos de cola' en el panel original con el requisito de tener esta característica de disustitución 2',2' para asegurar una adecuada potencia in vitro, pero también con el requisito de probablemente producir unas propiedades físicas aceptables en las moléculas resultantes. Por ejemplo, se esperaba que los grupos adamantano, ciclohexilo y alquilo 2'2-ramificados de cadena corta dieran lugar a compuestos con formas sólidas cristalina (o semicristalina), y con una solubilidad en agua aceptable. En cambio, se excluyeron del panel otros grupos de cola posibles, tales como 2',2'-dimetildodecanoilo (que se conforma de otra manera a la disposición deseable de átomos de carbono en la posición 2 clave), en base a sus formas físicas amorfas cerosas como sólidos y su extrema insolubilidad en tampones fisiológicos. Estos factores reducen la conveniencia de un compuesto para el desarrollo farmacéutico incluso antes de determinar las propiedades de ADME y toxicológicas porque hacen que el compuesto sea difícil de manipular, por ejemplo durante la formulación o formación de comprimidos, y esto aumenta la probabilidad de propiedades de ADME desfavorables, tales como la acumulación en reservas de grasa durante la administración crónica o la falta de biodisponibilidad oral.

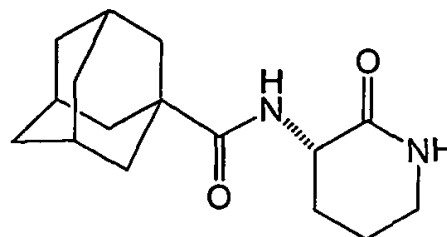
[0149] De este modo, los cinco compuestos examinados en los ejemplos 1 a 6 presentaban una posibilidad aproximadamente igual de ser adecuados para el desarrollo farmacéutico. Antes de determinar sus propiedades de ADME no era posible predecir cual sería superior.

[0150] Una vez que se completó la prueba descrita en los ejemplos 1 a 6, sin embargo, se hizo evidente que el compuesto (I) era sustancialmente e inesperadamente superior a los otros compuestos. Dado que el compuesto (I) era el único compuesto en el panel con un anillo de 6 miembros, era posible que las propiedades superiores fueran debidas al tamaño del anillo de lactama. Para determinar si esto era cierto, se revisaron todos los ejemplos descritos previamente de compuestos de acilaminolactama con actividad BSCI, y se seleccionaron los dos compuestos con mayor similitud estructural a (I). De todos los compuestos previamente conocidos con actividad de BSCI, estos eran los dos compuestos con la estructura más similar al compuesto (I).

[0151] Los compuestos seleccionados fueron 3-(2',2'-dimetildodecanoilamino)-tetrahidropiridin-2-ona (ejemplo 3 de WO2006/134385; designado aquí como VI) y 3-(adamantano-1-carbonilamino)-tetrahidropiridin-2-ona (ejemplo 1 de WO2006/134385; designado aquí como VII):



(VI)



(VII)

[0152] Estos compuestos comparten en común con (I) el anillo lactama de 6 miembros, el enlazador amida y la presencia de la disustitución en 2',2', con 4 átomos de carbono unidos al carbono clave en la posición 2 en relación con el grupo amidocarbonilo en una disposición esencialmente tetraédrica.

[0153] Los compuestos (VI) y (VII) se sometieron a un análisis farmacocinético en rata utilizando exactamente los mismos protocolos aplicados previamente para los compuestos (I) a (V) en el ejemplo 1. Cabe indicar que se utilizó el enantiómero (S) de (VI) y (VII) para estos experimentos, ya que se espera que sea el enantiómero más activo en común con los otros BSCI de acilaminolactama descritos hasta la fecha.

Resultados

[0154] Desafortunadamente, (VI) era un sólido ceroso con tendencia a retener disolvente. Fue difícil obtener una preparación de (VI) que estuviera libre de disolvente, pero esto finalmente se logró después de un considerable secado durante muchas semanas. Sin embargo, esta muestra era completamente insoluble en DMSO al 5% en solución salina, que se utiliza como vehículo para la dosificación intravenosa de los compuestos anteriores. Como resultado, fue necesario utilizar un vehículo totalmente diferente con el fin de preparar una solución adecuada para la administración intravenosa. El compuesto (VI) se disolvió en PEG400 al 50%/solutol al 20%/solución salina al 30% para la administración intravenosa. Todos los compuestos, incluyendo (VI), se suspendieron (o disolvieron) en carboximetilcelulosa al 1% en solución salina para la dosificación oral. Aunque no se recomienda generalmente comparar la biodisponibilidad oral entre experimentos utilizando diferentes vehículos (ya que el vehículo puede tener un impacto considerable en la absorción intestinal de compuestos), sin embargo, es muy poco probable que la selección del vehículo afecte significativamente en la vida media observada después de la inyección intravenosa de (VI) en comparación con otros compuestos, tales como (I).

[0155] En la tabla 7 se muestran los parámetros de un modelo simple farmacocinético de un compartimento. Los datos para el compuesto (I') de la tabla 1 anterior se muestran para comparación. Es evidente que (VI) y (VII) son ambos notablemente inferiores a (I'), con unas tasas de eliminación de más de 10 veces superiores y una exposición oral que es 25-50 veces inferior a la conseguida con (I')

Tabla 7: Parámetros farmacocinéticos para BSCI de acilaminolactama de 6 miembros en el anillo seleccionado

	F (%)	t _{1/2} (min)	Eliminación (ml/min/kg)	V _{ss} (l/kg)	Exposición (min.ng/ml)
(VI)	16	46	40,3	1,95	11.000
(VII)	35	20	31,1	0,7	32.500
(I')	69	196	2,6	0,7	939.000

[0156] La biodisponibilidad oral (F, %), la vida media en plasma dominante ($t_{1/2}$, minutos) después de la administración intravenosa, la eliminación (ml/min/kg), volumen de distribución (Vss, L/kg) y la exposición oral (AUC 0-t, min.ng/ml) de un modelo simple farmacocinético de un compartimiento para cada compuesto se promedió en tres ratas. Para **(VII)**, se alcanzó la Cmax en 15 minutos, en concordancia con una absorción óptima como para **(I')**. El **(VI)** hidrófobo se absorbió más lentamente, sin embargo, con una Tmax entre 60 y 120 minutos.

[0157] De hecho, es evidente a partir de la comparación de la tabla 7 con la tabla 1 que los compuestos **(VI)** y **(VII)** no son aún tan buenos como **(IV)** y **(V)** en cuanto a la exposición. A pesar de compartir el anillo de lactama de 6 miembros con **(I)**, los compuestos **(VI)** y **(VII)** tienen propiedades de ADME notablemente inferiores, y no son mejores que una amplia gama de otros compuestos BSCI de acilaminolactama que han sido previamente descritos.

[0158] En concordancia con la mayor eliminación para **(VI)** y **(VII)** en comparación con **(I')**, estos compuestos presentan vidas medias en plasma sustancialmente más cortas que **(I')** (inferior a 1 hora, en comparación con más de 3 horas).

[0159] En base a este análisis farmacocinético, será obvio para los expertos en la materia que a pesar de la estabilidad química similar, así como sus propiedades predichas similares por razones teóricas y su similitud en la estructura, sin embargo, **(I')** es notablemente superior a **(VI)** y **(VII)**, con una exposición oral 25-50 veces mejor que la de cualquiera de estos análogos de anillo de lactama de 6 miembros. Se concluye que las propiedades de ADME inesperadamente excelentes de **(I')** no se pueden atribuir al anillo de lactama de 6 miembros (ya que otros anillos de lactama de 6 miembros, tales como **(VI)** y **(VII)**, no comparten sus características espectaculares de ADME), ni el enlazador de amida (ya que otros compuestos con enlazadores de amida, incluyendo **(II)**, **(III)** y **(V)**, no comparten sus características espectaculares de ADME), ni al grupo de cola pivote (ya que el compuesto **(IV)** comparte este grupo y no tiene las características espectaculares de ADME de **(I')**). En cambio, las características sorprendentes y notablemente superiores de ADME de **(I')** dependen de la combinación particular de características estructurales, que no podían predecirse.

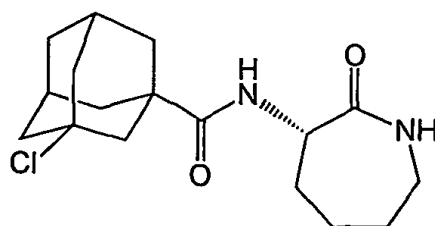
Ejemplo 8. Intento del diseño racional de un BSCI de acilaminolactama con propiedades de ADME equivalentes a **(I')**

[0160] En el proceso de identificación de las propiedades de ADME superiores del compuesto **(I')**, se ha analizado la farmacocinética de una variedad de diferentes acilaminolactamas con potencia subnanomolar como BSCI in vitro. Como resultado, se esperaba obtener algo de información sobre los factores que modulan las propiedades de ADME para moléculas de este espacio estructural. Por lo tanto, se trató de utilizar esta experiencia para seleccionar un segundo compuesto BSCI de acilaminolactama entre las clases estructurales descritas previamente con propiedades de ADME lo más parecidas posibles a las de **(I')**

[0161] La eliminación relativamente rápida de **(IV)** en comparación con **(I')** (véase la tabla 1 anterior) sugería que la amida enlazadora se puede correlacionar con propiedades de ADME superiores. Por lo tanto, se limitó la selección a compuestos con enlazadores de amida.

[0162] El compuesto **(II)** se absorbió muy bien, pero se convirtió rápidamente en **(V)** in vivo, presumiblemente a través de la acción de la isoenzima o isoenzimas del citocromo P450 del hígado. El compuesto **(V)** en sí mismo aparentemente no se oxidó más (probablemente como resultado del sustituyente extractor de electrones en el anillo de adamantina), pero, sin embargo, se eliminó de manera relativamente rápida. La ausencia de metabolitos primarios detectables en la orina sugiere fuertemente que la rápida eliminación estaba mediada por la formación de un conjugado de fase II, tal como el glucurónido, que en rata se excreta en las heces. Los conjugados de la fase II se forman fácilmente en grupos hidroxilo, tales como el 3-hidroxiadamantano en **(V)**. Como resultado, se ha propuesto que un derivado de **(II)** con un sustituyente extractor de electrones estable (para evitar la hidroxilación del anillo de adamantina por el citocromo P450 u otras hidroxilasas u oxidasas del hígado) que era incapaz de formar conjugados de la fase II, tal como un sustituyente halógeno, puede tener las propiedades de ADME óptimas que se estaban buscando.

[0163] Como resultado, se sintetizó y probó el compuesto **(VIII)** a continuación. Se seleccionó el análogo sustituido con cloro (sobre el análogo sustituido con flúor, por ejemplo, porque éste era un compuesto conocido (véase el ejemplo 8 en WO2006/016152) para el que estaba disponible fácilmente una ruta sintética. Además, la introducción de enlaces C-F alifáticos es sintéticamente desafiante y puede incrementar el coste de productos para obtener el principio activo farmacéutico en un orden de magnitud o más.



(VIII)

[0164] Al igual que antes (véase el ejemplo 7), se eligió preparar y evaluar el (S)-enantiómero de este compuesto, ya que, en general, los (S)-enantiómeros de compuestos de acilaminolactama son conocidos porque tienen una mayor actividad de BSCI in vitro.

[0165] Una preocupación obvia relacionada con esta molécula era la estabilidad del enlace C-Cl. Por lo tanto, se examinó la estabilidad de (VIII) in vitro, tanto en solución salina fisiológica como en una preparación microsomal de hígado de rata. De manera alentadora, menos del 2% de (VIII) había experimentado hidrólisis (determinado por LC/MS, con la detección dual de iones del producto de hidrólisis (V) y el compuesto de origen (VIII)) incluso después de 24 horas a 37°C. De manera similar, la incubación de (VIII) en a 1 µM con una preparación de microsomas de rata durante 1 hora a 37°C dio lugar a la degradación de menos del 10% en comparación con un ensayo de blanco "sin NADPH". Como resultado, se concluyó que el compuesto (VIII) tiene una estabilidad in vitro y una eliminación intrínseca similares a (I').

[0166] De este modo, en base a fundamentos teóricos utilizando la experiencia obtenida del descubrimiento de (I'), así como el conocimiento general en la técnica de predecir las propiedades de ADME, así como la utilización de ensayos de cribado in vitro convencionales, tales como la estabilidad in vitro y la eliminación intrínseca en preparaciones de microscopio del hígado, se esperaba que el compuesto (VIII) tuviera las propiedades de ADM comparables con (I').

[0167] Por lo tanto, se sometió (VIII) a análisis farmacocinético en rata utilizando exactamente los mismos protocolos aplicados previamente para los compuestos (I') a (VII) en los ejemplos 1 y 7.

Resultados

[0168] Los parámetros de un modelo farmacocinético simple de un compartimento se muestran en la tabla 8. Los datos para el compuesto (I') de la tabla 1 anterior se muestran para comparación. Es evidente que el compuesto (VIII) es notablemente inferior a (I'), con una velocidad de eliminación más de 20 veces superior y sin biodisponibilidad oral detectable en absoluto.

Tabla 8: Parámetros farmacocinéticos para BSCI de lactama seleccionado

	F (%)	t _{1/2} (min)	Eliminación (ml/min/kg)	V _{ss} (l/kg)	Exposición (min.ng/ml)
(VIII)	<1%	15	62,8	0,7	<100
(I')	69	196	2,6	0,7	939.000

[0169] La biodisponibilidad oral (F, %), la vida media en plasma dominante (t_{1/2}, minutos) después de la administración intravenosa, la eliminación (ml/min/kg), volumen de distribución (V_{ss}, L/kg) y la exposición oral (AUC 0-t, min.ng/ml) de un modelo simple farmacocinético de un compartimento para cada compuesto se promedió en tres ratas. Para (VIII), el nivel de analito fue inferior al límite de cuantificación (~ 2 ng/ml) en todos los puntos de tiempo después de la administración oral.

[0170] En conclusión, el compuesto (VIII), que se había seleccionado en base a consideraciones teóricas y en las pruebas de cribado in vitro por tener propiedades ADME óptimas, estaba, sin embargo, entre los compuestos de acilaminolactama menos adecuados, al menos entre aquellos cuya PK se ha determinado, para el desarrollo como agente farmacéutico. El compuesto mostró una eliminación rápida, dando lugar a una vida media en plasma corta y, además, no mostró una biodisponibilidad oral en absoluto.

[0171] El grado de superioridad del compuesto (I') se ilustra en la figura 10. Aquí, se han representado dos parámetros PK (vida media en plasma y exposición oral) para cada compuesto BSCI para los que se ha analizado la farmacocinética en ratas. El compuesto (I') se encuentra lejos del grupo, representando las propiedades

generalmente malas de ADME de los compuestos en este espacio estructural (y no atípico de muchas clases completamente no relacionadas de candidatos de fármaco), lo que indica que el compuesto (I') es de forma inesperada, y inusual, superior.

5 Ejemplo 9. Comparación de los enantiómeros (S) y (R) de (I)

10 [0172] Se ha observado que el compuesto (I') tiene propiedades de ADME inesperadas y notablemente superiores (véase el ejemplo, 1). Este compuesto tiene un átomo de carbono asimétrico (en la unión del anillo con el enlazador de amida) y, en consecuencia, existe en dos estereoisómeros: el enantiómero (S) designado (I') y el enantiómero (R) opuesto, designado como (R)-(I).

15 [0173] Como con todos los otros BSCI de acilaminolactama descritos hasta la fecha, el (S)-enantiómero de (I) es más potente como BSCI in vitro que el correspondiente (R)-enantiómero. Es por esta razón por la que (I') se ha estudiado en la mayoría de los experimentos en lugar del (R)-enantiómero aislado o una mezcla de los enantiómeros. Sin embargo, es poco probable que las propiedades ADME estén relacionadas con la actividad farmacológica primaria. De hecho, para muchos compuestos las propiedades de ADME de pares enantioméricos son muy similares, ya que (en muchos casos) las propiedades físicas del compuesto son particularmente dominantes en la determinación de la disposición in vivo, y las propiedades físicas de los pares enantioméricos son idénticas.

20 [0174] Como resultado, se probó si el (R)-enantiómero comparte las propiedades de ADME particularmente excelentes de (I'). Dado que la utilidad de cualquier compuesto particular depende tanto de la potencia del efecto o efectos farmacológicos primarios como de la disposición de la molécula in vivo (ya que para ser eficaz, la molécula de fármaco debe estar presente en el sitio o sitios diana deseados en una concentración suficiente para ejercer sus efectos farmacológicos), entonces un compuesto que tiene una menor potencia pero excelentes propiedades de ADME puede ser más eficaz (o más potente in vivo) que un compuesto comparador de mayor potencia, pero con propiedades ADME inferiores.

25 [0175] Por consiguiente, el (R)-enantiómero de (I) se sintetizó (exactamente tal como se describe en el presente documento para el (S)-enantiómero aislado, pero reemplazando el material de partida (S)-ornitina por (R)-ornitina disponible comercialmente de alta pureza estereoquímica), y se determinaron las propiedades de PK de este agente en rata utilizando la metodología idéntica descrita anteriormente (véanse los ejemplos 1, 7 y 8).

35 Resultados

40 [0176] Los parámetros de un modelo farmacocinético simple de un compartimento se muestran en la tabla 9. Los datos para el compuesto (I') de la tabla 1 anterior se muestran para comparación. Es evidente que (R)-(I) comparte, en gran medida, las propiedades de ADME inesperadamente superiores de (I'). Como con (I'), (R)-(I) también está biodisponible por vía oral de manera esencialmente cuantitativa y consigue una exposición después de una única dosis oral a 3 mg/kg más de 5 veces superior que el siguiente mejor compuesto probado hasta la fecha (véase el compuesto (V) en el ejemplo 1; Tabla 1).

Tabla 9: Parámetros farmacocinéticos para enantiómeros (R) y (S) de (I) aislados

	F (%)	t _{1/2} (min)	Eliminación (ml/min/kg)	V _{ss} (l/kg)	Exposición (min.ng/ml)
(R)-(I)	84	81	8,6	0,9	295.000
(I')	69	196	2,6	0,7	939.000

45 [0177] La biodisponibilidad oral (F, %), la vida media en plasma dominante (t_{1/2}, minutos) después de la administración intravenosa, la eliminación (ml/min/kg), volumen de distribución (V_{ss}, L/kg) y la exposición oral (AUC 0-t, min.ng/ml) de un modelo simple farmacocinético de un compartimento para cada compuesto se promedió en tres ratas. En ambos casos, la concentración máxima en plasma se observó habitualmente en menos de 30 minutos, en concordancia con una buena absorción.

50 [0178] Aunque (R)-(I) comparte claramente, en un grado significativo, las propiedades de ADME inusualmente beneficiosas de (I'), sin embargo, existen diferencias estadísticamente significativas. Lo más destacado es el aumento de la eliminación en plasma (~3 veces superior para (R)-(I) en comparación con (I')), dando lugar a una vida media en plasma 2 veces más corta después de la dosificación intravenosa, así como una exposición 3 veces inferior después de la dosis oral única.

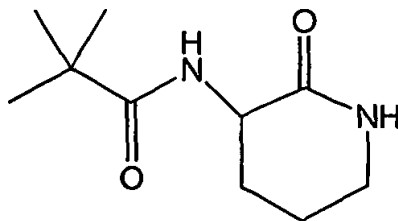
55 [0179] La eliminación de (R)-(I) se aproxima a la tasa de filtración glomerular en rata (habitualmente indicada como 9 ml/min/kg), mientras que la eliminación de (I') es significativamente inferior. Una posible interpretación de estos

descubrimientos es que (I') se reabsorbe de forma activa, quizás en el túbulo distal del nefrón, y este proceso de reabsorción es selectivo para el (S)-enantiómero sobre el (R)-enantiómero. Si, como parece plausible, las propiedades de ADME inesperadas y muy superiores de (I') son debidas, en parte, a la recaptación en el nefrón a través de un transportador capaz de distinguir el (S)-enantiómero del (R)-enantiómero, entonces se enfatiza la imprevisibilidad de las propiedades de ADME y se ilustra además la inventividad de la invención descrita en este documento.

[0180] Sin embargo, (R)-(I) es también claramente un compuesto superior según la presente invención (tal como se ilustra por el círculo abierto en la figura 10, que ilustra que está más próximo en las propiedades de ADME a (I') que a la clase general de acilaminolactamas. En conclusión, por lo tanto, tanto (R)-(I) como (I'), y por tanto, de manera más general, el compuesto (I), muestran tener propiedades de ADME inesperadas, y notablemente superiores, en comparación con otros BSCI de acilaminolactama que se han descrito. Además, el compuesto (I') es ligeramente, pero significativamente, superior al compuesto (I), en general, y por tanto, es preferido.

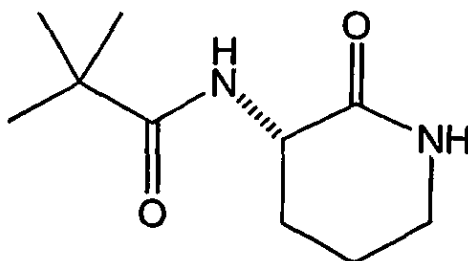
REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio:



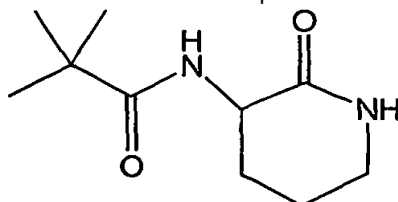
(I)

2. Uso de un compuesto de fórmula (I') o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio:



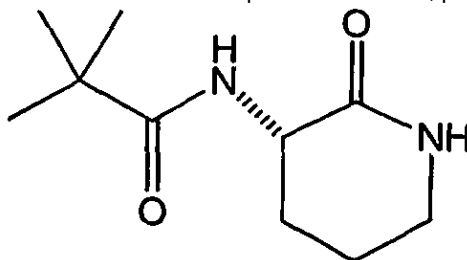
(I')

3. Compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para utilizar como medicamento:



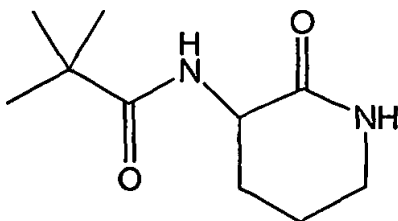
(I)

4. Compuesto de fórmula (I') o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para utilizar como medicamento:



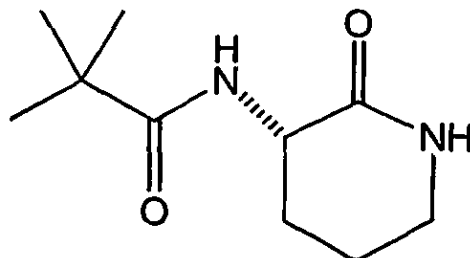
(I')

5. Compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para utilizar en el tratamiento de un trastorno inflamatorio:



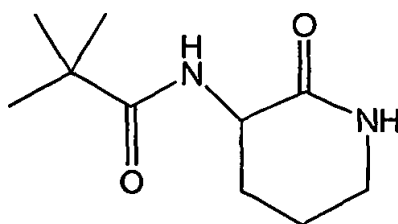
(I)

6. Compuesto de fórmula (I') o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para utilizar en el tratamiento de un trastorno inflamatorio:



(I')

7. Composición farmacéuticamente aceptable, que comprende, como principio activo, un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable:



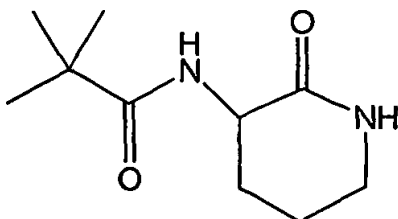
(I)

8. Composición farmacéuticamente aceptable, que comprende, como principio activo, un compuesto de fórmula (I') o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable:



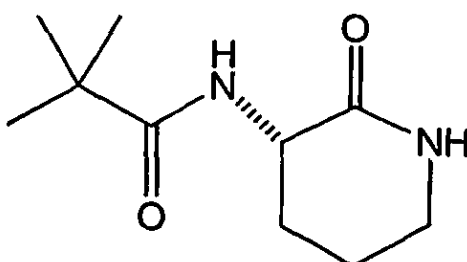
(I')

9. Compuesto de fórmula general (I):



(I)

10. Compuesto de fórmula general (I'):



(I')

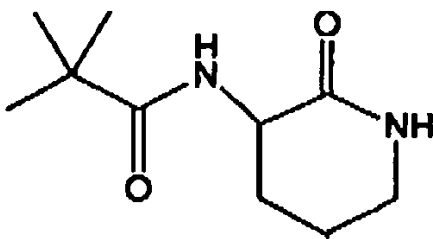
11. Uso de un compuesto de fórmula (I) o (I'), según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o el compuesto de fórmula (I) o (I') para utilizar, cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, en el que el trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en enfermedades autoinmunes, trastornos vasculares, infección o replicación viral, asma, osteoporosis (baja densidad mineral ósea), crecimiento de tumores, rechazo de trasplantes de órganos y/o funcionamiento retrasado del injerto u órgano, un trastorno **caracterizado por** un nivel elevado de TNF- α , psoriasis, heridas de la piel, trastornos causados por parásitos intracelulares, dolor neuropático, alergias, enfermedad de Alzheimer, respuesta de memoria inducida por antígeno, supresión de la respuesta inmune, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, ELA, fibrosis y formación de adhesiones.

12. Uso de un compuesto de fórmula (I) o (I'), o el compuesto de fórmula (I) o (I') para utilizar, según la reivindicación 11, en el que el trastorno inflamatorio es asma, rinitis alérgica o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

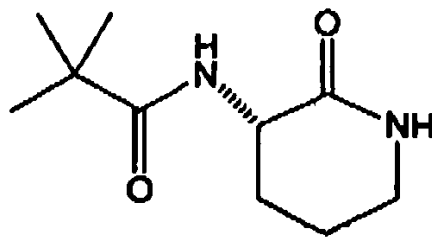
13. Uso de un compuesto de fórmula (I) o (I'), o el compuesto de fórmula (I) o (I') para utilizar, según la reivindicación 11, en el que el trastorno inflamatorio es la formación de adhesiones después de cirugía ginecológica o general.

14. Uso de un compuesto de fórmula (I) o (I'), o el compuesto de fórmula (I) o (I') para utilizar, según la reivindicación 11, en el que el trastorno inflamatorio es nefropatía, incluyendo nefropatía diabética.

15. Uso de un compuesto de fórmula (I) o (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento, mejora o profilaxis de los síntomas de una enfermedad inflamatoria (incluyendo una reacción inflamatoria adversa a cualquier agente):

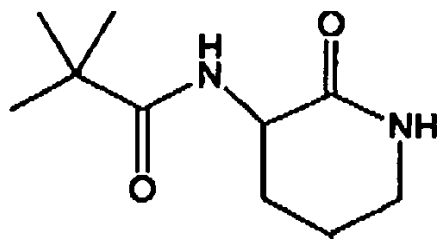


(I)

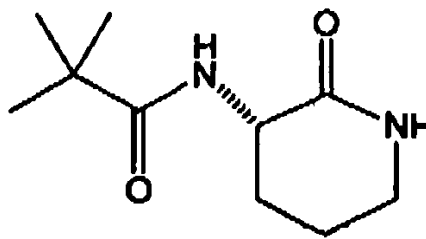


(I').

16. Compuesto de fórmula (I) o (I'), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para utilizar en el tratamiento, mejora o profilaxis de los síntomas de una enfermedad inflamatoria (incluyendo una reacción inflamatoria adversa a cualquier agente):



(I)



(I').

17. Composición farmacéuticamente aceptable, según la reivindicación 7 u 8, para utilizar en el tratamiento, mejora o profilaxis de los síntomas de un trastorno inflamatorio.

18. Composición farmacéuticamente aceptable para utilizar, según la reivindicación 17, en la que el trastorno se selecciona entre los trastornos definidos en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14.

19. Uso, compuesto, compuesto para utilizar, composición o composición para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que el compuesto de fórmula (I) o (I') está en forma hidratada o solvatada.

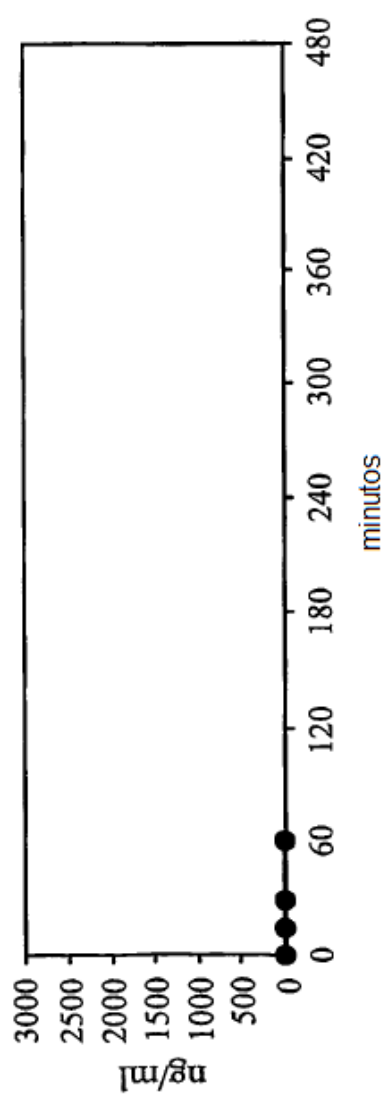
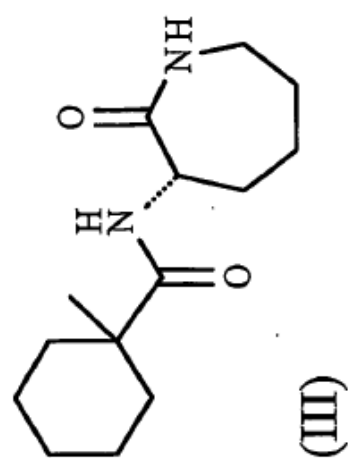
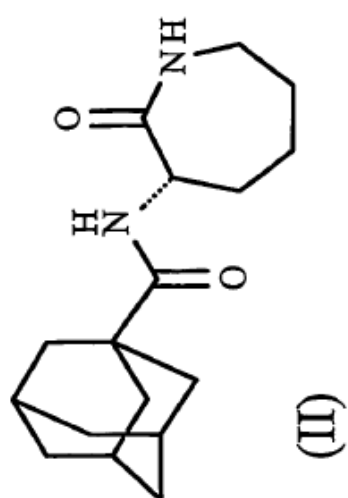


Figura 1A

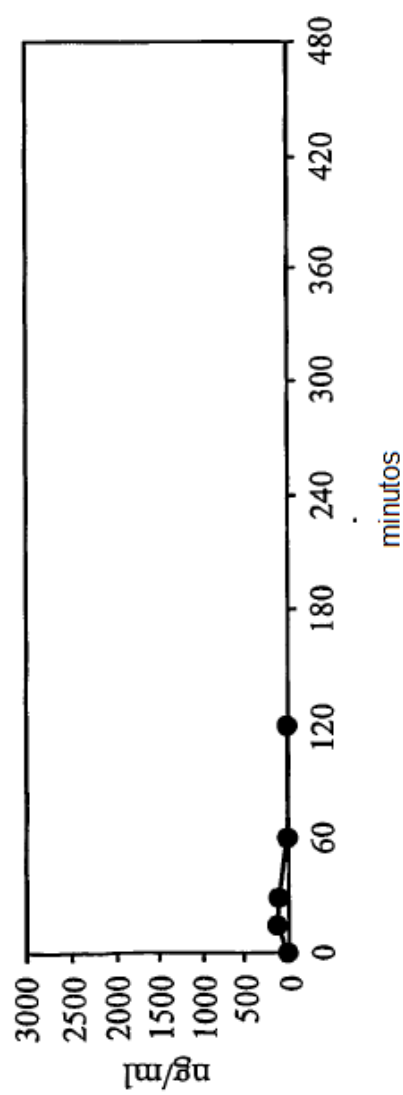


Figura 1B

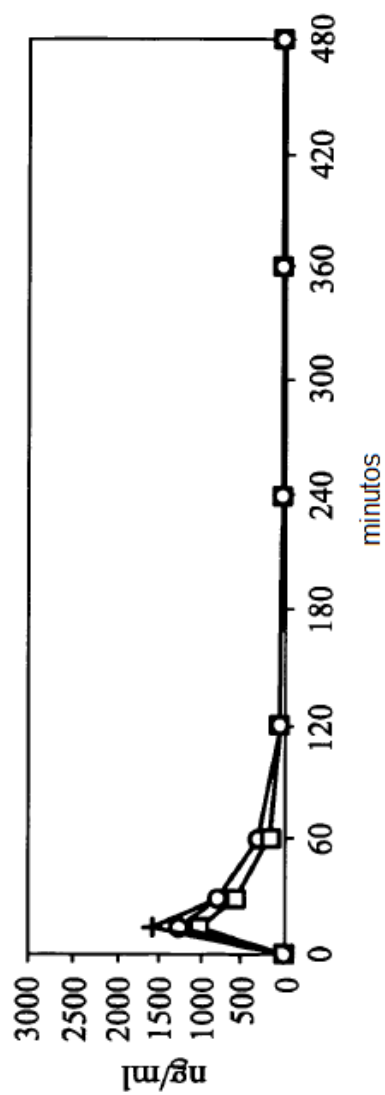
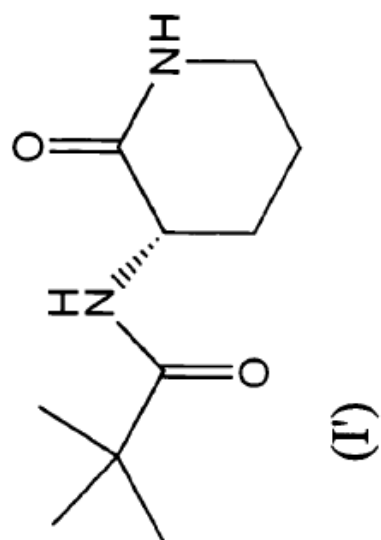
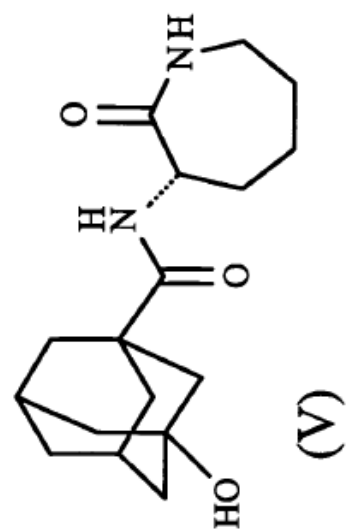


Figura 1C

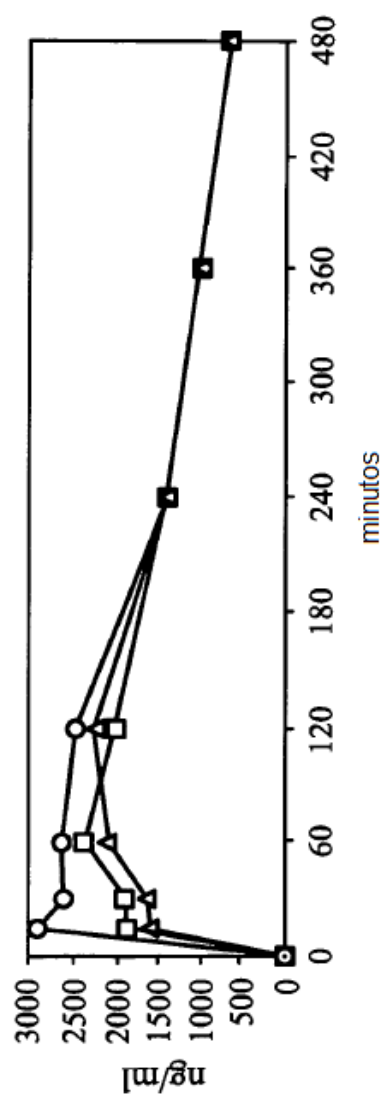


Figura 1D

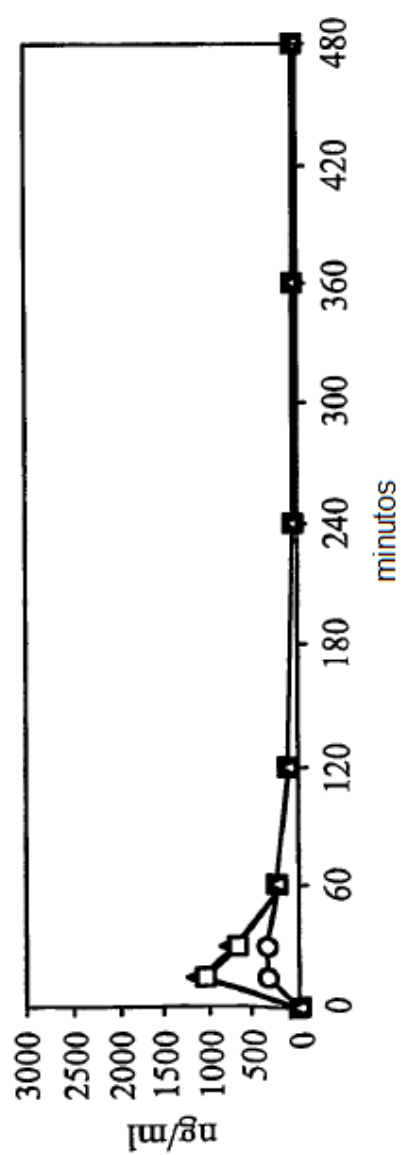
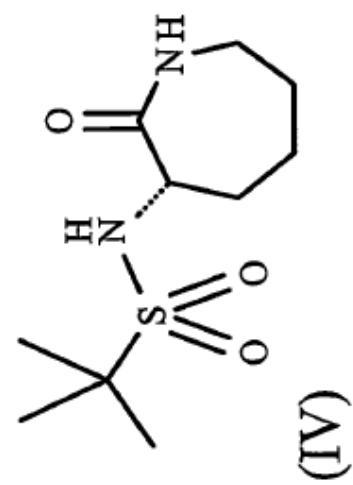


Figura 1E

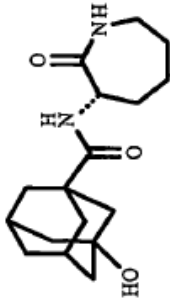
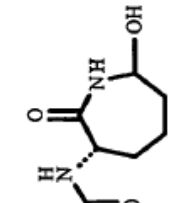
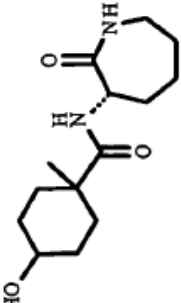
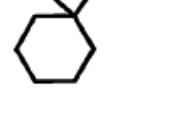
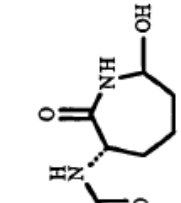
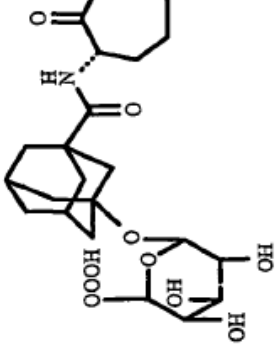
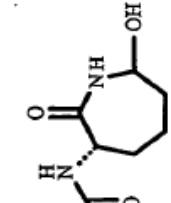
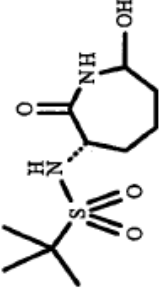
(II)   	(III)   	(V)   	(I') Ninguna	(IV) Estructura desconocida 
---	--	--	----------------------------	---

Figura 2

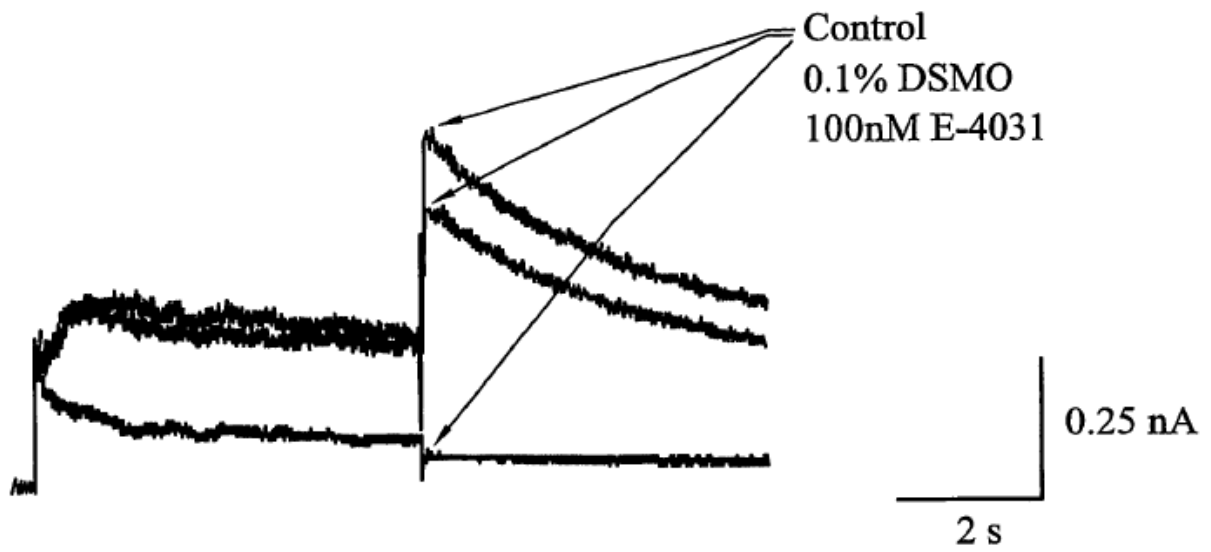


Figura 3A

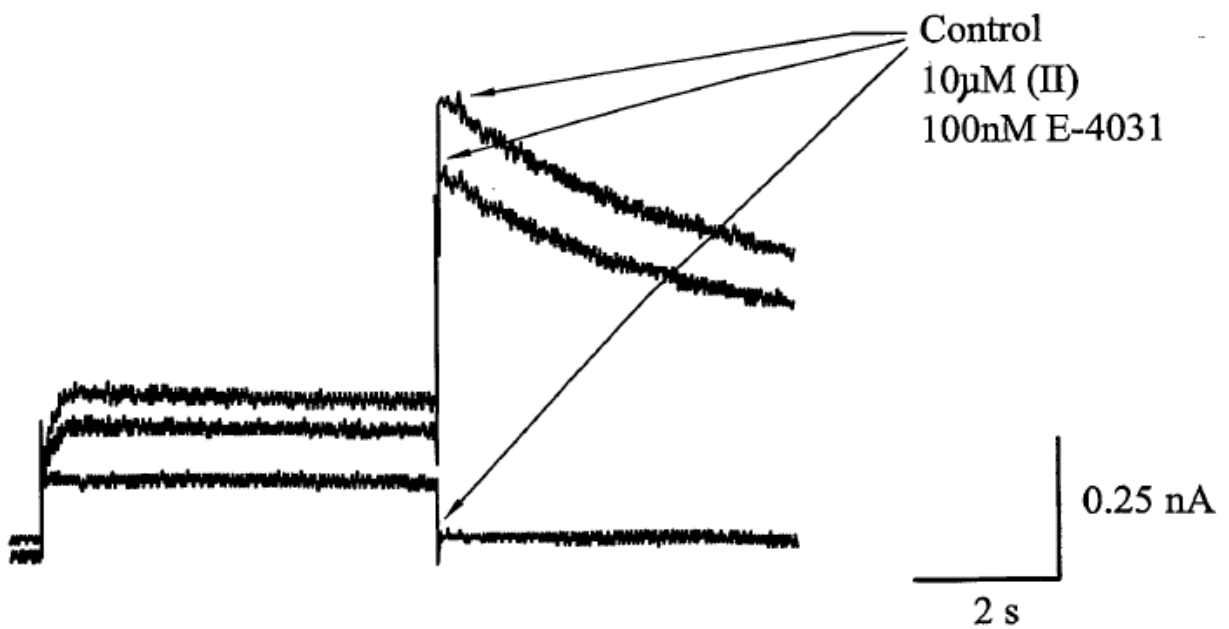


Figura 3B

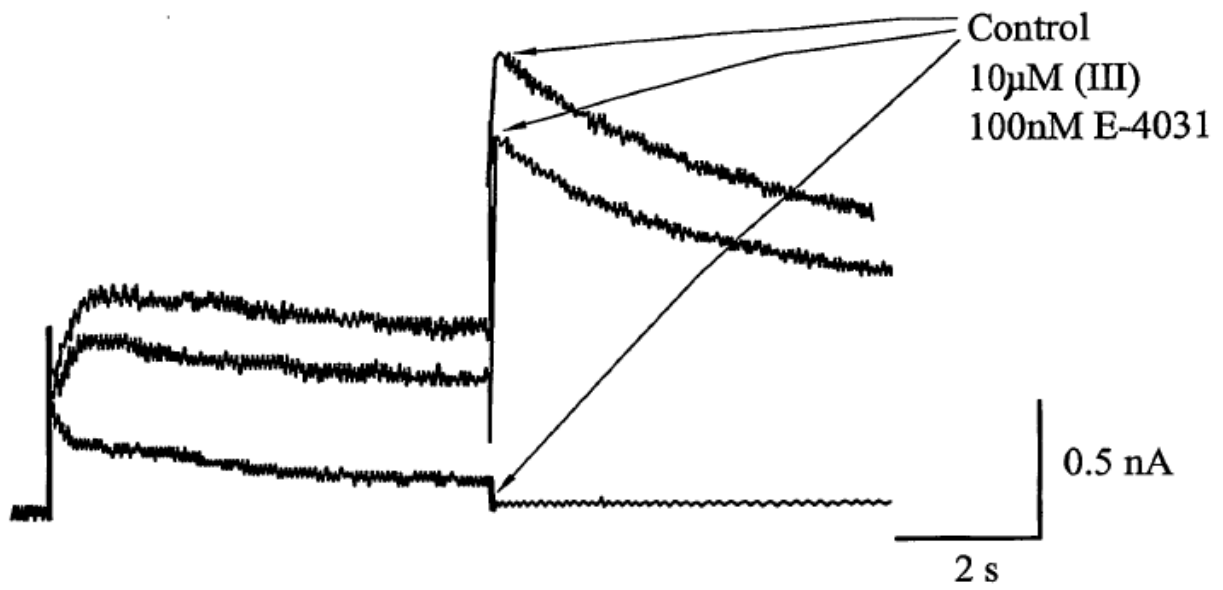


Figura 3C

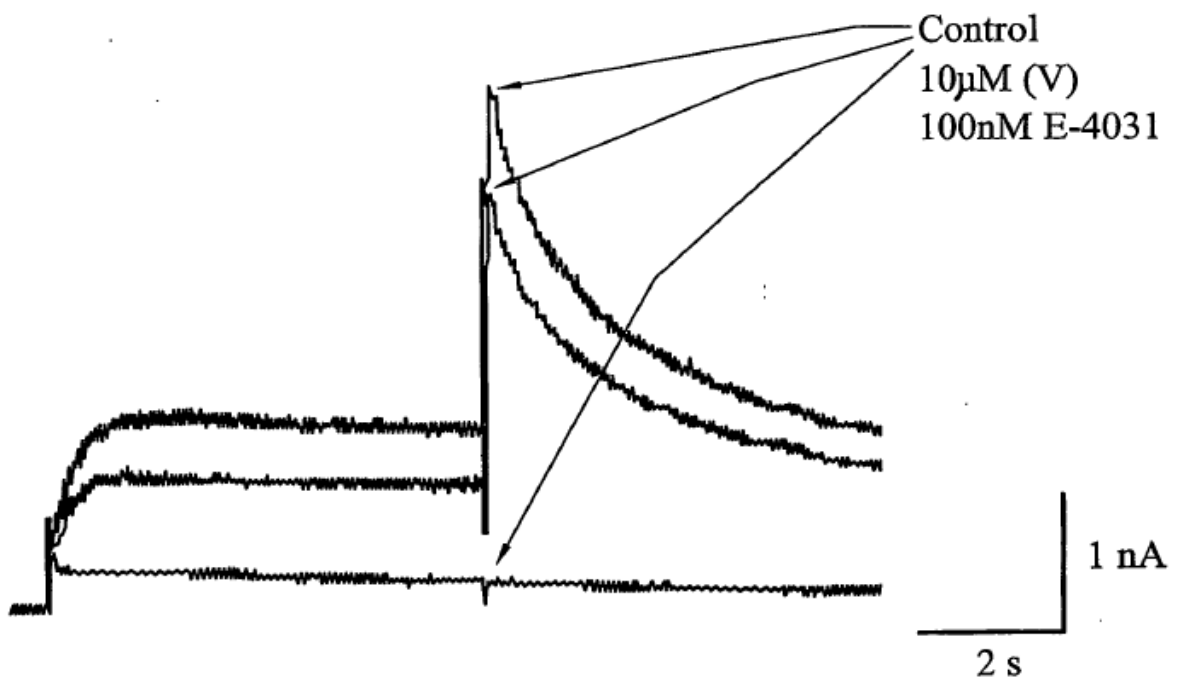


Figura 3D

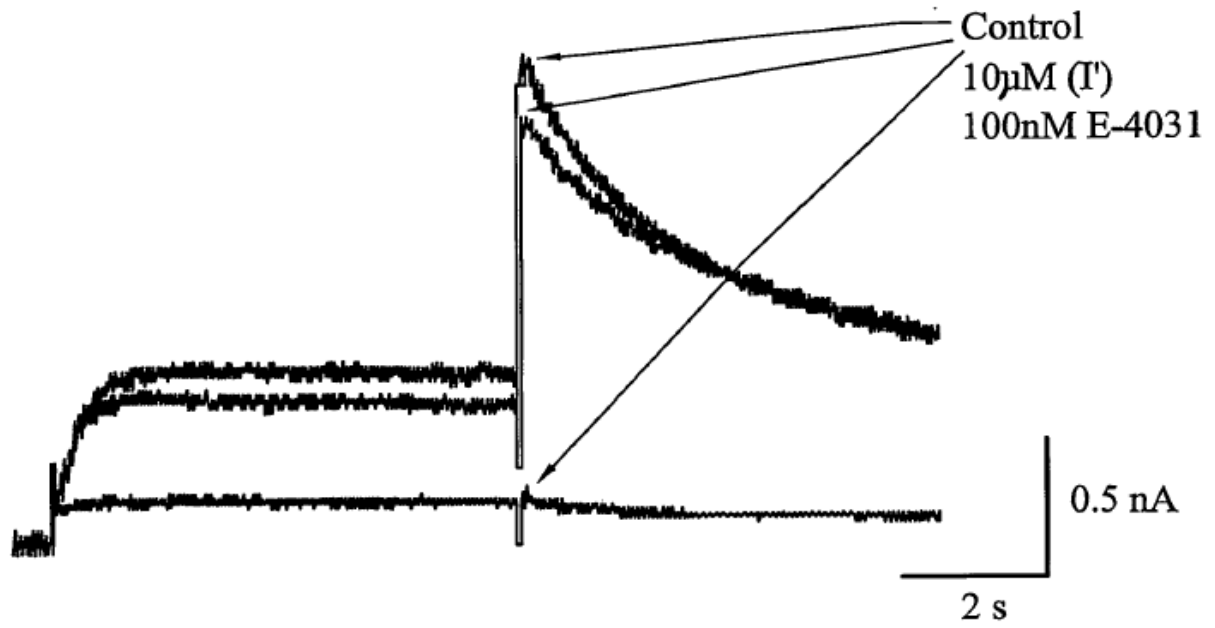


Figura 3E

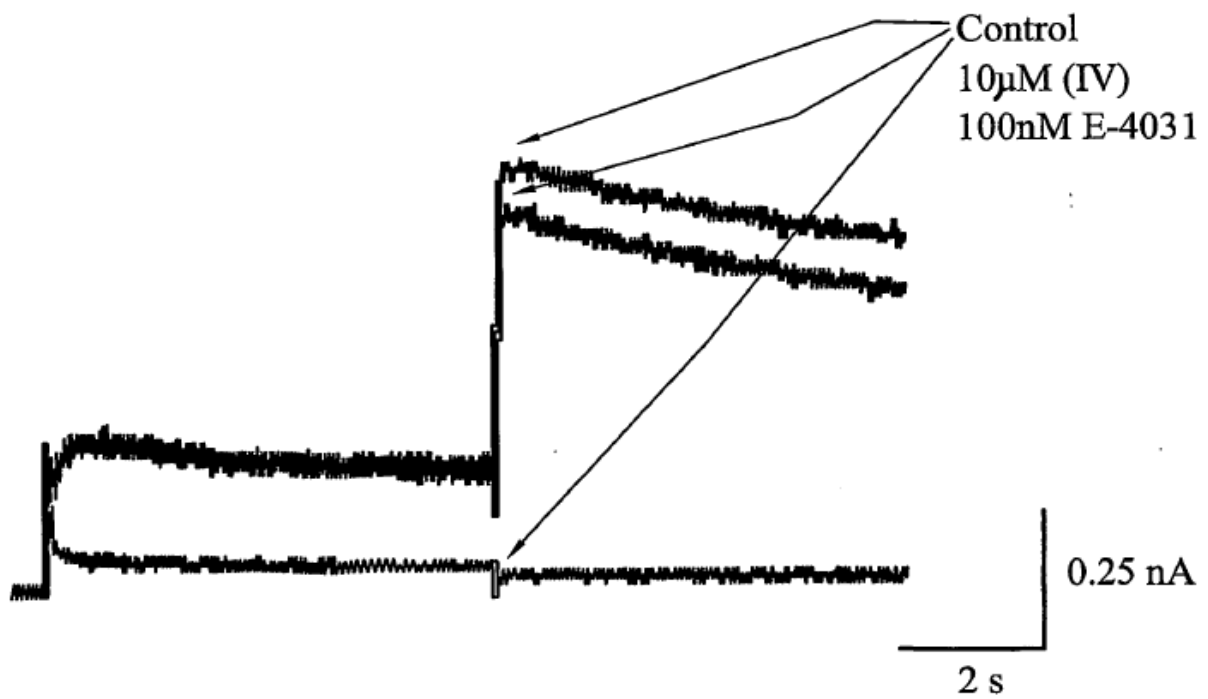


Figura 3F

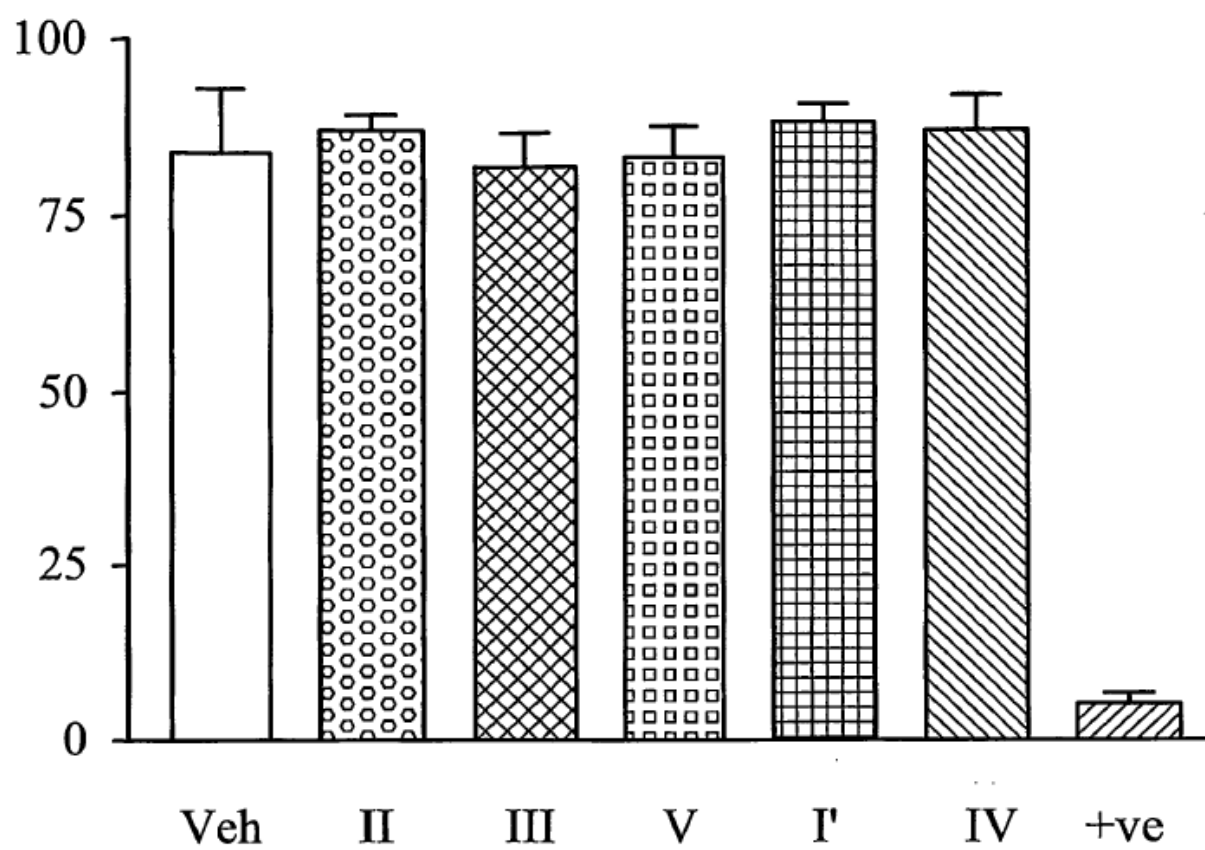
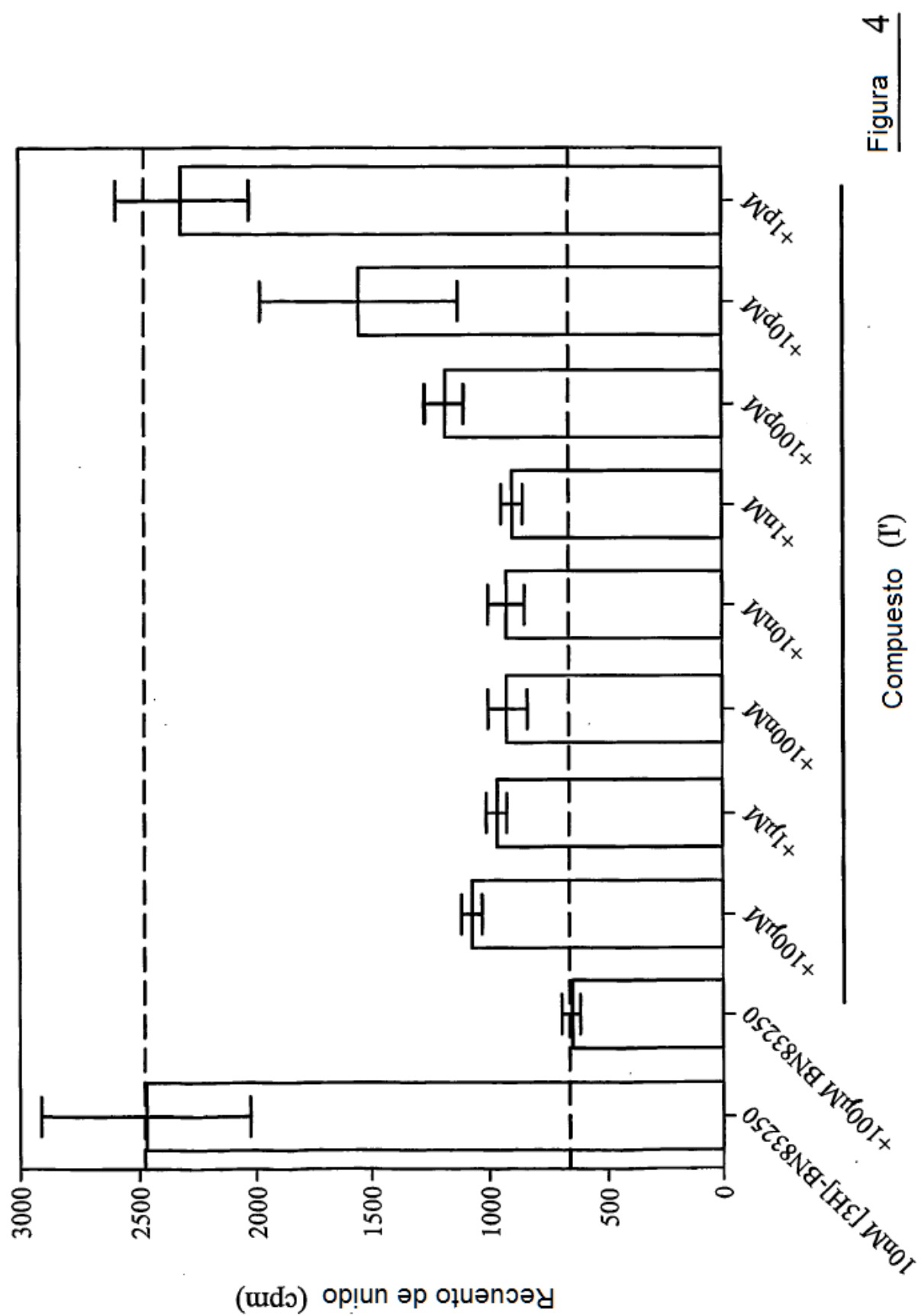


Figura 3G



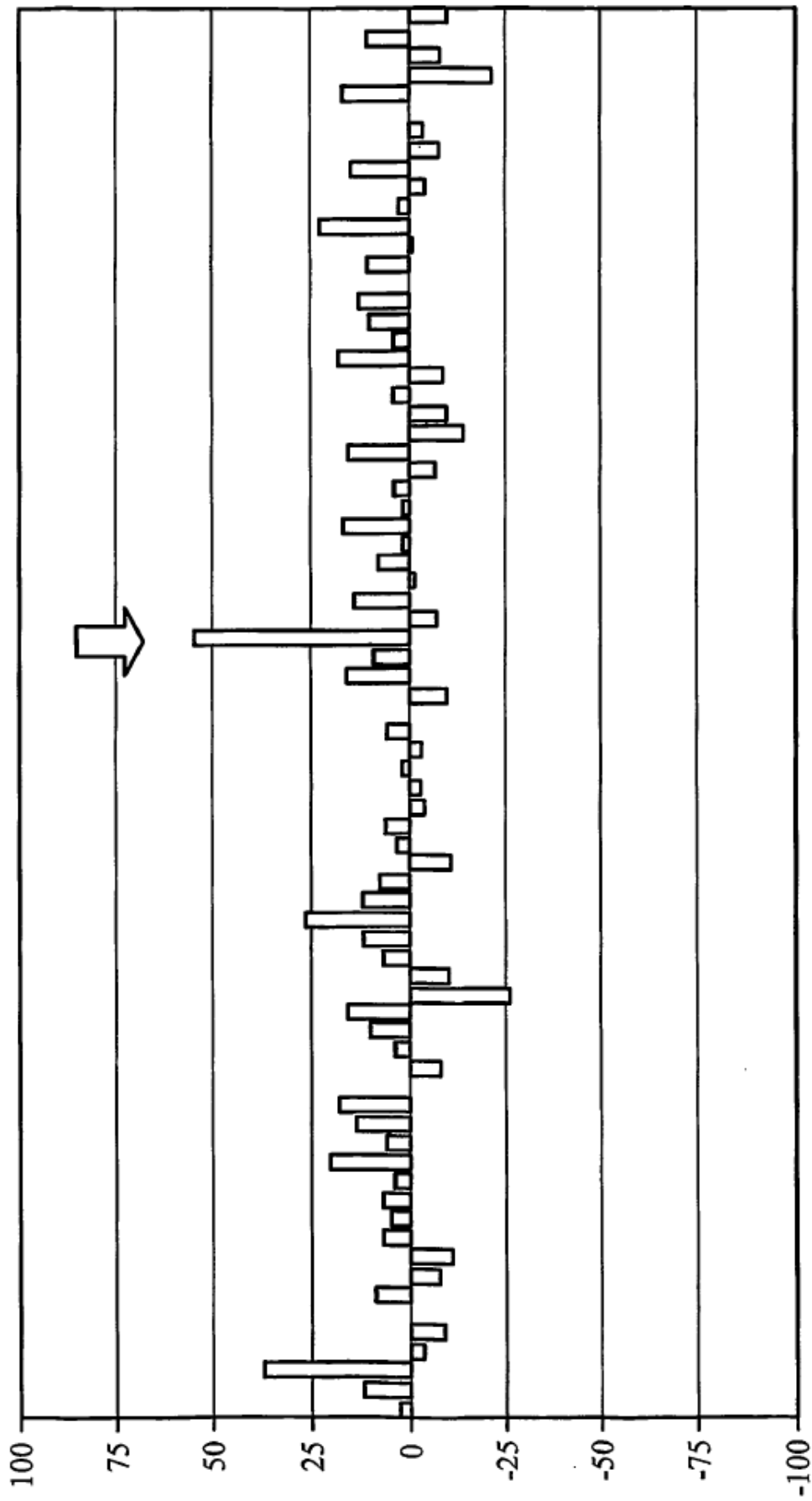


Figura 5A

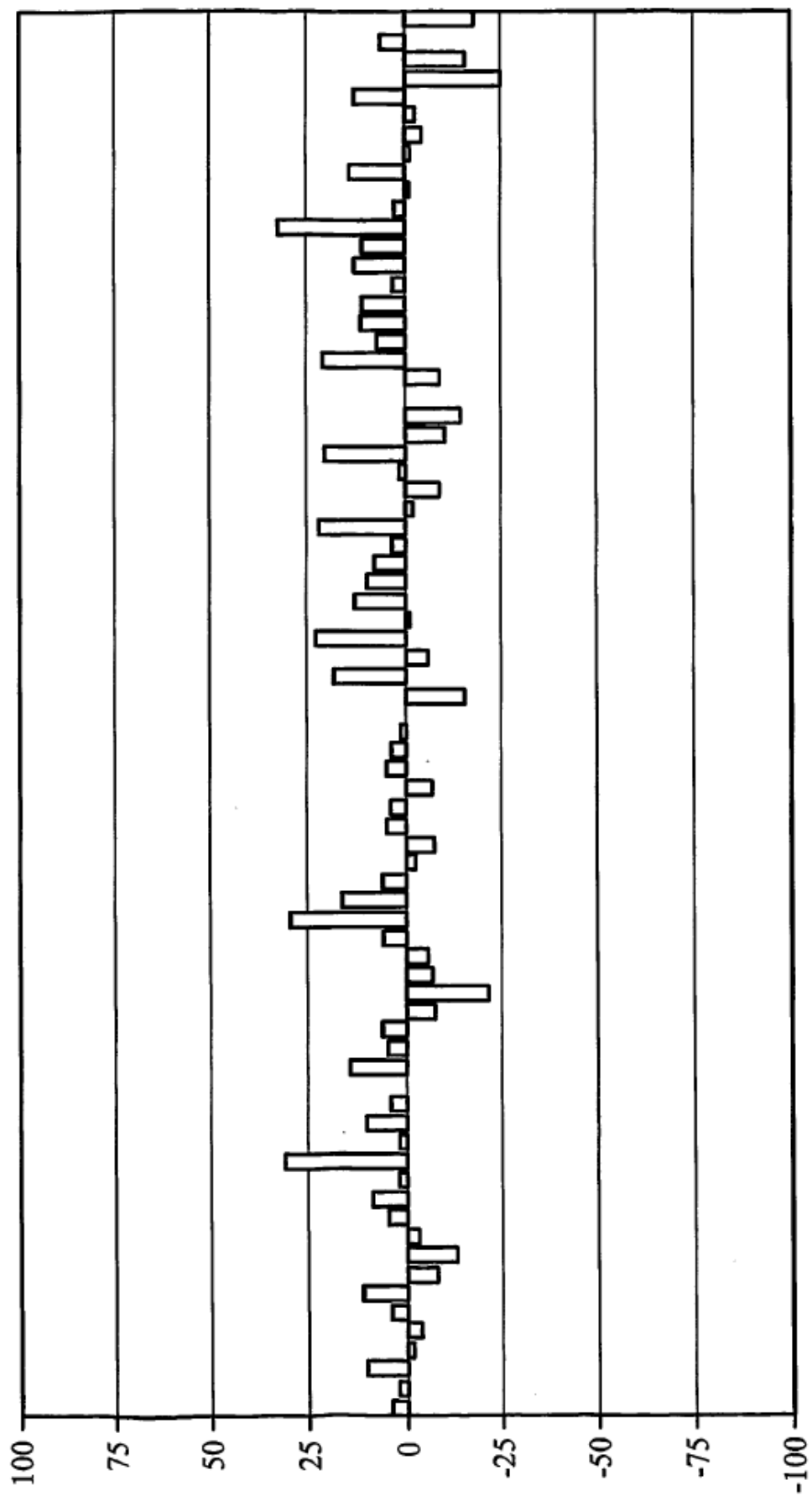


Figura 5B

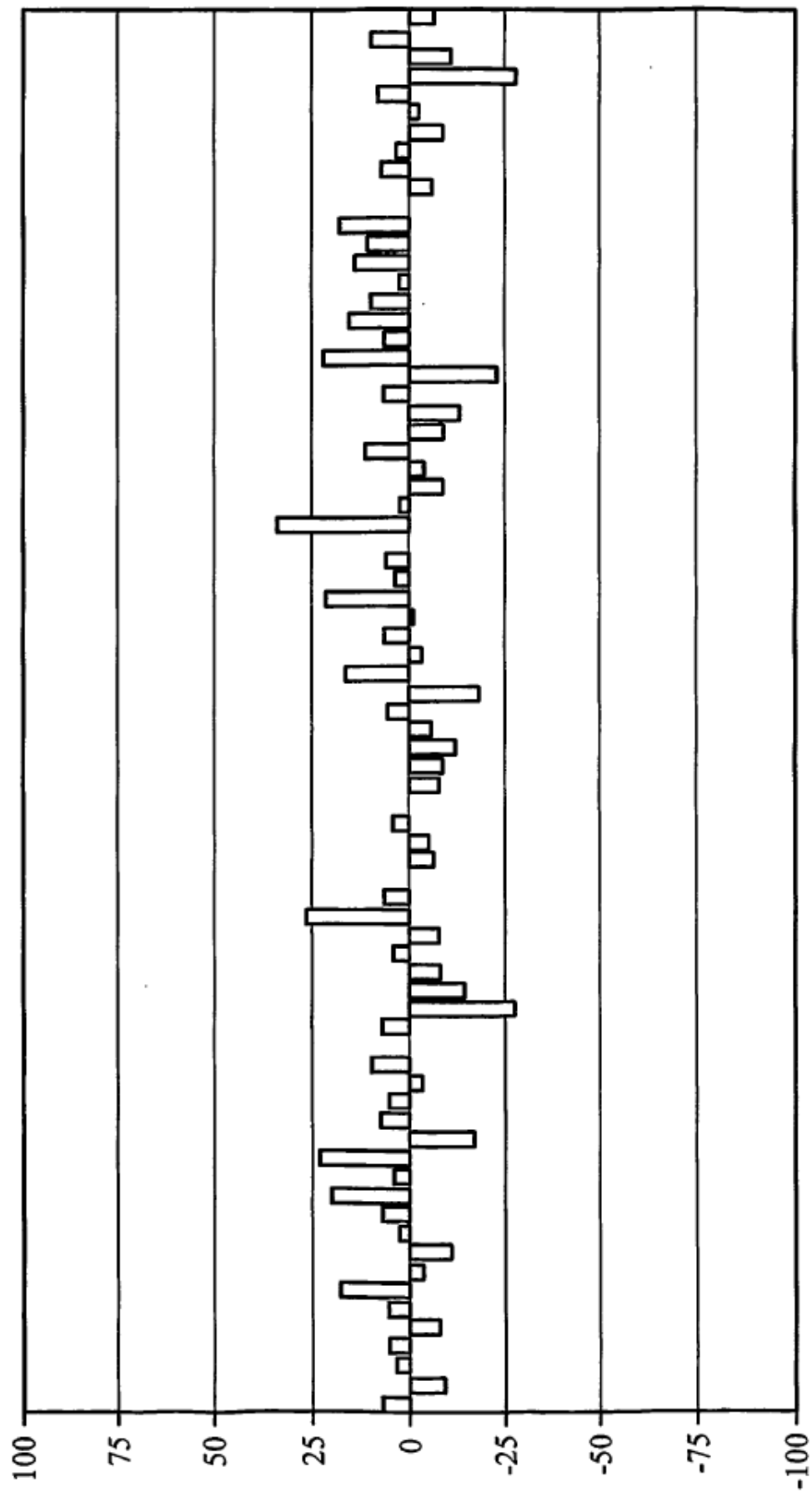


Figura 5C

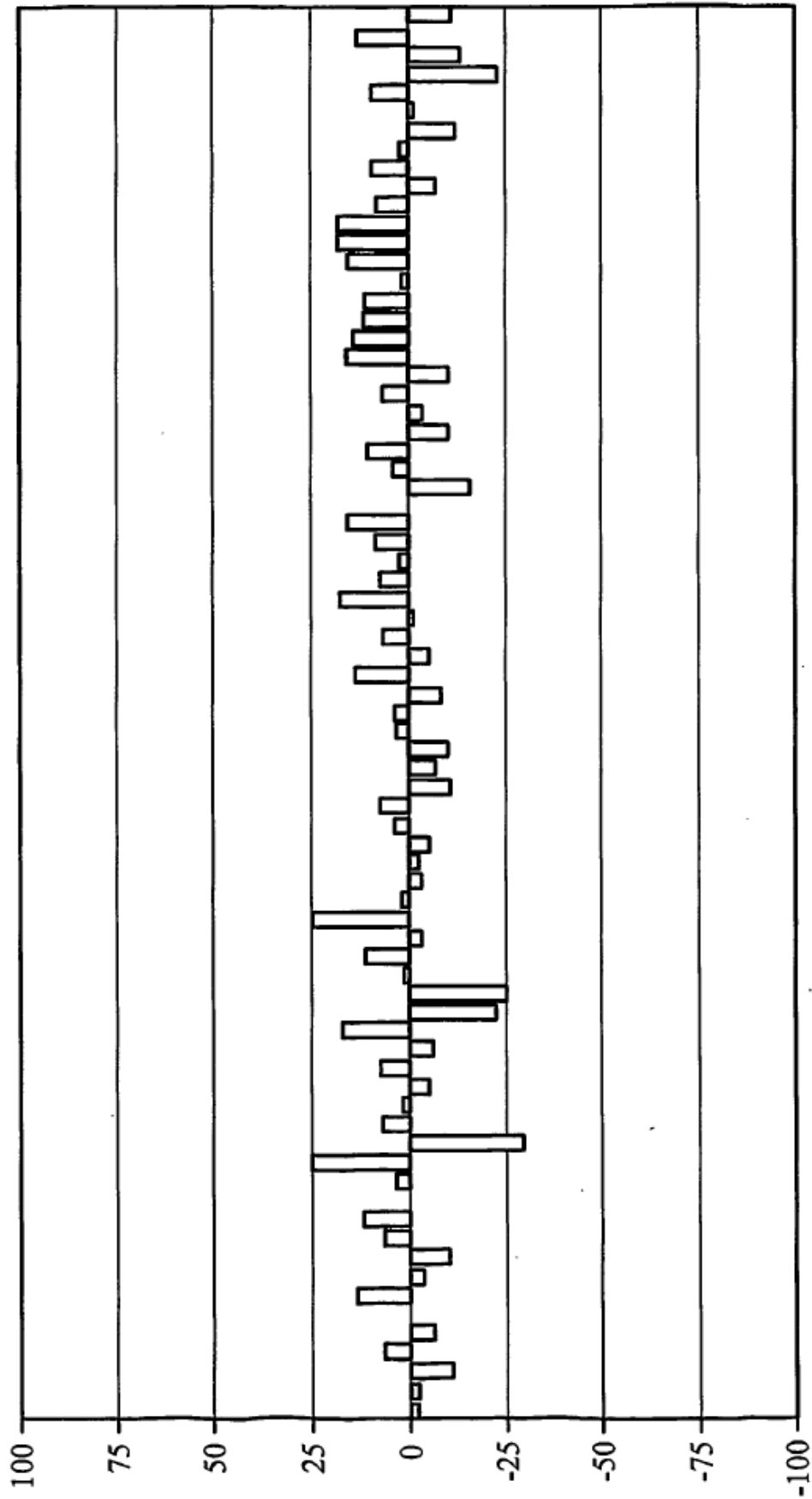


Figura 5D

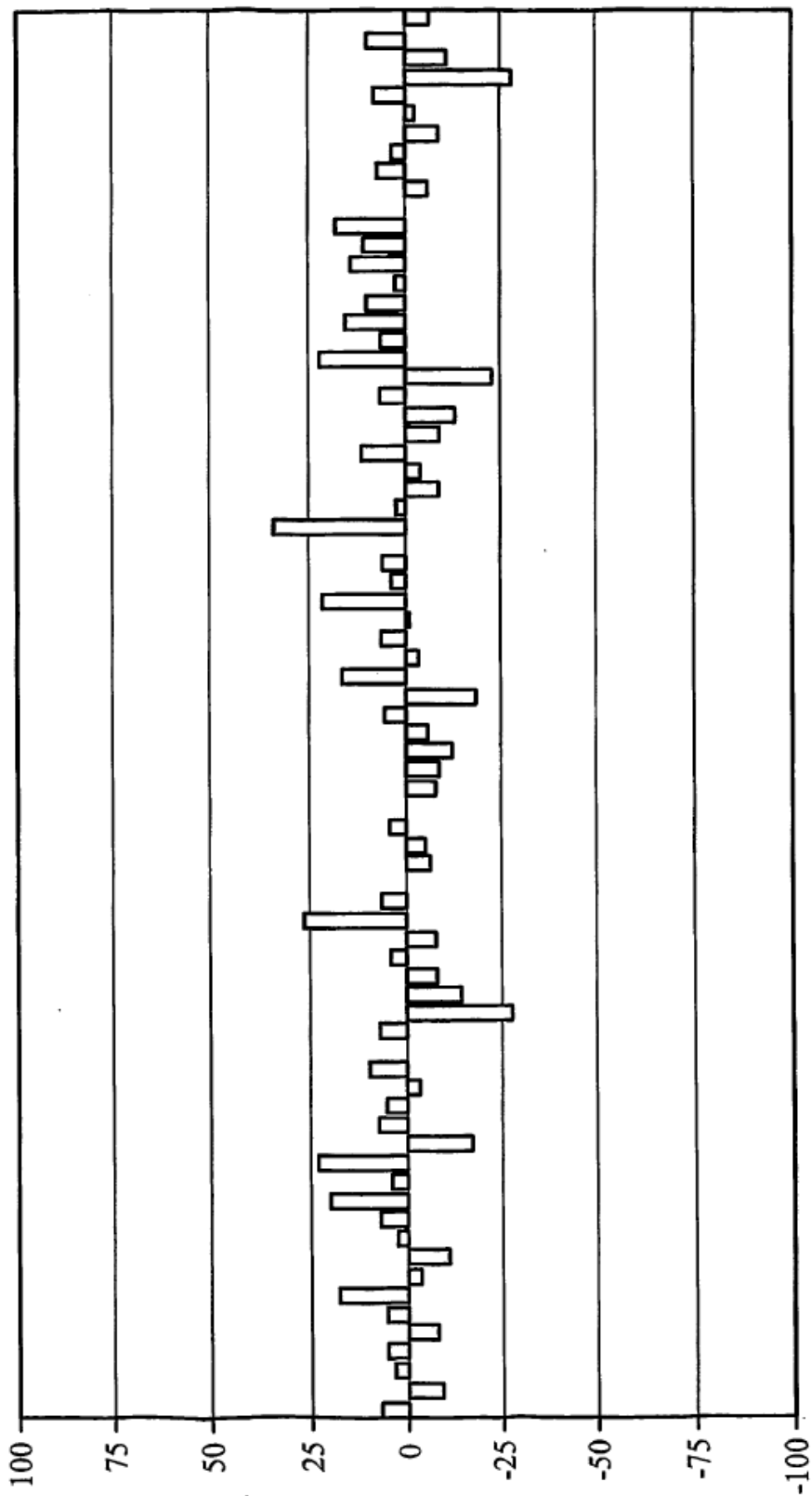


Figura 5E

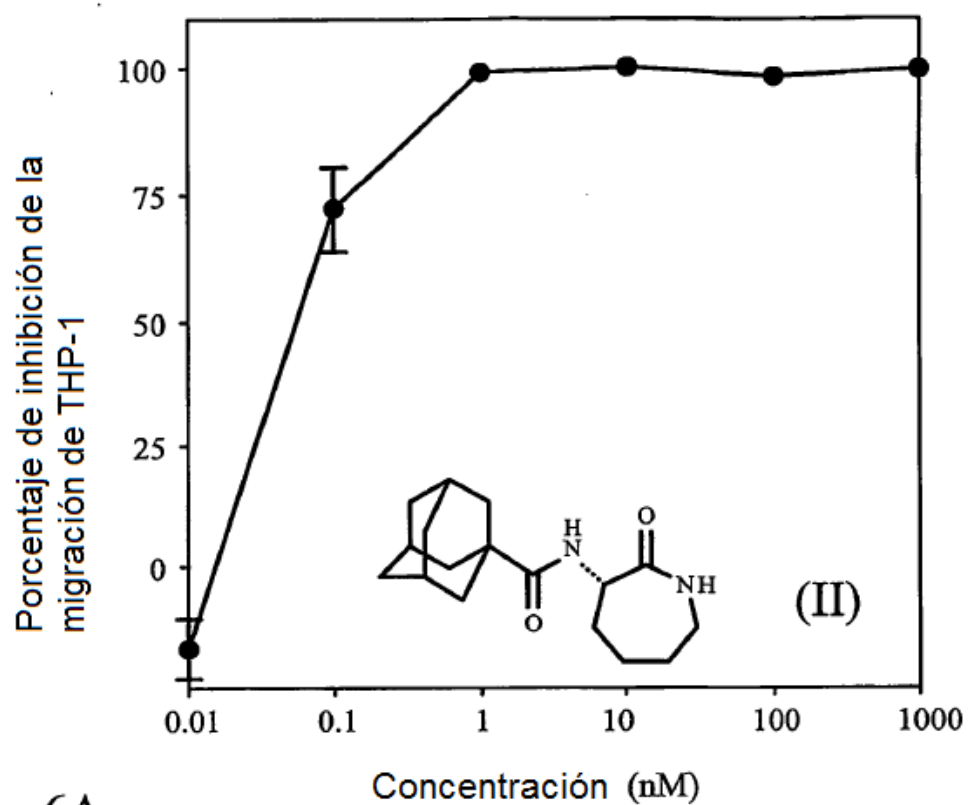


Figura 6A

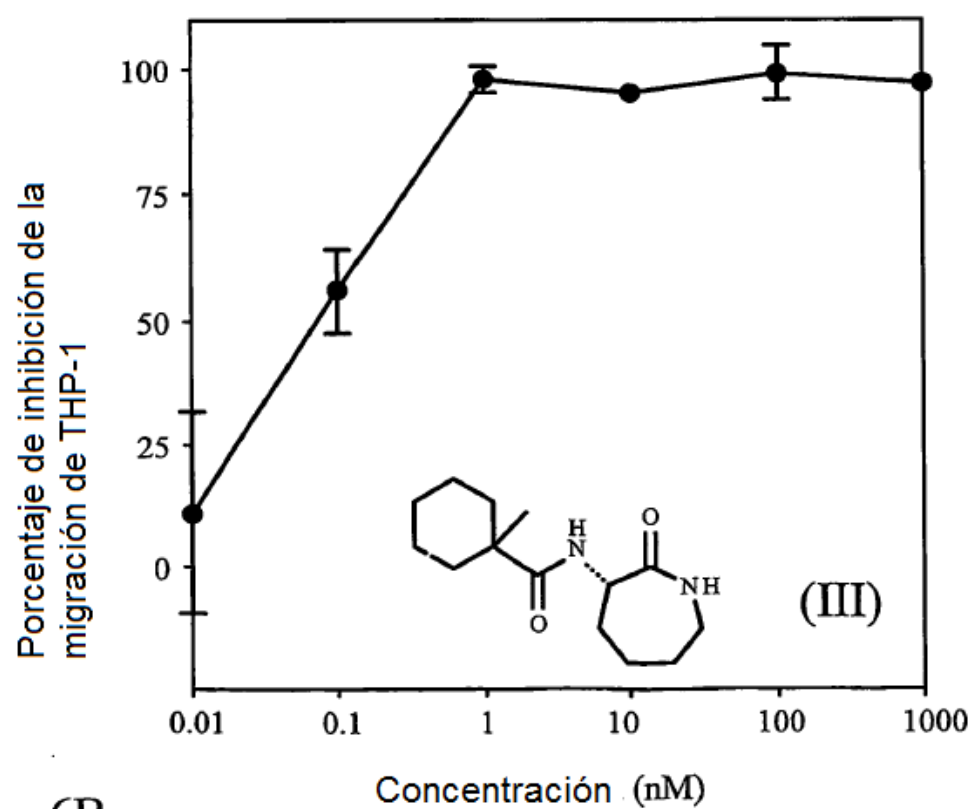


Figura 6B

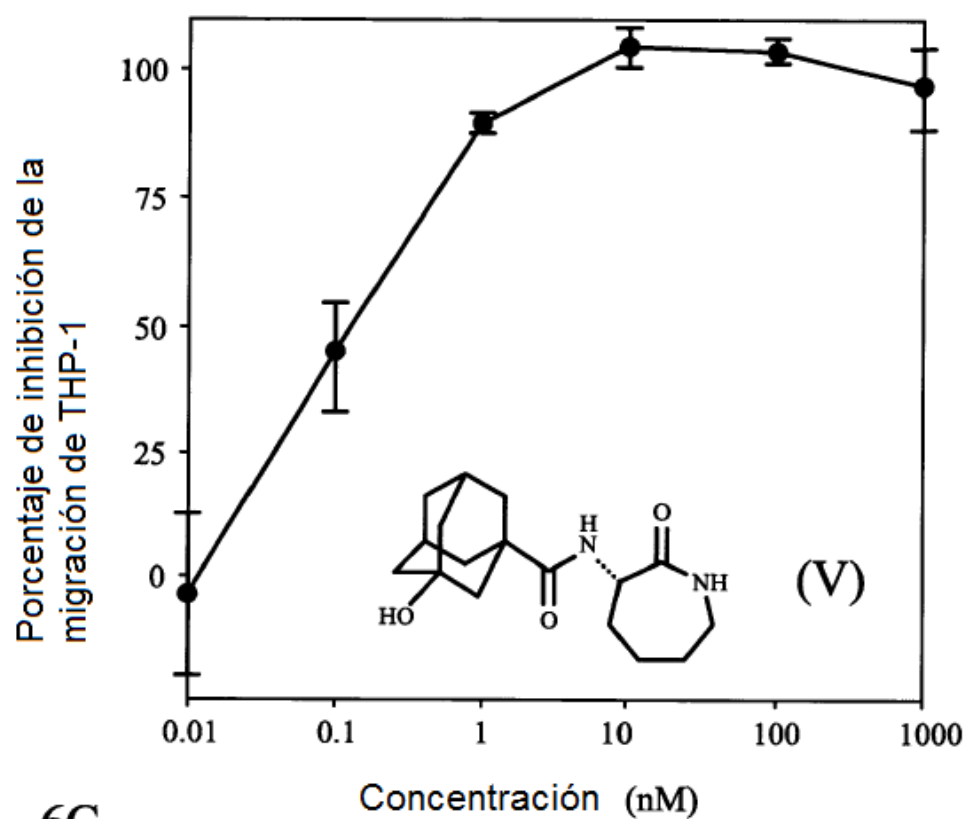


Figura 6C

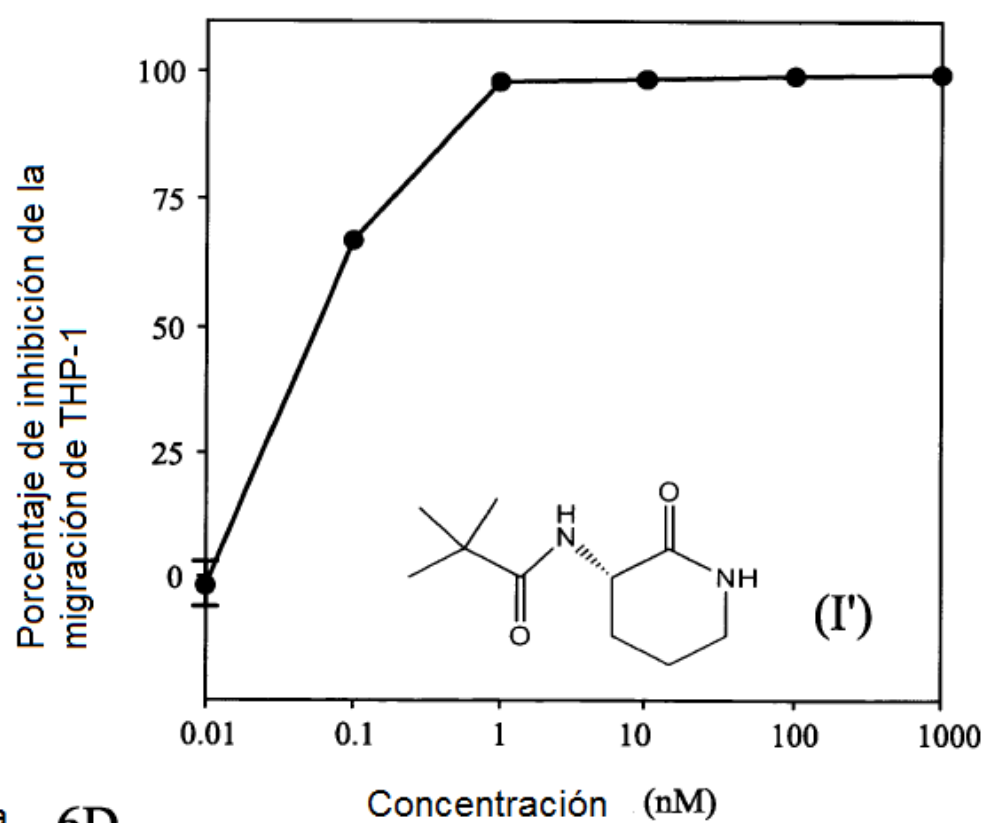


Figura 6D

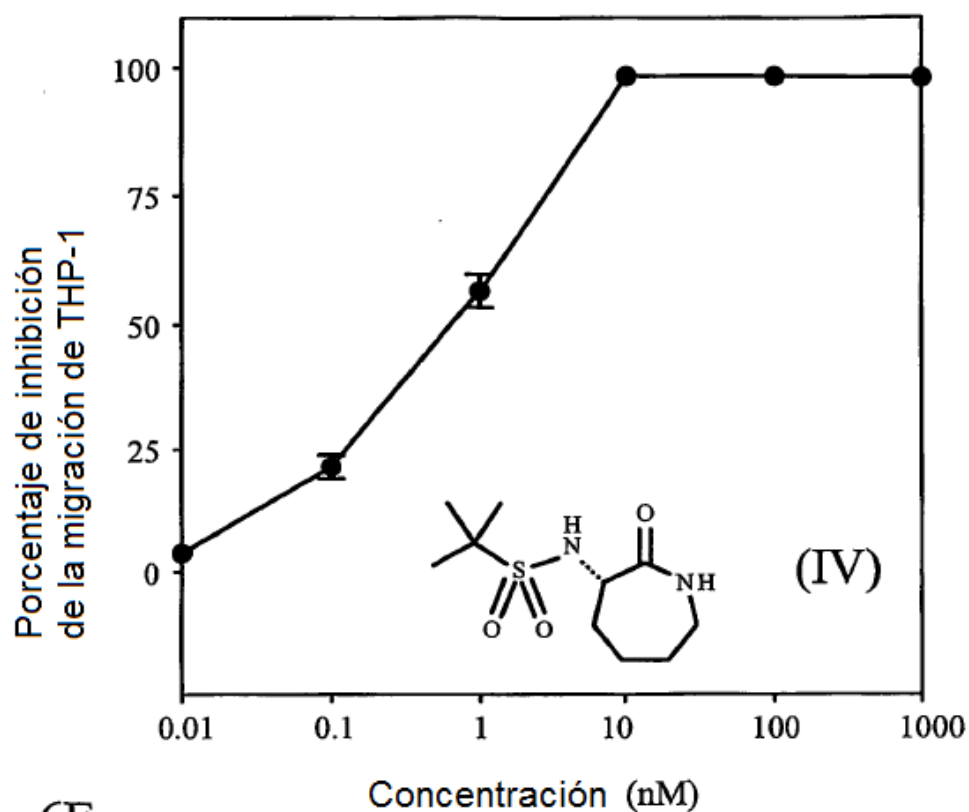


Figura 6E

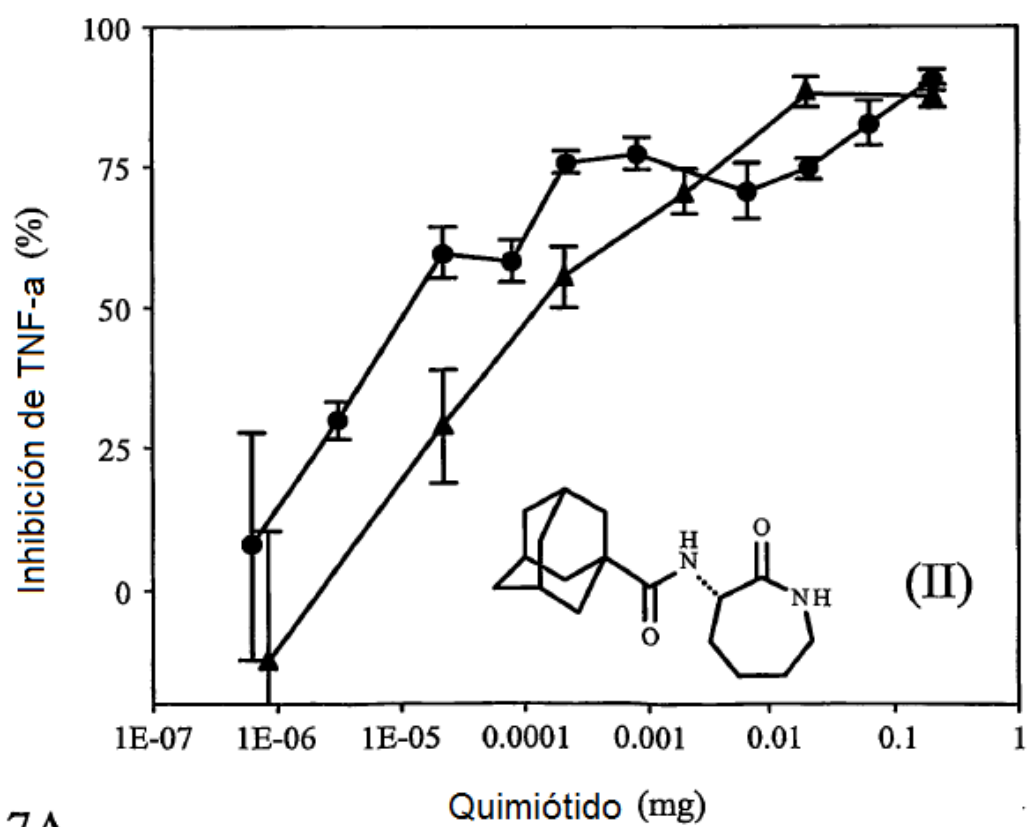


Figura 7A

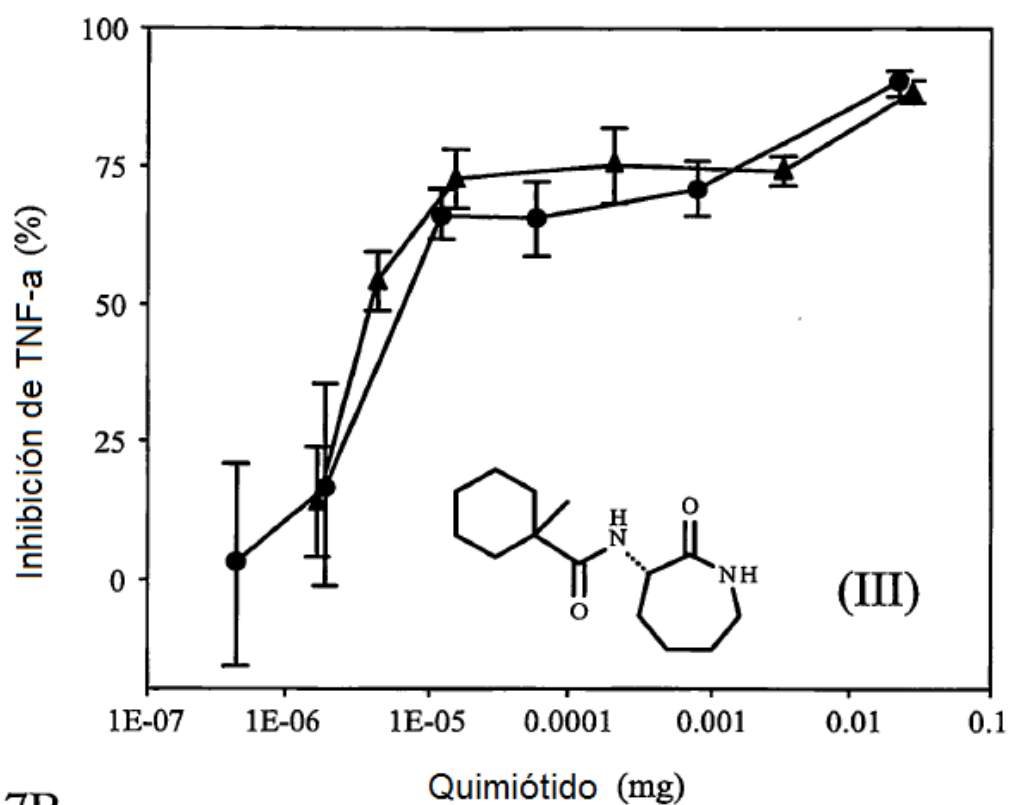


Figura 7B

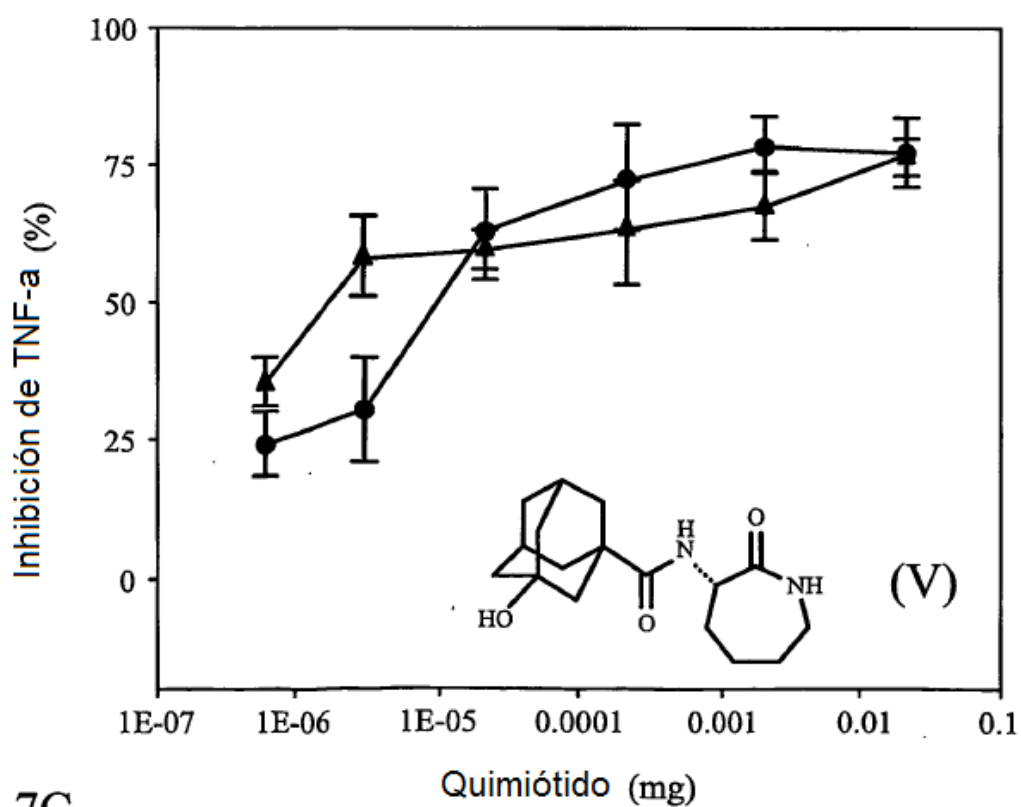


Figura 7C

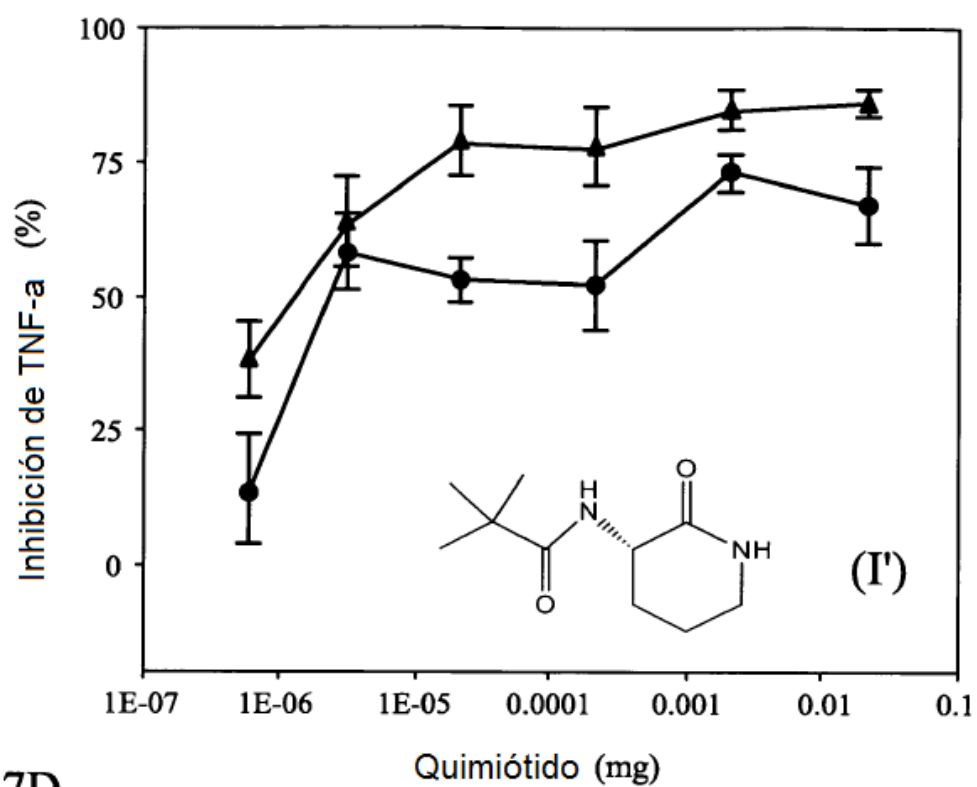


Figura 7D

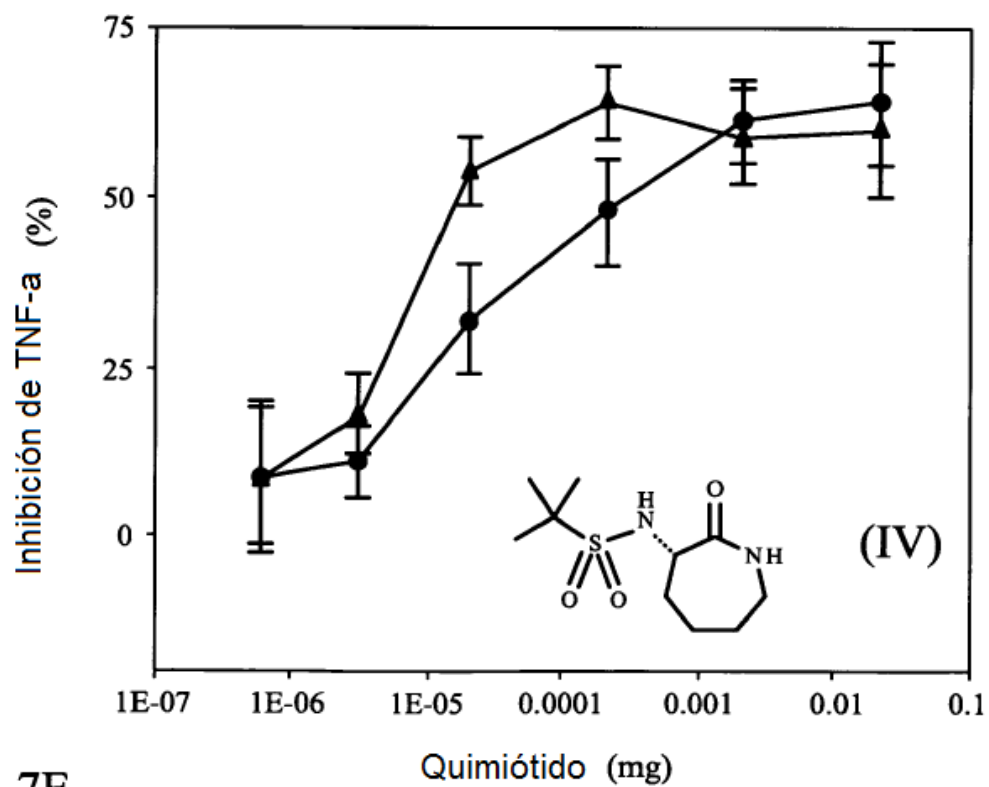


Figura 7E

Figura 8

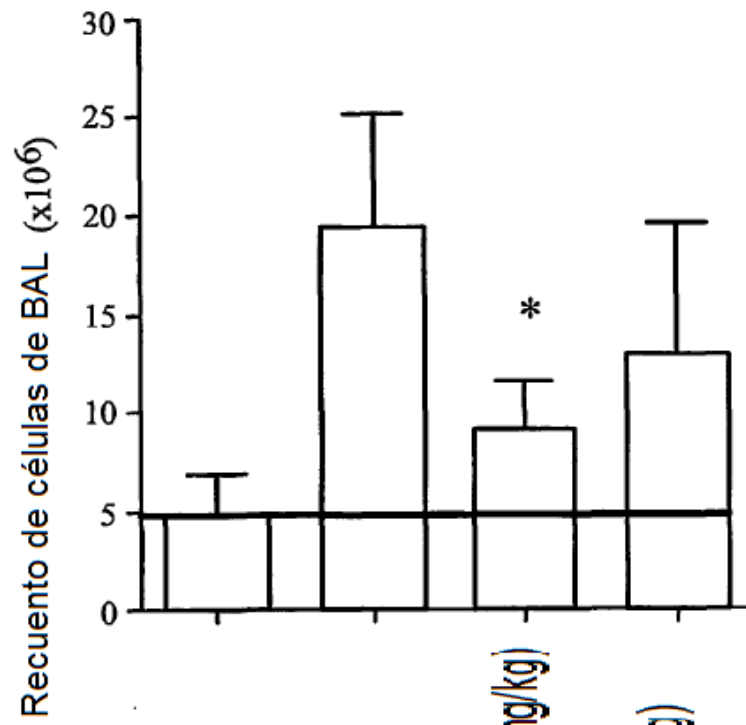
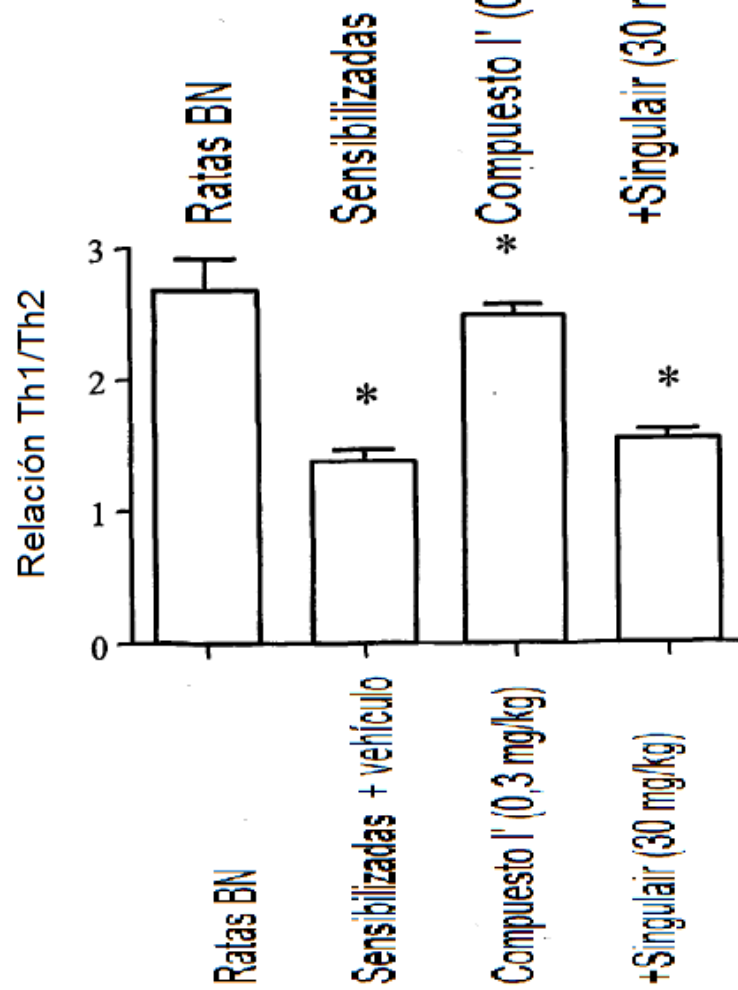


Figura 9



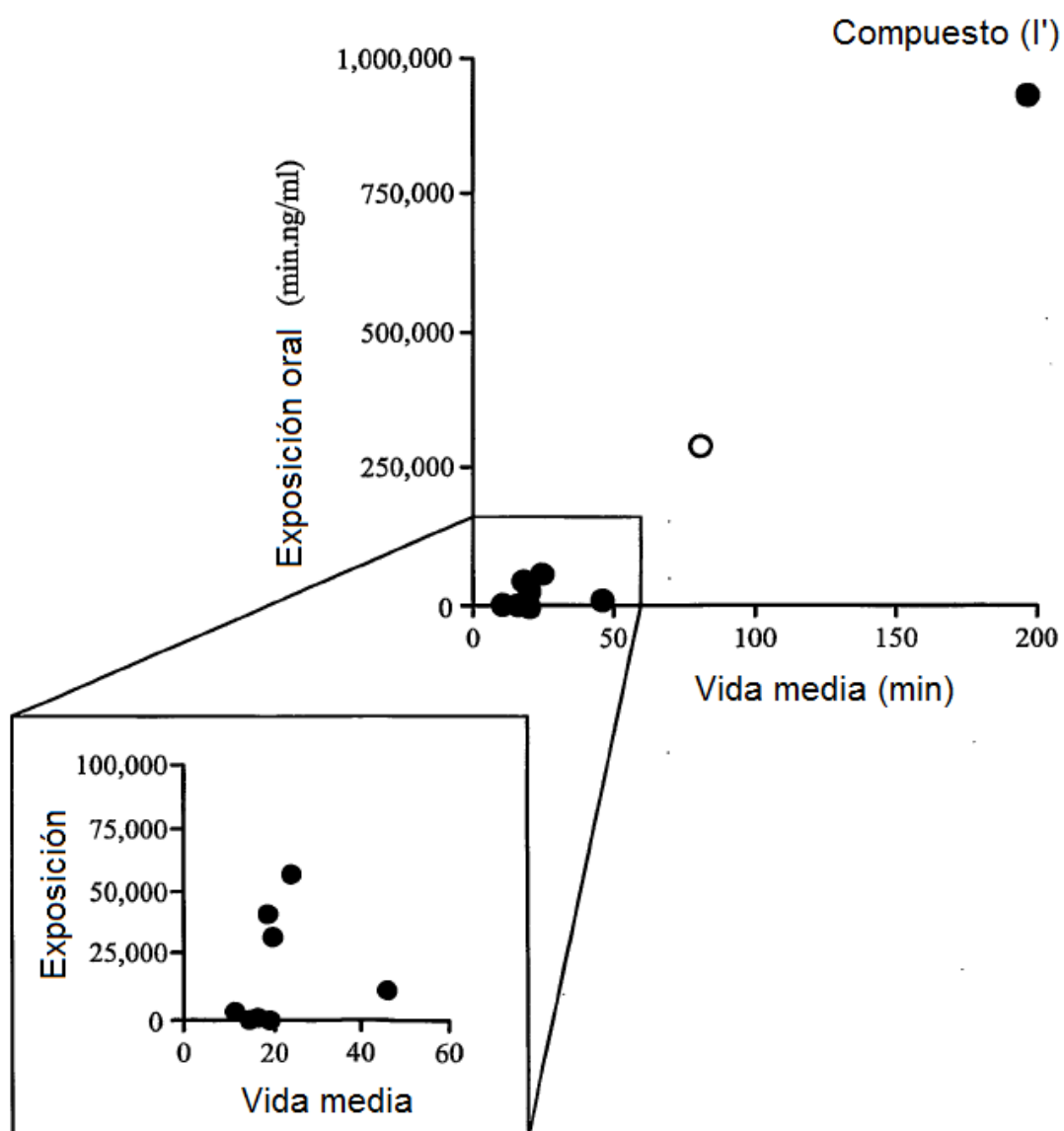


Figura 10