

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 780**

51 Int. Cl.:

A61K 31/166	(2006.01)	A61K 31/4709	(2006.01)
A61K 31/40	(2006.01)	A61K 31/496	(2006.01)
A61K 31/404	(2006.01)	A61K 31/4745	(2006.01)
A61K 31/4184	(2006.01)	A61K 31/5377	(2006.01)
A61K 31/4192	(2006.01)	A61K 31/54	(2006.01)
A61K 31/44	(2006.01)	A61K 31/541	(2006.01)
A61K 31/4725	(2006.01)		
A61P 27/02	(2006.01)		
A61K 31/198	(2006.01)		
A61K 31/4162	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2006 E 06770607 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 1881823**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos oculares**

30 Prioridad:

17.05.2005 US 681684 P
17.05.2005 US 681722 P
17.05.2005 US 681723 P
17.05.2005 US 681772 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2015

73 Titular/es:

SARCODE BIOSCIENCE INC. (100.0%)
1000 Marina Blvd., Suite 250
Brisbane, CA 94005 , US

72 Inventor/es:

GADEK, THOMAS y
BURNIER, JOHN

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 530 780 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

Composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos oculares

5 Antecedentes de la invención

10 Un trastorno oftalmológico, ojo seco, es una queja común de los pacientes oftalmológicos. Condiciones sin dirección de ojo seco pueden conducir a la erosión y la abrasión de la superficie de las células epiteliales de la córnea, aumentando la susceptibilidad a la infección. La progresión de la enfermedad puede conducir a la ulceración de la córnea, incluso la pérdida de la vista.

15 Una variedad de irritantes, lesiones y condiciones médicas predisponen a los individuos al inicio de la disminución de la secreción de la glándula lagrimal dando lugar a niveles deficientes de lágrimas acuosas que protegen y nutren la superficie del ojo. Existen factores ambientales como la gran altura, climas áridos y venteados, la contaminación del aire, aire desecado de calefacción central y aire acondicionado central, y la exposición al humo del cigarrillo que puede establecer y/o potenciar el deterioro de la cantidad y calidad de la producción de lágrimas. Incluso el uso extenso del ordenador puede ser un factor que contribuye ya que los estudios han demostrado una disminución significativa de la velocidad de parpadeo para los usuarios que concentran su atención en las pantallas de ordenador. Algunos avances en el cuidado de los ojos, comenzando con la introducción de los lentes de contacto, y en la actualidad, la popularidad del procedimiento LASIK para la corrección de la visión, han contribuido al reciente crecimiento del número de sujetos con ojo seco. El uso de lentes de contacto resulta en la absorción de la película lagrimal por la lente, con la resultante irritación física de la conjuntiva en los párpados. LASIK puede tener un efecto secundario de lesión en el ojo ya que los nervios a menudo pueden ser cortados o sometidos a ablación durante la cirugía refractiva con láser, lo que puede conducir al síndrome de ojo seco, al menos temporal por varios meses de duración.

25 La enfermedad y algunas condiciones físicas pueden predisponer a las personas al trastorno de ojo seco, incluyendo; alergias, diabetes, deficiencia de la glándula lagrimal, lupus, la enfermedad de Parkinson, el síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, la rosácea, y otras. Los medicamentos para otras enfermedades pueden causar o exacerbar los trastornos de ojo seco, incluyendo diuréticos, antidepresivos, medicamentos para la alergia, píldoras anticonceptivas, descongestionantes y otros.

30 También los cambios relacionados con la edad pueden inducir o exacerbar el ojo seco. Las mujeres post-menopáusicas experimentan cambios en los niveles hormonales que pueden fomentar o empeorar el ojo seco, y desequilibrios de la tiroides pueden causar cambios similares. Por último, el envejecimiento en sí mismo puede causar una reducción en la producción de lípidos con el resultante ojo seco.

35 Hasta hace poco, las intervenciones terapéuticas se limitaron a medidas paliativas para aumentar el nivel de humedad del ojo. Esto se consigue más frecuentemente con la instilación de los fluidos que actúan como lágrimas artificiales. Estos fluidos son a menudo soluciones que se instilan una vez o varias veces al día. Para los casos más graves de ojo seco, soluciones de lágrimas artificiales que incorporan un espesante o geles oculares pueden aumentar la cantidad de película retenida en el ojo. Alternativamente, varias terapias de ungüento nocturnas están disponibles. Las soluciones espesas, geles y pomadas sufren la limitación de que la visión puede verse afectada de manera significativa después de la aplicación, lo que las hace menos útiles para el sujeto promedio, que puede requerir numerosas aplicaciones durante su vigilia, horas de actividad. Otra intervención paliativa es la instalación de oclusiones lagrimales temporales, o incluso en el cierre quirúrgico de la ruta de drenaje normal de lágrimas en la cavidad nasal adyacente al ojo.

Sin embargo, ninguna de estas intervenciones es eficaz en el tratamiento de este trastorno. Por lo tanto, es deseable desarrollar agentes que traten eficazmente el ojo seco, preferiblemente con efectos secundarios mínimos.

50 El artículo de Jianping, Gao et al, Experimental Eye Research, vol. 78, no.4, Abril de 2004, páginas 823-835, describe cómo expresión ICAM-1 predispone los tejidos oculares a la inflamación de base inmune en pacientes con ojo seco y ratones MRL/lpr tipo síndrome de Sjogrens.

55 El documento WO 2005/044817 revela compuestos para el tratamiento de trastornos mediados por la familia CD11/CD18 de moléculas de adhesión celular (por ejemplo, LFA-1).

60 El documento US 2004/058968 revela compuestos que unen los receptores de adhesión CD11/CD18 tal como Antígeno-1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1) y que son útiles para el tratamiento de trastornos mediados por LFA-1, tales como la inflamación y las enfermedades autoinmunes.

Los documentos US 2005/080119 y US 2004/006236 revelan compuestos que son útiles para el tratamiento de la lesión por reperfusión.

5 El artículo de Keating, Susan M. et al, Proc. Spie, vol. 2913, no. 128, 2 de julio de 2003, página 137, revela la contribución de los ensayos de polarización de fluorescencia para la optimización de plomo de molécula pequeña.

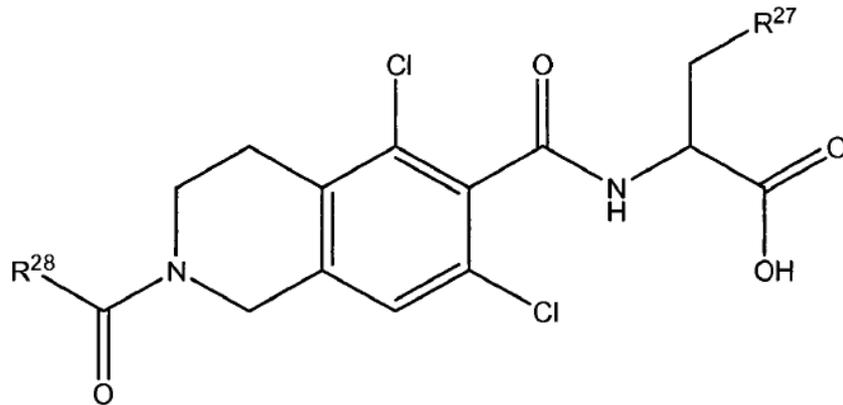
El artículo de Gadek, T Ret al, Science, vol. 295, no. 5557, 8 de febrero de 2002, revela la generación de un antagonista del LFA-1 por la transferencia del epítipo inmunorregulador ICAM-1 a una molécula pequeña.

10 El artículo de Shimaoka, M et al, Immunity, Cell Press, US, vol. 19, no. 3, 1 septiembre de 2003, páginas 391-402, revela antagonistas de integrina de molécula pequeña que se unen al dominio similar a la subunidad 1 beta2 y activan las señales en una dirección y los bloquean en la otra.

15 El artículo de Kunert Kathleen S et al, Archives of Ophthalmology, vol. 118, no. 11, noviembre de 2000, páginas 1489-1496, revela el análisis de tratamiento con ciclosporina tópica de los pacientes con síndrome de ojo seco y el efecto sobre los linfocitos conjuntivales.

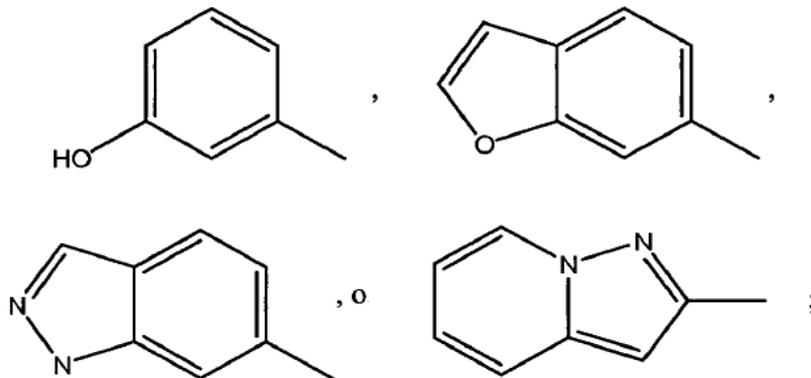
Resumen de la invención

20 La presente invención provee un compuesto para utilizar en el tratamiento de la enfermedad de ojo seco, que es antagonista del antígeno asociado a la función de linfocitos (LFA-1) de la Fórmula II

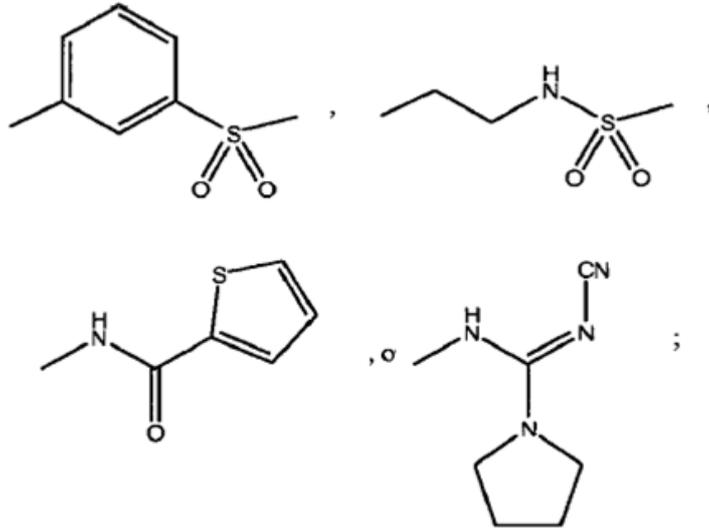


Fórmula II

25 en donde R²⁸ se selecciona del grupo de

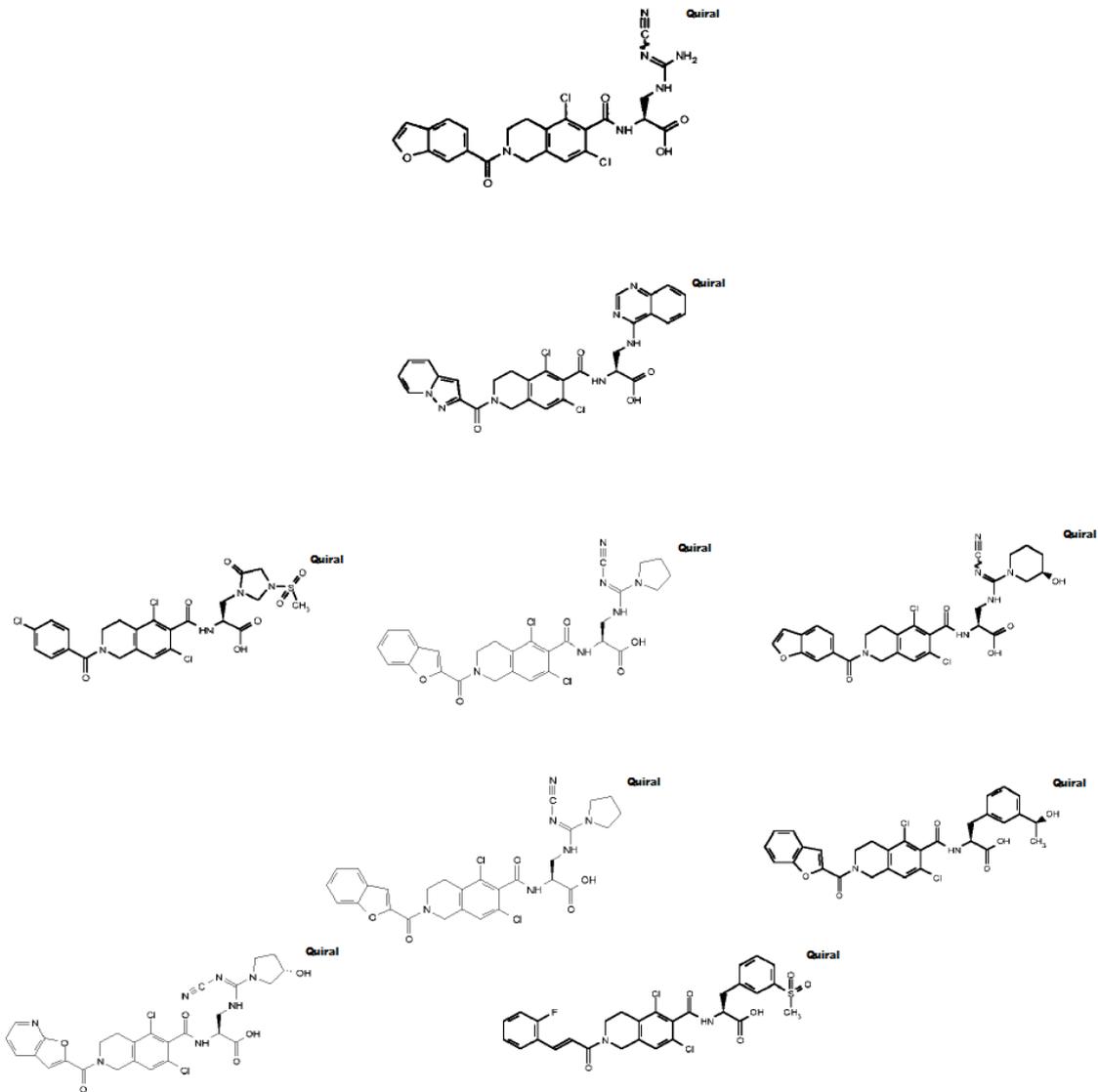


y R²⁷ se selecciona del grupo que consiste en



5 y

o es de la fórmula:



; o una sal de este farmacéuticamente aceptable.

- 5 En este documento se describen los procedimientos para el tratamiento de trastornos inflamatorios mediados por LFA-1 mediante la administración de una cantidad eficaz de un antagonista del LFA-1 por sí mismo o en combinación con otros agentes terapéuticos a un sujeto. En algunos casos se describen en este documento, enfermedades en las que el anticuerpo anti-LFA-1, Raptiva, ha mostrado efecto terapéutico o efecto sobre las células inflamatorias en el tejido enfermo, son enfermedades que se tratan por los compuestos de LFA-1 de la presente invención. Los pacientes con enfermedades
- 10 alérgicas mediadas inmunes, incluyendo rinitis pueden ser tratados con los compuestos de la invención para reducir la inflamación asociada con respuestas alérgicas y/o inmunes mediadas por LFA-1. Una administración local de los compuestos de la invención, administrados a través de la boca o la nariz como una solución nebulizada o polvo disperso es útil en el tratamiento del asma u otras enfermedades inflamatorias pulmonares mediadas por LFA-1. Una formulación de crema de los compuestos de la invención es útil en la administración local de un antagonista del LFA-1 a la piel en enfermedades dermatológicas mediadas por LFA-1 tales como eczema y psoriasis. Una formulación oral de un antagonista
- 15 del LFA-1 que se sabe que se absorbe mal a nivel sistémico se administra por vía oral en estudios en animales es útil para la administración local tópica de antagonistas del LFA-1 en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del tracto

gastrointestinal (GI), incluyendo la enfermedad de Crohn y el síndrome del intestino irritable, u otra enfermedad del GI mediada por LFA-1 u otras integrinas de los leucocitos incluyendo VLA4 y Mac-1.

5 En la presente invención, el trastorno que está mediado por LFA-1 es un trastorno del ojo. Específicamente el trastorno inflamatorio que está mediada por LFA-1 es ojo seco. Los compuestos de la presente invención son útiles para el tratamiento del síndrome de ojo seco. Este síndrome abarca síntomas causados por: queratoconjuntivitis seca, síndrome de Sjorgen, lesión en la córnea, el ojo seco relacionado con la edad, el síndrome de Stevens-Johnson, alacrima congénita, los efectos secundarios farmacológicos, infección, síndrome de Riley-Day, fibrosis conjuntival, tensión ocular, destrucción glandular y de tejido, penfigoide cicatricial ocular, blefaritis, trastornos autoinmunes y otros trastornos inmunodeficientes, 10 alergias, diabetes, la deficiencia de la glándula lagrimal, el lupus, la enfermedad de Parkinson, el síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, la rosácea, la exposición ambiental al aire excesivamente seco, las partículas en suspensión en el aire, el humo y el smog y la incapacidad para parpadear, entre otros. Muchos pacientes que sufren de ojo seco también pueden tener una enfermedad autoinmune subyacente, el síndrome de Sjogren. Los criterios de diagnóstico actualmente reconocidos para la identificación del paciente incluyen los signos clínicos y síntomas de sequedad en la boca. Los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de este síntoma, en formulaciones de enjuagues bucales o pastillas. Una crema para la piel aplicada a la Superficie exterior de los párpados administrando así un antagonista del LFA-1 a través del párpado para el revestimiento interior del párpado y la intervención del tejido conjuntival y las glándulas lagrimales accesorias es deseable en el tratamiento de inflamación mediada por LFA-1 del párpado y ojo, 20 particularmente en el tratamiento de ojo seco.

También se describen en el presente documento las composiciones farmacéuticas que comprenden un antagonista del LFA-1 para la administración en los métodos de tratamiento de trastornos inflamatorios mediados por LFA-1. En la presente descripción el trastorno inflamatorio mediado por LFA-1 es un trastorno del ojo para el cual se proporcionan las composiciones farmacéuticas que comprenden un antagonista del LFA-1. En concreto, el trastorno inflamatorio mediado por LFA-1 es el ojo seco, para lo cual se han proporcionado composiciones farmacéuticas que comprenden un antagonista del LFA-1. Se provee además que las composiciones pueden comprender además otro agente terapéutico para coadministrar ya sea en la misma formulación o por separado. En algunos casos, las composiciones farmacéuticas se administran por vía oral, mediante inyección, por vía intranasal, por inhalación, por vía rectal, tópica, a través de la instilación a la superficie ocular, o por vía transdérmica. 25

30 También se describen en el presente documento las formulaciones para las composiciones que se administran en los métodos de tratamiento de trastornos inflamatorios mediados por LFA-1. En algunos casos, se proveen las formulaciones de retención gástrica de las composiciones para la administración para tratar trastornos inflamatorios mediados por LFA-1. En algunos casos, se proveen formulaciones de retención gástrica de las composiciones para la administración para tratar trastornos oculares que son trastornos inflamatorios mediados por LFA-1. En la presente descripción, se proveen formulaciones oculares de composiciones para la administración para tratar trastornos inflamatorios mediados por LFA-1. En la presente descripción, se proveen formulaciones oculares de composiciones para la administración para tratar trastornos inflamatorios mediados por LFA-1. En algunos casos, se proveen formulaciones de composiciones para la administración para tratar trastornos inflamatorios mediados por LFA-1, que son soluciones, cremas, polvos, suspensiones, neblinas, geles, sólidos, y similares. Las formulaciones de liberación controlada también están previstas en algunos casos. 35 40

45 En otro ejemplo, se describen los compuestos para su uso en los métodos descritos en este documento. Los compuestos que son útiles en los métodos descritos en este documento incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, polipéptidos, péptidos, polímeros y molécula pequeñas orgánicas. En otro ejemplo, se utiliza Raptiva en una formulación ocular para tratar el ojo seco.

50 Un ejemplo descrito combina un diagnóstico con un método de tratamiento con un antagonista del LFA-1. En un caso, se realiza una prueba de diagnóstico para síndrome de Sjorgen y después de realizar el diagnóstico de la enfermedad, al paciente se le administra un antagonista del LFA-1 como se describe en el presente documento. En otro ejemplo, se realiza una prueba de diagnóstico para el ojo seco y después se hace un diagnóstico de ojo seco, al paciente se le administra un antagonista del LFA-1 como se describe en el presente documento.

55 Los compuestos proporcionados en el presente documento se administran para aumentar la producción de mucina o lágrimas a un sujeto que sufre de un trastorno inflamatorio mediado por LFA-1. En la presente invención el trastorno inflamatorio es ojo seco.

60 También se describe en este documento un método para identificar inhibidores de la interacción LFA-1:ICAM-1. Los inhibidores se identifican como siendo competitivos directamente con el enlace de ICAM-1 con LFA-1 en la subunidad α L de LFA-1. El método puede utilizar experimentos de enlace competitivo para identificar antagonistas de la interacción LFA-

1:ICAM-1. Se pueden emplear las moléculas de sonda marcada que se sabe que se unen al sitio de adhesión dependiente del ion metálico de la interacción de LFA-1:ICAM-1 en la subunidad α L de LFA-1.

5 Se describe un método de identificación de agentes farmacéuticos útiles para la enfermedad humana, utilizando el patrón de la inhibición del crecimiento celular por ARNsi (secuencias de ARN de interferencia pequeñas) dirigido contra una diana celular implicada en el crecimiento celular y la enfermedad humana para identificar compuestos con un patrón similar de inhibición del crecimiento celular en un grupo de líneas de células cultivadas. Los métodos también pueden utilizarse para identificar inhibidores útiles de LFA-1, el receptor de células-B BR3, Grb2 (una proteína en dirección 3' de los receptores del factor de crecimiento en las cascadas de señalización) y otras proteínas diana dentro y fuera de las células. La identificación de compuestos que se ajustan a un patrón de actividad opuesto de la inhibición del crecimiento celular por ARNsi puede ser estimulante del crecimiento celular útil en enfermedades y condiciones de crecimiento de las células lento. El crecimiento celular mejorado podría ser útil en la curación de heridas y otras situaciones clínicas. Este método puede utilizar datos de la actividad celular de ARNsi para dirigir o seleccionar dianas mediante la búsqueda en bases de datos públicas y/o de propiedad exclusiva de la actividad celular de compuestos por un patrón de actividad celular similar en respuesta a un compuesto o colección de compuestos como un método para identificar compuestos útiles en la identificación de un fármaco humano

Breve descripción de los dibujos

20 Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención se obtendrá por referencia a la siguiente descripción detallada que expone modalidades ilustrativas, en la cual se utilizan los principios de la invención y los dibujos adjuntos de los cuales:

25 La Figura 1 representa el rodamiento, la adhesión de los leucocitos y la migración transendotelial resultantes de la interacción de LFA-1:ICAM-1.

La Figura 2 representa la activación del antígeno de la interacción de LFA-1:ICAM-1.

30 La Figura 3 representa la función coestimuladora de la interacción de LFA-1:ICAM-1.

La Figura 4 representa los antagonistas de moléculas pequeñas útiles en los métodos de identificación.

35 La Figura 5 representa la Tabla 1 que muestra la dependencia de cationes de antagonistas de moléculas pequeñas de LFA-1.

La Figura 6 representa el análisis SDS-PAGE de LFA-1 del compuesto 5 reticulado.

40 La Figura 7 representa el enlace del compuesto 2B e ICAM-1-Ig con las células 293 que expresan LFA-1 de tipo salvaje o LFA-1 que carece del dominio I.

La Figura 8 representa la competencia del antagonista por los compuestos 2A, 3, A-286982 y sICAM-1 en los ELISA de LFA-1/moléculas pequeñas y LFA-1/ICAM-1.

45 La Figura 9 representa la correlación de los valores de IC50 de la competencia del antagonista en los ELISA de LFA-1/moléculas pequeñas y LFA-1/ICAM-1.

La figura 10 muestra el efecto de los antagonistas del enlace del ligando en los ELISA de LFA-1/moléculas pequeñas y LFA-1/ICAM-1.

50 La Figura 11 representa las regresiones Schild de sICAM-1 y el antagonismo del compuesto 3.

La Figura 12 representa el diagrama de flujo de descubrimiento de potentes inhibidores de crecimiento celular para el tratamiento del cáncer humano y la inflamación.

55 Descripción detallada de la invención

I. Interacción de leucointegrinas y receptores de adhesión: Biología y Enfermedades

En este documento se describen los compuestos para utilizar en el tratamiento del componente inflamatorio de trastornos del sistema inmune y otros. En particular, los compuestos descritos en el presente documento son útiles para el tratamiento de la inflamación mediada por leucocitos. Este componente juega un papel en la iniciación y la promoción de la inflamación en enfermedades seleccionadas, tales como psoriasis, eczema, asma, dermatitis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, respuestas asociadas con enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome de Reynaud, enfermedad de Sjorgen, diabetes de aparición juvenil, diabetes mellitus, granulomatosis, trastorno inflamatorio del SNC, enfermedades de daño multiorgánico, todos los tipos de trasplantes, incluyendo enfermedad de injerto contra huésped o huésped contra injerto, infecciones por el VIH y el rinovirus, y la aterosclerosis, entre otras enfermedades.

En la presente invención los compuestos son útiles para el tratamiento del síndrome de ojo seco. Este síndrome abarca los síntomas causados por: queratoconjuntivitis seca, síndrome de Sjorgen, lesión en la córnea, el ojo seco relacionado con la edad, el síndrome de Stevens-Johnson, alacrima congénita, los efectos secundarios farmacológicos, infección, síndrome de Riley-Day, fibrosis conjuntival, tensión ocular, destrucción glandular y de tejido, penfigoide cicatricial ocular, blefaritis, trastornos autoinmunes y otros trastornos inmunodeficientes, las alergias, la diabetes, la deficiencia de la glándula lagrimal, el lupus, la enfermedad de Parkinson, el síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, la rosácea, la exposición ambiental al aire excesivamente seco, las partículas en suspensión en el aire, el humo y el smog y la incapacidad para parpadear, entre otros.

No se pretende limitar el mecanismo de acción, los compuestos para utilizar de la presente invención implican la inhibición de la iniciación y la progresión de la enfermedad relacionada con la inflamación mediante la inhibición de la interacción entre LFA-1 e ICAM-1. LFA-1 e ICAM-1 son moléculas con dominios del receptor extracelular que están implicados en el proceso migración y la proliferación de linfocitos/leucocitos, que conducen a una cascada de respuestas inflamatorias. Tales usos proporcionan efectos anti-inflamatorios *in vitro* e *in vivo*, por ejemplo, como se describe con más detalle más adelante, y son útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas por la inflamación y, en particular, la enfermedad de ojo seco.

La sangre humana contiene células blancas de la sangre (leucocitos), que adicionalmente se clasifican como neutrófilos, linfocitos (con subtipos B- y T-), monocitos, eosinófilos y basófilos. Varias de estas clases de leucocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y linfocitos, están involucrados en los trastornos inflamatorios. LFA-1 es uno de un grupo de leucointegrinas que se expresan en la mayoría de los leucocitos, y se considera que es la integrina linfoide que interactúa con un número de ICAM como ligandos. La interrupción de estas interacciones, y por lo tanto la respuesta inmune/inflamatoria provee la reducción de la inflamación, en particular, la inflamación del ojo.

Por ejemplo, ICAM-1 (CD54) es un miembro de la familia ICAM de los receptores de adhesión (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, ICAM-4) en la súper familia de proteína inmunoglobulina, y se expresa en leucocitos activados, fibroblastos dérmicos y células endoteliales. Véase Krensky, A.M.; Sanchez-Madrid, F.; Robbins, E.; Nagy, J.A.; Springer, T.A. Burakoff, S.J. "The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2, and LFA-3: cell surface antigens associated with CTL-target interactions." 1983 J. Immunol. 131, 611-616. Se expresa normalmente en las células endoteliales que revisten la vasculatura, y se favorece la expresión bajo la exposición a citocinas tales como IL-1, LPS y TNF durante el inicio inflamatorio/inmune.

La investigación realizada en la última década ha ayudado a dilucidar los eventos moleculares implicados en el movimiento y la activación de las células en el sistema inmunológico, centrándose en las interacciones de activación célula a célula dentro de la cascada. Véase Springer, T.A. "Adhesion receptors of the immune system." Nature, 1990,346,425-434. La interacción de Moléculas de Adhesión Intercelular (ICAM) con leucointegrinas juega un papel en el funcionamiento del sistema inmune. Se cree que los procesos inmunes tales como la presentación de antígenos, la citotoxicidad mediada por las células T y la migración transendotelial de los leucocitos (diapedesis) requieren la adhesión celular mediada por la interacción de ICAM con Leucointegrinas. Véase Kishimoto, T. K.; Rothlein; R. R. "Integrins, ICAMs, and selectins: role and regulation of adhesion molecules in neutrophil recruitment to inflammatory sites". Adv. Pharmacol. 1994, 25, 117-138 y Diamond, M.; Springer, T.A. "The dynamic regulation of integrin adhesiveness". Current Biology, 1994, 4, 506-532.

La interacción de ICAM-1 y LFA-1 (también denominado como α L β 2 y CD11a/CD18) se ha demostrado que se involucran en los procesos de adhesión, migración transendotelial de leucocitos, la migración a los sitios de lesión, y la proliferación de linfocitos en el sitio diana activado, como se muestra en la Figura 1. Por ejemplo, actualmente se cree que antes de la migración transendotelial de leucocitos, un componente de la respuesta inflamatoria, la presencia de citocinas/quimiocinas activan las integrinas constitutivamente expresadas en los leucocitos. Células endoteliales de los vasos sanguíneos también favorecen la expresión de ICAM-1 en respuesta a la presencia de las mismas citocinas/quimiocinas. Ya que el rodamiento de los leucocitos enfoca las células endoteliales activadas, su progreso se desaceleró primero por estos receptores de ICAM-1 favorecidos por la expresión. Esto es seguido por una interacción ligando/receptor entre LFA-1 e ICAM-1, expresada en las superficies de las células endoteliales de los vasos sanguíneos, que detiene el linfocito de que rueda más. El linfocito

luego se aplana, y la trasvasación tiene lugar. Este proceso es de importancia tanto en la transmigración de linfocitos a través del endotelio vascular, así como en el tráfico de linfocitos de la sangre periférica a los ganglios linfáticos.

LFA-1 juega un papel en la creación y el mantenimiento de la sinapsis inmunológica, que se puede definir como la estructura física de las superficies de interacción de las células T y Células Presentadoras de Antígeno (APC), como se muestra en la Figura 2. LFA-1 estabiliza la participación de células T con la APC, y por lo tanto conduce a la activación de las células T. La interacción de LFA-1 e ICAM-1 también parece proporcionar señales coestimuladoras para reposar las células T, como se muestra en la Figura 3. La proliferación de células T + CD4 y la síntesis de citoquinas están mediadas por esta interacción como parte de la respuesta inflamatoria.

Dado el papel que la interacción de ICAM-1 y LFA-1 juega en la respuesta inmune/inflamatoria, es deseable para modular estas interacciones para lograr un resultado terapéutico deseado (por ejemplo, la inhibición de la interacción en el caso de una respuesta inflamatoria hiperactiva). También, puesto que LFA-1 tiene varios socios de ligando dentro de la familia ICAM (ICAM-1, ICAM-2 y ICAM-3), que involucran un número de vías de señalización, en algunas modalidades de la invención, es deseable modular estas interacciones selectivamente. Se ha demostrado que el antagonismo de la interacción entre ICAM y Leuointegrinas se puede llevar a cabo por agentes dirigidos contra cualquiera de los componentes.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden modular uno o más componentes de las vías descritas en este documento. Además de inhibir la interacción entre LFA-1 e ICAM-1, las composiciones de la presente invención también pueden intervenir en porciones ya sea antes o después del proceso inflamatorio adicionalmente. Por ejemplo, la expresión inducida de ICAM-1 o LFA-1 (activación) sobre las células endoteliales o leucocitos, antes de la inmovilización y la migración transendotelial, puede ser modulada por las composiciones descritas en el presente documento. La presente invención puede ser útil en la modulación de la expresión de citocinas o quimiocinas que activan ICAM-1 y LFA-1 en el curso del tráfico de leucocitos, en la modulación del transporte de las citocinas o quimiocinas, en la prevención de trasvasación de los leucocitos detenidos, en la señalización de modulación a través de otros mecanismos que están implicados en la proliferación de leucocitos en el sitio de la lesión o la inflamación, y similares.

II. Métodos de tratamiento

El término "sujeto" como se usa en el presente documento incluye animales, en particular seres humanos así como otros mamíferos. Los métodos generalmente implican la administración de uno o más fármacos para el tratamiento de una o más enfermedades. Se pueden utilizar combinaciones de agentes para tratar una enfermedad o múltiples enfermedades o para modular los efectos secundarios de uno o más agentes en la combinación. Los compuestos descritos en este documento pueden usarse en combinación con otros agentes para el tratamiento de ojo seco. Además, los compuestos de la invención se pueden usar con medicamentos que causan ojo seco como un efecto secundario.

El término "tratar" y sus equivalentes gramaticales, como se utiliza en este documento incluyen lograr un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico se entiende la erradicación o mejora del trastorno subyacente que está siendo tratado. También, un beneficio terapéutico se logra con la erradicación o mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con el trastorno subyacente de tal manera que se observa una mejora en el sujeto, sin soportar que el sujeto todavía puede ser afectado por el trastorno subyacente. Para el beneficio profiláctico, las composiciones se pueden administrar a un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad particular, o a un sujeto que reporta uno o más de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, a pesar de que un diagnóstico de esta enfermedad no puede haber sido hecho. Las composiciones se pueden administrar a un sujeto para prevenir la progresión de los síntomas fisiológicos o del trastorno subyacente.

En algunos casos, el agente terapéutico está presente en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéutico en un promedio de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, más del 90%, o sustancialmente eliminar la enfermedad o al menos uno de sus síntomas subyacentes. Preferiblemente, el efecto terapéutico es un efecto en la inflamación.

En algunos casos, el agente terapéutico está presente en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéutico para reducir los síntomas de ojo seco en un promedio de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, más del 90%, o eliminar sustancialmente los síntomas de ojo seco.

En algunos casos, una cantidad eficaz del agente terapéutico es una dosis diaria de aproximadamente 1×10^{-11} , 1×10^{-10} , 1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1×10^{-2} , 1×10^{-1} , 1, 1×10^1 , 1×10^2 gramos.

La administración del agente terapéutico puede ser por cualquier medio apropiado. En algunos casos, el agente terapéutico se administra por vía oral. En algunos casos, el agente terapéutico se administra por administración transdérmica. En

algunos casos, el agente terapéutico se administra por inyección. En algunos casos, el agente terapéutico se administra por vía tópica. Si las combinaciones de agentes se administran como composiciones separadas, se pueden administrar por la misma vía o por vías diferentes. Si las combinaciones de agentes se administran en una única composición, se pueden administrar por cualquier vía apropiada. En algunas modalidades, se administran combinaciones de agentes como una composición sola por administración oral. En algunos casos, las combinaciones de agentes se administran como una composición sola por administración transdérmica. En algunos casos, las combinaciones de agentes se administran como una composición sola por inyección. En algunos casos, las combinaciones de agentes se administran como una composición tópica sola.

El método descrito en este documento es un método de administración de un antagonista del LFA-1 a un sujeto para tratar el ojo seco. En particular, el antagonista del LFA-1 puede modular la inflamación mediada por leucocitos. En un caso, el método descrito en el presente documento trata a un sujeto mediante la administración de un antagonista del LFA-1 para modular la inflamación asociada con la inflamación ocular. De acuerdo con la presente descripción, los compuestos para su uso son para el tratamiento de un sujeto con inflamación asociada con el síndrome de ojo seco mediante la administración de un antagonista del LFA-1. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de ojo seco debido a alergias. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a la diabetes. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a la deficiencia de la glándula lagrimal. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a lupus. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a la enfermedad de Parkinson. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a la enfermedad de Sjogren. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a la artritis reumatoide. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a la rosácea. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a complicaciones derivadas de la terapia LASIK para la corrección de la visión. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido al uso de lentes de contacto. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a la exposición a climas áridos. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a la exposición a la contaminación atmosférica. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a los climas ventosos. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a la exposición, debido al humo del cigarrillo. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a la queratoconjuntivitis seca. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a la lesión en la córnea. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a la fibrosis conjuntival. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco relacionada con la edad. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a síndrome de Stevens-Johnson. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a alacrima congénita. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a los efectos secundarios farmacológicos de otros fármacos que está tomando el paciente. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a la infección. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a síndrome de Riley-Day. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a la tensión del ojo, incluyendo el que se debe al uso del ordenador. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a la destrucción glandular y del tejido. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a penfigoide cicatricial ocular. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a la blefaritis. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a trastornos autoinmunes y otros trastornos inmunodeficientes. Un ejemplo de la descripción trata un sujeto con síntomas de trastorno de ojo seco debido a la imposibilidad de parpadear.

En algún caso de la descripción, se emplearán los procedimientos de diagnóstico para identificar un sujeto en necesidad de tratamiento con los compuestos de la invención. La tinción con fluoresceína de la córnea se utiliza para diagnosticar síntomas del trastorno de ojo seco. La tinción con rosa de Bengala de la córnea se utiliza para diagnosticar síntomas del trastorno de ojo seco. La sensibilidad corneal se utiliza para diagnosticar los síntomas del trastorno de ojo seco. Se utiliza el tiempo de ruptura lagrimal (BUT) para diagnosticar los síntomas del trastorno de ojo seco. La prueba de Schirmer con anestesia se utiliza para diagnosticar los síntomas del trastorno de ojo seco. El análisis de la prueba de Schirmer se utiliza para diagnosticar los síntomas del trastorno de ojo seco. La citología de impresión se utiliza para diagnosticar los síntomas del trastorno de ojo seco. Los síntomas de ojo seco subjetivos se utilizan para diagnosticar síntomas del trastorno de ojo seco. Análisis de flujo lagrimal se utiliza para diagnosticar los síntomas del trastorno de ojo seco. Los métodos inmunohistoquímicos, incluyendo pero no limitando a, antígeno leucocitario humano II (HLA-DR), se utilizan para diagnosticar los síntomas del trastorno de ojo seco. La prueba de anticuerpos antinucleares (ANA) o prueba de anticuerpos antinuclear fluorescente (FANA) se utiliza para diagnosticar los síntomas del trastorno de ojo seco. La evaporación ocular se utiliza para diagnosticar los síntomas del trastorno de ojo seco. La meibografía infrarrojo se utiliza para diagnosticar los síntomas del trastorno de ojo seco. La microscopía confocal de barrido en tándem (TSCM) se utiliza para diagnosticar

síntomas del trastorno de ojo seco. Esta es una lista ejemplar de los procedimientos que pueden utilizar para diagnosticar los síntomas de ojo seco y no es de ningún modo limitativo.

El antagonista descrito en este documento puede ser un anticuerpo, fragmento de un anticuerpo, péptido o molécula pequeña. En algunos casos, el antagonista del LFA-1 utilizado es un péptido que no es un anticuerpo. El antagonista de la invención es un agente terapéutico.

Muchas indicaciones terapéuticas para antagonistas del LFA-1 requieren terapia crónica; por lo tanto, inhibidores de moléculas pequeñas de la interacción de LFA-1/ICAM-1 son un grupo descrito en este documento, ya que tienen el potencial para la administración oral, así como un coste de mercancías reducido.

Un ejemplo preferido adicional es un compuesto para utilizar en el tratamiento de la enfermedad de ojo seco usando agentes terapéuticos que son apropiados para la formulación y administración como agentes terapéuticos oculares.

Se describe en este documento y a continuación un método de comparación del enlace de ICAM-1 y los antagonistas que se pueden utilizar para identificar anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, péptidos y moléculas pequeñas como antagonistas de la interacción de LFA-1:ICAM-1. Véase Gadek et al. 2002. El método se describe en términos de identificar antagonistas de moléculas pequeñas. Sin embargo, no debe interpretarse como una limitación del método de ninguna manera para excluir su uso en la identificación de tipos de moléculas más grandes de inhibidores de LFA-1, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o péptidos.

Este método comprende la elección de uno o más de los siguientes pasos como parte del proceso de identificación de un antagonista como un inhibidor competitivo directamente de LFA-1: (a) experimentos de competición utilizando LFA-1 de tipo salvaje de longitud completa comparando el enlace de agentes potenciales antagónicos con el de sICAM-1 (los dominios extracelulares de ligando nativo de LFA-1 y un inhibidor competitivo de LFA-1/ICAM-1) y A-286982 (un inhibidor alostérico de LFA-1/ICAM-1 conocido por el enlace con el sitio alostérico del dominio I (insertado) (IDAS)). Véase Liu, G.; Huth, J. R.; Olejniczak, E. T.; Mendoza, R.; DeVries, P.; Leitza, S.; Reilly, E. B., Okasinski; G. F.; Fesik, S. W.; and von Geldern, T. W. 2001. "Novel p-arythio cinnamides as antagonists of leukocyte function-associated antigen-1/intracellular adhesion molecule-1 interaction. 2. Mechanism of inhibition and structure-based improvement of pharmaceutical properties". *J. Med. Chem.*, 44, 1202-1210)) (b) estudios de enlace de los agentes antagonistas potenciales e ICAM-1 con un mutante de LFA-1, y (c) estudios de reticulación química. El sitio de enlace de ICAM-1 dirigido en el presente documento ha sido previamente localizado para incluir el motivo del sitio de adhesión dependiente de iones metálicos (MIDAS) dentro del dominio I de la subunidad α de LFA-1. Véase Shimaoka, M., Xiao, T., Liu, J.-H., Yang, Y., Dong, Y., Jun, C.-D., McCormack, A. Zhang, R., Joachimiak, A., Takagi, J., Wang, J.-H., and Springer, T. A. 2003 "Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation" *Cell* 2003, 99-111. Los antagonistas que inhiben el enlace de ICAM-1 con LFA-1 por la competencia directa para un sitio de enlace de alta afinidad común en LFA-1 pueden ser identificados usando una o más etapas de este método.

A. Anticuerpos como agentes terapéuticos

Varios anticuerpos apropiados son conocidos en la técnica. El bloqueo de las CAM, tales como por ejemplo ICAM-1, o las leucointegrinas, como por ejemplo, LFA-1, por anticuerpos dirigidos contra una o ambas de estas moléculas puede inhibir la respuesta inflamatoria. Estudios previos han investigado los efectos de anti-CD11a MAb en muchas funciones inmunes dependientes de células T in vitro y un número de respuestas inmunes in vivo. In vitro, anti-CD11a MABs inhibe la activación de células T (Véase Kuypers T.W., Roos D. 1989 "Leukocyte membrane adhesion proteins LFA-1, CR3 and p150.95: a review of functional and regulatory aspects" *Res. Immunol.*, 140:461-465; Fischer A, Durandy A, Sterkers G, Griscelli C. 1986 "Role of the LFA-1 molecule in cellular interactions required for antibody production in humans" *J. Immunol.*, 136, 3198; target cell lysis by cytotoxic T-lymphocytes (Krensky et al., supra), formation of immune conjugates (Sanders VM, Snyder JM, Uhr JW, Vitetta ES., "Characterization of the physical interaction between antigen-specific B and T cells". *J. Immunol.*, 137:2395 (1986); Mentzer SJ, Gromkowski SH, Krensky AM, Burakoff SJ, Martz E. 1985 "LFA-1 membrane molecule in the regulation of homotypic adhesions of human B lymphocytes" *J. Immunol.*, 135:9), y the adhesion of T-cells to vascular endothelium (Lo SK, Van Seventer GA, Levin SM, Wright SD., Two leukocyte receptors (CD11a/CD18 and CD11b/CD18) mediate transient adhesion to endothelium by binding to different ligands., *J. Immunol.*, 143:3325 (1989)). Dos anti-CD11a MABs, HI 111, y G43-25B están disponibles de Pharmingen/BD Biosciences. Adicionalmente, un estudio que incluye F8.8, CBR LFA 1/9, BL5, May.035, TS1 / 11, TS1 / 12, TS 1/22, TS2 / 14, 25-3-1, MHM2 y efalizumab evaluó el rango de sitios de enlace en LFA-1 estos anticuerpos ocupadas. Véase Lu, C; Shimaoka, M.; Salas, A.; Springer, T.A. 2004, "The Binding Sites for Competitive Antagonistic, Allosteric Antagonistic, and Agonistic Anticuerpos to the I Domain of Integrin LFA-1" *J. Immun.* 173: 3972-3978 y las referencias en este.

La observación de que la interacción de LFA-1: ICAM-1 es necesaria para optimizar la función de las células T in vitro, y que el anti-CD11a MAB induce la tolerancia a antígenos de proteína (Benjamin RJ, Qin SX, Wise MP, Cobbold SP, Waldmann H.

1988 "Mechanisms of monoclonal antibody-facilitated tolerance induction: a possible role for the CD4 (L3T4) and CD11a (LFA-1) molecules in self-non-self discrimination" *Eur. J. Immunol.*, 18:1079) y prolonga la supervivencia del injerto tumoral en ratones (Heagy W, Walterbangh C, Martz E. 1984 "Potent ability of anti-LFA-1 monoclonal antibody to prolong allograft survival" *Transplantation*, 37: 520-523) fue la base para la prueba de los MABs para estas moléculas para la prevención del rechazo de injertos en los seres humanos. Los experimentos también han sido realizados en primates. Por ejemplo, en base a experimentos en monos, se ha sugerido que un MAb dirigido contra ICAM-1 puede prevenir o incluso revertir el rechazo del injerto renal (Cosimi et al., "Immunosuppression of Cynomolgus Recipients of Renal Allografts by R6.5, a Monoclonal Antibody to Intercellular Adhesion Molecule-1," in Springer et al. (eds.), *Leukocyte Adhesion Molecules* New York: Springer, (1988), p. 274; Cosimi et al., *J. Immunology*, 144:4604-4612 (1990)). Por otra parte, la administración in vivo de anti-CD11a MAb a monos cynomolgus prolongó la supervivencia del injerto de piel Véase Berlin et al., *Transplantation*, 53: 840-849 (1992).

B. Moléculas Pequeñas

Los péptidos han sido investigados para su uso en la reducción de la interacción de LFA-1 con ICAM-1. Los polipéptidos que no contienen una región Fc de una IgG se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5,747,035, que se puede utilizar para tratar trastornos mediados con LFA-1, en particular ojo seco. El uso de péptidos duales, el primero un modulador de la ICAM-1 y el segundo un péptido de bloqueo con una secuencia obtenida a partir de LFA-1 se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5,843,885 para reducir las interacciones entre LFA-1 e ICAM-1. Los péptidos cíclicos se han descrito en la Patente de Estados Unidos No. 6,630,447 como inhibidores de la interacción LFA-1:ICAM-1.

Los antagonistas de moléculas pequeñas incluyen estatinas que se unen con el dominio CD11a de LFA-1. Véase Kallen, J., Welzenbach, K., Ramage, P., Geyl, D., Kriwacki, R., Legge, G., Cottens, S., Weitz-Schmidt, G., and Hommel, U. 1999. "Structural basis for LFA-1 inhibition upon lovastatin binding to the CD11a 1-domain", *J. Mol. Biol.*, 292: 1-9; and Weitz-Schmidt, G., Welzenbach, K., Brinkmann, V., Kamata, T., Kallen, J., Bruns, C., Cottens, S., Takada, Y., and Hommel, U. 2001. Las estatinas inhiben selectivamente la función de leucocitos antigéno-1 mediante el enlace con un nuevo sitio regulador de la integrina, *Nature Med.*, 7:687-692; and Frenette, P. S. 2001. "Locking a leukocyte integrin with statins", *N. Engl. J. Med.*, 345: 1419-1421. Moléculas derivadas del motivo mevinolina/compactina también muestran actividad contra LFA-1. Véase Welzenbach, K., Hommel, U., and Weitz-Schmidt, G. 2002. "Small molecule inhibitors induce conformational changes in the I domain and the 1-like domain of Lymphocyte Function-Associated Antigen-1", *J. Biol. Chem.*, 277: 10590-10598, y en la Patente de Estados Unidos No. 6,630,492.

Una familia de inhibidores basados en hidantoína también se puede utilizar como antagonistas. Véase Kelly, T. A., Jeanfavre, D. D., McNeil, D. W., Woska, J. R. Jr., Reilly, P. L., Mainolfi, E. A., Kishimoto, K. M., Nabozny, G. H., Zinter, R., Bormann, B.-J., and Rothlein, R. 1999. "Cutting edge: a small molecule antagonist of LFA-1-mediated cell adhesion", *J. Immunol.*, 163: 5173-5177. Se cree que estos compuestos son inhibidores alostéricos de LFA-1.

Una familia de p-ariltio cinnamidas nuevas puede actuar como antagonistas de LFA-1. Véase Liu, G.; Link, J.T.; Pei, Z.; Reilly, E.B.; Nguyen, B.; Marsh, K.C.; Okasinski, G.F.; von Geldern, T.W.; Ormes, M.; Fowler, K.; Gallatin, M. 2000 "Discovery of novel p-arylthio cinnamides as antagonists of leukocyte function-associated antigen-1/intracellular adhesion molecule-1 interaction. 1. Identification of an additional binding pocket based on an anilino diaryl sulfide lead". *J. Med. Chem.* 43, 4015-4030.

Otras familias de inhibidores de moléculas pequeñas se revelan en publicaciones (Véase Gadek, T. R., Burdick, D. J., McDowell, R. S., Stanley, M. S., Marsters, J. C. Jr., Paris, K. J., Oare, D. A., Reynolds, M. E., Ladner, C., Zioncheck, K. A., Lee, W. P., Gribling, P., Dennis, M. S., Skelton, N. J., Tumas, D. B., Clark, K. R., Keating, S. M., Beresini, M. H., Tilley, J. W., Presta, L. G., and Bodary, S. C. 2002. "Generation of an LFA-1 antagonist by the transfer of the ICAM-1 immunoregulatory epitope to a small molecule" *Science*, 295: 1086-1089 and online supplementary material). Y en patentes, incluyendo Patente de Estados Unidos No. 6,872, 735, Patente de Estados Unidos No. 6,667,318, Patente de Estados Unidos No. 6803384, Patente de Estados Unidos No. 6,515,124, Patente de Estados Unidos No. 6331640, y solicitudes de patente, incluyendo: US 20020119994, US 20040058968, US 20050080119, WO99/49856, WO00/21920, WO01/58853, WO02/59114, WO05/044817, y otros.

En algunas modalidades, los compuestos descritos en este documento se utilizan en combinación con restasis (Ciclosporina A). Los compuestos de la invención también se pueden utilizar para aumentar la producción de mucina y/o la producción de lágrimas. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención pueden ofrecer un alivio adicional más allá de la disminución de la inflamación y también por el aumento de la producción de mucina que forma una parte de la película lagrimal. Se sabe que la interacción de LFA-1 e ICAM están implicadas en varias enfermedades autoinmunes e inflamatorias, particularmente aquellas con participación de células linfocítica (células -T o -B), dendríticas, monocíticas que expresan LFA-1 en su superficie como parte del componente inflamatorio de la enfermedad. Los antagonistas de LFA-1 pueden ser

particularmente útiles en el tratamiento de estas enfermedades debido a la expresión de la diana terapéutica en el tejido enfermo se limita a la infiltración de células del sistema inmune. LFA-1 puede bloquear la adhesión, migración, proliferación, y liberación de señales inflamatorias en el tejido circundante por las células del sistema inmune. El anticuerpo anti-LFA-1, Raptiva, que tiene un efecto sobre las células inflamatorias en el tejido enfermo se puede utilizar para tratar el ojo seco.

Muchos de los pacientes que sufren de ojo seco también pueden tener una enfermedad autoinmune subyacente, el síndrome de Sjogren. Los criterios de diagnóstico actualmente reconocidos incluyen los signos clínicos y síntomas de Boca Seca. Los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de este síntoma, en formulaciones de enjuagues bucales o pastillas. Una pastilla que incorpora los compuestos de la invención en un material sólido o ceroso puede estimular la secreción de saliva mientras que libera el compuesto de la invención mediante liberación sostenida.

Los pacientes con enfermedades alérgicas mediadas inmunes, incluyendo la rinitis pueden ser tratados con los compuestos descritos en el presente documento. Por ejemplo, un antagonista del LFA-1 puede ser administrado localmente en la nariz, fosas nasales, y/o en la cavidad nasal para reducir las respuestas inmunes y/o alérgicas asociadas con la inflamación.

A la administración local de los compuestos descritos en el presente documento, administrados a través de la boca o la nariz como una solución nebulizada o polvo disperso puede ser útil en el tratamiento del Asma u otras enfermedades inflamatorias pulmonares mediadas por LFA-1.

Una formulación de crema de los compuestos descritos en el presente documento podría ser útil en la administración local de un antagonista del LFA-1 a la piel en enfermedades dermatológicas mediadas por LFA-1 tales como eczema y psoriasis. Los compuestos útiles en este sentido incluyen antagonistas del LFA-1 y sus pro-fármacos que se transforman en el fármaco activo en la piel inflamada. Una crema para la piel aplicada al superficie exterior de los párpados administrada así un antagonista del LFA-1 de todo el párpado para el revestimiento interior del párpado y la intervención del tejido conjuntival y las glándulas lagrimales accesorias pueden ser deseables en el tratamiento de inflamación mediada por LFA-1 del párpado y el ojo, particularmente en el tratamiento de ojo seco.

Una formulación oral de un antagonista del LFA-1 que se sabe que se absorbe mal a nivel sistémico por vía oral en estudios con animales puede ser útil para la administración tópica local de antagonistas del LFA-1 en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal (GI), incluyendo la enfermedad de Crohn y el Síndrome de Intestino Irritable, u otra enfermedad gastrointestinal mediada por LFA-1 u otras integrinas de leucocitos incluyendo VLA4 y Mac-1.

II. Compuestos útiles en el método

A. Definiciones

El término "alifático", como se utiliza en este documento, incluye ambos hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados, de cadena lineal (no ramificados) o ramificada, que están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos funcionales. Como se apreciará por un experto en la técnica, "alifático" en el presente documento tiene la intención de incluir, pero no se limita a, fracciones alquilo, alquenilo, alquinilo. Por lo tanto, como se utiliza en este documento, el término "alquilo" incluye grupos alquilo lineales y ramificados. Una convención análoga se aplica a otros términos genéricos tales como "alquenilo", "alquinilo" y similares.

Además, como se usa en este documento, los términos "alquilo", "alquenilo", "alquinilo", y similares abarcan grupos tanto sustituidos y no sustituidos. Como se usa en el presente documento, "alquilo inferior" se utiliza para indicar los grupos alquilo (sustituidos, no sustituidos, ramificados o no ramificados) que tienen aproximadamente 1-6 átomos de carbono.

En ciertos casos, los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo empleados en la invención contienen de aproximadamente 1-20 átomos de carbono alifáticos. En ciertos otros casos, los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo empleados en la invención contienen aproximadamente 1-10 átomos de carbono alifáticos. En aún otros casos, los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo empleados en la invención contienen aproximadamente de 1-8 átomos de carbono alifáticos. En aún otros casos, los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo empleados en la invención contienen aproximadamente de 1-6 átomos de carbono alifáticos. En aún otros casos, los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo empleados en la divulgación contienen aproximadamente de 1-4 átomos de carbono. Por lo tanto los grupos alifáticos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, alilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, tert-butilo, n-pentilo, sec-pentilo, isopentilo, tert-pentilo, n-hexilo, sec-hexilo, fracciones y similares, que a su vez, pueden llevar uno o más sustituyentes.

Los grupos alquenilo incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, etenilo, propenilo, butenilo, y similares. Los grupos alquinilo representativos incluyen, pero no se limitan a, etinilo, 2-propinilo y similares.

El término "alquileo inferior" tal como se utiliza en este documento, se refiere a una cadena hidrocarburo que une juntos otros dos grupos, i. e., está unida a otro grupo en cada extremo, por ejemplo metileno, etileno, butileno y similares. Tal sustituyente tiene preferiblemente de 1 a 10 carbonos y más preferiblemente de 1 a 5 carbonos. Tales grupos pueden estar sustituidos, preferiblemente con un grupo amino, acetilamino (un grupo alquilcarbonilo inferior unido a través de un átomo de nitrógeno), o grupo cicloalquilo inferior. Por este último se entiende un anillo de hidrocarburo saturado, preferiblemente con un total de 3 a 10 metilenos (inclusive de los carbonos de fijación), más preferiblemente de 3 a 6.

El término "alicíclico", como se utiliza en este documento, se refiere a compuestos que combinan las propiedades de los compuestos alifáticos y cíclicos e incluyen pero no se limitan a, hidrocarburos alifáticos monocíclicos o policíclicos y compuestos cicloalquilo con puente, que están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos funcionales.

Como se apreciará por un experto en la técnica, "alicíclico" en el presente documento tiene la intención de incluir, pero no se limita a, fracciones cicloalquilo, cicloalqueno, y cicloalquino, que están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos funcionales.

Por lo tanto, los grupos alicíclicos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, ciclopropilo, -CH₂-ciclopropilo, ciclobutilo, -CH₂-ciclobutilo, ciclopentilo, -CH₂-ciclopentilo, ciclohexilo, -CH₂-ciclohexilo, ciclohexeniletilo, ciclohexaniletilo, fracciones norbornilo y similares, que a su vez, pueden llevar uno o más sustituyentes.

El término "alcoxi" o "alquiloxi", como se utiliza en este documento, se refiere a una fracción molecular original saturada o insaturada a través de un átomo de oxígeno. En ciertos casos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-20 átomos de carbono alifáticos. En ciertos otros casos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-10 átomos de carbono alifáticos. En aún otros casos, el grupo alquilo empleado en la invención contiene aproximadamente 1-8 átomos de carbono alifáticos. En aún otros casos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-4 átomos de carbono alifáticos. Los ejemplos de alcoxi incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, isopropoxi, n-butoxi, i-butoxi, sec-butoxi, tert-butoxi, neopentoxi, n-hexiloxi y similares.

El término "alcoxi inferior" tal como se utiliza en este documento se refiere a un grupo alquilo inferior como se define anteriormente que puede ser ramificado o no ramificado como también se ha definido anteriormente y que está unido por un oxígeno a otro grupo (i. e., éteres de alquilo).

El término "tioalquilo", como se utiliza en este documento, se refiere a un grupo saturado o insaturado (i. e., S-alqueno y S-alquino) unido a la fracción molecular original a través de un átomo de azufre. En ciertos casos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-20 átomos de carbono alifáticos. En ciertos otros casos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-10 átomos de carbono alifáticos. En aún otros casos, el grupo alquilo empleado en la invención contiene aproximadamente 1-8 átomos de carbono alifáticos. En aún otros casos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-6 átomos de carbono alifáticos. En aún otros casos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-4 átomos de carbono alifáticos. Ejemplos de tioalquilo incluyen, pero no se limitan a, metiltio, etiltio, propiltio, isopropiltio, n-butiltio, y similares.

El término "alquiltio inferior" tal como se utiliza en este documento se refiere a un grupo alquilo inferior unido a través de un átomo de azufre divalente, por ejemplo, un grupo metilmercapto o uno isopropilmercapto. Por alquiltio inferior se entiende dicho grupo que está unido en cada extremo.

El término "alquilamino" se refiere a un grupo que tiene la estructura -NHR', donde R' es alquilo, como se define en este documento. El término "aminoalquilo" se refiere a un grupo que tiene la estructura NH₂R', en donde como se define en este documento. En ciertos casos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-20 átomos de carbono alifáticos. En ciertos otros casos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-10 átomos de carbono alifáticos. En aún otros casos, el grupo alquilo empleado en la invención contiene aproximadamente átomos de carbono alifáticos. En aún otros casos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-6 átomos de carbono alifáticos. En aún otros casos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-4 átomos de carbono alifáticos. Los ejemplos de alquilamino incluyen, pero no se limitan a, metilamino, y similares.

Algunos ejemplos de sustituyentes de las fracciones alifáticas descritas anteriormente (y otras) de los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a alifático; alicíclico; heteroalifático; heterocíclico; aromático; heteroaromático; arilo; heteroarilo; alquilarilo; heteroalquilarilo; alquilheteroarilo; heteroalquilheteroarilo; alcoxi; ariloxi; heteroalcoxi; heteroariloxi; alquiltio; ariltio; heteroalkyltio; R_x incluye independientemente, pero no se limita a, alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heteroalquilarilo o heteroalquilheteroarilo, en donde cualquiera de los sustituyentes alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, alquilarilo o alquilheteroarilo descritos anteriormente y en este documento puede ser sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, saturado o insaturado, y en donde cualquiera de los sustituyentes arilo o heteroarilo descritos anteriormente y en este documento puede ser sustituido o no

sustituido. Ejemplos adicionales de sustituyentes generalmente aplicables se ilustran por las modalidades específicas mostradas en los Ejemplos que se describen en este documento.

5 En general, el término "fracción aromática", como se utiliza en este documento, se refiere a una fracción mono-o policíclica, insaturada estable que tiene preferiblemente de 3-14 átomos de carbono, cada uno de los cuales puede ser sustituido o no sustituido. En ciertas modalidades, el término "fracción aromática" se refiere a un anillo plano que tiene orbitales-p perpendiculares al plano del anillo en cada átomo del anillo y que satisface la regla de Hückel donde el número de electrones pi en el anillo es $(4n + 2)$ en donde n es un número entero. Una fracción mono-o policíclica, insaturada que no satisface uno o todos estos criterios para la aromaticidad se define en el presente documento como "no aromático", y es abarcado por el término "alicíclico".

10 En general, el término "fracción heteroaromática", como se utiliza en este documento, se refiere a una fracción insaturada mono-o policíclica, estable que tiene preferiblemente de 3-14 átomos de carbono, cada uno de los cuales puede ser sustituido o no sustituido; y que comprende al menos un heteroátomo seleccionado de O, S, y N dentro del anillo en lugar de un átomo de carbono del anillo). En ciertas modalidades, el término "fracción heteroaromática" se refiere a un anillo planar que comprende al menos un heteroátomo, que tiene orbitales p perpendiculares al plano del anillo en cada átomo del anillo, y que satisface la regla de Hückel donde el número de electrones pi en el anillo es $(4n + 2)$, en donde n es un número entero.

15 También se apreciará que fracciones aromáticas y heteroaromáticas, tal como se define en el presente documento pueden estar unidas a través de una fracción alquilo o heteroalquilo y por lo tanto también incluyen fracciones -(alquilo) aromáticas, -(heteroalquilo) aromáticas, -(heteroalquilo) heteroaromáticas, y -(heteroalquilo) heteroaromáticas. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, las frases "fracciones aromáticas o heteroaromáticas" y "aromática, (heteroalquilo) aromática, -(heteroalquilo) heteroaromáticas, y (heteroalquilo) heteroaromática" son intercambiables. Los sustituyentes incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los sustituyentes mencionados anteriormente, i.e., los sustituyentes indicados para las fracciones alifáticas, o para otras fracciones como se revela en este documento, lo que resulta en la formación de un compuesto estable.

20 El término "arilo", como se utiliza en este documento, no difiere significativamente del sentido común del término en la técnica, y se refiere a una fracción cíclica insaturada que comprende al menos un anillo aromático. En ciertos casos, "arilo" se refiere a un sistema de anillo carbocíclico mono-o bicíclico que tiene uno o dos anillos aromáticos incluyendo, pero no limitado a, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, indenilo y similares.

25 El término "heteroarilo", como se usa en el presente documento, no difiere significativamente del sentido común del término en la técnica, y se refiere a un radical aromático cíclico que tiene de cinco a diez átomos de anillo de los cuales un átomo del anillo se selecciona entre S, y N; cero, uno o dos átomos del anillo son heteroátomos adicionales seleccionados independientemente entre S, y N; y los átomos restantes del anillo son carbono, estando unido el radical al resto de la molécula mediante cualquiera de los átomos del anillo, tales como, por ejemplo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, y similares.

30 Se apreciará que los grupos arilo y heteroarilo (incluyendo grupos arilo bicíclicos) pueden ser no sustituidos o sustituidos, en donde la sustitución incluye la sustitución de uno o más de los átomos de hidrógeno del mismo independientemente con uno o más de las siguientes fracciones que incluyen, pero no limitan a: alifática; alicíclica; heteroalifática; heterocíclica; aromática; heteroaromática; arilo; heteroarilo; alquilarilo; heteroalquilarilo; alquilheteroarilo; heteroalquilheteroarilo; alcoxi; ariloxi; heteroalcoxi; heteroariloxi; alquiltio; ariltio; heteroalquiltio; heteroariltio; F; Cl; Br; I; -OH; -NO₂; -CN; -CF₃; -CH₂CF₃; -CHCl₂; -CH₂OH; -CH₂CH₂OH; -CH₂NH₂; CH₂SO₂CH₃; -C(=O)R_x; -C(=N)(R_x)₂; -OC(=O)R_x; -OCO₂R_x; -OC(=O)N(R_x)₂; -N(R_x)₂; -S(O)₂R_x; -NR_x(CO)R_x; en donde cada ocurrencia de R_x independientemente incluye, pero no se limita a, alifática, alicíclica, heteroalifática, heterocíclica, aromática, heteroaromática, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heteroalquilarilo o heteroalquilheteroarilo donde cualquiera de los sustituyentes alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, alquilarilo, o alquilheteroarilo descritos anteriormente y en este documento puede ser sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, saturado o insaturado, y en donde cualquiera de los sustituyentes aromático, heteroaromático, arilo, heteroarilo, -(alquil) arilo o- (alquilo) heteroarilo descritos anteriormente y en este documento, pueden ser sustituidos o no sustituidos. Adicionalmente, se apreciará, que dos grupos adyacentes tomados juntos pueden representar una fracción alicíclica o heterocíclica sustituida o no sustituida de 4, 5, 6, o 7-miembros. Ejemplos adicionales de sustituyentes generalmente aplicables se ilustran por las modalidades específicas mostradas en los Ejemplos que se describen en este documento.

35 El término "cicloalquilo", como se utiliza en este documento, se refiere específicamente a grupos que tienen de tres a siete, preferiblemente tres a diez átomos de carbono. Los cicloalquilos apropiados incluyen, pero no se limitan a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y similares, que, como en el caso de fracciones alifática, alicíclica,

heteroalifática o heterocíclica, opcionalmente pueden ser sustituidas con sustituyentes que incluyen, pero no se limitan a alifático; alicíclico; heteroalifático; heterocíclico; aromático; heteroaromático; arilo; heteroarilo; alquilarilo; heteroalquilarilo; alquilheteroarilo; heteroalquilheteroarilo; alcoxi; ariloxi; heteroalcoxi; heteroariloxi; alquiltio; heteroariltio; F; Cl; Br; I; -OH; -NO₂; -CN; -CF₃; -CH₂CF₃; -CHCl₂; -CH₂OH; -CH₂CH₂OH; -CH₂NH₂; -CH₂SO₂CH₃; -C(=O)R_x; -C(=O)N(R_x)₂; -OC(=O)R_x; -OCO₂R_x; -OC(=O)N(R_x)₂; -N(R_x)₂; -S(O)₂R_x; -NR_x(CO)R_x, en donde cada ocurrencia de R_x independientemente incluye, pero no se limita a, alifática, alicíclica, heteroalifática, heterocíclica, aromática, heteroaromática, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heteroalquilarilo o heteroalquilheteroarilo, en donde cualquiera de los sustituyentes alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, alquilarilo, o alquilheteroarilo descritos anteriormente y en este documento puede ser sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, saturado o insaturado, y en donde cualquiera de los sustituyentes, aromático, heteroaromático, arilo o heteroarilo descritos anteriormente y en este documento, pueden ser sustituidos o no sustituidos. Ejemplos adicionales de sustituyentes generalmente aplicables se ilustran por las modalidades específicas mostradas en los Ejemplos que se describen en este documento.

El término "heteroalifático", como se utiliza en este documento, se refiere a fracciones alifáticas en las que uno o más átomos de carbono en la cadena principal han sido sustituidos con un heteroátomo. Por lo tanto, un grupo heteroalifático se refiere a una cadena alifática que contiene uno o más átomos de oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo o silicio, i.e. en lugar de átomos de carbono. Las fracciones heteroalifáticas pueden ser lineal o ramificada, y saturada o insaturada. En ciertos casos, los fracciones heteroalifáticas están sustituidas mediante el reemplazo independiente de uno o más de los átomos de hidrógeno del mismo con una o más fracciones, incluyendo, pero no limitando a alifática; alicíclica; heteroalifática; heterocíclica; aromática; heteroaromática; arilo; heteroarilo; alquilarilo; alquilheteroarilo; alcoxi; ariloxi; heteroalcoxi; heteroariloxi; alquiltio; ariltio; heteroariltio; F; Cl; Br; I; -OH; -NO₂; -CN; -CF₃; -CH₂CF₃; -CHCl₂; -CH₂OH; -CH₂CH₂OH; CH₂NH₂; -CH₂SO₂CH₃; -C(=O)R_x; -C(=O)N(R_x)₂; -OC(=O)R_x; -OCO₂R_x; -OC(=O)N(R_x)₂; -N(R_x)₂; -S(O)₂R_x; NR_x(CO)R_x, en donde cada ocurrencia de R_x independientemente incluye, pero no se limita a, alifática, alicíclica, heteroalifática, heterocíclica, aromática, heteroaromática, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heteroalquilarilo o heteroalquilheteroarilo, en donde cualquiera de los sustituyentes alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, alquilarilo, o alquilheteroarilo descritos anteriormente y en este documento puede ser sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, saturado o insaturado, y en donde cualquiera de los sustituyentes, aromático, heteroaromático, arilo o heteroarilo, descritos anteriormente y en este documento, puede ser sustituido o no sustituido. Ejemplos adicionales de sustituyentes generalmente aplicables se ilustran por las modalidades específicas mostradas en los Ejemplos que se describen en este documento.

El término "heterocicloalquilo", "heterociclo" o "heterocíclico", como se utiliza en este documento, se refiere a compuestos que combinan las propiedades de los compuestos heteroalifáticos y cíclicos e incluyen, pero no se limitan a, sistemas de anillo cíclico mono- o policíclico saturado e insaturado, que tiene de 5-16 átomos en donde al menos un átomo de anillo es un heteroátomo seleccionado de S y N (en donde los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados), en donde los sistemas de anillo están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos funcionales, como se define en este documento. En ciertos casos, el término "heterocicloalquilo", "heterociclo" o "heterocíclico" se refiere a un anillo no aromático de 5, 6 ó 7 miembros o un grupo policíclico en donde al menos un heteroátomo del átomo en el anillo seleccionado de S y N (en donde los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados), incluyendo, pero no limitando a, un grupo bi o tri-cíclico, que comprende anillos de seis miembros condensados que tienen entre uno y tres heteroátomos seleccionados independientemente entre oxígeno, azufre y nitrógeno, en donde (i) cada anillo de 5 miembros tiene 0 a 2 dobles enlaces, cada anillo de 6 miembros tiene 0 a 2 dobles enlaces y cada anillo de 7 miembros tiene de 0 a 3 dobles enlaces, (ii) los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, (iii) el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, y (iv) cualquiera de los anillos heterocíclicos anteriores puede estar fusionado a un anillo arilo o heteroarilo. Los heterociclos representativos incluyen, pero no se limitan a, heterociclos tales como furanilo, piranilo, pirrolilo, tienilo, pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, oxazolilo, oxazolidinilo, isooxazolilo, isoxazolidinilo, dioxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tetrazolilo, triazolilo, tiatriazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, morfolinilo, tiazolilo, tiazolidinilo, isotiazolilo, isotiazolidinilo, ditiazolilo, ditiazolidinilo, tetrahidrofurilo, y derivados benzocondensados de los mismos. En ciertos casos, un grupo "heterociclo heterocicloalquilo o heterocíclico sustituido" se utiliza y como se usa en este documento, se refiere a un grupo heterociclo, o heterocicloalquilo o uno heterocíclico, como se define anteriormente, sustituido por el reemplazo independiente de uno, dos o tres de los átomos de hidrógeno del mismo con, pero no se limitan a alifático; alicíclico; heteroalifático; heterocíclico; aromático; heteroaromático; arilo; heteroarilo; alquilarilo; heteroalquilarilo; alquilheteroarilo; heteroalquilheteroarilo; alcoxi; ariloxi; heteroalcoxi; heteroariloxi; alquiltio; ariltio; heteroariltio; F; Cl; Br; I; -OH; -NO₂; -CN; -CF₃; -CH₂CF₃; -CHCl₂; -CH₂OH; -CH₂CH₂OH; CH₂NH₂; -CH₂SO₂CH₃; -C(=O)R_x; -C(=O)N(R_x)₂; -OC(=O)R_x; -OCO₂R_x; -OC(=O)N(R_x)₂; -N(R_x)₂; -S(O)₂R_x; NR_x(CO)R_x, en donde cada ocurrencia de R_x independientemente incluye, pero no se limita a, alifática, alicíclica, heteroalifática, heterocíclica, aromática, heteroaromática, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heteroalquilarilo o heteroalquilheteroarilo, en donde cualquiera de los sustituyentes alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, alquilarilo, o alquilheteroarilo descrito anteriormente y en este documento, puede ser sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, saturado o insaturado, y en donde cualquiera de los aromáticos, heteroaromáticos, arilo o

heteroarilo descritos anteriormente y en este documento pueden ser sustituidos o no sustituidos. Adicionalmente, se apreciará que cualquiera de las fracciones alicíclicas o heterocíclicas descritas anteriormente y en el presente documento puede comprender una fracción arilo o heteroarilo fusionado a la misma.

5 Los términos "halo" y "halógeno" utilizados en este documento se refieren a un átomo seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo.

El término "haloalquilo" indica un grupo alquilo, como se define anteriormente, que tiene uno, dos, o tres átomos de halógeno unidos a ellos y se ilustra mediante tales grupos como clorometilo, bromoetilo, trifluorometilo, y similares.

10 El término "amino" como se utiliza en este documento, se refiere a una (-NH₂) primaria, (-NHR_x) secundaria, (-NR_xR_y) terciaria, o amina cuaternaria (-N + R_xR_yR_z), donde R_y y R_z son independientemente una fracción alifática, alicíclica, heteroalifática, heterocíclica, aromática o heteroaromática, como se define en el presente documento. Ejemplos de grupos amino incluyen, pero no se limitan a, metilamino, dimetilamino, etilamino, dietilamino, dietilaminocarbonilo, iso-propilamino, piperidino, trimetilamino y propilamino.

15 El término "acilo", como se utiliza en este documento, se refiere a un grupo que tiene la fórmula general -C(=O)R, donde R es una fracción alifática, alicíclica, heteroalifática, heterocíclica, aromática o heteroaromática, como se define en este documento.

20 El término "sulfonamido" como se utiliza en este documento, se refiere a un grupo de la fórmula general -SO₂NR_xR_y donde R_x y R_y son independientemente hidrógeno, o una fracción alifática, alicíclica, heteroalifática, heterocíclica, aromática, heteroaromática o acilo, como se define en este documento.

25 El término "benzamido", como se utiliza en este documento, se refiere a un grupo de la fórmula general PhNR_x, donde R_x es hidrógeno, o una fracción alifática, alicíclica, heteroalifática, heterocíclica, aromática, heteroaromática o acilo, tal como se define en el presente documento.

30 El término "alquilideno C₁₋₆" como se utiliza en este documento, se refiere a un radical divalente saturado sustituido o no sustituido, lineal o ramificado que consiste únicamente de átomos de carbono e hidrógeno, que tiene de uno a seis átomos de carbono, que tiene una valencia libre "-" en ambos extremos del radical.

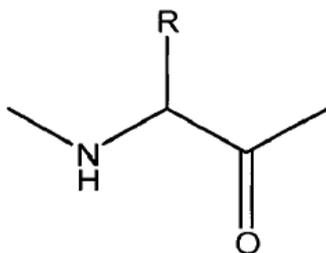
35 El término "alquilideno C₂₋₆", como se utiliza en este documento, se refiere a un radical divalente insaturado sustituido o no sustituido, lineal o ramificado que consiste solamente en átomos de carbono e hidrógeno, que tiene de dos a seis átomos de carbono, que tiene una valencia libre "-" en ambos extremos del radical, y en donde la insaturación está presente sólo como dobles enlaces y en donde un doble enlace puede existir entre el primer carbono de la cadena y la fracción de la molécula.

40 Tal como se utiliza en este documento, los términos "alifático", "heteroalifático", "alquilo", "alquenilo", "alquinilo", "heteroalquilo", "heteroalquenilo", "heteroalquinilo", y similares abarca grupos sustituidos y no sustituidos, saturados e insaturados, y lineales y ramificados. Del mismo modo, los términos grupos "alíclico", "heterocíclico", "heterocicloalquilo", "heterociclo" y similares, abarcan grupos sustituidos y no sustituidos, y saturados e insaturados. Adicionalmente, los términos "cicloalquilo", "cicloalquenilo", "cicloalquinilo",

45 "heterocicloalquilo", "heterocicloalquenilo", "heterocicloalquinilo", "aromático", "heteroaromático", "arilo", "heteroarilo" y similares abarcan grupos tanto sustituidos como no sustituidos.

50 El término "aminoácido natural" como se utiliza en este documento, se refiere a uno cualquiera de L-aminoácido común, de origen natural encontrados en las proteínas de origen natural: glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), triptófano (Trp), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), glutamina (Gln), cisteína (Cys) y la metionina (Met).

55 El término "aminoácido no natural" como se utiliza en este documento se refiere a todos los aminoácidos que no son aminoácidos naturales. Esto incluye, por ejemplo, residuos de α-, β-, D-, L-aminoácidos, y los compuestos de la fórmula general:



5 en donde la cadena lateral R es distinta de las cadenas laterales de aminoácidos de origen natural.

De manera más general, el término "aminoácido", como se utiliza en este documento, abarca los aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales.

10 El término "bioisómeros", como se utiliza en este documento, se refiere generalmente a dos o más compuestos o fracciones que poseen formas y/o volúmenes moleculares similares. En ciertos casos, los bioisómeros tienen aproximadamente la misma distribución de los electrones. En ciertos otros casos, los bioisómeros presentan propiedades biológicas similares. En los casos preferidos, los bioisómeros poseen formas y volúmenes moleculares similares; tienen aproximadamente la misma distribución de los electrones; y presentan propiedades biológicas similares.

15 El término "derivado farmacéuticamente aceptable", como se utiliza en este documento, significa cualquier sal, éster, o sal de dicho éster farmacéuticamente aceptable, de tal compuesto, o cualquier otro aducto o derivado que, tras la administración a un paciente, es capaz de proveer (directa o indirectamente) un compuesto como se describe de otra manera en este documento, o un metabolito o residuo del mismo. Por lo tanto los derivados farmacéuticamente aceptables incluyen entre otros pro-fármacos. Un pro-fármaco es un derivado de un compuesto, normalmente con una actividad farmacológica significativamente reducida, que contiene una fracción adicional, que es susceptible de eliminación in vivo produciendo la molécula original como la especie farmacológicamente activa. Un ejemplo de un pro-fármaco es un éster, que se escinde in vivo para dar un compuesto de interés. Los pro-fármacos de una variedad de compuestos, y materiales y métodos para derivatizar los compuestos originales para crear los pro-fármacos, son conocidos y pueden ser adaptados a la presente divulgación. Ciertas composiciones farmacéuticas ejemplares y derivados farmacéuticamente aceptables se discutirán en más detalle a continuación.

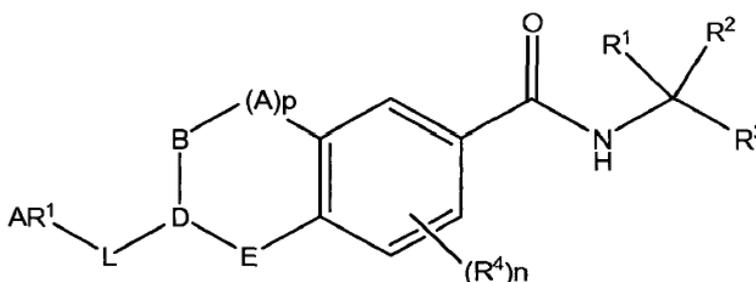
30 Como se usa en este documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que son apropiadas para uso farmacéutico, preferiblemente para su uso en los tejidos de humanos y animales inferiores sin excesiva irritación, respuesta alérgica y similares. Las sales farmacéuticas de aminas, ácidos carboxílicos, y otros tipos de compuestos, son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, S.M. Berge, et al, describe las sales farmacéuticamente aceptables con detalle en J Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977). Las sales se pueden preparar in situ durante el aislamiento y purificación final de los compuestos de la invención, o por separado haciendo reaccionar una función de base libre o ácido libre con un reactivo apropiado, tal como se describe en general a continuación. Por ejemplo, una función de base libre puede hacerse reaccionar con un ácido apropiado. Adicionalmente, cuando los compuestos de la invención llevan una fracción ácida, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos pueden, incluir sales metálicas tales como sales de metales alcalinos, por ejemplo sales de sodio o potasio; y sales de metales alcalinotérreos, por ejemplo sales de calcio o magnesio. Ejemplos de sales de adición de ácido no tóxicas, farmacéuticamente aceptables, son las sales de un grupo amino formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico o usando otros métodos utilizados en la técnica tales como intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen adipato, alginato, ascorbato, aspartato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluensulfonato, undecanoato, sales de valerato, y similares. Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares. Adicionalmente las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, cuando sea apropiado, amonio no tóxico, amonio cuaternario, y cationes de amina formados usando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato y sulfonato de arilo.

Tal como se utiliza en este documento, el término "éster farmacéuticamente aceptable" se refiere a ésteres que se hidrolizan in vivo e incluyen aquellos que se descomponen fácilmente en el cuerpo humano para dejar el compuesto original o una sal del mismo. Los grupos éster apropiados incluyen, por ejemplo, aquellos derivados de compuestos de alcoholes alifáticos farmacéuticamente aceptables, en particular los alcanos, alquenos, etilenglicol, cicloalcanos, y similares, en los que cada fracción alquilo o alquenilo tiene ventajosamente no más de 6 átomos de carbono. Estos son solamente ejemplos y de ninguna manera limitan las posibilidades de ésteres conocidos en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "pro-fármacos farmacéuticamente aceptables" se refiere a aquellos pro-fármacos de los compuestos descritos en este documento que son apropiados para uso farmacéutico, preferiblemente para su uso con los tejidos de humanos y animales inferiores sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, y similares, y eficaces para su uso pretendido, así como las formas zwitteriónicas, cuando sea posible, de los compuestos descritos en el presente documento. El término "pro-fármaco" se refiere a compuestos que se transforman rápidamente in vivo para producir el compuesto original de la fórmula anterior, por ejemplo por hidrólisis en la sangre. Una discusión detallada se proporciona en T. Higuchi and V. Stella, Pro-drugs as Novel Delivery Systems, Vol. 14 of the A. C. S. Symposium Series, and in Edward B. Roche, ed., Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

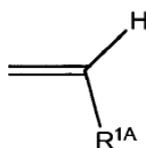
B. Ejemplos de los compuestos del método.

Los compuestos útiles en los métodos descritos en este documento incluyen los compuestos de fórmula I:



Fórmula I

donde R¹ y R² son cada uno independientemente hidrógeno, una cadena lateral de aminoácido, - (CH₂)_mOH, - (CH₂)_marilo, (CH₂)_mheteroarilo, en donde m es 0-6, - CH (R^{1A}) (OR^{1B}), -CH (R^{1A}) (NHR^{1B}), U-T-Q, o una fracción alifática, alicíclica, heteroalifática o heteroalíclica opcionalmente sustituida con U-T-Q; en donde U puede estar ausente o ser uno de los siguientes: -O-, -S(O)₀₋₂-, -SO₂N(R^{1A}), -N(R^{1A})-, -N(R^{1A})C(=O)-, -N(R^{1A})C(=O)- O-, -N(R^{1A})C(=O)-N(R^{1B})-, -N(R^{1A})-SO₂-, -C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, -C(=O)-N(R^{1A})-, -OC(=O)N(R^{1A})-, -C(=N-R^{1E})-, -C(=N-R^{1E})-O-, -C(=N-R^{1E})-N(R^{1A})-, -O-C(=N-R^{1A})-N(R^{1A})-, -N(R^{1A})C(=N-R^{1E})-, -N(R^{1A})C(=N-R^{1E})-O-, -N(R^{1A})C(=N-R^{1E})-N(R^{1B})-, -P(=O)(OR^{1A})-O-, o -P(=O)(R^{1A})-O-; en donde T está ausente o es, una fracción alifática, heteroalifática, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo; y Q es hidrógeno, halógeno, ciano, isocianato, OR^{1B}; -SR^{1B}; -N(R^{1B})₂; -NHC(=O)OR^{1B}; -NHC(=O)N(R^{1B})₂; -NHC(=O)R^{1B}; -NHSO₂R^{1B}; NHSO₂N(R^{1B})₂; -NHSO₂NHC(=O)OR^{1B}; -NHC(=O)NHSO₂R^{1B}; -C(=O)NHC(=O)OR^{1B}; C(=O)NHC(=O)R^{1B}; C(=O)NHC(=O)N(R^{1B})₂; -C(=O)NHSO₂R^{1B}; -C(=O)NHSO₂N(R^{1B})₂; C(=S)N(R^{1B})₂; -SO₂R^{1B}; -SO₂OR^{1B}; SO₂N(R^{1B})₂; -SO₂-NHC(=O)OR^{1B}; -OC(=O)-N(R^{1B})₂; -OC(=O)R^{1B}; -OC(=O)NHC(=O)R^{1B}; -OC(=O)NHSO₂R^{1B}; -OSO₂R^{1B}, o una fracción alifática, heteroalifática, arilo o heteroarilo, o en donde R¹ y R² tomados juntos son una fracción heterocíclica o alicíclica, o juntos son



en donde cada aparición de R^{1A} y R^{1B} es, independientemente, hidrógeno, una fracción alifática, alicíclica, heteroalifática, heterocíclica, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo, -C(=O)R^{1C}, o -C(=O)NR^{1C}R^{1D}; en donde cada aparición de

R^{1C} y R^{1D} es, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, o una fracción alifática, heteroalifática, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo; y R^{1E} es hidrógeno, una fracción alifática, alicíclica, heteroalifática, heterocíclica, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo, -CN, -OR^{1C}, -NR^{1C} R^{1D} o -SO₂R^{1C};

5 donde R³ es -C(=O)OR^{3A}, -C(=O)H, -CH₂OR^{3A}, -CH₂OC(=O)alquilo, -C(=O)NH(R^{3A}), -CH₂X⁰; en donde cada aparición de R^{3A} es, independientemente, hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, alicíclica, heteroalifática, heteroalíciclica, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heteroalquilarilo, heteroalquilheteroarilo, o una sal o éster farmacéuticamente aceptable, o R^{3A}, tomada junto con R¹ y R², forma una fracción heterocíclica; en donde X⁰ es un halógeno seleccionado entre F, Br o I;

10 R⁴ para cada aparición, es independientemente hidrógeno, halógeno, -CN, -NO₂, una fracción alifática, alicíclica, heteroalifática, heteroalíciclica, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo, o es GR^{G1} en donde G es -O-, -S-, NR^{G2}-, -CO-, -SO-, -SO₂-, C(=O)O-, -C(=O)NR^{G2}-, C(=O)-, -NR^{G2}C(=O)- o -SO₂NR^{G2}-, y R^{G1} y R^{G2} son independientemente hidrógeno, una fracción alifática, alicíclica, heteroalifática, heteroalíciclica, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo;

15 n es un número entero de 0-4;

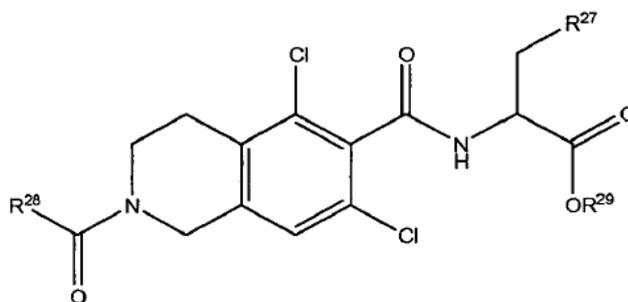
Ar¹ es una fracción monocíclica o policíclica arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alicíclica o heterocíclica;

20 A, B, D y E están conectados por un enlace sencillo o doble, según lo permita la valencia; en donde cada aparición de A, D y E es independientemente C=O, CR^{Ri}, NRⁱ, CRⁱ, N, O, S, -S(=O) o SO₂; en donde cada aparición de Rⁱ es independientemente hidrógeno, halógeno, -CN, -NO₂, una fracción alifática, alicíclica, heteroalifática, heteroalíciclica, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo, o es -GR^{G1} en donde G es -O-, -S-, -NR^{G2}-, -CO-, -SO-, -C(=O)O-, C(=O)NR^{G2}-, -OC(=O)-, -NR^{G2}C(=O)- o -SO₂NR^{G2}-, y R^{G1} y R^{G2} son independientemente hidrógeno, una fracción alifática, alicíclica, heteroalifática, heteroalíciclica, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo, o cualquiera de dos apariciones adyacentes tomadas juntas, representan una fracción alicíclica, heteroalíciclica, arilo, heteroarilo o;

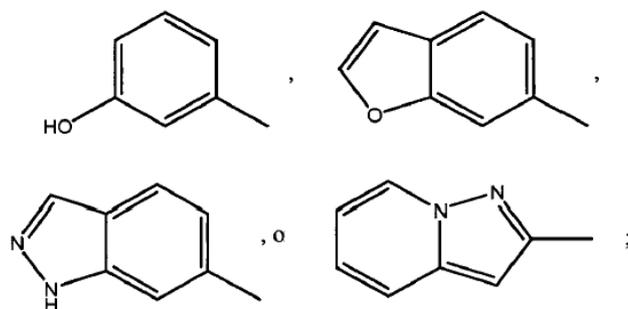
p es un número entero de 0-4; y,

30 L está ausente o es V-W-X-Y-Z, en donde cada aparición de V, W, X, Y Z es independientemente ausente, C=O, NR^{L1}, -O-, -C(R^{L1})=, =C(R^{L1})-, -C(R^{L1})(R^{L2}), C(=N-O R^{L1}), C(=NR^{L1}), -N=, S(O)₀₋₂; una cadena alquenilideno C₁₋₆ o alquenilideno C₂₋₆ sustituido o no sustituido en donde hasta dos unidades de metileno no adyacentes están opcionalmente de forma independiente sustituidas por -C(=O)-, -CO₂-, -C(=O)C(=O)-, -C(C-O)NR^{L3}-, -OC(=O)-, -OC(=O)NR^{L3}-, -NR^{L3}NR^{L4}-, -NR^{L3}NR^{L4}C(=O)-, -NR^{L3}C(=O)-, NR^{L3}CO₂-, NR^{L3}C(=O)NR^{L4}-, -S(=O)-, -SO₂-, -NR^{L3}SO₂-, -SO₂NR^{L3}-, -NR^{L3}SO₂NR^{LA}-, -O-, -S-, o -NR^{L3}-; en donde cada aparición de R^{L3} y R^{L4} es independientemente hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, arilo, heteroarilo o acilo; o una fracción alifática, alicíclica, heteroalifática, heteroalíciclica, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo; y cada aparición de R^{L1} y R^{L2} es independientemente hidrógeno, hidroxilo, hidroxilo protegido, amino, amino protegido, tio, tio protegido, halógeno, ciano, isocianato, carboxi, carboxialquilo, formilo, formiloxi, azido, nitro, ureido, tioureido, tiocianato, alcoxi, ariloxi, mercapto, sulfonamido, benzamido, tosilo, o una fracción alifática, alicíclica, heteroalifática, heteroalíciclica, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo, o en donde una o más apariciones de R^{L1} y R^{L2}, tomadas juntas, o tomadas junto con uno de V, W, X, Y o Z forman una fracción heterocíclica o alicíclica o forman una fracción arilo o heteroarilo.

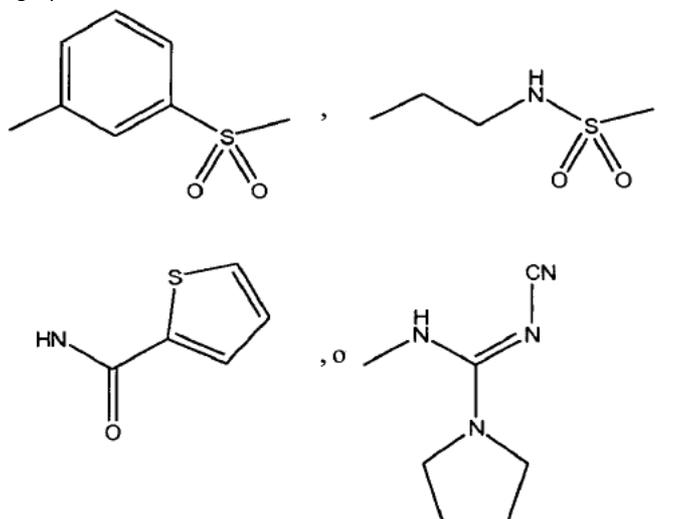
La presente invención provee compuestos para utilizar en el tratamiento de la enfermedad de ojo seco, que es antagonista del antígeno asociado a la función de linfocitos (LFA-1) de la Fórmula II:



45 donde R²⁸ es uno de los siguientes grupos:



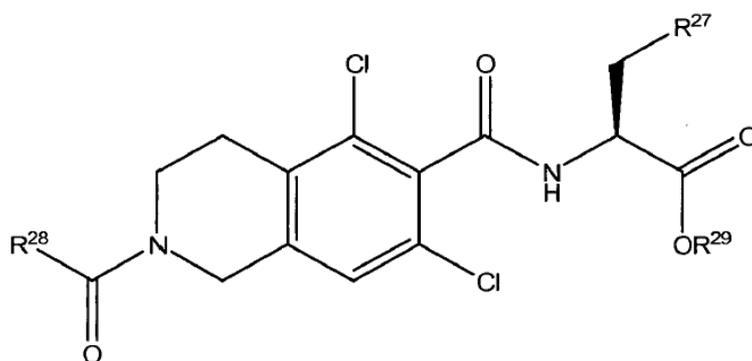
Y R²⁷ es uno de los siguientes grupos:



Formula II

y R²⁹ es hidrógeno, una sal farmacéuticamente aceptable.

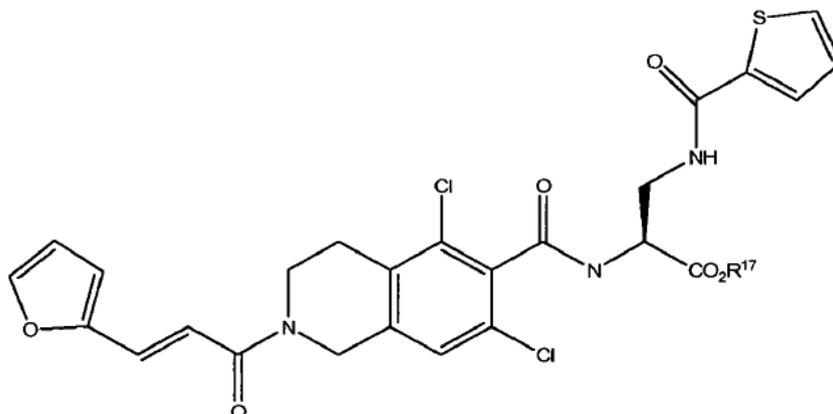
5 Algunas modalidades preferidas de la invención son compuestos de la fórmula II'



Fórmula II'

10 donde la sustitución es como en la Fórmula II.

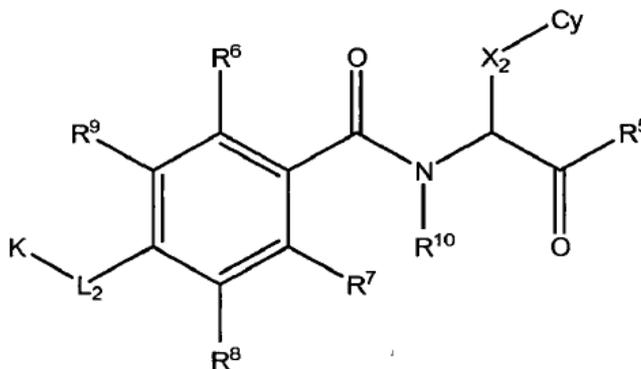
Se describe en este documento los compuestos de fórmula IIA:



Fórmula IIA

- 5 donde R¹⁷, respectivamente, puede ser cada uno elegido entre el grupo de hidrógeno, las sales y ésteres farmacéuticamente aceptables.

También se describe en el presente documento los compuestos de la Fórmula III:



Fórmula III

10

donde Cy es un carbociclo aromático, heterociclo aromático o un carbociclo no aromático o un heterociclo opcionalmente sustituido con hidroxilo (-OH), mercapto (-SH), tioalquilo, halógeno (por ejemplo F, Cl, Br, I), oxo (= O), tio (= S), amino, aminoalquilo, amidina (-C (NH)-NH₂), guanidina (-NH₂-C (NH) -NH₂), nitro, alquilo o alcoxi. En un caso, Cy es un anillo de 3-5 miembros. En otro ejemplo, Cy es un heterociclo de 5 o 6 miembros no aromático opcionalmente sustituido con hidroxilo, mercapto, halógeno (preferiblemente F o Cl), oxo (= O), tio (= S), amino, amidina, guanidina, nitro, alquilo o alcoxi. En otro ejemplo, Cy es un heterociclo no aromático de 5 miembros opcionalmente sustituido con hidroxilo, oxo, tio, Cl, alquilo C₁₋₄ (preferiblemente metilo), o alcanilo C₁₋₄ (preferiblemente acetilo, propanoilo o butanoilo). El heterociclo no aromático puede comprender uno o heteroátomos (N, O o S) y está opcionalmente sustituido con hidroxilo, oxo, mercapto, tio, metilo, acetilo, propanoilo o butilo. En algunos casos el heterociclo no aromático comprende al menos un átomo de nitrógeno que está opcionalmente sustituido con metilo o acetilo. En otro ejemplo, el heterociclo no aromático se selecciona del grupo que consiste en piperidina, piperazina, morfolina, tetrahydrofurano, tetrahydrotiofeno, oxazolidina, tiazolidina opcionalmente sustituido con hidroxilo, oxo, mercapto, tio, alquilo o alcanilo. En otro ejemplo Cy es un heterociclo no aromático seleccionado del grupo que consiste en tetrahydrofurano-2-ilo, tiazolidin-5-ilo, tiazolidin-2-ona-5-ilo, y tiazolidin-2-ona-5-ilo y

20

5 ciclopropapirrolidina. En otro ejemplo, Cy es un carbociclo aromático o heterociclo de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido con hidroxilo, mercapto, halógeno (preferiblemente F o Cl), oxo (= O), tio (= S), amino, amidina, guanidina, nitro, alquilo o alcoxi. En otro ejemplo, Cy es un carbociclo o heterociclo aromático de 5 miembros opcionalmente sustituido con hidroxilo, oxo, tio, Cl, alquilo C₁₋₄ (preferiblemente metilo), o alcanóilo C₁₋₄ (preferiblemente acetilo, propanoílo o butanoílo). Más preferiblemente, el heterociclo o aromático comprende uno o heteroátomos (N, O o S) y es opcionalmente sustituido con hidroxilo, oxo, mercapto, tio, metilo, acetilo, propanoílo o butilo.

10 En otro ejemplo, Cy es un carbociclo de 3-6 miembros opcionalmente sustituido con hidroxilo, mercapto, halógeno, oxo, tio, amino, amidina, guanidina, alquilo, alcoxi o acilo. En otro ejemplo el carbociclo es saturado o parcialmente insaturado. En otro ejemplo Cy es un carbociclo seleccionado del grupo que consiste en ciclopropilo, ciclopropenilo, ciclobutilo, ciclobutenilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo y ciclohexenilo.

15 X₂ es un conector de hidrocarburo divalente C₁₋₅ que tiene opcionalmente uno o más átomos de carbono reemplazados por N, O, S, SO o SO₂ y, opcionalmente, está sustituido con hidroxilo, mercapto, halógeno, amino, aminoalquilo, nitro, oxo o tio. En una modalidad preferida X₂ tendrá al menos un átomo de carbono. Los reemplazos y sustituciones pueden formar una fracción amida (-NRC (= O) - o -C (= O) NR) dentro de la cadena de hidrocarburo o en cualquiera o ambos extremos. Otras fracciones incluyen sulfonamida (-NRSO₂ - o -SO₂NR), acilo, éter, tioéter y amina. En otra modalidad ejemplo X₂ es el grupo -CH₂-NR¹⁰-C(O)- en donde la parte carbonilo -C(O)- del mismo es adyacente (i. e., unida covalentemente) a Cy y R¹⁰ es alquilo i. e., metilo y más preferiblemente H.

20 K es un carbociclo o heterociclo opcionalmente sustituido con hidroxilo, mercapto, halógeno, oxo, tio, un hidrocarburo, un hidrocarburo sustituido con halo, amino, amidina, guanidina, ciano, nitro, alcoxi o acilo. En otro ejemplo, K es arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con halógeno o hidroxilo. En otro ejemplo, K es fenilo, furano-2-ilo, tiofeno-2-ilo, fenilo sustituido con un halógeno (preferiblemente Cl) o hidroxilo, preferiblemente en la posición meta.

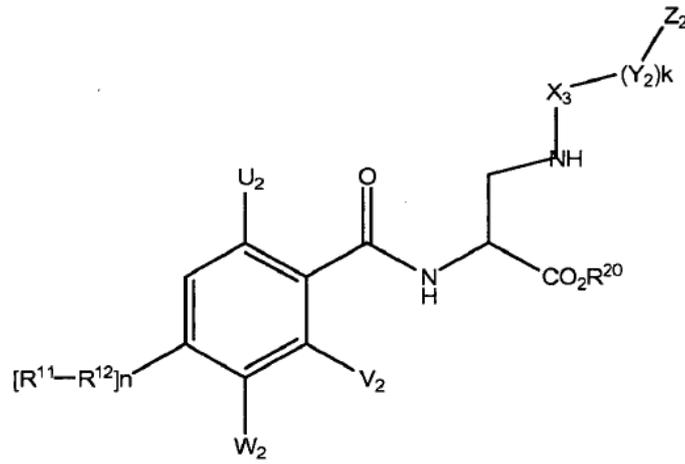
25 L₂ es un hidrocarburo divalente que tiene opcionalmente uno o más átomos de carbono reemplazados por N, O, S, SO o SO₂ y, opcionalmente, está sustituido con hidroxilo, oxo halógeno, o tio; o tres átomos de carbono del hidrocarburo se sustituyen por un residuo de aminoácido. Preferiblemente L₂ tiene menos de 10 átomos de longitud y más preferiblemente 5 o menos y más preferiblemente 5 o 3 átomos de longitud. En otro ejemplo, L₂ se selecciona entre el grupo que consiste en CH=CH-C(O)-NR¹⁰-CH₂-, -CH₂-NR¹⁰-C(O)-, -C(O)-NR¹⁰-CH₂-, -CH(OH)-(CH₂)₂-, -(CH₂)₂-CH(OH)-, -(CH₂)₃-, -C(O)-NR¹⁰-CH(R₇)-C(O)-NR¹⁰-, -NR¹⁰-C(O)-CH(R¹⁶)-NR¹⁰C(O)-, -CH(OH)-CH₂-O- y -CH(OH)-CF₂-CH₂- en donde cada R¹⁰ es independientemente H o alquilo y R¹⁶ es una cadena lateral de aminoácido. Las cadenas laterales de los aminoácidos preferidos incluyen cadenas laterales de origen no natural tales como fenilo o cadenas laterales de origen natural. Las cadenas laterales preferidas son las de Phe, Tyr, Ala, Gln y Asn. En otro ejemplo L₂ es -CH=CH-C(O)-NR¹⁰-CH₂- en donde la fracción -CH = H- del mismo es adyacente (i. e., unida covalentemente) a K. En otro ejemplo, L₂ es -CH₂-NR¹⁰-C(O)- en donde la fracción de metileno (-CH₂) del mismo es adyacente a K.

40 R⁵ es H, OH, amino, O-carbociclo o alcoxi opcionalmente sustituido con amino, un carbociclo, un heterociclo, o una sal o éster farmacéuticamente aceptable. En otro ejemplo, R⁵ es H, fenilo o alcoxi C₁₋₄ opcionalmente sustituido con un carbociclo tal como fenilo. En otro ejemplo, R⁵ es H. En otro ejemplo R⁵ es metoxi, etoxi, propiloxi, butiloxi, isobutiloxi, s-butiloxi, t-butiloxi, fenoxi o benciloxi. En otro ejemplo R⁵ es NH₂. En otro ejemplo R⁵ es etoxi. En otro ejemplo R⁵ es isobutiloxi. En otro ejemplo R⁵ es alcoxi sustituido con amino, por ejemplo 2-aminoetoxi, N-morfolinoetoxi, N, N-dialquilaminoetoxi, hidroxil alcoxi amonio cuaternario (por ejemplo trimetilamoniohidroxietoxi).

45 R⁶⁻⁹ son independientemente H, hidroxilo, mercapto, halógeno, ciano, amino, amidina, guanidina, nitro o alcoxi; o R⁷ y R⁸ juntos forman un carbociclo o heterociclo fusionado opcionalmente sustituido con hidroxilo, halógeno, oxo, tio, amino, amidina, guanidina o alcoxi. En otro ejemplo, R⁶ y R⁷ son independientemente H, F, Cl, Br o I. En otro ejemplo, R⁸ y R⁹ son ambos H. En otro ejemplo, uno de R⁶ y R⁷ es un halógeno mientras que el otro es hidrógeno o un halógeno. En otro ejemplo, R⁷ es Cl, mientras que R⁶, R⁸ y R⁹ son cada uno H. En otro ejemplo, R⁶ y R⁷ son ambos C¹, mientras que R⁸ y R⁹ son ambos H.

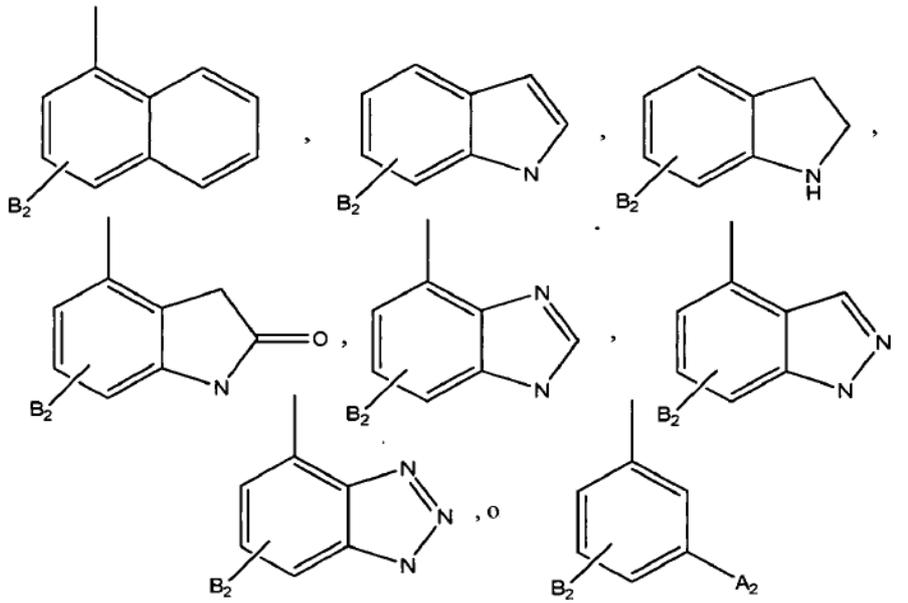
R¹⁰ es H o una cadena de hidrocarburo opcionalmente sustituida con un carbociclo o un heterociclo. En otro ejemplo, R¹⁰ es H o alquilo i. e. metilo, etilo, propilo, butilo, i-butilo, s-butilo o t-butilo. En otro ejemplo R¹⁰ es H.

55 En este documento se describen los compuestos de la Fórmula IV:



Fórmula IV

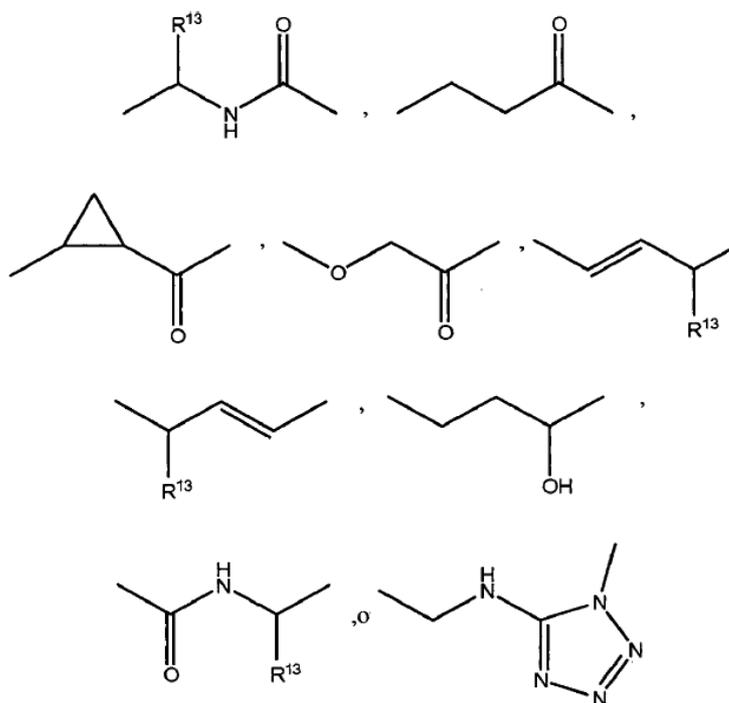
donde R¹¹ es un grupo de la fórmula



5

donde A es hidrógeno, hidroxilo, amino, o halógeno y B es amino, carboxilo, hidrógeno, hidroxilo, ciano, trifluorometilo, halógeno, alquilo inferior, o alcoxi inferior;

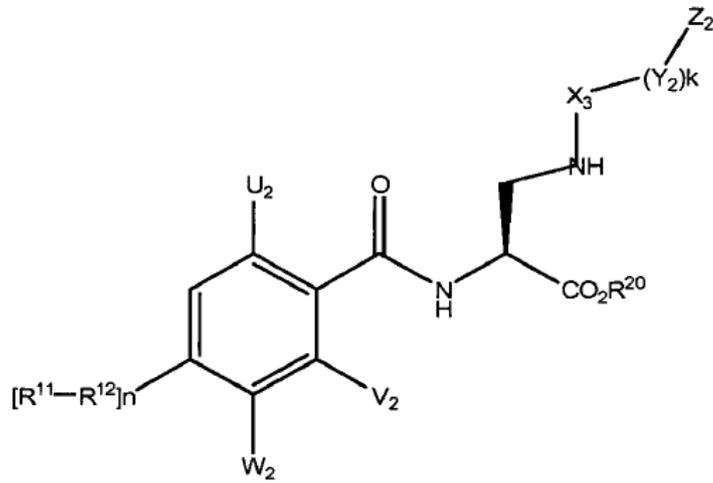
10 R¹² es un grupo de la fórmula:



5 donde R¹³ es hidrógeno, carboxi, o alquilo inferior; n es 0 o 1; U₂, V₂, y W₂ son independientemente hidrógeno, halógeno, o alquilo inferior con la condición de que U₂ y V₂ no sean ambos hidrógeno; X₃ es carbonilo, alquilenio inferior sustituido con fenilo, imino, imino sustituido, o sulfonilo; Y₂ es alquilenio inferior que puede ser sustituido por uno o más de amino, amino sustituido, alquilo inferior, o ciclo-alquilo inferior, o Y₂ es alquilenio inferior o alquilenotio;

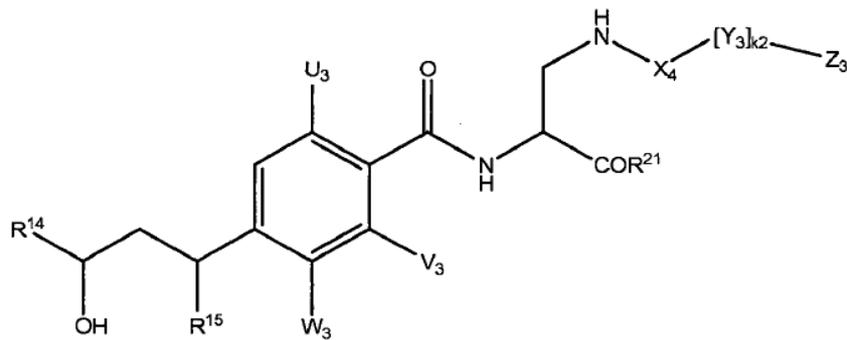
10 k es 0 o 1; cuando k es 1, Z₂ es hidrógeno, alquiltio inferior, -COOH, -CONH₂, amino; y cuando k es 0 o 1, Z₂ es 1-adamantilo, difenilmetilo, 3 - [[(5-cloropiridin-2-il) amino] carbonil] pirazin-2-ilo, hidroxil, fenilmetoxil, 2-cloro-4- [[[(3-hidroxifenil) metil] amino] carbonil] fenilo, [2,6-diclorofenil) metoxil] fenilo; además cuando k es 0 o 1, Z₂ puede ser cicloalquilo o arilo que contiene de 0 a 3 heteroátomos que pueden ser iguales o diferentes, o un sistema de anillo fusionado que contiene dos o tres anillos que son independientemente anillos cicloalquilo o arilo que contiene de 0 a 3 heteroátomos que pueden ser iguales o diferentes, cualquiera de cuyos anillos puede ser no sustituido o sustituido con al menos uno de halógeno, ciano, amino, amino sustituido, aminosulfonilo, nitro, oxo, hidroxil, arilo, ariloxil, alquilo inferior no sustituido, alquilo inferior sustituido con halógeno, alquilo inferior sustituido con alcoxi inferior, alcoxi inferior, alcanosulfonilo inferior, alquiltio inferior, acetilo, aminocarbonilo, hidrazino, carboxil, alcoxycarbonilo, acetoxil, o también en adición con amino alquilo inferior; y R²⁰ es hidrógeno, una sal o éster farmacéuticamente aceptable.

20 Los compuestos de Fórmula IV pueden tener la estereoquímica tal como se indica en la Fórmula IV:



Fórmula IV'

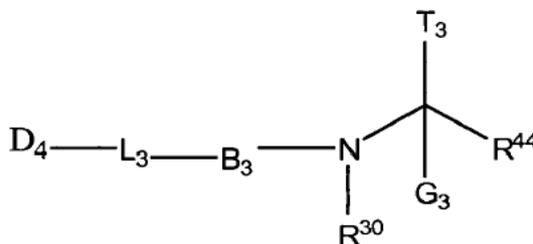
También se describen los compuestos de Fórmula V:



Fórmula V

5

donde R^{14} es un grupo de la fórmula:

**Fórmula VI**

5 donde D₄ es un anillo mono-, bi-, o tricíclico saturado, insaturado, o aromático, cada anillo que tiene 5, 6 ó 7 átomos en el anillo donde los átomos en el anillo son carbono o de uno a cuatro heteroátomos seleccionados del grupo de nitrógeno, oxígeno y azufre, en donde cualquier átomo de anillo de carbono o azufre puede estar opcionalmente oxidado, cada anillo sustituido con 0-3 R³¹.

L₃ es un grupo de enlace bivalente seleccionado de entre el grupo

10 - L³-L²-L¹,

- L⁴-L³-L²-L¹, - y

15 - L⁵-L⁴-L³-L²-L¹,

en donde L¹ se selecciona de oxo (-O-), S (O)_s, C (=O), CR³², R³², het CR³², NR³⁰ y N,

L² se selecciona de oxo (-O-), S (O)_s, C (=O), C (= NO-R³³), CR³⁴R³⁴, CR³⁴, het NR³⁰ y N,

20 L³ se selecciona de oxo (-O-), S (O)_s, C (=O), C (= NO-R³³), CR³⁵R³⁵, CR³⁵, het NR³⁰ y N,

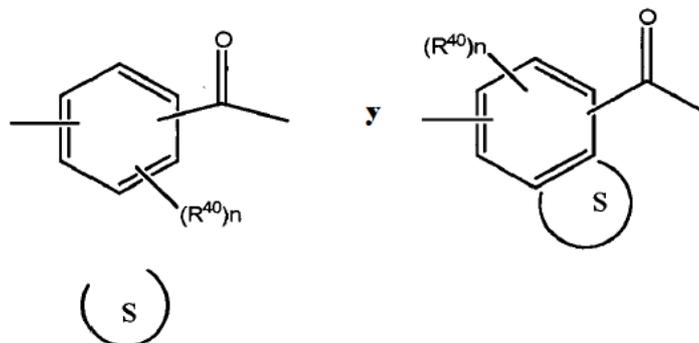
L⁴ está ausente o se selecciona de oxo (-O-), S(O)_s, C (=O), C (= NO-R³³), CR³⁶R³⁶, CR³⁶, NR³⁰ y N,

25 L⁵ está ausente o se selecciona de oxo (-O-), S(O)_s, C (=O), CR³⁷R³⁷, CR³⁷, NR³⁰ y N, a condición de que sólo uno de L¹-L³ pueda ser -het y que cuando uno de L¹-L³ es het los otros L¹-L⁵ pueden estar ausentes,

donde

30 R³², R³², R³⁴, R³⁴, R³⁵, R³⁵, R³⁶, R³⁶, R³⁷ y R³⁷, se seleccionan cada uno independientemente de R³⁸, R³⁹ y U-Q-V-W, opcionalmente, R²⁴ y R³⁴, por separado o juntos pueden formar un anillo fusionado saturado, insaturado o aromático con B₃ a través de un sustituyente RP en B, el anillo fusionado que contiene 5, 6 o 7 átomos en el anillo y que contiene opcionalmente 1-3 heteroátomos seleccionados del grupo O, S y N, donde cualquiera de N o S opcionalmente puede estar oxidado;

35 opcionalmente, R³⁵ y R³⁵ juntos o por separado y R³⁶ y R³⁶ por separado o juntos pueden formar un anillo fusionado insaturado o aromático saturado con D₃ a través de un sustituyente R³¹ en D₃, el anillo fusionado que contiene 5, 6 o 7 átomos en el anillo y opcionalmente que contiene 1-3 heteroátomos seleccionados del grupo O, S y N, donde cualquier S o N opcionalmente puede estar oxidado; también opcionalmente, cada uno de R³²-R³⁷, NR³⁰ o N en L¹-L⁵ junto con cualquier otro de R³²-R³⁷, NR³⁰ o N en L¹-L⁵ puede formar un homo- o heterociclo de 5, 6 o 7 miembros ya sea saturado, insaturado o aromático opcionalmente que contiene 1-3 heteroátomos adicionales seleccionados entre N, O y S, donde cualquier átomo de anillo de carbono o de azufre opcionalmente puede estar oxidado, cada ciclo sustituido con 0-3 R³¹; y donde s es 0-2; B se selecciona del grupo



donde es un anillo hetero- u homocíclico fusionado que contiene 5, 6 o 7 átomos, siendo el anillo insaturado, parcialmente saturado o aromático, los heteroátomos seleccionados a partir de 1-3 O, S y N,

5

Y_3 se selecciona de CH y NR^{30} ; n es 0-3:

G_3 se selecciona entre hidrógeno y alquilo C_1-C_6 , opcionalmente G tomado junto con T pueden formar un cicloalquilo C_3-C_6 opcionalmente sustituido con $-V-W$;

10

T_3 se selecciona del grupo

una cadena lateral del α -amino-ácido de origen natural,

15

y $U_4-Q_4-V_4-W_4$;

U_4 es un radical bivalente opcionalmente sustituido seleccionado de entre el grupo

alquilo C_1-C_6 , alquilo C_0-C_6-Q , alquenoilo C_2-C_6-Q , y alquinoilo C_2-C_6-Q :

20

donde los sustituyentes en cualquier alquilo, alquenoilo o alquinoilo son 1-3 R^{38} ;

Q_4 está ausente o se selecciona del grupo

25

$-O-$, $-S(O)_s-$, $-SO_2-N(R^{30})-$, $-N(R^{30})-$, $-N(R^{30})-C(=O)-$, $-N(R^{30})-C(=O)-N(R^{30})-$,

$-N(R^{30})-C(=O)-O-$, $-N(R^{30})-SO_2-$, $-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, het-, $-C(=O)-N(R^{30})-$, $-O-C(=O)N(R^{30})-$, $-PO(OR^{30})O-$ y $-P(O)O-$;

donde

30

s es 0-2 y

het es un anillo heterocíclico mono- o bicíclico de 5, 6, 7, 9 o 10 miembros, cada anillo que contiene 1-4 heteroátomos seleccionados entre N, O y S, donde el anillo heterocíclico puede ser saturado, parcialmente saturado o aromático y cualquier N o S siendo opcionalmente oxidado, el anillo heterocíclico está sustituido con 0-3 R^{41} ;

35

V_4 está ausente o es un grupo bivalente opcionalmente sustituido seleccionado entre alquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_8 , alquilo C_0-C_6 -arilo C_6-C_{10} , y alquilo C_0-C_6 -het;

40

donde los sustituyentes en cualquier alquilo son 1-3 R^{38} y los sustituyentes en cualquier arilo o het son 1-3 R^{31} ;

W_4 se selecciona entre el grupo

45

hidrógeno, OR^{33} , SR^{42} , $NR^{30}R^{30}$, $NH-C(=O)-O-R^{43}$, $NH-C(=O)-NR^nR^n$, $NH-C(=O)-R^{43}$, $NH-SO_2-R^{37}$, $NH-SO_2-NR^{30}R^{30}$, $NH-SO_2-NH-C(=O)-R^{43}$, $NH-C(=O)-NH-SO_2-R^{37}$, $C(=O)-NH-C(=O)-O-R^{43}$, $C(=O)-NH-C(=O)-R^{43}$, $C(=O)-NH-C(=O)-NR^{30}R^{30}$, $C(=O)-NH-SO_2-R^{37}$, $C(=O)-NH-SO_2-NR^{30}R^{30}$, $C(=S)-NR^{30}R^{30}$, SO_2-R^{37} , SO_2-O-R^{37} , $SO_2-NR^{37}R^{37}$, $SO_2-NH-C(=O)-O-R^{43}$, $SO_2-NH-C(=O)-NR^{30}R^{30}$, $SO_2-NH-C(=O)-R^{43}$, $O-C(=O)-NR^{30}R^{30}$, $OC(=O)-R^{43}$, $O-C(=O)-NH-C(=O)-R^{43}$, $O-C(=O)-NH-SO_2R^{46}$ y $O-SO_2-R^{37}$;

R⁴⁴ se selecciona de C(O)-R⁴⁵, C(=O)-H, CH₂(OH), y CH₂O-C(=O)-alquilo C₁-C₆;

R³⁸ es R^{38a} o R³⁸ⁿ sustituido con 1-3 R^{38b}, donde

R^{38a} se selecciona del grupo

hidrógeno, halo (F, Cl, Br, I), ciano, isocianato, carboxi, carboxi-alquilo C₁-C₁₁, amino, amino-alquilo C₁-C₈, aminocarbonilo, carboxamido, carbamoilo, carbamoiloxi, formilo, formiloxi, azido, nitro, imidazolilo, ureido, tioureido, tiocianato, hidroxilo, alcoxi C₁-C₆, mercapto, sulfonamido, het, fenoxi, fenilo, benzamido, tosilo, morfolino, morfolinilo, piperazinilo, piperidinilo, pirrolinilo, imidazolilo, e indolilo;

R³⁸ⁿ se selecciona del grupo

alquilo C₀-C₁₀-Q-alquilo C₀-C₆, alqueno C₀-C₁₀-Q-alquilo C₀-C₆, alquino C₀-C₁₀-Q-alquilo C₀-C₆, cicloalquilo C₃-C₁-Q-alquilo C₀-C₆, cicloalquilo C₃-C₁₀-Q-alquilo C₀-C₆, alquilo C₁-C₆-arilo C₆-C₁₂-Q-alquilo C₀-C₆, arilo C₆-C₁₀-alquilo C₁-C₆-Q-alquilo C₀-C₆, alquilo C₀-C₆-het-Q-alquilo C₀-C₆, alquilo C₀-C₆-Q-het-alquilo C₀-C₆, het-alquilo C₀-C₆-Q-alquilo C₀-C₆, alquilo C₀-C₆-Q-arilo C₆-C₁₂, y-Q-alquilo C₁-C₆;

R⁴³ se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido, alqueno C₂-C₁₀, alquino C₂-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₁, cicloalqueno C₃-C₁₀, alquilo C₁-C₆-arilo C₆-C₁₂, arilo C₆-C₁₀-alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆-het, het-alquilo-C₁-C₆, arilo C₆-C₁₂ y het,

donde los sustituyentes en cualquier alquilo, alqueno o alquino son 1-3 R³⁸ y los sustituyentes en cualquier arilo o het son 1-3 R³¹;

R³¹ se selecciona de entre R⁴⁰ y R⁴¹;

R⁴¹ se selecciona del grupo

OH, OCF₃, OR⁴³, SR⁴², halo(F, Cl, Br, I), CN, isocianato, NO₂, CF₃, alquilo C₀-C₆-NR³⁰R⁴⁰, alquilo C₀-C₆-C(=O)-NR³⁰R⁴⁰, alquilo C₀-C₆-C(O)-R³⁸, alquilo C₁-C₈, alcoxi C₁-C₈, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, cicloalquilo C₃-C₆, cicloalqueno C₃-C₆, alquilo C₁-C₆-fenilo, fenil-alquilo C₁-C₆, alquilo carbonilo C₁-C₆, fenil-alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆-het, het-alquilo C₁-C₆, SO₂-het, -O-arilo C₆-C₁₂, -SO₂-arilo C₆-C₁₂, -SO₂-alquilo C₁-C₆ y het,

donde cualquier alquilo, alqueno o alquino opcionalmente puede estar sustituido con 1-3 grupos seleccionados entre OH, halo (F, Cl, Br, I), nitro, amino y aminocarbonilo y los sustituyentes en cualquier arilo o het son 1-2 hidroxilo, halógeno (F, Cl, Br, I), CF₃, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, nitro y amino;

R⁴² se selecciona de S-alquilo C₁-C₆, C(=O)alquilo C₁-C₆, C(=O)-NR³⁰R³⁰, alquilo C₁-C₆, halo (F, Cl, Br, I)-alquilo C₁-C₆, bencilo y fenilo;

R³⁰ se selecciona del grupo R⁴³, NH-C(=O)-O-R⁴³, NH-C(=O)-R⁴³, NH-C(=O)-NHR⁴³, NH-SO₂-R₄₆, NH-SO₂-NHC(=O)-R⁴³, NH-C(=O)-NH-SO₂-R³⁷, C(=O)-O-R⁴³, C(=O)-R⁴³, C(=O)-NHR⁴³, C(=O)-NH-C(=O)-O-R⁴³, C(=O)-NHC(=O)-R⁴³, C(=O)-NH-C(=O)-R⁴³, C(=O)-NH-SO₂-NHR³⁷, SO₂-R³⁷, SO₂-O-R³⁷, SO₂-N(R⁴³)₂, SO₂-NH-C(=O)-O-R⁴³, SO₂-NH-C(=O)-O-R⁴³ y SO₂-NH-C(=O)-R⁴³;

R³⁰ se selecciona de hidrógeno, hidroxilo y alquilo C₁-C₁₁ sustituido o no sustituido, alcoxi C₁-C₁₁, alqueno C₂-C₁₀, alquino C₂-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₁, cicloalqueno C₃-C₁₀, alquilo C₁-C₆-arilo C₆-C₁₂, arilo C₆-C₁₀-alquilo C₁-C₆, arilo C₆-C₁₀-alquilo C₀-C₆, alquilo C₁-C₆-het, het-alquilo C₁-C₆, arilo C₆-C₁₂, het, alquilcarbonilo C₁-C₆, alcoxycarbonilo C₁-C₆, cicloalquilcarbonilo C₃-C₈, cicloalcoxycarbonilo C₃-C₈, ariloxycarbonilo C₆-C₁₁, arilalcoxycarbonilo C₇-C₁₁, heteroarilalcoxycarbonilo, heteroarilalquilcarbonilo, heteroarilcarbonilo, heteroarilalquilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquilsulfonilo C₁-C₆, y arilsulfonilo C₆-C₁₀, donde los sustituyentes en cualquier alquilo, alqueno o alquino son 1-3 R³⁸ y los sustituyentes en cualquier arilo, het o heteroarilo son 1-3 R³¹;

R³⁰ y R³⁰, tomados junto con el nitrógeno común al cual están unidos, pueden formar un heterociclo opcionalmente sustituido seleccionado de morfolinilo, piperazinilo, tiamorfolinilo, pirrolidinilo, imidazolidinilo, indolinilo, isoindolinilo, 1,2,3,4-tetrahydro-quinolinilo, 1,2,3,4-tetrahydro-isoquinolinilo, tiazolidinilo y azabicyclononilo, donde los sustituyentes son 1-3 R³⁸;

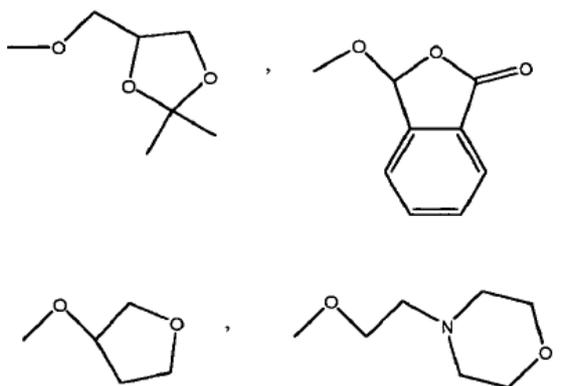
R³³ se selecciona entre hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, alquilcarbonilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₈ y benzoilo, donde los sustituyentes en cualquier alquilo son 1-3 R³⁸ y los sustituyentes en cualquier arilo son 1-3 R⁴⁰;

5 R⁴⁰ se selecciona del grupo OH, halo (F, Cl, Br, I), CN, isocianato, OR⁴³, SR⁴², SOR⁴³, NO₂, CF₃, R⁴³, NR³⁰R^{30'}, NR³⁰C(=O)-O-R⁴³, NRC(=O)-R⁴³, alquilo C₀-C₆-SO₂-R⁴³, alquilo C₀-C₆-SO₂-NR³⁰R^{30'}, C(=O)-R⁴³, O-C(=O)-R⁴³, C(=O)-OR⁴³, y C(=O)-NR³⁰R^{30'}, donde los sustituyentes en cualquier alquilo, alquenilo o alquinilo son 1-3 R³⁸ y los sustituyentes en cualquier arilo o het son 1-3 R³¹;

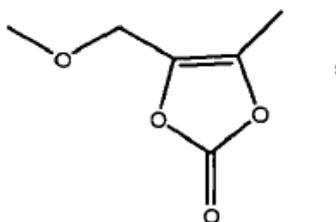
10 R⁴⁶ es un grupo sustituido o no sustituido seleccionado entre alquilo C₁-C₈, alquenilo C₂-C₈, alquinilo C₂-C₈, cicloalquilo C₃-C₈, cicloalquenilo C₃-C₆, alquilo C₀-C₆-fenilo, fenil-alquilo C₀-C₆, alquilo C₀-C₆-het y het-C₀-C₆,

15 donde los sustituyentes en cualquier grupo alquilo, alquenilo o alquinilo son 1-3 R³⁸ y los sustituyentes en cualquier arilo o het son 1-3 R³¹;

20 R⁴⁵ es un grupo sustituido o no sustituido seleccionado entre hidroxilo, alcoxi C₁-C₁₁, cicloalcoxi C₃-C₁₂, aralcoxi C₈-C₁₂, aralcicloalcoxi C₈-C₁₂, ariloxi C₆-C₁₀, alquilcarboniloxialquiloxi C₃-C₁₀, alcoxycarboniloxialquiloxi C₃-C₁₀, alcoxycarbonilalquiloxi C₃-C₁₀, cicloalquilcarboniloxialquiloxi C₅-C₁₀, cicloalcoxycarboniloxialquiloxi C₅-C₁₀, cicloalcoxycarbonilalquiloxi C₅-C₁₀, ariloxycarbonilalquiloxi C₈-C₁₂, ariloxycarboniloxialquiloxi C₈-C₁₂, arilcarboniloxialquiloxi C₈-C₁₂, alcoxialquilcarboniloxialquiloxi C₅-C₁₀, (R³⁰) (R³⁰) N (alcoxi C₁-C₁₀) -,



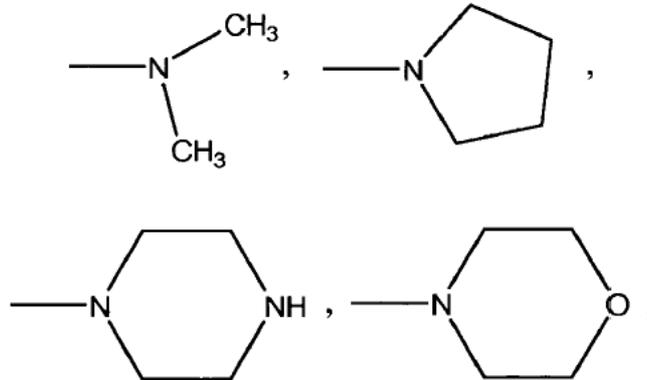
25 y



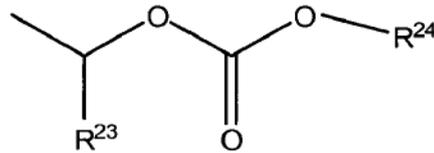
30 donde los sustituyentes en cualquier alquilo, alquenilo o alquinilo son 1-3 R³⁸ y los sustituyentes en cualquier arilo o het son 1-3 R³¹ y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los compuestos de fórmulas I-VI incluyen también las sales farmacéuticamente aceptables, y ésteres incluyendo compuestos pro-fármacos de la Fórmula I-VI donde R^{3A}, R⁵, R¹⁰, R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹, R²⁰, R²¹, R²⁹, y un éster carboxílico en R⁴⁴ puede ser alquilo inferior o -CH₂CH₂-R²² donde R²² es uno de los siguientes:

35



o

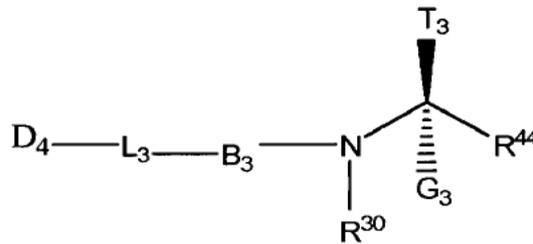


5

donde R^{23} es hidrógeno o metilo y R^{24} es alquilo inferior o cicloalquilo inferior.

Los compuestos de Fórmula VI pueden tener la estereoquímica indicada en la Fórmula VI'.

10



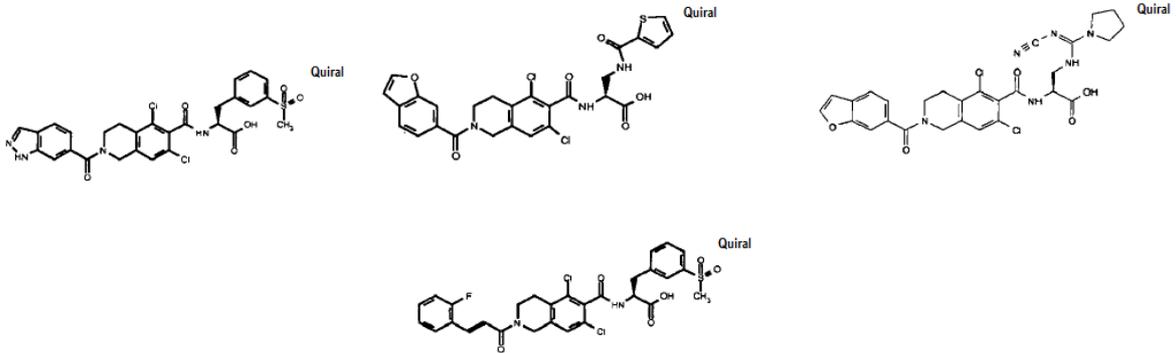
Fórmula VI'

Algunos de los compuestos descritos en este documento pueden comprender uno o más centros asimétricos, y por lo tanto pueden comprender los estereoisómeros individuales, diastereómeros individuales y cualquier mezcla de los mismos. Además, los compuestos de la invención pueden contener isómeros geométricos de dobles enlaces, que comprenden isómeros Z y E, y pueden estar presentes como isómeros geométricos puros o mezclas de los mismos.

15

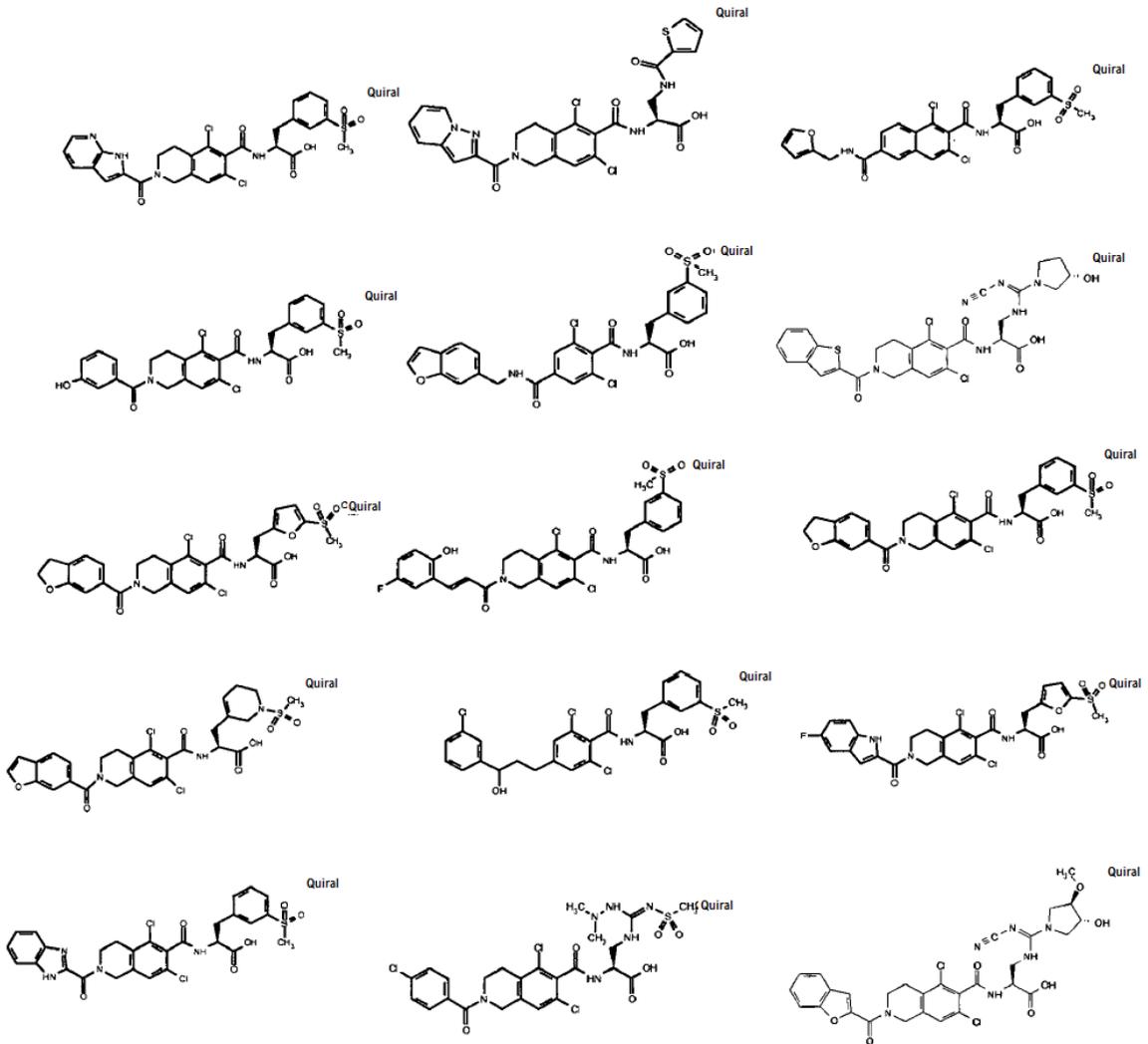
En algunas modalidades preferidas, los compuestos para uso de la presente invención se seleccionan de los siguientes compuestos o una sal de estos farmacéuticamente aceptable:

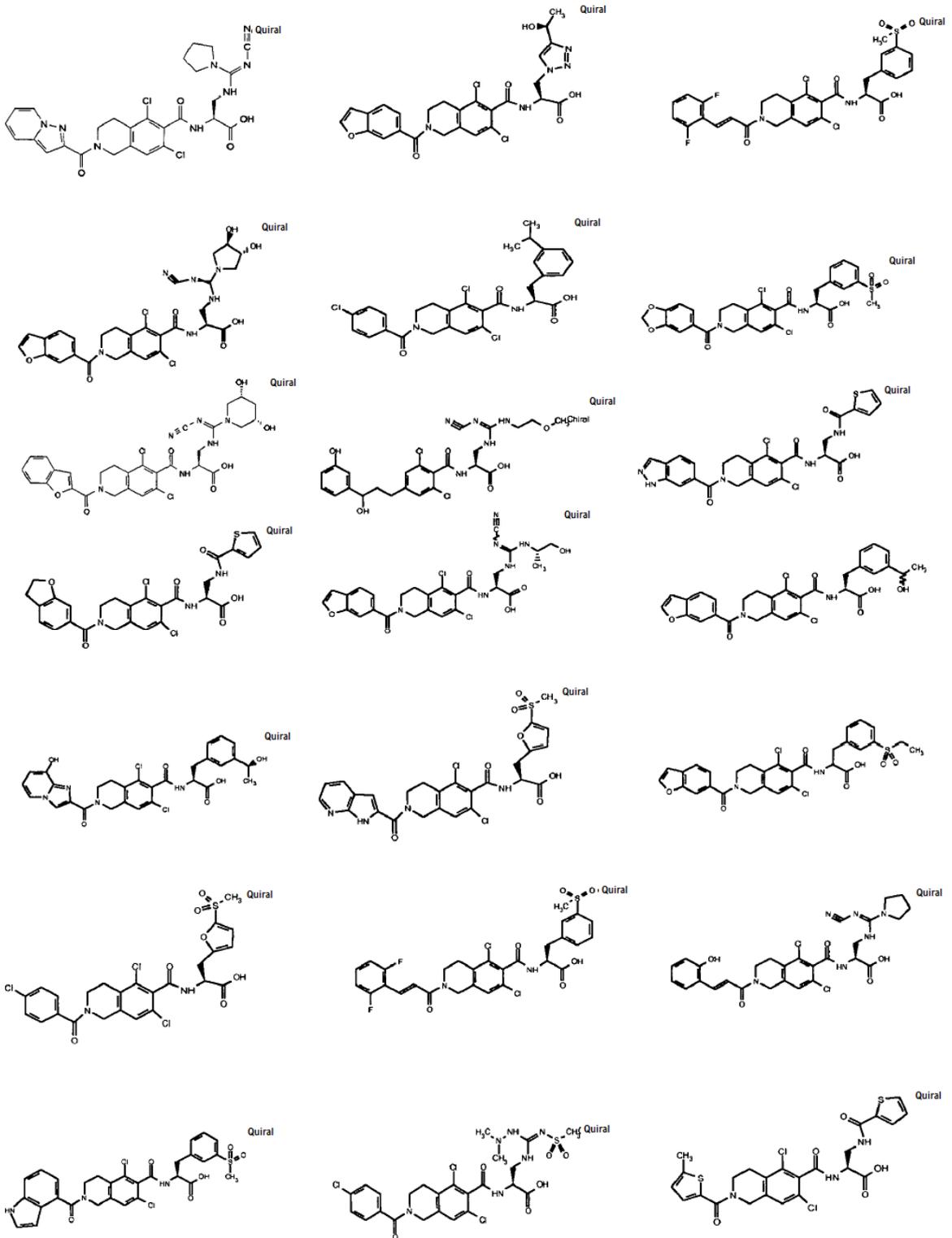
20



Los compuestos de la presente divulgación incluyen los siguientes compuestos o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo:

5





que es un inhibidor selectivo, potente y competitivo directamente de la interacción entre LFA -1 e ICAM-1, con el fin de tratar la enfermedad de ojo seco.

También se describen en el siguiente documento los métodos comerciales que emplean los compuestos y métodos de diagnóstico y terapéuticos descritos en el presente documento. Un método comercial implica la identificación de propiedades antagonistas de LFA-1 de péptidos o moléculas pequeñas y el desarrollo de los compuestos para el tratamiento de enfermedades mediadas por LFA-1, preferiblemente por administración tópica. Como los compuestos no se administran sistémicamente, los perfiles farmacocinéticos sistémicos de estos fármacos normalmente no están determinados y por lo tanto el grupo de candidatos de fármacos disponibles para el desarrollo es más grande. Los antagonistas de LFA-1 se pueden desarrollar en las formulaciones oculares y luego se promueven y venden para el tratamiento de trastornos oculares, tales como ojo seco. El ensayo Hut78 normalmente se utiliza para determinar las propiedades antagonistas de LFA-1. Además de las propiedades antagonistas de LFA-1, se pueden determinar las propiedades antagonistas de los leucocitos.

III. Administración

Los métodos descritos en este documento pueden aprovechar muchos modos de administración apropiados para suministrar el antagonista del LFA-1 de los métodos descritos en el presente documento. Tal administración a las regiones afectadas del cuerpo puede lograrse ya sea a través de la administración local o sistémica. Las formulaciones apropiadas y portadores adicionales se describen en Remington "The Science and Practice of Pharmacy" (20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD).

En algunos ejemplos, la descripción provee una composición farmacéutica para administración a un sujeto que contiene: (i) una cantidad eficaz de un agente terapéutico; y (ii) un excipiente farmacéutico apropiado para la administración oral. En algunas modalidades, la composición contiene además: (iii) una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico.

Con el fin de reducir la inflamación en trastornos oculares, la composición farmacéutica se suministra preferiblemente a la superficie ocular, interconectando inervación, conjuntiva, glándulas lagrimales, o de las glándulas de Meibomio. Se prevé que el tratamiento eficaz puede abarcar la administración de agentes terapéuticos de la presente invención a través de la administración oral, la administración tópica, mediante inyección, por vía intranasal, rectal, transdérmica, a través de un dispositivo impregnado o recubierto tal como una inserción o implante ocular, o iontoforesis, entre otras vías de administración.

Para la administración mediante inyección, la composición farmacéutica se puede inyectar por vía intramuscular, intraarterial, subcutánea, o intravenosa. Un mecanismo de bomba se puede emplear para administrar la composición farmacéutica durante un período preseleccionado. Para algunos casos es deseable administrar fármacos localmente, por lo tanto las inyecciones se pueden hacer por vía periocular, intraocular, subconjuntiva, retrobulbar, o intercameral. Para algunos casos, se prefiere la administración sistémica.

Para la administración sistémica, los compuestos de la invención se pueden formular para ser administrándose por vía oral. Para que la administración pueda dar lugar a la distribución regional o sistémica de los agentes terapéuticos, la composición de la invención se puede administrar por vía intranasal, transdérmica, o por medio de algunas formas de administración oral, por ejemplo, con el uso de un enjuague bucal o pastilla que incorpora un compuesto de la invención que se absorbe mal en el G.I. Para que la administración pueda dar lugar a una administración regional o local de la composición de la invención, se puede utilizar la administración iontoforética o tópica.

Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar a la superficie ocular mediante un sistema de bomba-catéter, o liberarse desde el interior de un dispositivo de liberación continua o selectiva, tal como, por ejemplo, membranas tales como, pero no limitando a, las empleadas en el sistema Ocusert™ System (Alza Corp, Palo Alto, CA). Las composiciones farmacéuticas se pueden incorporar dentro, soportar por o adherir a lentes de contacto que luego se usan por el sujeto. Las composiciones farmacéuticas se pueden pulverizar sobre la superficie ocular.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en combinación con otras terapias para el tratamiento del trastorno o enfermedad subyacente. Por ejemplo, el antagonista del LFA-1 de la invención se administra al mismo tiempo, o por separado durante el período de tratamiento para el cual un sujeto recibe terapias inmunosupresoras, tales como azatioprina, ciclofosforamida, metotrexato, medicamentos antipalúdicos, micofenolato de mofetilo, daclizumab, terapia de inmunoglobulina intravenosa, y similares. En otro ejemplo, el antagonista del LFA-1 de la invención se administra al mismo tiempo o por separado durante el período de tratamiento para el cual un sujeto recibe otros tratamientos anti-inflamatorios, tales como ciclosporina A, corticosteroides, NSAIDS, aspirina, doxiciclina y similares. En un ejemplo adicional, el antagonista del LFA-1 de la invención se administra al mismo tiempo o por separado durante el período de tratamiento para el cual un sujeto recibe la terapia hormonal, y similares. En aún un ejemplo adicional, el antagonista del LFA-1 de la

invención se administra al mismo tiempo o por separado durante el período de tratamiento para el cual un sujeto recibe la terapia anti-alérgica, los cuidados paliativos para el ojo seco incluyendo lágrimas artificiales o saliva artificial, agonistas del receptor muscarínico M3 para aumentar las secreciones acuosas, suero autólogo, gotas de hialuronato de sodio, y similares. Estos ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden limitar la invención.

5 En algunas modalidades, el antagonista del LFA-1 se administra en una sola dosis. Una sola dosis de un antagonista del LFA-1 también se puede utilizar cuando se coadministra con otra sustancia (por ejemplo, un analgésico) para el tratamiento de una condición aguda. En algunos ejemplos, el antagonista del LFA-1 (por sí mismo o en combinación con otros fármacos) se administra en dosis múltiples. La dosificación puede ser aproximadamente una, dos, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, diez veces o más de diez veces al día. La dosificación puede ser una vez al mes, una vez cada dos semanas, una vez a la semana o una vez cada dos días. En una modalidad el fármaco es un analgésico. En otro ejemplo, el antagonista del LFA-1 y otra sustancia terapéutica se administran juntos aproximadamente una vez por día a aproximadamente 10 veces por día. En otro ejemplo, la administración del antagonista del LFA-1 y otra sustancia terapéutica continúa durante menos de aproximadamente 7 días. En otro ejemplo, la coadministración continúa durante más de 6, 10, 14, 28 días, dos meses, seis meses o un año. En algunos ejemplos, la dosificación coadministrada se mantiene durante el tiempo necesario, por ejemplo, la dosificación para la inflamación crónica. La administración de las composiciones de la invención puede continuar tanto como sea necesario. En algunos ejemplos, una composición de la invención se administra durante más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, o 28 días. En algunos ejemplos, una composición de la invención se administra por menos de 28, 14, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 día. En algunos ejemplos, una composición de la invención se administra crónicamente sobre una base continua, por ejemplo, para el tratamiento del dolor crónico.

La dosificación para el antagonista del LFA-1 en el método descrito en el presente documento se puede encontrar mediante experimentación de rutina. La dosis diaria puede variar de aproximadamente 1×10^{-7} g a 5000 mg. El intervalo de dosis diaria puede depender de la forma del antagonista del LFA-1 por ejemplo, los ésteres o sales utilizados, y/o la vía de administración, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, para la administración sistémica, los rangos típicos de dosis diarias son, por ejemplo, acerca de 1-5000 mg, o aproximadamente 1-3000 mg, o aproximadamente 1-2000 mg, o aproximadamente 1-1000 mg, o aproximadamente 1-500 mg, o aproximadamente 1-100 mg, o aproximadamente 10 a 5000 mg, o aproximadamente 10-3000 mg, o aproximadamente 10-2000 mg, o aproximadamente 10-1000 mg, o aproximadamente 10-500 mg, o aproximadamente 10-200 mg, o aproximadamente 10-100 mg, o aproximadamente 20-2000 mg o aproximadamente 20- 1500 mg o aproximadamente 20-1000 mg o aproximadamente 20-500 mg, o aproximadamente 20-100 mg, o aproximadamente 50-5000 mg, o aproximadamente 50-4000 mg, o aproximadamente 50-3000 mg, o aproximadamente 50-2000 mg, o aproximadamente 50-1000 mg, o aproximadamente 50-500 mg, o aproximadamente 50-100 mg, o aproximadamente 100-5000 mg, o aproximadamente 100-4000 mg, o aproximadamente 100-3000 mg, o aproximadamente 100-2000 mg, o aproximadamente 100-1000 mg, o aproximadamente 100-500 mg. En algunos ejemplos, la dosis diaria de antagonista del LFA-1 es de aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000 mg. En algunos ejemplos, la dosis diaria del antagonista del LFA-1 es 10 mg. En algunas modalidades, la dosis diaria del antagonista del LFA-1 es 100 mg. En algunos ejemplos, la dosis diaria de antagonista del LFA-1 es 500 mg. En algunos ejemplos, la dosis diaria de antagonista del LFA-1 es de 1000 mg.

Para la administración tópica a la superficie ocular, los rangos típicos de dosis diarias son, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-7} g a 5.0 g, o aproximadamente 1×10^{-7} g a 2.5 g, o aproximadamente 1×10^{-7} g a 1.00 g, o aproximadamente 1×10^{-7} g a 0.5 g, o aproximadamente 1×10^{-7} g a 0.25 g, o sobre 1×10^{-7} g a 0.1 g, o aproximadamente 1×10^{-7} g a 0.05 g, o aproximadamente 1×10^{-7} g a 0,025 g, o aproximadamente 1×10^{-7} g a 1×10^{-2} g, o aproximadamente 1×10^{-7} g de 5×10^{-3} g, o aproximadamente 1×10^{-7} g de 2.5×10^{-3} g, o aproximadamente 1×10^{-7} g de 1×10^{-3} g, o aproximadamente 1×10^{-7} g 5×10^{-4} g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 5.0 g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 2.5 g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 1 g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 0.5 g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 0.25 g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 0.1 g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 0.05 g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 5×10^{-2} g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 5×10^{-3} g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 2.5×10^{-2} g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 1×10^{-2} g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 5×10^{-3} g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 2.5×10^{-3} g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 1×10^{-3} g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 5×10^{-4} g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 5 g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 2.5 g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 1 g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 0.5 g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 0.25 g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 0.1 g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 0.05 g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 2.5×10^{-2} g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 1×10^{-2} g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 5×10^{-3} g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 2.5×10^{-3} g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 1×10^{-3} g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 5×10^{-4} g. En algunos ejemplos, la dosis diaria del antagonista del LFA-1 es de aproximadamente 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} g, 1×10^{-2} g, 1×10^1 g, o 1g. En algunos ejemplos, la dosis diaria del antagonista del LFA-1 se 1×10^{-7} g. En algunas modalidades, la dosis diaria de el antagonista del LFA-1 se 1×10^{-5} g. En algunos ejemplos, la dosis diaria de antagonista del LFA-1 es 1×10^{-3} g. En algunos ejemplos, la dosis diaria del antagonista del LFA-1 es 1×10^{-2} g. En algunos ejemplos la dosis individual varía de aproximadamente 1×10^{-7} g a 5.0 g, o aproximadamente 1×10^{-7} g a 2.5 g, o aproximadamente 1×10^{-7} g a 1.00 g, o aproximadamente 1×10^{-7} g a 0.5 g, o aproximadamente 1×10^{-7} g a 0.25 g, o aproximadamente 1×10^{-7} g a 0.1 g,

o aproximadamente 1×10^{-7} g a 0,05 g, o aproximadamente 1×10^{-7} g a 0,025 g, o aproximadamente 1×10^{-7} g a 1×10^{-2} g, o aproximadamente 1×10^{-7} g a 5×10^{-3} g, o aproximadamente 1×10^{-7} g de $2,5 \times 10^{-3}$ g, o aproximadamente 1×10^{-7} g de 1×10^{-3} g, o aproximadamente 1×10^{-7} g a 5×10^{-4} g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 5,0 g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 2,5 g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 1 g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 0,5 g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 0,25 g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 0,1 g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 5×10^{-2} g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 5×10^{-2} g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a $2,5 \times 10^{-2}$ g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 1×10^{-2} g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 5×10^{-3} g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a $2,5 \times 10^{-3}$ g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 1×10^{-3} g, o aproximadamente 1×10^{-6} g a 5×10^{-4} g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 5 g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 2,5 g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 1 g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 0,5 g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 0,25 g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 0,1 g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 0,05 g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a $2,5 \times 10^{-2}$ g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 1×10^{-2} g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 5×10^{-3} g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a $2,5 \times 10^{-3}$ g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 1×10^{-3} g, o aproximadamente 1×10^{-5} g a 5×10^{-4} g. En algunos ejemplos, la dosis individual como se describe anteriormente, se repite 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9, o 10 veces por día.

15 Para otras formas de administración, las dosis diarias pueden variar sobre el intervalo descrito para la administración sistémica o puede oscilar sobre el intervalo descrito para la administración tópica.

IV. Formulaciones

20 Los compuestos de la invención se pueden formular como una solución o suspensión estéril, en vehículos apropiados, bien conocido en la técnica. Las formulaciones apropiadas y portadores adicionales se describen en Remington "The Science and Practice of Pharmacy" (20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD).

25 Para las formulaciones inyectables, el vehículo puede ser elegido de entre los conocidos en la técnica por ser apropiados, incluyendo soluciones acuosas o suspensiones de aceite, o emulsiones, con aceite de sésamo, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, o aceite de cacahuete, así como elixires, manitol, dextrosa, o una solución acuosa estéril, y vehículos farmacéuticos similares.

30 La concentración del fármaco se puede ajustar, el pH de la solución estandarizar y la isotonicidad ajustar para ser compatible con la inyección intravenosa, como es bien conocido en la técnica.

35 Las formulaciones orales pueden ser comprimidos, cápsulas, trociscos, píldoras, obleas, gomas de mascar, pastillas, soluciones o suspensiones acuosas, suspensiones oleosas, jarabes, elixires, o polvos o gránulos dispersables, y similares, y se pueden hacer de cualquier manera conocida en la técnica. Las formulaciones orales también pueden contener agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes y agentes conservantes. Los excipientes farmacéuticamente aceptables para formas de comprimidos pueden comprender ingredientes no tóxicos tales como diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio, y similares.

40 En el caso de comprimidos para uso oral, los portadores que se usan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz, y agentes lubricantes tales como estearato de magnesio se adicionan comúnmente. Para la administración oral en forma de cápsulas, los portadores útiles incluyen lactosa y almidón de maíz. Otros ejemplos no limitantes de portadores y excipientes incluyen leche, azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales del mismo, estearato de calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas y glicoles.

45 El agente surfactante que se puede utilizar para formar composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación de la invención incluyen, pero no se limitan a, surfactantes hidrófilos, surfactantes lipófilos, y sus mezclas. Es decir, se puede emplear una mezcla de agentes surfactantes hidrófilos, se puede emplear una mezcla de agentes surfactantes lipófilos, o una mezcla de al menos un agente surfactante hidrófilo y puede ser empleado al menos un agente surfactante lipófilo.

50 Un agente surfactante hidrófilo apropiado generalmente puede tener un valor de HLB de al menos 10, mientras que los agentes surfactantes lipófilos apropiados pueden generalmente tener un valor de HLB de o menos de aproximadamente 10. Un parámetro empírico utilizado para caracterizar la hidrofiliidad relativa y la hidrofobicidad de los compuestos anfífilos no-iónicos es el equilibrio hidrófilo-lipófilo (valor "HLB"). Los agentes surfactantes con valores de HLB inferiores son más lipófilos o hidrófobos, y tienen mayor solubilidad en aceites, mientras que los agentes surfactantes con valores de HLB más altos son más hidrófilos, y tienen mayor solubilidad en soluciones acuosas. Los agentes surfactantes hidrófilos generalmente se consideran como los compuestos que tienen un valor de HLB mayor que aproximadamente 10, así como compuestos aniónicos, catiónicos, o zwitterionicos para los que la escala de HLB no es de aplicación general. Del mismo modo, los agentes surfactantes lipófilos (i. e., hidrófobos) son compuestos que tienen un valor de HLB igual a o menos de aproximadamente 10. Sin embargo, el valor de HLB de un agente surfactante es simplemente una guía aproximada generalmente utilizada para permitir la formulación de emulsiones industriales, farmacéuticas y cosméticas.

Los agentes surfactantes hidrófilos pueden ser iónicos o no iónicos. Los agentes surfactantes iónicos apropiados incluyen, pero no se limitan a, sales de alquilamonio; sales de ácido fusídico; derivados de ácidos grasos de aminoácidos, oligopéptidos y polipéptidos; derivados glicérido de aminoácidos, oligopéptidos y polipéptidos; lecitinas y lecitinas hidrogenadas; lisolecitinas y lisolecitinas hidrogenadas; fosfolípidos y sus derivados; lisofosfolípidos y sus derivados; sales de ésteres de ácido graso de carnitina; sales de alquilsulfatos; sales de ácidos grasos; docusato de sodio; lactilatos de acilo; ésteres de ácido tartárico mono- y di -acetilado de mono- y di-glicéridos; mono- y di-glicéridos succinilados; ésteres de ácido cítrico de mono y diglicéridos; y sus mezclas.

Dentro del grupo mencionado anteriormente, los agentes surfactantes iónicos preferidos incluyen, a modo de ejemplo: lecitinas, lisolecitina, fosfolípidos, lisofosfolípidos y sus derivados; sales de ésteres de ácido graso de carnitina; sales de alquilsulfatos; sales de ácidos grasos; docusato de sodio; lactilatos de acilo; ésteres de ácido tartárico mono- y di -acetilados de mono- y di-glicéridos; mono- y di-glicéridos succinilados; ésteres de ácido cítrico de mono- y di-glicéridos; y sus mezclas.

Los agentes surfactantes iónicos pueden ser las formas ionizadas de lecitina, lisolecitina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidilserina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico, lisofosfatidilserina, PEG-fosfatidiletanolamina, PVP-fosfatidiletanolamina, ésteres lactílicos de ácidos grasos, estearoil-2-lactilato, estearoil lactilato, monoglicéridos succinilados, ésteres de ácido tartárico mono/diacetilado de mono/diglicéridos, ésteres de ácido cítrico de mono/diglicéridos, colilsarcosina, caproato, caprilato, caprato, laurato, miristato, palmitato, oleato, ricinoleato, linoleato, linolenato, estearato, lauril sulfato, teracecil sulfato, docusato, carnitinas de lauroilo, carnitinas de palmitoilo, carnitinas de miristoilo, y las sales y mezclas de los mismos.

Los agentes surfactantes no iónicos hidrófilos pueden incluir, pero no limitar a, alquilglucósidos; alquilmaltósidos; alquiltioglucoídos; macroglicéridos de laurilo; éteres alquílicos de polioxialquileno tales como éteres de alquilo de polietilenglicol; alquilfenoles de polioxialquileno tales como fenoles de alquilo de polietilenglicol; ésteres de ácidos grasos de alquil polioxialquileno fenol tales como monoésteres de ácidos grasos de polietilenglicol y diésteres de ácidos grasos de polietilenglicol; ésteres de ácidos grasos de glicerol polietilenglicol; ésteres de ácidos grasos de poliglicerol; ésteres de ácidos grasos de sorbitán de polioxialquileno tales como ésteres de ácidos grasos de sorbitán polietilenglicol; productos de transesterificación hidrófilos de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en glicéridos, aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados, ácidos grasos, y esteroides; esteroides de polioxietileno, derivados y análogos de los mismos; vitaminas polioxietiladas y derivados de las mismas; copolímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno; y sus mezclas; ésteres de ácidos grasos de sorbitán de polietilenglicol y productos de transesterificación hidrófila de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en triglicéridos, aceites vegetales y aceites vegetales hidrogenados. El poliol puede ser glicerol, etilenglicol, polietilenglicol, sorbitol, propilenglicol, pentaeritritol, o un sacárido.

Otros agentes surfactantes hidrófilos no iónicos incluyen, sin limitación, laurato de PEG-10, laurato de PEG-12, laurato de PEG-20, laurato de PEG-32, dilaurato de PEG-32, oleato de PEG-12, oleato PEG-15, oleato de PEG-20, dioleato de PEG-20, oleato de PEG-32, oleato de PEG-200, oleato de PEG-400, estearato de PEG-15, diestearato de PEG-32, estearato de PEG-40, estearato de PEG-100, dilaurato de PEG-20, trioleato de glicerilo de PEG-25, dioleato de PEG-32, laurato de glicerilo de PEG-20, laurato de glicerilo de PEG-30, estearato de glicerilo de PEG-20, oleato de glicerilo de PEG-20, oleato de glicerilo de PEG-30, laurato de glicerilo de PEG-30, laurato de glicerilo de PEG-40, aceite de palma kernel de PEG-40, aceite de ricino hidrogenado de PEG-50, aceite de ricino de PEG-40, aceite de ricino de PEG-35, aceite de ricino de PEG-60, aceite de ricino hidrogenado de PEG-40, aceite de ricino hidrogenado de PEG-60, aceite de maíz de PEG-60, glicéridos caprato / caprilato de PEG-6, glicéridos caprato/caprilato de PEG-8, laurato de poligliceril-10, colesterol de PEG-30, fito esteroides de PEG-25, esteroil de soja de PEG-30, trioleato de PEG-20, oleato de sorbitán de PEG-40, laurato de sorbitán de PEG-80, polisorbato 20, polisorbato 80, POE-9 lauril éter, POE-23 lauril éter, POE-10 oleil éter, POE-20 oleil éter, POE-20 estearil éter, succinato de tocoferil PEG-100, colesterol PEG-24, poliglicerilo-10 oleato, Tween 40, Tween 60, monoestearato de sacarosa, monolaurato de sacarosa, monopalmitato de sacarosa, PEG serie de 10-100 nonil fenol, PEG serie de 15-100 fenol octilo, y poloxámeros.

Los agentes surfactantes lipófilos apropiados incluyen, solamente a modo de ejemplo: alcoholes grasos; ésteres de ácidos grasos de glicerol; ésteres de ácidos grasos de glicerol acetilados; ésteres de ácidos grasos de alcohol inferior; ésteres de ácidos grasos de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos de sorbitán; ésteres de ácidos grasos de sorbitán polietilenglicol; derivados de esteroides y esteroil; derivados de esteroides y esteroil polioxietilados; alquil éteres de polietilenglicol; ésteres de azúcar; éteres de azúcar; derivados del ácido láctico de mono- y di-glicéridos; productos de transesterificación hidrófobos de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en glicéridos, aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados, ácidos grasos y esteroides; vitaminas solubles en aceite/derivados de vitaminas; y sus mezclas. Dentro de este grupo, los agentes surfactantes lipófilos preferidos incluyen ésteres de ácidos grasos de glicerol, ésteres de ácidos grasos de propilenglicol, y mezclas de los mismos, o son productos de transesterificación hidrófobos de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados, y triglicéridos.

Los agentes surfactantes pueden ser utilizados en cualquier formulación de la invención cuando su uso no se contradice de otra manera. En algunos ejemplos de la descripción, se prefiere el uso de agentes no surfactantes o clases limitadas de agentes surfactantes.

5

Cuando se formulan los compuestos de la invención para una administración oral, puede ser deseable utilizar formulaciones de retención gástrica para mejorar la absorción desde el tracto gastrointestinal (GI). Una formulación que es retenida en el estómago durante varias horas puede liberar compuestos de la invención lentamente y proveer una liberación sostenida que puede ser preferible en algunas modalidades de la invención. La divulgación de tales formulaciones de retención gástrica se encuentran en Klausner, E.A.; Lavy, E.; Barta, M.; Cserepes, E.; Friedman, M.; Hoffman, A. 2003 "Novel gastroretentive dosage forms: evaluation of gastroretentivity and its effect on levodopa in humans". Pharm. Res. 20, 1466-73, Hoffman, A.; Stepensky, D.; Lavy, E.; Eyal, S. Klausner, E.; Friedman, M. 2004 "Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of gastroretentive dosage forms" Int. J. Pharm. 11, 141-53, Streubel, A.; Siepmann, J.; Bodmeier, R.; 2006 "Gastroretentive drug delivery systems" Expert Opin. Drug Deliver. 3, 217-3, and Chavanpatil, M.D.; Jain, P.; Chaudhari, S.; Shear, R.; Vavia, P.R. "Novel sustained release, swellable and bioadhesive gastroretentive drug delivery system for ofloxacin" Int. J. Pharm. 2006 epub March 24. Se pueden utilizar técnicas extendibles, flotantes y bioadhesivas para maximizar la absorción de los compuestos de la invención.

10

15

20

La administración intranasal puede utilizar una suspensión en aerosol de partículas respirables que comprenden los compuestos de la invención, que el sujeto inhala. El compuesto de la invención se absorbe en el torrente sanguíneo a través de la absorción pulmonar o se pone en contacto con los tejidos a través de conductos nasolagrimal, y posteriormente será entregado a los tejidos lagrimales en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Las partículas respirables pueden ser sólidas o líquidas, con partículas de tamaño apropiado, como se conoce en la técnica que es eficaz para la absorción. Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes farmacéuticamente aceptables, acuosos u orgánicos, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados como se describió anteriormente. Preferiblemente, las composiciones se administran por vía respiratoria oral o nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables preferentemente se pueden nebulizar mediante el uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas pueden inhalarse directamente desde el dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede fijarse a una máscara de tipo tienda facial, o máquina de respiración intermitente de presión positiva. Las composiciones en solución, suspensión, o en polvo se pueden administrar, preferiblemente por vía oral o nasal, desde dispositivos que suministran la formulación de una manera apropiada.

25

30

Para la administración transdérmica, se puede utilizar cualquier formulación apropiada conocida en la técnica, ya sea como una solución, suspensión, gel, polvo, crema, aceite, sólidos, soluciones basadas en dimetilsulfóxido (DMSO) o formulación liposomal para utilizar en un parche u otro sistema de administración conocido en la técnica. Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender portadores o excipientes sólidos o en fase gel apropiados, que son compuestos que permiten una mayor penetración de, o ayudar en la administración de moléculas terapéuticas, a través de la barrera de permeabilidad del estrato córneo de la piel. Existen muchas de estas moléculas potenciadoras de la penetración conocidos por aquellos entrenados en la técnica de la formulación tópica. Ejemplos de tales portadores y excipientes incluyen, pero no se limitan a, humectantes (por ejemplo, urea), glicoles (por ejemplo, propilenglicol), alcoholes (por ejemplo, etanol), ácidos grasos (por ejemplo, ácido oleico), surfactantes (por ejemplo, miristato de isopropilo y lauril sulfato de sodio), pirrolidonas, monolaurato de glicerol, sulfóxidos, terpenos (por ejemplo, mentol), aminas, amidas, alcanos, alcanoles, agua, carbonato cálcico, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles. La construcción y uso de parches transdérmicos para la administración de agentes farmacéuticos es bien conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.023.252, 4.992.445 y 5.001.139. Dichos parches se pueden construir para la administración continua, pulsátil o bajo demanda de agentes farmacéuticos.

35

40

45

Para la administración tópica, todas las formulaciones para administración ocular tópica usadas en el campo de la oftalmología (por ejemplo, gotas para los ojos, insertos, paquetes oculares, lentes de contacto impregnadas, sistemas de administración por bomba, soluciones suspensiones a base de dimetilsulfóxido (DMSO), liposomas, y ungüento para los ojos) y todas las formulaciones para uso externo en los campos de la dermatología y otorrinolaringología (por ejemplo, ungüento, crema, gel, polvo, pomada, loción, formas cristalinas, espuma, pulverizador) se pueden utilizar como es conocido en la técnica. Adicionalmente, todas las formulaciones apropiadas para administración tópica a la piel y las membranas mucosas de las fosas nasales se pueden utilizar para administrar los compuestos de la invención. Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento pueden ser una formulación liposomal para la administración tópica u oral, cualquiera de las cuales se conoce en la técnica por ser apropiada para el propósito de esta invención.

50

55

Los lubricantes que se pueden utilizar para formar composiciones farmacéuticas y formas de dosificación de la invención incluyen, pero no se limitan a, estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina,

60

sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, lauril sulfato de sodio, talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja), estearato de zinc, oleato de etilo, laurato de etilo, agar, o sus mezclas. Los lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice Syloid, un aerosol coagulado de sílice sintética, o mezclas de los mismos. Un lubricante se puede adicionar opcionalmente, en una cantidad de menos de aproximadamente 1 por ciento en peso de la composición farmacéutica.

Se contempla además, que los compuestos de la invención pueden estar unidos de manera liberable a los polímeros biocompatibles para su uso en formulaciones de liberación sostenida sobre, en o unidos a los insertos para la administración tópica o sistémica. La liberación controlada de un polímero biocompatible puede ser utilizada con un polímero soluble en agua para formar una formulación que puede ser instilada, también.

Las gotas para los ojos se pueden preparar disolviendo el ingrediente activo en una solución acuosa estéril tal como solución salina fisiológica, solución reguladora, etc., o mediante la combinación de composiciones de polvo que se disuelven antes de su uso. Otros vehículos pueden ser elegidos, como se conoce en la técnica, incluyendo pero no limitando a: solución de sal de equilibrio, solución salina, poliéteres solubles en agua tales como polietilenglicol, polivinilos, tales como alcohol de polivinilo y povidona, derivados de celulosa tales como metilcelulosa e hidroxipropil metilcelulosa, derivados del petróleo tales como aceite mineral y vaselina blanca, grasas animales tales como la lanolina, polímeros de ácido acrílico tales como gel de carboxipolimetileno, grasas vegetales tales como aceite de cacahuete y polisacáridos tales como dextrans, y glicosaminoglicanos tales como hialuronato de sodio. Si se desea, se pueden adicionar aditivos utilizados normalmente en las gotas para los ojos. Tales aditivos incluyen agentes isotonzantes (por ejemplo, cloruro de sodio, etc.), agente regulador (por ejemplo, ácido bórico, fosfato monohidrógeno de sodio, fosfato dihidrógeno de sodio, etc.), conservantes (por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, clorobutanol, etc.), espesantes (por ejemplo, sacáridos tales como lactosa, manitol, maltosa, etc.; por ejemplo, ácido hialurónico o su sal, tal como hialuronato de sodio, hialuronato de potasio, etc.; por ejemplo, mucopolisacárido tal como sulfato de condroitina, etc.; por ejemplo, poliacrilato de sodio, polímero de carboxivinilo, poliacrilato reticulado, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa u otros agentes conocidos por los expertos en la técnica).

La solubilidad de los componentes de las presentes composiciones se puede mejorar mediante un agente surfactante u otro codisolvente apropiado en la composición. Tales codisolventes incluyen polisorbato 20, 60, y 80, Pluronic F68, F-84 y P-103, ciclodextrina, u otros agentes conocidos por los expertos en la técnica. Tales codisolventes se pueden emplear a un nivel de aproximadamente 0.01% a 2% en peso.

La composición descrita en el presente documento se puede formular como un tipo de dosis unitaria estéril que no contiene conservantes. Las composiciones de la invención pueden ser envasadas en forma de multidosis. Los conservantes pueden ser preferidos para prevenir la contaminación microbiana durante el uso. Los conservantes apropiados incluyen: cloruro de benzalconio, timerosal, clorobutanol, metilparabeno, propilparabeno, alcohol feniletílico, edetato disódico, ácido sórbico, Onamer M u otros agentes conocidos por los expertos en la técnica. En los productos oftálmicos de la técnica anterior, tales conservantes se pueden emplear a un nivel de 0.004% a 0.02%. En las composiciones de la presente divulgación, el conservante, preferentemente cloruro de benzalconio, se puede emplear a un nivel de 0.001% a menos del 0.01%, por ejemplo de 0.001% a 0.008%, preferiblemente de aproximadamente 0.005% en peso. Se ha encontrado que una concentración de cloruro de benzalconio de 0.005% puede ser suficiente para preservar las composiciones de la presente divulgación del ataque microbiano.

La cantidad de administración y el número de administraciones del ingrediente activo utilizado en la presente invención varía según el sexo, la edad y peso corporal del paciente, los síntomas a tratar, efectos terapéuticos deseables, vías de administración y período de tratamiento. Para gotas para los ojos para un adulto, las formulaciones que contienen los compuestos de la invención pueden variar en concentración de aproximadamente 0.0001 a 10.0 % W/V, aproximadamente el 0.005 a 10.0 % W/V, aproximadamente 0.01 a 10.0 % W/V, aproximadamente 0.05 a 10.0 % W/V, aproximadamente 0.1 a 10.0 % W/V, aproximadamente 0.5-10.0 % W/V, aproximadamente 1.0 a 10.0 % W/V, aproximadamente el 20 a 10.0 % W/V, aproximadamente 3.0-10.0 % W/V, aproximadamente 4.0-10.0 % W/V, o aproximadamente 5.0 a 10.0 W/V%. Un ejemplo tiene una formulación de aproximadamente 1.0 a 10.0 % W/V de los compuestos de la invención. Un ejemplo tiene una formulación de aproximadamente 0.01 a 10.0 W/V% de los compuestos de la invención. Un ejemplo tiene una formulación de aproximadamente de 5.0 a 10.0 % W/V de los compuestos de la invención. La administración puede ser administrada varias veces al día por ojo, preferiblemente de uno a diez veces, más preferiblemente una a cuatro veces, más preferiblemente una vez al día. El tamaño de la gota administrada puede estar en el intervalo de aproximadamente 10-100 μ l, aproximadamente 10-90 μ l, aproximadamente 10-80 μ l, aproximadamente 10-70 μ l, aproximadamente 10-60 μ l, aproximadamente 10-50 μ l, aproximadamente 10-40 μ l, aproximadamente 10- 30 μ l, aproximadamente 20-100 μ l, aproximadamente 20-90 μ l, aproximadamente 20-80 μ l, aproximadamente 20-70 μ l, aproximadamente 20-60 μ l,

aproximadamente 20-50 μ l, aproximadamente 20-40 μ l, o de aproximadamente 20-30 μ l. Un ejemplo administra una gota en el rango de 10-30 μ l. Un ejemplo administra una gota en el rango de 10-100 μ l. Un ejemplo administra una gota en el rango de 20-50 μ l. Un ejemplo administra una gota en el rango de 10-60 μ l.

- 5 Las formulaciones de la invención pueden ser administradas con varias gotas por hora, de una a cuatro gotas, preferiblemente de uno a tres gotas, más preferiblemente una a dos gotas, y más preferiblemente una gota por día.

10 En las formulaciones de ungüento, crema, loción o pulverizador, la concentración de los compuestos de la invención en las formulaciones puede variar de aproximadamente 0.0001 a 10.0 % W/V, aproximadamente el 0.005 a 10.0 % W/V, aproximadamente 0.01 a 10.0 % W/V, aproximadamente 0.05 a 10.0 % W/V, aproximadamente 0.1 a 10.0 % W/V, aproximadamente 0.5-10.0 % W/V, aproximadamente 1.0 a 10.0 % W/V, aproximadamente el 20 a 10.0 % W/V, aproximadamente 3.0-10.0 % W/V, aproximadamente 4.0-10.0 % W/V, o aproximadamente 5.0 a 10.0% W/V. Un ejemplo tiene una formulación de aproximadamente 1.0 a 10.0 % W/V de los compuestos de la invención. Un ejemplo tiene una formulación de aproximadamente 0.01 a 10.0 % W/V de los compuestos de la invención. Un ejemplo tiene una formulación de aproximadamente 5.0 a 10.0 % W/V de los compuestos de la invención. Estas formulaciones pueden aplicarse o pulverizarse varias veces al día, preferiblemente una a seis veces, más preferiblemente una a cuatro veces, y más preferiblemente una vez al día. La relación de mezcla de cada ingrediente se puede aumentar o disminuir adecuadamente basándose en el grado de inflamaciones o infecciones.

- 20 Las formulaciones de la invención pueden incluir además otros ingredientes activos farmacológicos en la medida que no contradigan el propósito de la presente invención. En una combinación de ingredientes activos plurales, sus respectivos contenidos se pueden aumentar o disminuir adecuadamente en consideración de sus efectos y seguridad.

V. Kits

25 En el presente documento se describen los kits. Los kits pueden incluir un compuesto de la invención en un envase apropiado, y el material escrito que puede incluir las instrucciones de uso, análisis de estudios clínicos, lista de efectos secundarios, y similares. El kit puede contener además otro agente terapéutico que se coadministra con el antagonista del LFA-1 de la invención. El agente terapéutico y el antagonista del LFA-1 de la invención se pueden proveer como composiciones separadas en recipientes separados dentro del kit. El agente terapéutico y el antagonista del LFA-1 de la invención se pueden proveer como una composición sola dentro de un recipiente en el kit. Los envases apropiados y artículos adicionales para su uso (por ejemplo, una taza de medir para las preparaciones líquidas, una envoltura de aluminio para reducir al mínimo la exposición al aire, dispensadores, y similares) son conocidos en la técnica y pueden ser incluidos en el kit.

- 35 VI. Método para identificar nuevos compuestos útiles en el método de tratamiento

A. Antecedentes del método de ensayo

- 40 1. Dependencia de afinidades del ligando en cationes divalentes

Los cationes divalentes juegan un papel crítico en el enlace de ligando/integrina y su presencia es esencial en las investigaciones experimentales de estas interacciones. Véase Hynes, R. O. 1992. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell*, 69: 11-25; Humphries, M. J. 1996. Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction, *Curr. Op. Cell Biol.*, 8: 632-640. Las afinidades de ICAM-1-Ig y los compuestos 1, 3, y 4 (estructuras que se muestran en la Figura 4) para el LFA-1 en dos conjuntos de condiciones de cationes divalentes utilizados comúnmente se midieron usando polarización de fluorescencia. La afinidad del compuesto 1 para LFA-1 se midió primero en un ensayo de enlace directo, y a continuación se midieron las afinidades de ICAM-1-Ig y los compuestos 3 y 4 para el LFA-1 en competencia con el compuesto 1 para LFA-1 (Figura 4, y en la Tabla 1 en la Figura 5). La afinidad de A-286982, que se une al IDAS, no se midió ya que no compite con el compuesto 1 por el enlace con LFA-1 (ver abajo). Cambios similares en las afinidades de los compuestos 1, 3 y 4 para LFA-1 se midieron bajo las diferentes condiciones de cationes como para ICAM-1-Ig. Las afinidades de moléculas pequeñas aumentan al menos diez veces en la presencia de $MnCl_2$ sobre las medidas en $CaCl_2$ y $MgCl_2$. Estas moléculas pequeñas no se unen a LFA-1 en ausencia de cationes divalentes (los datos no se muestran). Del mismo modo, las afinidades de enlace de la proteína soluble, ICAM-1-Ig, para LFA-1 en solución, tal como se mide por el mismo método, en presencia de $MnCl_2$, es al menos cuatro veces mejor que la afinidad en presencia de $CaCl_2$ y $MgCl_2$. Por lo tanto, a diferencia de las clases de los antagonistas LFA-1, incluyendo A-286982 que se sabe que se une a la región IDAS del dominio I (Liu, G., Huth, J. R., Olejniczak, E. T., Mendoza, R., DeVries, P., Leitza, S., Reilly, E. B., Okasinski, G. F., Fesik, S. W., and von Geldern, T. W. 2001. Novel p-arylthio cinnamides as antagonists of leukocyte function-associated antigen-1/intracellular adhesion molecule-1 interaction. 2. Mechanism of inhibition and structure-based improvement of pharmaceutical properties, *J. Med. Chem.*, 44: 1202-1210., Huth, J. R., Olejniczak, E. T., Mendoza, R.,

Liang, H., Harris, E. A. S., Lupher, M. L. Jr., Wilson, A. E., Fesik, S. W., and Staunton, D. E. 2000. NMR and mutagenesis evidence for an I domain allosteric site that regulates lymphocyte function-associated antigen 1 ligand binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 5231-5236.) y se presentan para unirse a LFA-1 de una manera independiente del catión (Welzenbach, K., Hommel, U., and Weitz-Schmidt, G. 2002. Small molecule inhibitors induce conformational changes in the I domain and the I-like domain of Lymphocyte Function-Associated Antigen-1, *J. Biol. Chem.*, 277: 10590-10598), ambos ICAM-1-Ig y la clase de antagonistas de LFA-1 representados por los compuestos de 1 - 4 comparten un catión divalente de sensibilidad para el enlace de LFA-1 (Tabla 1). En consecuencia, con el fin de identificar antagonistas de LFA-1/ICAM-1 que se unen de una manera similar a la de ICAM-1-Ig y los compuestos 1-4, todos los ensayos de enlace presentados en este documento se realizaron bajo condiciones similares, en presencia de $MnCl_2$, el cual se sabe que maximiza el enlace de ambos ICAM-1 y estos antagonistas sensibles a cationes.

2. Reticulación del compuesto 5 con la subunidad αL de LFA-1

Para identificar el sitio de enlace de antagonistas de moléculas pequeñas, el compuesto 5, un análogo fotoactivable marcado con tritio del compuesto 3 se une a LFA-1 y luego es fotorreticulado. Para maximizar la reticulación de alta afinidad, específica, fue necesario filtrar en gel las muestras para eliminar el compuesto 5 no unido o unido débilmente antes de la irradiación (Figura 6, carriles e vs. f y g vs. h). En la ausencia de filtración en gel, hubo reticulación significativa del compuesto 5 con la subunidad α , la subunidad β , y el heterodímero de LFA-1 (la banda a aproximadamente 200,000), mientras que la reticulación no específica no se observó en las muestras filtradas en gel (los datos no se muestran). En condiciones de filtración en gel, el compuesto 5 se reticula específicamente sólo con la subunidad αL (Figura 6, carriles c y g). Además, la presencia del compuesto 3 durante la incubación redujo sustancialmente la incorporación de tritio en la subunidad αL (Figura 6, carril e vs. g). Del mismo modo, en presencia del compuesto 3, hubo una ligera reducción de la incorporación de tritio en la subunidad αL , la subunidad $\beta 2$ y el heterodímero en ausencia de filtración en gel (Figura 6, carril f vs. h). La no reticulación del compuesto 5 se produjo cuando se utilizaron muestras filtradas en gel de las subunidades αL o $\beta 2$ intactas estructuralmente, aisladas (los datos no se muestran). Por lo tanto, el sitio de enlace de alta afinidad necesario para reticular después de la filtración en gel es proporcionado por el heterodímero de LFA-1 intacto. La ausencia de un sitio de alta afinidad en la subunidad αL aislada es consistente con un estudio anterior que demuestra la falta de interacción de XVA143 con el dominio I aislado (Welzenbach et al. 2002).

El sitio de reticulación se definió aún más por la fragmentación de la subunidad αL marcada afinidad con hidroxilamina, la separación electroforéticamente de los fragmentos, y luego realizar la secuenciación N-terminal de los fragmentos radiomarcados para determinar sus ubicaciones dentro de la secuencia de la proteína. Se identificaron dos secuencias, la primera iniciando con el residuo 1 (secuencia encontrada: YNL DVRGARSFS) y la segunda con el residuo 30 (secuencia encontrada: GVIVGAPGEGNST) (Larson, R.S., Corbi, A. L., Berman, L., and Springer, T. 1989. Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunidad: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily, *J. Cell Biol.*, 108: 703-712). Ambos péptidos fueron de aproximadamente 500 aminoácidos de longitud, como se evalúa por sus tamaños en SDS-PAGE (50 - 60 kDa); este tamaño fragmento es coherente con los siguientes dos sitios de escisión predichos (N-G) para hidroxilamina, N507 y N530 (Larson et al. 1989, Bornstein, P. 1969. The nature of a hydroxylamine-sensitive bond in collagen, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 36: 957-964). No se incorporó etiqueta en la mitad del terminal-C de la subunidad. Los intentos para refinar el sitio reticulación además no tuvieron éxito. No se recuperaron los péptidos marcados definibles después de la digestión limitada de la subunidad αL etiquetada, ya sea con bromuro de cianógeno o Lys-C.

3. La falta de enlace del compuesto 2B con LFA-1 que carece del dominio I

El papel del dominio I en el enlace del compuesto 2B y los análogos relacionados para LFA-1 se demostró mediante la preparación de una construcción de la subunidad αL que carece del dominio I. La construcción de $\beta 2$ solo (simulada) o junto con la construcción que carece del dominio I o αL de tipo salvaje se transfectó en células 293, y se examinó el enlace del compuesto 2B con las células transfectadas (Figura 7). El compuesto 2B mostró sustancial enlace con las células transfectadas αL de tipo salvaje, pero no mostró enlace significativo con las células transfectadas con αL que carecen del dominio I relativo al enlace de células ($\beta 2$) transfectadas simuladas. Los transfectantes también se ensayaron por su capacidad de adherirse a ICAM-1-Ig, y como se esperaba, las células transfectadas de LFA-1 que carecen del dominio I y transfectantes simuladas mostraron niveles de fondo indistinguibles de unión, mientras que las células transfectadas αL de tipo salvaje mostraron adhesión robusta (Figura 7B) Yalamanchili, P., Lu, C., Oxvig, C., and Springer T. A. 2000. Folding and function of I domain-deleted Mac-1 and lymphocyte function-associated antigen-1, *J. Biol. Chem.*, 275: 21877-21882). La evaluación del enlace de un panel de anticuerpos de LFA-1 con las células transfectadas indicó que, aparte de la pérdida de enlace por los anticuerpos mapeados con el dominio I, el heterodímero de LFA-1 parecía estar intacto en las células transfectadas que carecen del dominio I de αL (los datos no se muestran).

Los datos apoyan la conclusión de que el Compuesto 3 y las moléculas relacionados se unen con un sitio de alta afinidad en LFA-1 que se superpone con el sitio de enlace de ICAM-1 que se ha demostrado previamente que incluye el motivo MIDAS del dominio I en la subunidad α L de LFA-1 (Shimaoka, M., Xiao, T., Liu, J.-H., Yang, Y., Dong, Y., Jun, C.-D., McCormack, A. Zhang, R., Joachimiak, A., Takagi, J., Wang, J.-H., and Springer, T. A. 2003a. Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation, *Cell*, 112: 99-111.).

La evidencia que corrobora la proximidad cercana de los sitios de enlace del antagonista de ICAM-1 y molécula pequeña en LFA-1 se puede ver en el efecto común de la delección del dominio I en el enlace de ambos ICAM-1-Ig y el compuesto 2B. Tanto el compuesto 2B como ICAM-1 fueron incapaces de unirse a LFA-1 que carece del dominio I, el dominio en el cual el sitio de enlace de ICAM-1 se localiza. Además, la capacidad de A-286982 para modificar alostéricamente el enlace de ambos ICAM-1-Ig y el compuesto 2B es consistente con una estrecha proximidad de sus sitios de enlace con el sitio de enlace A-286982 en el motivo IDAS en el dominio I de la subunidad α de LFA-1 (Liu, G. 2001b. Small molecule antagonists of the LFA-1/ICAM-1 interaction as potential therapeutic agents, *Expert Opin. Ther. Patents*, 11: 1383-1393, Liu et al. 2001). La reticulación fotoquímica selectiva del compuesto 5 con la cadena α de LFA-1 localiza su sitio de enlace dentro de los residuos 30 - 507 de esta subunidad. Todos los hallazgos mencionados anteriormente son consistentes con un único sitio de enlace de molécula pequeña de alta afinidad localizado en el dominio I de la cadena α de LFA-1.

Un examen detallado del estudio de reticulación fotoquímica realizada con una concentración relativamente alta del compuesto 5 (4.1 μ M, Figura 6) proporciona evidencia directa de un sitio adicional de enlace de molécula pequeña de baja afinidad en LFA-1. Dramáticamente diferentes patrones de proteínas y la reticulación se observan en la presencia y ausencia de filtración en gel. Cuando las muestras se filtraron en gel para eliminar las moléculas no unidas y débilmente unidas antes de la irradiación, sólo se observa marcación de alta afinidad de la subunidad α . Sin embargo, en ausencia de la etapa de filtración en gel, la irradiación del complejo del compuesto 5 con LFA-1 resulta en una alta intensidad de reticulación con la subunidad α y menor intensidad de reticulación con un sitio de enlace de baja afinidad en la subunidad β cuyo complejo con el compuesto 5 es demasiado débil para sobrevivir la filtración en gel. En ambas condiciones, la reticulación observada se inhibe parcialmente por un exceso grande (290 μ M) del compuesto 3 (Figura 6, carriles e y g, f y h), lo que demuestra la naturaleza específica del enlace de ambos sitios. Los intentos para reticular el compuesto 5 con cualquiera de las subunidades α o β aisladas fallaron para producir complejos de alta afinidad capaces de sobrevivir el proceso de filtración en gel. En consecuencia, parece que el enlace competitivo de alta afinidad de la clase de compuestos representados por el compuesto 3 requiere la presencia de un heterodímero de LFA-1 de longitud completa intacto. Los intentos para capturar este sitio de enlace en construcciones de cualquiera de las subunidades de LFA-1 o el dominio I aislado resulta en la disminución de la afinidad de LFA-1 para ICAM-1 y análogos de moléculas pequeñas del compuesto 3 (por ejemplo XVA143) (Shimaoka, M., Lu, C., Palframan, R. T., von Andrian, U. H., McCormack, A., Takagi, J., and Springer, T. A. 2001. Reversibly locking a protein fold in an active conformation with a disulfide bond: integrin alphaL I domains with high affinity and antagonist activity in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98: 6009-6014., Welzenbach et al. 2002). Es particularmente interesante observar la presencia de una banda de heterodímero de LFA-1 menor que aparece en la ausencia de filtración en gel (Figura 6, banda a > 200,000 daltons). La intensidad de la banda de LFA-1 como se juzga tanto por tinción con azul de Coomassie como autorradiografía es consistente con un enlace de baja afinidad con un segundo sitio en la cadena β que estabiliza el heterodímero.

Parece, a partir de los estudios de estabilización en gel publicados (Shimaoka, M., Salas, A., Yang, W., Weitz-Schmidt, G. and Springer, T. 2003b. Small molecule integrin antagonists that bind to the β 2 subunit I-like domain and activate signals in one direction and block them in another, *Immunity*, 19: 391-402, Salas, A., Shimaoka, M., Kogan, A. N., Harwood, C., von Andrian, U. H., and Springer, T. A., 2004. Rolling adhesion through an extended conformation of integrin α 1 β 2 and relation to α I and β I-like domain interaction, *Immunity*, 20: 393-406, Yang, W., Shimaoka, M., Salas, A., Takagi, J., and Springer, T. A. 2004. Intersubunit signal transmission in integrins by a receptor-like interaction with a pull spring. *PNAS*, 101: 2906-2911), que el sitio de enlace responsable de la estabilización de LFA-1 con SDS-PAGE reside en el dominio de tipo I de la subunidad β . Los datos presentados en este documento muestran que este sitio de enlace de la subunidad β no está relacionado con el sitio de enlace de alta afinidad en la subunidad β que es responsable de la inhibición competitiva directa del enlace de ICAM-1. Sin embargo, hemos observado que el sitio de enlace de la subunidad β responsable de la estabilización de LFA-1 por el compuesto 3 puede ser el mismo que el sitio de reticulación de la subunidad β de baja afinidad.

En general, los resultados de los experimentos de reticulación y de enlace presentados en este documento indican que hay dos sitios de enlace diferentes para la clase de sondas del antagonista de molécula pequeña de LFA-1 utilizadas en este documento. El primero es un sitio de enlace de alta afinidad en la subunidad α L de LFA-1 a través del cual la molécula pequeña y LFA-1 forman un complejo que es lo suficientemente estable (por ejemplo, K_d <25 nM) para sobrevivir al proceso de filtración en gel. Este es el sitio de enlace de molécula pequeña que se ha caracterizado en los experimentos de enlace reportados en este documento como la superposición del sitio de enlace de ICAM-1 y que se correlaciona con: la potente

inhibición del enlace LFA-1/ICAM-1 por los compuestos 3 y 4 (IC_{50} del compuesto 4 = 1.4 nM); su potente inhibición del LFA-1 inducida por la proliferación de linfocitos (IC_{50} del compuesto 4 = 3 nM) *in vitro*; y su inhibición de la respuesta del sistema inmune *in vivo* (Gadek et al. 2002). El segundo sitio es un sitio de enlace de menor afinidad (por ejemplo, $K_d > 1 \mu M$) en la subunidad β que está implicada con la estabilización del heterodímero de LFA-1 mediante SDS-PAGE. Este sitio es más dinámico por naturaleza (i. e., más rápido de velocidad) y no sobrevive al proceso de filtración en gel/fotólisis. Las características de este segundo sitio de baja afinidad son consistentes con las del sitio de enlace antagonista alostérico del tipo α/β descrito recientemente en el dominio del tipo I de la subunidad β (Welzenbach et al. 2002, Shimaoka et al. 2003b, Salas et al. 2004, Yang et al. 2004). El enlace de baja afinidad de los miméticos de ICAM-1 descritos en el presente documento con la subunidad β de LFA-1, presumiblemente para el dominio de tipo I, es probable debido a la homología de secuencia entre los dominios de tipo I y I, particularmente con respecto a similitudes en motivos MIDAS y sus afinidades para el fracción de ácido carboxílico común a esta clase de antagonistas. Dado que la familia $\beta 2$ de las integrinas, incluyendo MAC-1, comparte esta subunidad, la afinidad de los compuestos para el dominio de tipo I en la subunidad $\beta 2$ debe ser atenuada con el fin de seleccionar antagonistas que son específicos para LFA-1 (Keating, S., Marsters, J., Beresini, M., Ladner, C., Zioncheck, K., Clark, K., Arellano, F., and Bodary, S. 2000. Putting the pieces together: Contribution of fluorescence polarization assays to small molecule lead optimization, SPIE Proceedings, 3913: 128-137).

Los experimentos descritos anteriormente corroborar el enlace de alta afinidad de los compuestos 3 y 4 con LFA-1 de una manera que es similar a la de ICAM-1, en un sitio de la superposición del sitio de enlace de ICAM-1 que implica el motivo MIDAS dentro de la dominio I de una subunidad de LFA-1 (Shimaoka, M., Xiao, T., Liu, J.-H., Yang, Y., Dong, Y., Jun, C.-D., McCormack, A. Zhang, R., Joachimiak, A., Takagi, J., Wang, J.-H., and Springer, T. A. 2003a. Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation, Cell, 112: 99-111.). Esto es consistente con su mimetismo propuesto del epitopo de ICAM-1 (Gadek et al. 2002), e inconsistente con cualquier conclusión de que funcionan como antagonistas alostéricos del tipo α/β de LFA-1/ICAM-1 (Shimaoka et al. 2003b, Shimaoka, M., and Springer, T.A. 2004. Therapeutic antagonists and the conformational regulation of the $\beta 2$ integrins, Curr. Topics Med. Chem., 4: 1485-1495). El enlace de estos miméticos de ICAM-1 con la subunidad de la integrina $\beta 2$, aunque con menor afinidad, plantea la cuestión de si ICAM-1 en sí se une a un segundo sitio en el dominio de tipo I (Welzenbach et al. 2002, Shimaoka et al. 2003b, Salas et al. 2004, Yang et al. 2004, Shimaoka and Springer 2004) como parte de un mecanismo de retroalimentación. Los requisitos para cationes divalentes, para asegurar la formación de la conformación activa de LFA-1, y la corroboración física de que las moléculas de sonda 1-5, moduladores conocidos de LFA-1, compiten directamente con ICAM-1, son detalles experimentales utilizados en la presente divulgación para formar un método de identificación de nuevos antagonistas que son antagonistas competitivos directos de LFA-1. El método es útil para identificar nuevos antagonistas de LFA-1, para ser utilizados en el tratamiento de la enfermedad de ojo seco.

Se ha demostrado, supra, que las moléculas pequeñas se pueden unir con alta afinidad a la subunidad α -L, que es única para LFA-1. En consecuencia, estos compuestos pueden ser selectivos para LFA-1 ($\alpha L\beta 2$) sobre Mac-1 ($\alpha M\beta 2$). Un ejemplo preferido es el de identificar y utilizar los inhibidores selectivos del LFA-1, lo que puede conferir ventajas en seguridad terapéutica.

B. Metodología de Ensayo: Experimentos de enlace competitivo

1. Competición del antagonista en el ELISA de LFA-1/ICAM-1 y LFA-1/molécula pequeña.

Los compuestos 2A y 3, A-286982, y sICAM-1 se utilizaron para demostrar el método. Con el fin de ilustrar la inhibición del enlace de ICAM-1-Ig con LFA-1, estos antagonistas se titularon en el ELISA de LFA-1/ICAM-1.

El experimento se realizó mediante la adición de diluciones en serie 1/5 del compuesto 3 ($-\lambda$ -), el compuesto 2A ($-\sigma$ -), A-286982 ($-\diamond$ -) y sICAM-1 ($-\tau$ -) se incubaron con ya sea ICAM-1-Ig (A) o el compuesto 2B (B) en placas que contienen LFA-1 capturado. Los datos mostrados son el promedio de dos placas de un solo experimento y son representativos de varias mediciones independientes. Las líneas continuas son los ajustes de los datos. Los valores de IC_{50} (nM) se proveen en las leyendas.

Las curvas de competición típicas para estos inhibidores en el ELISA se muestran en la Figura 8A. El compuesto 3 inhibe potentemente el enlace de ICAM-1-Ig a LFA-1 con un IC_{50} 2 nM. El compuesto 2A, un análogo del compuesto 3, inhibió el enlace, pero con un valor de IC_{50} aproximadamente 10 veces mayor. A-286982 y sICAM-1 inhibieron el enlace de ICAM-1-Ig con LFA-1 pero con valores de IC_{50} que fueron más de 100 veces la del compuesto 3.

μ se demostró la capacidad de estos mismos compuestos para inhibir el enlace de un antagonista de molécula pequeña marcada con FITC, compuesto 2B, con LFA-1 (Fig. 8B). Las potencias de los compuestos 2A y 3 e ICAM-1 soluble como inhibidores del enlace del compuesto 2B en paralelo a sus potencias como inhibidores del enlace de ICAM-1-Ig. El compuesto 3, el compuesto 2A y sICAM-1 inhibieron el enlace del compuesto 2B con LFA-1 con valores de IC_{50} de 3, 56, y 1200 nM, respectivamente. A-286982 no inhibió, sino aumentó el enlace del compuesto 2B con LFA-1 como se indica por el

aumento transitorio en los valores de absorbancia, alcanzando un efecto máximo a aproximadamente 4 μM antes de disminuir.

La evaluación de los valores de IC_{50} en los ELISA de molécula pequeña/LFA-1 y LFA-1/ICAM-1 se amplió a un conjunto más amplio de compuestos, incluyendo un grupo de péptidos derivados de kistrina y moléculas pequeñas que representan la evolución de esta clase de antagonistas del LFA-1 de moléculas pequeñas (Gadek et al. 2002). Como se muestra en la Figura 9 (la correlación de los valores de IC_{50} de la competencia antagonista en los ELISA de LFA-1: ICAM-1 y LFA-1: moléculas pequeñas. Los valores de IC_{50} de un grupo diverso de compuestos (4 péptidos, 5 moléculas pequeñas y sICAM-1) en competencia con compuesto 2B se registran en contra de los valores IC_{50} determinados en competencia con ICAM-1-Ig para el enlace a LFA-1. La pendiente del registro es de 0.964, intercepto y, 0.237 y $R = 0.940$. Cada punto de datos es la media de los valores de IC_{50} a partir de dos placas), hay una buena correlación ($R = 0.94$) entre los valores de IC_{50} para la competencia en cada uno de los dos ensayos de enlace de ligando para este conjunto diverso de compuestos, incluyendo sICAM-1, los compuestos 2A y 3, a través de cinco unidades log de potencia. La tendencia común en potencias entre las dos pruebas ELISA de competencia de antagonistas con ICAM-1-Ig y el compuesto 2B como ligandos revela que cada compuesto altera el enlace de ambos ICAM-1 y ligandos de moléculas pequeñas de una forma mecánica similar.

Este paralelo en la potencia de la inhibición demuestra que ICAM-1-Ig y el compuesto 2B son vinculantes para el mismo sitio en LFA-1 (Wong, A., Hwang, S. M., Johanson, K., Samanen, J., Bennett, D., Landvatter, S. W., Chen, W., Heys, J. R., Ali, F. E., Ku, T. W., Bondinell, W., Nichols, A. J., Powers, D. A., and Stadel, J. M. 1998. Binding of $[^3\text{H}]$ -SK&F 107260 and $[^3\text{H}]$ -SB 214857 to purified integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$: evidence for a common binding site for cyclic arginyl-glycyl-aspartic acid peptides and nonpeptides, *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics*, 285: 228-235).

2. Modulación Antagonista del Enlace de Ligando en los ELISA LFA-1/ICAM-1 y LFA-1/Molécula Pequeña.

Un antagonista, que inhibe a través de la competencia directa con el ligando de interés, presenta un desplazamiento hacia la derecha no saturable de las curvas de enlace del ligando para valores de EC_{50} aparentes mayores con el aumento de la concentración del antagonista y ninguna reducción en el enlace máximo del ligando (Lutz, M., and Kenakin, T. 1999. *Quantitative Molecular Pharmacology and Informatics in Drug Discovery*, John Wiley & Sons, Ltd., New York, Pratt, W. B., and Taylor, P. 1990. *Principles of Drug Action: The Basis of Pharmacology*, Churchill Livingstone, New York Matthews, J. C. 1993. *Fundamentals of Receptor, Enzyme, and Transport Kinetics*, CRC Press, Boca Raton, Kenakin, T. 1997. *Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction*, Lippincott-Raven, Philadelphia). La inhibición será superable pero requerirá cantidades crecientes del ligando en presencia de concentraciones crecientes de un inhibidor competitivo directo (Gaddum, J. H., Hameed, K. A., Hathway, D. E., and Stephens, F. F. 1955. Quantitative studies of antagonists for 5-hydroxytryptamine, *Q. J. Exp. Physiol.*, 40: 49-74). Los efectos del compuesto competitivo directamente 3, A-286 982 y sICAM-1 en las curvas de enlace de ICAM-1-Ig y el compuesto 2B con LFA-1 se muestran en la Figura 10 como ejemplos de antagonistas que presentan competencia directa. La titulación de ICAM-1-Ig (A, C, E) o el compuesto 2B (B, D, F) en ausencia (-) o presencia de antagonista en los ELISA de LFA-1/ICAM-1 y LFA-1/molécula pequeña. Los antagonistas se adicionaron en diluciones de dos veces a partir de 2.4 (A) y 2.7 (B) μM de sICAM-1, 0.040 (C) y 0.10 (D) μM del compuesto 3 y 20 (E) y 50 (F) μM de A- 286.982. El orden de las concentraciones de antagonista fue, \square (la concentración más baja de antagonista adicionado), Δ , \circ , \diamond , \blacksquare , \blacktriangle a \bullet (la concentración más alta del antagonista). Los ajustes de los datos se muestran como las líneas continuas. Los datos que se muestran son de una placa y son representativos de un mínimo de dos experimentos. (Tener en cuenta que A-286982 (F) resultó en un aumento del enlace del compuesto 2B con LFA-1). En contraste, un inhibidor alostérico puede alterar las curvas de enlace del ligando, causando una reducción en el enlace máximo o saturación en los desplazamientos hacia la derecha de las curvas (Lutz and Kenakin 1999, Matthews 1993). Como se muestra en la Figura 10A, la presencia de concentraciones crecientes de sICAM-1 desplazó claramente las curvas del enlace de ICAM-1-Ig hacia la derecha para los valores más altos de EC_{50} . Además, se observó la misma medida máxima del enlace de ICAM-1-Ig con LFA-1 en presencia y ausencia de sICAM-1 como se esperaba cuando dos formas moleculares del mismo ligando natural están compitiendo directamente por el enlace con un sitio en el receptor (Lutz and Kenakin 1999, Pratt, W. B., and Taylor, P. 1990. *Principles of Drug Action: The Basis of Pharmacology*, Churchill Livingstone, New York, Matthews 1993, Kenakin, T. 1997. *Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction*, Lippincott-Raven, Philadelphia). De manera similar, las concentraciones crecientes del compuesto 3 también desplazan el enlace de ICAM-1-Ig a valores más altos de EC_{50} con una variación mínima en el enlace de ICAM-1-Ig máximo (Figura 10C). Aunque los desplazamientos a la derecha en las curvas del enlace ligando en presencia de un antagonista competitivo son normalmente paralelos, este no es siempre el caso (Coultrap, S. J., Sun, H., Tenner, T. E. Jr., and Machu, T. K. 1999. Competitive antagonism of the mouse 5-hydroxytryptamine₃ receptor by bisindolylmaleimide I, a "selective" protein kinase C inhibitor, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 290: 76-82). Las pendientes no paralelas para las curvas LFA-1/enlace de ICAM-1-Ig en presencia y ausencia del compuesto 3 pueden ser debido a una incapacidad para alcanzar el equilibrio completo bajo condiciones de ELISA de enlace del ligando heterogéneo con este compuesto. En el formato LFA-1/compuesto 2B del ELISA de enlace de ligando, las concentraciones crecientes del compuesto 3 también desplazaron claramente las curvas del enlace del compuesto 2B para valores más altos de EC_{50} con ninguna reducción en el enlace máximo (Figura 10D). Las concentraciones crecientes de sICAM-1 también mostraron un efecto similar (Figura 10B), aunque el grado del

desplazamiento de las curvas estuvo limitado por la concentración máxima alcanzable de sICAM-1 a 2.7 μM . Por lo tanto, los efectos tanto de sICAM-1 y el compuesto 3 en ICAM-1-Ig y el enlace del compuesto 2B con LFA-1 son característicos de la competencia directa como se describe anteriormente.

5 El efecto del enlace A-286982 y el compuesto 2B con el receptor 1-ICAM-Ig era claramente diferente (Figuras 10E y 10F). En el ELISA de LFA-1/ICAM -1, las curvas de ICAM-1-Ig se desplazaron hacia la derecha para los valores de EC_{50} superiores; Sin embargo, el enlace máximo de ICAM-1-Ig con LFA-1 disminuyó considerablemente con el aumento de las concentraciones de A-286982. La reducción del enlace máximo y el desplazamiento hacia la derecha de las curvas del enlace de ligando con el aumento de la concentración de A-286982 son un reflejo de la inhibición alostérica como se describe anteriormente. A-286982 causa reducciones tanto en la afinidad del ligando como en la capacidad de enlace (Lutz, M., and Kenakin, T. 1999. Quantitative Molecular Pharmacology and Informatics in Drug Discovery, John Wiley & Sons, Ltd., New York, Matthews 1993); esto demuestra que A-286982 es un antagonista insuperable del enlace de ICAM-1-Ig. En contraste, en el ELISA de LFA/molécula pequeña, la presencia de A-286982 a concentraciones micromolares desplazó las curvas del enlace del compuesto 2B para reducir los valores de EC_{50} y parece que mejora el enlace del compuesto 2B con LFA-1 (Figura 10F). Los efectos contrastantes de A-286982 sobre el enlace del compuesto 2B y ICAM-1-Ig pueden ser debidos al efecto alostérico conocido del enlace del compuesto con el sitio IDAS en LFA-1. Los datos de enlace de A-286982 sirven como ilustración de la inhibición alostérica por enlace de ligando de proteína y moléculas pequeñas con LFA-1 en los experimentos de enlace demostrados en este método.

20 El análisis Schild también puede ser utilizado para investigar si un compuesto inhibe el enlace del ligando a través de la competencia directa para un solo sitio de enlace (Lutz and Kenakin 1999, Pratt and Taylor 1990, Matthews 1993, Kenakin 1997, Coultrap 1999). Este modelo se basa en los supuestos de que respuestas equiactivas en un ensayo son el resultado de la ocupación equivalente del receptor por el ligando y que el enlace máximo no se cambia por la presencia del antagonista. En un análisis de Schild, la relación de dosis es la relación de los valores de EC_{50} en presencia y en ausencia de antagonista y es una medida de las concentraciones de ligando que conducen a respuestas equiactivas. Esta relación de dosis se determinó para cada concentración de antagonista y las regresiones de Schild se representaron gráficamente como se muestra en la Figura 11. Una respuesta lineal con una pendiente de 1 en una regresión de Schild indica que la inhibición por un antagonista es competitivamente directa y reversible (Lutz and Kenakin 1999, Kenakin 1997). El análisis de Schild produciría una relación no lineal y/o una pendiente que se desvía significativamente de 1 en el caso de un inhibidor alostérico que no resulte en una reducción del enlace máximo (Lutz and Kenakin 1999, Kenakin 1997). Las regresiones de Schild tanto para sICAM-1 como para el compuesto 3 se muestran en la Figura 11 con pendientes comparables de 1.26 y 1.24, respectivamente. Las regresiones de Schild del antagonismo de s-ICAM-1 (-▲-) y el compuesto 3 (-●-) en el ELISA del enlace del ligando LFA-1/ICAM-1 se representan gráficamente a partir de los datos de la Figura 5 (A) y (C), respectivamente. La pendiente del registro para el compuesto 3 es de 1.24 con un intercepto y de 10.9 y $R = 0.99832$. La pendiente del registro sICAM-1 es de 1.26, intercepto y, 8.51 y $R = 0.99131$. Aunque el análisis Schild requiere una regresión lineal con una pendiente próxima a 1 para demostrar la inhibición competitiva directa, no existe una orientación en la extensa literatura en cuanto a qué rango de valores Schild son aceptables. Las pendientes de 1.24 y 1.26 caen dentro de los límites de muchos valores Schild publicados utilizados para apoyar las conclusiones de enlace competitivo, y por lo tanto, estos valores de pendiente no se consideran significativamente diferentes a 1. La linealidad de los registros de regresión y la similitud en las pendientes de las relaciones son coherentes con el enlace del ligando (ICAM-1-Ig) y ambos antagonistas (sICAM-1 y compuesto 3) en el mismo sitio de una manera similar.

Los experimentos de enlace descritos anteriormente y los análisis discutidos se utilizan para formar un método para identificar inhibidores competitivos directamente de LFA-1. Los potenciales agentes terapéuticos competitivos directamente se pueden investigar utilizando uno o más de los tipos de experimento descritos en este documento para determinar si el agente de interés no compiten con ligandos sintéticos y naturales conocidos para competir por el enlace en el mismo sitio de LFA-1, en donde ICAM-1 se une. Los agentes terapéuticos antagonistas competitivos directamente identificados así, se utilizan en el método descrito en el presente documento para tratar a un sujeto en necesidad de tratamiento para los trastornos inflamatorios mediados por LFA-1 y su interacción con ICAM-1.

50 VII. Método de identificación de compuestos útiles en el tratamiento de enfermedades humanas.

Un método de búsqueda refinada se describe en este documento utilizando el patrón de la inhibición del crecimiento celular por ARNsi (secuencias de ARN de interferencia pequeñas) dirigido contra una diana celular implicada en el crecimiento celular y la enfermedad humana para identificar compuestos con un patrón similar de inhibición del crecimiento celular en un grupo de líneas celulares cultivadas. El uso de datos del ARNsi es deseable porque ARNsi silencia el gen diana y está directamente ligado a la inhibición del crecimiento celular por esa diana. Por lo tanto los datos de ARNsi son útiles para correlacionar la inhibición de una función diana y la inhibición del crecimiento celular. Los compuestos identificados de esta manera son útiles en el tratamiento de enfermedades humanas.

60

La Figura 12 es un diagrama de flujo para la identificación de compuestos para el tratamiento de enfermedades humanas utilizando los datos de inhibición del crecimiento de ARNs.

El método incluye la elección de una diana celular (por ejemplo, una proteína u otro biopolímero cuya formación se controla por la transcripción y/o traducción de un gen) que participe en el crecimiento de células que contienen dicha diana cuya inhibición sería útil en el control del crecimiento celular se selecciona. Esta selección puede ser de listas de tales dianas en el dominio público, incluyendo la literatura científica e incluye enzimas, receptores y proteínas implicados en las interacciones proteína-proteína. Una de tales dianas útiles es la asociación de beta-catenina con proteínas de la familia TCF, como TCF-4. Estas proteínas se encuentran en la vía Wnt y están involucradas en el crecimiento y la proliferación de un número de tumores humanos incluyendo el cáncer común. Un compuesto que se une a beta-catenina y bloquea su asociación con TCF-4 es útil en la prevención de la transcripción de genes seleccionados y el crecimiento de tumores en cánceres humanos, particularmente cáncer de colon. Las secuencias ARN de interferencia pequeño (ARNsi) únicas en la diana se compraron a proveedores comerciales tales como Dharmacon, Boulder CO. Las líneas celulares desde el panel del National Cancer Institute de 60 líneas celulares relevantes para el cáncer (por ejemplo, líneas celulares derivadas de Colon y Mama NCI) y/o la inflamación (por ejemplo, las líneas celulares de leucemia NCI) se pueden cultivar en la presencia de cantidades crecientes del ARNsi dirigidos contra la diana hasta que se inhibe el crecimiento de las células. Alternativamente, una sola concentración de ARNsi se puede utilizar contra todas las líneas celulares y la inhibición relativa del crecimiento celular se puede medir. Las líneas celulares cuyo crecimiento depende de la presencia de la diana será inhibido, mientras que otras líneas celulares pueden ser menos dependientes y por consiguiente, su crecimiento será menos inhibido. Por lo tanto la inhibición del panel de 60 líneas celulares del NCI producirá un patrón de inhibición del crecimiento para cada ARNsi y diana probada. El uso de líneas celulares no está actualmente en el panel de línea celular NCI-60 también se contempla como parte de este método. Se prevé, además, que los reactivos, por ejemplo, Lipofectina™, Lipofectamina™, y similares, pueden modular la administración de ARNsi a las células. Los datos existentes del NCI para efectos de titulación de dosis de los compuestos sobre el crecimiento de las mismas 60 líneas celulares se pueden buscar utilizando el programa COMPARE del NCI o para identificar los compuestos que tienen un patrón similar de actividad (por ejemplo, la concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de las células en un 50% con respecto a su crecimiento no inhibido, el valor de GI50 para un compuesto). La similitud se puede cuantificar mediante métodos estadísticos u otros, incluyendo la correlación de Pearson utilizada en el programa COMPARE del NCI. Los algoritmos de búsqueda distintos de COMPARE del NCI se pueden utilizar para definir similitudes de compuestos y ARNsi. Los datos del NCI se pueden analizar en línea a través de la Web en todo el mundo, o se pueden descargar a un ordenador o una red de ordenadores y analizar fuera de línea. Bases de datos adicionales, incluyendo bases de datos públicas y de propiedad exclusiva que unen la estructura del compuesto a su inhibición del crecimiento celular también son útiles para los fines de esta invención. Para cada diana, las estructuras de los compuestos cuyo patrón de actividad de crecimiento celular es similar al patrón de inhibición del crecimiento producido por el experimento de ARNsi contendrá características de subestructuras comunes (por ejemplo, grupos fenilo, grupos de ácido carboxílico, grupo de donantes de enlaces de hidrógeno, etc.) que puedan definir una relación estructura-actividad (SAR). Tales relaciones SAR se utilizan comúnmente por los químicos farmacéuticos expertos en la técnica del descubrimiento de fármacos para vincular la actividad de los compuestos frente a una diana para un motivo estructural común. El desarrollo y perfeccionamiento de una SAR es útil en la identificación y el diseño de compuestos estructuralmente análogos con una probabilidad o posibilidad de mostrar las actividades celulares similares o mejoradas. SAR se desarrolló y perfeccionó mediante la comparación de las actividades de compuestos estructuralmente relacionados. Los compuestos útiles pueden ser sintetizados o identificados en búsquedas por ordenador de la base de datos del NCI u otras bases de datos de compuestos disponibles comercialmente o bibliotecas generadas por ordenador de compuestos con características estructurales interesantes y diversas y propiedades calculadas (como "similitud farmacéutica"). Los compuestos de fuentes comerciales o sintéticas se pueden probar en los ensayos de crecimiento celular para la mejora de la potencia en la inhibición del crecimiento celular y los datos (tanto para la mejora como para la disminución de potencia) se puede utilizar para refinar la SAR para la inhibición del crecimiento celular mediado por una diana. Los ciclos iterativos de adquisición de datos, refinamiento de SAR, obtención del compuesto, la adquisición de datos/pruebas del compuesto puede identificar un compuesto con una potencia por debajo de 10 micromolar en la inhibición del crecimiento celular. Tal compuesto puede ser útil en el descubrimiento de fármacos, ya que a menudo es posible conseguir niveles circulantes en exceso de 10 micromolar en un animal utilizado como modelo de la enfermedad humana (por ejemplo, un modelo de xenoinjerto de ratón de cáncer humano, como un ejemplo no limitativo). Pruebas adicionales en modelos animales pertinentes para la diana para mejorar la potencia, eficacia y duración de la acción pueden identificar una molécula candidato para el tratamiento clínico de enfermedades humanas incluyendo cáncer y enfermedades inflamatorias del crecimiento celular aberrante. Alternativamente, la identificación de compuestos que se ajustan a un patrón de actividad opuesto de la inhibición del crecimiento celular por ARNsi puede ser estimulante del crecimiento celular útil en enfermedades y condiciones de crecimiento de las células lento. El crecimiento celular mejorado podría ser útil en la curación de heridas y otras situaciones clínicas. El método descrito en este documento también puede utilizar la transfección de un gen para un regulador de proteína conocido de la diana para ayudar en la identificación de un patrón de inhibición suficientemente distintivo para ser capaz de identificar moléculas con un patrón similar de actividad.

Este método es útil en la identificación de compuestos potentes con potencias importantes por debajo de 10 micromolar en la inhibición del crecimiento celular. Estos compuestos se pueden utilizar en modelos animales de cáncer humano y la inflamación. Más preferidos son los compuestos cuya inhibición del crecimiento celular (GI50) es inferior a 1 micromolar. Aún más preferidos son los compuestos cuya inhibición del crecimiento (GI50) es menor que 100 nM. Los más preferidos son los compuestos con valores de GI50 inferiores a 10 nM. Los métodos descritos en este documento también se pueden utilizar para identificar inhibidores útiles de LFA-1, el receptor de células-B BR3, Grb2 (una proteína corriente abajo de los receptores de factor de crecimiento en las cascadas de señalización) y otras proteínas diana dentro y fuera de las células. Es particularmente útil contra dianas en la vía Wnt incluyendo beta-catenina para el tratamiento de cáncer de colon humano. También es útil contra dianas adicionales relacionadas con la enfermedad en el linfoma, leucemia, cáncer de colon, melanoma, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de riñón y otros cánceres humanos.

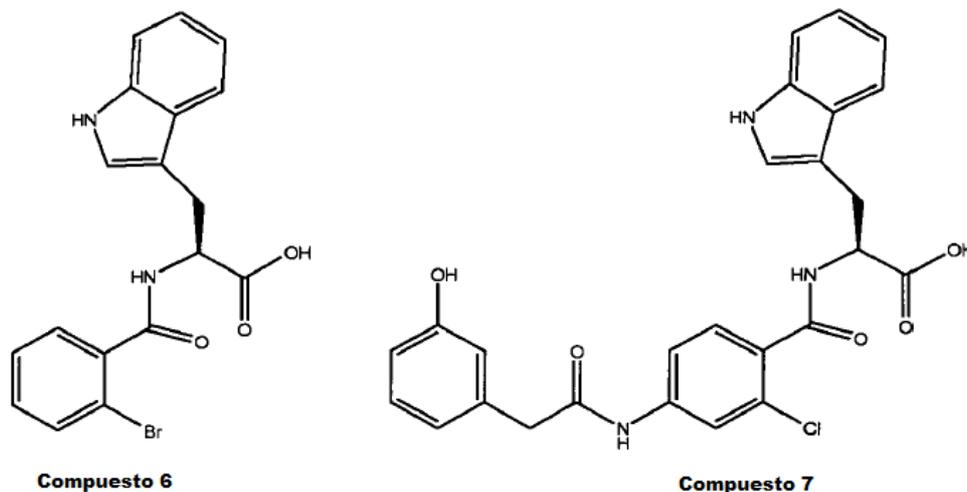
El método es útil en la identificación de compuestos útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias humanas mediadas por el crecimiento y la proliferación de las células inflamatorias. Estos incluyen, pero no se limitan a Psoriasis, Eczema, Asma, artritis reumatoide y Ojo Seco. Los compuestos que se identifican de la manera anterior y activos en modelos animales de enfermedad humana son útiles como tratamientos de enfermedades humanas incluyendo cáncer y enfermedades inflamatorias. Las dianas implicadas en enfermedades distintas del cáncer y la inflamación que implican proliferación celular aberrante también se pueden utilizar en este método.

Adicionalmente, se concibe un método para utilizar los datos de la actividad celular de ARNs para dirigir o seleccionar dianas mediante la búsqueda en bases de datos públicas y/o de propiedad exclusiva de la actividad celular del compuesto por un patrón de actividad celular similar en respuesta a un compuesto o colección de compuestos como un método para identificar compuestos útiles en la identificación de un producto farmacéutico humano.

VIII. Ejemplos

A. MATERIALES

Se produjeron LFA-1 unida a membrana humana recombinante de longitud completa y fusión ICAM-1-Ig dominio recombinante humano 5 (ICAM-1-Ig) en células 293 humanas y se purificaron como se describe (**Fisher et al. 1997, Keating et al. 2000**). sICAM-1 (una forma truncada de ICAM-1 nativa sin los dominios transmembrana y citoplasmáticos para facilitar su uso en ensayos *in vitro*, pero con el epítipo de enlace de LFA-1 intacto) y MEM-48 fueron de R & D Systems (Minneapolis, MN). La integrina $\beta 2$ anti-humana de ratón monoclonal (clon PLM2) se generó utilizando procedimientos estándar (**Fisher et al. 1997**). Los antagonistas de péptidos y moléculas pequeñas fueron sintetizados como se describe (**Gadek et al. 2002, Burdick 1999, Liu et al. 2000**). Los compuestos 1 - 5 y A-286982 se muestran en la **Figura 4**. Los compuestos 1, 2A y 2B, son similares al compuesto 3 pero con la adición de ligadores para permitir la conjugación con fluoresceína (compuestos 1 y 2B; 2A no se conjugó con fluoresceína). Los conjugados de fluoresceína se prepararon mediante acoplamiento de una funcionalidad amina con fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) (**Keating et al. 2000**). Las moléculas adicionales analizadas incluyen los compuestos 6 y 7 (**Gadek et al. 2002**), kistrin (**Dennis et al. 1990**), los heptapéptidos no-kistrin, $H_2N-C G F D M P C-CO_2H$ y $H_2N-C G Y^{(m)} D M P C-CO_2H$, péptido Kistrin cíclico C R I P R G D M P D R C y tetrapéptido, $H_2N-C N^{(F)} P C-CO_2H$, en donde $Y^{(m)}$ es meta- tirosina y $N^{(F)}$ es N'-3-fenilpropilo asparagina.



Todos los antagonistas de moléculas pequeñas se almacenan como soluciones 10 mM en DMSO al 50% a -20 °C. El compuesto 5 fue un regalo de Hoffman-La Roche Inc. (Nutley, NJ).

5

B. Experimentos

Ejemplo 1: Mediciones de afinidad

10 Las afinidades de las moléculas pequeñas de LFA-1 se midieron usando polarización de fluorescencia (FP) (**Lakowicz 1999, Panvera 1995**) en un formato competitivo con un antagonista de molécula pequeña, compuesto 1 (Figura 2), como se describe previamente (Keating et al. 2000). Todas las mediciones se realizaron en solución reguladora que contiene Hepes 50 mM, pH 7.2, NaCl 150 mM, 0.05% de n-octilglucósido y 0.05% de gamma globulina bovina (BGG) y, ya sea MnCl₂ 1 mM, o CaCl₂ 1 mM y MgCl₂ 1 mM. La afinidad del compuesto 1 para LFA-1 se midió primero mediante la adición del compuesto

15 1, 2 nM a diluciones seriadas de LFA-1 a partir de 1 μM en solución reguladora que contiene ya sea MnCl₂ o CaCl₂ y MgCl₂. Los experimentos de competición se realizaron mediante la adición de diluciones en serie de antagonistas para el compuesto 1, 2 nM (utilizando cualquiera LFA-1 3 nM (en MnCl₂) o LFA-1 40 nM (en CaCl₂ y MgCl₂)). En los experimentos de competición ICAM-1-Ig, las concentraciones de LFA-1 se redujeron a 2 y 20 nM de LFA-1 en las dos condiciones de solución reguladora de catión divalente para maximizar la inhibición por ICAM-1-Ig. Las diferentes concentraciones de LFA-1

20 utilizadas en los experimentos fueron tomadas en cuenta en los cálculos de afinidad (véase más abajo). Las soluciones se incubaron en placas de HE96 negras de 96 pozos (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) durante 2 horas a 37 °C. Las mediciones de polarización de fluorescencia (FP) se realizaron en un lector de placas Analyst (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) usando excitación de 485 nm, emisión de 530 nm y filtros dicróicos de 505 nm. Todos los datos de intensidad en bruto fueron corregidos por las emisiones base por sustracción de las intensidades medidas a partir de las muestras apropiadas sin compuesto 1. Los datos de competición de antagonistas y de enlace LFA-1 se analizaron

25 utilizando un ajuste de mínimos cuadrados no lineales de una ecuación de cuatro parámetros con el software KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA) para obtener los valores de EC₅₀ para la titulación de LFA-1 y los valores de IC₅₀ de los antagonistas. La ecuación utilizada para ajustar los datos es $Y = ((AD) / (1 + (X / C)^B)) + D$, donde Y es la respuesta del ensayo, A es Y - valor de la asíntota superior, B es el factor de pendiente, C es la IC₅₀ o EC₅₀ y D es Y - el valor de la asíntota inferior. En general, los datos medidos tanto en los formatos de FP homogénea y de ELISA heterogéneos descritos a continuación, contienen señal relativamente grande para las relaciones de base y las estimaciones de error en los ajustes normalmente son menos de 10% del valor final del parámetro ajustado. Las constantes de disociación de equilibrio (K_d) de LFA-1 para el compuesto 1 con y sin A-286982 se calcularon utilizando el análisis de Klotz and Hill (**Panvera, 1995**). Las afinidades (K_i) de los antagonistas de LFA-1 se calcularon usando los valores de IC₅₀, la K_d del compuesto 1/LFA-1, y las

35 concentraciones del compuesto 1 y LFA-1 en los experimentos de competición (**Keating et al. 2000, Jacobs et al., 1975**).

Ejemplo 2: Ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) de LFA-1/ICAM-1 y LFA-1/molécula pequeña.

40 (A) Competición de Antagonista: las moléculas pequeñas y sICAM-1 se ensayaron para determinar la capacidad de alterar el enlace de ICAM-1-Ig o un antagonista de molécula pequeña marcado con fluoresceína, compuesto 2B, con LFA-1 en un formato competitivo (**Gadek et al. 2002, Burdick 1999, Quan et al. 1998**). El compuesto 2B es similar al compuesto 1, pero con un conector más largo entre la molécula pequeña y fluoresceína para maximizar el enlace del anticuerpo de detección

anti-fluoresceína. Las placas de 96 pozos se revistieron con 5 µg/ml (33.3 nM) de integrina β2 anti-humano de ratón (un anticuerpo bloqueante sin función) en solución salina regulada con fosfato (PBS) durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con solución reguladora de ensayo (Hepes 20 mM, pH 7.2, NaCl 140 mM, MnCl₂ 1 mM, 0.5% de albúmina de suero bovino (BSA) y 0.05% de Tween-20) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado en solución reguladora (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM, MnCl₂ 1 mM, y 0.05% de Tween-20), se adicionaron LFA-1 8 nM (ELISA de LFA-1/ICAM-1) o LFA-1 2nM (ELISA LFA-1/molécula pequeña), seguido de incubación durante 1 h a 37 °C. Las placas se lavaron, y para el ELISA de LFA-1/ICAM-1, se adicionaron diluciones en serie de los antagonistas de moléculas pequeñas o sICAM-1 a las placas durante 30 minutos, seguido de la adición de ICAM-1-Ig 0.89 nM (concentración final) durante 2 horas a 37 °C. Después de un lavado adicional, se adicionó anti-huIgG de cabra (específico de Fc)-HRP y se incubó durante una hora a 37 °C. En el ELISA de LFA-1/molécula pequeña, se adicionaron los antagonistas diluidos y compuesto 2B 25 nM simultáneamente a las placas, seguido de una incubación de 2 horas a 37 °C. Se adicionó HRP-anti-fluoresceína de oveja, después de un lavado y se incubó durante una hora a 37 °C. Para ambos ensayos, después del lavado, los anticuerpos conjugados-HRP unido se detectaron mediante la adición de tetrametilbencidina (TMB), seguido por la medición de la absorbancia del producto a 450 nm después de la adición de H₃PO₄ 1M para detener la reacción. Los valores de IC₅₀ para cada curva se determinaron por ajuste a la ecuación de cuatro parámetros descrita anteriormente utilizando el software KaleidaGraph. El formato y los resultados de esta forma del ensayo de LFA-1/ICAM-1 son similares a los reportados previamente (**Gadek et al. 2002, Burdick 1999**); sin embargo, este formato es más robusto debido a la captura de anticuerpos del LFA-1 en lugar de recubrimiento directo sobre la placa de ELISA.

(B) *Enlace de Ligando*: Los ELISA de LFA-1/ICAM-1 y de LFA-1/moléculas pequeñas se realizaron como se describe anteriormente, excepto que se adicionaron diluciones en serie de cualquiera de ICAM-1-Ig o el compuesto 2B a las placas ya sea en la presencia o en la ausencia del antagonista. En todos los casos se adicionó el ligando simultáneamente con el antagonista. Las placas se incubaron durante 6 h a 37 °C para acercarse a las condiciones de equilibrio después de la adición del antagonista y el ligando, antes del lavado y de la adición del anticuerpo de detección. Los valores de EC₅₀ para cada curva se determinaron mediante el ajuste con un modelo de cuatro parámetros como se describe anteriormente. Los valores de EC₅₀ generados en presencia y ausencia de antagonista se analizaron mediante la regresión de Schild (**Arunlakshana and Schild 1959, Lutz and Kenakin 1999, Pratt and Taylor 1990, Matthews 1993, Kenakin, 1997**). Se calculan los gráficos Schild de Log (Proporción Conc. -1) frente a la concentración del antagonista a partir de, (Proporción Conc. -1) = ((EC₅₀ del ligando con antagonista)/(EC₅₀ del ligando sin antagonista))-1. Las pendientes de los gráficos del Log (Proporción de Conc. -1) frente a la concentración del Antagonista se calcularon mediante el ajuste de la línea de la ecuación lineal, $Y = A + BX$.

Ejemplo 3: Reticulación de un análogo radiomarcado, fotoactivable del compuesto 3 para LFA-1

LFA-1 o BSA asociada con la membrana humana de longitud completa (0.35 mg/ml [1.4 y 5.3 µM, respectivamente] en Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, MgCl₂ 5 mM, MnCl₂ 1 mM, y 1 % de n-octilglucósido, pH 7.2) se incubó durante la noche a 37 °C con el compuesto 5 4.1 µM, un análogo de fotoactivable marcado con tritio de compuesto 3 (**Kauer et al. 1986**), ya sea en la presencia o ausencia del compuesto 3 290 µM. La relación molar del compuesto 5 con LFA-1 fue de 3:1. Una placa de 96 pozos pre-cubierta con 1% de BSA se utilizó para la incubación. Justo antes de la reticulación, el exceso del compuesto 5 se retiró rápidamente mediante filtración en gel con una columna MicroSpin G-25 en un formato de 96 pozos equilibrado con la misma solución reguladora. El complejo de LFA-1/compuesto 5 se reticuló por medio de la exposición a una lámpara de vapor de mercurio de alta presión (450 vatios, Ace Glass, Vineland, NJ). Durante la irradiación, las muestras se enfriaron en hielo y se protegieron por una placa gruesa de 5 mm de vidrio de borosilicato para minimizar la degradación de las proteínas. El compuesto 5 no ligado residual se eliminó por filtración en gel (G-25) como anteriormente. A continuación, el complejo reticulado se desnaturalizó en hidrócloruro de guanidina 8 M (GuHCl) y se redujo y alquiló. Las proteínas tratadas se sometieron a SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie. Las proteínas radiomarcadas se visualizaron por autoradiografía.

Para identificar los sitios de enlace del compuesto 5, las subunidades αL y β2 tratadas se separaron por cromatografía de exclusión de tamaño en presencia de GuHCl 6 M, Hepes 20 mM, EDTA 10 mM, pH 6.8 y luego se escinde químicamente con hidroxilamina 2.6 M en ácido acético al 10% con GuHCl 7 M durante 4 horas a 75 °C. Los fragmentos de proteína radiomarcada se separaron por SDS-PAGE y ya sea se visualizaron por autoradiografía, o se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno, se tiñeron con azul de Coomassie, y luego se identificaron por secuenciación de la proteína N-terminal.

Ejemplo 4: Generación de la construcción αL carente del dominio I

La construcción utilizada, pLFA.huID.Δp, contiene la secuencia del gen αL desde el sitio de restricción Nar1 5' del dominio I al segundo sitio de restricción PflM1 3' del dominio I en el cual el primer sitio de restricción PflM1 3' del dominio I fue abolida (**Edwards et al. 1995**). Con el fin de generar el mutante carente del dominio I, se hicieron los siguientes cebadores: el

cebador hacia adelante

CACTGTGGCGCCCTGGTTTTTCAGGAAGGTAGTGGATCAGGCACAAGCAAACAGGACCTGACTTC, que contiene la secuencia desde el sitio Nar1 al inicio del dominio I, una secuencia de ADN que codifica GSGSG y 23 bp de la secuencia α L después del final del dominio I, y el cebador reverso TCTGAGCCATGTGCTGGTATCGAGGGGC, que se imprima en el segundo sitio de restricción PflM1 después del dominio I. Se realizó un PCR usando estos cebadores y la pLFA.huID. Δ p linealizada con Bgl II, que corta en un sitio dentro del dominio I. Un fragmento de ADN fue amplificado que contenía la secuencia desde el sitio Nar1 al segundo sitio PflM1 y en el cual todo el dominio I, a partir de C125 a través de G311, fue reemplazado con una secuencia de ADN que codifica GSGSG. Este fragmento de ADN se purificó, se digirió con Nar1 y PflM1 y se insertó en el plásmido α L humano (pRKLFA α m) en los correspondientes sitios de Nar1 y PflM1. La inserción correcta de la secuencia de ADN que codifica GSGSG se confirmó por análisis de secuencia.

Ejemplo 5: El enlace de LFA-1 carente del dominio I de la ICAM-1 o el compuesto 2B

Las células 293 se transfectaron con la construcción β 2 sola (simulada) o con ya sea la construcción α L de tipo salvaje (wt) o la construcción α L carente del dominio I (I-menos) y se dejó que se recuperara durante 3 días. Las células fueron separadas y se resuspendieron en solución reguladora de adhesión (HEPES 0.02 M, pH 7.2, NaCl 0.14 M, 0.2% de glucosa). Se realizó el enlace de ICAM-1-Ig unida a la placa como se describe (Edwards et al. 1998). Para el enlace del compuesto 2B, se adicionaron 2×10^5 células por pozo en una placa de 96 pozos de fondo redondo en solución reguladora de adhesión que contiene 0.5% de BGG, MnCl₂ 0.1 mM de, 1 μ g/ml de anticuerpo activador anti- β 2 MEM-48 y el compuesto 2B 1 μ M. Las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C, se lavaron con PBS frío y se fijaron con formaldehído al 1% de PBS. Las células se incubaron con una dilución 1: 500 de anti-fluoresceína-HRP de oveja durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se incubaron con TMB durante 15 minutos. La reacción se detuvo con H₃PO₄ 1 M y se leyó a 450 nm. En paralelo, los transfectantes se ensayaron para la integridad estructural de los complejos α L/ β 2 expresados en la superficie y de la presencia o ausencia del dominio I por análisis FACS utilizando un panel de anticuerpos con epítomos de enlace conocidos (Edwards et al. 1998).

Ejemplo 6: Ensayo de adhesión de células T humanas (ensayo del enlace celular).

El ensayo de adhesión de células T se realiza usando una línea de células linfoides T humanas, HuT 78. Se diluye el anti-hulG(Fc) de cabra hasta 2 mg/ml en PBS y las placas de 96 pozos se recubren con 50 μ l/pozo a 37 °C durante 1 h. Las placas se lavaron con PBS y se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con BSA al 1% en PBS. Se diluye el dominio ICAM-Ig 5 a 100 ng/ml en PBS y se adicionaron 50 μ l/pozo a las placas de O/N a 4 °C. Las células HuT 78 se centrifugaron a 100 g y el pellet celular se trató con EDTA 5 mM durante aproximadamente 5 minutos a 37 °C en una incubadora con 5% de CO₂. Las células se lavaron en NaCl 0.14 M, Hepes 0.02 M, 0.2% de glucosa y MnCl₂ 0.1 mM (solución reguladora de ensayo) y se centrifugaron. Las células se resuspendieron en solución reguladora de ensayo hasta 3.0×10^6 c.ml. Los inhibidores se diluyeron en solución reguladora de ensayo a una concentración final 2X y se pre-incubaron con células HUT 78 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 100 μ l/pozo de células y los inhibidores a las placas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Se adicionaron 100 μ l/pozo de PBS y las placas se sellaron y se sometieron a centrifugación invertida a 100 g durante 5 minutos. Las células no unidas se retiraron fuera de la placa y el exceso de PBS se transfirió a una toalla de papel. Se adicionaron a la placa 60 μ l/pozo de p-nitrofenil N-acetil-b-D-glucosaminida (0.257 g a 100 ml de solución reguladora de citrato) y se incubaron durante 1.5 h a 37 °C. La reacción enzimática se detuvo con 90 μ l/pozo de glicina 50 mM/EDTA 5 mM y se leyó en un lector de placas a 405 nm. La adhesión celular de HUT 78 para 5dICAM-Ig se midió utilizando el método de p-nitrofenil de Langegren, U. (1984). J. Immunol. Methods 57,379-388.

Ejemplo 7: Ensayo de proliferación de Células T.

Este ensayo es un modelo in vitro de la proliferación de linfocitos resultante de la activación, inducida por el acoplamiento del receptor de células T y LFA-1, tras la interacción con las células presentadoras de antígeno. (Springer, et al. 1990, Nature). Las placas de microtitulación (Nunc de 96 pozos ELISA certificadas) se pre-recubrieron durante la noche a 4 °C con 50 μ l de 2 μ g/ml de anti-humano Fc de cabra (Caltag H10700) y 50 μ l de 0.07 μ g/ml de anticuerpo monoclonal para CD3 (Immunotech 0178) en PBS estéril.

Al siguiente día las soluciones cubiertas se aspiran. A continuación, las placas se lavaron dos veces con PBS y se adicionaron 100 μ l de 17 ng/ml de 5d-ICAM-Ig durante 4 horas a 37 °C. Las placas se lavaron dos veces con PBS antes de la adición de las células T + CD4. Los linfocitos de sangre periférica se separaron de la sangre entera heparinizada extraída de donantes sanos. Un método alternativo es la obtención de sangre completa de donantes sanos mediante leucoforesis. La sangre se diluyó 1: 1 con solución salina, en capas, y se centrifugó a 2500 xg durante 30 minutos en LSM (6.2 g de Ficoll y 9.4 g de diatrizoato de sodio por 100 ml) (Organon Technica, NJ). Los monocitos se agotan utilizando un método de reactivo de depleción de las células mieloides (Myeloclear, Labs, Hornby, Ontario, Canada). PBLs se resuspenden en 90% de suero

bovino fetal inactivado por calor y DMSO al 10%, se dividieron en alícuota, y se almacenaron en nitrógeno líquido. Después de la descongelación, las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Intergen, Purchase, NY), piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 3 mM, aminoácidos no esenciales 1 mM, 500 µg/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina, 50 µg/ml de gentamicina (Gibco).

5

La purificación de las células T +CD4 se obtienen por el método de selección negativa (Columna de recuperación celular CD4 humano Kit # CL110-5 Accurate). 100,000 células T+CD4 purificadas (90% de pureza) por pozo de placa de microtitulación se cultivan durante 72 horas a 37 °C en 5% de CO₂ en 100 ml de medio de cultivo (RPMI 1640 (Gibco) suplementado con FBS al 10% inactivado por calor (Intergen), aminoácidos no esenciales 0.1 mM, piruvato de sodio 1 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 50 µg/ml de gentamicina, Hepes 10 mM y glutamina 2 mM). Los inhibidores se adicionaron a la placa en el inicio del cultivo. Las respuestas proliferativas en estos cultivos se miden mediante la adición de 1 µCi/pozo de timidina titulado durante las últimas 6 horas antes de la recolección de las células. La incorporación del marcador radiactivo se mide por recuento de centelleo líquido (colector y contador de 96 pozos Packard). Los resultados se expresan en cuentas por minuto (cpm).

10

15

Ejemplo 8: Modelo de cultivo mixto de linfocitos in-vitro.

El modelo de cultivo mixto de linfocitos, que es un modelo in vitro de trasplante (A. J. Cunningham, "Understanding Immunology, Transplantation Immunology" pages 157-159 (1978) examina los efectos de diversos antagonistas de LFA-1 tanto en el brazo proliferativo como el efector de la respuesta linfocitaria mixta humana.

20

Aislamiento de células: las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se separan de la sangre total heparanizada extraída de donantes sanos. La sangre se diluyó 1:1 con solución salina, en capas, y se centrifugó a 2500 g x durante 30 minutos en LSM (6.2 g de Ficoll y 9.4 g de diatrizoato de sodio por 100 ml) (Organon Technica, NJ). Un método alternativo es la obtención de sangre completa de donantes sanos mediante leucoforesis. Se separaron las PBMC como anteriormente, se resuspendieron en 90% de suero fetal Bovino inactivado por calor y 10% de DMSO, se hicieron alícuotas y se almacenaron en nitrógeno líquido. Después de la descongelación, las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero fetal Bovino inactivado por calor (Intergen, Purchase, NY), piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 3 mM, aminoácidos no esenciales 1 mM, 500 µg/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina, 50 µg/ml de gentamicina (Gibco).

25

30

Respuesta de linfocitos mixtos (MLR): Cultivos mixtos de linfocitos humanos de un solo sentido se establecieron en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pozos 1.5 x 10⁵ de PBMCs de respuesta se co-cultivaron con un número igual de alogénicos irradiados (3000 rads durante 3 minutos, 52 segundos estimulador PBMSc en 200 µl de medio completo. Se adicionaron los antagonistas del LFA-1 al inicio de los cultivos.

35

Los cultivos se incubaron a 37 °C en 5% de CO₂ durante 6 días, luego se pulsaron con de ³H-timidina (6.7 Ci/mmol, NEN, Boston, MA) durante 6 horas. Los cultivos se recogen en un recolector de células Packard (Packard, Canberra, Canada). [³H] TdR se mide por recuento de centelleo líquido. Los resultados se expresan como cuentas por minuto (cpm).

40

Ejemplo 9: Modelo en Conejo para revertir la aparición de ojo seco

El ojo seco se crea en conejos mediante el cierre quirúrgico del conducto excretor de la glándula lagrimal, y permitiendo que los conejos para permanezcan sin tratamiento durante al menos cuatro semanas. Véase Gilbard, JP, 1996 Gilbard, J.P, 1996 " Dry Eye: phramcological approaches, effects, and progress" CLAO J. 22, 141-145. Después de confirmar el ojo seco mediante la prueba de Schirmer, y tinción de la superficie ocular, los antagonistas del LFA-1 de la invención fueron instilados como una solución en concentraciones de 0.01, 0.1, y 1.0% en solución neutra, isotónica estandarizada acuosa. La administración es una gota de 50 microlitros en la superficie ocular hasta 5 veces al día, cada día durante 4 semanas. Los síntomas de ojo seco se controlan una vez a la semana durante 4 semanas y un aumento en las puntuaciones de Schirmer y/o una disminución en la cantidad de tinción de la superficie ocular indican la eficacia del antagonista del LFA-1 en el tratamiento de la enfermedad de ojo seco.

50

Ejemplo 10: Estudio en humanos fase 1

Hasta 56 individuos sanos se inscribieron. Se lleva a cabo un estudio de escala de dosis, aleatorio, controlado, de ambas administraciones únicas y múltiples del antagonista del LFA-1. Se tratan las cohortes de 7 sujetos cada una (5 de tratamiento, 2 placebo) a cada uno de 6-8 niveles de dosis de antagonistas del LFA-1 formulados como soluciones acuosas estériles, neutrales, isotónicas, estandarizadas. Los sujetos reciben una sola administración intraocular en el Día 1. Se obtienen muestras para evaluaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas durante la semana posterior. A partir del día 8,

55

los sujetos reciben la misma dosis de antagonista del LFA-1 al día durante un total de 14 días. Evaluaciones PK/PD, estudios de laboratorio de seguridad, pruebas de Schirmer, tinción corneal y biopsias conjuntivales son evaluadas.

Ejemplo 11: Estudio en humanos fase II

5

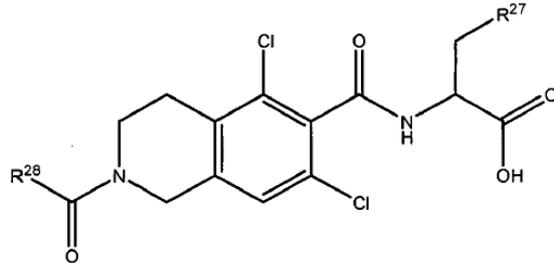
Se inscribieron 150 pacientes adultos con ojo seco como se define por criterio clave de inclusión/exclusión. Los pacientes pueden o no pueden tener el síndrome de Sjogren o enfermedad de Sjogren. Se realizó un ensayo aleatorio y, controlado de búsqueda de dosis, de antagonistas del LFA-1. Tres grupos de pacientes recibieron ya sea Restasis en la dosis etiquetada, o, uno de los dos niveles de dosis del antagonista del LFA-1, formuladas como una solución acuosa neutra, estandarizada, isotónica, diariamente durante doce semanas. Los pacientes son seguidos por seguridad y la evidencia de mejoría en la prueba de Schirmer, tinción corneal y el índice general de gravedad de la enfermedad durante un período de seguimiento de tres meses. Se obtuvieron Biopsias conjuntivales en un subconjunto de pacientes.

10

Reivindicaciones

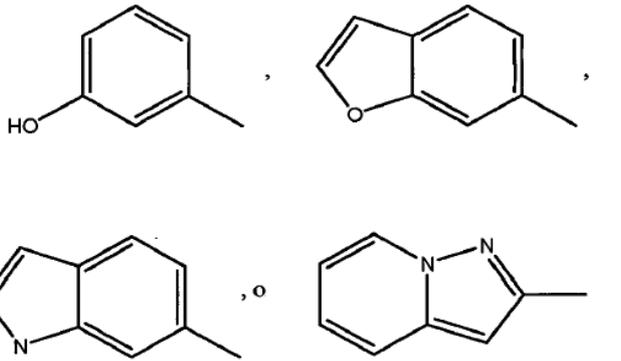
1. Un compuesto para su uso en el tratamiento de la enfermedad de ojo seco, que es un antagonista del antígeno asociado a la función linfocitaria (LFA-1) de la Fórmula II

5



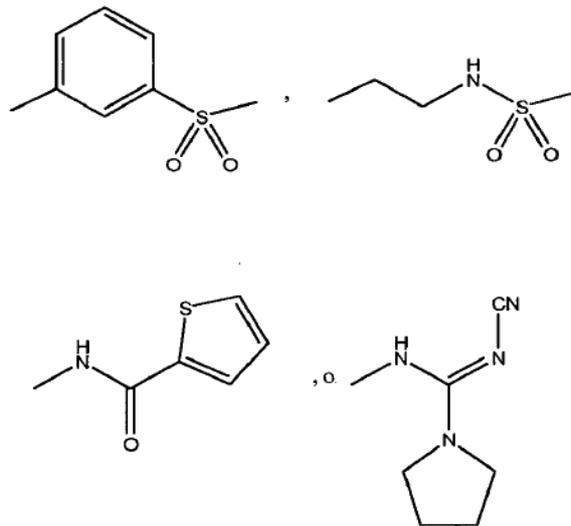
Fórmula II

en donde R²⁸ se selecciona del grupo de



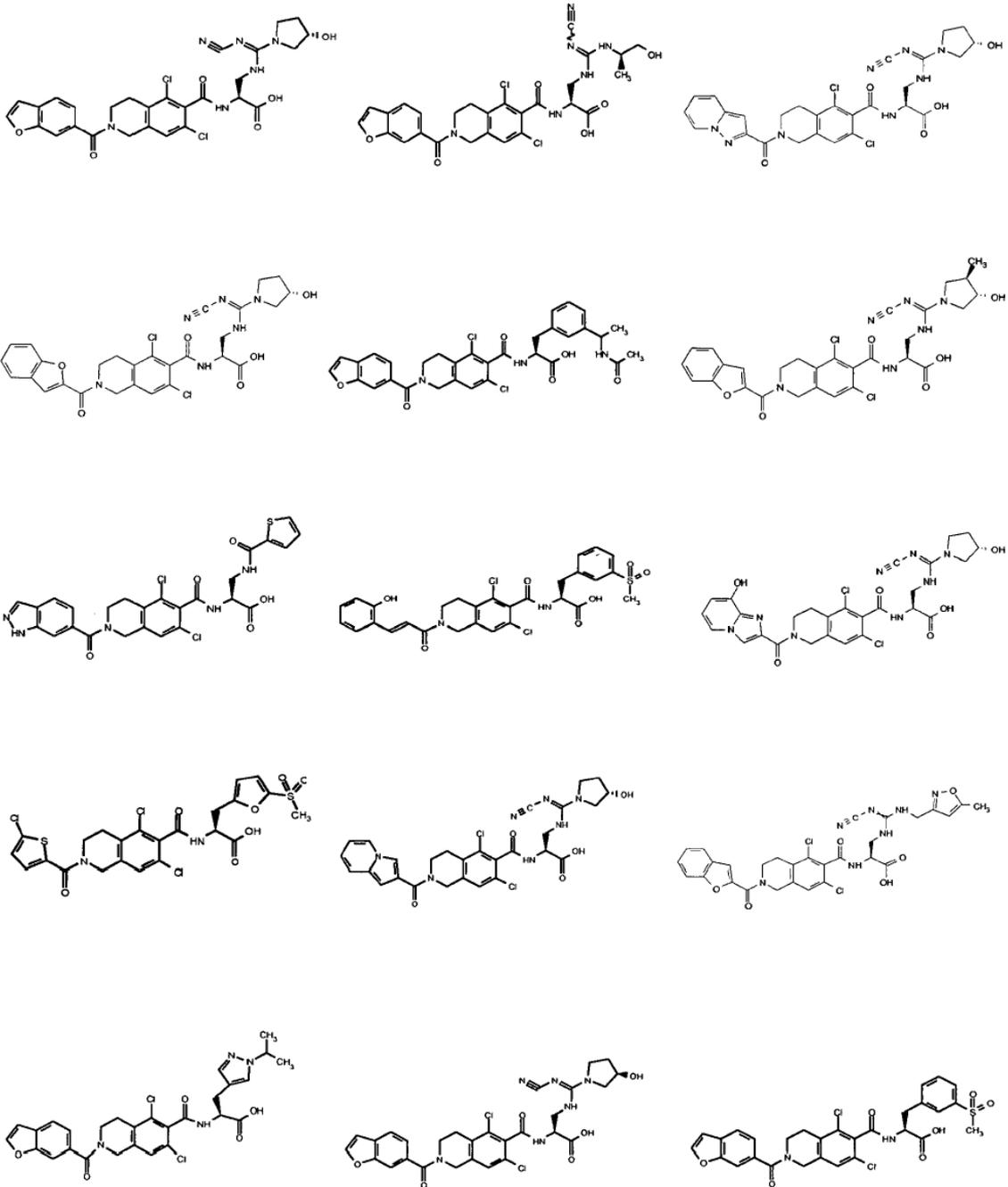
10

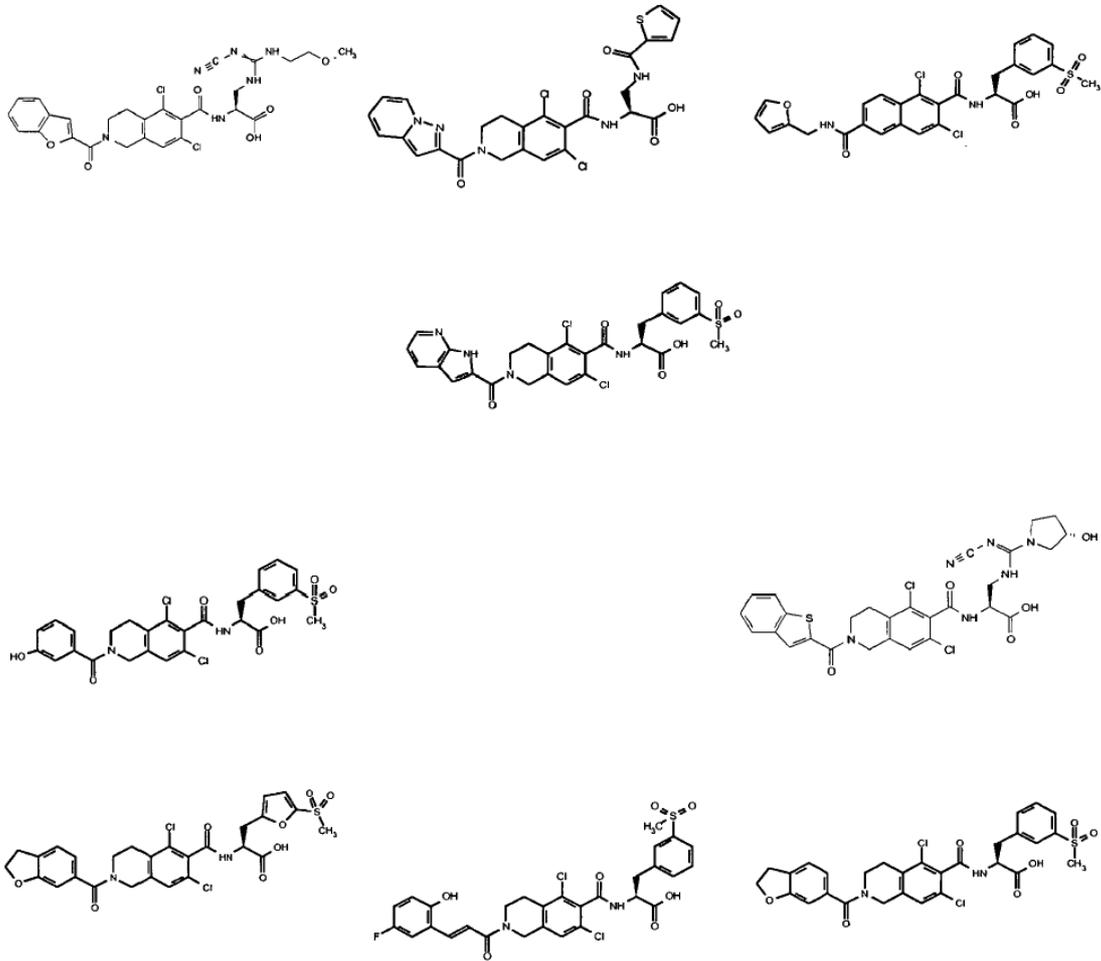
y R²⁷ se selecciona del grupo que consiste en

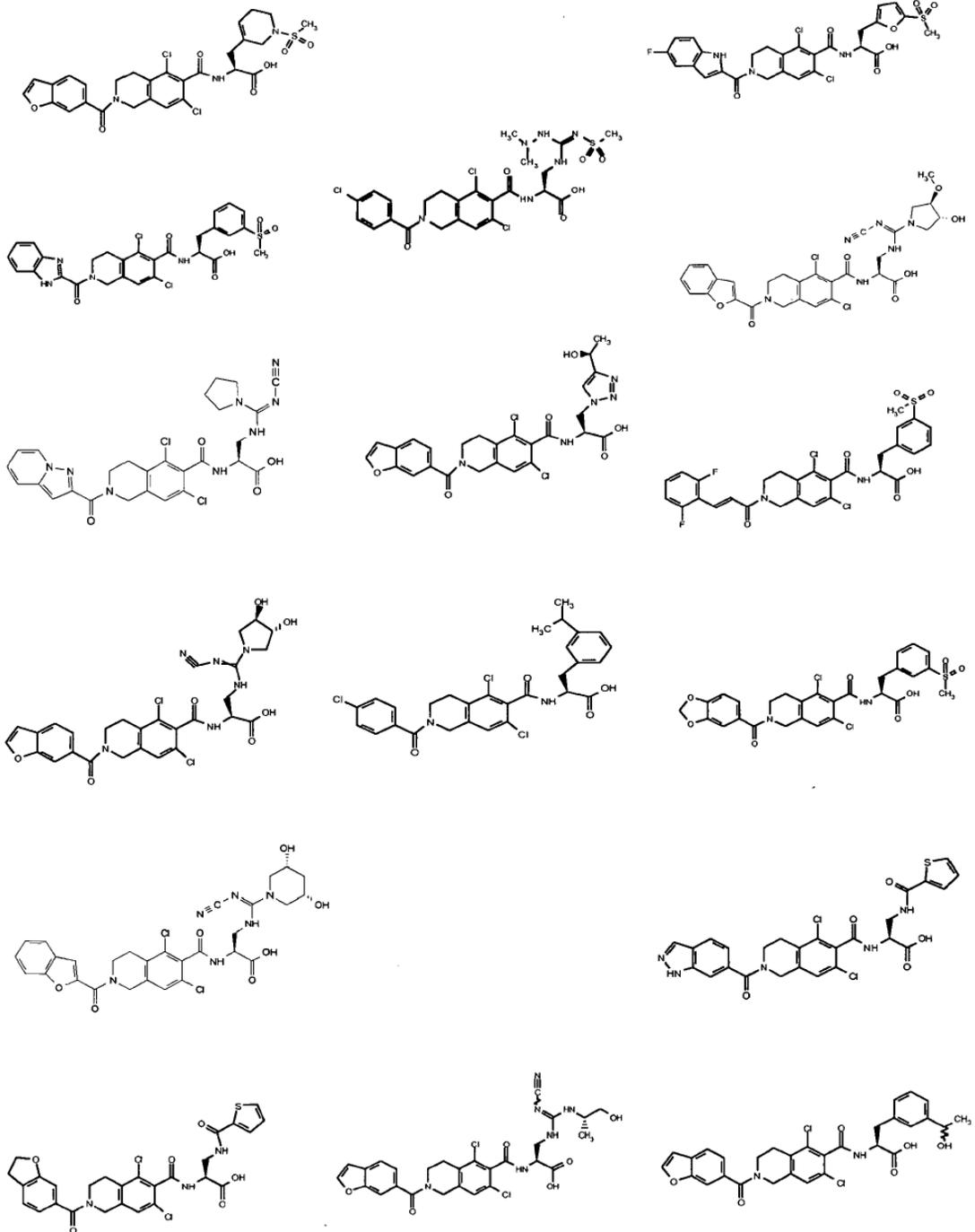


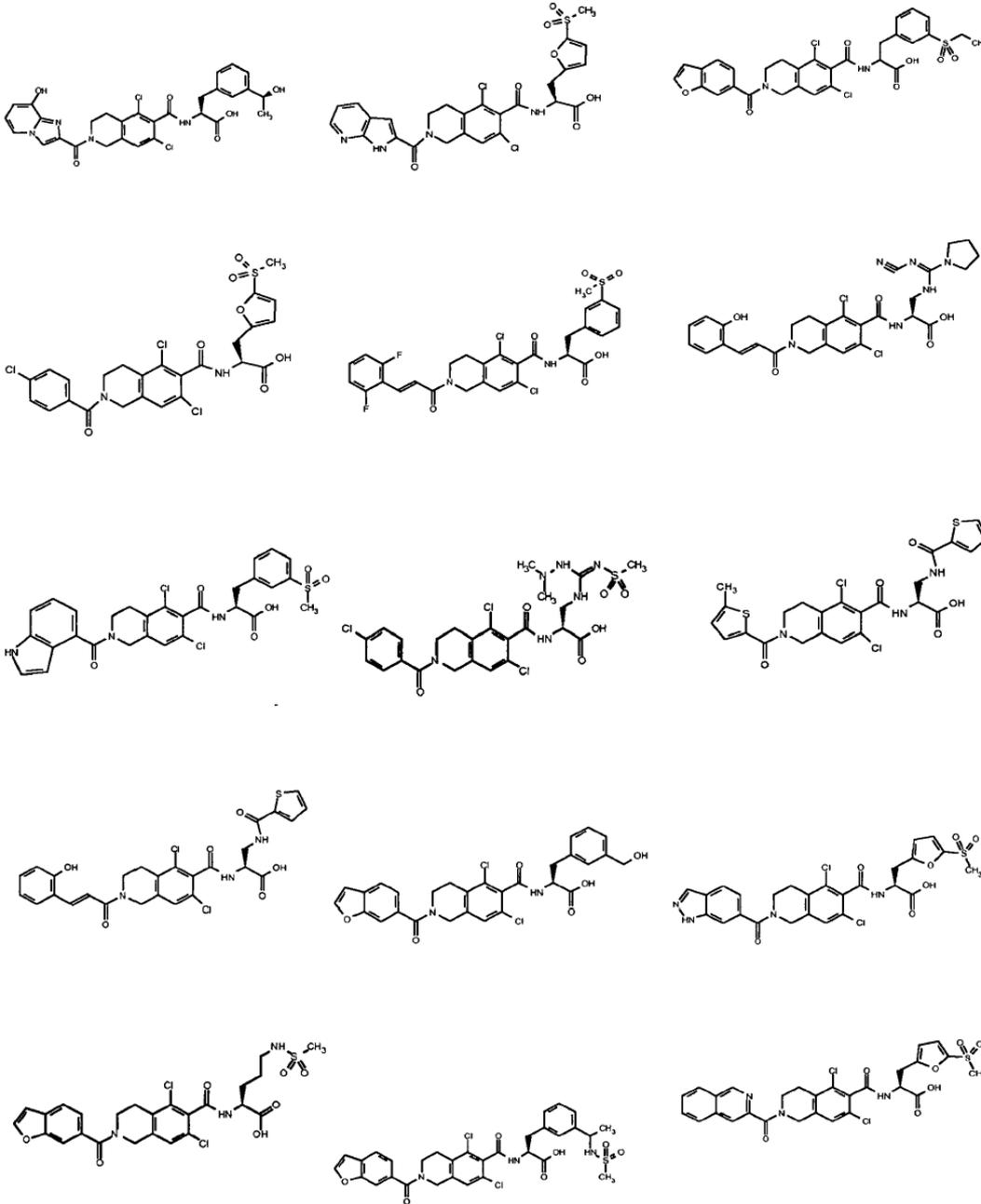
15 y

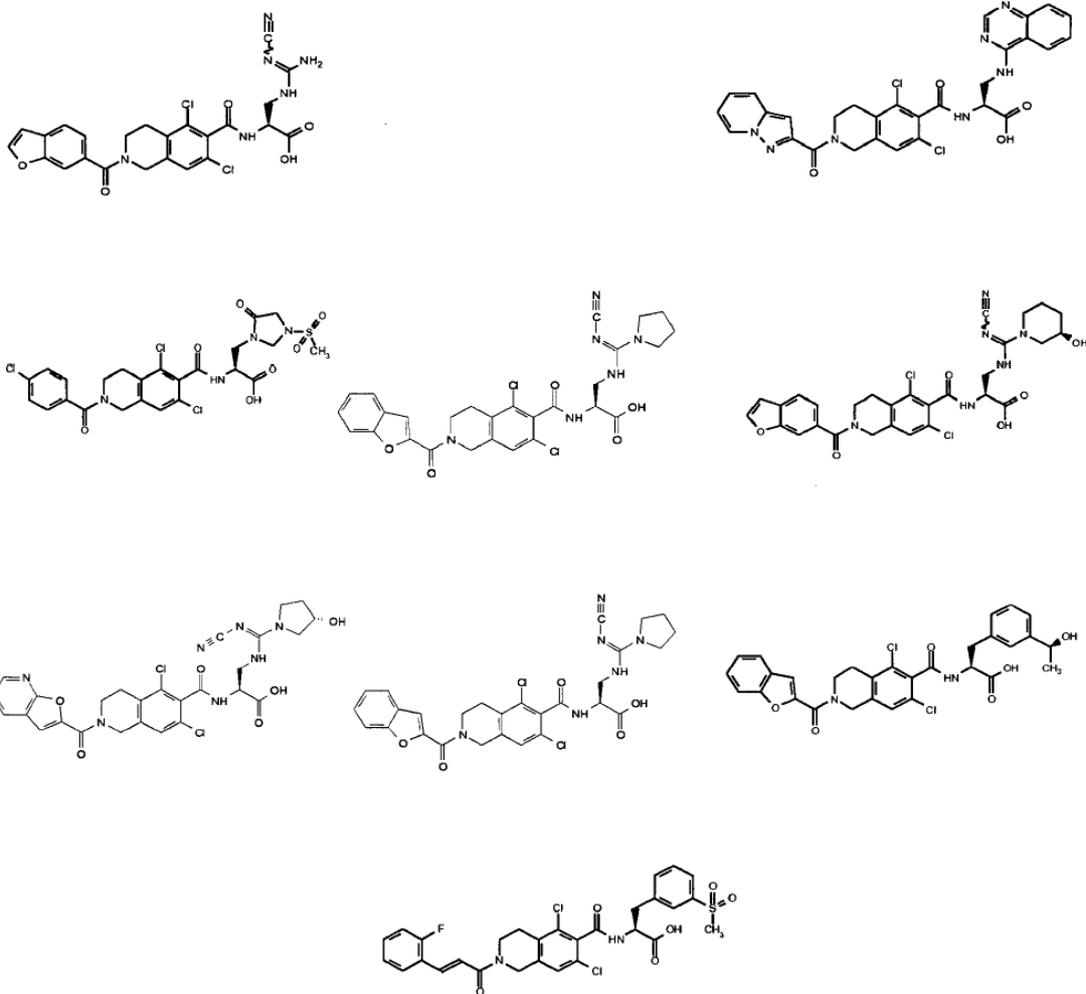
o es de la fórmula:





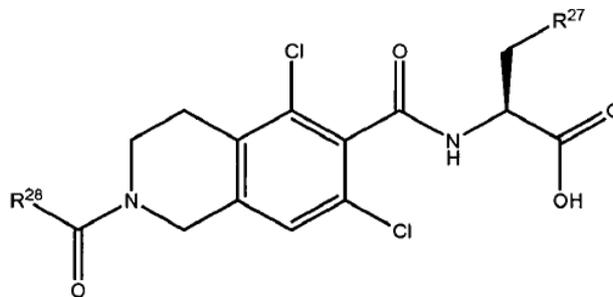






o una sal de este farmacéuticamente aceptable.

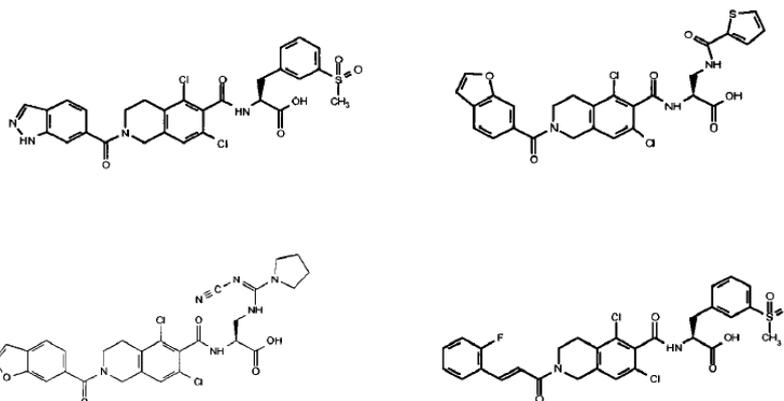
- 5 2. Un compuesto para utilizar como se reivindica en 1, de la fórmula II':



Fórmula II'

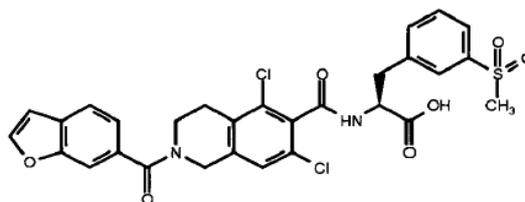
o una sal de este farmacéuticamente aceptable.

- 10 3. Un compuesto para utilizar como se reivindica en la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:



o una sal de este farmacéuticamente aceptable.

- 5 4. Un compuesto para utilizar como se reivindica en la reivindicación 1, de la fórmula:



o una sal de este farmacéuticamente aceptable.

- 10 5. Un compuesto para utilizar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la administración por cualquiera de
- 15 i) administración tópica de dicho compuesto a través de un vehículo portador seleccionado de un grupo que consiste en gotas líquidas, lavado líquido, gel, ungüento, pulverizador, y liposoma, opcionalmente en donde; dicha administración tópica comprende la infusión de dicho compuesto a dicho ojos a través de un dispositivo seleccionado del grupo que consiste en un sistema de bomba-catéter, un dispositivo de liberación continua o selectiva, y una lente de contacto; o
- 20 ii) administración sistémica de una suspensión líquida o líquido de dicho compuesto a través de gotas para la nariz o pulverizador nasal o líquido nebulizado para las vías respiratorias orales o nasofaríngeas de dicho sujeto, de manera que dicho compuesto se pone en contacto con una o más de la glándula lagrimal, el tejido conjuntival, y la superficie ocular de los ojos de dicho sujeto a través de la absorción sistémica y la circulación; o
- 25 iii) administración sistémica de una forma oral de dicho compuesto, de tal manera que dicho compuesto se pone en contacto con uno o más de la glándula lagrimal, el tejido conjuntival, y la superficie ocular de los ojos de dicho sujeto a través de la absorción sistémica y la circulación; o
- iv) una formulación oral de retención gástrica.
- 30 6. Un compuesto para utilizar como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la administración a las superficies oculares de un sujeto para alcanzar concentraciones del mismo de 1×10^{-7} a aproximadamente 1×10^{-1} moles/litro.
- 35 7. Una formulación farmacéutica ocular que comprende un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para utilizar como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en un portador farmacéuticamente aceptable, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
8. Una formulación farmacéutica para utilizar como se reivindica en la reivindicación 7, que comprende además

- i) no contiene conservantes; o
- ii) al menos un conservante; o
- 5 iii) un agente espesante.
9. Una formulación farmacéutica para utilizar como se reivindica en la reivindicación 7, en donde
- 10 i) dicha formulación es apropiada para la administración a través de la instilación, por vía intranasal, tópica, o
- ii) en donde dicha formulación comprende una solución, una suspensión, un ungüento, un paquete, o un inserto ocular.
10. Una formulación farmacéutica para utilizar como se reivindica en la reivindicación 9, en donde dicha formulación comprende un inserto ocular y en donde dicho inserto ocular es un dispositivo de liberación selectiva que libera dicho compuesto continuamente durante un período preseleccionado.
- 15 11. Una formulación farmacéutica para utilizar como se reivindica en la reivindicación 9, en donde dicha formulación es una formulación de liberación controlada que comprende un polímero biocompatible.
- 20 12. Un compuesto para utilizar como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde se ha diagnosticado dicha enfermedad de ojo seco, mediante la realización de una prueba de diagnóstico de ojo seco en el sujeto, opcionalmente en donde dicha prueba de diagnóstico se realiza mediante la formación de imágenes de un ojo de dicho sujeto o el análisis de una muestra biológica de un ojo de dicho sujeto.
- 25 13. Una formulación farmacéutica ocular para utilizar como se reivindica en la reivindicación 7, que comprende el compuesto tal como se establece por la reivindicación 3, a una concentración de 0.1 a 10.0 % w/v, en donde dicha formulación está regulada a pH 7.
- 30 14. Una formulación farmacéutica para su uso como se reivindica en la reivindicación 13, en donde dicha formulación comprende uno o más de fosfato monohidrógeno de sodio y fosfato dihidrógeno de sodio como soluciones reguladoras, y en donde dicha formulación comprende opcionalmente metilparabeno y/o propilparabeno como conservantes.
- 35 15. Una formulación farmacéutica para utilizar como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, en donde dicha formulación está adaptada para ser administrada como una gota oftálmica tópica una a cuatro veces al día, opcionalmente dos veces al día.
16. Una formulación farmacéutica para utilizar como se reivindica en la reivindicación 15, en donde las gotas son de 10 a 60 microlitros.
- 40 17. Una formulación farmacéutica para utilizar como se reivindica en la reivindicación 16, en donde las gotas son de 20 a 50 microlitros.

Tráfico de Leucocitos a través del Endotelio Vascular

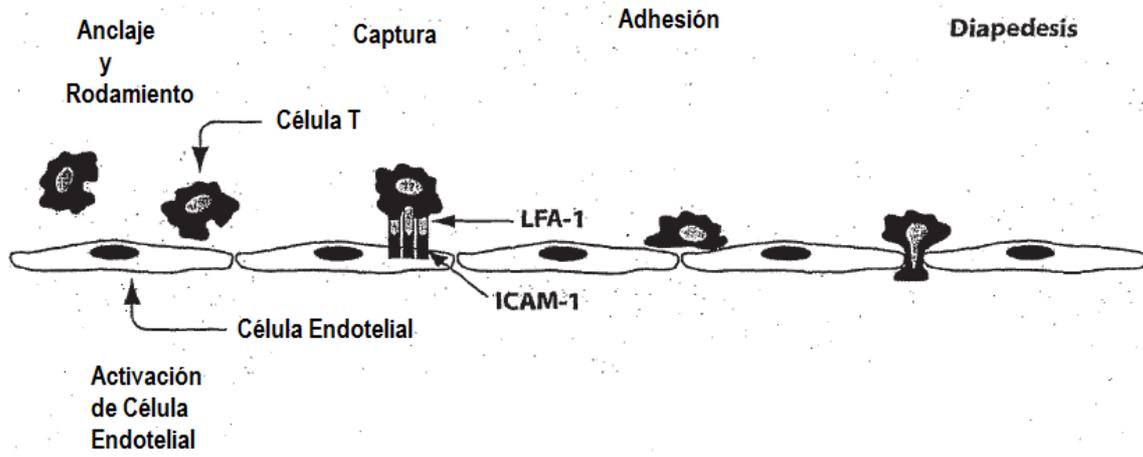
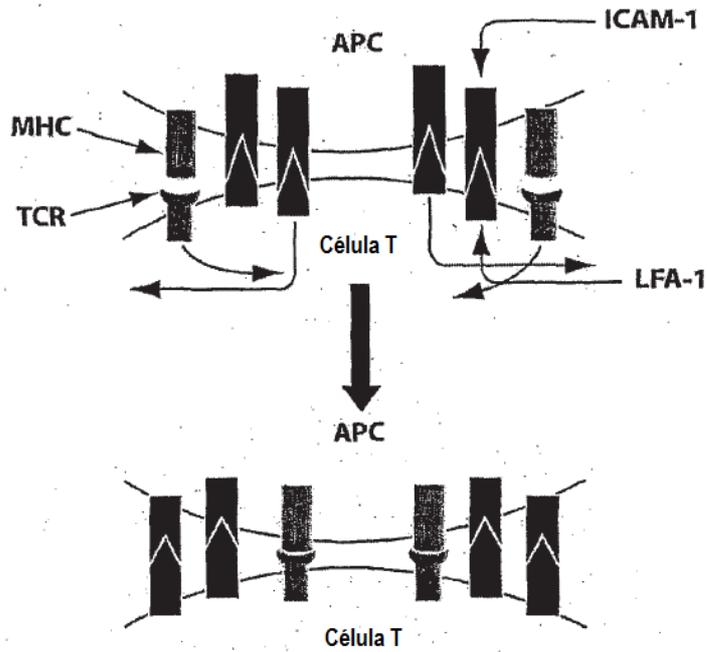
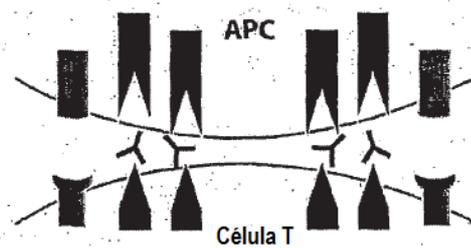


FIGURA 1

Interacción de la formación de sinapsis inmunológica del LFA-1



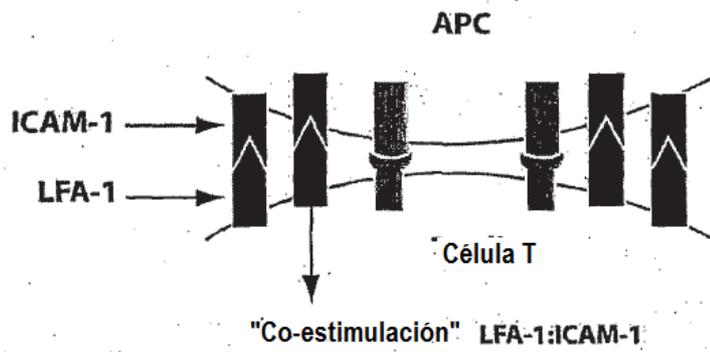
Formación de Sinapsis Inmunológica



Inhibición de Formación de Sinapsis Inmunológica apropiada via inhibición de LFA-1

FIGURA 2

Interacción de LFA-1 con Co-estimulación de ICAM



Co-estimulación

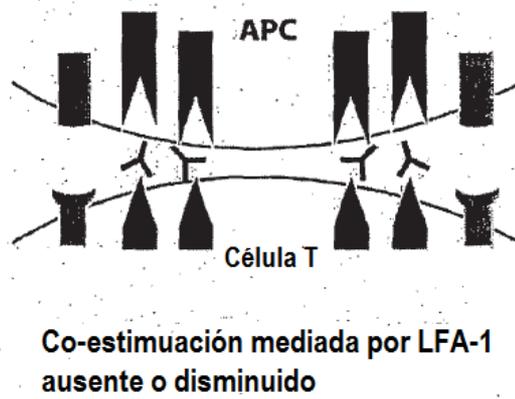
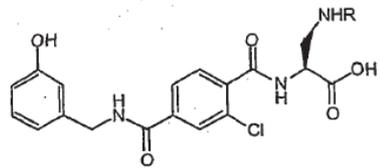
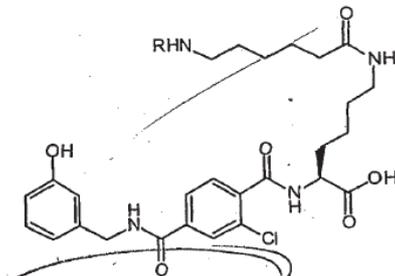


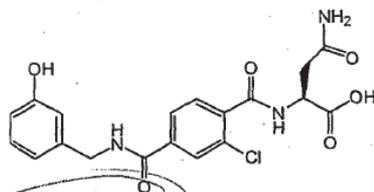
FIGURA 3



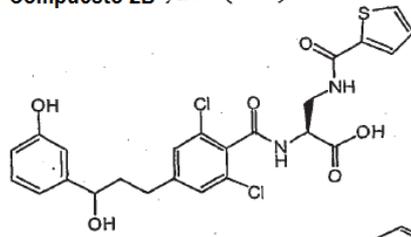
Compuesto 1, R = (C=S)NH-Fluoresceína



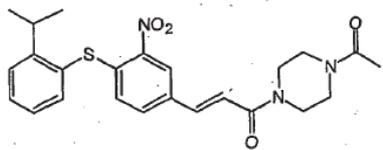
Compuesto 2A, R = H
Compuesto 2B, R = (C=S)NH-Fluoresceína



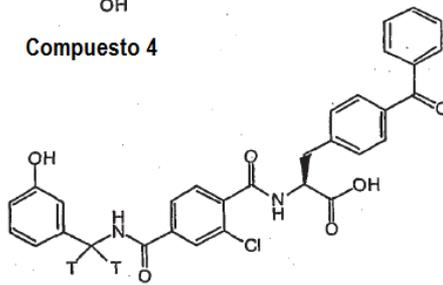
Compuesto 3



Compuesto 4



A-286982



Compuesto 5

FIGURA 4

Tabla 1. Dependencia de catión de las afinidades de antagonistas de molécula pequeña para LFA-1

Antagonista	Cationes Divalentes	K _i (nM)	K _d (nM)
Compuesto 3	CaCl ₂ + MgCl ₂	95	
	MnCl ₂	3.2	
Compuesto 4	CaCl ₂ + MgCl ₂	6.0	
	MnCl ₂	0.58	
ICAM-1-Ig ¹	CaCl ₂ + MgCl ₂	~ 2700	
	MnCl ₂	~ 600	
Compuesto 1	CaCl ₂ + MgCl ₂		24
	MnCl ₂		0.77

FIGURA 5

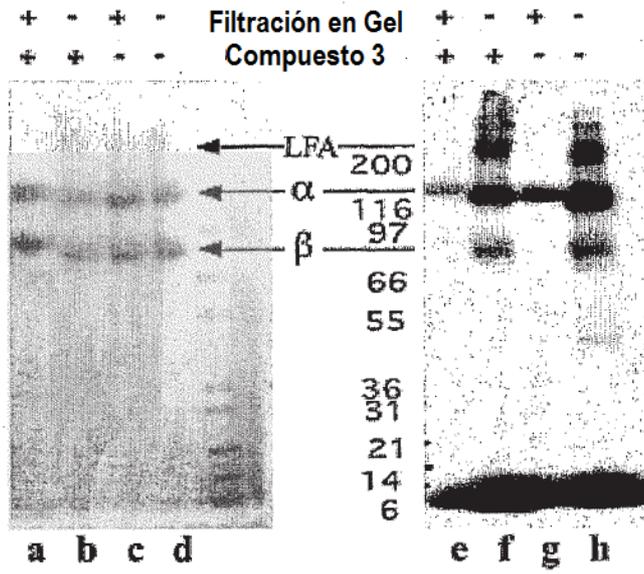


FIGURA 6

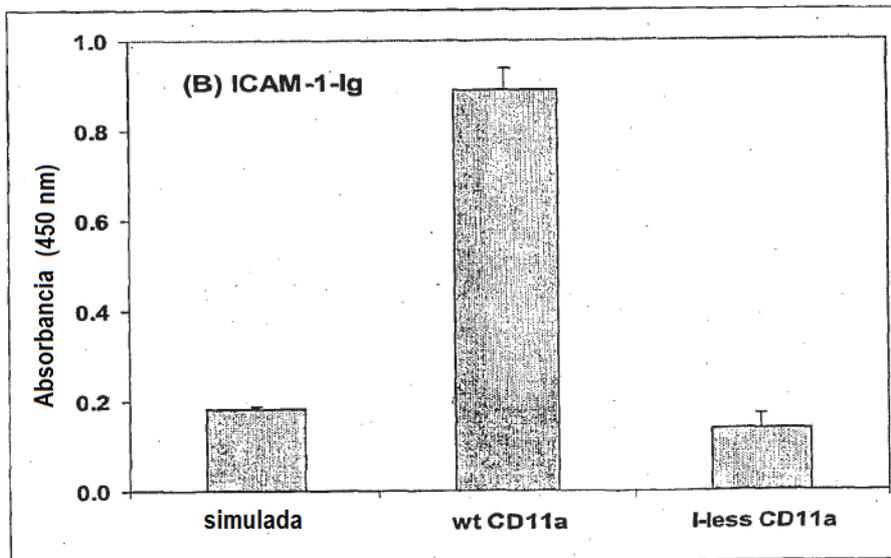
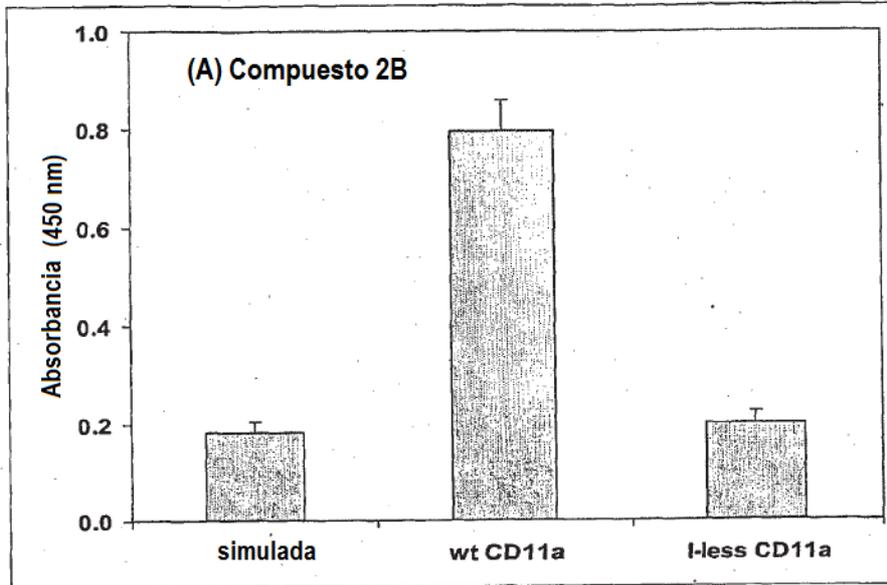


FIGURA 7

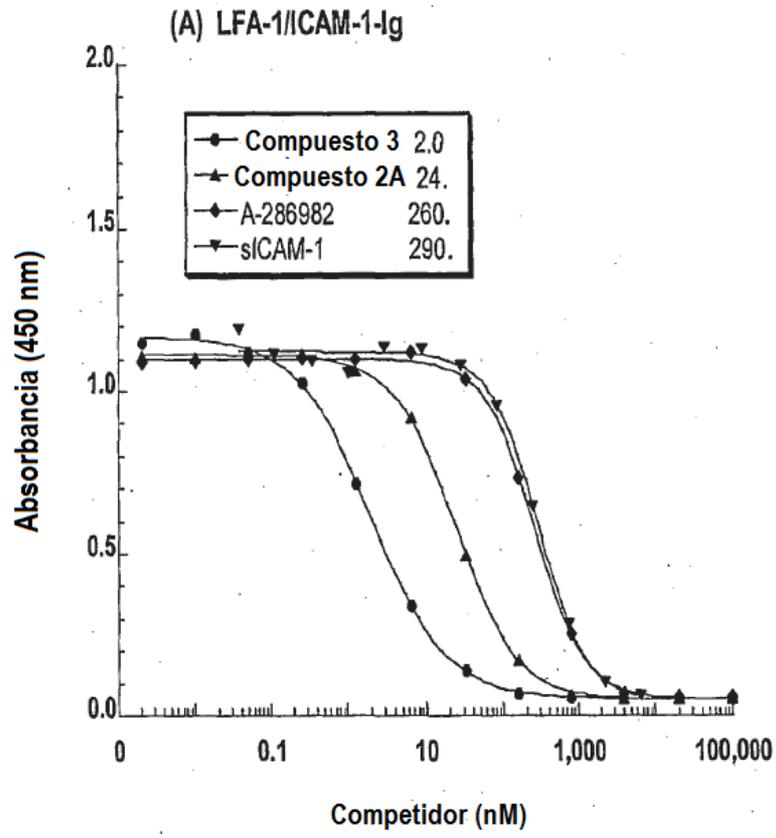


FIGURA 8

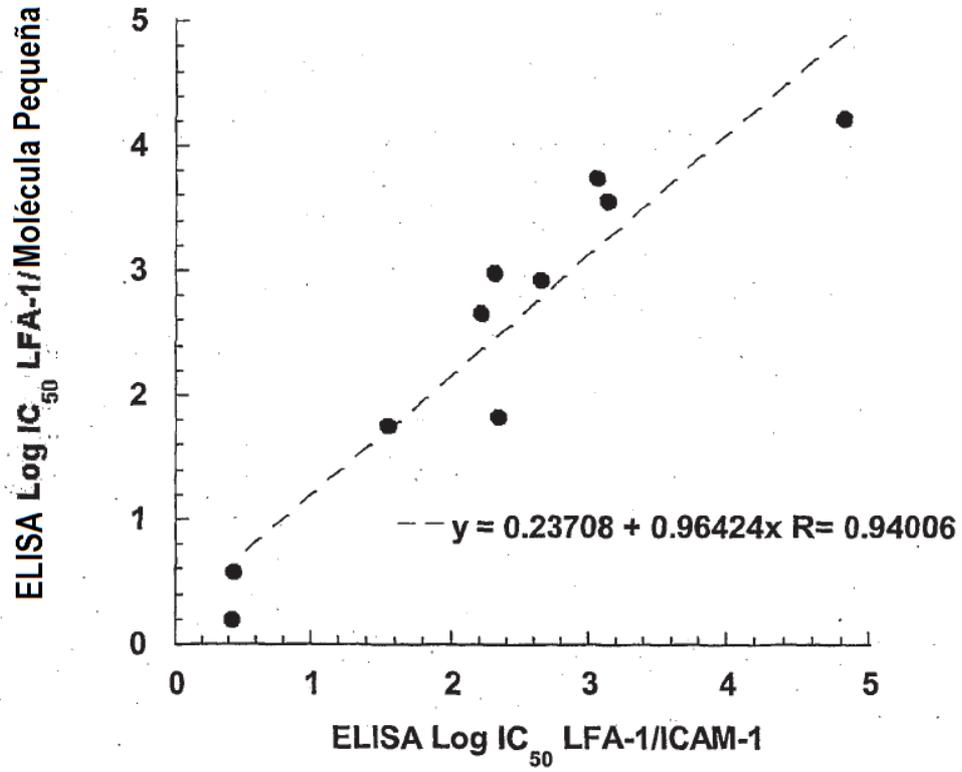


FIGURA 9

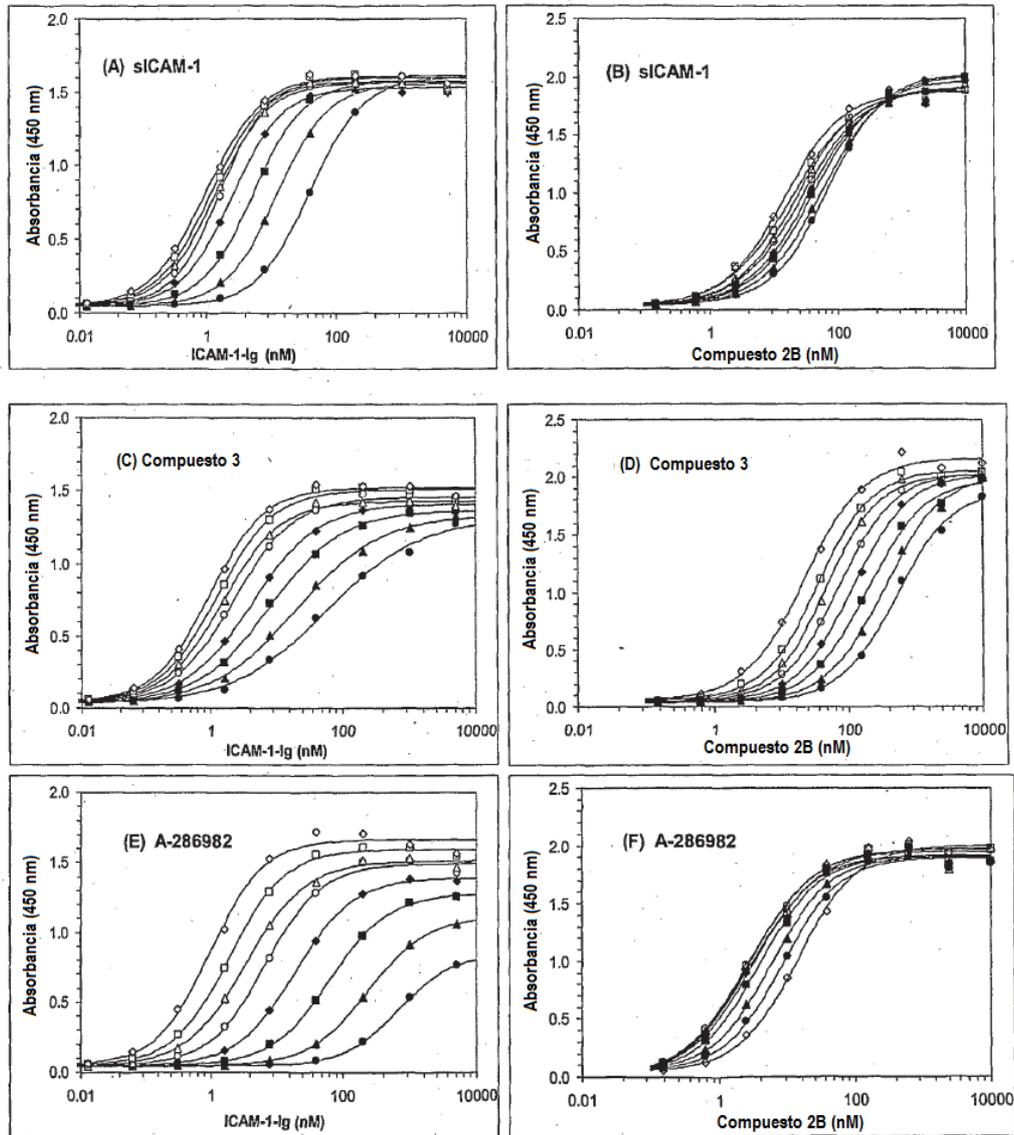


FIGURA 10

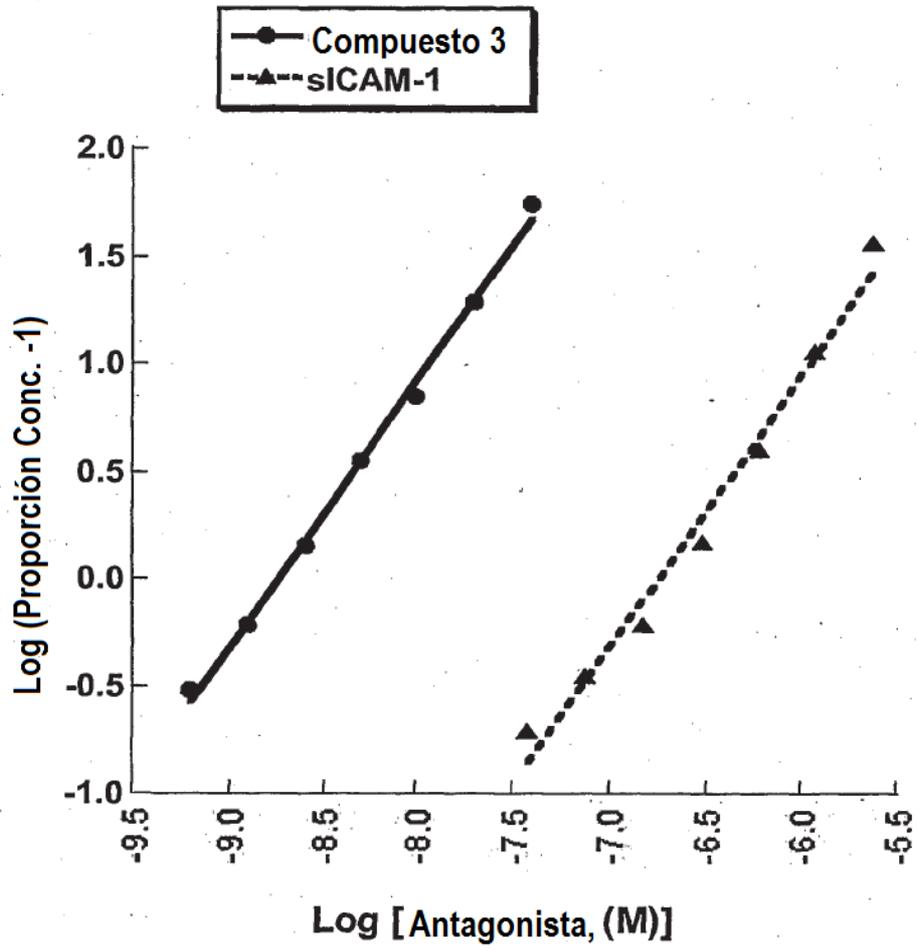


FIGURA 11

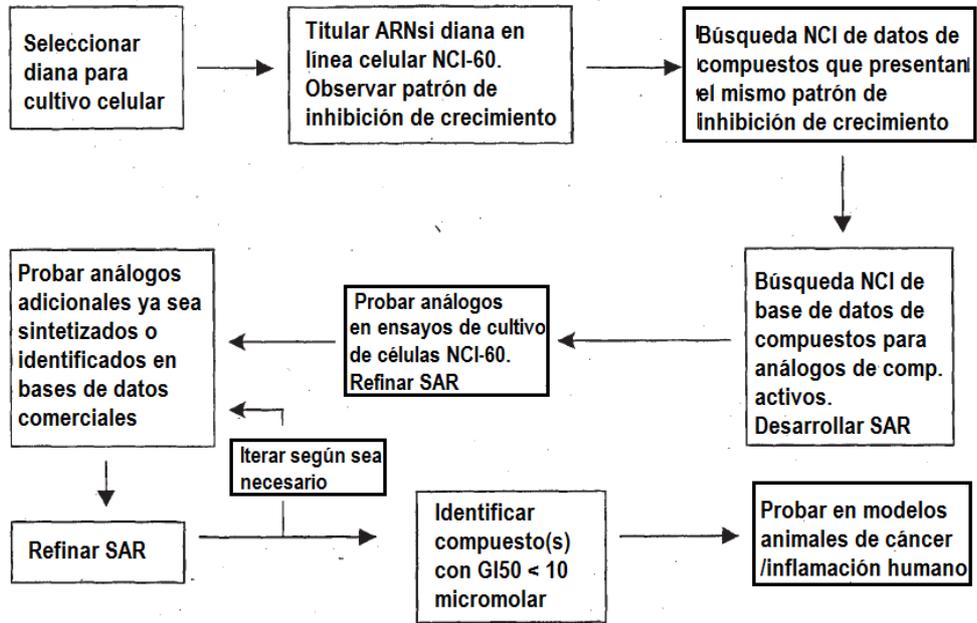


FIGURA 12