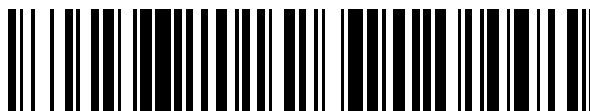


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 761**

51 Int. Cl.:

C07D 271/06 (2006.01)

C07D 401/04 (2006.01)

C07D 413/04 (2006.01)

C07D 413/14 (2006.01)

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/41 (2006.01)

A01N 43/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2009 E 09762826 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2291080**

54 Título: **Nuevos moduladores de los receptores de esfingosina fosfato**

30 Prioridad:

14.05.2008 US 127603

14.05.2009 US 465767

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

02.11.2015

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
10550 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**ROBERTS, EDWARD;
ROSEN, HUGH;
BROWN, STEVEN;
GUERRERO, MIGUEL A.;
PENG, XUEMEI y
PODDUTOORI, RAMULU**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 549 761 T3

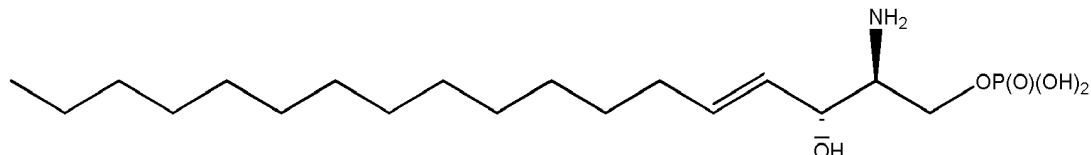
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Nuevos moduladores de los receptores de esfingosina fosfato

Antecedentes

La esfingosina-1-fosfato (S1P), cuya estructura se muestra a continuación, es un fosfolípido con una amplia gama de actividades biológicas, en particular, implicadas en la señalización celular.



Por ejemplo, la S1P modula la proliferación celular, tal como las células epidérmicas. La bioactividad de la S1P está mediada por múltiples subtipos de receptores. Por ejemplo, los receptores de los subtipos 1 y 3, (S1P1 y S1P3, respectivamente) se expresan ambos en las células endoteliales y desempeñan un papel en las funciones del pulmón y endoteliales linfoides. Por lo tanto, los agonistas de receptores, tales como los agonistas de S1P1, podrían ser de valor en el tratamiento de enfermedades tales como esclerosis múltiple, rechazo de trasplantes y el síndrome disneico agudo del adulto. La estimulación agonista del receptor S1P1 está modulada por la degradación del receptor. La estimulación del ligando induce la fosforilación, internalización, poliubiquitinación y degradación del receptor (González-Cabrera, Hla y col., 2007).

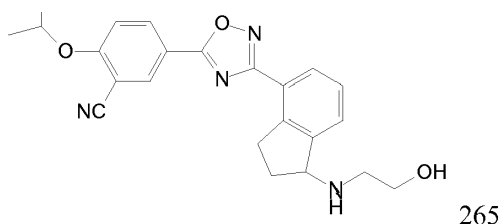
Los oxadiazoles y oxazoles se han descrito para su uso como ligandos del receptor de la esfingosina-1-fosfato, véase, por ejemplo las publicaciones de solicitud de patente PCT números WO2006/131336, WO2008/037476 and WO2008/074821.

El documento WO2005/058848 divulga carboxilatos (3,4-disustituídos)propanoicos (EDG) como receptores de S1P. PEDRO J GONZALEZ-CABRERA Y COL.,: MOLECULAR PHARMACOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, US, vol. 74, nº 5, 1 Noviembre 2008 divulga la eficacia farmacológica de un agonista de S1P(1) que no requiere interacciones del grupo de cabeza de tipo S1P.

Sumario

La presente invención está dirigida a compuestos heterocíclicos adaptados para actuar como agonistas del subtipo 1 del receptor de S1P, S1P1.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula 265 o una sal, profármaco, tautómero, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo:



En diversas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un excipiente adecuado.

En varias combinaciones se proporciona una combinación farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un segundo medicamento. En diversas realizaciones el segundo medicamento está médicamente indicado para el tratamiento de la esclerosis múltiple, rechazo de trasplantes, o el síndrome disneico agudo del adulto.

También se describe el uso de un compuesto de fórmula 265 para la preparación de un medicamento adaptado para el tratamiento de un trastorno o afección en el que mal activación o inhibición de un receptor de esfingosina-1-fosfato de subtipo 1 está indicado médicamente. También se describe la activación, agonismo, inhibición o antagonismo de un receptor de esfingosina-1-fosfato subtipo 1 que comprende poner en contacto el receptor de subtipo 1 con una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula 265 o una sal, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo:

El compuesto anterior activa o agoniza, o inhibe o antagoniza, el receptor de la esfingosina-1-fosfato subtipo 1 en un grado mayor que el compuesto que activa o agoniza, o inhibe o antagoniza, otro subtipo de receptor de esfingosina-1-fosfato, por ejemplo un receptor de esfingosina-1-fosfato de subtipo 3.

En diversas realizaciones se proporciona un compuesto de fórmula 265 para su uso en el tratamiento de una afección en un paciente para el que la activación o agonismo o inhibición o antagonismo de un receptor de S1P1 está indicado médicamente, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto como se ha mostrado anteriormente al paciente para proporcionar una efecto beneficioso.

- 5 La activación selectiva o agonismo de un receptor de S1P1, tal como con respecto a un receptor S1P3, está indicado médicamente. En diversas realizaciones, la enfermedad comprende esclerosis múltiple, rechazo de trasplantes, o síndrome disneico agudo del adulto. Adicionalmente, la inhibición selectiva o antagonismo de un receptor de S1P1 está médicamente indicada, por ejemplo, con respecto a un receptor S1P3.

Breve descripción de las figuras

- 10 La Figura 1 muestra los resultados de un bioensayo, tal como se describe en los Ejemplos, para la activación S1P1, que implica la detección de la ubiquitinación que es una consecuencia de la activación de S1P1. Lisados celulares HEK 293-S1P1-GFP se inmunoprecipitaron (IP) y se sometieron a inmunotransferencia (IB) con anticuerpos P4D1(anti-ubiquitina) para detectar la ubiquitinación de S1P1. A. La ubiquitinación de S1P1 se detectó como una banda que corre entre 64 y 82 kDa (carril 1 vehículo control, carril 2, AFD-R 0,5 uM, Carril 2
- 15 control del vehículo para SR-917, carril 4, SR917 1 uM). B. Localización celular de S1P1-GFP con Veh (control del vehículo, 0,01, 0,1 y 1 uM de SR-917. C. Las células S1P1-GFP se marcaron con P32 y estimularon con agonista. S1P1-GFP se inmunoprecipitó, se resolvió mediante PAGE, se transfirió a nitrocelulosa y se expuso a una película Kodak XAR durante la noche. Carril 1, control del vehículo, carriles 2 y 3, S1P a 0,5 y 0,05 uM, carriles 4 y 5, AFD-R a 0,5 y 0,05 uM, carriles 6 y 7 SR-917 en 10 y 1 uM. SR-917 es un agonista conocido del
- 20 receptor S1P1, se indexaron en el NIH Molecular Libraries Small Molecule Repository (MLMSR). La ID del compuesto es 976135. Está disponible comercialmente en ChemBridge Screening Library.
- La Figura 2 muestra que el compuesto de referencia **32** induce de forma sólida la internalización y poliubiquitinación, y estos efectos son bloqueados por el antagonista de S1P1, W146R.
- La Figura 3 muestra que el compuesto de referencia 236, al igual que otros compuestos de la serie, induce poliubiquitinación de S1P1.
- 25 La Figura 4 muestra que el compuesto de referencia **236** induce linfopenia en ratones. El compuesto se disolvió en DMSO al 10%, Tween-20 y se administró mediante sonda nasogástrica.
- La Figura 5 muestra un estudio farmacocinético de 1 mg/ml de SR-917 en 10/10/80 DMSO/Tween/ agua liberada a 1 mg / kg i.v.
- 30 La Figura 6 muestra mutaciones en el bolsillo de unión al ligando polar de S1P1. Las células CHO se transfectaron con construcciones de ADNc de S1P1. Se privó a las células de suero durante la noche y se estimularon con diluciones seriadas 3 veces de S1P o de CYM-5442. Se detectó fosforilación de ERK1/2 con el ELISA Phospho-ERK (Cell Signaling). A. Mutantes de S1P1 E121A y R292A. B. S1P1 de tipo salvaje (sv) y mutantes de S1P1 R120A.

Descripción detallada

Como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "uno", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

- 40 Como se usa en el presente documento, "individuo" (como en el sujeto del tratamiento) significa mamíferos y no mamíferos. Los mamíferos incluyen, por ejemplo, seres humanos; primates no humanos, por ejemplo, simios y monos; ganado vacuno; caballos; ovejas; y cabras. No mamíferos incluyen, por ejemplo, peces y aves.

El término "S1P1" tal como se utiliza en el presente documento se refiere al subtipo 1 de un receptor de esfingosina-1-fosfato, mientras que otros subtipos del receptor de la esfingosina-1-fosfato se denominan de manera correspondiente, por ejemplo, el subtipo 3 del receptor de esfingosina-1-fosfato se denomina "S1P3".

- 45 Un "receptor", como es bien conocido en la técnica, es una entidad biomolecular que generalmente comprende una proteína que se une específicamente a una clase estructural de ligandos o un solo ligando nativo en un organismo vivo, cuya unión hace que el receptor transduzca la señal de unión señal a otro tipo de acción biológica, tal como señalizar a una célula que se ha producido un evento de unión, lo que hace que la célula altere su función de alguna manera. Un ejemplo de transducción es la unión al receptor de un ligando que causa la alteración de la actividad de una "proteína G" en el citoplasma de una célula viva que está acoplada al receptor. Cualquier molécula, de origen
- 50 natural o no, que se une a un receptor y lo activa para la transducción de la señal, se conoce como un "agonista" o "activador". Cualquier molécula, de origen natural o no, que se une a un receptor, pero no causa la transducción de señal y que puede bloquear la unión de un agonista y su consiguiente transducción de señal, se conoce como "antagonista".

- 55 Un "compuesto S1P1" o "agonista de S1P1" o "activador de S1P1" o "inhibidor de S1P1" o "antagonista de S1P1" como las expresiones que se usan en el presente documento, se refieren a compuestos que interaccionan de algún modo con el subtipo 1 de receptor de S1P. Pueden ser agonistas o activadores, o pueden ser antagonistas o inhibidores. Un "compuesto S1P1" de la invención puede ser selectiva para la acción sobre el subtipo 1 de la familia de receptores S1P; por ejemplo, un compuesto de la invención puede actuar a una concentración menor del subtipo

1 de la familia de receptores S1P que en otros subtipos de la familia de receptores S1P; más específicamente, un "compuesto S1P1" de la invención puede actuar selectivamente sobre los receptores de subtipo 1 en comparación con su acción sobre el subtipo 3, o receptores "S1P3".

En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención son agonistas ortostáticos. En otras ciertas realizaciones, los compuestos de la invención son agonistas alostéricos. Los agonistas de los receptores pueden clasificarse como ortostáticos o alostéricos. Un agonista ortostático une a un sitio en el receptor que se solapa significativamente con la unión del ligando natural y replica las interacciones clave del ligando natural con el receptor. Un agonista ortostático activará el receptor por un mecanismo molecular similar al del ligando natural, será competitivo para el ligando natural, y será antagonizado competitivamente por agentes farmacológicos que son antagonistas competitivos para el ligando natural. Un agonista alostérico se une a un sitio en el receptor que hace que algunas interacciones significativas no solapen total o parcialmente con el ligando natural. Los agonistas alostéricos son verdaderos agonistas y potenciadores no alostéricos. Por consiguiente, activan la señalización en el receptor solo y sin un requisito para una concentración submáxima del ligando natural. Los agonistas alostéricos pueden identificarse cuando un antagonista que se sabe que es competitivo para el ligando ortostático muestra antagonismo no competitivo. El sitio del agonista alostérico también puede mapearse por mutagénesis del receptor. La introducción de mutaciones puntuales individuales en los receptores que retienen la activación del receptor por agonista alostérico, al tiempo que disminuyen o anulan la señalización inducida por un agonista ortostático o viceversa proporciona evidencia formal para las diferencias en las interacciones de unión. Los agonistas ortostáticos pueden desestabilizar una estructura GPCR ("receptor acoplado a proteína G") y la conformación, al tiempo que los agonistas alostéricos pueden estabilizar o desestabilizar la estructura y la conformación de la GPCR. Los agonistas alostéricos, en virtud de sus diferentes interacciones con el receptor, pueden ser farmacéuticamente útiles porque el sitio alostérico puede conferir oportunidades adicionales para la potencia agonista y la selectividad dentro de una familia relacionada de subtipos de receptores que comparten un ligando ortostático similar. Además, el sitio alostérico puede requerir propiedades físicas y químicas muy diferentes de un agonista en comparación con el ligando ortostático. Estas propiedades físico-químicas, que incluyen hidrofobicidad, aromaticidad, distribución de carga y solubilidad, también pueden proporcionar ventajas en la generación de agonistas de perfiles variables farmacocinéticos, de biodisponibilidad oral, de distribución y metabolismo que faciliten el desarrollo de sustancias farmacéuticas eficaces.

"Sustancialmente" como el término se usa en el presente documento, significa completamente o casi completamente; por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de un componente o bien no tiene nada del componente o contiene una cantidad tan escasa que cualquier propiedad funcional pertinente de la composición no se ve afectada por la presencia de la cantidad traza; o un compuesto que es "sustancialmente puro" solo tiene presentes restos insignificantes de impurezas.

"Tratar" o "tratamiento" en el sentido en el presente documento se refiere a un alivio de los síntomas asociados con un trastorno, afección o enfermedad, o la inhibición de la progresión o empeoramiento adicional de esos síntomas, o la prevención o profilaxis del trastorno, afección o enfermedad.

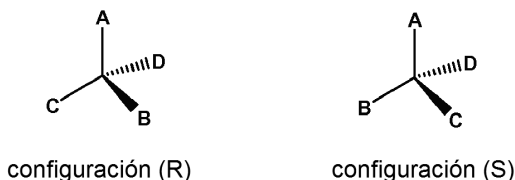
La expresión "cantidad eficaz", cuando se usa para describir el uso de un compuesto de la invención en la administración de terapia a un paciente que padece un trastorno o afección mediada por un receptor de esfingosina-1-fosfato de subtipo 1 se refiere a la cantidad de un compuesto de la invención que es eficaz para unirse como un agonista o como un antagonista de un receptor S1P1 en los tejidos del individuo, en el que el receptor S1P1 está implicada en el trastorno, en el que dicha unión se produce en un grado suficiente para producir un efecto terapéutico beneficioso sobre el paciente. Del mismo modo, como se utiliza en el presente documento, una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto de la invención se refiere a una cantidad del compuesto que alivia, en su totalidad o en parte, los síntomas asociados con el trastorno o afección, o detiene o ralentiza la progresión o empeoramiento adicional de los síntomas, o previene o proporciona profilaxis para el trastorno o afección. En particular, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado actuando como agonista o activador de la actividad del receptor de subtipo 1 de la esfingosina-1-fosfato (S1P1). Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una con la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de los compuestos de la invención es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Por ejemplo, en el contexto de tratar una afección mediada por la activación de S1P1, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de S1P1 de la invención es una cantidad suficiente para controlar la afección, para mitigar el progreso de la afección o aliviar los síntomas de la afección. Ejemplos de afecciones que pueden tratarse de este modo incluyen esclerosis múltiple, rechazo de trasplantes, y síndrome disneico agudo del adulto.

Se pretenden todas las formas quirales, diaestereoméricas, racémicas de una estructura, a menos que se indique específicamente la estereoquímica o forma isomérica específica. Los compuestos usados en la presente invención pueden incluir isómeros ópticos enriquecidos o resueltos en cualquiera o en todos los átomos asimétricos como son evidentes a partir de las representaciones, en cualquier grado de enriquecimiento. Las mezclas tanto racémicas como diastereoméricas, así como los isómeros ópticos individuales se pueden aislar o sintetizar de modo que estén sustancialmente libres de sus parejas enantioméricas o diaestereoméricas, y estas entran todas ellas dentro del alcance de la invención.

Isomería en compuestos de la invenciónIsomería óptica

Se entenderá que cuando los compuestos de la presente invención contienen uno o más centros quirales, los compuestos de la invención pueden existir en, y pueden aislarse como, formas enantioméricas o diastereoméricas, o como una mezcla racémica. Por lo tanto, la presente invención incluye cualquier posible enantiómero, diastereoisómero, racemato o mezclas de los mismos de los compuestos de la invención, que son biológicamente activos en el tratamiento de enfermedades mediadas por S1P1,

Los isómeros resultantes de la presencia de un centro quiral comprenden un par de isómeros no superponibles que se denominan "enantiómeros." Los enantiómeros individuales de un compuesto puro son ópticamente activos, es decir, son capaces de rotar el plano de luz polarizada del plano. Los enantiómeros simples son designados de acuerdo al sistema *Cahn-Ingold-Prelog*. Una vez que se determina la clasificación de prioridad de los cuatro grupos, la molécula se orienta de manera que el grupo de clasificación inferior se dirija lejos del visor. Después, si el orden de clasificación descendente de los otros grupos procede en sentido de las agujas del reloj, la molécula se designa (*R*) y si la clasificación descendente de los otros grupos procede en sentido contrario a las agujas del reloj, la molécula se designa (*S*). En el ejemplo del Esquema 14, la clasificación de *Cahn-Ingold-Prelog* es $A > B > C > D$. El átomo de clasificación inferior, D está orientado lejos del visor.



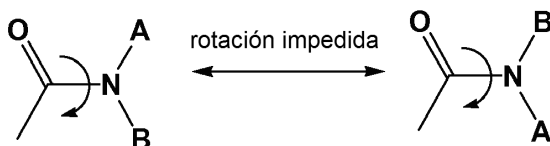
La presente invención pretende incluir diastereómeros, así como sus formas racémicas y resueltas, diastereomérica y enantioméricamente puras y sales de los mismos. Los pares diastereoméricos pueden resolverse mediante técnicas de separación conocidas, incluyendo cromatografía de fase normal e inversa y cristalización.

"Isómero óptico aislado" o "enantiómero aislado" se refieren a un compuesto que se ha purificado sustancialmente a partir del isómero óptico correspondiente (enantiómero) de la misma fórmula. Preferentemente, el isómero aislado es puro al menos aproximadamente al 80%, más preferentemente puro al menos al 90%, incluso más preferentemente al menos puro al 98%, mucho más preferentemente puro al menos aproximadamente al 99%, en peso.

Los isómeros ópticos aislados pueden purificarse de mezclas racémicas mediante técnicas de separación quiral ya conocidas. De acuerdo con uno de tales procedimientos, una mezcla racémica de un compuesto de la invención, o un intermedio quiral del mismo, se separa en isómeros ópticos puros al 99% en peso por HPLC usando una columna quiral adecuada, tal como un miembro de la serie de la familia de columnas DAICEL® CHIRALPAK® (Daicel Chemical Industries, Ltd., Tokio, Japón). La columna se manipula de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

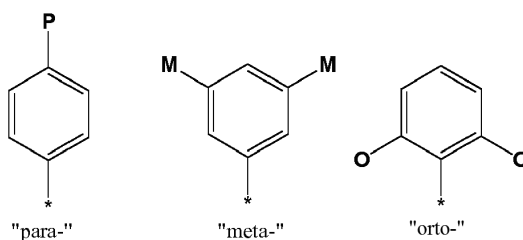
Isomería rotacional

Se entiende que debido a las propiedades químicas (es decir, resonancia que confiere cierto carácter de doble enlace al enlace C-N) de la rotación limitada alrededor de la unión del enlace amida (como se ilustra a continuación), entre otros tipos de enlaces, es posible observar especies rotaméricas separadas e incluso, en algunas circunstancias, aislar dichas especies, ejemplo mostrado a continuación. Se entiende adicionalmente que ciertos elementos estructurales, incluyendo sustituyentes estéricamente voluminosos o sustituyentes en el nitrógeno de amida, pueden mejorar la estabilidad de un rotámero en la medida en que un compuesto puede aislarse como, y existir indefinidamente, en forma de un rotámero estable individual. Por lo tanto, la presente invención incluye cualquier rotámero estable posible de compuestos de la invención que sean biológicamente activos en el tratamiento de cáncer u otras patologías proliferativas.

Regioisomería

Los compuestos preferidos de la presente invención tienen una distribución espacial particular de los sustituyentes en los anillos aromáticos, que está relacionada con la relación de estructura-actividad demostrada por la clase de compuestos. A menudo, dicha distribución de la sustitución se representa por un sistema de numeración; sin embargo, la numeración de los sistemas aromáticos a menudo no es consistente entre diferentes sistemas de anillo. En sistemas aromáticos de 6 miembros, las distribuciones especiales se especifican por la nomenclatura común

"para" para la sustitución 1, 4, "meta" para la sustitución 1, 3 y "orto" para la sustitución 1, 2, como se muestra a continuación



Los compuestos de la invención pueden contener uno o más centros estereogénicos (quirales) o asimétricos, tales como uno o más átomos de carbono asimétricos. Pueden estar presentes sustituyentes en un doble enlace en forma cis ("Z") o trans ("E"), a menos que se indique otra cosa. Asimismo, los sustituyentes en un anillo pueden disponerse cis o trans entres sí, o una mezcla de los mismos. Por lo tanto, los compuestos de la invención pueden estar presentes como mezclas de estereoisómeros o preferentemente como estereoisómeros sustancialmente puros. Los estereoisómeros puros pueden obtenerse separando mezclas de estereoisómeros o mediante síntesis estereoselectivas o estereoespecíficas de manera conocidas por los expertos en la técnica.

Todas las estructuras incluidas dentro de una reivindicación son "químicamente posibles", por lo que se entiende que la estructura representada por cualquier combinación o subcombinación de sustituyentes opcionales destinados a citarse por la reivindicación es físicamente capaz de existencia con al menos cierta estabilidad como puede determinarse por las leyes de la química estructural y por la experimentación. Las estructuras que no son químicamente factibles no están dentro de un conjunto de compuestos reivindicado.

Las expresiones "que comprende", "que incluye", "que tiene", "compuesto por" son términos ampliables como se usa en el presente documento, y no excluyen la existencia de elementos o componentes adicionales. En un elemento de reivindicación, el uso de las formas "que comprende", "que incluye", "que tiene" o "compuesto por" significa que cualquiera que sea el elemento comprendido, que se tenga, se incluya o por el que esté compuesto no es necesariamente el único elemento incluido por el objeto de la reivindicación que contiene esta palabra.

Una "sal" como se conoce bien en la técnica, incluye un compuesto orgánico, tal como un ácido carboxílico, un ácido sulfónico o una amina, en forma iónica, junto con un contraión. Por ejemplo, los ácidos en su forma aniónica pueden formar sales con cationes, tales como cationes metálicos, por ejemplo sodio, potasio, y similares; con sales de amonio, tales como NH_4^+ o los cationes de diversas aminas, incluyendo sales de tetraalquil amonio, tal como tetrametilamonio, u otros cationes, tal como trimetilsulfonio, y similares. Una sal "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" es una sal formada a partir de un ión que se ha aprobado para el consumo humano y generalmente no es tóxicas, tal como una sal cloruro o una sal sódica. Un "zwitterion" es una sal interna, tal como la que puede formarse en una molécula que tiene al menos dos grupos ionizables, uno formando un anión y el otro un catión, que sirven para equilibrarse entre sí. Por ejemplo, los aminoácidos, tales como glicina, pueden existir en una forma zwitteriónica. Un "zwitterion" es una sal en el sentido del presente documento. Los compuestos de la presente invención pueden tomar la forma de sales. El término "sales" incluye sales de adición de ácidos libres o bases libres que son compuestos de la invención. Las sales pueden ser "sales farmacéuticamente aceptables". La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que poseen perfiles de toxicidad dentro de un intervalo que proporciona utilidad en aplicaciones farmacéuticas. Las sales farmacéuticamente inaceptables no obstante pueden poseer propiedades, tal como elevada cristalinidad, que tienen utilidad en la práctica de la presente invención, tal como, por ejemplo, utilidad en los procedimientos de síntesis, purificación o formación de compuestos de la invención.

Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden prepararse a partir de un ácido inorgánico o de un ácido orgánico. Los ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, carbónico, sulfúrico y fosfórico. Los ácidos orgánicos apropiados pueden seleccionarse entre las clases alifáticas, cicloalifáticas, aromáticas, aralifáticas, heterocíclicas, carboxílicas y sulfónicas de ácidos orgánicos, cuyos ejemplos incluyen ácido fórmico, acético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, 4-hidroxibenzoico, fenilacético, mandélico, embónico (pamoico), metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, trifluorometanosulfónico, 2-hidroxi-etanosulfónico, p-toluenosulfónico, sulfanílico, ciclohexilaminosulfónico, esteárico, algínico, β -hidroxibutírico, salicílico, galactárico y galacturónico. Los ejemplos de sales de adición de ácidos farmacéuticamente inaceptables incluyen, por ejemplo, percloratos y tetrafluoroboratos.

Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables adecuadas de compuestos de la invención incluyen, por ejemplo, sales metálicas, incluyendo sales de metales alcalinos, de metales alcalinotérreos y de metales de transición, tales como, por ejemplo, sales de calcio, magnesio, potasio, sodio y cinc. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables también incluyen sales orgánicas fabricadas a partir de aminas básicas, tales como, por ejemplo, *N,N*-dibenciletilendiamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (*N*-metilglucamina) y procaina. Los ejemplos de sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables incluyen

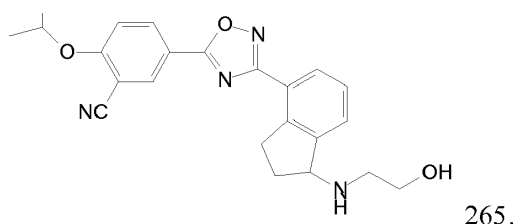
sales de litio y sales cianato. Aunque las sales farmacéuticamente inaceptables por lo general no son útiles como medicamentos, dichas sales pueden ser útiles, por ejemplo, como intermedios en la síntesis del compuesto 265, por ejemplo en su purificación por recristalización. Todas estas sales pueden prepararse por medios convencionales a partir del compuesto correspondiente haciendo reaccionar, por ejemplo, el ácido o base apropiados con el compuesto de acuerdo con el compuesto 265. La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales de adición de ácidos y/o bases no tóxicas inorgánicas u orgánicas, véase, por ejemplo, Lit y col., Salt Selection for Basic Drugs (1986), Int J. Pharm., 33, 201-217.

Un "hidrato" es un compuesto que existe en una composición con moléculas de agua. La composición puede incluir agua en cantidades estequiométricas, tal como un monohidrato o un dihidrato, o puede incluir agua en cantidades aleatorias. Según el término se usa en el presente documento, un "hidrato" se refiere a una forma sólida, es decir, un compuesto en solución acuosa, aunque puede estar hidratado, no es un hidrato como el término se usa en el presente documento.

Un "solvato" es una composición similar, excepto que un disolvente distinto de agua reemplaza el agua. Por ejemplo, el metanol o el etanol pueden formar un "alcoholato", que puede ser de nuevo estequiométrico o no estequiométrico. Según el término se usa en el presente documento, un "solvato" se refiere a una forma sólida, es decir, un compuesto en solución en un disolvente, aunque puede solvatar, no es un solvato como el término se usa en el presente documento.

En diversas realizaciones, el compuesto o conjunto de compuestos, *per se* o como se usa en la práctica de las realizaciones de los procedimientos inventivos, puede ser una de una cualquiera de las combinaciones y/o subcombinaciones de las diversas realizaciones citadas.

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula 265 o una sal, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo:



En diversas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un excipiente adecuado.

En diversas realizaciones, la invención proporciona una combinación farmacéutica que comprende el compuesto de la invención y un excipiente medicamento. Por ejemplo, el segundo medicamento puede estar médicamente indicado para el tratamiento de la esclerosis múltiple, rechazo de trasplantes, o el síndrome disneico agudo del adulto.

Diversas realizaciones de la invención proporcionan un compuesto para su uso en el tratamiento de un trastorno o una afección en el que la activación o la inhibición de un receptor de esfingosina-1-fosfato-subtipo de subtipo 1 están indicadas médicamente, que comprende un compuesto de fórmula 265 o una sal, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un procedimiento de activación, agonismo, inhibición o antagonismo de un receptor de esfingosina-1-fosfato del subtipo 1, que comprende poner en contacto el receptor de subtipo 1 con una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula 265 o una sal, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. Un compuesto de fórmula 265 de la invención activa o agoniza el receptor de subtipo 1 de la esfingosina-1-fosfato en un mayor grado que el compuesto activa o agoniza otro subtipo de receptor de esfingosina-1-fosfato. Por ejemplo, el otro subtipo del receptor de esfingosina-1-fosfato puede ser de subtipo 3.

En diversas realizaciones, la invención proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento de una afección en un paciente para la cual la activación, agonismo, inhibición o el antagonismo de un receptor de S1P1 está indicado médicamente, que comprende poner en contacto el receptor S1P1 de acuerdo con un procedimiento de la invención mediante la administración del compuesto al paciente a una frecuencia y por una duración de tiempo suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al paciente. Por ejemplo, la activación selectiva o agonismo de un receptor de S1P de subtipo 1 del receptor con respecto a otros subtipos de receptor de S1P está médicamente indicada. Más específicamente, la afección puede comprender esclerosis múltiple, rechazo de trasplantes, o síndrome disneico agudo del adulto. La forma de realización puede comprender además la administración de una cantidad efectiva de un segundo medicamento al paciente, tal como en el que el segundo medicamento está adaptado para el tratamiento de la esclerosis múltiple, rechazo de trasplantes, o síndrome disneico agudo del adulto.

Composiciones y tratamientos de combinación

Un compuesto de fórmula 265 o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden combinarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable para proporcionar composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de las afecciones o trastornos biológicos indicados en el presente documento en especies de mamíferos, y más preferentemente, en seres humanos. El vehículo particular empleado en estas composiciones farmacéuticas puede variar dependiendo del tipo de administración deseada (por ejemplo, intravenosa, oral, tópica, supositorio o parenteral).

En la preparación de las composiciones en formas de dosificación líquidas orales (por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones) se pueden usar medios farmacéuticos típicos, tales como agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares. Del mismo modo, en la preparación de formas de dosificación orales sólidas (por ejemplo, polvos, comprimidos y cápsulas), se pueden usar vehículos tales como almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares.

Otro aspecto de una forma de realización de la invención proporciona composiciones de los compuestos de la invención, solos o en combinación con otro inhibidor de S1P1 u otro tipo de agente terapéutico, o ambos. Como se expone en el presente documento, los compuestos de la invención incluyen estereoisómeros, solvatos, hidratos, sales, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables, y mezclas de los mismos. Las composiciones que contienen un compuesto de la invención pueden prepararse mediante técnicas convencionales, por ejemplo como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a Ed. 1995. Las composiciones pueden aparecer en formas convencionales, por ejemplo cápsulas, comprimidos, aerosoles, soluciones, suspensiones o aplicaciones tópicas.

Las composiciones típicas incluyen un compuesto de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable que puede ser un vehículo o un diluyente. Por ejemplo, el compuesto activo normalmente se mezclará con un vehículo, o se diluirá con un vehículo, o se introducirá en un vehículo, que puede estar en forma de una ampolla, cápsula, sello, papel u otro recipiente. Cuando el compuesto activo se mezcla con un vehículo, o cuando el vehículo sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa como vehículo, excipiente o medio para el compuesto activo. El compuesto activo puede adsorberse sobre un vehículo sólido granular, por ejemplo contenido en una bolsita. Algunos ejemplos de vehículos adecuados son agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, aceite de ricino polihidroxietoxilado, aceite de cacahuete, aceite de oliva, gelatina, lactosa, terra alba, sacarosa, dextrina, carbonato de magnesio, azúcar, ciclodextrina, amilosa, estearato de magnesio, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, ácido esteárico o éteres de alquilo inferior de celulosa, ácido silícico, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de pentaeritritol, polioxitileno, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona. De un modo similar, el vehículo o diluyente puede incluir cualquier material de liberación sostenida conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o mezclado con una cera.

Las formulaciones se pueden mezclar con agentes auxiliares que no reaccionan perjudicialmente con los compuestos activos. Tales aditivos pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, sal para influir en la presión osmótica, tampones y / o sustancias colorantes, agentes conservantes, agentes edulcorantes o agentes aromatizantes. Las composiciones también se pueden esterilizar, si se desea.

La vía de administración puede ser cualquier vía que transporte eficazmente el compuesto activo de la invención que inhibe la actividad enzimática de la quinasa de adhesión focal al sitio de acción apropiado o deseado, tal como oral, nasal, pulmonar, bucal, subdérmica, intradérmica, transdérmica o parenteral, por ejemplo, rectal, depósito, subcutánea, intravenosa, intrauretral, intramuscular, intranasal, solución oftálmica o una pomada, siendo la vía oral la preferida.

Para la administración parenteral, el vehículo comprenderá normalmente agua estéril, aunque también se pueden incluir otros ingredientes que ayudan a la solubilidad o sirven como conservantes. Adicionalmente, también se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear vehículos líquidos adecuados, agentes de suspensión y similares.

Para administración tópica, los compuestos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos de la presente invención se pueden formular usando bases hidratantes blandas, tales como ungüentos o cremas.

Si se usa un vehículo sólido para la administración oral, la preparación se puede comprimir, introducir en una cápsula de gelatina dura en polvo o forma de pastilla o puede estar en forma de un trocisco o píldora. Cuando se usa un vehículo líquido, la preparación puede estar en forma de jarabe, emulsión, cápsula de gelatina blanda, líquido inyectable estéril, tal como una suspensión o solución líquida acuosa o no acuosa.

Formas de dosificación inyectables generalmente incluyen suspensiones acuosas o suspensiones oleosas que pueden prepararse usando un dispersante o agente humectante adecuado y un agente de suspensión. Las formas inyectables pueden estar en fase de solución o en forma de una suspensión, que se prepara con un disolvente o diluyente. Los disolventes o vehículos aceptables incluyen agua esterilizada, solución de Ringer, o una solución salina acuosa isotónica. Alternativamente, los aceites estériles se pueden emplear como disolventes o agentes de

suspensión. Preferentemente, el aceite o ácido graso no es volátil, incluyendo aceites naturales o sintéticos, ácidos grasos, mono-di- o tri-glicéridos.

Para la inyección, la formulación también puede ser un polvo adecuado para reconstitución con una solución apropiada como se ha descrito anteriormente. Ejemplos de estos incluyen, pero no se limitan a, secado por congelación, polvos desecados por rotación o desecados por pulverización, polvos amorfos, gránulos, precipitados o partículas. Para la inyección, las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizantes, modificadores del pH, tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de estos. Los compuestos se pueden formular para administración parenteral mediante inyección, tal como mediante inyección en bolo o infusión continua. Una forma de dosificación unitaria para inyección puede ser en ampollas o en recipientes de dosis múltiples.

Las formulaciones de la invención pueden diseñarse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de la administración al paciente empleando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, las formulaciones también se pueden formular para liberación controlada o para liberación lenta.

Las composiciones contempladas por la presente invención pueden incluir, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden administrarse en una forma de liberación prolongada para proporcionar un almacenamiento prolongado y / o efecto de liberación. Por lo tanto, las formulaciones pueden comprimirse en gránulos o cilindros e implantarse intramuscularmente o subcutáneamente como inyecciones de depósito. Tales implantes pueden emplear materiales inertes conocidos tales como siliconas y polímeros biodegradables, por ejemplo, polilactida-polglicólido. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli (ortoésteres) y poli (anhídridos).

Para la administración nasal, la preparación puede contener un compuesto de la invención que inhibe la actividad enzimática de la quinasa de adhesión focal, disuelto o suspendido en un vehículo líquido, preferentemente un vehículo acuoso, para la aplicación de aerosol. El vehículo puede contener aditivos tales como agentes solubilizantes, por ejemplo, propilenglicol, tensioactivos, potenciadores de la absorción tales como lecitina (fosfatidilcolina) o ciclodextrina, o conservantes tales como parabenos.

Para la aplicación parenteral, son particularmente adecuadas las soluciones o suspensiones inyectables, preferentemente soluciones acuosas, con el compuesto activo disuelto en aceite de ricino polihidroxilado.

Los comprimidos, grageas, o cápsulas que tienen talco y / o un vehículo de carbohidrato o aglutinante o similar son particularmente adecuados para aplicación oral. Vehículos preferibles para comprimidos, grageas, o cápsulas incluyen lactosa, almidón de maíz, y / o almidón de patata. En casos en los que se puede usar un vehículo edulcorado se puede usar un jarabe o elixir.

Un comprimido típico que se puede preparar por técnicas de formación de comprimidos convencionales puede contener:

Núcleo:

Compuesto activo (como compuesto libre o sal del mismo)	250 mg
Dióxido de silicio coloidal (Aerosil)	1,5 mg
Celulosa microcristalina (Avicel)®	70 mg
Goma de celulosa modificada (Ac-Di-Sol)®	7,5 mg
estearato de magnesio	Añadir

Recubrimiento:

HPMC aprox.	9 mg
*Mywacett 9-40 T aprox.	0,9 mg

*monoglicérido acilado usado como plastificante para recubrimiento pelicular.

Una cápsula típica para administración oral contiene compuestos de la invención (250 mg), lactosa (75 mg) y estearato de magnesio (15 mg). La mezcla se pasa a través de un tamiz de malla 60 y se envasa en una cápsula de gelatina N° 1. Una preparación inyectable típica se produce colocando asépticamente 250 mg de compuestos de la invención en un vial, secado por congelación y sellado asépticamente. Para su uso, los contenidos del vial se mezclan con 2 ml de solución salina fisiológica estéril, para producir una preparación inyectable.

Los compuestos de la invención se pueden administrar a un ser humano en necesidad de tal tratamiento, prevención, eliminación, alivio o mejora de una afección mediada por la acción de S1P1, por ejemplo, esclerosis múltiple, rechazo de trasplantes, y síndrome disneico agudo del adulto.

Las composiciones farmacéuticas y compuestos de la presente invención generalmente se pueden administrar en forma de una unidad de dosificación (por ejemplo comprimido, cápsula, etc.) en una cantidad de aproximadamente 1 µ/kg de peso corporal a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal, preferentemente de aproximadamente 5 µ/kg de peso corporal a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 10 µ/kg de peso corporal a aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 20 µ/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Los expertos en la técnica reconocerán que la cantidad particular de composición y / o compuestos de la presente invención administrada a un individuo farmacéutica dependerá de una serie de factores incluyendo, sin limitación, el efecto biológico deseado, la afección del individuo y la tolerancia del individuo al compuesto.

Los compuestos de la invención son eficaces durante un intervalo de dosis amplio. Por ejemplo, en el tratamiento de seres humanos adultos, se pueden usar dosificaciones desde aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5000 mg, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 2000 mg, y más preferentemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 2000 mg al día. Una dosis típica es de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1.000 mg al día. En la elección de un régimen para los pacientes, con frecuencia puede ser necesario comenzar con una dosis más alta y cuando la afección está bajo control, reducir la dosis. La dosis exacta dependerá de la actividad del compuesto, el modo de administración, la terapia deseada, la forma en que se administra, el sujeto que se va a tratar y el peso corporal del sujeto a tratar y la preferencia y experiencia del médico o veterinario encargado. La bioactividad del agonista de S1P1 de los compuestos de la invención se puede determinar mediante el uso de un sistema de ensayo *in vitro* que mide la activación de S1P1, que puede expresarse como los valores de CE₅₀ valores, como son bien conocidos en la técnica, los inhibidores de la invención pueden determinarse mediante el procedimiento descrito en los Ejemplos.

Generalmente, los compuestos de la invención se dispensan en forma de dosificación unitaria, incluyendo de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 1.000 mg de ingrediente activo junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable por unidad de dosificación.

Por lo general, las formas de dosificación adecuadas para administración oral, nasal, pulmonar o transdérmica incluyen de aproximadamente 125 µg a aproximadamente 1250 mg, preferentemente de aproximadamente 250 µg a aproximadamente 500 mg, y más preferentemente de aproximadamente 2,5 mg a aproximadamente 250 mg, de los compuestos mezclados con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Las formas de dosificación se pueden administrar diariamente, o más de una vez al día, tal como dos veces o tres veces al día. Como alternativa, las formas de dosificación se pueden administrar con menos frecuencia que todos los días, tal como en días alternos, o semanalmente, si el médico responsable lo encuentra aconsejable.

En otra realización, se proporcionan procedimientos de fabricación de una composición de un compuesto descrito en el presente documento, incluyendo la formulación de un compuesto de la invención con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable es adecuado para administración oral. En algunas de tales realizaciones, los procedimientos pueden incluir además la etapa de formulación de la composición en un comprimido o cápsula. En otras realizaciones, el vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable es adecuado para administración parenteral. En algunas de tales realizaciones, los procedimientos incluyen además la etapa de liofilización de la composición para formar una preparación liofilizada.

Los compuestos de la invención pueden usarse terapéuticamente en combinación con i) uno o más de otros inhibidores de S1P1 y / o ii) uno o más de otros tipos de inhibidores de proteína quinasa y / o uno o más de otros tipos de agentes terapéuticos que se pueden administrar por vía oral en la misma forma de dosificación, en una forma de dosificación oral separada (por ejemplo, secuencialmente o no secuencialmente) o mediante inyección juntos o por separado (por ejemplo, secuencialmente o no secuencialmente).

De acuerdo con lo anterior, en otra realización, la invención proporciona combinaciones que comprenden:

- a) un compuesto de la invención como se describe en el presente documento; y
- b) uno o más compuestos que comprenden:
 - i) otros compuestos de la presente invención,
 - ii) otros medicamentos adaptados para el tratamiento de una afección para los cual la activación de S1P1 está indicada médicamente, por ejemplo esclerosis múltiple, rechazo de trasplantes, o síndrome disneico agudo del adulto.

Las combinaciones de la invención incluyen mezclas de compuestos de (a) y (b) en una sola formulación y compuestos de (a) y (b) como formulaciones separadas. Algunas combinaciones de la invención pueden envasarse como formulaciones separadas en un kit. En algunas realizaciones, dos o más compuestos de (b) se formulan juntos, mientras que un compuesto de la invención se formula por separado.

Las dosificaciones y formulaciones para utilizar los demás agentes, cuando proceda, será como se establece en la última edición del *Physicians' Desk Reference*.

Uso en tratamiento

El compuesto de la presente invención se puede usar en un procedimiento para activar o agonizar (es decir, para que tenga un efecto agónico, para actuar como un agonista) un subtipo de receptor de la esfingosina-1-fosfato, tal como S1P1. El procedimiento implica poner en contacto el receptor con una concentración adecuada de un compuesto de la invención para llevar a cabo la activación del receptor. La puesta en contacto puede tener lugar *in vitro*, por ejemplo en la realización de un ensayo para determinar la actividad de activación del receptor de S1P de un compuesto de la invención sometido a experimentación en relación con una presentación para su aprobación reglamentaria. El procedimiento para la activación de un receptor de S1P, tal como S1P1, también puede llevarse a cabo *in vivo*, es decir, dentro del cuerpo vivo de un mamífero, tal como un paciente humano o un animal de ensayo. El compuesto de la invención puede suministrarse al organismo vivo a través de una de las vías como se ha descrito anteriormente, por ejemplo por vía oral, o se puede proporcionar localmente dentro de los tejidos del cuerpo, por ejemplo mediante inyección de un tumor dentro del organismo. En presencia del compuesto de la invención produce la activación del receptor y el efecto del mismo se puede estudiar.

Una realización de la presente invención proporciona un compuesto de fórmula 265 para su uso en el tratamiento de una afección en un paciente para el cual la activación de un receptor de S1P, tales como S1P1, está indicado médicamente, en el que se administra al paciente el compuesto de la invención en una dosificación, a una frecuencia y por una duración para producir un efecto beneficioso sobre el paciente. El compuesto de la invención puede administrarse por cualquier medio adecuado, ejemplos de los cuales se han descrito anteriormente.

Procedimientos experimentales para el estudio de la internalización inducida por el agonista, fosforilación del receptor poliubiquitinación del receptor en las células que expresan de forma estable S₁P1-GFP

Materiales. S1P se obtuvo de Biomol. El agonista del receptor de S1P, AFD-R, fue un regalo del Dr. Brickman (Novartis Pharma). Los anticuerpos anti-GFP (ab-1218 and ab-6556) procedían de Abcam, el anticuerpo P4D1 anti-ubiquitina de Santa Cruz, los geles de SDS-PAGE de Tris-Glicina Novex al 4-12% de Invitrogen, P³². ortofosfato de Perkin-Elmer. El suero bovino fetal (FBS) y el FBS marcado con carbón vegetal fueron de Hyclone, y otros reactivos de cultivo eran del TSRI Supply Center (suministrado por Invitrogen y Gibco BRL).

Cultivo celular. Las células HEK-293 que expresan de forma estable el receptor S1P1 humano marcado con GFP (S1P1-GFP) y las células 293-vector-GFP fueron un regalo del Dr. Timothy Hla (Connecticut Health Science Center). Las células se mantuvieron en medio Eagle modificado rico en glucosa que contiene GlutaMAX y se suministró 10% de FBS, 1% de solución de penicilina/estreptomicina y se seleccionaron con 500 ug/ml de G418 (Gibco BRL).

Estudios de imagen por microscopia para internalización de S1P₁-GFP mediado por ligando.

Se usaron células sencillas de S1P1-GFP cultivadas en cubre objetos revestidos con gelatina para estudiar la internalización de S1P1-GFP inducida por ligando. Las células se incubaron durante la noche en medio de FBS con carbón vegetal (cs-FBS) antes del inicio del experimento y todas las incubaciones posteriores se realizaron en medio cs-FBS que contiene 15 ug/ml de ciclohexamida. Las células se incubaron con agonistas (o control del vehículo para los tiempos indicados y las reacciones se terminaron mediante la eliminación del medio, y el lavado con PBS. En experimentos con el antagonista W146 se añadió antagonista o vehículo a las células durante 30-45 minutos antes la incubación con agonista. Las células se fijaron en 3,7% de paraformaldehído durante 10 minutos y se montaron en cubreobjetos utilizando medio de montaje GelMount. Las células se barrieron con un microscopio de barrido confocal de fluorescencia Olympus BX61. Para la detección de GFP, la fluorescencia se excitó mediante el uso de un láser de argón a una longitud de onda de 488 nm, y la longitud de onda absorbida se detectó para 510-520 nm para GFP. Se obtuvieron microfotografías de ligando frente a vehículo utilizando el software Metamorph y las imágenes fueron evaluadas (en Photoshop) para determinar la aparición o no del patrón de internalización de S1P1-GFP vesicular, un patrón característico adoptado por la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G tras la estimulación de ligando.

Inmunoprecipitación e inmunotransferencia para la poliubiquitinación de S1P₁ estimulada por ligando e S1P₁-GFP

El efecto del reclutamiento estimulado por agonista de las cadenas de poliubiquitina a S1P₁-GFP se analizó mediante experimentos de inmunoprecipitación-inmunotransferencia con anticuerpos anti-GFP. Las células se sembraron en placas de 35 mm y se cultivaron hasta ~95% de confluencia utilizando medio de crecimiento regular. El medio de crecimiento se reemplazó por medio cs-FBS y las células se incubaron durante la noche. El fármaco o vehículo (ambos en medio cs-FBS) se incubaron durante los tiempos indicados. Al final de la incubación, las monocapas se lavaron dos veces en PBS helado y los lisados se obtuvieron mediante incubación en tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1% de Nonidet P-40, desoxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,1%), más inhibidores de la proteasa (comprimidos completos, Roche), y NaVO₄, 1 mM, NaF 1 mM y B-glicerol-fosfato 0,5 M. Los lisados celulares se aclararon mediante centrifugación (10.000 g, 15 minutos) y la concentración de proteínas de los sobrenadantes de lisado se determinó mediante el procedimiento BCA (Pierce). Cantidades iguales de lisados (0,5-1 mg se incubaron durante la noche a 4 °C con un anticuerpo monoclonal GFP (1 ug de anticuerpo por 400 ug de proteína), seguido de incubación con perlas de proteína A-Sepharose (2H, 4c). Las perlas se recuperaron mediante centrifugación (10.000 g, 1 minuto) y lavado: tampón RIPA 3x; PBS (1: 1) y sin inhibidores

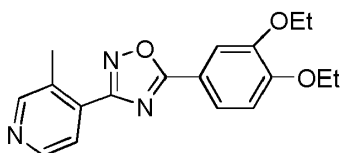
de la proteasa y dos veces en PBS. Las perlas se suspendieron en tampón Laemli 2X que contiene 2-mercaptoetanol, se llevaron a ebullición durante 10 minutos y las proteínas en las perlas se separaron por SDS-PAGE en geles Novex 4-12% de Tris-glicina. A continuación, los geles se transfirieron a membranas de PVDF y se sondaron durante la noche (4 °C) con un anticuerpo policlonal GFP (1:10.000) para la detección de la expresión de S1P1-GFP o P4D1 (1:200 a 1:800) para detectar el complejo S1P1-GFP-poliubiquitinado. Los anticuerpos marcados con peroxidasa de rábano se visualizaron mediante EQL de quimioluminiscencia (Amersham Biosciences).

Los agonistas estimulan la fosforilación de S1P₁-GFP en células HEK293.

Las células que expresan de forma estable el S1P₁ humano marcado con GFP se marcaron metabólicamente con ortoFosfato-P³² (80 µCi / ml, Perkin Elmer) durante 2 horas y posteriormente se incubaron con agonistas a las concentraciones indicadas durante los tiempos indicados a 37 °C. Las incubaciones se terminaron mediante la eliminación del agonista y lavado con PBS, y el receptor se inmunoprecipitó con un anticuerpo GFP a partir de cantidades iguales de proteína de los lisados celulares. El receptor inmunoprecipitado se separó mediante SDS-PAGE y la incorporación de P³² sobre el receptor estimulado con agonista se evaluó mediante autorradiografía (-80 °C, 24 horas de exposición).

Internalización, ubiquitinación y fosforilación de S1P1-GFP

Compuesto de referencia 32:



Compuesto de referencia 236 2-(4-(5-(3,4-dietoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)etanol

Durante el curso de los estudios de optimización principales, los compuestos SR-917, el compuesto **32** y el compuesto **236** se evaluaron en profundidad en varios estudios biológicos. SR-917 es un agonista conocido del receptor S1P₁, indexado en la NIH Molecular Libraries Small Molecule Repository MLMSR. La ID del compuesto es 976135. Está disponible comercialmente en ChemBridge Screening Library.

La estimulación agonista del receptor S1P₁ está modulada por la degradación del receptor. La estimulación del ligando induce la fosforilación, internalización, poliubiquitinación y degradación del receptor (González-Cabrera, Hla y col., 2007). Al igual que AFD-R y S1P, la estimulación con el compuesto sintético identificados por cribado de alto rendimiento, SR-917 da lugar a la internalización de S1P1-GFP, fosforilación de proteínas y poliubiquitinación; véase la Figura 1.

El compuesto **32** 2 induce de forma sólida la internalización y poliubiquitinación con 5178, y estos efectos son bloqueados por el antagonista de S1P₁, W146R., véase la Figura 2.

El Compuesto **236**, al igual que otros compuestos de la serie, induce poliubiquitinación de S1P₁; véase la Figura 3.

Se observó que S1P y el agonista específico de S1P₁, SEW2897, inducen linfopenia (Wei, Rosen y col., 2005). SR-917 y el compuesto **32**, administrado mediante sonda, no indujeron linfopenia en ratones. El compuesto **236** a 10 mgpk por sonda, indujo linfopenia; véase la Figura 4. El compuesto **236** es soluble en agua a 0,5 mg / ml y mediante administración i.v. e i.p. indujo linfopenia (Sanna, Leaf).

Farmacocinética

A partir de los estudios iniciales de eficacia en ratones (Figura 5), los niveles en plasma del Compuesto **236** a las 5 horas fueron: 395 / 87,6 Media / DE. La estabilidad en microsomas hepáticos para el Compuesto **236** dependía de la especie. En microsomas humanos, el compuesto era muy estable y moderadamente estable en ratas. Todos eran dependientes de NADPH. En presencia de 1,8 mg / ml DE microsomas hepáticos, las semividas (minutos) son estables en seres humanos, el en ratón 50, en rata 16.

Los aminoácidos polares de S1P₁ esenciales para la activación mediada para S1P no se requieren para la activación del receptor S1P₁ por el Compuesto **236**. S1P requiere varios aminoácidos polares (R120, E121 y R292) que recubren el bolsillo de unión al ligando para la activación completa (Jo, Sanna y col., 2005). Las cadenas laterales polares de S1P₁ de los residuos R120, E121 y R29 forman puentes de sales con el fosfato de S1P₁ y la S1P puede activar solo mínimamente los mutantes R120A, E121A y R292A. Por el contrario, los receptores S1P₁ salvaje y S1P₁ mutantes R120A, E121A and R292A se activan indistintamente con el compuesto **236** (Figura 6).

Ejemplos

Los siguientes compuestos se sintetizaron y se evaluaron en bioensayos como se describe en el presente documento.

Procedimientos sintéticos

- 5 Disolventes para extracción: Grado ACS. Disolventes para reacción: Grado reactivo. Reactivos: A menos que se indique otra cosa, de Alfa Aesar, Fisher y Aldrich de la mayor calidad disponible. TLC: placas de aluminio en gel de sílice 60 F₂₅₄, (whatman, tipo Al Sil G/UV, capa de 250 µm); visualización por absorción UV. La cromatografía ultrarrápida se realizó sobre gel de sílice 60 (0,40-0,63 mm, malla 230-440, EM Science). RMN: ¹H: Valores δ en ppm (TMS como patrón interno); ¹³C: Valores δ en ppm (TMS como patrón interno)
- 10 Las reacciones se controlaron por CL/EM.

Procedimiento general para reducir aldehído:

A una suspensión agitada de aldehído (1,0 equiv., 0,4 M) y gel de sílice (catalítico) en etanol a 0 °C se le añadió NaBH₄ (1/3 equiv.). La reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. El disolvente se retiró a presión reducida y el producto se purificó por CC en hexano/EtOAc (7:3).

- 15 Procedimiento general para sintetizar amidoximas:

A una suspensión agitada de clorhidrato de hidroxilamina (1,1 equiv.) y Na₂CO₃ (1,1 equiv.) en etanol se le añadió, en una porción, el benzonitrilo correspondiente (1 equiv.). La mezcla se calentó a reflujo durante 6 h seguido de la adición de NH₂OH.HCl (1,1 equiv.) y Na₂CO₃ (1,1 equiv.), y la reacción se calentó a reflujo durante 6 h más. La suspensión se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El sólido se lavó con etanol y la fase orgánica se concentró a presión reducida. La amidoxima en bruto se recristalizó en EtOAc/Hexanos y se usó sin purificación adicional.

20

Procedimiento general para sintetizar oxadiazoles:

A una solución en agitación de ácido 3,4-dietoxibenzoico (1 equiv., 0,2 M) en DMF se le añadieron secuencialmente HOBt (1,3 equiv.) y EDCI (1,3 equiv.) a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 20 min, seguido de la adición, en una única porción, de la amidoxima correspondiente (1,3 equiv., de la etapa anterior). La reacción se agitó durante 30 min más a temperatura ambiente y después se calentó a 90-95 °C durante 8-14 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó usando una solución saturada de NaCl y se extrajo con EtOAc (3 x). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por C.C. usando CH₂Cl₂:MeOH (9:1), ofreciendo los diariloxadiazoles con rendimientos moderados.

25

Procedimiento general para sintetizar aminas.

A una solución agitada de alcohol bencílico (1 equiv.) y piridina (1,1 equiv.) en CH₂Cl₂ a 0 °C se le añadió gota a gota SOCl₂ (1,1 equiv.). La reacción se calentó hasta la temperatura ambiente, se agitó durante 1 h más y se concentró a presión reducida. A una solución agitada de cloruro en bruto en CH₂Cl₂ a 0 °C se le añadió gota a gota una solución de pirrolidina (3 equiv.) en CH₂Cl₂. La reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. La fase orgánica se lavó con agua y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. El producto en bruto se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna en DCM/MeOH, proporcionando derivados de pirrolidina con buenos rendimientos.

35

Reducción de derivados indolo.

A una solución agitada de núcleo indolo (1 equiv.) en ácido acético a 13 °C se le añadió lentamente cianoborohidruro sódico (3 equiv.). La reacción se agitó durante 2 h a 13 °C y se controló por TLC. Después de la finalización de la reacción, la mezcla se neutralizó con hidróxido sódico al 50% y el producto se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre Na₂CO₃ y se retiró a presión reducida. Los núcleos de indolina se purificaron por C.C. usando CH₂Cl₂/MeOH (9:1), ofreciendo un rendimiento cuantitativo.

40

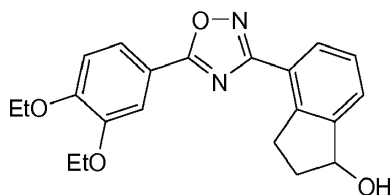
Procedimiento de aminación.

Una solución de alcohol (1 equiv.), a 0 °C, se trató con SOCl₂ (1,1 equiv.) y piridina (1,1 equiv.) en CH₂Cl₂. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con NaHCO₃ (2 x). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se disolvió en DMF y se trató con la amina correspondiente (2 equiv.) y DIPEA (2,0 equiv.). La reacción se agitó a 50 °C durante 48 h. La reacción se diluyó con H₂O y el producto se extrajo con EtOAc (3 x). El producto se purificó por C.C. usando CH₂Cl₂/MeOH (9:1), ofreciendo amino-diariloxadiazoles con rendimientos moderados.

45

50

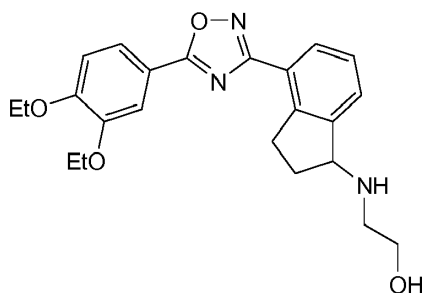
Ejemplo de referencia 1

**4-(5-(3,4-dietoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ol (compuesto 215)**

A una suspensión agitada de 1-oxo-2,3-dihidro-1H-inden-4-carbonitrilo (5 g, 31,8 mmol) y gel de sílice (100 mg) en etanol (30 ml) a 0 °C se le añadió NaBH₄ (400 mg, 10,6 mmol). La reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. El disolvente se retiró a presión reducida y el producto se purificó por cromatografía en columna en hexano/EtOAc (5:5), ofreciendo 1-hidroxi-2,3-dihidro-1H-inden-4-carbonitrilo en forma de un sólido de color blanco con un rendimiento del 80% (4,04 g, 25,4 mmol). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7,62 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,54 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,33 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 5,28 (t, J = 6,3 Hz, 1H), 3,28-3,18 (m, 1H), 3,02-2,92 (m, 1H), 2,63-2,52 (m, 1H), 2,06-1,99 (m, 1H).

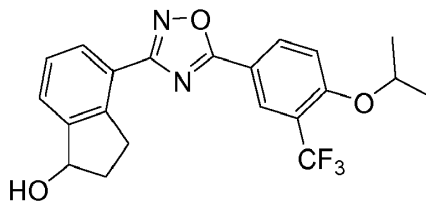
A una solución agitada de 1-hidroxi-2,3-dihidro-1H-inden-4-carbonitrilo (3 g, 18,86 mmol) en etanol (100 ml) se le añadieron cuidadosamente en porciones equivalentes durante un periodo de 16 h en condiciones de reflujo clorhidrato de hidroxilamina (6,55 g, 94,3 mmol) y carbonato potásico (13,03 g, 94,3 mmol). La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y el sólido se filtró. El disolvente orgánico se concentró a presión reducida y el producto en bruto se recrystalizó en etanol, produciendo 2,5 g (69%) de amidoxima.

En un vial para microondas, una solución en agitación de ácido 3,4-dietoxibenzoico (200 mg, 0,95 mmol) en DMF se trató con HOBt (168 mg, 1,24 mmol) y EDCI (237 mg, 1,24 mmol) a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 20 min seguido de la adición, en una única porción, de amidoxima (238 mg, 1,24 mmol). La reacción se agitó durante 30 min más a temperatura ambiente y después se calentó a 130 °C durante 35 min en el iniciador. La reacción se diluyó usando una solución saturada de NaCl y se extrajo con EtOAc (3 x 80 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna usando CH₂Cl₂:MeOH (9:1), ofreciendo el producto en forma de un sólido de color blanco con un rendimiento del 69% (208 mg). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 8,10 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,78 (dd, J₁ = 1,6 Hz, J₂ = 8 Hz, 1H), 7,67 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 7,56 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,39 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 6,97 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,29 (t, J = 6,4 Hz, 1H), 4,19 (c, J = 7,2 Hz, 2H), 4,18 (c, J = 7,2 Hz, 2H), 3,51-4,43 (m, 1H), 3,22-3,14 (m, 1H), 2,59-2,51 (m, 1H), 2,04-1,97 (m, 1H), 1,5 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,49 (t, J = 7,2 Hz, 3H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 175,2, 168,9, 152,8, 148,9, 146,6, 143,3, 128,9, 127,4, 127,0, 123,8, 122,2, 116,7, 112,7, 112,4, 76,2, 64,9, 64,8, 35,7, 31,5, 14,9, 14,8. EM (IE) m/z 367 (M⁺), EMAR (IE) para C₂₁H₂₂N₂O₄ (M⁺): calc. 367,1652, observado 367,1653.

**2-(4-(5-(3,4-dietoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)etanol (compuesto 236)**

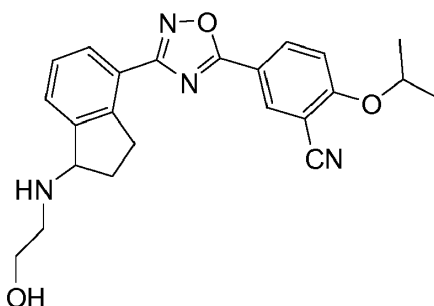
A una solución agitada del compuesto **215** (400 mg, 1,09 mmol) en CH₂Cl₂ se le añadieron a 0 °C piridina (89 µl, 1,1 mmol) y cloruro de tionilo (81 µl, 1,1 mmol), la reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y la mezcla se concentró a presión reducida. El producto en bruto se diluyó en DMF (10 ml) y se añadieron carbonato potásico (290 mg, 2,1 mmol) y etanolamina (128 µl, 2,1 mmol), la reacción se agitó durante una noche a 60 °C. La mezcla de reacción se vertió en agua (100 ml) y se extrajo con EtOAc (100 ml x 3). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna usando CH₂Cl₂:MeOH (9:1), produciendo 312 mg (rendimiento del 70%) del producto en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8,12 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,79 (dd, J₁ = 2,0 Hz, J₂ = 8,5 Hz, 1H), 7,68 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,63 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,40-7,37 (m, 1H), 4,49-4,47 (m, 1H), 4,23-4,16 (m, 4H), 3,78-3,70 (m, 1H), 3,53-3,46 (m, 1H), 3,29-3,22 (m, 1H), 2,96-2,94 (m, 4H), 2,56-2,50 (m, 1H), 2,09-2,03 (m, 1H), 1,52-1,49 (m, 6H); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 175,03, 168,66, 152,71, 148,87, 143,76, 128,71, 127,11, 123,89, 122,04, 116,67, 112,63, 112,49, 104,66, 64,84, 64,61, 62,70, 60,34, 47,98, 31,90, 29,69, 14,72, 14,64. EM (IE) m/z 410 (M⁺), EMAR (IE) para C₂₃H₂₇N₃O₄ (M⁺): calc. 410,2074, observado 410,2077.

Ejemplo 1

**4-(5-(4-isopropoxi-3-(trifluorometil)fenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ol (compuesto 261)**

En un vial para microondas, una solución en agitación de ácido 4-etoxi-3-(trifluorometil)benzoico (200 mg, 0,97 mmol) en DMF se trató con HOBt (172 mg, 1,26 mmol) y EDCI (242 mg, 1,26 mmol) a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 20 min seguido de la adición, en una única porción, de *N*',1-dihidroxi-2,3-dihidro-1*H*-inden-4-carboximidamida (243 mg, 1,26 mmol). La reacción se agitó durante 30 min más a temperatura ambiente y después se calentó a 130 °C durante 35 min en el iniciador. La reacción se diluyó usando una solución saturada de NaCl y se extrajo con EtOAc (80 ml x 3). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna usando CH₂Cl₂:MeOH (9:1), ofreciendo el producto en forma de un sólido de color amarillo pálido con un rendimiento del 63% (229 mg).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃-CH₃OD): δ 8,36 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,29 (dd, *J*₁ = 2,4 Hz, *J*₂ = 9,0 Hz, 1H), 8,06 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,55 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,37 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,10 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 5,26 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H), 4,81-4,73 (m, 1H), 3,48-3,38 (m, 1H), 3,19-3,08 (m, 1H), 2,56-2,49 (m, 1H), 2,04-1,95 (m, 1H), 1,45 (d, *J* = 6,3 Hz, 6H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃-CH₃OD): δ 173,11, 168,95, 162,82, 146,70, 143,26, 134,15, 134,041, 128,27, 127,30, 127,18, 123,18, 116,85, 115,41, 113,66, 103,86, 72,85, 35,57, 31,42, 21,82. EM (IE) *m/z* 362 (M⁺), EMAR (IE) para C₂₁H₁₉N₃O₃ (M⁺): calc. 362,1499, u observado 362,1494.

**5-(3-(1(2-hidroxi-etilamino)-2,3-dihidro-1H-inden-4-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-2-isopropoxibenzonitrilo (compuesto 265)**

A una solución agitada del compuesto **261** (130 mg, 0,360 mmol) en CH₂Cl₂ se le añadieron a 0 °C piridina (30 µl, 0,378 mmol) y cloruro de tionilo (27 µl, 0,378 mmol), la reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se diluyó en DMF (2 ml) y se añadieron DIPEA (328 µl, 1,889 mmol) y etanolamina (114 µl, 1,889 mmol) a 0 °C. La reacción se agitó durante una noche a 60 °C. La mezcla de reacción se vertió en agua (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (20 ml x 3). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna usando CH₂Cl₂:MeOH (9:1), produciendo el 23% (34 mg) del producto en forma de un sólido de color pardo pálido.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃-CH₃OD): δ 8,33 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,26 (dd, *J*₁ = 2,4 Hz, *J*₂ = 9,0 Hz, 1H), 7,99 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,47 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,33 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,07 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 4,74 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H), 4,27 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H), 3,62 (c, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,37-3,32 (m, 1H), 3,18-3,10 (m, 1H), 2,79 (t, 5,1 Hz, 2H), 2,48-2,37 (m, 1H), 1,92-1,85 (m, 1H), 1,40 (d, *J* = 6,0 Hz, 6H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃-CH₃OD): δ 172,73, 168,58, 162,49, 145,45, 143,33, 133,74, 133,71, 127,85, 126,69, 126,58, 122,81, 116,40, 115,00, 113,31, 103,33, 72,46, 62,30, 60,54, 32,15, 31,51, 21,35. EM (IE) *m/z* 405 (M⁺), EMAR (IE) para C₂₃H₂₄N₄O₃ (M⁺): calc. 405,1921, observado 405,1920.

El compuesto 265 se ha evaluado como se muestra a continuación.

Tabla 1: Datos biológicos

Número de compuesto	tPSA	ClogP	CE ₅₀ (S1P ₁ Ag) (nM)	CE ₅₀ (S1P ₃ Ag) (nM)
265	99,2	3,44	< 0,5	NA

Usando los procedimientos sintéticos proporcionados en el presente documento, está dentro de la habilidad ordinaria preparar cualquier compuesto de la invención. Usando el conocimiento del experto en la técnica en combinación con las referencias citadas anteriormente y los procedimientos para la evaluación de la bioactividad inhibidora de S1P1, el experto en la técnica puede evaluar el compuesto de la presente invención preparado de este modo para determinar su eficacia en la inhibición de S1P1, la inhibición selectiva de S1P1 en presencia de otros subtipos de receptores tales como S1P3, y la eficacia en bioensayos basados en células indicativa de la inhibición de S1P1 *in vivo*. De acuerdo con lo anterior, el alcance de las reivindicaciones que figuran a continuación se permite por la divulgación del presente documento.

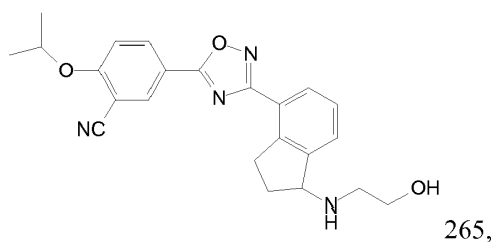
Referencias

- 10 1. Matloubian, M.; Lo, C. G.; Cinamon, G.; Lesneski, M. J.; Xu, Y.; Brinkmann, V.; Allende, M. L.; Proia, R. L.; Cyster, J. G. *Nature* 2004, 427, 355. (b) Allende, M. L.; Dreier, J. L.; Mandala, S.; Proia, R. L. *J Biol. Chem.* 2004, 279, 15396.
2. Germana, S. M.; Liao, J.; Jo, E.; Alfonso, C.; Ahn, M.-Y.; Peterson, M. S.; Webb, B.; Lefebvre, S.; Chun, J.; Gray, N.; Rosen, H. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 13839.
- 15 3. (a) Budde, K.; Schmouder, R. L.; Nashan, B.; Brunkhorst, R.; Lucker, P. W.; Mayer, T.; Brookman, L.; Nedelman, J.; Skerjanec, A.; Bohler, T.; Neumayer, H.-H. *Am. J. Transplant.* 2003, 3, 846-854. (b) Budde, K.; Schmouder, R. L.; Brunkhorst, R.; Nashan, B.; Lucker, P. W.; Mayer, T.; Choudhury, S.; Skerjanec, A.; Kraus, G.; Neumayer, H. H. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002, 13, 1073-1083. (c) Kahan, B. D.; Karlix, J. L.; Ferguson, R. M.; Leichtman, A. B.; Mulgaonkar, S.; Gonwa, T. A.; Skerjanec, A.; Schmouder, R. L.; Chodoff, L. *Transplantation* 2003, 7, 1079-1084.
- 20 4. Yan L.; Huo P.; Hale J.; Mills S. G.; Hajdu R.; Keohane C. A.; Rosenbach M. J.; Milligan J. A.; Shei G.; Chrebet G.; Bergstrom J.; Card D.; Mandala S. M. *Bioorg Med Chem Lett* 2006, 16, 3684-3687.
5. Li Z.; Chen W.; Hale J.; Lynch C. L.; Mills S. G.; Hajdu R.; Keohane C. A.; Rosenbach M. J.; Milligan J. A.; Shei G.; Chrebet G.; Parent S. A.; Bergstrom J.; Card D.; Forrest M.; Quackenbush E. J.; Wickham L. A.; Vargas H.; Evans R. M.; Rosen H.; Mandala S. *J Med Chem* 2005, 48, 6169-6173.
- 25 6. Hale J. J.; Lynch C. L.; Neway W.; Mills S. G.; Hajdu R.; Keohane C. A.; Rosenbach M. J.; Milligan J. A.; Shei G.; Parent S. A.; Chrebet G.; Bergstrom J.; Card D.; Ferrer M.; Hodder P.; Strulovici B.; Rosen H.; Mandala S. *J Med Chem* 2004, 47, 6662-5.
7. Gonzalez-Cabrera, P. J., T. Hla, y col. (2007). "Mapping pathways downstream of sphingosine 1-phosphate subtype 1 by differential chemical perturbation and proteomics." *J Biol Chem* 282(10): 7254-64.
- 30 8. Jo, E., M. G. Sanna, y col. (2005). "S1P1-selective in vivo-active agonists from high-throughput screening: off-the-shelf chemical probes of receptor interactions, signaling, and fate." *Chem Biol* 12(6): 703-15.
9. Wei, S. H., H. Rosen, y col. (2005). "Sphingosine 1-phosphate type 1 receptor agonism inhibits transendothelial migration of medullary T cells to lymphatic sinuses." *Nat Immunol* 6(12): 1228-35.

35

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula 265



o una sal, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 2. El compuesto de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno o una afección en el que la activación o inhibición de un receptor de subtipo 1 de la esfingosina-1-fosfato está médicamente indicado seleccionado del grupo que consiste en esclerosis múltiple, rechazo de trasplante o síndrome disneico agudo del adulto.
3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 en el tratamiento de la esclerosis múltiple.
- 10 4. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1 y un excipiente adecuado.
5. Una combinación farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1 y un segundo medicamento.