

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 984**

51 Int. Cl.:

**A01N 37/18** (2006.01)

**A61K 31/165** (2006.01)

**C07C 233/60** (2006.01)

**C07C 271/44** (2006.01)

**C07F 9/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2010 E 10751489 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2405751**

54 Título: **Profármacos inhibidores de la esfingosina cinasa**

30 Prioridad:

**12.03.2009 US 159723 P**

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

**13.11.2015**

73 Titular/es:

**APOGEE BIOTECHNOLOGY CORPORATION  
(100.0%)  
1214 Research Blvd., Suite 1016 Hershey Center  
For Applied Research  
Hummelstown, PA 17036, US**

72 Inventor/es:

**SMITH, CHARLES D.;  
ZHUANG, YAN y  
MAINES, LYNN W.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 550 984 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

Profármacos inhibidores de la esfingosina cinasa

5 **Patrocinio del gobierno**

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno a través de la Subvención R44 DK071395 otorgada por el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos. Por consiguiente, el gobierno de los Estados Unidos puede tener ciertos derechos sobre la presente invención.

10

**Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los EE.UU. número de serie 61/159.723, presentada el 12 de marzo de 2009.

15

**Campo de la invención**

La invención se refiere a compuestos profármacos cuyos metabolitos son capaces de inhibir la esfingosina cinasa y a composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos. La invención también se refiere a métodos para el uso de estos compuestos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento o la prevención de la enfermedad hiperproliferativa, la enfermedad inflamatoria o la enfermedad angiogénica.

20

**Antecedentes de la invención**

Los mecanismos y efectos de la interconversión de los esfingolípidos han sido objeto de un creciente cuerpo de investigación científica. La esfingomielina es un componente básico de las membranas celulares y sirve como precursor de mensajeros lipídicos potentes que tienen profundos efectos celulares. Como se describe a continuación, el metabolismo de estos lípidos está involucrado de forma crítica en la biología de las enfermedades hiperproliferativas, inflamatorias y angiogénicas. En consecuencia, la manipulación de estas vías metabólicas es un método para el tratamiento de una diversidad de enfermedades.

30

La ceramida es producida por la hidrólisis de esfingomielina en respuesta a varios estímulos, incluyendo factores de crecimiento y citocinas inflamatorias. La ceramida puede ser hidrolizada por la acción de la ceramidasa para producir esfingosina. La esfingosina después es fosforilada por la esfingosina cinasa (SK) para producir esfingosina-1-fosfato (S1P). La evidencia demuestra que la S1P es un segundo mensajero crítico que ejerce acciones proliferativas y antiapoptóticas. Además, la ceramida potencia la apoptosis en respuesta a antineoplásicos, incluyendo taxol y etopósido. Además, la ceramida parece inducir la apoptosis en las células tumorales sin matar a las células normales inactivas. Los estudios en diversas líneas celulares indican consistentemente que la S1P es capaz de inducir la proliferación y proteger las células de la apoptosis. En conjunto, los datos demuestran que el equilibrio entre los niveles celulares de ceramida y de S1P determina si una célula prolifera. Por tanto, la alteración de este equilibrio mediante la reducción de la producción de la S1P dentro de las células hiperproliferativas es un método eficaz para tratar los trastornos que surgen de la proliferación celular anormal.

35

40

La esfingosina cinasa es responsable de la producción de la S1P en las células. El ARN que codifica la SK se expresa en la mayoría de los tejidos, apareciendo a menudo los niveles más altos en el tejido tumoral que en el tejido normal correspondiente. Una diversidad de factores proliferativos, incluyendo los activadores de la proteína cinasa C (PKC), el suero de ternera fetal, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento epidérmico y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF $\alpha$ ), elevan rápidamente la actividad de la SK celular. Esto promueve la proliferación e inhibe la apoptosis de las células diana. Además, se ha demostrado un papel oncogénico de la SK. A la inversa, la inhibición de la SK mediante la transfección con un mutante de la SK dominante negativo o mediante el tratamiento de las células con el inhibidor de la SK inespecífico D-eritro-N,N-dimetilesfingosina (DMS) bloquea la transformación mediada por la H-Ras oncogénica. Puesto que la activación anormal de la Ras, así como la sobreexpresión y mutación de los genes de la familia *ras*, aparece con frecuencia en diferentes tipos de cáncer, estos resultados indican un papel importante de la SK en estas enfermedades.

45

50

55

Además, se ha demostrado que la S1P tiene varios efectos importantes sobre las células que median las funciones inmunitarias. Las plaquetas, los monocitos y los mastocitos secretan S1P tras su activación, promoviendo cascadas inflamatorias en el sitio del daño tisular. Se requiere la activación de la SK para las respuestas de señalización ya que la capacidad del TNF $\alpha$  para inducir la expresión de la molécula de adhesión a través de la activación del factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) es mimetizada por la S1P y es bloqueada por la DMS. De forma similar, la S1P mimetiza la capacidad del TNF $\alpha$  para inducir la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la síntesis de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), y la atenuación génica de la SK por interferencia del ARN bloquea estas respuestas al TNF $\alpha$ . La S1P también es un mediador de la entrada de calcio durante la activación de neutrófilos por el TNF $\alpha$  y otros estímulos, conduciendo a la producción de superóxido y otros radicales tóxicos. Por tanto, la reducción de la producción de la S1P en las células inmunes y sus tejidos diana puede ser un método eficaz para tratar los trastornos que surgen de la inflamación anormal. Los ejemplos de dichos trastornos incluyen la enfermedad intestinal inflamatoria, la artritis, la

60

65

aterosclerosis, el asma, la alergia, la insuficiencia renal inflamatoria, el shock circulatorio, la lesión por isquemia-reperusión, la insuficiencia orgánica post-quirúrgica, el trasplante de órganos, la esclerosis múltiple, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la inflamación de la piel, la enfermedad periodontal, la psoriasis y las enfermedades de la inmunidad mediadas por linfocitos T.

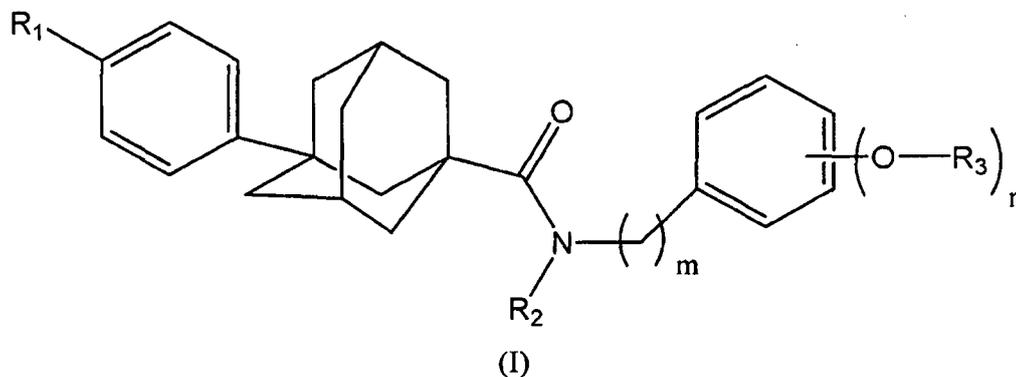
5 La angiogénesis se refiere al estado en el cuerpo en el que diversos factores de crecimiento u otros estímulos promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos, y este proceso es crítico para la patogenia de una diversidad de enfermedades. En cada caso, la angiogénesis excesiva permite la progresión de la enfermedad y/o produce efectos no deseados en el paciente. Puesto que mecanismos bioquímicos conservados regulan la proliferación de las células endoteliales vasculares que forman estos nuevos vasos sanguíneos, se espera que la identificación de métodos para inhibir estos mecanismos tenga utilidad para el tratamiento y la prevención de una diversidad de enfermedades. Más específicamente, se han identificado ciertos factores de crecimiento que conducen a la angiogénesis patógena. Por ejemplo, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) tiene capacidades angiogénicas y mitógenas. Específicamente, el VEGF induce la proliferación de células endoteliales vasculares, favoreciendo la formación de nuevos vasos sanguíneos. La esfingosina cinasa es un mediador importante de las acciones del VEGF. Por ejemplo, se ha demostrado que la SK media la activación de las proteínas cinasas inducida por VEGF. La producción de la S1P por la SK estimula la actividad del NFκB que conduce a la producción de COX-2, moléculas de adhesión y VEGF adicional y otras citocinas, todos los cuales promueven la angiogénesis. Además, la expresión de las isoformas endoteliales de la óxido nítrico sintasa (eNOS) está regulada por la SK, y la eNOS también por consiguiente modula la angiogénesis. Por tanto, es probable que la reducción de la producción de la S1P en las células endoteliales sea un método eficaz para tratar los trastornos que surgen de la angiogénesis anormal. Los ejemplos de dichos trastornos incluyen la artritis, el cáncer, la psoriasis, el sarcoma de Kaposi, los hemangiomas, la angiogénesis miocárdica, la aterosclerosis y las enfermedades angiogénicas oculares. El documento US 2008/167352 A1 describe compuestos sustituidos de adamantano con estructuras diferentes y aplicaciones médicas de los mismos.

Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad de inhibidores de la SK mejorados necesarios para su uso como agentes antiproliferativos, antiinflamatorios y antiangiogénicos.

### 30 Sumario de la invención

La presente invención proporciona las siguientes realizaciones como se define en los puntos 1 a 18:

35 1. Un compuesto de fórmula (I)



y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, donde

40 R<sub>1</sub> es H, Cl o F;  
R<sub>2</sub> es H o alquilo;  
m es 1 o 2;  
n es 1, 2, 3, 4 o 5; y  
45 cada R<sub>3</sub> es independientemente H, -C(O)alquilo, -C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OH, R<sub>4</sub>, -C(O)NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, -P(O)(OR<sub>7</sub>)<sub>2</sub> o glucosilo, siempre que al menos un R<sub>3</sub> no sea H, donde

50 R<sub>4</sub> es un aminoácido natural o no natural unido a través del resto carboxilo como un éster,  
R<sub>5</sub> es H o alquilo,  
R<sub>6</sub> es H o alquilo, y  
cada R<sub>7</sub> es independientemente H o alquilo,

donde cada alquilo tiene independientemente 1-20 átomos de carbono.

2. Un compuesto de acuerdo con el punto 1, donde R<sub>1</sub> es Cl.

3. Un compuesto de acuerdo con el punto 1 o el punto 2, donde R<sub>2</sub> es H.

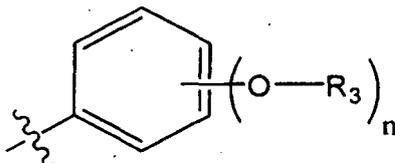
5 4. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-3, donde n es 1 o 2.

5. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-4, donde m es 2.

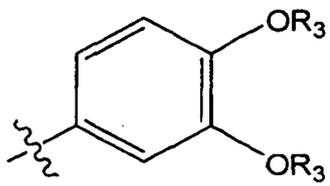
6. Un compuesto de acuerdo con el punto 5, donde n es 2.

10

7. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-5, donde el resto



15 tiene la estructura



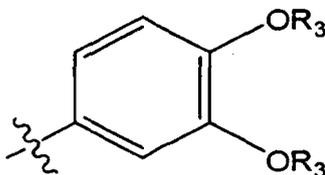
8. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-6, donde R<sub>3</sub> no es H.

20

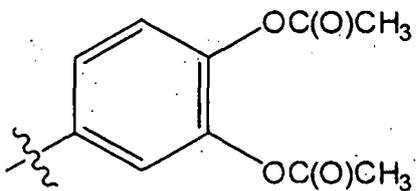
9. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-6, donde cada R<sub>3</sub> es un -C(O)alquilo.

10. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-4, donde el resto

25



tiene la estructura



30

11. Un compuesto de acuerdo con el punto 1 seleccionado entre el grupo que consiste en:

- 2-acetoxi-5-(2-{{[3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino}etil})fenil éster del ácido acético;
- 2-propioniloxi-5-(2-{{[3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino}etil})fenil éster del ácido propiónico;
- 2-butililoxi-5-(2-{{[3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino}etil})fenil éster del ácido butírico;
- 5-(2-{{[3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]amino}etil})-2-hidroxifenil éster del ácido isobutírico; y
- 5-(2-{{[3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]amino}etil})-2-hidroxifenil éster del ácido 2-amino-3-metil-butírico, preferentemente 2-acetoxi-5-(2-{{[3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino}etil})fenil éster del ácido acético.

35

40 12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en combinación con un vehículo, medio o agente auxiliar farmacéuticamente aceptables.

13. Un compuesto o sal de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-11, o una composición de acuerdo con el punto 12 para su uso en la inhibición de la esfingosina cinasa en un paciente que necesite dicha inhibición.

14. Un compuesto o sal de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-11, o una composición de acuerdo con el punto 12 para su uso en el tratamiento de un trastorno en un paciente, teniendo dicho trastorno una activación anormal de la esfingosina cinasa.

15. Un compuesto o sal de acuerdo con cualquiera de los puntos 1-11, o una composición de acuerdo con el punto 12 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre una enfermedad hiperproliferativa, una enfermedad inflamatoria, o una enfermedad angiogénica.

16. El compuesto para su uso de acuerdo con el punto 15, donde la enfermedad es una enfermedad hiperproliferativa seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, aterosclerosis, reestenosis, trastornos proliferativos de las células mesangiales y psoriasis; o la enfermedad es una enfermedad inflamatoria seleccionada entre el grupo que consiste en enfermedad intestinal inflamatoria, artritis, aterosclerosis, asma, alergia, insuficiencia renal inflamatoria, shock circulatorio, lesión por isquemia-reperusión, insuficiencia orgánica post-quirúrgica, esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, inflamación de la piel, enfermedad periodontal, psoriasis y enfermedades de la inmunidad mediadas por linfocitos T.

17. El compuesto para su uso de acuerdo con el punto 15, donde la enfermedad es un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cánceres de cabeza y cuello, cánceres de pulmón, cánceres del tracto gastrointestinal, cánceres de mama, cánceres ginecológicos, cánceres testiculares, cánceres del tracto urinario, cánceres neurológicos, cánceres endocrinos, cánceres de piel, sarcomas, cánceres del mediastino, cánceres retroperitoneales, cánceres cardiovasculares, mastocitosis, carcinosarcomas, cilindroma, cánceres dentales, estioneuroblastoma, cáncer de uraco, carcinoma de células de Merkel, paragangliomas, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemias crónicas, leucemias agudas, cánceres mieloproliferativos, discrasias de células plasmáticas y síndromes mielodisplásicos; o un trastorno proliferativo de las células mesangiales seleccionado entre el grupo que consiste en glomerulonefritis, nefropatía diabética, nefrosclerosis maligna, síndromes microangiopáticos trombóticos, rechazo de trasplantes y glomerulopatías.

18. El compuesto para su uso de acuerdo con el punto 13, donde la enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en

(i) una enfermedad intestinal inflamatoria seleccionada entre el grupo que consiste en colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y colitis indeterminada;

(ii) una enfermedad de la inmunidad mediada por linfocitos T seleccionada entre el grupo que consiste en encefalomiелitis alérgica, neuritis alérgica, rechazo de trasplantes de aloinjertos, enfermedad de injerto contra hospedador, miocarditis, tiroiditis, nefritis, lupus eritematoso sistémico y diabetes mellitus insulino-dependiente;

(iii) una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, osteoartritis, síndrome de Caplan, síndrome de Felty, síndrome de Sjogren, espondilitis anquilosante, enfermedad de Still, condrocalcinosis, gota, fiebre reumática, enfermedad de Reiter y síndrome de Wissler;

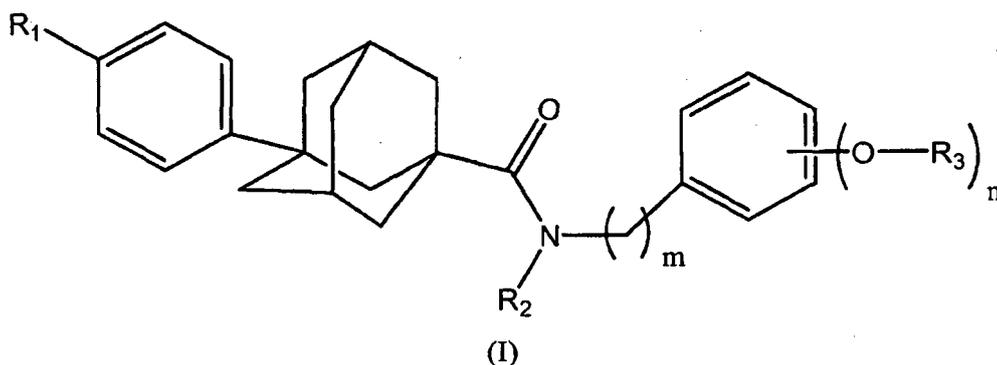
(iv) una insuficiencia renal inflamatoria seleccionada entre el grupo que consiste en glomerulonefritis, lesión glomerular, síndrome nefrótico, nefritis intersticial, nefritis lúpica, enfermedad de Goodpasture, granulomatosis de Wegener, vasculitis renal, nefropatía por IgA y la enfermedad glomerular idiopática;

(v) una inflamación de la piel seleccionada entre el grupo que consiste en psoriasis, dermatitis atópica, sensibilidad de contacto y acné; y

(vi) una enfermedad angiogénica seleccionada entre el grupo que consiste en retinopatía diabética, artritis, cáncer, psoriasis, sarcoma de Kaposi, hemangiomas, angiogénesis miocárdica, neovascularización de la placa aterosclerótica y enfermedades angiogénicas oculares tales como neovascularización coroidea, retinopatía del prematuro (fibroplasias retrolentales), degeneración macular, rechazo de injerto de córnea, rubeosis, glaucoma neovascular y síndrome de Osler-Webber.

En el presente documento se desvelan los compuestos de fórmula (I), que se muestran a continuación, las composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos y los métodos que emplean dichos compuestos o composiciones en el tratamiento o la prevención de la enfermedad hiperproliferativa, la enfermedad inflamatoria o la enfermedad angiogénica. Más específicamente, la invención se refiere a compuestos que son profármacos que se metabolizan a compuestos que son capaces de inhibir la SK. Estos profármacos pueden ser, por ejemplo, ésteres de alquilo, succinato, ésteres de aminoácido, carbamatos, fosfatos y glucósidos.

En el presente documento se desvelan compuestos de fórmula (I):



y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, donde

- 5     R<sub>1</sub> es H, Cl o F;  
       R<sub>2</sub> es H o alquilo;  
       m es 1 o 2;  
       n es 1, 2, 3, 4 o 5; y  
 10    cada R<sub>3</sub> es independientemente H, -C(O)alquilo, -C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OH, R<sub>4</sub>, -C(O)NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, -P(O)(OR<sub>7</sub>)<sub>2</sub> o glucosilo,  
       donde  
       R<sub>4</sub> es un aminoácido natural o no natural unido a través del resto carboxilo como un éster,  
 15    R<sub>5</sub> es H o alquilo,  
       R<sub>6</sub> es H o alquilo, y  
       cada R<sub>7</sub> es independientemente H o alquilo,

Los términos generales para estos compuestos incluyen alquil ésteres, succinatos, aminoácido ésteres, carbamatos, fosfatos y glucósidos.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto o sal de fórmula (I) y al menos un vehículo, disolvente, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptables.

En el presente documento también se desvelan métodos para el tratamiento o prevención de la enfermedad hiperproliferativa, la enfermedad inflamatoria o la enfermedad angiogénica.

### Descripción de los dibujos

Figura 1. Modelo para la conversión del Compuesto 2 en el Compuesto 1. El compuesto 2 y varios otros profármacos de la presente invención son ésteres del Compuesto 1. Estos compuestos son sustratos para las esterazas presentes en la sangre y/o tejidos de mamíferos, produciendo de este modo el inhibidor de la SK activo.

Figura 2. Cromatograma del Compuesto 2. El Compuesto 2 purificado se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución utilizando un sistema Waters 2795 equipado con un detector de matriz de fotodiodos. Las separaciones se realizaron utilizando una columna Nova-Pak C18 (3,9 × 150 mm, Waters), se eluyó isocráticamente con una fase móvil que consistía en Disolvente A al 65% (metanol que contiene ácido fórmico al 0,1%) y Disolvente B al 35% (acetonitrilo al 5% y agua al 95% que contiene ácido fórmico al 0,1%) a un caudal de 0,6 ml/min. El Compuesto 2 se detectó por su absorbancia a la longitud de onda de 265 nm. Los datos demuestran que un único compuesto está presente inicialmente en la preparación del Compuesto 2.

Figura 3. Conversión del compuesto 2 en el Compuesto 1 por enzimas plasmáticas. El Compuesto 2 purificado se incubó con plasma de ratón durante 5 minutos a temperatura ambiente. La muestra después se extrajo y se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución como se ha descrito para la Figura 2. Los datos demuestran que las esterazas del plasma de ratón convierten rápidamente el Compuesto 2 en el Compuesto 1.

Figura 4. Conversión del compuesto 2 en el Compuesto 1 *in vivo*. Se trataron ratones Balb/C hembra, de 6-8 semanas de edad, ya sea con el Compuesto 1 (♦) o el Compuesto 2 (♦) a 50 mg/kg por inyección intravenosa. Se sacrificaron los ratones a los tiempos indicados después de la inyección, y la sangre se recogió por punción cardíaca y se preparó plasma. El plasma después se extrajo y se analizó para determinar los niveles de Compuesto 1 mediante HPLC. Los datos demuestran que los niveles circulantes de Compuesto 1 se mantienen durante un tiempo más largo mediante la administración del profármaco, es decir, el Compuesto 2.

Figura 5. Inhibición de la proliferación de células tumorales por el Compuesto 1 y el Compuesto 2. Se expusieron células de adenocarcinoma mamario JC murino a las concentraciones indicadas de ya sea el Compuesto 1 (■) o el Compuesto 2 (A) durante 72 h. Al final de la exposición, el número de células tumorales viables se cuantificó utilizando el ensayo de MTS. Los valores representan la fracción de células supervivientes en comparación con las células de control tratadas con DMSO (vehículo). Los datos demuestran que la forma de profármaco del

Compuesto 1, es decir, el Compuesto 2, tiene una potencia mayor (el 50% de las células mueren a una dosis menor) y una eficacia mayor (muere un porcentaje mayor de células a la concentración óptima) para inhibir proliferación de células tumorales.

Figura 6. Actividad antitumoral del Compuesto 2 solo y en combinación con gemcitabina. Se inyectaron por vía subcutánea células de adenocarcinoma mamario JC murino en ratones Balb/c y los tumores se dejaron crecer hasta aproximadamente  $15,0\text{ mm}^3$ . Los animales después se trataron con vehículo solo (■), 1 mg/kg de gemcitabina semanal (▲), 50 mg/kg del Compuesto 2 al día durante cinco días por semana (▼) o una combinación de gemcitabina más el Compuesto 2 (◆). Los tumores se midieron dos veces por semana. Los valores que se muestran representan el volumen tumoral promedio  $\pm$  la desviación estándar para cada grupo (n = 8). Los datos demuestran que el Compuesto 2 solo causa una reducción significativa del crecimiento tumoral, y que la combinación del Compuesto 2 más gemcitabina tiene una mayor actividad antitumoral que cualquiera de los fármacos solos.

Figura 7. Efectos del Compuesto 1 y el Compuesto 2 en el Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE) en el modelo de colitis aguda inducida por DSS. Se trataron ratones C57BL/6 durante 6 días de la siguiente manera: DSS al 2% en el agua de bebida y administración oral diaria de vehículo (PEG 400 al 46,7%, una solución al 46,7% de Tween 80 al 0,375% en solución salina y etanol al 6,6%); o DSS al 2% en el agua de bebida y la administración oral diaria de 50 mg/kg de Compuesto 1 o Compuesto 2 en el vehículo. Después de 6 días, se calculó el IAE para cada grupo. Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar para 5-6 ratones por grupo. Los datos demuestran que ambos compuestos 1 y 2 reducen la gravedad de la colitis en este modelo, siendo el Compuesto 2 más eficaz que el Compuesto 1.

Figura 8. Efectos del Compuesto 1 y el Compuesto 2 en la longitud del colon en el modelo de colitis aguda inducida por DSS. Se trataron ratones C57BL/6 durante 6 días de la siguiente manera: DSS al 2% en el agua de bebida y administración oral diaria de vehículo (descrito en la Figura 7); o DSS al 2% en el agua de bebida y la administración oral de 50 mg/kg de Compuesto 1 o Compuesto 2 dos veces al día en el vehículo. Después de 6 días, se sacrificaron los animales y se midió la longitud del colon. Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar para 6-7 ratones por grupo. En este modelo, la longitud del colon disminuye a medida que la enfermedad progresa. Los datos demuestran que ambos compuestos 1 y 2 reducen la contracción del colon inducida por la colitis, siendo el Compuesto 2 más eficaz que el Compuesto 1.

Figura 9. Efectos del Compuesto 1 y el Compuesto 2 en la infiltración de neutrófilos en el colon en el modelo de colitis aguda inducida por DSS. Se trataron ratones C57BL/6 durante 6 días de la siguiente manera: DSS al 2% en el agua de bebida y administración oral diaria de vehículo (descrito en la Figura 7); o DSS al 2% en el agua de bebida y la administración oral de 50 mg/kg de Compuesto 1 o Compuesto 2 en el vehículo. Después de 6 días, se sacrificaron los animales y los se recogieron los cólones. Se midió la actividad de la mieloperoxidasa (AMP) se midió y se normalizó por la concentración de proteína de las muestras. Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar para 6-7 ratones por grupo. En este modelo, la actividad AMP del colon aumenta como resultado de la infiltración de neutrófilos en el colon a medida que la enfermedad progresa. Los datos demuestran que ambos compuestos 1 y 2 reducen la infiltración de neutrófilos inducida por la colitis en el colon, siendo el Compuesto 2 más eficaz que el Compuesto 1.

Figura 10. Efectos de profármacos de éster en la longitud del colon en el modelo de colitis aguda inducida por DSS. Se trataron ratones C57BL/6 durante 6 días de la siguiente manera: DSS al 2% en el agua de bebida y administración oral diaria de vehículo (descrito en la Figura 7); o DSS al 2% en el agua de bebida y la administración oral de 50 mg/kg de los profármacos de éster indicados en el vehículo. Después de 6 días, se sacrificaron los animales y se midió la longitud del colon. Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar para 4-5 ratones por grupo. En este modelo, la longitud del colon disminuye a medida que la enfermedad progresa. Los datos demuestran que cada uno de los profármacos de éster protege contra la contracción del colon inducida por la colitis.

Figura 11. Efectos de profármacos de éster en la infiltración de neutrófilos en el colon en el modelo de colitis aguda inducida por DSS. Se trataron ratones C57BL/6 durante 6 días de la siguiente manera: DSS al 2% en el agua de bebida y administración oral diaria de vehículo (descrito en la Figura 7); o DSS al 2% en el agua de bebida y la administración oral de 50 mg/kg de los profármacos de éster indicados en el vehículo. Después de 6 días, se sacrificaron los animales y se midió la longitud del colon. Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar para 4-5 ratones por grupo. En este modelo, la actividad AMP del colon aumenta como resultado de la infiltración de neutrófilos en el colon a medida que la enfermedad progresa. Los datos demuestran que, con la excepción del Compuesto 6, cada uno de los profármacos de éster reduce la infiltración de neutrófilos en el colon.

Figura 12. Efectos del Compuesto 1 y el Compuesto 2 en la histología del colon en el modelo de enfermedad de Crohn inducida por TNBS. El día 0, se les administró TNBS a ratas Sprague-Dawley hembra utilizando un catéter de acero inoxidable que se insertó en el colon (8<sup>o</sup>cm proximal al ano; 1,0 ml de solución que contiene 30 mg de TNBS y etanol al 20% en PBS). Los días 0-5 los animales recibieron alimentación por sonda oral diaria de vehículo (descrito en la Figura 7) o 50 mg/kg del Compuesto 1 o Compuesto 2 en el vehículo. El día 6, se retiraron los cólones, se pesaron y se puntuaron para determinar el daño macroscópico. Los 6<sup>o</sup>cm distales se seccionaron transversalmente para la histología y los análisis bioquímicos posteriores. En este modelo, la puntuación macroscópica es un índice de daño histológico al colon que aumenta a medida que la enfermedad progresa. Los datos demuestran que el Compuesto 2 reduce el daño al colon, mientras que el Compuesto 1 es mucho menos activo en este modelo.

Figura 13. Efectos del Compuesto 1 y el Compuesto 2 en el peso de colon en el modelo de enfermedad de Crohn

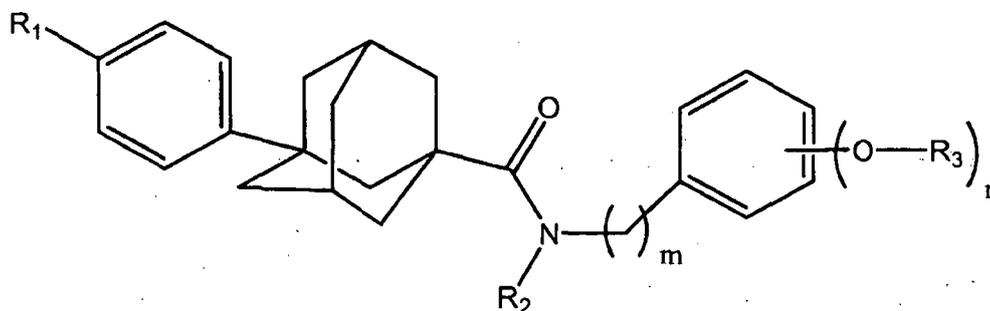
inducida por TNBS. Se midieron los pesos de los cólones de las ratas descritas en la Figura 12. Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar para 5-6 ratas por grupo. En este modelo, el peso del colon aumenta a medida que la enfermedad progresa debido a edema mediado por la inflamación progresiva. Los datos demuestran que el Compuesto 2 reduce el edema del colon, mientras que el Compuesto 1 es mucho menos activo en este modelo.

Figura 14. Efectos del Compuesto 2 sobre la infiltración de neutrófilos en el colon en el modelo de enfermedad de Crohn inducida por TNBS. La infiltración de neutrófilos se evaluó en las ratas descritas en la Figura 12. Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar para 5-6 ratas por grupo. En este modelo, la actividad AMP del colon aumenta como resultado de la infiltración de neutrófilos en el colon a medida que la enfermedad progresa. Los datos demuestran que el Compuesto 2 reduce la infiltración de neutrófilos en este modelo.

### Descripción detallada de la invención

A menos que los sustituyentes para una fórmula particular se definan expresamente para esa fórmula, se entiende que tienen las definiciones que se exponen en relación con la fórmula precedente a la cual hace referencia la fórmula particular.

Como se señaló anteriormente, en el presente documento se desvelan compuestos de fórmula (I):



y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, donde

R<sub>1</sub> es H, Cl o F;

R<sub>2</sub> es H o alquilo;

m es 1 o 2;

n es 1, 2, 3, 4 o 5; y

cada R<sub>3</sub> es independientemente H, -C(O)alquilo, -C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OH, R<sub>4</sub>, -C(O)NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, -P(O)(OR<sub>7</sub>)<sub>2</sub> o glucosilo,

siempre que al menos un R<sub>3</sub> no sea H,

donde

R<sub>4</sub> es un aminoácido natural o no natural unido a través del resto carboxilo como un éster,

R<sub>5</sub> es H o alquilo,

R<sub>6</sub> es H o alquilo, y

cada R<sub>7</sub> es independientemente H o alquilo,

Los términos generales para estos compuestos incluyen ésteres, succinatos, ésteres de aminoácidos, carbamatos, fosfatos y glucósidos.

Ciertos compuestos de fórmula (I) preferidos incluyen compuestos donde R<sub>1</sub> es Cl. En otras realizaciones, R<sub>1</sub> es H; o R<sub>1</sub> es F.

En ciertas realizaciones, los compuestos de fórmula (I) como se han descrito anteriormente tienen R<sub>2</sub> = H. Por ejemplo, los compuestos de fórmula (I) de una realización preferida tienen R<sub>1</sub> = Cl y R<sub>2</sub> = H.

En ciertas realizaciones, los compuestos de fórmula (I) como se han descrito anteriormente tienen m = 1 o 2. Por ejemplo, en una realización, m = 1. En otra realización, m = 2. En ciertas realizaciones, los compuestos de fórmula (I) como se han descrito anteriormente tienen n = 1 o 2. Por ejemplo, en una realización, n = 1. En otra realización, n = 2. Ciertas realizaciones preferidas de los compuestos de fórmula (I) son aquellas en las que R<sub>1</sub> es Cl, R<sub>2</sub> es H, m es 1 o 2 y n es 1 o 2.

En ciertas realizaciones de los compuestos de fórmula (I) como se han descrito anteriormente, cada R<sub>3</sub> es un -C(O)alquilo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, cada R<sub>3</sub> es -C(O)CH<sub>3</sub>.

En ciertas realizaciones de los compuestos de fórmula (I) como se han descrito anteriormente, cada R<sub>3</sub> es un aminoácido natural o no natural. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, cada R<sub>3</sub> es un aminoácido natural.

En ciertas realizaciones de los compuestos de fórmula (I) como se han descrito anteriormente, cada  $R_3$  es -C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OH.

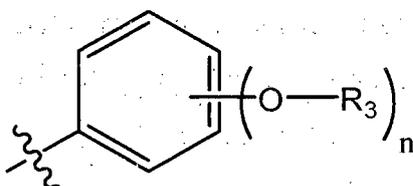
5 En ciertas realizaciones de los compuestos de fórmula (I) como se han descrito anteriormente, cada  $R_3$  es -C(O)NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>.

10 En ciertas realizaciones de los compuestos de fórmula (I) como se han descrito anteriormente, cada  $R_3$  es -P(O)(OR<sub>7</sub>)<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, ambos R<sub>7</sub> son H. En otras realizaciones, ambos R<sub>7</sub> son alquilo (por ejemplo, un alquilo inferior no sustituido).

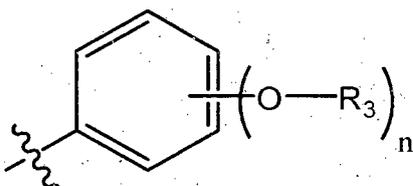
En ciertas realizaciones de los compuestos de fórmula (I) como se han descrito anteriormente, cada R<sub>5</sub> es glucosilo.

15 En ciertas realizaciones de los compuestos de fórmula (I) como se han descrito anteriormente, ningún R<sub>3</sub> es H. En ciertas realizaciones de los compuestos de fórmula (I) como se han descrito anteriormente, todos los R<sub>3</sub> son iguales.

En ciertas realizaciones de los compuestos de fórmula (I) como se han descrito anteriormente, el resto

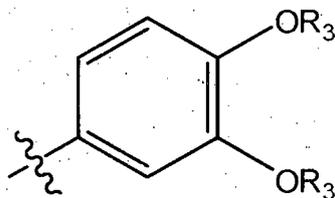


20 resto es un catecol con una sustitución en al menos un -OH del catecol. Por ejemplo, en una realización, el resto



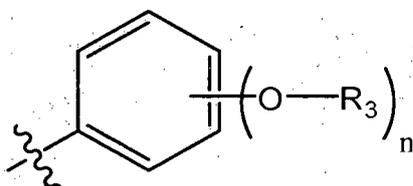
tiene la estructura

25



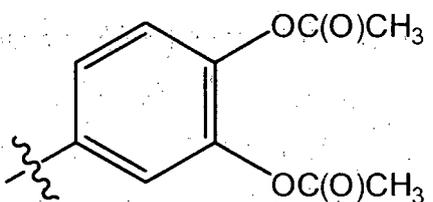
En una realización particularmente preferida de los compuestos de fórmula (I) como se han descrito anteriormente, el resto

30



tiene la estructura

35

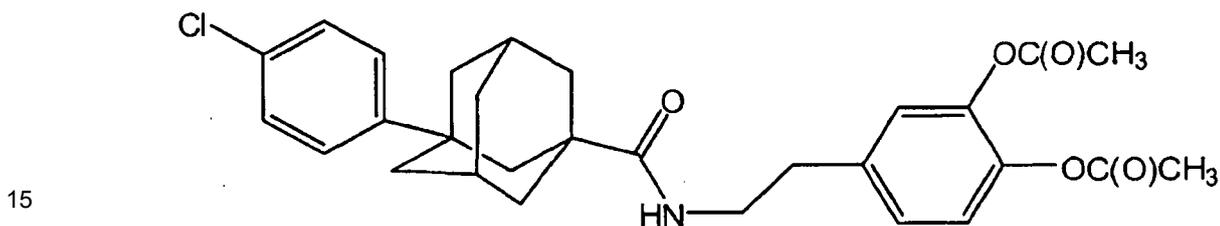


En una realización especialmente preferida de la invención, los compuestos de fórmula (I) tienen  $R_1 = \text{Cl}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $m = 2$ ,  $n = 2$  y cada  $R_3 = -\text{C}(\text{O})\text{alquilo}$ , especialmente  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ .

Por ejemplo, los compuestos de la invención incluyen:

- 5  
 2-acetoxi-5-(2-([3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino)etil)fenil éster del ácido acético;  
 2-propioniloxi-5-(2-([3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino)etil)fenil éster del ácido propiónico;  
 2-butiloxi-5-(2-([3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino)etil)fenil éster del ácido butírico;  
 10 5-(2-([3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]amino)etil)-2-hidroxifenil éster del ácido isobutírico; y  
 5-(2-([3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]amino)etil)-2-hidroxifenil éster del ácido 2-amino-3-metil-butírico.

Un compuesto de la presente invención particularmente preferido es 2-acetoxi-5-(2-([3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino)etil)fenil éster del ácido acético (Compuesto 2):



En el presente documento se desvelan métodos para el tratamiento de un paciente que tiene, o en la prevención de que un paciente contraiga, una enfermedad o afección seleccionada entre el grupo que consiste en una enfermedad hiperproliferativa, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad angiogénica, que incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) como se ha descrito anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente que necesite dicho tratamiento o prevención. Una enfermedad hiperproliferativa preferida, para cuyo tratamiento o prevención son útiles los compuestos de la invención, es el cáncer, incluyendo tumores sólidos tales como cánceres de cabeza y cuello, cánceres de pulmón, cánceres del tracto gastrointestinal, cánceres de mama, cánceres ginecológicos, cánceres testiculares, cánceres del tracto urinario, cánceres neurológicos, cánceres endocrinos, cánceres de piel, sarcomas, cánceres del mediastino, cánceres retroperitoneales, cánceres cardiovasculares, mastocitosis, carcinosarcomas, cilindroma, cánceres dentales, estesioneuroblastoma, cáncer de uraco, carcinoma de células de Merkel, paragangliomas, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemias crónicas, leucemias agudas, cánceres mieloproliferativos, discrasias de células plasmáticas y síndromes mielodisplásicos.

Otras enfermedades preferidas que pueden tratarse o prevenirse con los compuestos de la invención incluyen las enfermedades inflamatorias, tales como enfermedad intestinal inflamatoria, artritis, aterosclerosis, asma, alergia, insuficiencia renal inflamatoria, shock circulatorio, lesión por isquemia-reperfusión, insuficiencia orgánica postquirúrgica, esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, inflamación de la piel, enfermedad periodontal, psoriasis y enfermedades de la inmunidad mediadas por linfocitos T, incluyendo la encefalomiелitis alérgica, neuritis alérgica, rechazo de trasplantes de aloinjertos, enfermedad de injerto contra hospedador, miocarditis, tiroiditis, nefritis, lupus eritematoso sistémico y diabetes mellitus insulino-dependiente.

Otras enfermedades preferidas que pueden tratarse o prevenirse con los compuestos de la invención incluyen las enfermedades angiogénicas, tales como retinopatía diabética, artritis, psoriasis, sarcoma de Kaposi, hemangiomas, angiogénesis miocárdica, neovascularización de la placa aterosclerótica, y enfermedades angiogénicas oculares tales como neovascularización coroidea, retinopatía del prematuro (fibroplasias retrolentales), degeneración macular, rechazo de injerto de córnea, rubeosis, glaucoma neovascular y síndrome de Osler-Webber.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen un compuesto de fórmula (I) como se ha descrito anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como principio activo, en combinación con un vehículo, medio o agente auxiliar farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse de diversas formas para su administración, incluyendo comprimidos, comprimidos oblongos, píldoras, o pueden envasarse en recipientes adecuados, tales como cápsulas, o, en el caso de las suspensiones, envasarse en botellas. Como se utiliza en el presente documento "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, diluyentes, u otros vehículos líquidos; adyuvantes de dispersión o suspensión; agentes tensioactivos; conservantes; aglutinantes sólidos; lubricantes y similares, según se adapte a la forma de dosificación particular deseada. Diversos vehículos y excipientes utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para su preparación se desvelan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (A. Osol et al. eds., 15ª ed. 1975). Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional sea incompatible con los compuestos químicos de la presente invención, tal como mediante la producción de cualquier efecto biológico indeseable o interacción de otro tipo: de

una manera perjudicial con cualquier otro componente de la composición farmacéutica, está contemplado que el uso del vehículo esté dentro del alcance de la presente invención.

5 En las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el agente activo puede estar presente en una cantidad de al menos el 1% y no más del 99% en peso, sobre la base del peso total de la composición, incluido el vehículo o los agentes auxiliares. Preferentemente, la proporción de agente activo varía entre el 1% y el 70% en peso de la composición. Pueden utilizarse para fabricar la composición vehículos farmacéuticos orgánicos o inorgánicos sólidos o líquidos adecuados para la administración enteral o parenteral. La gelatina, la lactosa, el almidón, el estearato de magnesio, el talco, las grasas y aceites vegetales y animales, la goma de polialquilenglicol, u otros excipientes o diluyentes para medicamentos conocidos pueden ser todos adecuados como vehículos.

15 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse utilizando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaces para el tratamiento de un paciente que tiene, o la prevención de que un paciente contraiga, una enfermedad o afección seleccionada entre el grupo que consiste en una enfermedad hiperproliferativa, una enfermedad inflamatoria y una enfermedad angiogénica. Por tanto, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una cantidad del agente activo suficiente para proporcionar el efecto deseado sobre las células diana. La cantidad exacta necesaria variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto; del compuesto particular; de su modo de administración; y similares.

20 Los compuestos farmacéuticos de la presente invención se formulan preferentemente en formas de dosificación unitarias para su facilidad de administración y su uniformidad de dosificación. "Forma de dosificación unitaria", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una unidad de agente terapéutico, físicamente aislada, adecuada para el animal que se trata. Cada dosis debe contener la cantidad de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, ya sea solo o en asociación con el vehículo farmacéutico seleccionado. Típicamente, la composición farmacéutica se administra en dosis unitarias que contienen de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10.000 mg del agente, prefiriéndose un intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg.

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por vía oral o parenteral, tal como por inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, intravenosa o infusión. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral o parenteral en niveles de dosificación de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1.000 mg/kg, y preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/kg, de peso corporal del animal por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado.

30 Aunque las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse a cualquier sujeto que pueda beneficiarse de los efectos terapéuticos de las composiciones, las composiciones están destinadas en particular al tratamiento de enfermedades en los seres humanos.

35 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administrarán típicamente de 1 a 4 veces al día, a fin de administrar la dosis diaria como se describe en el presente documento. Como alternativa, las dosis dentro de estos intervalos pueden administrarse mediante infusión constante durante un periodo de tiempo prolongado, generalmente de 1 a 96 horas, hasta que se hayan obtenido los beneficios terapéuticos deseados. Sin embargo, la pauta exacta para la administración de los compuestos químicos y las composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento necesariamente dependerá de las necesidades del animal que se trate, el tipo de tratamientos que se administre y el criterio del médico especialista.

40 En ciertas situaciones, los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricos, de modo que los compuestos pueden existir en diferentes formas estereoisoméricas. Estos compuestos pueden ser, por ejemplo, racematos, isómeros no racémicos quirales o diastereómeros. En estas situaciones, los enantiómeros individuales, es decir, las formas ópticamente activas, pueden obtenerse mediante síntesis asimétrica o mediante resolución de los racematos. La resolución de los racematos puede lograrse, por ejemplo, mediante métodos convencionales tales como cristalización en presencia de un agente de resolución; cromatografía, utilizando, por ejemplo, una columna de HPLC quiral; o derivatización de la mezcla racémica con un reactivo de resolución para generar diastereómeros, separando los diastereómeros mediante cromatografía, y retirando el agente de resolución para generar el compuesto original en la forma enantioméricamente enriquecida. Cualquiera de los procedimientos anteriores puede repetirse para aumentar la pureza enantiomérica de un compuesto.

45 Cuando los compuestos descritos en el presente documento contienen dobles enlaces olefínicos u otros centros de asimetría geométrica, y a menos que se especifique lo contrario, se pretende que los compuestos incluyan las configuraciones cis, trans, Z- y E-. Del mismo modo, también se pretenden incluir todas las formas tautoméricas.

50 Las sales atóxicas farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, sales de ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, difosfórico, bromhídrico y nítrico, o sales de ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, cítrico, málico, maleico, fumárico, tartárico, succínico, acético, láctico, metanosulfónico, p-toluenosulfónico, 2-hidroxiethylsulfónico, salicílico y esteárico. De forma similar, los

65

cationes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, sodio, potasio, calcio, aluminio, litio y amonio. Aquellos expertos en la materia reconocerán una amplia diversidad de sales de adición atóxicas farmacéuticamente aceptables.

- 5 La invención proporciona compuestos de fórmula (I) que son profármacos de inhibidores de la SK, y que son útiles para la modulación de la vía de transducción de señales de la esfingomielina, y para el tratamiento y la prevención de enfermedades hiperproliferativas, enfermedades inflamatorias y enfermedades angiogénicas. Los compuestos de la invención pueden ser preparados por un experto en la materia basándose solo en el conocimiento de la estructura química del compuesto. La química para la preparación de los compuestos de la presente invención es conocida por los expertos en la materia. De hecho, existe más de un proceso para preparar los compuestos de la invención. Los ejemplos específicos de métodos de preparación pueden encontrarse en el presente documento y en la técnica.

15 Como se ha tratado anteriormente, los esfingolípidos tienen una importancia crítica en la regulación del equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis. La esfingosina 1-fosfato es producida por la enzima SK y estimula la proliferación de las células tumorales. El agotamiento simultáneo de la ceramida por la acción de la SK bloquea la apoptosis. Los compuestos de la invención son profármacos de inhibidores de la SK humana. Por tanto, la inhibición de la actividad de la SK de acuerdo con la invención atenuará la proliferación de las células tumorales y promoverá la apoptosis. Por tanto, los compuestos de la invención son útiles como antineoplásicos. Además, puesto que la hiperproliferación celular es un proceso necesario en el desarrollo de la aterosclerosis y la psoriasis, los compuestos de la invención, que son profármacos de inhibidores de la SK, son útiles en el tratamiento de estas y otras enfermedades hiperproliferativas. Además, la activación y/o proliferación inadecuadas de clases específicas de células inmunitarias dan como resultado enfermedades inflamatorias y autoinmunes crónicas. En consecuencia, los compuestos de la invención también son útiles en el tratamiento de estas enfermedades. Además, la angiogénesis inadecuada da como resultado una diversidad de enfermedades, como se describe a continuación. En consecuencia, los compuestos de la invención también son útiles en el tratamiento de estas enfermedades.

### **Definiciones**

30 Las definiciones y explicaciones a continuación son para los términos como se utilizan a lo largo de todo el presente documento, incluyendo tanto la memoria descriptiva como las reivindicaciones.

35 Debe señalarse que, como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "la" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene "un compuesto" incluye una mezcla de dos o más compuestos. También hay que señalar que el término "o" se emplea generalmente en este sentido incluyendo "y/o" a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

40 El símbolo "-" en general representa un enlace entre dos átomos de la cadena. Por tanto  $\text{CH}_3\text{-O-CH}_2\text{-CH(Ri)-CH}_3$  representa un compuesto 1-metoxipropano sustituido en 2. Además, el símbolo "-" representa el punto de unión del sustituyente a un compuesto. Por tanto, por ejemplo aril-alquilo( $\text{C}_1\text{-C}_6$ )- indica un grupo alquilarilo, tal como bencilo, unido al compuesto por el resto alquilo.

45 Cuando se indica que múltiples sustituyentes están unidos a una estructura, debe apreciarse que los sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

50 El término "alquilo", como se utiliza en el presente documento solo o como parte de un resto mayor, se refiere a un hidrocarburo alifático saturado incluyendo grupos de cadena lineal, de cadena ramificada o cíclicos (también llamados "cicloalquilos"). Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *iso*-, *sec*- y *terc*-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, 3-etilbutilo y similares. Preferentemente, el grupo alquilo tiene de 1 a 20 átomos de carbono (siempre que se indica en el presente documento un intervalo numérico, por ejemplo, "1-20", significa que el grupo, en este caso el grupo alquilo, puede contener 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc. hasta e incluyendo 20 átomos de carbono). Más preferentemente, es un alquilo de tamaño medio que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Mucho más preferentemente, es un alquilo inferior que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo un alquilo inferior no sustituido. El cicloalquilo puede ser monocíclico o un sistema policíclico condensado. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo y adamantilo. El grupo alquilo o cicloalquilo puede no estar sustituido o estar sustituido con 1, 2, 3 o más sustituyentes. Los ejemplos de dichos sustituyentes incluyen, sin limitación, halo, hidroxilo, amino, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilo, arilo, ariloxi, arilalquilo, radical heterocíclico y (radical heterocíclico)oxi. Los ejemplos incluyen fluorometilo, hidroxietilo, 2,3-dihidroxietilo, (2- o 3-furanil)metilo, ciclopropilmetilo, benciloxietilo, (3-piridinil)metilo, (2-tienil)etilo, hidroxipropilo, aminociclohexilo, 2-dimetilaminobutilo, metoximetilo, N-piridiniletilo y dietilaminoetilo.

65 El término "solvato" significa una asociación física de un compuesto de la presente invención con una o más moléculas de disolvente. Esta asociación física implica grados variables de enlace iónico y covalente, incluyendo el enlace de hidrógeno. En ciertos casos, el solvato será susceptible de aislamiento, por ejemplo cuando una o más moléculas de disolvente se incorporan en la red cristalina del sólido cristalino. "Solvato" abarca tanto la fase de

solución como los solvatos aislables. Los solvatos ejemplares incluyen etanolatos, metanolatos y similares. "Hidrato" es un solvato donde el disolvente es agua.

5 Los compuestos que tienen la misma fórmula molecular pero difieren en la naturaleza o secuencia de unión de sus átomos o la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "isómeros". Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros". Los estereoisómeros que no son imágenes especulares uno del otro se denominan "diastereómeros" y aquellos que son imágenes especulares no superponibles entre sí se denominan "enantiómeros". Cuando un compuesto tiene un centro asimétrico, por ejemplo, un átomo de carbono que está unido a cuatro grupos diferentes, es posible un par de enantiómeros. Un enantiómero  
10 puede caracterizarse por la configuración absoluta de su centro asimétrico y se describe por las reglas de secuenciación R y S de Cahn y Prelog, que son bien conocidas por aquellos expertos en la materia. Adicionalmente, los enantiómeros pueden caracterizarse por la manera en la que una solución del compuesto rota un plano de luz polarizada e indicarse como dextrógiro o levógiro (es decir, como isómeros (+) o (-) respectivamente). Un compuesto quiral puede existir ya sea como enantiómero individual o como una mezcla de los mismos. Una mezcla que  
15 contiene proporciones iguales de los enantiómeros se llama "mezcla racémica".

Los compuestos de la presente invención pueden poseer uno o más centros asimétricos; dichos compuestos pueden por tanto producirse como estereoisómeros (R) o (S) o como mezclas de los mismos. A menos que se indique lo contrario, se pretende que la memoria descriptiva y las reivindicaciones incluyan ambos enantiómeros individuales,  
20 así como mezclas, racémicas o de otra forma, de los mismos.

A menos que se indique lo contrario, también se pretende que las estructuras representadas en el presente documento incluyan los compuestos que difieren sólo en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, los compuestos que tienen las estructuras del presente documento, con la excepción del  
25 reemplazo de un hidrógeno por un deuterio o tritio o el reemplazo de un carbono por un carbono enriquecido con  $^{13}\text{C}$   $^{14}\text{C}$ , están dentro del alcance de la presente invención. Dichos compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas analíticas o sondas en ensayos biológicos.

Como se utilizan en el presente documento, "trastorno relacionado con la SK", "trastorno provocado por la SK" y  
30 "actividad anormal de la SK" se refieren todos a una afección caracterizada por la actividad catalítica inadecuada de la SK, es decir, menor o, más habitualmente, mayor. La actividad catalítica inadecuada puede surgir como resultado de: (1) la expresión de SK en células que normalmente no expresan SK, (2) la actividad catalítica aumentada de la SK que conduce a un proceso celular no deseado, tal como, sin limitación, la proliferación celular, la regulación génica, la resistencia a la apoptosis y/o la diferenciación. Dichos cambios en la expresión de la SK pueden  
35 producirse por el aumento de la expresión de la SK y/o la mutación de la SK de modo que se mejora su actividad catalítica, (3) la disminución de la actividad catalítica de la SK conduce a reducciones no deseadas de los procesos celulares. Algunos ejemplos de los trastornos relacionados con la SK, sin limitación, se describen en otra parte de la presente solicitud.

40 El término "método" se refiere a las maneras, medios, técnicas y procedimientos para la realización de una tarea determinada incluyendo, pero no limitado a, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos bien conocidos o que se desarrollan fácilmente a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los profesionales de las técnicas química, farmacéutica, biológica, bioquímica y médica.

45 Los términos "modulación" o "modular" se refieren a la alteración de la actividad catalítica de la SK. En particular, la modulación se refiere a la activación o, preferentemente, a la inhibición de la actividad catalítica de la SK, dependiendo de la concentración del compuesto o la sal a los que se expone la SK.

50 La expresión "actividad catalítica" como se utiliza en el presente documento se refiere a la velocidad de fosforilación de la esfingosina bajo la influencia de la SK.

La expresión "poner en contacto" como se utiliza en el presente documento se refiere a poner juntos un compuesto de la presente invención y la SK de modo que el compuesto pueda afectar a la actividad catalítica de la SK, ya sea directamente, es decir, mediante la interacción con la propia SK, o indirectamente, es decir, mediante la alteración  
55 de la localización intracelular de la SK. Dicho "poner en contacto" puede realizarse *in vitro*, es decir, en un tubo de ensayo, una placa de Petri o similares. En un tubo de ensayo, el contacto puede implicar solamente un compuesto y la SK o puede implicar células enteras. Las células también pueden mantenerse o cultivarse en placas de cultivo celular y ponerse en contacto con un compuesto en ese medio. En este contexto, la capacidad de un compuesto particular para influir en un trastorno relacionado con la SK puede determinarse antes de intentar el uso de los compuestos *in vivo* con organismos vivos más complejos. Para las células externas al organismo, existen múltiples  
60 métodos, y son bien conocidos por aquellos expertos en la materia, para permitir el contacto de los compuestos con la SK incluyendo, pero no limitado a, la microinyección celular directa y numerosas técnicas para promover el movimiento de compuestos a través de una membrana biológica.

65 La expresión "*in vitro*" como se utiliza en el presente documento se refiere a procedimientos realizados en un entorno artificial, como por ejemplo, sin limitación, en un tubo de ensayo o un sistema de cultivo celular. El experto

entenderá que, por ejemplo, una enzima SK aislada puede ponerse en contacto con un modulador en un entorno *in vitro*. Como alternativa, una célula aislada puede ponerse en contacto con un modulador en un medio *in vitro*.

5 El término "*in vivo*" como se utiliza en el presente documento se refiere a procedimientos realizados dentro de un organismo vivo tal como, sin limitación, un ser humano, ratón, rata, conejo, bovino, equino, porcino, canino, felino o primate.

10 El término "CI<sub>50</sub>" o "concentración inhibitoria del 50%" como se utiliza en el presente documento, se refiere a la concentración de un compuesto que reduce un proceso biológico en un 50%. Estos procesos pueden incluir, pero sin limitación, reacciones enzimáticas, es decir, la inhibición de la actividad catalítica de la SK, o propiedades celulares, por ejemplo, la proliferación celular, la apoptosis o la producción celular de S1P.

15 Como se utiliza en el presente documento, "administrar" o "administración" se refieren a la entrega de un compuesto o sal de la presente invención o de una composición farmacéutica que contiene un compuesto o sal de la presente invención a un organismo con el propósito de prevenir o tratar un trastorno relacionado con la SK.

Como se utilizan en el presente documento, los términos "prevenir" y "prevención" se refieren a un método para impedir que un organismo contraiga un trastorno relacionado con la SK.

20 Como se utiliza en el presente documento, los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren a un método para aliviar o anular un trastorno mediado por la SK y/o sus consiguientes síntomas.

25 El término "organismo" se refiere a cualquier entidad viva compuesta por al menos una célula. Un organismo vivo puede ser tan simple como, por ejemplo, una sola célula eucariótica o tan complejo como un mamífero. En un aspecto preferido de la presente invención, el organismo es un mamífero. En un aspecto particularmente preferido de la presente invención, el mamífero es un ser humano.

30 Una "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de uno o más de los compuestos descritos en el presente documento, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes fisiológicamente aceptables. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo

35 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica del precursor. Dichas sales incluyen: (1) sal de adición de ácido que se obtiene por reacción de la base libre del precursor con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico y similares o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido (D) o (L)-málico, ácido maleico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico y similares, preferentemente ácido clorhídrico o ácido (L)-málico; o (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el precursor se reemplaza por ya sea un ion metálico, por ejemplo un ion de metal alcalino, un ion alcalinotérreo o un ion de aluminio; o se coordina con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares.

45 Como se utiliza en el presente documento, la expresión un "vehículo fisiológicamente aceptable" se refiere a un vehículo o diluyente que no causa irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Típicamente, esto incluye aquellas propiedades y/o sustancias que son aceptables para el paciente desde un punto farmacológico/toxicológico y para el químico farmacéutico que las fabrica desde un punto de vista físico/químico con respecto a la composición, formulación, estabilidad, aceptación del paciente y biodisponibilidad.

50 Un "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Los ejemplos de excipientes incluyen, sin limitación, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa (que incluyen celulosa microcristalina), gelatina, aceites vegetales, polietilenglicoles, diluyentes, agentes granulantes, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares.

55 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" como se utiliza en el presente documento se refiere a aquella cantidad del compuesto que se administra que es eficaz para reducir o disminuir al menos un síntoma de la enfermedad que se trata o para reducir o retrasar la aparición de uno o más marcadores clínicos o síntomas de la enfermedad. En referencia al tratamiento del cáncer, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad que tiene el efecto de: (1) reducir el tamaño del tumor, (2) inhibir, es decir, ralentizar hasta cierto punto, preferentemente detener, la metástasis tumoral, (3) inhibir, es decir, ralentizar hasta cierto punto, preferentemente detener, el crecimiento tumoral, y/o (4) aliviar hasta cierto punto, preferentemente eliminar, uno o más síntomas asociados al cáncer.

65 Los compuestos de la presente invención actúan como profármacos. El término "profármaco" se refiere a un agente que se convierte en el fármaco precursor *in vivo*. Los profármacos son a menudo útiles porque, en algunas

situaciones, pueden ser más fáciles de administrar que el fármaco precursor. Pueden, por ejemplo, ser biodisponibles por administración oral mientras que el fármaco precursor no lo es. El profármaco también puede tener una solubilidad mejorada en las composiciones farmacéuticas sobre el fármaco precursor. Un ejemplo, sin limitación, de un profármaco sería un compuesto de la presente invención que se administra en forma de un éster de alquilo, succinato, éster de aminoácido, carbamato, fosfato o glucósido.

Los compuestos de la presente invención también pueden ser metabolizados por enzimas del cuerpo del organismo, tal como un ser humano, para generar un metabolito que pueda modular la actividad de la SK.

## 10 Indicaciones

La esfingosina cinasa (SK), cuya actividad catalítica es modulada por los metabolitos de los compuestos y composiciones de la presente invención, es una enzima clave implicada en vías de señalización que se activan de forma anormal en una diversidad de enfermedades. El siguiente análisis describe los papeles de la SK en enfermedades hiperproliferativas, inflamatorias y angiogénicas y, en consecuencia, proporciona ejemplos de usos de los compuestos y composiciones de la presente invención. El uso de estos compuestos y composiciones para la prevención y/o tratamiento de enfermedades adicionales en las cuales la SK está anormalmente activada también están dentro del alcance de la presente invención.

## 20 Enfermedades hiperproliferativas

La presente invención se refiere a compuestos, composiciones farmacéuticas y métodos útiles para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades hiperproliferativas. Más específicamente, la invención se refiere a compuestos y composiciones farmacéuticas cuyos metabolitos inhiben la actividad enzimática de la SK para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades hiperproliferativas, tales como cáncer, psoriasis, trastornos proliferativos de las células mesangiales, aterosclerosis y la reestenosis. El siguiente análisis demuestra el papel de la SK en varias de estas enfermedades hiperproliferativas. Puesto que en las enfermedades enumeradas anteriormente están implicados los mismos procesos, los compuestos, composiciones farmacéuticas y métodos de la presente invención serán útiles para el tratamiento y/o prevención de una diversidad de enfermedades.

La esfingosina-1-fosfato y la ceramida tienen efectos opuestos sobre la proliferación y la apoptosis de las células cancerosas. La esfingomielina es no solo un componente básico de las membranas celulares, sino que también sirve como precursor de mensajeros lipídicos potentes que tienen efectos celulares profundos. El metabolismo de estos lípidos inducido por estímulos está involucrado de forma crítica en la biología de las células cancerosas. En consecuencia, estas vías metabólicas ofrecen dianas para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos.

La ceramida se produce por la hidrólisis de esfingomielina en respuesta a factores de crecimiento u otros estímulos. La ceramida induce la apoptosis en las células tumorales, pero puede hidrolizarse adicionalmente por la acción de la ceramidasa para producir esfingosina. La esfingosina después se fosforila rápidamente por la SK para producir S1P, que es un segundo mensajero crítico que ejerce acciones proliferativas y antiapoptóticas. Se ha planteado la hipótesis de un balance crítico, es decir, una ceramida/reostato S1P, para determinar el destino de la célula. En este modelo, el equilibrio entre las concentraciones celulares de ceramida y la S1P determina si una célula prolifera o experimenta apoptosis. Tras la exposición a mitógenos u oncoproteínas intracelulares, las células experimentan un rápido aumento de los niveles intracelulares de S1P y el agotamiento de los niveles de ceramida. Esta situación promueve la supervivencia y la proliferación celulares. En contraste, la activación de la esfingomielinasa en ausencia de activación de la ceramidasa y/o de la SK da como resultado la acumulación de ceramida y la posterior apoptosis.

La SK es la enzima responsable de la producción de S1P en las células. Una diversidad de factores proliferativos, incluyendo los activadores de la PKC, el suero de ternera fetal y el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el EGF y el TNF $\alpha$  elevan rápidamente la actividad de la SK celular. La S1P promueve la señalización a través de la vía Ras-Raf-Mek-Erk, preparando una cascada de amplificación para la proliferación celular.

La esfingosina cinasa y la S1P desempeñan papeles importantes en la patogenia del cáncer. Se ha demostrado un papel oncogénico de la SK. La inhibición de la SK mediante la transfección con un mutante de la SK dominante negativo o mediante el tratamiento de las células con el inhibidor inespecífico de la SK, DMS, bloquea la transformación mediada por la H-Ras. Debido a que la activación anormal de la Ras aparece con frecuencia en el cáncer, estos resultados sugieren un papel importante de la SK en esta enfermedad. La SK también se ha relacionado con la señalización de estrógenos y la oncogénesis dependiente de estrógenos en las células MCF-7. Otras vías o dianas con las que se ha relacionado la actividad de la SK en las enfermedades hiperproliferativas incluyen la señalización del VEGF, la proteína cinasa C, el TNF $\alpha$ , el factor nuclear de hepatocitos 1 y el receptor de ácido retinoico alfa, el calcio intracelular y la activación de las caspasas.

La hiperproliferación celular es una característica de una diversidad de enfermedades, incluyendo, sin limitación, el cáncer, la psoriasis, los trastornos proliferativos de las células mesangiales, la aterosclerosis y la reestenosis. Por tanto, los compuestos, composiciones farmacéuticas y métodos de la presente invención serán útiles para la prevención y/o el tratamiento del cáncer, incluyendo tumores sólidos, cánceres hematopoyéticos y metástasis

tumorales. Estos cánceres pueden incluir, sin limitación, tumores sólidos tales como cánceres de cabeza y cuello, cánceres de pulmón, cánceres del tracto gastrointestinal, cánceres de mama, cánceres ginecológicos, cánceres testiculares, cánceres del tracto urinario, cánceres neurológicos, cánceres endocrinos, cánceres de piel, sarcomas, cánceres del mediastino, cánceres retroperitoneales, cánceres cardiovasculares, mastocitosis, carcinosarcomas, cilindroma, cánceres dentales, esteseoneuroblastoma, cáncer de uraco, carcinoma de células de Merkel, paragangliomas. Además, dichos cánceres pueden incluir, sin limitación, cánceres hematopoyéticos tales como el linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemias crónicas, leucemias agudas, cánceres mieloproliferativos, discrasias de células plasmáticas y síndromes mielodisplásicos.

La psoriasis es una enfermedad crónica habitual desfiguradora de la piel que se caracteriza por placas bien delimitadas, rojas, endurecidas y escamosas que pueden ser limitadas o generalizadas. Aunque la enfermedad raramente es mortal, tiene graves efectos perjudiciales sobre la calidad de vida del paciente y esto se complica adicionalmente por la falta de terapias eficaces. Por tanto, existe una gran necesidad insatisfecha de medicamentos eficaces y seguros para esta afección. La psoriasis se caracteriza por la hiperproliferación local de queratinocitos, la inflamación mediada por linfocitos T y por la angiogénesis localizada. Se ha implicado la activación anormal de la SK en todos estos procesos. Por tanto, se espera que los inhibidores de la SK sean de utilidad en la terapia de la psoriasis.

Los trastornos hiperproliferativos de las células mesangiales se refieren a trastornos provocados por la hiperproliferación anormal de las células mesangiales en el riñón. Los trastornos hiperproliferativos mesangiales incluyen diversas enfermedades renales humanas tales como glomerulonefritis, nefropatía diabética, y nefrosclerosis maligna, así como trastornos tales como síndromes microangiopáticos trombóticos, rechazo de trasplantes y glomerulopatías. Puesto que la hiperproliferación de las células mesangiales es inducida por factores de crecimiento cuya acción depende de la señalización aumentada a través de la SK, se espera que los compuestos inhibidores de la SK, las composiciones farmacéuticas y los métodos de la presente invención sean de utilidad en la terapia de estos trastornos hiperproliferativos de las células mesangiales.

Además de los procesos inflamatorios que se analizan a continuación, la aterosclerosis y la reestenosis se caracterizan por la hiperproliferación de células musculares lisas vasculares en los sitios de las lesiones. Puesto que la hiperproliferación de células musculares lisas vasculares es inducida por factores de crecimiento cuya acción depende de la señalización aumentada a través de la SK, se espera que los compuestos inhibidores de la SK, las composiciones farmacéuticas y los métodos de la presente invención sean de utilidad en la terapia de estos trastornos vasculares.

### 35 Enfermedades inflamatorias

La presente invención también se refiere a compuestos, composiciones farmacéuticas y métodos útiles para el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias. Más específicamente, la invención se refiere a compuestos y composiciones farmacéuticas cuyos metabolitos inhiben la actividad enzimática de la SK para el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias, tales como enfermedad intestinal inflamatoria, artritis, aterosclerosis, asma, alergia, insuficiencia renal inflamatoria, shock circulatorio, lesión por isquemia-reperusión, insuficiencia orgánica post-quirúrgica, esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, inflamación de la piel, enfermedad periodontal, psoriasis y enfermedades de la inmunidad mediadas por linfocitos T, incluyendo la encefalomielitis alérgica, neuritis alérgica, rechazo de trasplantes de aloinjertos, enfermedad de injerto contra hospedador, miocarditis, tiroiditis, nefritis, lupus eritematoso sistémico y diabetes mellitus insulino dependiente. El siguiente análisis demuestra el papel de la SK en varias de estas enfermedades inflamatorias. Puesto que en las enfermedades enumeradas anteriormente están implicados los mismos procesos, los compuestos, composiciones farmacéuticas y métodos de la presente invención serán útiles para el tratamiento y/o prevención de una diversidad de enfermedades.

La enfermedad intestinal inflamatoria (EII) abarca un grupo de trastornos caracterizados por la inflamación patológica del intestino grueso. La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa son las formas más conocidas de la EII y son provocadas por mediadores infecciosos e inmunológicos. A partir de estudios con modelos animales, está claro que las manifestaciones completas de la EII dependen de la sinergia entre las respuestas inmunitarias humorales y celulares. La noción de que las células inmunitarias y las citocinas desempeñan un papel crítico en la patogenia de la EII, está bien establecida. Como se analiza a continuación, las citocinas que promueven la inflamación en el intestino afectado por la EII, activan un mediador común, la SK. Más destacadamente, se ha demostrado que el TNF $\alpha$  desempeña un papel significativo en la EII. El TNF $\alpha$  activa varios procesos que se ha demostrado que contribuyen a la EII y es necesario tanto para la iniciación como para la persistencia de la respuesta Th1. Por ejemplo, se ha demostrado que el TNF $\alpha$  actúa a través de la inducción del NF $\kappa$ B que se ha implicado en el aumento de las enzimas proinflamatorias óxido nítrico sintasa (NOS) y COX-2. Se ha demostrado que la COX-2 desempeña un papel clave en la inflamación de las EII a través de su producción de prostaglandinas, y también se ha demostrado que el estrés oxidativo tal como el mediado por el óxido nítrico producido por la NOS, exacerba la inflamación de la EII.

65

Una vía común de la activación inmunitaria en las EII es la afluencia local de mastocitos, monocitos, macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares que da como resultado la amplificación secundaria del proceso inflamatorio y produce las manifestaciones clínicas de las enfermedades. Esto da como resultado un marcado aumento del número de mastocitos en las mucosas del íleon y del colon de los pacientes que padecen EII, que se acompaña de aumentos espectaculares del TNF $\alpha$ . Los productos de secreción adicionales de los mastocitos, incluyendo la histamina y la triptasa, pueden ser importantes en la EII. Por tanto, está claro que las cascadas inflamatorias desempeñan un papel crítico en la patogenia de la EII.

La ceramida se produce por la hidrólisis de la esfingomielina en respuesta a las agresiones inflamatorias, incluyendo el TNF $\alpha$ , y puede hidrolizarse por la ceramidasa para producir esfingosina. La esfingosina después se fosforila rápidamente por la SK para producir S1P. La ceramidasa y la SK también se activan por citocinas y factores de crecimiento, conduciendo a un incremento rápido de los niveles intracelulares de S1P y al agotamiento de los niveles de ceramida. Esta situación promueve la proliferación celular e inhibe la apoptosis. La desregulación de la apoptosis en los fagocitos es un componente importante del estado inflamatorio crónico en la EII y se ha demostrado que la S1P protege los neutrófilos de la apoptosis en respuesta a la Fas, al TNF $\alpha$  y a la ceramida. De forma similar, la apoptosis de los macrófagos se bloquea por la S1P.

Además de su papel en la regulación de la proliferación celular y de la apoptosis, se ha demostrado que la S1P tiene varios efectos importantes sobre las células que median las funciones inmunitarias. Las plaquetas, los monocitos y los mastocitos secretan S1P tras la activación, promoviendo cascadas inflamatorias en el sitio del daño tisular. La activación de la SK es necesaria para las respuestas de señalización; ya que la capacidad del TNF $\alpha$  para inducir la expresión de moléculas de adhesión a través de la activación del NF $\kappa$ B es mimetizada por la S1P y es bloqueada por el inhibidor de la SK dimetilesfingosina. De forma similar, la S1P mimetiza la capacidad del TNF $\alpha$  para inducir la expresión de la COX-2 y la síntesis de la PGE<sub>2</sub>, y la atenuación génica de la SK por interferencia del ARN bloquea estas respuestas al TNF $\alpha$  pero no la SP1. La S1P también es un mediador de la entrada de calcio durante la activación de neutrófilos por el TNF $\alpha$  y otros estímulos, conduciendo a la producción de superóxido y otros radicales tóxicos.

Puesto que los procesos implicados en la EII son inducidos por citocinas y factores de crecimiento cuya acción depende de la señalización aumentada a través de la SK, se espera que los compuestos inhibidores de la SK, las composiciones farmacéuticas y los métodos de la presente invención sean de utilidad en la terapia de la EII.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica, sistémica, que se caracteriza por la hiperplasia sinovial, la infiltración celular masiva, la erosión del cartílago y del hueso y una respuesta inmunitaria anormal. A partir de estudios con modelos animales, está claro que las manifestaciones completas de la AR dependen de la sinergia entre las respuestas inmunitarias humorales y celulares. La noción de que las células inmunitarias y las citocinas desempeñan un papel crítico en la patogenia de la artritis, está bien establecida.

La fase temprana de la inflamación reumática se caracteriza por la infiltración de leucocitos en los tejidos, especialmente por los neutrófilos. En el caso de la AR, esto ocurre principalmente en las articulaciones donde la infiltración de leucocitos da como resultado sinovitis y engrosamiento de la membrana sinovial que producen los síntomas típicos de calor, enrojecimiento, tumefacción y dolor. A medida que la enfermedad progresa, la colección aberrante de células invade y destruye el cartilago y el hueso en la articulación conduciendo a deformidades y dolor crónico. Las citocinas inflamatorias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-8 actúan como mediadores críticos de esta infiltración y estas citocinas están presentes en el líquido sinovial de los pacientes que padecen AR.

Los leucocitos se localizan en los sitios de lesión inflamatoria como resultado de las acciones integradas de las moléculas de adhesión, las citocinas y los factores quimiotácticos. En la artritis inducida por lipopolisacáridos en el conejo, la producción de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en la fase de iniciación de la inflamación se produjo en paralelo al curso temporal de la infiltración de leucocitos. La adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular es una primera etapa de la extravasación de las células al intersticio. Este proceso está mediado por selectinas, integrinas y moléculas de adhesión endoteliales, por ejemplo, ICAM-1 y VCAM-1. Puesto que el TNF $\alpha$  induce la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 y está presente en altas concentraciones en las articulaciones artríticas, es probable que esta proteína desempeñe un papel central en la patogenia de la enfermedad. Esto se corrobora por la actividad clínica de terapias anti-TNF $\alpha$  tales como Remicade. Después de la adhesión al endotelio, los leucocitos migran a lo largo de un gradiente de concentración de factores quimiotácticos. Un proceso crítico adicional en la progresión de la AR es la mejora del suministro de sangre a la membrana sinovial a través de la angiogénesis. La expresión del factor angiogénico clave VEGF es potentemente inducida por citocinas proinflamatorias que incluyen el TNF $\alpha$ . En conjunto, estos datos apuntan a papeles importante del TNF $\alpha$ , de los leucocitos, de las moléculas de adhesión de leucocitos, de los factores quimiotácticos de leucocitos y de la angiogénesis en la patogenia de la lesión artrítica.

Como los procesos implicados en la artritis son inducidos por citocinas y factores de crecimiento, cuya acción depende de la señalización aumentada a través de la SK, se espera que los compuestos inhibidores de la SK, las composiciones farmacéuticas y los métodos de la presente invención sean de utilidad en la prevención y/o terapia de la artritis.

La aterosclerosis es una enfermedad vascular compleja que implica una serie de sucesos celulares y moleculares coordinados característicos de las reacciones inflamatorias. En respuesta a una lesión vascular, las primeras lesiones ateroscleróticas se inician por reacciones inflamatorias agudas, principalmente mediadas por monocitos, plaquetas y linfocitos T. Estas células inflamatorias se activan y se reclutan en el espacio subendotelial vascular a través de factores quimiotácticos expresadas localmente y moléculas de adhesión expresadas en la superficie de las células endoteliales. El reclutamiento continuo de células inflamatorias circulantes adicionales en la pared vascular lesionada potencia la reacción inflamatoria mediante la activación adicional de la migración y la proliferación de las células del músculo liso vascular (MLV). Esta reacción inflamatoria vascular crónica conduce a la formación de la cápsula fibrosa, que es un medio inflamatorio rico en oxidantes compuesta de monocitos/macrófagos y células del MLV. Con el tiempo, esta capa fibrosa puede desestabilizarse y romperse por metaloproteinasas extracelulares secretadas por los monocitos/macrófagos residentes. La cápsula fibrosa rota puede ocluir vasos fácilmente dando como resultado isquemia cardíaca o cerebral agudas. Este mecanismo subyacente de la aterosclerosis indica que la activación de los monocitos/macrófagos y la migración celular y la proliferación del MLV desempeñan papeles críticos en el desarrollo y la progresión de las lesiones ateroscleróticas. De forma importante, esto también sugiere que un enfoque terapéutico que bloquea las actividades de estas células inflamatorias vasculares o la proliferación de las células del músculo liso debe ser capaz de evitar la progresión y/o el desarrollo de la aterosclerosis.

La SK se expresa en gran medida en las plaquetas lo que les permite fosforilar la esfingosina circulante para producir S1P. En respuesta a la lesión del vaso, las plaquetas liberan grandes cantidades de S1P en los sitios de lesión que puede ejercer efectos mitógenos en las células del MLV mediante la activación de receptores de S1P. La S1P también se produce en las células endoteliales y del VSM activadas. En estas células, la S1P producida intracelularmente funciona como una molécula segunda mensajera, regulando la homeostasis del  $Ca^{2+}$  asociada a la proliferación celular y a la supresión de la apoptosis. Además, la desregulación de la apoptosis en los fagocitos es un componente importante del estado inflamatorio crónico de la aterosclerosis, y la S1P protege a los granulocitos de la apoptosis. En conjunto, estos estudios indican que la activación de la SK altera el metabolismo de los esfingolípidos en favor de la formación de S1P, dando como resultado respuestas celulares proinflamatorias e hiperproliferativas. Estos estudios indican que la SK es una nueva diana molecular para la aterosclerosis. El uso de inhibidores de la SK como agentes antiateroescleróticos evitará la activación perjudicial de los leucocitos, así como evitará la infiltración y la hiperproliferación de las células del músculo liso, haciendo que los compuestos, composiciones farmacéuticas y métodos de la presente invención sean útiles para el tratamiento y/o prevención de la aterosclerosis.

El criterio de valoración fisiológica en la patología asmática es el estrechamiento de los bronquios debido a la inflamación. En una gran parte de los casos de asma, la inflamación se inicia y posteriormente se amplifica mediante la exposición a los alérgenos. Tras la inhalación, estos alérgenos, se unen a la IgE circulante y después se unen a los receptores de superficie FcεRI de alta afinidad expresados por las células inflamatorias que residen en la mucosa bronquial. Esta unión extracelular conduce a una cascada de sucesos de señalización dentro de las células inflamatorias, que culmina en la activación de estas células y la secreción de múltiples factores que desencadenan que las células que recubren las vías aéreas bronquiales se hinchen, dando como resultado tubos bronquiales limitados y disminución del intercambio de aire. El proceso inflamatorio en respuesta a la exposición inicial al alérgeno puede no desaparecer por completo. Por otra parte, las exposiciones adicionales pueden conducir a una respuesta exagerada llamada hiperreactividad bronquial. Este estado hiperreactivo puede conducir a una afección permanente de las vías aéreas limitadas a través de la remodelación de la vía respiratoria. En consecuencia, las respuestas inflamatorias descontroladas a la exposición inicial al alérgeno pueden dar como resultado la inflamación crónica y la constricción bronquiolar permanente. Por tanto, la inhibición o la disminución de esta inflamación exagerada probablemente disminuyen los síntomas asociados al asma.

Muchos estudios han puesto de manifiesto la implicación de los mastocitos en el proceso inflamatorio que conduce al asma y se ha demostrado que la SK está implicada en la activación de mastocitos estimulada por alérgenos, una etapa crítica en el proceso inflamatorio bronquial. En las células RBL-2H3 de leucemia basófila de rata, la unión de la IgE/Ag al receptor de alta afinidad FcεRI conduce a la activación de la SK y a la conversión de la esfingosina en S1P. La S1P recién formada aumenta los niveles de calcio intracelular, lo que es necesario para la activación de los mastocitos. Como alternativa, las concentraciones altas de esfingosina disminuyen la síntesis de leucotrienos mediada por la exposición a IgE/Ag y disminuyen la transcripción y la secreción de citocinas.

Además del papel clave de la SK y la S1P en la activación de los mastocitos, la S1P también tiene efectos directos sobre la señalización corriente abajo en la vía de la inflamación del asma. Se han descubierto niveles aumentados de S1P en el líquido de lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos recogido 24 horas después de la exposición al alérgeno en comparación con sujetos no asmáticos. En conjunción con el descubrimiento de que los mastocitos activados producen y secretan S1P, estos resultados ponen de manifiesto una correlación entre la S1P y la respuesta inflamatoria asmática. Además, las células del músculo liso de las vías respiratorias (MLVR) son sensibles a estímulos que dependen de la S1P y la SK, tales como el TNFα y la IL-1β. Además, el tratamiento de la S1P aumenta la síntesis de ADN, el número de células y la progresión acelerada de las células del MLVR desde la fase G<sub>1</sub> a la S.

65

Además de los efectos directos sobre las células del MLVR, la S1P también regula la secreción de citocinas y la expresión de moléculas de adhesión celular que amplifican la respuesta inflamatoria a través del reclutamiento de leucocitos y facilitan la interacción de componentes extracelulares. Las múltiples funciones de la S1P y por tanto, de la SK, en la fase inflamatoria bronquiolar de la patogenia del asma indican claramente una oportunidad para la intervención farmacológica, tanto en la fase aguda como crónica de esta enfermedad. El uso de inhibidores de la SK como agentes antiasmáticos inhibirá la activación de los leucocitos mediada por citocinas, impidiendo de este modo la activación perjudicial de los leucocitos, así como impidiendo la hiperproliferación de las células del músculo liso de las vías respiratorias, lo que hace que los compuestos, composiciones farmacéuticas y métodos de la presente invención sean útiles para el tratamiento y/o prevención del asma.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), como el asma, implica la obstrucción del flujo aéreo y la hiperrespuesta que se asocia a la activación aberrante de neutrófilos en el tejido pulmonar. Esto se manifiesta clínicamente como bronquitis crónica, fibrosis o enfisema, que en conjunto constituyen la cuarta causa principal de muerte en los Estados Unidos. Puesto que la activación de las células inflamatorias por lesiones químicas en la EPOC se produce a través de las vías mediadas por NF $\kappa$ B similares a aquellas activadas durante el asma, es probable que los compuestos, composiciones farmacéuticas y métodos de la presente invención también sean útiles para el tratamiento y/o prevención de la EPOC.

La lesión por isquemia-reperfusión también se asocia a niveles elevados de citocinas inflamatorias que median sus efectos por vías que requieren la actividad de la SK. Por ejemplo, los niveles de TNF $\alpha$  se incrementan después de la isquemia-reperfusión, y esta respuesta inflamatoria conduce a la insuficiencia orgánica. Esta situación surge de forma aguda en pacientes sometidos a muchos tipos de cirugía en las que el flujo sanguíneo a uno o más tejidos se detiene temporalmente. Debido a esta etiología, es probable que los compuestos, composiciones farmacéuticas y métodos de la presente invención también sean útiles para el tratamiento y/o prevención de la lesión por isquemia-reperfusión, incluyendo el daño a los órganos que se utilizan para el trasplante.

La inflamación también está implicada en una diversidad de trastornos de la piel, incluyendo la psoriasis, la dermatitis atópica, la sensibilidad de contacto y el acné, que afectan a más del 20% de la población. Aunque los corticosteroides tópicos se han utilizado ampliamente, sus efectos adversos impiden el uso a largo plazo. Puesto que las respuestas inflamatorias implican típicamente la activación aberrante de las vías de señalización detalladas anteriormente, es probable que los compuestos, composiciones farmacéuticas y métodos de la presente invención también sean útiles para el tratamiento de estas enfermedades de la piel.

Una diversidad de enfermedades incluyendo la encefalomiелitis alérgica, neuritis alérgica, rechazo de trasplantes de aloinjertos, enfermedad de injerto contra hospedador, miocarditis, tiroiditis, nefritis, lupus eritematoso sistémico y diabetes mellitus insulino dependiente, puede ser inducida por la activación inadecuada de los linfocitos T. Las características comunes de la patogenia de estas enfermedades incluyen la infiltración de células mononucleares, la expresión de linfocitos T autorreactivos CD4 y CD8 y la señalización hiperactiva por mediadores inflamatorios tales como IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ . Puesto que las respuestas inflamatorias implican típicamente la activación aberrante de las vías de señalización detalladas anteriormente, es probable que los compuestos, composiciones farmacéuticas y métodos de la presente invención también sean útiles para el tratamiento de estas enfermedades de la inmunidad mediadas por linfocitos T.

#### Enfermedades angiogénicas

La presente invención también se refiere a compuestos, composiciones farmacéuticas y métodos útiles para el tratamiento y/o prevención de enfermedades que implican una angiogénesis no deseada. Más específicamente, la invención se refiere al uso de compuestos profármacos y composiciones que inhiben la actividad enzimática de la SK para el tratamiento y/o prevención de enfermedades angiogénicas, tales como retinopatía diabética, artritis, cáncer, psoriasis, sarcoma de Kaposi, hemangiomas, angiogénesis miocárdica, neovascularización de la placa aterosclerótica y enfermedades angiogénicas oculares tales como neovascularización coroidea, retinopatía del prematuro (fibroplasias retrolentales), degeneración macular, rechazo de injerto de córnea, rubeosis, glaucoma neovascular y síndrome de Osler-Webber. El siguiente análisis demuestra el papel de la SK en varias de estas enfermedades angiogénicas. Puesto que en las enfermedades enumeradas anteriormente están implicados los mismos procesos, los compuestos, composiciones farmacéuticas y métodos de la presente invención serán útiles para el tratamiento y/o prevención de una diversidad de enfermedades.

La angiogénesis se refiere al estado en el cuerpo en el que diversos factores de crecimiento u otros estímulos promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos. Como se analiza a continuación, este proceso es crítico para la patogenia de una diversidad de enfermedades. En cada caso, la angiogénesis excesiva permite la progresión de la enfermedad y/o produce efectos no deseados en el paciente. Puesto que mecanismos bioquímicos conservados regulan la proliferación de las células endoteliales vasculares que forman estos nuevos vasos sanguíneos, es decir, la neovascularización, se espera que la identificación de métodos para inhibir estos mecanismos tenga utilidad para el tratamiento y/o prevención de una diversidad de enfermedades. El siguiente análisis proporciona detalles adicionales de la forma en que los compuestos, composiciones y métodos de la presente invención pueden utilizarse para inhibir la angiogénesis en varias de estas enfermedades.

La retinopatía diabética es la principal causa de deterioro de la visión y la elevación en la expresión de factores de crecimiento contribuye a la angiogénesis patógena en esta enfermedad. En particular, el VEGF es un importante contribuyente a la formación de nuevos vasos en la retina diabética y se ha demostrado que el VEGF está elevado en pacientes que padecen retinopatía diabética proliferativa. Además de la retinopatía diabética, otras varias enfermedades oculares debilitantes, incluyendo la degeneración macular relacionada con la edad y la neovascularización coroidea, se asocian a la angiogénesis excesiva que está mediada por el VEGF y otros factores de crecimiento.

En la retina, el VEGF se expresa en el epitelio pigmentado, la retina neurosensorial, los pericitos y la capa de músculo liso vascular. El VEGF induce la proliferación de las células endoteliales, favoreciendo la formación de nuevos vasos en la retina: Al mismo tiempo, el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) de la retina se activa y este factor actúa en sinergia con el VEGF de modo que los dos juntos inducen la formación de nuevos vasos en los que la matriz subendotelial es mucho más débil que la de los vasos normales. Además, el VEGF facilita la extravasación de líquido al intersticio, donde se forman exudados en el tejido retiniano. El VEGF también promueve la fenestración de las células endoteliales, un proceso que puede dar origen a canales intercelulares a través los cuales los fluidos pueden filtrarse y altera las uniones estrechas entre las células. Por tanto, la reducción de la actividad del VEGF en la retina es probable que reduzca eficazmente el desarrollo y la progresión de la angiogénesis retiniana y la filtración vascular que subyacen al proceso retinopático.

También se ha demostrado que la citocina proinflamatoria TNF $\alpha$  desempeña un papel en la retinopatía diabética ya que altera el citoesqueleto de las células endoteliales, dando como resultado una función de barrera permeable y la activación de las células endoteliales. Estos cambios en las células endoteliales retinianas son fundamentales en la patogenia de la retinopatía diabética.

Una unión entre las acciones del VEGF y la SK puede estar implicada en el desarrollo de la retinopatía. Se ha demostrado que la SK media la activación inducida por VEGF de las proteínas cinasas activadas por mitógenos y por *ras*. Se ha demostrado que el VEGF mejora las respuestas de señalización intracelular a la S1P, aumentando de este modo sus acciones angiogénicas. También se ha demostrado que la S1P estimula la actividad del NF $\kappa$ B que conduce a la producción de COX-2, de moléculas de adhesión, y a la producción de VEGF adicional, todos los cuales se han relacionado con la angiogénesis. Además, la expresión de la isoforma endotelial de la óxido nítrico sintasa (eNOS), una molécula de señalización clave en las células endoteliales vasculares y que modula un amplio conjunto de funciones, incluyendo las respuestas angiogénicas, está regulada por la SK. Claramente, la SK es un regulador fundamental de la angiogénesis, apoyando la hipótesis de que su manipulación farmacológica puede ser terapéuticamente útil. También se ha demostrado que la S1P estimula la producción de NF $\kappa$ B que se ha demostrado que es angiogénico. El NF $\kappa$ B conduce a la producción de COX-2, de moléculas de adhesión y a la producción de VEGF adicional, todos los cuales se han relacionado con la angiogénesis.

Uno de los sitios más atractivos de intervención en esta vía es la conversión de la esfingosina en S1P por la enzima SK. La SK es la enzima clave responsable de la síntesis de la S1P en células de mamíferos, que facilita la supervivencia y la proliferación celulares y media los procesos críticos implicados en la angiogénesis y la inflamación, incluyendo las respuestas al VEGF y al TNF $\alpha$ . Por tanto, la inhibición de la producción de S1P es un punto de intervención terapéutica potencialmente importante para la retinopatía diabética.

El papel de la angiogénesis en el cáncer es bien reconocido. El crecimiento de un tumor depende de la neovascularización de modo que los nutrientes puedan proporcionarse a las células tumorales. El principal factor que promueve la proliferación de células endoteliales durante la neovascularización tumoral es el VEGF. Como se ha analizado anteriormente, la señalización a través receptores del VEGF depende de las acciones de la SK. Por tanto, los compuestos, composiciones farmacéuticas y métodos de la presente invención tienen utilidad para el tratamiento del cáncer.

Se han relacionado más de 50 enfermedades oculares con la estimulación de la neovascularización coroidea, aunque las tres enfermedades principales que causan esta patología son la degeneración macular relacionada con la edad, la miopía y el traumatismo ocular. Aunque la mayoría de estas causas son idiopáticas, entre las causas conocidas están las relacionadas con la degeneración, las infecciones, los tumores coroides y/o el traumatismo. Entre los usuarios de lentes de contacto blandas, la neovascularización coroidea puede causarse por la falta de oxígeno en el globo ocular. A medida que la neovascularización coroidea es inducida por factores de crecimiento, cuya acción depende del aumento de la señalización a través de la SK, se espera que los profármacos, composiciones farmacéuticas y métodos inhibidores de la SK de la presente invención sean de utilidad en la terapia de los trastornos de neovascularización coroidea.

Los hemangiomas son enfermedades angiogénicas caracterizadas por la proliferación del endotelio capilar con acumulación de mastocitos, fibroblastos y macrófagos. Representan los tumores más frecuentes en la infancia y se caracterizan por el crecimiento neonatal rápido (fase proliferativa). A la edad de 6 a 10 meses, la tasa de crecimiento del hemangioma se vuelve proporcional a la tasa de crecimiento del niño, seguida de una regresión muy lenta para los siguientes 5 a 8 años (fase involutiva). La mayoría de los hemangiomas se producen como tumores únicos, mientras que aproximadamente el 20% de los niños afectados tienen múltiples tumores, que pueden aparecer en

5 cualquier parte del cuerpo. Varios estudios han proporcionado información sobre la histopatología de estas lesiones. En particular, los hemangiomas proliferantes expresan altos niveles de antígeno nuclear de células proliferantes (un marcador de las células en fase S), de colagenasa de tipo IV, de VEGF y de FGF-2. Como los hemangiomas son inducidos por factores de crecimiento, cuya acción depende del aumento de señalización a través de la SK, se espera que los compuestos inhibidores de la SK, las composiciones farmacéuticas y los métodos de la presente invención sean de utilidad en la terapia de los hemangiomas.

10 La psoriasis y el sarcoma de Kaposi son trastornos de la piel angiogénicos y proliferativos. Las lesiones psoriásicas hipervasculares expresan altos niveles de inductor angiogénico IL-8, mientras que la expresión del inhibidor endógeno TSP-1 disminuye. El sarcoma de Kaposi (KS) es el tumor más común asociado a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y en este contexto casi siempre se asocia a la infección por el virus del herpes humano 8. Las características típicas del SK son las células proliferantes en forma de huso, consideradas como las células tumorales y las células endoteliales que forman los vasos sanguíneos. El SK es una enfermedad mediada por citocinas, muy sensible a los diferentes mediadores de la inflamación como la IL-1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  y a los factores angiogénicos. Como la progresión de la psoriasis y del SK es inducida por factores de crecimiento cuya acción depende del aumento de señalización a través de la SK, se espera que los compuestos inhibidores SK, las composiciones farmacéuticas y los métodos de la presente invención sean de utilidad en la terapia de estos trastornos.

## 20 Ejemplos

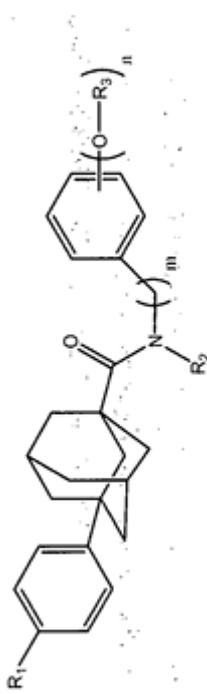
La presente invención puede entenderse mejor con relación a los siguientes ejemplos. Se pretende que estos ejemplos sean representativos de las realizaciones específicas de la invención y no se pretende que sean limitantes del alcance de la invención.

25 Los compuestos representativos de la invención incluyen aquellos de la Tabla 1. Las estructuras se nombraron utilizando ChemDraw Ultra, versión 7.0.1, disponible de CambridgeSoft Corporation, Cambridge Park Drive 100, Cambridge, MA 02140, EE.UU.

Tabla 1. Compuestos representativos de la invención

Compuesto	Nombre químico	R1	R2	R3	m	n
1*	[2-(3,4-Dihidroxifenil)-etil]amida del ácido 3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carboxílico	Cl	H	3-H 4-H	2	2
2	2-Acetoxi-5-(2-[[3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino]etil)fenil éster del ácido acético (Acetil diéster del Compuesto 1)	Cl	H	3-C(O)CH <sub>3</sub> 4-C(O)CH <sub>3</sub>	2	2
3	2-Propioniloxi-5-(2-[[3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino]etil)fenil éster del ácido propiónico (Propionil diéster of Compuesto 1)	Cl		3-C(O)CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> 4-C(O)CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	2
4	2-Butiriloxi-5-(2-[[3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino]etil)fenil éster del ácido butírico (Butil diéster del Compuesto 1)	Cl	H	3-C(O)CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> 4-C(O)CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	2
5	5-(2-[[3-(4-clorofenil)adamantano-1-carbonil]-amino]etil)-2-hidroxifenil éster del ácido isobutírico (Isobutil monoéster del Compuesto 1)	Cl	H	3-C(O)CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4-OH	2	2
6	5-(2-[[3-(4-clorofenil)adamantano-1-carbonil]-amino]etil)-2-hidroxifenil éster del ácido 2-amino-3-metil-butírico (Valina monoéster del Compuesto 1)	Cl	H	3-valina 4-OH	2	2

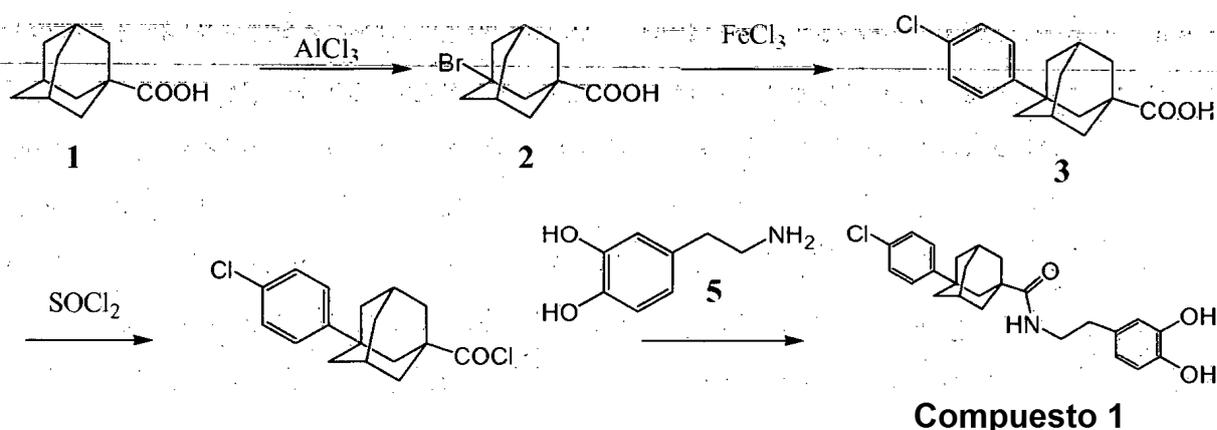
\*Compuesto de la técnica anterior más próxima y no de acuerdo con la presente invención.



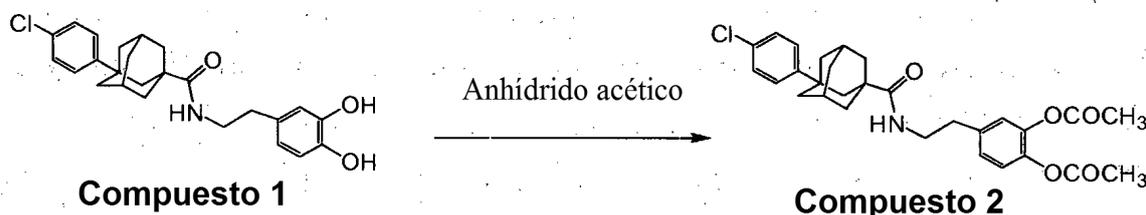
**Métodos generales.** Los espectros de RMN se obtuvieron con los instrumentos Varian 500 y Bruker 500 en  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$ . Los desplazamientos químicos se anotan en relación con TMS para los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Los análisis de CL/EM se realizaron utilizando un espectrómetro CL/EM/EM Finnigan LCQ Classic y los espectros de EM MALDI-TOF se obtuvieron en un espectrómetro de masas Voyager RP. Los disolventes se secaron y se destilaron antes de su uso. Las reacciones que requieren condiciones anhidras se realizaron en atmósfera de nitrógeno y la cromatografía en columna se realizó sobre gel de sílice (Merck, gel de sílice 60, malla 230-400). Los reactivos y los materiales disponibles en el mercado se utilizaron sin purificación adicional.

**Ejemplo 1. Método para la síntesis de [2-(3,4-dihydroxifenil)-etil]amida del ácido 3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carboxílico: Compuesto 1**

El enfoque de síntesis general involucró la bromación del ácido adamantano-1-carboxílico (1) en presencia de cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) para proporcionar el Intermedio (2) que se convirtió en el intermedio (3) mediante una reacción de Friedel-Crafts en presencia de  $\text{FeCl}_3$ . El intermedio 3 se hizo reaccionar con cloruro de tionilo ( $\text{SOCl}_2$ ) para proporcionar el intermedio (4). Por reacción del intermedio 4 con clorhidrato de 3-hidroxitiramina (5) en DMF, se obtuvo el Compuesto 1.

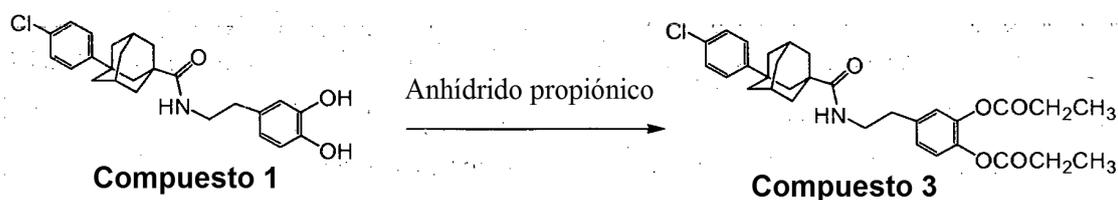


Más específicamente, se añadió ácido adamantano-1-carboxílico (1) (45 g, 0,25 mol) a una mezcla de  $\text{AlCl}_3$  (45 g, 34 mol) y  $\text{Br}_2$  (450 g) a  $0^\circ\text{C}$  y se agitaron a  $0-10^\circ\text{C}$  durante 48 horas y después se mantuvo durante 5 horas a aproximadamente  $20^\circ\text{C}$ . Después la mezcla se vertió sobre 500 g de hielo triturado, se diluyó con 300 ml de  $\text{CHCl}_3$  y se decoloró con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  sólido. La fase acuosa se extrajo dos veces con  $\text{Et}_2\text{O}$  (50 ml cada una) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con  $\text{H}_2\text{O}$  y se extrajeron con  $\text{NaOH}$  al 10%. La extracción alcalina se acidificó con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N y se mantuvo durante la noche para proporcionar 49 g (rendimiento = 75,7%) de ácido 3-bromo-adamantano-1-carboxílico (2). En el transcurso de 0,5 horas, el intermedio 2 (16,0 g, 61,7 $^\circ\text{mmol}$ ) en 50 ml de clorobenceno seco a  $-10^\circ\text{C}$  se añadió a 100 ml de clorobenceno seco que contenían 9,3 g (70 $^\circ\text{mmol}$ ) de  $\text{AlCl}_3$ . Después, la mezcla se calentó a temperatura ambiente durante 1 h y después se calentó a  $90^\circ\text{C}$  durante 10 horas. Después la mezcla se vertió sobre 200 g de hielo triturado y se filtró para proporcionar 14,2 g (rendimiento = 79,3%) de ácido 3-(4-clorofenil)adamantano-1-carboxílico (3). El intermedio 3 (1 $^\circ\text{mmol}$ ) se añadió a un matraz de fondo redondo de 50 ml que contenía tolueno de grado HPLC (20 ml), equipado con un condensador de reflujo y se introdujo  $\text{N}_2$  seco. La mezcla se agitó mientras se añadía cloruro de tionilo ( $\text{SOCl}_2$ ) (10 $^\circ\text{mmol}$ ) y se calentó a reflujo durante 1 hora. La muestra después se evaporó al vacío para producir el intermedio 4, cloruro de 3-(4-clorofenil)adamantano-1-carbonilo. Sin purificación adicional, el intermedio 4 se añadió a 5 ml de una mezcla que contenía clorhidrato de 3-hidroxitiramina (5, 1 $^\circ\text{mmol}$ ),  $\text{NaOH}$  (1 $^\circ\text{mmol}$ ) y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1 $^\circ\text{mmol}$ ) en 5 ml de DMF en atmósfera de  $\text{N}_2$ , y la mezcla se agitó a  $60^\circ\text{C}$  durante 24 horas y después se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se evaporó al vacío y se le añadió  $\text{HCl}$  al 10% lentamente a la mezcla hasta que alcanzó un valor de pH de 1. Después, la mezcla se extrajo con 20 ml de  $\text{CHCl}_3$ , se lavó tres veces con agua (10 ml cada una), se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se concentró para proporcionar el Compuesto 1 en forma de cristales de color blanco (Rendimiento = 83%) con un punto de fusión de  $146-148^\circ\text{C}$ . RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}$ )  $\delta$  1,63-1,68 (m, 2H, Admant-H), 1,71-1,83 (m, 10H, Admant-H), 2,14 (s, 2H, Admant-H), 2,50-2,53 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,15-3,18 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3,40 (s, 1H, NH), 6,40-6,42 (d,  $J = 10$  Hz, 1H, Ar-H), 6,56 (s, 1H, Ar-H), 6,62-6,63 (d,  $J = 5$  Hz, 1H, Ar-H), 7,36-7,41 (m, 4H, Ar-H), 8,68 (s (a), 2H, OH). RMN  $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}$ )  $\delta$  28,8, 31,3, 35,0, 35,5, 33,3, 36,6, 38,3, 41,0, 41,3, 42,0, 44,3, 115,8, 116,4, 119,8, 127,4, 128,5, 130,7, 131,0, 149,6, 162,9, 176,8. Espectroscopia de masas  $m/z$  (intensidad relativa) 426,18 ( $\text{MH}^+$ , 100), 427,18 (68), 428,18 (75).

**Ejemplo 2. Método para la síntesis de 2-acetoxi-5-(2-[[3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino]etil)fenil éster del ácido acético: Compuesto 2**

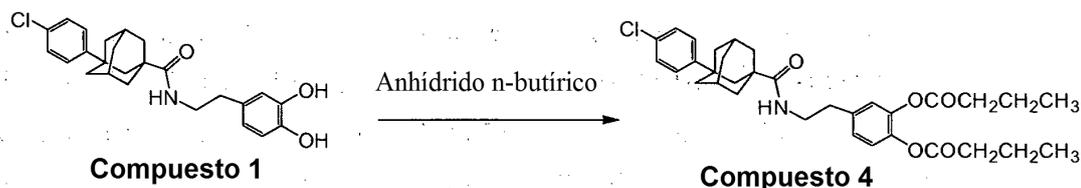
5 El compuesto 1 (1 g) se disolvió en 10 ml de anhídrido acético con una cantidad catalítica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98% y se agitó en atmósfera de N<sub>2</sub> durante 3 días a temperatura ambiente. Después, la solución se concentró al vacío y se filtró para proporcionar el Compuesto 2 producto (rendimiento = 54%), con un punto de fusión de 160-162°C. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,74 (m, 2H, Admant-H), 1,81-1,88 (m, 8H, Admant-H), 1,93 (s, 2H, Admant-H), 2,26-2,27 (m, 2H, Admant-H), 2,28 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2,31 (s, 3H, CONCH<sub>3</sub>), 2,83-2,85 (t, J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,50-3,54 (c, 2H, NCH<sub>2</sub>), 5,69 (s, 1H, NH), 7,01-7,02 (d, J = 5 Hz, 1H, Ar-H), 7,07-7,09 (d,d, 1H, H-Ar), 7,13-7,15 (d, J = 10 Hz, 1H, Ar-H), 7,30 (s, 4H, Ar-H). RMN <sup>13</sup>C (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 20,6, 20,7, 28,8, 35,0, 35,5, 36,5, 38,3, 40,2, 40,3, 41,7, 42,0, 44,5, 123,5, 124,0, 126,4, 127,0, 128,3, 131,5, 138,0, 140,6, 142,0, 148,4, 168,4, 168,5, 177,5. Espectroscopía de masas m/z (intensidad relativa) 510,24 (M<sup>+</sup>, 100), 511,24 (38), 512,24 (45).

15 Se apreciará por aquellos que practican la técnica que la variación de las condiciones de esta reacción permitirá la síntesis de diésteres y monoésteres, es decir, la modificación de los restos hidroxilo 3 y/o 4 del Compuesto 1, que puede aislarse mediante una diversidad de técnicas cromatográficas o cristalográficas.

**Ejemplo 3. Método para la síntesis de 2-propioniloxi-5-(2-[[3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino]etil)fenil éster del ácido propiónico: Compuesto 3**

25 El compuesto 1 se disolvió en anhídrido propiónico con una cantidad catalítica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98% y se agitó en atmósfera de N<sub>2</sub> durante 3 días a temperatura ambiente. Después, la solución se concentró al vacío y se filtró para proporcionar el Compuesto 3 producto, con un punto de fusión de 114-115°C. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,24-1,30 (m, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 1,74 (m, 2H, Admant-H), 1,84-1,87 (m, 8H, Admant-H), 1,93 (s, 2H, Admant-H), 2,26 (m, 2H, Admant-H), 2,53-2,61 (m, 4H, 2COCH<sub>2</sub>), 2,82-2,85 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,50-3,54 (c, 2H, NCH<sub>2</sub>), 5,40 (s, 1H, NH), 7,1-7,2 (d, J = 5 Hz, 1H, Ar-H), 7,6-7,8 (d, d, 1H, H-Ar), 7,13-7,15 (d, J = 10 Hz, 1H, Ar-H), 7,30 (s, 4H, Ar-H); RMN <sup>13</sup>C (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,1, 27,5, 28,8, 35,0, 35,5, 36,5, 38,3, 40,3, 41,7, 42,0, 44,5, 123,5, 123,9, 126,4, 126,8, 128,3, 131,5, 137,8, 140,7, 142,1, 148,4, 171,7, 171,8, 177,4; EM m/z (intensidad relativa) 538,61 (MH<sup>+</sup>, 100), 539,61 (38), 540,61 (45).

35 Se apreciará por aquellos que practican la técnica que la variación de las condiciones de esta reacción permitirá la síntesis de diésteres y monoésteres, es decir, la modificación de los restos hidroxilo 3 y/o 4 del Compuesto 1, que puede aislarse mediante una diversidad de técnicas cromatográficas o cristalográficas.

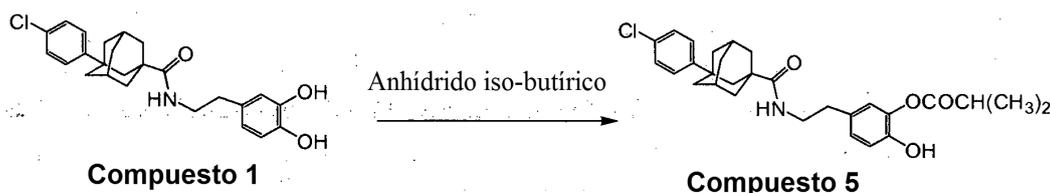
**Ejemplo 4. Método para la síntesis de 2-butililoxi-5-(2-[[3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino]etil)fenil éster del ácido butírico: Compuesto 4**

45 El Compuesto 1 se disolvió en anhídrido n-butírico con una cantidad catalítica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98% y se agitó en atmósfera de N<sub>2</sub> durante 3 días a temperatura ambiente. Después, la solución se concentró al vacío y se filtró para

proporcionar el Compuesto 4 producto, con un punto de fusión de 78-80°C, RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,03-1,08 (m, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 1,74 (m, 2H, Admant-H), 1,75-1,87 (m, 12H, 2CH<sub>2</sub>Admant-H), 1,93 (s, 2H, Admant-H), 2,26 (m, 2H, Admant-H), 2,49-2,55 (m, 4H, 2COCH<sub>2</sub>), 2,82-2,85 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,50-3,54 (c, 2H, NCH<sub>2</sub>), 5,69 (s, 1H, NH), 7,01-7,02 (d, J = 5 Hz, 1H, Ar-H), 7,6-7,8 (d, d, 1H, H-Ar), 7,12-7,14 (d, J = 10 Hz, 1H, Ar-H), 7,30 (s, 4H, Ar-H); EM m/z (intensidad relativa) 566,73 (MH<sup>+</sup>, 50), 567,61 (12), 568,60 (20).

Se apreciará por aquellos que practican la técnica que la variación de las condiciones de esta reacción permitirá la síntesis de diésteres y monoésteres, es decir, la modificación de los restos hidroxilo 3 y/o 4 del Compuesto 1, que puede aislarse mediante una diversidad de técnicas cromatográficas o cristalográficas.

**Ejemplo 5. Método para la síntesis de 5-(2-([3-(4-clorofenil)adamantano-1-carbonil]-amino)etil)-2-hidroxifenil éster del ácido isobutírico: Compuesto 5**



El Compuesto 1 se disolvió en anhídrido iso-butírico con una cantidad catalítica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98% y se agitó en atmósfera de N<sub>2</sub> durante 3 días a temperatura ambiente. Después, la solución se concentró al vacío y se filtró para proporcionar el Compuesto 5 producto, con un punto de fusión de 126-128°C. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,29-1,33 (d, d, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 1,74 (m, 2H, Admant-H), 1,81-1,88 (m, 8H, Admant-H), 1,94 (s, 2H, Admant-H), 2,26 (m, 2H, Admant-H), 2,74-2,81 (m, 2H, 2COCH), 2,82-2,85 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,50-3,54 (c, 2H, NCH<sub>2</sub>), 5,68 (s, 1H, NH), 6,99 (s, 1H, Ar-H), 7,05-7,07 (d, d, 1H, HAr), 7,11-7,13 (d, J = 10 Hz, 1H, Ar-H), 7,30 (s, 4H, Ar-H); RMN <sup>13</sup>C (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 18,9, 28,8, 34,0, 35,0, 35,5, 36,5, 38,3, 40,3, 41,7, 42,0, 44,4, 123,5, 123,9, 126,4, 126,7, 128,3, 131,5, 137,7, 140,9, 142,2, 148,4, 174,4, 174,5, 177,4; EM m/z (intensidad relativa) 566,22 (MH<sup>+</sup>, 50), 567,22 (10), 567,22 (15).

Se apreciará por aquellos que practican la técnica que la variación de las condiciones de esta reacción permitirá la síntesis de diésteres y monoésteres, es decir, la modificación de los restos hidroxilo 3 y/o 4 del Compuesto 1, que puede aislarse mediante una diversidad de técnicas cromatográficas o cristalográficas.

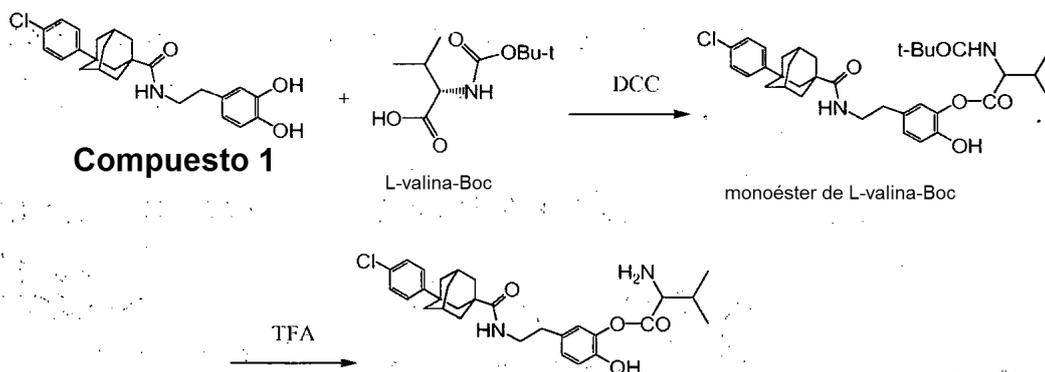
**Ejemplo 6. Método para la síntesis de ésteres de alquilo adicionales del Compuesto 1**

Como se demuestra en los Ejemplos 1-5, la reacción del Compuesto 1 con una diversidad de anhídridos de alquilo da como resultado la generación de mono o diésteres. Por tanto, pueden prepararse ésteres adicionales del Compuesto 1 haciendo reaccionar el anhídrido adecuado con el Compuesto 1 en condiciones ligeramente ácidas. Otros métodos para la preparación de ésteres orgánicos son bien conocidos en la técnica y pueden utilizarse para la síntesis de estos y otros ésteres de alquilo del Compuesto 1. Por ejemplo, el Compuesto 1 puede hacerse reaccionar con cloruros de acilo de la sustitución alquílica deseada. Estos ésteres adicionales son, por tanto, objeto de la presente invención.

Se apreciará por aquellos que practican la técnica que la variación de las condiciones de esta reacción permitirá la síntesis de diésteres y monoésteres, es decir, la modificación de los restos hidroxilo 3 y/o 4 del Compuesto 1, que puede aislarse mediante una diversidad de técnicas cromatográficas o cristalográficas.

**Ejemplo 7. Método para la síntesis de ésteres de aminoácido del Compuesto 1**

Los profármacos de ésteres de aminoácidos son con frecuencia transportados activamente por los transportadores en el tracto gastrointestinal y, por tanto, pueden mejorar la absorción oral de los fármacos. Los ésteres de aminoácido del Compuesto 1 pueden prepararse mediante acoplamiento de un aminoácido protegido en el amino con el Compuesto 1 utilizando una diversidad de estrategias. Como un ejemplo, el éster de valina del Compuesto 1, es decir, el Compuesto 6, se preparó del siguiente modo:

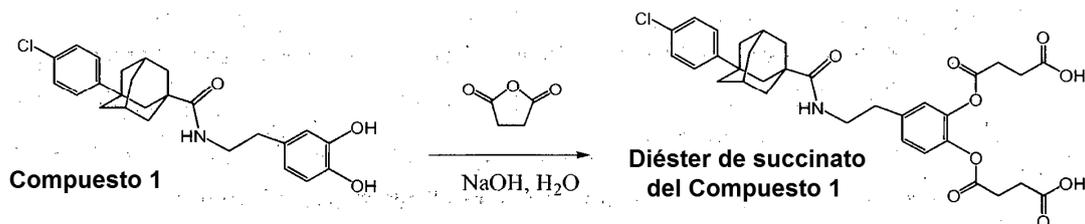


**Compuesto 6**

- 5 El Compuesto 1 se hizo reaccionar con L-Valina-Boc disponible en el mercado utilizando DCC como reactivo de acoplamiento, produciendo el éster de L-Valina-Boc intermedio. El tratamiento de este intermedio con ácido trifluoroacético (TFA) en diclorometano a 0°C proporcionó el Compuesto 6: RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,20-1,30 (m, 7H, CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,74 (m, 2H, Admant-H), 1,84-1,87 (m, 8H, Admant-H), 1,98-1,99 (d, J = 5 Hz, 2H, Admant-H), 2,20 (m, 2H, Admant-H), 2,61-2,63 (m, 2H, NH<sub>2</sub>), 2,72-2,76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,41-3,46 (c, 2H, NCH<sub>2</sub>), 4,44-4,46 (t, J = 5 Hz, 1H, COCH), 5,12-5,14 (m, 1H, NH), 6,69-6,70 (d, J = 5 Hz, 1H, Ar-H), 6,89-7,0 (m, 2H, H-Ar), 7,33- 7,35 (d, J = 10 Hz, 2H, Ar-H), 7,40-7,42 (d, J = 10 Hz, 2H, Ar-H), 8,04 (s, 1H, OH); EM m/z (intensidad relativa) 525,23 (MH<sup>+</sup>, 30), 526,23 (10), 527,23 (15).
- 10

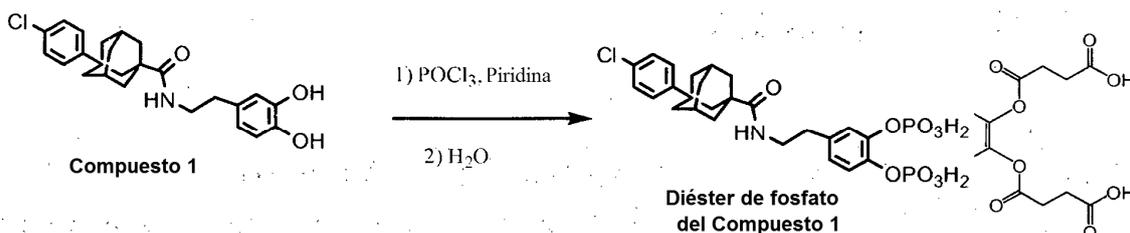
15 Se apreciará por aquellos que practican la técnica que la variación de las condiciones de esta reacción permitirá la síntesis de diésteres y monoésteres de aminoácidos, es decir, la modificación de los restos hidroxilo 3 y/o 4 del Compuesto 1, que puede aislarse mediante una diversidad de técnicas cromatográficas o cristalográficas.

**Ejemplo 8. Método para la síntesis de ésteres de succinato del Compuesto 1**



- 20 El Compuesto 1 puede hacerse reaccionar con anhídrido succínico en condiciones básicas para proporcionar el diéster de succinato del Compuesto 1. Se apreciará por aquellos que practican la técnica que la variación de las condiciones de esta reacción permitirá la síntesis de diésteres y monoésteres de succinato, es decir, la modificación de los restos hidroxilo 3 y/o 4 del Compuesto 1, que puede aislarse mediante una diversidad de técnicas cromatográficas o cristalográficas.
- 25

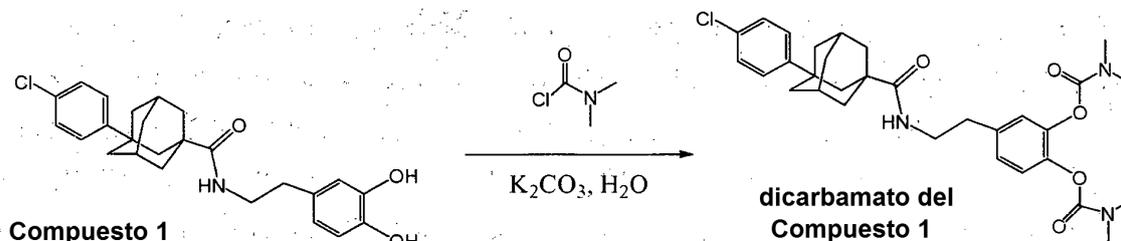
**Ejemplo 9. Método para la síntesis de ésteres de fosfato del compuesto 1**



30

El Compuesto 1 puede hacerse reaccionar con oxiclورو de fósforo en condiciones básicas, seguido de hidrólisis en agua, para proporcionar el diéster de fosfato del Compuesto 1. Se apreciará por aquellos que practican la técnica que la variación de las condiciones de esta reacción permitirá la síntesis de diésteres y monoésteres de fosfato, es decir, la modificación de los restos hidroxilo 3 y/o 4 del Compuesto 1, que puede aislarse mediante una diversidad de técnicas cromatográficas o cristalográficas. La reacción del Compuesto 1 con diferentes cloruros de ácido fosfórico, tales como fosforoclorhidrato de dimetilo, puede proporcionar ésteres de fosfato sustituidos con alquilo.

#### **Ejemplo 10. Método para la síntesis de carbamatos del Compuesto 1**

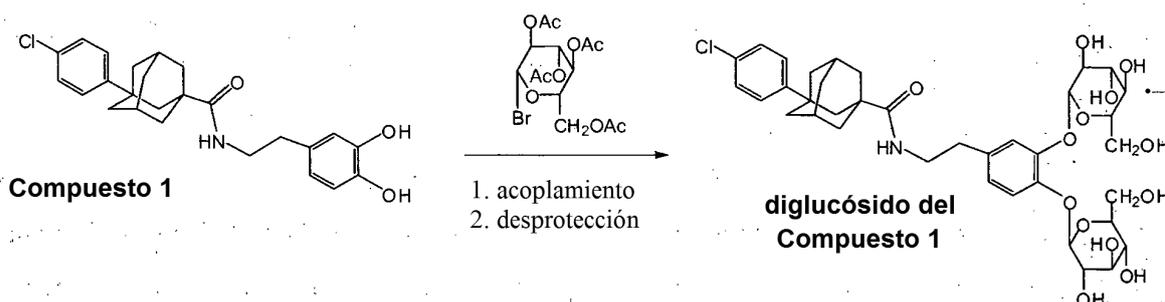


10

El Compuesto 1 puede hacerse reaccionar con cloruro de dimetilcarbamoilo para proporcionar el dicarbamato del Compuesto 1. Se apreciará por aquellos que practican la técnica que la variación de las condiciones de esta reacción permitirá la síntesis de dicarbamatos y monocarbamatos, es decir, la modificación de los restos hidroxilo 3 y/o 4 del Compuesto 1, que puede aislarse mediante una diversidad de técnicas cromatográficas o cristalográficas.

15

#### **Ejemplo 11. Método para la síntesis de glucósidos del Compuesto 1**



20

El Compuesto 1 puede hacerse reaccionar con análogos de bromoglucosa protegidos, por ejemplo 3,4,5,6-triacetoxibromotetrahidropirán-2-ilmetil éster del ácido acético, seguido de la desprotección en condiciones básicas, para proporcionar los conjugados de glucósido del Compuesto 1. Se apreciará por aquellos que practican la técnica que la variación de las condiciones de esta reacción permitirá la síntesis de monoglucósidos y diglucósidos, es decir, la modificación de los restos hidroxilo 3 y/o 4 del Compuesto 1, que puede aislarse mediante una diversidad de técnicas cromatográficas o cristalográficas.

25

#### **Ejemplo 12. Conversión de los profármacos de ésteres en el Compuesto 1 mediante plasma de ratón**

Los profármacos son compuestos que se convierten en un metabolito biológicamente activo a través de la acción de enzimas del cuerpo. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 1, el Compuesto 2 puede convertirse en el Compuesto 1 por la actividad esterasa en la sangre y en las células. En el caso de los ésteres de alquilo, esta conversión es catalizada habitualmente por la carboxiesterasa 1. Para demostrar esta conversión, el Compuesto 2 se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se demostró que eluye en forma de un pico único bien definido (Figura 2). Cuando el Compuesto 2 se incubó con plasma aislado de la sangre de ratón a temperatura ambiente durante 5 minutos y después se analizó mediante un proceso de HPLC similar, el pico correspondiente al Compuesto 2 se redujo en más del 95%, y los nuevos compuestos eluyeron con tiempos de retención coherentes con el monoéster del Compuesto 1, es decir, uno de los ésteres de acetilo, se había eliminado, y el propio Compuesto 1, es decir, ambos ésteres de acetilo se habían eliminado (Figura 3). Los experimentos similares con el Compuesto 3, Compuesto 4, el Compuesto 5 y el Compuesto 6 demostraron una escisión similar de los ésteres de alquilo o de aminoácidos dando como resultado la producción del Compuesto 1. Por tanto, coherentes con el metabolismo conocido de los profármacos de ésteres, estos compuestos pueden sustituir eficazmente al inhibidor de la SK activo, es decir, el Compuesto 1, en experimentos biológicos y en usos terapéuticos.

45

**Ejemplo 13. Conversión del compuesto 2 en el Compuesto 1 en ratones vivos**

Para prolongar los estudios *in vitro* descritos anteriormente, se determinó la capacidad del Compuesto 2 de convertirse en el Compuesto 1 en un sistema de ensayo *in vivo*. En estos experimentos, se disolvió el Compuesto 1, o el Compuesto 2, en PEG400 y se administró a ratones Balb/c hembras, a una dosis de 50 mg/kg por inyección intravenosa. Se sacrificaron los ratones y la sangre se retiró a través de punción cardíaca a los 2 minutos, 15 minutos, 30 minutos o 60 minutos. Se determinó la concentración del compuesto en la sangre de los animales en cada uno de los puntos temporales utilizando HPLC con detección UV como se ha descrito en el ejemplo anterior. Como se muestra en la Figura 4, estos estudios demuestran que pueden detectarse cantidades sustanciales de Compuesto 1 en la sangre después de la dosificación. En el caso de la administración del Compuesto 1, la concentración plasmática máxima se observó en el punto temporal más temprano y las concentraciones del compuesto 1 se redujeron rápidamente, es decir, el tiempo medio de aclaramiento fue de aproximadamente 5 minutos. En el caso de la administración del Compuesto 2, las concentraciones plasmáticas del Compuesto 1 aumentaron durante los primeros 30 minutos y después se redujeron con un tiempo medio de aclaramiento de aproximadamente 20 minutos. Esto demuestra que el Compuesto 2 se convierte de manera eficiente en el Compuesto 1 en el animal vivo y el área bajo la curva (AUC) para la exposición al Compuesto 1 circulante es mucho mayor cuando se utiliza el Compuesto 2 como agente de tratamiento en lugar del propio Compuesto 1. Por tanto, se espera que los profármacos del Compuesto 1 sean agentes quimioterapéuticos superiores cuando se desee la exposición a largo plazo.

**Ejemplo 14. Perfiles de citotoxicidad del Compuesto 1 y del Compuesto 2**

A fin de evaluar adicionalmente las eficacias biológicas de los compuestos en células intactas, se evaluaron el Compuesto 1 y el Compuesto 2 para determinar su citotoxicidad utilizando una línea celular de cáncer de mama murino. Estos experimentos siguieron los métodos que se han utilizado ampliamente. Las células se trataron con dosis variables del compuesto de ensayo durante 72 horas y después se midió la viabilidad celular utilizando el ensayo de proliferación celular no radiactivo acuoso CellTiter 96® (MTS) disponible de Promega Corporation. Los efectos de los compuestos se muestran en la Figura 5. Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar del porcentaje de células que sobreviven en cada una de las concentraciones indicadas de compuesto 1 o compuesto 2. Los datos demuestran que ambos compuestos pueden inhibir la proliferación de las células tumorales. Sin embargo, el alcance de la destrucción celular y la potencia de la destrucción celular fueron mayores para el Compuesto 2 que para el Compuesto 1. Por tanto, la forma de profármaco es más eficaz en la penetración de las células y/o el bloqueo de la proliferación.

**Ejemplo 15. Actividad antitumoral del Compuesto 2**

Se evaluó la actividad antitumoral de un profármaco inhibidor de la SK representativo utilizando un modelo de tumor alogénico que utiliza la línea celular de adenocarcinoma mamario JC murino que crecen subcutáneamente en ratones Balb/c inmunocompetentes (Lee et al, *Oncol Res.* 14:49 (2003)). Estas células expresan niveles elevados de actividad de la SK en relación con las células no transformadas, así como el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos debido a la actividad de la P-glicoproteína. Los datos se muestran en la Figura 6. Las células de adenocarcinoma mamario JC murino se inyectaron por vía subcutánea en ratones Balb/c y los tumores se dejaron crecer hasta aproximadamente 100<sup>o</sup>mm<sup>3</sup>. Los animales se trataron con vehículo solo (■), 1 mg/kg de gemcitabina semanal (A), 50 mg/kg del Compuesto 2 al día durante cinco días por semana (▼) o una combinación de gemcitabina más el Compuesto 2 (◆). Los tumores se midieron dos veces por semana. Los valores que se muestran representan el volumen tumoral promedio  $\pm$  la desviación estándar para cada grupo (n = 8). Los datos demuestran que el Compuesto 2 solo causa una reducción significativa del crecimiento tumoral y que la combinación del Compuesto 2 y gemcitabina tiene una mayor actividad antitumoral que cualquiera de los fármacos solos.

**Ejemplo 16. Efectos *in vivo* del Compuesto 1 y del Compuesto 2 en un modelo de enfermedad intestinal inflamatoria**

Se realizaron experimentos con el Compuesto 1 y el Compuesto 2 utilizando el modelo dextrano sulfato de sodio (DSS) de la EII. En estos experimentos, se proporcionaron una dieta estándar para roedores y agua a voluntad a ratones C57BL/6 machos. Después de su aclimatación, los animales se dividieron aleatoriamente en grupos de 5 o 6 para el tratamiento con DSS (40.000 MW de ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH) y el tratamiento farmacológico. Los compuestos se disolvieron en un vehículo que consiste en PEG 400 al 46,7%, una solución al 46,7% de Tween 80 al 0,375% en solución salina y etanol al 6,6%, y se administran una vez al día (comenzando el día 0) por sonda oral en un volumen de 0,1 ml por dosis. Los ratones recibieron agua de bebida normal o DSS al 2% (comenzando el día 0) y se trataron por vía oral con el Compuesto 1 o el Compuesto 2 a una dosis de 50 mg/kg al día. El peso corporal de cada animal se midió cada día y el Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE) se anotó para cada animal el día 6. El día 6, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se retiró el colon entero y se midió con una precisión de 0,1<sup>o</sup>cm. Los 3<sup>o</sup>cm distales de los cólones se utilizaron para los análisis bioquímicos de los marcadores de inflamación.

El IAE controla la pérdida de peso, la consistencia de las heces y la sangre en las heces y es una medida de la gravedad de la enfermedad. Los animales que recibieron agua de bebida normal y PEG como control de disolvente tuvieron los IAE muy bajos durante todo el experimento. La exposición de los ratones al DSS en su agua potable indujo marcadamente los síntomas de la EII, incluyendo la pérdida de peso y la producción de heces sueltas y sanguinolentas. La intensidad de la enfermedad aumentó progresivamente hasta el momento en que se sacrificaron los ratones el día 6. El tratamiento de los animales que recibieron DSS, ya sea con el Compuesto 1 o con el Compuesto 2, redujo la intensidad de las manifestaciones de la EII en los ratones (Figura 7). De forma coherente con los datos analizados anteriormente, el Compuesto 2 fue superior al Compuesto 1 en la reducción del IAE para los ratones.

El día 6, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se midió el colon entero para evaluar el acortamiento debido a la cicatrización y a los daños. En comparación con el grupo de control de agua, los cólores de los ratones tratados con DSS y con el vehículo se acortaron significativamente (Figura 8). Los ratones tratados con DSS que también se trataron con el Compuesto 1 o el Compuesto 2 tenían cólores de longitud significativamente más larga, lo que indica una protección sustancial por los fármacos. De nuevo, la respuesta al Compuesto 2 fue superior al efecto protector del Compuesto 1.

La actividad de la mieloperoxidasa (AMP), que es un reflejo de la afluencia de neutrófilos en el colon, a menudo se utiliza como medida de la inflamación y se ensayó en los cólores de los ratones de los estudios de la colitis inducida por DSS. Como se indica en la Figura 9, la actividad AMP fue muy elevada en los animales del DSS solo, en comparación con los controles de agua. El aumento de la actividad AMP se atenuó marcadamente en los ratones que recibieron dosis diarias de ya sea el Compuesto 1 o el Compuesto 2. Al igual que con los otros marcadores de la progresión de la enfermedad, la elevación de la actividad AMP se redujo en un grado mayor en los animales tratados con el Compuesto 2 en comparación con los animales tratados con el Compuesto 1.

#### **Ejemplo 17. Efectos *in vivo* de los profármacos de éster en un modelo de enfermedad inflamatoria intestinal**

Se utilizó el modelo de colitis ulcerosa inducida por DSS para comparar las actividades antiinflamatorias de varios profármacos de éster adicionales. Como se demuestra en la Figura 10, los compuestos 2, 3, 4, 5 y 6 eran todos eficaces en la prevención de la contracción de los cólores de ratones tratados con DSS. El Compuesto 4 fue ligeramente menos eficaz en esta medida que los otros profármacos de éster. Para cuantificar el grado de inflamación del colon, se midió la actividad AMP en extractos de cólores de los ratones tratados como se ha descrito en el ejemplo anterior. Los datos que se muestran en la Figura 11 indican que todos los compuestos, excepto el Compuesto 6, evitan sustancialmente la elevación de la actividad AMP colónica resultante de la infiltración de granulocitos. En general, estos datos demuestran que la entidad química particular que forma el grupo protector (en este caso, el éster) en el profármaco no es crítico para la actividad biológica de los compuestos. En consecuencia, se demuestra que puede utilizarse una diversidad de formas de profármacos del inhibidor de la SK activo en el tratamiento de la enfermedad.

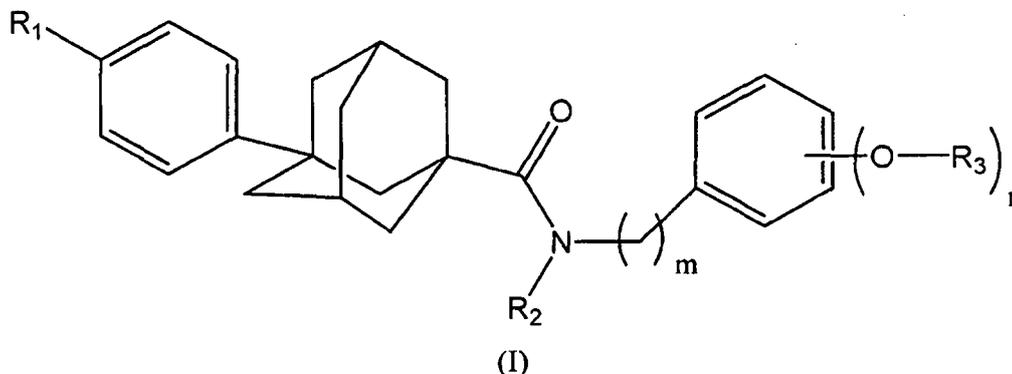
#### **Ejemplo 18. Efectos *in vivo* de los profármacos de éster en un segundo modelo de enfermedad inflamatoria intestinal**

El modelo del ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) en ratas proporciona un modelo de EII rápido, fiable y reproducible que imita las manifestaciones de la enfermedad de Crohn. La aplicación del hapteno TNBS en el colon en presencia de etanol da como resultado la enfermedad infiltrativa transmural que se limita al colon y parece ser una respuesta inmunológica provocada por IL-12, mediada por Th1. El papel del TNF $\alpha$  en el desarrollo de la enfermedad ha sido bien documentado puesto que la respuesta inflamatoria no se produce en los animales deficientes en TNF $\alpha$  y se potencia en particular en los ratones que sobreexpresan esta citocina. El TNBS induce una lesión medible a los 2 a 3 días, un pico de inflamación aguda a la semana y la progresión gradual a inflamación crónica dura aproximadamente 2 meses.

Para ensayar la eficacia de los compuestos, se administró TNBS a grupos de ratas Sprague-Dawley hembra el día 0 y se trataron con vehículo (como grupo de control negativo), con el Compuesto 1 o con el Compuesto 2 los días 0-5 por sonda oral a una dosis de 50 mg/kg/día. No hubo toxicidades aparentes relacionadas con los compuestos en las ratas sacrificadas el día 6 de estos estudios. Se evaluó la progresión de la enfermedad mediante la puntuación macroscópica, el peso del colon y la actividad AMP de los cólores al momento del sacrificio. La puntuación macroscópica mide el daño macroscópico en los 6<sup>o</sup>cm distales del colon utilizando un sistema que considera el alcance y el número de úlceras. Como se muestra en la Figura 12, el Compuesto 2 redujo la puntuación macroscópica en las ratas tratadas con TNBS, pero el Compuesto 1 no. De forma similar, el Compuesto 2, pero no el Compuesto 1, redujo la elevación del peso del colon en ratas tratadas con TNBS (Figura 13) que es resultado del edema, de la hipertrofia de la capa muscular y de la fibrosis durante la inflamación. Finalmente, el Compuesto 2 también redujo la actividad AMP en el colon (Figura 14) confirmando que reduce la infiltración de granulocitos en el tejido. En conjunto, estos datos confirman los resultados observados en el modelo de DSS, lo que demuestra que la forma de profármaco del inhibidor de la SK tiene una mayor eficacia terapéutica que el propio inhibidor de la SK activo.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



5

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, donde

10  $R_1$  es H, Cl o F;  
 $R_2$  es H o alquilo;  
 $m$  es 1 o 2;  
 $n$  es 1, 2, 3, 4 o 5; y  
 cada  $R_3$  es independientemente H, -C(O)alquilo, -C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)OH,  $R_4$ , -C(O)NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, -P(O)(OR<sub>7</sub>)<sub>2</sub> o glucosilo,  
 15 donde

20  $R_4$  es un aminoácido natural o no natural unido a través del resto carboxilo como un éster,  
 $R_5$  es H o alquilo,  
 $R_6$  es H o alquilo, y  
 cada  $R_7$  es independientemente H o alquilo,

donde cada alquilo tiene independientemente 1-20 átomos de carbono.

25 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde  $R_1$  es Cl.

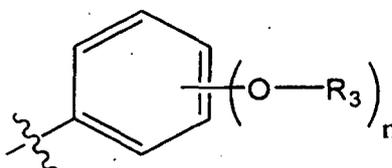
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde  $R_2$  es H.

4. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde  $n$  es 1 o 2.

30 5. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde  $m$  es 2.

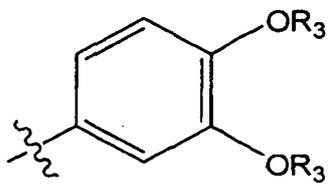
6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, donde  $n$  es 2.

35 7. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el resto



tiene la estructura

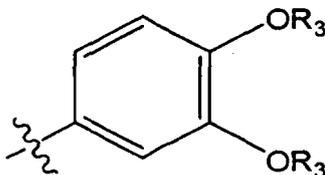
40



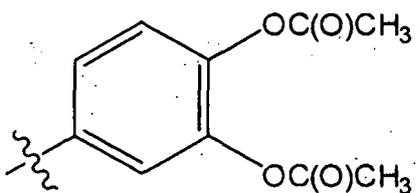
8. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde  $R_3$  no es H.

9. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde cada R<sub>3</sub> es un -C(O)alquilo.  
 10. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el resto

5



tiene la estructura



10

11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado entre el grupo que consiste en:

- 15  
 2-acetoxi-5-(2-{{3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino}etil)fenil éster del ácido acético;  
 2-propioniloxi-5-(2-{{3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino}etil)fenil éster del ácido propiónico;  
 2-butililoxi-5-(2-{{3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino}etil)fenil éster del ácido butírico;  
 5-(2-{{3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]amino}etil)-2-hidroxifenil éster del ácido isobutírico; y  
 5-(2-{{3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]amino}etil)-2-hidroxifenil éster del ácido 2-amino-3-metil-butírico,  
 preferentemente 2-acetoxi-5-(2-{{3-(4-clorofenil)-adamantano-1-carbonil]-amino}etil)fenil éster del ácido acético.

- 20 12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en combinación con un vehículo, medio o agente auxiliar farmacéuticamente aceptables.

- 25 13. Un compuesto o sal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, o una composición de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en la inhibición de la esfingosina cinasa en un paciente que necesite dicha inhibición.

- 30 14. Un compuesto o sal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, o una composición de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de un trastorno en un paciente, teniendo dicho trastorno una activación anormal de la esfingosina cinasa.

- 35 15. Un compuesto o sal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, o una composición de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre una enfermedad hiperproliferativa, una enfermedad inflamatoria, o una enfermedad angiogénica.

- 40 16. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, donde la enfermedad es una enfermedad hiperproliferativa seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, aterosclerosis, reestenosis, trastornos proliferativos de las células mesangiales y psoriasis; o la enfermedad es una enfermedad inflamatoria seleccionada entre el grupo que consiste en enfermedad intestinal inflamatoria, artritis, aterosclerosis, asma, alergia, insuficiencia renal inflamatoria, shock circulatorio, lesión por isquemia-reperusión, insuficiencia orgánica post-quirúrgica, esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, inflamación de la piel, enfermedad periodontal, psoriasis y enfermedades de la inmunidad mediadas por linfocitos T.

- 45 17. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, donde la enfermedad es un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cánceres de cabeza y cuello, cánceres de pulmón, cánceres del tracto gastrointestinal, cánceres de mama, cánceres ginecológicos, cánceres testiculares, cánceres del tracto urinario, cánceres neurológicos, cánceres endocrinos, cánceres de piel, sarcomas, cánceres del mediastino, cánceres retroperitoneales, cánceres cardiovasculares, mastocitosis, carcinosarcomas, cilindroma, cánceres dentales, esteseoneuroblastoma, cáncer de uraco, carcinoma de células de Merkel, paragangliomas, linfoma de Hodgkin,  
 50 linfoma no Hodgkin, leucemias crónicas, leucemias agudas, cánceres mieloproliferativos, discrasias de células plasmáticas y síndromes mielodisplásicos; o un trastorno proliferativo de las células mesangiales seleccionado entre el grupo que consiste en glomerulonefritis, nefropatía diabética, nefrosclerosis maligna, síndromes microangiopáticos trombóticos, rechazo de trasplantes y glomerulopatías.

18. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, donde la enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en

- 5 (i) una enfermedad intestinal inflamatoria seleccionada entre el grupo que consiste en colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y colitis indeterminada;
- (ii) una enfermedad de la inmunidad mediada por linfocitos T seleccionada entre el grupo que consiste en encefalomiелitis alérgica, neuritis alérgica, rechazo de trasplantes de aloinjertos, enfermedad de injerto contra hospedador, miocarditis, tiroiditis, nefritis, lupus eritematoso sistémico y diabetes mellitus insulino-dependiente;
- 10 (iii) una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, osteoartritis, síndrome de Caplan, síndrome de Felty, síndrome de Sjogren, espondilitis anquilosante, enfermedad de Still, condrocalcinosis, gota, fiebre reumática, enfermedad de Reiter y síndrome de Wissler;
- (iv) una insuficiencia renal inflamatoria seleccionada entre el grupo que consiste en glomerulonefritis, lesión glomerular, síndrome nefrótico, nefritis intersticial, nefritis lúpica, enfermedad de Goodpasture, granulomatosis de Wegener, vasculitis renal, nefropatía por IgA y la enfermedad glomerular idiopática;
- 15 (v) una inflamación de la piel seleccionada entre el grupo que consiste en psoriasis, dermatitis atópica, sensibilidad de contacto y acné; y
- (vi) una enfermedad angiogénica seleccionada entre el grupo que consiste en retinopatía diabética, artritis, cáncer, psoriasis, sarcoma de Kaposi, hemangiomas, angiogénesis miocárdica, neovascularización de la placa aterosclerótica y enfermedades angiogénicas oculares tales como neovascularización coroidea, retinopatía del prematuro (fibroplasias retrolentales), degeneración macular, rechazo de injerto de córnea, rubeosis, glaucoma neovascular y síndrome de Osler-Webber.
- 20

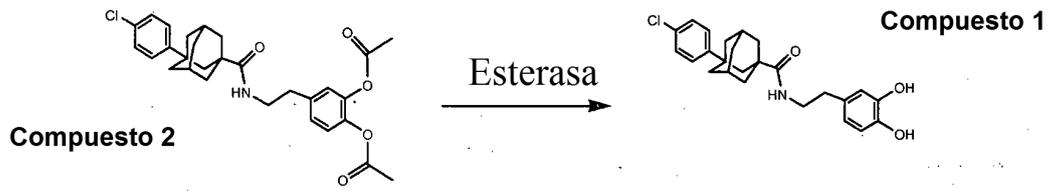


Figura 1

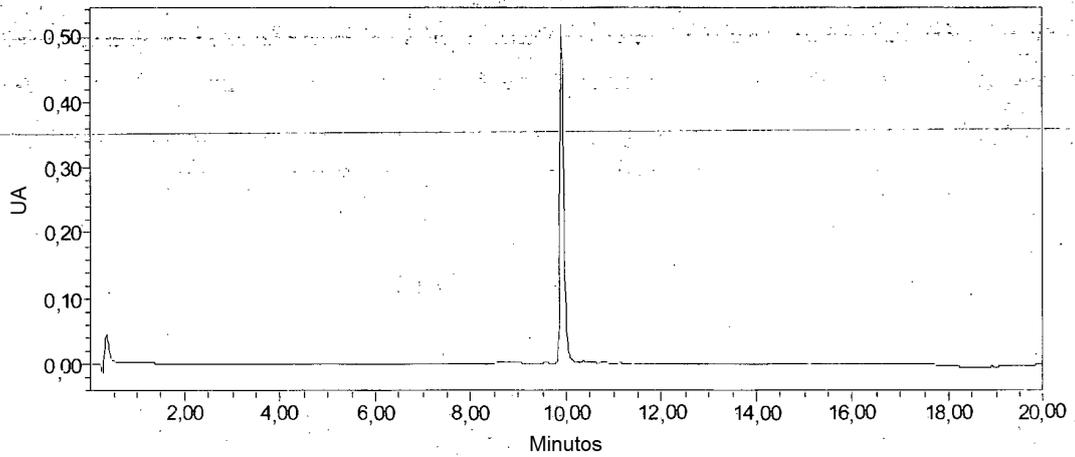


Figura 2

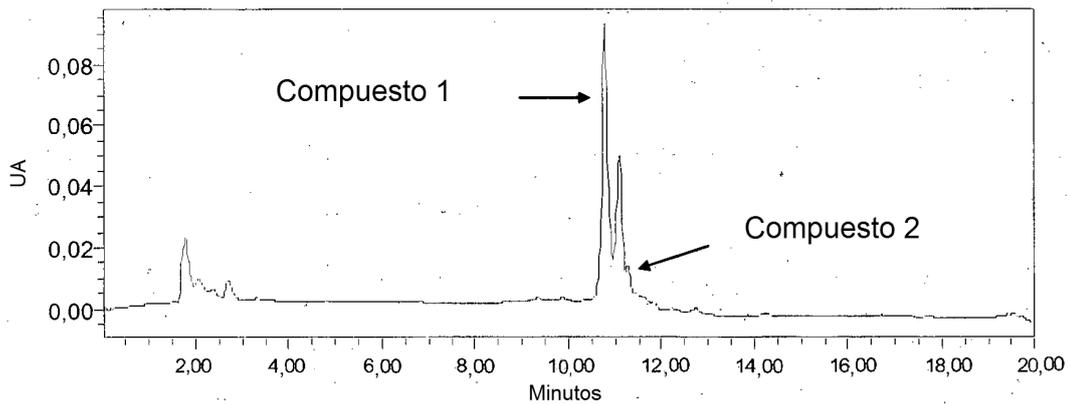


Figura 3

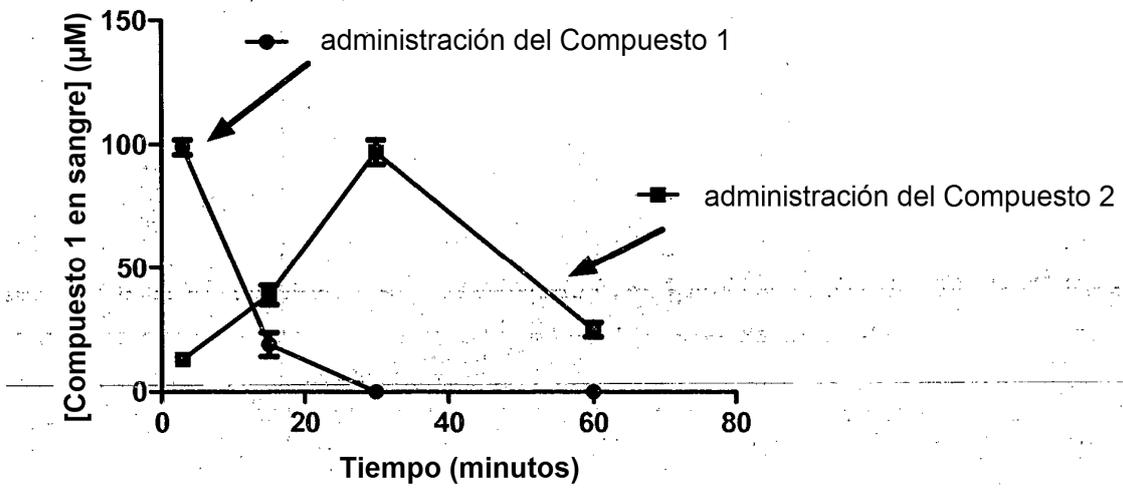


Figura 4

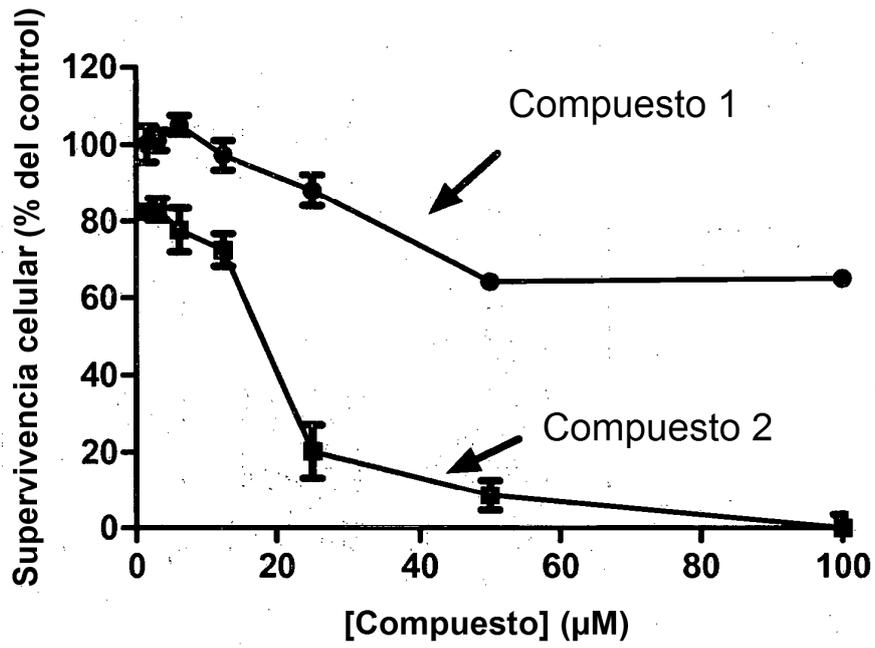


Figura 5

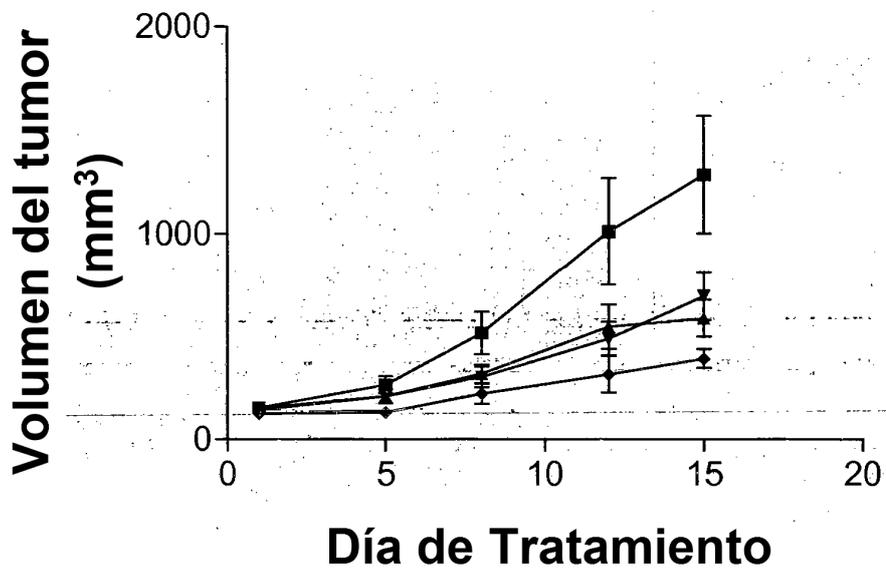


Figura 6

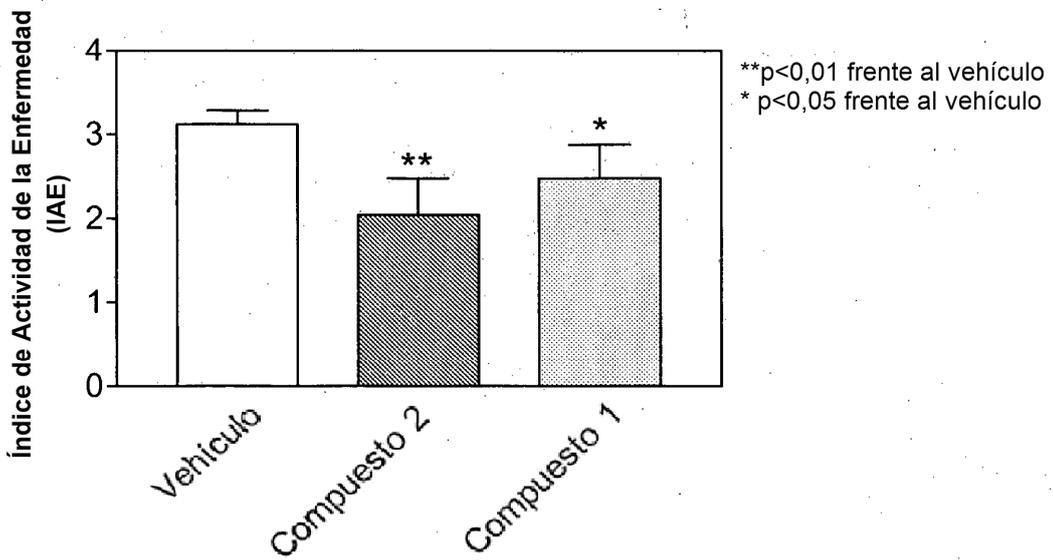


Figura 7

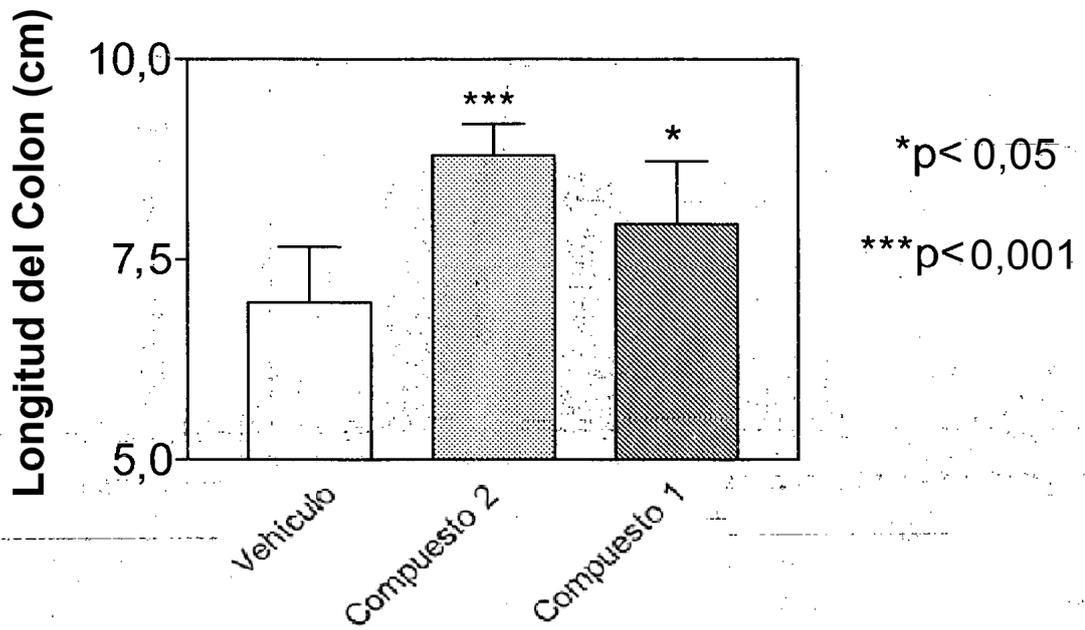


Figura 8

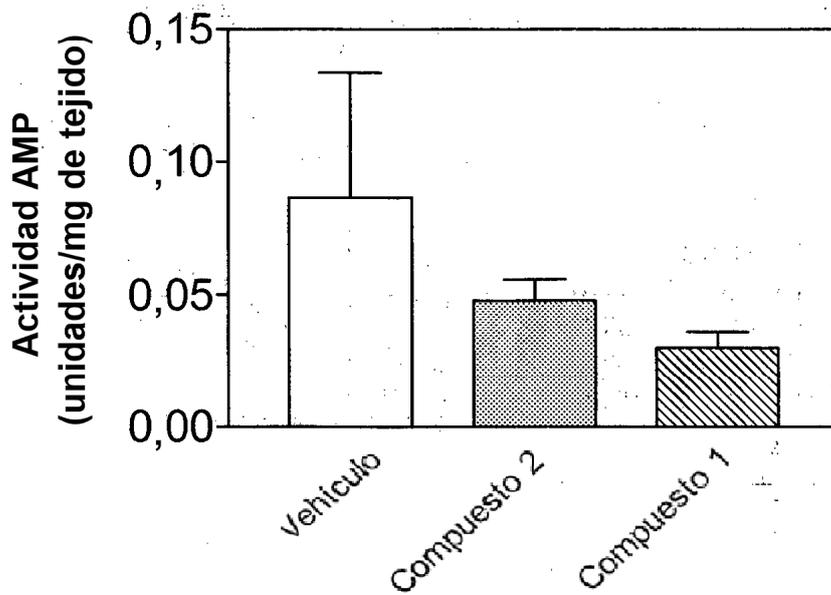


Figura 9

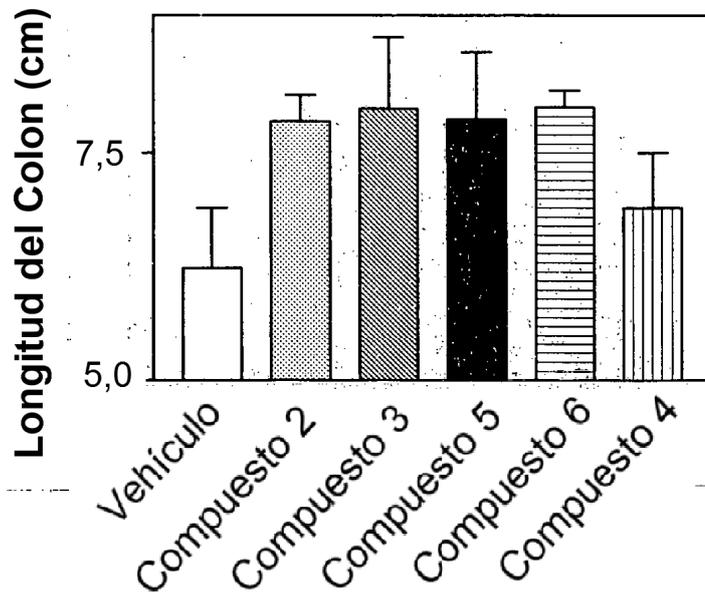


Figura 10

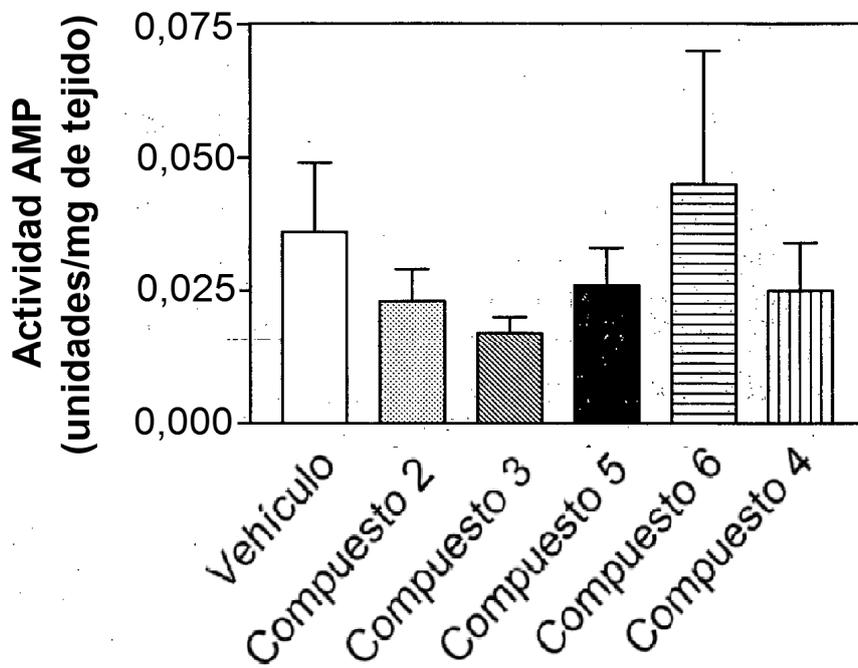


Figura 11

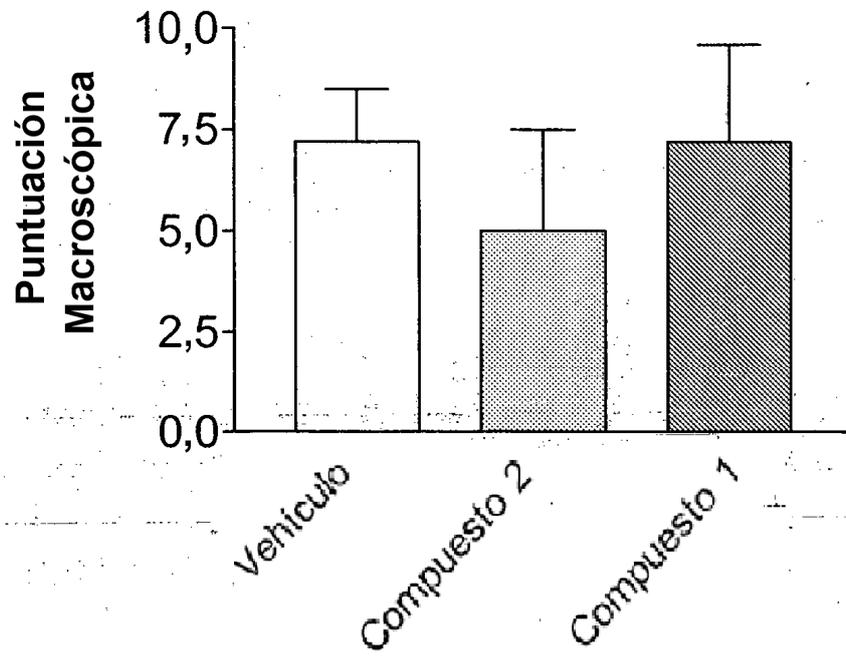


Figura 12

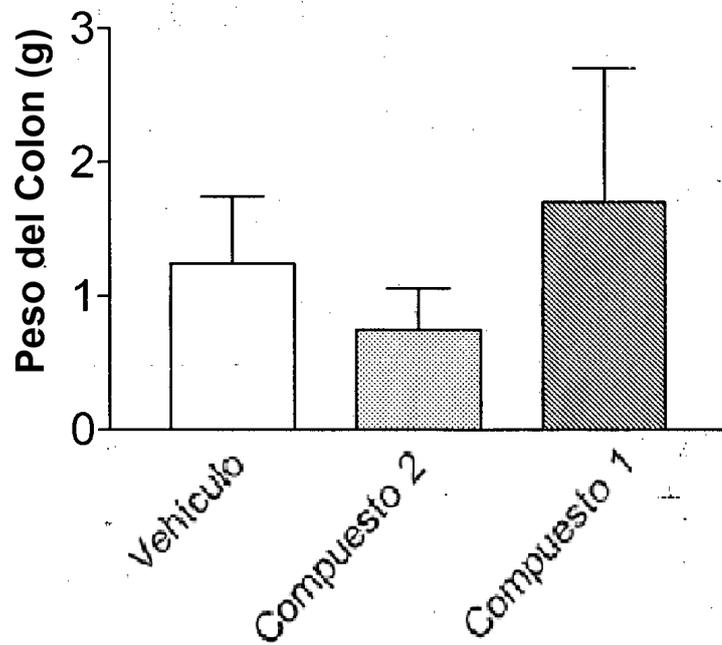


Figura 13

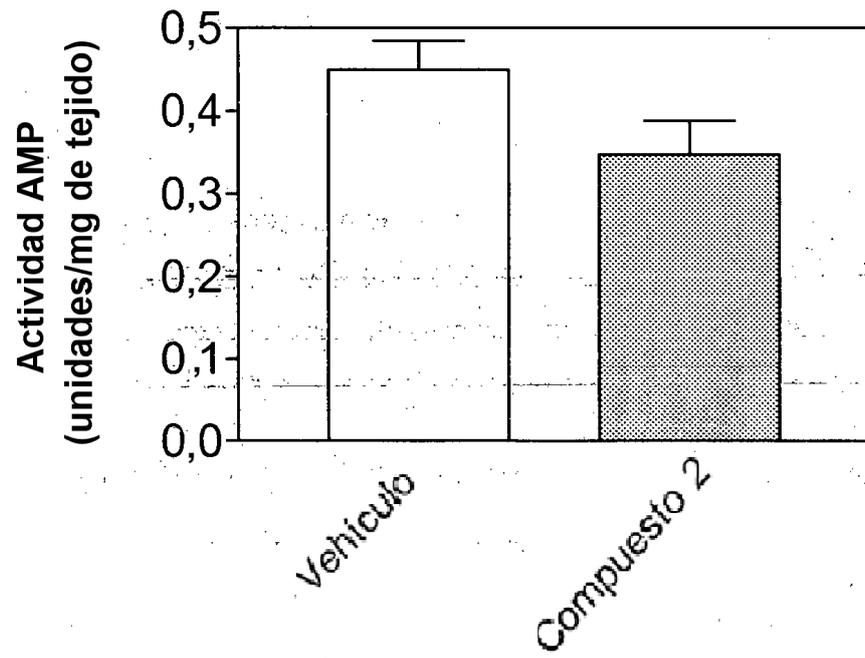


Figura 14