

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 482**

51 Int. Cl.:

**C07C 237/08** (2006.01)

**A61K 31/164** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2012** **E 12729378 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016** **EP 2739606**

54 Título: **Derivados de amino y amonio hidroxí-sustituídos y su uso médico**

30 Prioridad:

**26.05.2011 EP 11167741**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.09.2016**

73 Titular/es:

**JADO TECHNOLOGIES GMBH (50.0%)**

**Tatzberg 47-51**

**01307 Dresden, DE y**

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHLECHTINGEN, GEORG;**

**KNÖLKER, HANS-JOACHIM;**

**FRIEDRICHSON, TIM;**

**JENNINGS, GARY y**

**BRAXMEIER, TOBIAS**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 581 482 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

Derivados de amino y amonio hidroxil-sustituidos y su uso médico

La presente invención se refiere a derivados de amino y amonio hidroxil-sustituidos, en particular, los compuestos de fórmula **1** o **2**, y su uso médico, incluyendo su uso en el tratamiento, prevención o mejora de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico, o una enfermedad o trastorno proliferativo, neoplásico o displásico.

Sin limitarse a teoría alguna, se considera que los compuestos proporcionados en el presente documento ejercen su actividad farmacológica a través de la inhibición de la ruta de fosfoinosítido 3-cinasa (PI3K)/Akt cinasa. La serina/treonina proteína cinasa Akt (también conocida como proteína cinasa B) es un mediador clave de la transducción de señales. Akt se activa por numerosos receptores, incluyendo aquellos de factores de crecimiento, citocinas, hormonas e insulina, así como por la unión de las células a la matriz extracelular. Una vez activados, los receptores de membrana plasmática estimulan la actividad de PI3K para generar fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), un segundo mensajero lipídico esencial para la translocación de Akt, que contiene un dominio de homología de pleckstrina (PH) de unión a PIP3, desde el citoplasma hasta la membrana plasmática (Franke et al., Cell 81 : 727-736, (1995)). Una vez se ha incorporado a la membrana, se fosforila y activa por otras cinasas (Hemmings, Science 275: 628-630 (1997); Hemmings, Science 276: 534 (1997); Downward, Science 279: 673-674 (1998); Alessi et al., EMBO J. 15: 6541-6551 (1996)), tales como PDK1 y mTORC2.

Akt, a su vez, es responsable de regular la función de muchas proteínas celulares implicadas en procesos tales como la transcripción, la proliferación celular y la apoptosis (muerte celular programada), la angiogénesis, la motilidad celular y el metabolismo de la glucosa (Kulik et al., Mol Biol Cell. 17: 1595-1606 (1997); Franke et al., Cell 88: 435-437 (1997); Kaufmann-Zeh et al., Nature 385: 544-548 (1997); Hemmings, Science 275: 628-630 (1997); Dudek et al., Science 275: 661-665 (1997)). La ruta de PI3K/Akt activada protege las células de la apoptosis y, actuando como un modulador de la señalización antiapoptótica en células tumorales, Akt es una diana para el tratamiento contra el cáncer. El bloqueo de la ruta de PI3K/Akt podría, por lo tanto, inhibir simultáneamente la proliferación de células tumorales y sensibilizarlas a agentes pro-apoptóticos (Falasca, Curr Pharm Des. 16: 1410-6 (2010)).

Estos hallazgos indican que Akt puede ser una diana terapéutica para el tratamiento de inflamación, enfermedades autoinmunitarias y alergias, así como el cáncer. Por consiguiente, los compuestos proporcionados en el presente documento, en particular, los compuestos de fórmula **1** o **2**, son útiles en el tratamiento, prevención o mejora de dichas enfermedades.

Los fármacos inmunomoduladores de amplia acción tales como corticoesteroides, inhibidores de calcineurina y ciclosporina son muy eficaces y se han usado para el tratamiento de enfermedades alérgicas e inflamatorias celulares, incluyendo enfermedades autoinmunitarias, durante muchos años. Son potentes en la supresión procesos impulsados tanto por Th1 como por Th2, aunque soportan efectos secundarios indeseables, que limitan su ventana terapéutica. Los corticoesteroides regulan la expresión de numerosos genes y, en consecuencia, su uso está limitado por efectos adversos graves. Los efectos adversos graves típicos del uso a corto plazo de corticoesteroides son alteraciones en la retención de agua y sales, metabolismo de los lípidos, adelgazamiento de la piel y cambios en el comportamiento. Los efectos adversos más graves asociados con la exposición sistémica a largo plazo a corticoesteroides incluyen aumento de apetito y ganancia de peso, depósitos de grasa en pecho, cara, parte alta de la espalda y el estómago, retención de agua y sales que conduce a hinchazón y edema, hipertensión arterial, diabetes, curación ralentizada de heridas, osteoporosis, cataratas, acné, debilidad muscular, adelgazamiento de la piel, susceptibilidad aumentada a infección, úlceras de estómago, aumento de sudoración, cambios de humor, problemas psicológicos tales como depresión, supresión suprarrenal y crisis.

Los tratamientos más específicamente dirigidos, tales como productos biológicos, por ejemplo, anticuerpos contra ciertas citocinas o sus receptores, inhiben una única proteína diana y son eficaces en ciertas situaciones, pero solo abordan una de las dianas en una cascada inflamatoria altamente redundante y, por tanto, a menudo se usan en el tratamiento de combinación, ya que la resolución eficaz de las enfermedades inflamatorias requiere abordar varias dianas simultáneamente.

Hay una gran necesidad médica no satisfecha de obtener nuevos fármacos que repriman los procesos patológicos subyacentes. Por ejemplo, en la artritis reumatoide (AR), los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) pueden ralentizar la destrucción progresiva de las articulaciones reduciendo la gravedad de la enfermedad a largo plazo. Esto proporciona ventajas terapéuticas como económicas acortando el periodo terapéutico y reduciendo la dosis de medicaciones simultáneas.

Muchas enfermedades inflamatorias crónicas, incluyendo enfermedades autoinmunitarias tales como la artritis reumatoide (AR), están asociadas con rutas de transducción de señales intracelulares desreguladas, incluyendo la ruta de fosfoinosítido 3-cinasa (PI3K)/Akt cinasa, y las interacciones patogénicas resultantes entre las células inmunitarias y estromáticas del tejido conjuntivo conducen a cambios en la activación, proliferación, capacidad migradora celular, y la supervivencia celular que contribuyen a la inflamación (Tas et al., Curr Pharm Des. 11: 581-611 (2005)). Por ejemplo, se ha documentado un funcionamiento, diferenciación y/o activación anormales de linfocitos T, linfocitos B y células mieloides en varias enfermedades autoinmunitarias, incluyendo la artritis reumatoide (AR),

diabetes mellitus, lupus y esclerosis múltiple y los estudios han detallado una activación anómala del eje de señalización Akt en el contexto de autoinmunidad sistémica (Wu et al., *Disord Drug Targets*. 9: 145-50 (2009)).

5 Akt es una importante ruta de transducción de señales que media el retardo de la apoptosis de los neutrófilos por mediadores inflamatorios, durante la activación de neutrófilos durante la inflamación (Rane y Klein, *Front Biosci*. 14: 2400-12 (2009)) y el control sobre la migración y la apoptosis de neutrófilos y macrófagos es un factor clave en la patogénesis de la mayoría de las enfermedades inflamatorias crónicas.

10 La AR es una enfermedad inflamatoria crónica, que da como resultado la inflamación de la membrana sinovial y la destrucción del hueso y el cartílago adyacentes. Los macrófagos, fibroblastos y linfocitos sinoviales son esenciales para la patogénesis de esta enfermedad, en la que la apoptosis desempeña tareas divergentes. Las rutas de señalización, tales como PI3K/Akt, están altamente activadas en la articulación con AR, lo que contribuye a la expresión de genes que causan inflamación y destrucción y expresión de una diversidad de moléculas antiapoptóticas. La inducción de la apoptosis de los macrófagos, fibroblastos o linfocitos sinoviales, a través de la inhibición de la expresión de moléculas antiapoptóticas, podría ser terapéuticamente beneficiosa en AR (Liu y Pope, *Curr Opin Pharmacol*. 3: 317-22 (2003)). Además, los resultados sugieren que las rutas de transducción de señales dependientes de PI3K/Akt están involucradas en la sobreproducción de la citocina inflamatoria clave IL-17 en pacientes con artritis reumatoide (Kim et al., *Arthritis Res Ther*. 7: R139-148 (2005)).

20 Akt está estrechamente asociada con receptores clave unidos a membrana y representa un punto de integración convergente para múltiples estímulos implicados en la patogénesis de COPD. Akt está también implicada en las manifestaciones sistémicas de COPD, tales como atrofia de músculo esquelético y trastornos metabólicos. Por tanto, Akt representa una diana terapéutica particularmente atractiva para el tratamiento de COPD (Bozinovski et al., *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 1: 31-38 (2006)).

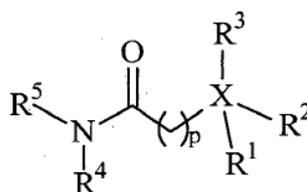
25 Los compuestos proporcionados en el presente documento están en condiciones de ser fármacos modificadores de la enfermedad. Los compuestos tienen potencial para su aplicación en una amplia diversidad de indicaciones inflamatorias crónicas y, en combinación con una tolerabilidad favorable, se puede esperar que los productos obtengan la aprobación de un número significativo de pacientes que padecen los graves efectos secundarios de los tratamientos actuales. Además, los compuestos proporcionados en el presente documento serán adecuadas no solo para monoterapia, sino también en combinación con los tratamientos existentes, que abordan dianas específicas de la enfermedad, pero no son suficientes para resolver la enfermedad en solitario.

30 El documento WO 2007/071402 describe el uso de ciertos fosfolípidos iónicos internos, fosfonolípidos y derivados de fosfato para el tratamiento o prevención de enfermedades alérgicas.

35 Además, se divulgan compuestos de amonio cuaternario específicos en el documento US 5.545.667, que son útiles como agentes antineoplásicos. Coy EA et al. *Int J Immunopharmacol*. 1990; 12(8): 871-81 informan de una actividad antiproliferativa generalizada de moléculas anfífilas específicas sobre linfocitos T y sobre una diversidad de líneas de células tumorales y la falta de especificidad para el sistema inmunológico. El documento WO 92/16201 se refiere al uso de compuestos de betaína específicos para el tratamiento de ciertas infecciones víricas. Se divulgan compuestos adicionales de amonio cuaternario específicos, por ejemplo, en: Ernst R et al. *Toxicology*. 1980;15(3): 233-42; Speijers GJ et al. *Vaccine*. 1989; 7(4): 364-8; y Vian L et al. *Toxic in Vitro*. 1995;9(2): 185-190.

40 Sorprendentemente, se ha descubierto que los compuestos de la presente invención, en particular los compuestos de fórmula 1 o 2, como se describe y define en el presente documento a continuación, tienen un citotoxicidad ventajosamente baja. La presente invención, por tanto, resuelve el problema de proporcionar agentes terapéuticos que tengan un perfil de toxicidad favorable que sean eficaces, *inter alia*, en el tratamiento, prevención o mejora de trastorno inflamatorios, autoinmunitarios y/o alérgicos.

En consecuencia, la presente invención proporciona un compuesto de la siguiente fórmula 1



1

45 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

R<sup>1</sup> es un grupo hidrocarburo C<sub>10-20</sub>.

R<sup>2</sup> es un grupo alquilo C<sub>1-4</sub>, y R<sup>3</sup> es H, un grupo alquilo C<sub>1-4</sub> o R<sup>3</sup> está ausente.

De forma alternativa, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> están unidos entre sí para formar un anillo de pirrolidina, un anillo de piperidina o un anillo de azepano junto con el átomo de nitrógeno X al que están unidos, en el que dicho anillo de pirrolidina, dicho anillo de piperidina o dicho anillo de azepano está opcionalmente sustituido con uno o más grupos independientemente seleccionados de -OH, -O(alquilo C<sub>1-3</sub>), -OC(O)-(alquilo C<sub>1-3</sub>), alquilo C<sub>1-3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1-3</sub>) o -N(alquilo C<sub>1-3</sub>)(alquilo C<sub>1-3</sub>).

R<sup>4</sup> es H o un grupo alquilo C<sub>1-4</sub>.

R<sup>5</sup> es un grupo alquilo C<sub>2-8</sub>, en el que uno o más átomos de hidrógeno de dicho grupo alquilo C<sub>2-8</sub> está remplazado por -OH, o R<sup>5</sup> es un grupo cicloalquilo C<sub>5-7</sub>, en el que un átomo de carbono del anillo de dicho grupo cicloalquilo C<sub>5-7</sub> está opcionalmente remplazado por un átomo de oxígeno y en el que uno o más átomos de hidrógeno de dicho grupo cicloalquilo C<sub>5-7</sub> están sustituidos independientemente por -OH o -CH<sub>2</sub>OH.

X es N<sup>+</sup> o, si R<sup>3</sup> está ausente, X es N.

p es 1, 2 o 3.

La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula **1**, como se describe y define en el presente documento, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En consecuencia, la invención se refiere a un compuesto de fórmula **1** o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las entidades mencionadas anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso como un medicamento.

La invención se refiere, además, a un compuesto de fórmula **1**, como se describe y define en el presente documento, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las entidades mencionadas anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico.

Además, la invención se refiere a un compuesto de fórmula **1** o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las entidades mencionadas anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad o trastorno proliferativo, neoplásico o displásico.

Las respuestas alérgicas e inflamatorias se caracterizan por interacciones dinámicas de las células inmunitarias y no inmunitarias, coordinadas a través del contacto célula-célula y mediadores inmunitarios solubles. Estas respuestas y sus resultados, además, se ven modificadas por la genética y el estilo de vida de cada individuo.

Los linfocitos T auxiliares desempeñan un papel clave en el inicio y mantenimiento de las respuestas inflamatorias y se pueden dividir en procesos impulsados por Th1 (inmunidad mediada por células) y Th2 (inmunidad mediada por anticuerpos). Desequilibrios en estas respuestas pueden dar como resultado una hiper- o hiposensibilidad patológica a los antígenos. Se manifiesta una inflamación crónica en diversos estados patológicos tales como, por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, dermatitis atópica, urticaria y psoriasis.

Las respuestas inflamatorias a los antígenos pueden adoptar la forma de respuestas impulsadas por linfocitos T auxiliares de diferentes tipos. Los linfocitos Th1 median respuestas celulares que involucran células citotóxicas tales como macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, mientras que los linfocitos Th2 median respuestas humorales que involucran la secreción de anticuerpos desde linfocitos B y la activación de mastocitos. También pueden estar involucradas otras respuestas no inmunitarias, tales como aquellas que involucran la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa. La liberación incontrolada de citocinas y quimiocinas está en el centro de las enfermedades inflamatorias, como la enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, dermatitis atópica, urticaria y psoriasis.

Se proporciona una nueva estrategia de intervención por los compuestos de acuerdo con la presente invención, en particular los compuestos de fórmula **1** o **2**, como se describe y define en el presente documento, que modulan ampliamente las actividades de las proteínas dentro de la cascada inflamatoria. A través del enriquecimiento del fármaco en dominios de la membrana, se ejerce una inhibición alostérica sobre proteínas diana clave en las cascadas de transducción de señales en la inflamación.

Los compuestos de la presente invención se identificaron como potentes inhibidores de la liberación de mediadores inmunitarios *in vitro* en un modelo de mastocitos, como también se demostró en el Ejemplo 5. Además, inhiben la liberación de las citocinas proinflamatorias, TNF- $\alpha$  e interleucina-6, desde células mononucleares de sangre periférica (PBMC) estimuladas con lipopolisacáridos, lo que demuestra la actividad inmunomoduladora en diferentes tipos de células.

Se confirmó amplia actividad antiinflamatoria en modelos animales de inflamación impulsada por Th1 y Th2. En un modelo de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) predominantemente impulsada por Th1 en ratones, los compuestos suprimieron la respuesta inflamatoria en un grado equivalente a la dexametasona, un corticoesteroide comercializado caracterizado por graves efectos secundarios, como se muestra en el Ejemplo 7. En un modelo de

dermatitis alérgica por contacto predominantemente impulsada por Th2, los compuestos fueron muy activos después de su aplicación tópica y también mostraron un efecto antiinflamatorio después de su administración oral, como se muestra en el Ejemplo 8.

En el contexto de la presente invención, se descubrió, sorprendentemente, que los compuestos de fórmula **1** o **2**, como se describe y define en el presente documento, son potentes inhibidores de la desgranulación de los mastocitos y por tanto funcionan como estabilizadores de mastocitos, y/o potentes inhibidores de la alergia y/o la inflamación celular. En particular, se ha descubierto, sorprendentemente, que los compuestos, como se describe en el presente documento, se pueden usar terapéuticamente en el tratamiento, prevención y/o mejora de trastornos inmunológicos y trastornos relacionados con alergia y/o inflamación celular, en particular trastornos inflamatorios, autoinmunitarios y/o alérgicos.

Los linfocitos T auxiliares (Th) son un subgrupo de linfocitos que desempeñan un papel importante en el sistema inmunitario debido a su participación en la activación y dirección de otras células inmunitarias. Los otros tipos principales de linfocitos son los linfocitos B y los linfocitos citolíticos naturales (NK). Durante la activación antigénica y la proliferación de los linfocitos Th, los linfocitos Th0 se diferencian en Th1, Th2 u otros subtipos dependiendo del tipo de antígeno, la célula presentadora de antígeno y el entorno de citocinas.

La hipersensibilidad de tipo retardado, también llamada hipersensibilidad de tipo IV es una respuesta inmunitaria de memoria mediada por linfocitos Th independiente de anticuerpos resultante de una sobre-estimulación de células inmunitarias, comúnmente linfocitos y macrófagos, lo que da como resultado inflamación crónica y liberación de citocinas. Ejemplos de enfermedades importantes son dermatitis de contacto, inflamación crónica del íleon y el colon, por ejemplo, como se observa en enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), artritis reumatoide y enfermedades relacionadas, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, enfermedad de Gaucher, fibromialgia, artrosis, artritis reactiva, enfermedad inflamatoria pélvica, polimialgia reumática, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves-Basedow, y rechazo crónico de trasplantes. Para IBD, por ejemplo, Hue et al. demostraron una relación causal entre la enfermedad y la inflamación intestinal mediada por linfocitos T (Hue, S; et al. (2006) J. Exp. Med. 203 (11), 2473).

La psoriasis es una enfermedad autoinmunitaria crónica que afecta a la piel. Una hipótesis para la causa de la psoriasis ve la enfermedad como un trastorno mediado por el sistema inmunológico en el que la reproducción excesiva de células de la piel es secundaria a factores producidos por el sistema inmunológico. Los linfocitos T se vuelven activos, migran a la dermis y desencadenan la liberación de citocinas, que causan inflamación y la rápida producción de células de la piel.

Las células cebadas, o mastocitos, desempeñan un papel clave en el proceso inflamatorio. Cuando se activa, el mastocito libera rápidamente sus gránulos característicos y diversos mediadores hormonales en el intersticio, un proceso llamado desgranulación. Las moléculas liberadas en el entorno extracelular incluyen mediadores preformados, por ejemplo, histamina y serotonina, mediadores lipídicos recién formados (eicosanoides) y citocinas. En reacciones alérgicas, los mastocitos permanecen inactivos hasta que un alérgeno se une al receptor de IgE expresado en la superficie celular, lo que conduce a la desgranulación y liberación de mediadores.

Muchas formas de alergias cutáneas y mucosas, en la mayoría de los casos acompañadas de síntomas inflamatorios, están mediadas, en gran medida, por mastocitos. Desempeñan un papel central en el asma, eccema, prurito y las diversas formas de rinitis, conjuntivitis y urticaria. Los mastocitos también están implicados en la patología asociada con trastornos tales como artritis reumatoide, penfigoide ampollar y esclerosis múltiple. Se ha demostrado que están involucrados en el reclutamiento de células inflamatorias a las articulaciones y la piel. Además, la mastocitosis es un trastorno que muestra proliferación de mastocitos y existe en una forma cutánea y sistémica.

La dermatitis atópica, también conocida como neurodermitis, es un trastorno inflamatorio y prurítico de la piel caracterizado por inflamación crónica. Aunque las causas subyacentes de la dermatitis atópica no se conocen bien y las relaciones entre la ingesta de, o contacto con, alérgenos y diversos estímulos inflamatorios no están bien establecidas, se postula que los mastocitos y/o los procesos relacionados con linfocitos T están implicados en los procesos patológicos que conducen a dermatitis atópica.

El asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) son ambos trastornos obstructivos de las vías respiratorias, pero están implicados diferentes tipos de inflamación en la patogénesis de estas enfermedades. El asma es con frecuencia un proceso alérgico con una preponderancia de linfocitos Th2 y eosinófilos en las vías respiratorias. Por el contrario, hay actividad Th1 predominante en la sangre de pacientes con COPD (Leckí, M J; et al. (2003) Thorax 58, 23).

La xeroftalmia (DED) es un trastorno inflamatorio de la unidad funcional lagrimal que conduce a enfermedad crónica de la superficie ocular, deterioro de la calidad de la visión, y una amplia gama de complicaciones. Se reconoce que una respuesta inflamatoria crónica desempeña un papel clave en la patogénesis de la xeroftalmia humana (Calonge M, et al. Ocul Immunol Inflamm. 2010. 18: 244-253; Stevenson, et al. Arch Ophthalmol. 2012. 130: 90-100; Zoukhri D. Exp Eye Res. 2006. 82: 885-898; Pflugfelder SC. Am J Ophthalmol. 2004. 137: 337-342).

El edema macular diabético (o retinopatía diabética) se caracteriza por una disfunción microvascular prematura de la

retina y es una causa principal de ceguera en sujetos que padecen diabetes. Hay evidencias que indican que la inflamación de la retina desempeña un papel importante en la patogénesis del edema macular diabético (Joussen AM, et al. FASEBJ. 2004. 18: 1450-1452; Rangasamy S, et al. Middle East Afr J Ophthalmol. 2012. 19: 52-59; Meleth AD, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005. 46: 4295-4301; Funatsu H, et al. Ophthalmology. 2009. 116: 73-79; Kim SJ, et al. Surv Ophthalmol. 2010. 55: 108-133).

En consecuencia, los compuestos de la presente invención, en particular los compuestos de fórmula **1** o **2**, son útiles en el tratamiento, prevención o mejora de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico. El trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico a tratar, prevenir o mejorar, usando los compuestos de la invención se selecciona, por ejemplo, de: psoriasis, dermatitis atópica (eccema atópico), dermatitis de contacto, eccema xerótico, dermatitis seborreica, neurodermatitis, dishidrosis, eccema discoide, eccema venoso, dermatitis herpetiforme (enfermedad de Dühring), autoeccematización, dermatomiositis, síndrome de hiper-IgE (Buckley), síndrome de Wiskott-Aldrich, anafilaxia, alergia alimentaria, o reacciones alérgicas a picaduras venenosas; urticarias agudas, urticarias crónicas, urticarias físicas incluyendo urticaria acuagénica, urticaria colinérgica, criourticaria (criourticaria crónica), urticaria retardada por presión, dermatografismo, urticaria por calor, urticaria solar, urticaria por vibraciones, urticaria adrenérgica, o angioedema con urticaria; enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis con desviación (diverticulitis), síndrome de Behçet, colitis indeterminada, enfermedad celíaca, síndrome del intestino irritable, íleon postoperatorio, gastroenteropatía eosinofílica, o gastritis; rinitis alérgica crónica, rinitis alérgica estacional (polinosis), conjuntivitis alérgica, conjuntivitis por sustancias químicas, conjuntivitis neonatal, síndrome de Sjogren, glaucoma de ángulo abierto, enfermedad del ojo seco (DED; incluyendo, por ejemplo, ojo seco deficiente en lágrimas acuosas (ADDE), xeroftalmia por síndrome de Sjögren (SSDE), no SSDE, u ojo seco evaporativo (EDE)), o edema macular diabético (o retinopatía diabética); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma alérgica, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, o fibrosis pulmonar; artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerodermia, artrosis, artritis reactiva, o polimialgia reumática; esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves-Basedow, arteritis de la temporal, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmunitaria, alopecia areata o síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS); una enfermedad de injerto contra huésped, una enfermedad de huésped contra injerto o un rechazo de trasplante; o una contribución inflamatoria a la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

Además, los compuestos de la presente invención, en particular los compuestos de fórmula **1** o **2**, han demostrado ser eficaces en la inhibición de la activación de la Akt cinasa, como también se muestra en el Ejemplo 6, y son, por tanto, útiles en el tratamiento, prevención o mejora de enfermedades/trastornos proliferativos, neoplásicos o displásicos, que se describirán con más detalle a continuación.

Las evidencias indican que Akt desempeña un papel clave en la progresión del cáncer estimulando la proliferación celular e inhibiendo la apoptosis (Chen et al., Cell Mol Immunol. 2: 241-52 (2005)). Comúnmente, se produce activación no regulada de la ruta de PI3K/Akt en cáncer a través de una diversidad de mecanismos, incluyendo mutaciones genéticas de cinasas y proteínas reguladoras, alteraciones epigenéticas que alteran la expresión y la traducción de genes, y modificaciones postraduccionales. El análisis de los niveles de Akt en tumores humanos mostró que Akt se sobreexpresa en un número significativo de cánceres de ovario (Cheng et al., Proc Natl Acad Sci USA. 89: 9267-9271 (1992)), de páncreas (Cheng et al., Proc Natl Acad Sci USA. 93: 3636-3641 (1996)), de mama y de próstata (Nakatani et al., J Biol Chem. 274: 21528-21532 (1999)) y tumores de tiroides. (Saji y Ringel, Mol Cell Endocrinol. 321: 20-8 (2010)). Estas observaciones demuestran que la ruta de PI3K/Akt desempeña un papel importante para la regulación de la supervivencia celular o la apoptosis en la tumorigénesis. La activación constitutiva de la ruta de PI3K/Akt promueve la supervivencia a largo plazo y el crecimiento de células cancerosas. Los compuestos de la presente invención, que son inhibidores de la activación de la Akt cinasa, están, por tanto, previstos para usarse en el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad o trastorno proliferativo, neoplásico o displásico, en particular el cáncer.

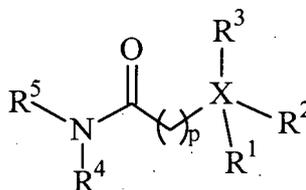
La enfermedad o trastorno proliferativo, neoplásico o displásico a tratar, prevenir o mejorado usando un compuesto de la invención es, por ejemplo, una neoplasia benigna o maligna, tal como, por ejemplo, leucemia, carcinoma corticosuprarrenal, un cáncer relacionado con el sida, cáncer de apéndice, astrocitoma, carcinoma basocelular, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, tumor cerebral, cáncer de mama, un adenoma bronquial, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, linfoma de linfocitos T cutáneos, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, un trastorno mieloproliferativo crónico, tumor desmoplásico de células redondas y pequeñas, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, tumor extracraneal de células germinativas, cáncer extrahepático del conducto biliar, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, carcinoide gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal, tumor de células germinativas, glioma, tumor trofoblástico gestacional, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de corazón, cáncer hepatocelular, linfoma hodgkiniano, linfoma no hodgkiniano, cáncer de hipofaringe, glioma hipotalámico y de la vía óptica, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de células renales, cáncer de laringe, cáncer de labio y la cavidad bucal, cáncer de pulmón, macroglobulinemia de Waldenström, osteosarcoma, meduloblastoma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer de boca, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, neoplasia de células plasmáticas, micosis fungoide, una enfermedad mielodisplásica, mieloma múltiple, un trastorno mieloproliferativo, cáncer de la cavidad nasal y los senos paranasales,

5 carcinoma nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer bucal, cáncer orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinativas del ovario, tumor pancreático, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, astrocitoma pineal, germinoma pineal, pineoblastoma, adenoma hipofisario, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células de transición, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivales, síndrome de Sézary, cáncer de piel, carcinoma broncopulmonar microcítico, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de estómago, tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma, cáncer de tiroides, cáncer de útero, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer de vulva o tumor de Wilms.

10 Los compuestos de la invención, que han demostrado exhibir una eficacia en la supresión de la respuesta inflamatoria al menos equivalente a la del corticoesteroide dexametasona, como también se muestra en los Ejemplos 7 y 8 son, además, ventajosos porque no muestran los efectos adversos observados para los corticoesteroides, tales como la reducción de peso de los ganglios linfáticos y el número de células que se observó para el corticoesteroide diflorasona en el Ejemplo 8, que los hace particularmente útiles en el tratamiento, prevención o mejora de trastornos inflamatorios, autoinmunitarios y/o alérgicos.

15 Además, los compuestos de la presente invención, incluyendo los compuestos de fórmula 1 o 2, tienen una citotoxicidad particularmente baja y, por tanto, un perfil ventajoso de toxicidad, como también se demostró en el Ejemplo 5.

El compuesto de fórmula 1, como se define anteriormente, se describe con más detalle a continuación.



1

20  $R^1$  es un grupo hidrocarburo  $C_{10-20}$ . Preferentemente,  $R^1$  es un grupo alquilo, un grupo alquenilo o un grupo alquinilo; más preferentemente,  $R^1$  es un grupo alquilo lineal, un grupo alquenilo lineal, o un grupo alquinilo lineal; incluso más preferentemente,  $R^1$  es un grupo alquilo lineal. El número de átomos de carbono del grupo hidrocarburo, el grupo alquilo, el grupo alquenilo o el grupo alquinilo es de 10 a 20, preferentemente 12, 14 o 16. En consecuencia, es preferente particularmente que  $R^1$  sea  $-(CH_2)_{11}-CH_3$ ,  $-(CH_2)_{13}-CH_3$ , o  $-(CH_2)_{15}-CH_3$ .

25  $R^2$  es un grupo alquilo  $C_{1-4}$ , y  $R^3$  es H, un grupo alquilo  $C_{1-4}$  o  $R^3$  está ausente; o  $R^2$  y  $R^3$  están unidos entre sí para formar un anillo de pirrolidina, un anillo de piperidina o un anillo de azepano junto con el átomo de nitrógeno X al que están unidos, en el que dicho anillo de pirrolidina, dicho anillo de piperidina o dicho anillo de azepano está opcionalmente sustituido con uno o más grupos independientemente seleccionados de  $-OH$ ,  $-O(\text{alquilo } C_{1-3})$ ,  $-OC(O)-(\text{alquilo } C_{1-3})$ , alquilo  $C_{1-3}$ ,  $-NH_2$ ,  $-NH(\text{alquilo } C_{1-3})$  o  $-N(\text{alquilo } C_{1-3})(\text{alquilo } C_{1-3})$ .

30 En un modo de realización preferido,  $R^2$  es metilo, y  $R^3$  es  $-H$ , un grupo alquilo  $C_{1-4}$  o  $R^3$  está ausente. Más preferentemente,  $R^2$  es metilo, y  $R^3$  es  $-H$ , metilo o  $R^3$  está ausente.

35 En otro modo de realización preferido,  $R^2$  y  $R^3$  están unidos entre sí para formar un anillo de pirrolidina, un anillo de piperidina o un de azepano junto con el átomo de nitrógeno X al que están unidos. Más preferentemente,  $R^2$  y  $R^3$  están unidos entre sí para formar un anillo de piperidina junto con el átomo de nitrógeno X al que están unidos. El anillo de pirrolidina, el anillo de piperidina o el anillo de azepano pueden estar sustituidos con uno o más (tal como, por ejemplo, uno, dos, tres, o cuatro), preferentemente uno o dos, más preferentemente uno, grupos independientemente seleccionados de  $-OH$ ,  $-O(\text{alquilo } C_{1-3})$ ,  $-OC(O)-(\text{alquilo } C_{1-3})$ , alquilo  $C_{1-3}$ ,  $-NH_2$ ,  $-NH(\text{alquilo } C_{1-3})$  o  $-N(\text{alquilo } C_{1-3})(\text{alquilo } C_{1-3})$ . Preferentemente, el anillo de pirrolidina, el anillo de piperidina o el anillo de azepano está no sustituido o sustituido con un grupo  $-OH$ . En consecuencia, es preferente particularmente que estén unidos entre sí para formar un anillo de piperidina junto con el átomo de nitrógeno X al que están unidos, en el que el anillo de piperidina está opcionalmente sustituido con un grupo  $-OH$ , preferentemente en posición para con respecto al átomo de nitrógeno X.

$R^4$  es  $-H$  o un grupo alquilo  $C_{1-4}$  (por ejemplo, metilo, etilo, propilo o butilo). Preferentemente,  $R^4$  es metilo.

45  $R^5$  es un grupo alquilo  $C_{2-8}$ , en el que uno o más átomos de hidrógeno de dicho grupo alquilo  $C_{2-8}$  está remplazado por  $-OH$ , o  $R^5$  es un grupo cicloalquilo  $C_{5-7}$ , en el que un átomo de carbono del anillo de dicho grupo cicloalquilo  $C_{5-7}$  está opcionalmente remplazado por un átomo de oxígeno y en el que uno o más átomos de hidrógeno de dicho grupo cicloalquilo  $C_{5-7}$  están sustituidos independientemente por  $-OH$  o  $-CH_2OH$ . En consecuencia,  $R^5$  es un grupo alquilo  $C_{2-8}$  sustituido con uno o más (tal como, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7) grupos hidroxilo o  $R^5$  es un grupo cicloalquilo  $C_{5-7}$  sustituido con uno o más (tal como, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) grupos seleccionados independientemente de  $-OH$  o  $-CH_2OH$ , en el que un átomo de carbono del anillo de dicho grupo cicloalquilo  $C_{5-7}$  está opcionalmente

reemplazado por un átomo de oxígeno. Preferentemente,  $R^5$  es un grupo alquilo  $C_{2-8}$ , en el que uno o más (tal como, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7) átomos de hidrógeno están reemplazados por -OH. Más preferentemente,  $R^5$  es - $CH_2CH_2OH$ , - $CH_2CH(OH)CH_2OH$ , - $CH_2CH(OH)CH(OH)CH_2OH$ , - $CH_2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH_2OH$ , - $CH_2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH_2OH$  o - $CH(CH_2OH)CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH_2OH$ . Incluso - $CH_2CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH_2OH$ .

5

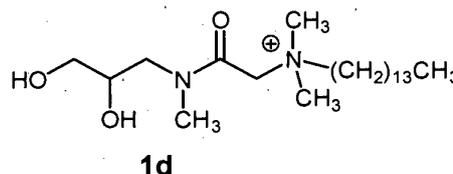
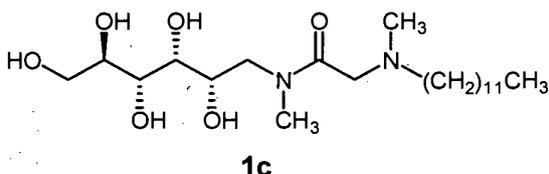
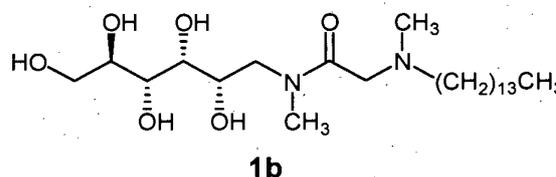
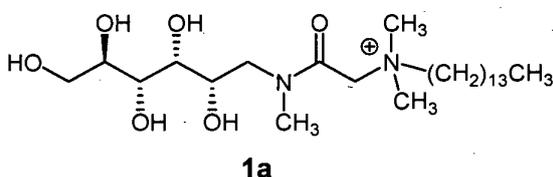
X es  $N^+$  o, si  $R^3$  está ausente, X es N.

p es 1, 2 o 3. Preferentemente, p es 1.

Un experto en la técnica entiende que, si se proporciona el compuesto de fórmula 1 en solución y si  $R^3$  en la fórmula 1 es -H o está ausente, la protonación del átomo de nitrógeno X y, en consecuencia, la carga en el átomo de nitrógeno X depende del pH de la solución. Por tanto, dependiendo del pH de la solución,  $R^3$  puede ser -H y X puede ser  $N^+$ ,  $R^3$  puede estar ausente y X puede ser N.

10

Los ejemplos preferentes del compuesto de fórmula 1 son los compuestos **1a**, **1b**, **1c** y **1d** mostrados a continuación o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos:

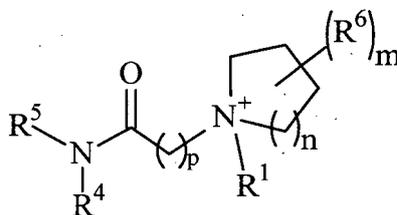


15

En un modo de realización descrito anteriormente,  $R^2$  y  $R^3$ , en la fórmula 1, están unidos entre sí para formar un anillo de pirrolidina, un anillo de piperidina o un anillo de azepano junto con el átomo de nitrógeno X al que están unidos, en el que dicho anillo de pirrolidina, dicho anillo de piperidina o dicho anillo de azepano está opcionalmente sustituido con uno o más grupos independientemente seleccionados de -OH, -O(alquilo  $C_{1-3}$ ), -OC(O)-(alquilo  $C_{1-3}$ ), alquilo  $C_{1-3}$ , - $NH_2$ , - $NH$ (alquilo  $C_{1-3}$ ) o -N(alquilo  $C_{1-3}$ )(alquilo  $C_{1-3}$ ).

20

En consecuencia, el compuesto de fórmula 1 puede ser un compuesto de la siguiente fórmula 2



**2**

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En la fórmula 2, los grupos  $R^1$ ,  $R^4$  y  $R^5$ , así como la variable p tienen los significados o los significados preferentes definidos en el presente documento anteriormente para el compuesto de fórmula 1.

25

n es 1, 2 o 3. Preferentemente, n es 2.

m es un número entero de 0 a 4. Preferentemente, m es 0, 1, o 2; más preferentemente, m es 0 o 1; aún más preferentemente, m es 1.

Cada  $R^6$  se selecciona independientemente de -OH, -O(alquilo  $C_{1-3}$ ), -OC(O)-(alquilo  $C_{1-3}$ ), alquilo  $C_{1-3}$ , -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo  $C_{1-3}$ ) o -N(alquilo  $C_{1-3}$ )(alquilo  $C_{1-3}$ ). Preferentemente, cada  $R^6$  es -OH.

5 Debe entenderse que cada  $R^6$  está unido a un átomo de carbono del anillo de pirrolidina, piperidina o azepano. Además, debe entenderse que, si m es 0, el anillo de pirrolidina, piperidina o azepano (al que se une  $R^6$ ) está no sustituido, es decir, está sustituido con hidrógeno.

En un modo de realización, n es 1 o 3, y m es 0.

En un modo de realización preferido, n es 2, m es 1, y  $R^6$  es -OH, -O(alquilo  $C_{1-3}$ ), -OC(O)-(alquilo  $C_{1-3}$ ), -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo  $C_{1-3}$ ) o -N(alquilo  $C_{1-3}$ )(alquilo  $C_{1-3}$ ), en particular, -OH. En este modo de realización, es preferente además que  $R^6$  esté en posición para respecto del átomo de nitrógeno  $N^+$  del anillo.

10 Los compuestos a usarse de acuerdo con la presente invención, en particular los compuestos de fórmula 1 o 2, se pueden preparar por procedimientos conocidos en el campo de la química sintética.

15 Por ejemplo, los compuestos de fórmula 1 o 2 se pueden preparar en analogía a las rutas sintéticas descritas en la sección de ejemplos. La N-acilación selectiva de aminopolioles tales como N-metil-D-glucamina con un éster activo (por ejemplo OSu-éster, OBt-éster) de un ácido carboxílico adecuado produce los compuestos diana, que se purifican por cromatografía, particularmente cromatografía de fase inversa. Los ácidos carboxílicos requeridos se pueden preparar por alquilación por etapas de  $R^1$ -NH<sub>2</sub> usando procedimientos conocidos, por ejemplo acilación y reducción o reacción de Hinsberg. El resto carboxílico se puede introducir por alquilación de aminas como  $R^1$ -NHMe o  $R^1$ -NMe<sub>2</sub> con carboxilatos  $\omega$ -halogenados o ésteres tales como éster del ácido terc-butil bromoacético y posterior desprotección.

20 Los compuestos de fórmula 2, es decir, compuestos de fórmula 1 en la que  $R^2$  y  $R^3$  están unidos entre sí para formar un N-heterociclo, se pueden preparar por N-alquilación por etapas de dicho heterociclo con un  $R^1$ -halogenuro y un carboxilato  $\omega$ -halogenado o éster tal como éster terc-butílico de ácido bromoacético y posterior desprotección. El ácido carboxílico resultante se usa para N-acilar aminopolioles, como se describe anteriormente.

25 Se pueden obtener productos polihidroxilados, estereoquímicamente uniformes de los carbohidratos por síntesis a partir de combinación quiral. Las síntesis estereoselectivas, tales como la reducción asimétrica de cetonas, la abertura de epóxidos quirales o la inversión de estereocentros proporcionan rutas de acceso a componentes básicos polihidroxilados enantioméricamente puros adicionales.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo hidrocarburo" se refiere a un grupo que consiste en átomos de carbono y átomos de hidrógeno, dicho grupo puede ser saturado o insaturado, lineal, ramificado o cíclico, alifático o aromático. Un "grupo hidrocarburo  $C_{10-20}$ " es un grupo hidrocarburo que tiene de 10 a 20 átomos de carbono.

Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo acíclico alifático (es decir, no aromático) saturado monovalente, que puede ser lineal o ramificado y que no comprende ningún doble enlace carbono-carbono o ningún triple enlace carbono-carbono.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo alqueno" se refiere a un grupo hidrocarburo acíclico alifático insaturado monovalente, que puede ser lineal o ramificado y que comprende al menos un doble enlace carbono-carbono mientras que no comprende ningún triple enlace carbono-carbono.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo alquino" se refiere a un grupo hidrocarburo acíclico monovalente alifático insaturado, que puede ser lineal o ramificado y que comprende al menos un triple enlace carbono-carbono y opcionalmente uno o más dobles enlaces carbono-carbono.

Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo alqueno" se refiere a un grupo hidrocarburo acíclico alifático (es decir, no aromático) saturado divalente, que puede ser lineal o ramificado y que no comprende ningún doble enlace carbono-carbono o ningún triple enlace carbono-carbono.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo cicloalquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático (es decir, no aromático) saturado cíclico monovalente, que no comprende ningún doble enlace carbono-carbono o ningún triple enlace carbono-carbono. Los ejemplos no limitantes de grupos cicloalquilo y, en particular, de grupos cicloalquilo  $C_{5-7}$  son cicloheptilo, ciclohexilo o cicloheptilo.

50 El alcance de la invención abarca todas las formas farmacéuticamente aceptables de sal de los compuestos de fórmula 1 o 2, que se pueden formar, por ejemplo, por la protonación de un átomo que lleva un par solitario de electrones que es susceptible a protonación, tal como un grupo amino, con un ácido inorgánico u orgánico, o como una sal de un grupo ácido carboxílico con un catión fisiológicamente aceptable, que son bien conocidas en la técnica. Las sales de adición de bases ejemplares comprenden, por ejemplo, sales de metales alcalinos tales como sales de sodio o potasio; sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio o magnesio; sales de amonio; sales de aminas alifáticas, tales como trimetilamina, trietilamina, dicitlohexilamina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina,

sales de procaína, sales de meglumina, sales de dietanolamina o sales de etilendiamina; sales de aralquilamina, tales como sales de N,N-dibenciletildiamina, sales de beretamina; sales de amina aromática heterocíclica, tales como sales de piridina, sales de picolina, sales de quinolina o sales de isoquinolina; sales de amonio cuaternario, tales como sales de tetrametilamonio, sales de tetraetilamonio, sales de benciltrimetilamonio, sales de benciltrietilamonio, sales de benciltributilamonio, sales de metiltriocetilamonio o sales de tetrabutilamonio; y sales de aminoácidos básicos, tales como sales de arginina o sales de lisina. Las sales de adición de ácidos ejemplares comprenden, por ejemplo, sales de ácido minerales, tales como clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sales de sulfato, sales de nitrato, sales de fosfato (tales como sales de fosfato, hidrogenofosfato o dihidrogenofosfato), sales de carbonato, sales de hidrogenocarbonato o sales de perclorato; sales de ácidos orgánicos tales como sales de acetato, propionato, butirato, pentanoato, hexanoato, heptanoato, octanoato, ciclopentanopropionato, undecanoato, lactato, maleato, oxalato, fumarato, tartrato, malato, citrato, nicotinato, benzoato, salicilato o ascorbato; sales de sultanato, tales como sales de metanosulfonato, etanosulfonato, 2-hidroxi-etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato (tosilato), 2-naftalenosulfonato, 3-fenilsulfonato, o alcanforsulfonato; y sales de aminoácidos ácidos, tales como sales de aspartato o glutamato.

Además, el alcance de la invención abarca formas sólidas de los compuestos de fórmula **1** o **2** en cualquier forma solvatada, incluyendo, por ejemplo, solvatos con agua, por ejemplo, hidratos, o con disolventes orgánicos, tales como, por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol o acetonitrilo, es decir, como un metanolato, etanolato, isopropanolato o acetonitrilato, respectivamente; o en forma de cualquier polimorfo.

Además, las fórmulas en la presente solicitud están pretendidas para cubrir todos los posibles estereoisómeros, incluyendo enantiómeros y diastereómeros, de los compuestos indicados.

Por tanto, todos los estereoisómeros de los compuestos de la presente invención, en particular los compuestos de fórmula **1** o **2**, se contemplan como parte de la presente invención, en mezcla o en forma pura o sustancialmente pura. El alcance de los compuestos de acuerdo con la invención abarca todos los posibles estereoisómeros y sus mezclas. Muy particularmente abarca las formas racémicas y los isómeros ópticos aislados. Las formas racémicas se pueden redissolver por procedimientos físicos, tales como, por ejemplo, cristalización fraccionada, separación o cristalización de derivados diastereoméricos o separación por cromatografía en columna quiral. Los isómeros ópticos individuales se pueden obtener a partir de los racematos usando procedimientos convencionales, tales como, por ejemplo, formación de sales con un ácido ópticamente activo seguido de cristalización.

También se divulgan en el presente documento profármacos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención, en particular de los compuestos de fórmula **1** o **2**. Dichos profármacos son derivados que tienen grupos química o metabólicamente escindibles y se convierten, por solvólisis o en condiciones fisiológicas, en los compuestos de la presente invención, que son farmacéuticamente activos in vivo. Los profármacos de compuestos de la presente invención se pueden formar de una manera convencional con un grupo funcional de los compuestos, tal como con un grupo amino, hidroxilo o carboxilo. La forma de derivado de profármaco a menudo ofrece las ventajas de solubilidad, compatibilidad tisular o liberación retardada en un organismo mamífero (véase, Bundgaard, H., Design of Prodrugs, p. 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam 1985). Los profármacos incluyen derivados ácidos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, ésteres preparados por reacción del compuesto ácido precursor con un alcohol adecuado, o amidas preparadas por reacción del compuesto ácido precursor con una amina adecuada. Cuando un compuesto de la presente invención tiene un grupo carboxilo, un derivado de éster preparado por reacción del grupo carboxilo con un alcohol adecuado o un derivado de amida preparado por reacción del grupo carboxilo con una amina adecuada se ejemplifica como un profármaco. Un derivado de éster ejemplar como un profármaco es el éster metílico, éster etílico, éster n-propílico, éster isopropílico, éster n-butílico, éster isobutílico, éster terc-butílico, éster morfolinoetílico, éster N,N-dietilglicolamido o éster  $\alpha$ -acetoxietílico. Cuando un compuesto de la presente invención tiene un grupo hidroxilo, un derivado aciloxi preparado por reacción del grupo hidroxilo con un haluro de acilo adecuado o un anhídrido de ácido adecuado se ejemplifica como un profármaco. Un derivado aciloxi ejemplar como un profármaco es  $-\text{OC}(=\text{O})-\text{CH}_3$ ,  $-\text{OC}(=\text{O})-\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $-\text{OC}(=\text{O})-(\text{terc-Bu})$ ,  $-\text{OC}(=\text{O})-\text{C}_{15}\text{H}_{31}$ ,  $-\text{OC}(=\text{O})-(\text{m-COONa-Ph})$ ,  $\text{OC}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COONa}$ ,  $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_3$  o  $-\text{OC}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ . Cuando un compuesto de la presente invención tiene un grupo amino, un derivado de amida preparado por la reacción del grupo amino con un haluro de ácido adecuado o un anhídrido mixto adecuado se ejemplifica como un profármaco. Un derivado de amida ejemplar como un profármaco es  $-\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_3$  o  $-\text{NHC}(=\text{O})-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_3$ .

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden administrar como compuestos per se en su uso como farmacóforos o composiciones farmacéuticas o se pueden formular como medicamentos. Dentro del alcance de la presente invención están las composiciones farmacéuticas que comprenden, como principio activo, un compuesto de fórmula **1** o **2**, como se define anteriormente. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, opcionalmente, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, diluyentes, cargas, disgregantes, agentes lubricantes, aglutinantes, colorantes, pigmentos, estabilizadores, conservantes o antioxidantes.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular por técnicas conocidas por el experto en la técnica, tales como las técnicas publicadas en Remington Pharmaceutical Sciences, 20ª Edición. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular como formas de dosificación para administración oral, parenteral, tal como intramuscular, intravenosa, subcutánea, intradérmica, intraarterial, rectal, nasal, tópica, en aerosol o vaginal. Las formas de dosificación para administración oral incluyen comprimidos recubiertos y no recubiertos, cápsulas blandas de

- 5 10 15 20
- gelatina, cápsulas duras de gelatina, pastillas para chupar, trociscos, soluciones, emulsiones, suspensiones, jarabes, elixires, polvos y gránulos para reconstitución, polvos dispersables y gránulos, gomas medicadas, comprimidos de mascar y comprimidos efervescentes. Las formas de dosificación para administración parenteral incluyen soluciones, emulsiones, suspensiones, dispersiones y polvos y granulados para su reconstitución. Las emulsiones son una forma de dosificación preferente para administración parenteral. Las formas de dosificación para administración rectal y vaginal incluyen supositorios y óvulos. Las formas de dosificación para administración nasal se pueden administrar por inhalación e insuflación, por ejemplo, mediante un inhalador dosificado. Las formas de dosificación para administración tópica incluyen cremas, geles, pomadas, ungüentos, parches y sistemas de administración transdérmica.
- 10 Los compuestos de acuerdo con la invención, en particular los compuestos de fórmula **1** o **2**, o las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente que comprenden uno o más compuestos de fórmula **1** o **2**, se pueden administrar a un sujeto por cualquier ruta conveniente de administración, ya sea de forma sistémica/periférica o en el sitio de acción deseada, incluyendo, pero sin limitarse a, uno o más de: oral (por ejemplo, como un comprimido, cápsula, o como una solución ingerible), tópica (por ejemplo, transdérmica, intranasal, ocular, bucal, y sublingual), parenteral (por ejemplo, usando técnicas de inyección o técnicas de infusión, e incluyendo, por ejemplo, por inyección, por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intratecal, intraespinal, intracapsular, subcapsular, intraorbital, intraperitoneal, intratraqueal, subcuticular, intraarticular, subaracnoidea, o intraesternal por, por ejemplo, implante de un depósito, por ejemplo, de forma subcutánea o intramuscular), pulmonar (por ejemplo, por tratamiento de inhalación o insuflación usando, por ejemplo, un aerosol, por ejemplo, a través de la boca o la nariz), gastrointestinal, intrauterina, intraocular, subcutánea, oftálmica (incluyendo intravítrea o intracameral), rectal, y vaginal.
- 15 20
- Si dichos compuestos o composiciones farmacéuticas se administran de forma parenteral, entonces los ejemplos de dicha administración incluyen uno o más de: administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea de las composiciones de compuestos farmacéuticos, y/o mediante el uso de técnicas de infusión. Para administración parenteral, los compuestos se usan mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales o glucosa suficientes para hacer la solución isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deben estar adecuadamente tamponadas (preferentemente a un pH de 3-9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se consigue fácilmente mediante técnicas farmacéuticas habituales bien conocidas para los expertos en la técnica.
- 25 30
- Dichos compuestos o composiciones farmacéuticas también se pueden administrar de forma oral en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, por pulsos o controlada.
- 35 40
- Los comprimidos pueden contener excipientes, tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina, disgregantes, tales como almidón (preferentemente almidón de maíz, de patata o de tapioca), almidón glicolato de sodio, croscarmelosa de sodio y ciertos silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y gorma arábiga. Adicionalmente, se pueden incluir agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco. También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferentes a este respecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de la leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, el agente se puede combinar con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o tintes, con agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión y con diluyentes, tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.
- 45 50
- De forma alternativa, dichos compuestos o composiciones farmacéuticas se pueden administrar en forma de un supositorio o pesario, o se pueden aplicar de forma tópica en forma de un gel, hidrogel, loción, solución, crema, pomada o polvo de espolvoreo. Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar de forma dérmica o transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche para la piel.
- 50
- Dichos compuestos o composiciones farmacéuticas se pueden administrar también por la ruta pulmonar, rutas rectales, o la ruta ocular. Para uso oftálmico, se pueden formular como suspensiones micronizadas en solución salina isotónica, de pH ajustado, estéril o, preferentemente, como soluciones en solución salina isotónica, de pH ajustado, estéril, opcionalmente en combinación con un conservante, tal como un cloruro de benzalconio. De forma alternativa, se pueden formular en una pomada, tal como vaselina.
- 55
- Para aplicación tópica a la piel, dichos compuestos o composiciones farmacéuticas se pueden formular como una pomada adecuada que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, cera emulsionante y agua. De forma alternativa, se pueden formular como una loción o crema adecuada, suspendidos o disueltos en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitán, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Típicamente, un médico determinará la dosificación real que será más adecuada para un sujeto individual. El nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier sujeto individual particular se puede variar y dependerá de diversos factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, peso corporal, el estado de salud general, el sexo/dieta, el modo y el momento de la administración, la tasa de eliminación, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular y el sujeto individual sometido a tratamiento.

Una dosis propuesta, pero no limitante, de la de los compuestos de fórmula 1 o 2 para su administración a un ser humano (de aproximadamente 70 kg de peso corporal) puede ser de 0,05 a 5000 mg, preferentemente de 0,1 mg a 1000 mg del principio activo por dosis unitaria. La dosis unitaria se puede administrar, por ejemplo, de 1 a 4 veces por día. La dosis dependerá de la ruta de administración. Se apreciará que puede ser necesario realizar variaciones rutinarias de la dosificación dependiendo de la edad y peso del paciente/sujeto, así como de la gravedad de la afección a tratar. La dosis y la ruta de administración precisas serán, en última instancia, según el criterio del médico o veterinario especialista.

Los compuestos de la presente invención, incluyendo los compuestos de fórmula 1 o 2, se pueden administrar en el contexto de una monoterapia o en tratamiento combinado con uno o más de otros agentes farmacéuticos. Por ejemplo, un compuesto de la presente invención o dos o más compuestos de la invención se pueden usar en combinación con uno o más fármacos inmunomoduladores y/o fármacos antiinflamatorios para el tratamiento, prevención o mejora de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico.

Una composición farmacéutica puede comprender dicho compuesto o compuestos, fármaco o fármacos inmunomoduladores y/o fármaco o fármacos antiinflamatorios. El tratamiento combinado también puede incluir la administración de dos o más compuestos de la presente invención en ausencia de fármacos inmunomoduladores o fármacos antiinflamatorios adicionales. También se prevé en el presente documento que el compuesto o compuestos, fármaco o fármacos inmunomoduladores y/o fármaco o fármacos antiinflamatorios podrían estar vinculados, por ejemplo, mediante la formación de conjugados. En consecuencia, los compuestos, fármacos inmunomoduladores y/o fármacos antiinflamatorios se pueden administrar a un sujeto simultáneamente. Además, una composición farmacéutica puede comprender solamente el compuesto o compuestos de la presente invención, mientras que el uno o más fármacos inmunomoduladores y/o fármacos antiinflamatorios están comprendidos en una composición farmacéutica diferente. En ese caso, todavía puede ser posible administrar el compuesto o compuestos de la invención, los fármacos inmunomoduladores y/o los fármacos antiinflamatorios simultáneamente; sin embargo, el compuesto o compuestos de la invención también se pueden administrar antes y/o después del uno o más fármacos inmunomoduladores y/o fármacos antiinflamatorios. Es fácilmente evidente para un experto en la técnica el modo de administrar, por ejemplo, uno o más compuestos de la presente invención, uno o más fármacos inmunomoduladores, y/o uno o más fármacos antiinflamatorios en el tratamiento combinado.

Se prevé que uno o más de los compuestos como se describe en el presente documento, en particular, los compuestos de fórmula 1 o 2, se pueden usar en combinación con uno o más fármacos inmunomoduladores y/o uno o más fármacos antiinflamatorios.

El uno o más fármacos inmunomoduladores incluyen, sin limitarse a los mismos: antimetabolitos, tales como, por ejemplo, azatioprina, ácido micofenólico, leflunomida, teriflunomida, o metotrexato; macrólidos, tales como, por ejemplo, tacrolimus, ciclosporina o pimecrolimus; inhibidores de IL-2, tales como, por ejemplo, abetimus o gusperimus; inhibidores de TNF-alfa, tales como, por ejemplo, talidomida o lenalidomida; antagonistas de receptores de IL-1 tales como, por ejemplo, anakinra; proteínas diana de mamíferos de rapamicina (mTOR), tales como, por ejemplo, sirolimus, deforolimus, everolimus, temsirolimus, zotarolimus, o A9 biolimus; anticuerpos monoclonales tales como, por ejemplo, eculizumab, infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, afelimomab, golimumab, mepolizumab, omalizumab, nerelimomab, faralimomab, elsilimomab, lebrikizumab, ustekinumab, muromonab-CD3, otezilumab, teplizumab, visilizumab, clenoliximab, keliximab, zanolimumab, efalizumab, erlizumab, afutuzumab, ocrelizumab, pascolizumab, lumiliximab, teneliximab, toralizumab, aselizumab, galiximab, gavilimomab, ruplizumab, belimumab, ipilimumab, tremelimumab, bertilimumab, lerdelimomab, metelimomab, natalizumab, tocilizumab, odulimomab, basiliximab, daclizumab, inolimomab, zolimomab aritox, atorolimumab, cedelizumab, dorlizumab, fontolizumab, gantenerumab, gomiliximab, maslimomab, morolimumab, pexelizumab, reslizumab, rovelizumab, siplizumab, talizumab, telimomab aritox, vapaliximab, o vepalimomab; anticuerpos policlonales tales como, por ejemplo, globulina antitímocitos o globulina antilinfocitos; o proteínas de fusión tales como, por ejemplo, abatacept, belatacept, etanercept, pegsunercept, aflibercept, alefacept, o rilonacept.

Además, el uno o más fármacos antiinflamatorios incluyen, sin limitarse a los mismos: derivados de pirazolidina o butilpirazolidina tales como, por ejemplo, ampirona, clofezona, kebufona, metamizol, mofebutazona, oxifenbutazona, fenazona, fenilbutazona, sulfpirazona o feprazona; derivados de ácido acético tales como, por ejemplo, aceclofenaco, acemetacina, alclofenaco, bromfenaco, bumadizona, bufexamaco, diclofenaco, difenpiramida, etodolaco, fentiazaco, indometacina, ketorolaco, lonazolaco, oxametacina, proglumetacina, sulindaco, tolmetina, zomepiraco, o amfenaco; derivados de oxicam tales como, por ejemplo, ampiroxicam, droxicam, lornoxicam, meloxicam, piroxicam, o tenoxicam; derivados de ácido propiónico tales como, por ejemplo, alminoprofeno, benoxaprofeno, dexibuprofeno, dexketoprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, flunoxaprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, ibuproxam, indoprofeno, ketoprofeno, naproxeno, oxaprozina, piroprofeno, suprofeno, o ácido tiaprofénico; derivados

de ácido fenámico tales como, por ejemplo, ácido flufenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido tolfenámico, ácido niflúmico, morniflumato, o azapropazona; inhibidores de COX-2 tales como, por ejemplo, celecoxib, etoricoxib, lumiracoxib, parecoxib, rofecoxib, o valdecoxib; o nabumetona, glucosamina, bencidamina, glicosaminoglicanos, salicilato de magnesio, procuazona, superóxido dismutasa/orgoteína, nimesulida, diacereína, tenidap, oxaceprol, o sulfato de condroitina.

El tratamiento combinado usando el compuesto o compuestos de la presente invención, el fármaco o fármacos inmunomoduladores y/o el fármaco o fármacos antiinflamatorios puede dar como resultado un efecto sinérgico, es decir, los agentes que actúan juntos pueden crear un efecto mayor que el predicho conociendo solo los efectos separados de los agentes individuales. Dicho efecto sinérgico podría ser particularmente ventajoso si entonces se pueden usar cantidades menores del compuesto o compuestos, el fármaco o fármacos inmunomoduladores y/o el fármaco o fármacos antiinflamatorios. Por tanto, los posibles efectos secundarios del compuesto o compuestos, el fármaco o fármacos inmunomoduladores y/o el fármaco o fármacos antiinflamatorios se podrían disminuir o evitar.

Se prevé además, particularmente, que uno o más de los compuestos de la invención, en particular los compuestos de fórmula 1 o 2, se pueden usar en combinación con uno o más fármacos inmunomoduladores como se describe anteriormente en el presente documento y/o uno o más fármacos antiinflamatorios como se describe anteriormente en el presente documento (incluyendo, por ejemplo, azatioprina, ciclosporina, D-penicilamina, sales de oro, hidroxicloroquina, leflunomida, metotrexato, minociclina, sulfasalazina, o ciclofosfamida) para el tratamiento, prevención, o mejora de la artritis reumatoide.

La expresión "tratamiento de un trastorno o enfermedad", como se usa en el presente documento, tal como "tratamiento de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico", es bien conocida en la técnica. "Tratamiento de un trastorno o enfermedad" implica que se sospecha o se ha diagnosticado un trastorno o enfermedad en un paciente/sujeto. Un paciente/sujeto sospechoso de padecer un trastorno o enfermedad típicamente muestra síntomas clínicos y/o patológicos específicos que un experto en la técnica puede atribuir fácilmente a una afección patológica específica (es decir, diagnosticar un trastorno o enfermedad).

"Tratamiento de un trastorno o enfermedad" puede, por ejemplo, conducir a una interrupción en la progresión del trastorno o enfermedad (por ejemplo, sin deterioro de los síntomas) o un retardo en la progresión del trastorno o enfermedad (en el caso de la interrupción de la progresión, es de naturaleza transitoria solamente). "Tratamiento de un trastorno o enfermedad" también puede conducir a una respuesta parcial (por ejemplo, mejora de los síntomas) o respuesta completa (por ejemplo, la desaparición de los síntomas) del sujeto/paciente que padece el trastorno o enfermedad. "Mejora" de un trastorno o enfermedad puede conducir, por ejemplo, a una interrupción en la progresión del trastorno o enfermedad o un retardo en la progresión del trastorno o enfermedad. Dicha respuesta parcial o completa puede estar seguida por una recidiva. Debe entenderse que un sujeto/paciente puede experimentar una amplia gama de respuestas a un tratamiento (por ejemplo, las respuestas ejemplares como se describe anteriormente en el presente documento).

El tratamiento de un trastorno o enfermedad puede comprender, entre otras cosas, tratamiento curativo (que conduce preferentemente a una respuesta completa y, finalmente, a la curación del trastorno o enfermedad) y tratamiento paliativo (incluyendo alivio sintomático).

Además la expresión "prevención de un trastorno o enfermedad", como se usa en el presente documento, tal como "prevención de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico", es bien conocida en la técnica. Por ejemplo, un paciente/sujeto sospechoso de ser propenso a padecer un trastorno o enfermedad, como se define en el presente documento puede beneficiarse, en particular, de una prevención del trastorno o enfermedad. El sujeto/paciente puede tener una susceptibilidad o predisposición a un trastorno o enfermedad incluyendo, pero sin limitarse a, la predisposición hereditaria. Dicha predisposición se puede determinar mediante ensayos convencionales usando, por ejemplo, marcadores genéticos o indicadores fenotípicos. Debe entenderse que un trastorno o enfermedad a prevenirse, de acuerdo con la presente invención, no se ha diagnosticado o no se puede diagnosticar en el paciente/sujeto (por ejemplo, el paciente/sujeto no muestra síntomas clínicos o patológicos). Por tanto, el término "prevención" comprende el uso de compuestos de la presente invención antes de diagnosticarse o determinarse, o poder diagnosticarse o determinarse, cualquier síntoma clínico y/o patológico, por el médico especialista.

El sujeto o paciente, tal como el sujeto que necesita tratamiento, prevención o mejora, puede ser un eucariota, un animal, un animal vertebrado, un mamífero, un roedor (por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), un murino (por ejemplo, un ratón), un canino (por ejemplo, un perro), un felino (por ejemplo, un gato), un equino (por ejemplo, un caballo), un primate, un simio (por ejemplo, un simio inferior o un simio superior), un simio inferior (por ejemplo, un tití, un babuino), un simio superior (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibón), o un ser humano. El significado de los términos "eucariota", "animal", "mamífero", etc. es bien conocido en la técnica y se puede deducir, por ejemplo, de Wehner y Gehring (1995; Thieme Verlag). En el contexto de la presente invención, se prevé en particular que los animales que se van a tratar son económica, agrícola o científicamente importantes. Los organismos científicamente importantes incluyen, pero sin limitarse limitan a, ratones, ratas, conejos, moscas de la fruta como *Drosophila melanogaster* y nematodos como *Caenorhabditis elegans*. Los ejemplos no limitantes de animales agrónomicamente importantes son ovejas, ganado y cerdos, mientras que, por ejemplo, gatos y perros se pueden considerar como animales económicamente importantes. Preferentemente, el sujeto/paciente es un

mamífero; más preferentemente, el sujeto/paciente es un ser humano o un mamífero no humano (tal como, por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón, un conejo, un perro, un gato, un caballo, un simio inferior, un simio superior, un tití, un babuino, un gorila, un chimpancé, un orangután, un gibón, una oveja, ganado o un cerdo; y en particular un canino tal como un perro); aún más preferentemente, el sujeto/paciente es un ser humano.

5 La invención también se describe mediante las siguientes figuras ilustrativas. Las figuras adjuntas muestran:

**Figura 1:** Inhibición de la desgranulación de los mastocitos por los compuestos **1a** (Fig. **1A**), **1b** (Fig. **1B**), **1c** (Fig. **1C**), **1d** (Fig. **1D**) y miltefosina (Fig. **1E**). Se muestran curvas de dosis-respuesta para la inhibición de la liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa desde células RBL-2H3 estimuladas con IgE específica de antígeno y desencadenada con antígeno (medias  $\pm$  error estándar de la media).

10 **Figura 2:** Inhibición de la fosforilación de Akt en Ser473 por el compuesto **1a**. Se expresa el porcentaje de Akt total fosforilada en Ser473 como un porcentaje de las células no tratadas de control inducidas con IgE y antígeno durante 15 minutos (se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar).

**Figura 3:** Efecto del compuesto **1a** y dexametasona sobre hinchazón en oreja de ratón en la respuesta DTH en ratones (los datos son medias  $\pm$  desviaciones estándar de 8 ratones; \*  $p < 0,01$  frente a control de vehículo (prueba *a posteriori* de Dunnett)).

**Figura 4:** Efecto del compuesto **1a** sobre hinchazón en oreja de ratón en el modelo de dermatitis alérgica de contacto en ratones. La Fig. **4A** muestra la comparación del estudio piloto de la actividad inhibidora, del compuesto **1a** y miltefosina en diferentes momentos de administración antes de la exposición al antígeno (los datos son medias  $\pm$  EEM de 7 ratones; \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  frente a control de vehículo (prueba *a posteriori* de Dunnett), <sup>s</sup>  $p < 0,05$  frente a control de vehículo (prueba de la t)). Las Fig. **4B** y **4C** muestran la comparación del estudio principal de la actividad inhibidora del compuesto **1a** y corticosteroides después de la aplicación sistémica (oral) (Fig. **4B**) o aplicación tópica (Fig. **4C**) (los datos son medias  $\pm$  EEM de 7 ratones; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  frente a control de vehículo (prueba *a posteriori* de Dunnett)). Las Fig. **4D** y **4E** muestran la reacción de los ganglios linfáticos locales, comparando el efecto del compuesto **1a** y diflorasona tópica sobre el peso de los ganglios linfáticos locales (Fig. **4D**) y número de células (Fig. **4E**) (los datos son medias  $\pm$  EEM de 7 ratones; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  frente a control de vehículo (prueba *a posteriori* de Dunnett)).

**Figura 5:** Efecto del compuesto **1a** sobre artritis inducida por colágeno (AIC) tipo II en ratones. La Fig. **5A** muestra los efectos sobre la puntuación de la artritis durante el curso de AIC tipo II del compuesto **1a** y dexametasona usando una pauta profiláctica (los datos son medias de 10-11 ratones; \*  $p < 0,02$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  frente a control de vehículo (prueba de la t)). La Fig. **5B** muestra los efectos sobre los cambios en el peso corporal durante el curso de AIC tipo II del compuesto **1a** y dexametasona usando una pauta profiláctica (los datos son medias de 10-11 ratones; \*  $p < 0,02$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  frente a control de vehículo (prueba de la t)). La Fig. **5C** muestra los efectos sobre la puntuación de la artritis durante el curso de AIC tipo II del compuesto **1a** usando una pauta terapéutica (los datos son medias de 11 ratones). La Fig. **5D** muestra los efectos sobre el peso del bazo y el timo durante el curso de AIC tipo II del compuesto **1a** y dexametasona utilizando una pauta profiláctica (los datos son medias de 10-11 ratones; \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  frente a control de vehículo (prueba de la t)).

La invención se describirá ahora por referencia a los siguientes ejemplos que son meramente ilustrativos y no se deben interpretar como una limitación del alcance de la presente invención.

## Ejemplos

40 **Ejemplo 1:** Preparación de cloruro de N-(2-(dimetil(tetradecil)amonio)acetil)-N-metil-D-glucamina **1a**

Se agita una mezcla de acetato de 2-(dimetil(tetradecil)amonio) (449 mg, 1,5 mmol), HBTU (569 mg, 1,5 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (DIEA) (279  $\mu$ l, 1,6 mmol) en una mezcla de dimetilformamida (DMF) seca (10 ml) y diclorometano (5 ml), durante 5 min a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Se añade N-metil-D-glucamina (351 mg, 1,8 mmol) sólida y la agitación se continuó durante otras 3 h. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida hasta sequedad, se recoge en una mezcla de tetrahidrofurano y etanol y se purificó por HPLC preparativa para producir 375 mg (42 %) de **1a** como sal trifluoroacetato. Después, se realiza intercambio iónico en el modo discontinuo usando una resina de tipo (P)-NMe<sub>3</sub><sup>+</sup> en forma de cloruro y etanol/agua como disolvente. La mezcla disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se seca al vacío para proporcionar **1a** como la sal de cloruro correspondiente.

50 **ESI-EM**, Positivo: 477,4 (M)<sup>+</sup>, 989,2 (2M+Cl)<sup>+</sup>. Negativo 547,5 (M+2Cl), 1059,2 (2M+3Cl).

**RMN de <sup>1</sup>H** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 0,84 (t, J = 7,1, 3H), 1,18-1,30 (m, 22H), 1,64 (m, 2H), 2,87 (s, 2,1 H), 3,00 (s, 0,9H), [3,19 (s), 3,19 (d, J = 1,7), 3,20 (s),  $\Sigma$  = 6H], 3,24 (d/d, J = 15,0/3,0, 0,8H), 3,45-3,63 (me, 8,4 H), 3,80 (m, 1H), [4,36-4,43 (me), 4,46 (d, J = 7,2), 4,49 (s),  $\Sigma$  = 3,6H], [4,56 (d), 4,58 (t, J = 6,5),  $\Sigma$  = 1,7H ], 4,63 (d, J = 5,5, 0,7H), 4,80 (d, J = 5,1, 0,3H), 5,15 (d, J = 5,4, 0,7H). (el análisis de RMN se complica por la naturaleza compleja del espectro y la rotación impedida alrededor del enlace amida.)

**Ejemplo 2:** Preparación de hidrotetrafluoroacetato de N-(2-(metil(tetradecil)amino)acetil)-N-metil-D-glucamina **1b**

El compuesto **1b** se prepara a partir de acetato de 2-(metil(tetradecil)amonio) (130 mg, 0,45 mmol) y N-metil-D-glucamina (88 mg, 0,45 mmol) usando HBTU (133 mg, 0,35 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (DIEA) (0,40 mmol) en una mezcla de 3 ml de dimetilformamida (DMF) y 1 ml de diclorometano de la misma manera como se describe para el compuesto **1c** en el ejemplo 3. La HPLC preparativa y el secado al vacío proporcionaron 116 mg (58 %) de **1b** como un sólido incoloro.

**ESI-EM**, Positivo: 463,4 (M+H)<sup>+</sup>, 947,6 (2M+Na)<sup>+</sup>. Negativo 461,1 (M-H), 575,1 (M+TFA), 923,3 (2M-H).

**RMN de <sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 8: 2): δ = 0,80 (t, J = 6,9, 3H), 1,18 + 1,26 (2s, Σ = 22H), 1,64 (m a. , 2H), 2,82 + 2,85 (2s, 3H), 2,94 + 2,96 (2s + m, 3,50H), 3,14 (d/d + m, J = 15,1/3,2 Σ = 2,0H), 3,48 (m, 1,3H), 3,62 (m, 5H), 3,95 (m, 1,2H), 4,08 (s a. + m, 9,3H, OH + H<sub>2</sub>O), 4,45 (m a. , 0,75 H). (Algunas señales están duplicadas debido a la rotación lenta de amida.)

**Ejemplo 3:** Preparación de hidrotetrafluoroacetato de N-(2-(metil(dodecil)amino)acetil)-N-metil-D-glucamina **1c**

Se disuelve acetato de 2-(dodecil(metil)amonio) (130 mg, 0,51 mmol) en una mezcla de 3 ml de dimetilformamida (DMF) seca y 1,5 ml de diclorometano seco en una atmósfera de argón. Se añaden HBTU (133 mg, 0,35 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (DIEA) (70 μl, 0,40 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 5 min. Se añade N-metil-D-glucamina (88 mg, 0,45 mmol) y la agitación se continúa durante otras 2 h. Después, tras el control por HPLC analítica, son visibles cantidades solamente minoritarias de acetato de 2-(dodecil(metil)-amonio) residual. Los disolventes se eliminan a presión reducida y el residuo se seca al vacío, se recoge en 3 ml de etanol y se purifica por HPLC preparativa para producir 106 mg (55 %) de **1c** como un sólido incoloro.

**ESI-EM**, Positivo: 435,4 (M+H)<sup>+</sup>. Negativo 433,1 (M-H), 547,0 (M+TFA).

**RMN de <sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0,81 (t, J = 6,8, 3H), 1,23 + 1,28 (2s, Σ = 18H), 1,68 (m a. , 2H), 2,90 (s, 2,18H), 2,92 (s, Σ = 0,84H), 2,94 (s, 2,30H), 2,99 (s + m, Σ = 1,50H), 3,47 (m, 1,4H), 3,57 (m, 4H), 3,62 (m, 1H), 3,80-4,05 (m + m a. Σ = 12H). (Algunas señales están duplicadas debido a la rotación lenta de amida.)

**Ejemplo 4:** Preparación de trifluoroacetato de N-(2-(dimetil(tetradecil)amonio)acetil)-N-metil-2,3-dihidroxiopropilamina **1d**

Se suspende acetato de 2-(dimetil(tetradecil)amonio) (300 mg, 1,0 mmol) en 7 ml de dimetilformamida (DMF) seca en una atmósfera de argón. El compuesto se disuelve mediante la adición de 3 ml de diclorometano seco. Se añade HBTU sólido (379 mg, 1,0 mmol), seguido de N,N-diisopropiletilamina (DIEA) (182 μl, 1,05 mmol). La mezcla se vuelve de color amarillo pardusco. Después de 10 min de tiempo de activación, se añade 3-(metilamino)propano-1,2-diol (201 μl, 2,1 mmol) como una solución en 1 ml de diclorometano. La solución se vuelve más brillante. Se agita la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción entonces se concentra a presión reducida. El producto en bruto se purifica por HPLC preparativa. La eliminación del disolvente de la fracción de producto a presión reducida proporciona un semisólido que se tritura con una mezcla de éter dietílico/éter de petróleo. El sobrenadante se desecha y el residuo semisólido se seca a vacío para dar 113 mg (22 %) de **1d** como un sólido incoloro.

**ESI-EM**, Positivo: 387,4 (M)<sup>+</sup>, 887,7 (2M+TFA)<sup>+</sup>. Negativo 613,0 (M+2TFA).

**RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 8: 2): δ = 0,81 (t, J = 6,5, 3H), 1,18 + 1,25 (2s, Z = 22H), 1,63 (m a. , 2H), 2,91 (s, 2,4 H), 3,03 + 3,10 (s + d/m, 2 = 1,3H), 3,23 (s + m, E = 5,8H), 3,35-3,69 (m, 4H), 3,77 (m, 1,8H), 4,36 (d, J = 16,3, 1,2H), 4,72 (d, J = 16,3, 0,75H), 5,63 (s a. , 3H). (Algunas señales se duplicaron debido a la rotación lenta de amida.)

**Ejemplo 5:** Inhibición de la desgranulación de mastocitos.**Introducción**

Los mastocitos son células efectoras clave involucradas en enfermedades alérgicas e inflamatorias, y la línea celular de leucemia basófila de rata clon 2H3 (RBL-2H3) es un modelo usado habitualmente de liberación de inmunomoduladores (desgranulación) dependiente de alérgenos en mastocitos. En su superficie, expresan el receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI). Tras la unión de IgE específica de antígeno al receptor, las células quedan sensibilizadas al antígeno específico de IgE (alérgeno). Cuando las células sensibilizadas a IgE se encuentran después con antígeno multivalente, el antígeno agrupa complejos IgE-FcεRI e inicia una cascada de transducción de señal que conduce a la desgranulación, es decir, la liberación de mediadores inflamatorios, tales como citocinas, eicosanoides, histamina y enzimas. El ensayo se puede usar como un procedimiento de selección para identificar compuestos inmunomoduladores, en particular compuestos útiles en el tratamiento médico de enfermedades alérgicas e inflamatorias y asma. Se demostró previamente que la β-hexosaminidasa se libera con la misma cinética que la histamina (Schwartz et al., J Immunology; 123:1445-1450 (1979)), ofreciendo, por tanto, un medio sencillo para controlar la desgranulación. La línea celular RBL-2H3 se ha usado con éxito para identificar compuestos con actividad antialérgica (Choo et al. Planta Med., 69: 518-522 (2003)).

**Materiales y procedimientos***Materiales*

5 Productos químicos El anticuerpo monoclonal IgE de rata anti-DNP se adquirió de Biozol (BZL06936), la albúmina de suero humano conjugada con dinitrofenilo (A6661) y el Triton X-100 (T9284) eran de Sigma-Aldrich, la 4-metilumbeliferil-N-acetil-β-D-glucosaminida (474502), el forbol-12-miristato-13-acetato (524400) y la tapsigargina (586005) de Calbiochem. La ionomicina (ALX-450-006) se adquirió de Alexis Biochemicals. El DMSO era de Merck (1.02950.0500) o Sigma-Aldrich (D2650). Los medios de cultivo celular y suplementos, medio esencial mínimo (21090-022), medio esencial mínimo sin rojo fenol (51200-046), medio RPMI 1640 (31870-025), L-glutamina (25030-024) y tripsina al 0,05 %-EDTA (25300-054), se obtuvieron de Invitrogen. El suero bovino fetal (A15-151) era de PAA Laboratories. Otros reactivos eran de calidad de laboratorio convencional o mejores.

10 Tampones y soluciones: la solución salina tamponada con fosfato (PBS) y HEPES 1 M se proporcionaron por la propia instalación de servicios. El tampón de Tyrode (TYB) consistía en medio esencial mínimo sin rojo fenol suplementado con L-glutamina 2 mM y HEPES 20 mM. El tampón de lisis consistía en Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM y Triton X-100 al 0,1 % (p/v). Se disolvió DNP-HSA hasta 1 mg/ml en agua. La solución de sustrato MUG consistía en 4-metilumbeliferil-N-acetil-PD-glucosaminida 2,5 mM en citrato 0,05 M, pH 4,5; la solución de parada era NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 10.

20 Equipo y materiales fungibles: Para los procedimientos de manipulación de líquidos de pequeño volumen, se usaron de forma rutinaria pipetas electrónicas Rainin LTS (Mettler-Toledo). Las placas de 24 pocillos Costar-Corning (3337) se centrifugaron en una centrífuga Eppendorf 5804 R. Se usó una incubadora de sobremesa Heraeus B15 para incubaciones a 37 °C en condiciones no estériles. Se midió la fluorescencia en placas negras Nunc de 96 pocillos (237105) usando un lector de microplaca (Tecan Safire) o lector de placa multi-modo FlexStation 3 (Molecular Devices). Las células se mantuvieron en incubadoras de CO<sub>2</sub> Hera Cell 240 (Thermo Scientific). Las pipetas serológicas (4487, 4488 y 4489) y frascos de cultivo celular (431080) eran de Corning-Costar, los tubos de microcentrifuga de 1,5 y 2 ml (0030 120.086 y 0030 120.094 ) eran de Eppendorf.

25 Cultivo celular: Las células RBL-2H3 obtenidas de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (ACC312) (Braunschweig, Alemania) se mantuvieron en medio esencial mínimo al 70 % con sales de Earle, RPMI 1640 al 20 %, FBS al 10 % y L-glutamina 2 mM en 95 % de aire/5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C y se comprobaron rutinariamente para contaminación por micoplasma. Las células se pasaron cada 3-4 días; después de lavar las células una vez con 35 ml de PBS, las células se incubaron 8 min con 5 ml de solución de tripsina al 0,05 %-EDTA a 37 °C. Las células se retiraron de la incubadora, se añadieron 15 ml de medio de cultivo y las células se resuspendieron mediante pipeteo repetido.

30 Siembra de células: las células se recogieron con tripsina-EDTA como se describe y se sembraron 50-100 µl de suspensión de células en placas de agrupación de 24 pocillos Costar Cellbind (n.º 3337). Las placas se mantuvieron durante 30 min a TA en la campana estéril antes de transferirse a la incubadora. Las células se usaron en uno o dos días después de la siembra.

**Medición de la liberación de β-hexosaminidasa***Procedimientos experimentales*

40 Para la sensibilización, las células para su uso inmediato se sensibilizaron 6-12 h después de la siembra; las células para su uso al día siguiente se sensibilizaron 26-38 h después de la siembra. Las placas de cultivo se retiraron de la incubadora y se comprobaron para el crecimiento celular y la contaminación. El medio se desechó y las células se sensibilizaron con IgE anti-DNP (0,4 µg/ml) en 0,4 ml de medio de cultivo durante la noche. Después de la sensibilización durante la noche, las células se lavaron con 0,8 ml de TyB precalentado y se añadieron 0,38 ml de compuesto de ensayo o control de vehículo (suplementado o no con FBS al 1 %) a pocillos duplicados. Las muestras se ajustaron para que contuvieran vehículo al 1 % para los compuestos de ensayo disueltos en disolventes orgánicos.

45 Se incubaron las células durante 1 h a 37 °C. Al final del período de incubación, las células se estimularon de forma rutinaria con 20 µl de DNP-HSA (2 µg/ml; concentración final 0,1 mg/ml) diluido en TyB y las células se incubaron durante 15 min a 37 °C. De forma alternativa, las células se estimularon con 20 µl de ionomicina 5 µM (concentración final 0,25 µM) o 20 µl de tapsigargina 5 µM (concentración final 0,25 µM), tanto en ausencia como en presencia de PMA 20 nM (concentración final).

50 Las placas se retiraron de la incubadora y se centrifugaron inmediatamente a 4 °C durante 5 min a 250 xg y se transfirieron a un baño de hielo. Se transfirieron alícuotas de los sobrenadantes, 25 µl, a placas de 96 pocillos. El sobrenadante restante se aspiró de los pocillos de control y las células se lisaron en 400 µl de tampón de lisis durante 5 min a TA en un agitador orbital a 450 rpm en condiciones no estériles. Después de la lisis, se transfirieron alícuotas de 25 µl de lisados a placas de 96 pocillos.

55 Se añadió solución de sustrato MUG, 100 µl, al sobrenadante y las muestras de lisado y las placas se incubaron 30 min a 37 °C. La reacción se terminó mediante la adición de 150 µl de solución de parada. Se midió la fluorescencia a longitudes de onda de 365 nm de excitación y de 440 nm de emisión.

Preparación del compuesto de ensayo: los compuestos de ensayo se prepararon en tubos de microcentrífuga de 1,5 o 2 ml y se incubaron durante 30 min a 37 °C en un Thermomixer Comfort con agitación (750 rpm). Se usó una pipeta multicanal electrónica para la transferencia rápida de diluciones del compuesto desde tubos de microcentrífuga a las células.

- 5 Controles: los controles usados se definen del siguiente modo: control negativo, se midió el sobrenadante de células no estimuladas de liberación inespecífica de β-hexosaminidasa; control positivo, se midió el sobrenadante de células estimuladas con DNP-HSA para la liberación específica, estimulada por antígeno, de β-hexosaminidasa; control de máximo, se midió el lisado de células no estimuladas para el contenido total de β-hexosaminidasa.

*Evaluación del efecto farmacológico*

- 10 Desgranulación (liberación de β-hexosaminidasa): La desgranulación se calculó como el porcentaje de β-hexosaminidasa liberada con respecto a un control de máximo (β-hexosaminidasa total) después de la sustracción de control negativo (liberación no específica) usando la fórmula;

$$\% \text{ de desgranulación} = 100 * (\text{compuesto de ensayo} - \text{control negativo}) / (\text{control de máximo} - \text{control negativo}).$$

- 15 Inhibición de la desgranulación (inhibición de la liberación de β-hexosaminidasa): La inhibición de la desgranulación se calculó como el porcentaje de reducción de la liberación de β-hexosaminidasa con respecto al control positivo (liberación estimulada por antígeno) después de sustraer el control negativo (liberación inespecífica) usando la fórmula;

$$\% \text{ de inhibición} = 100 * (1 - (\text{compuesto de ensayo} - \text{control negativo}) / (\text{control positivo} - \text{control negativo})).$$

*Medición de la concentración máxima tolerada*

- 20 La concentración máxima tolerada (MTC), es decir, la concentración más alta de compuesto de ensayo que no causa citotoxicidad, que se determina por la liberación de lactato deshidrogenasa, se midió sobre intervalo de concentración ensayado. Se usó una prueba de citotoxicidad disponible comercialmente (Promega Cytotox-One n.º cat. 67891).

El índice de seguridad (SI) de un compuesto de ensayo es la proporción entre la concentración máxima tolerada y la CI50 y se usa como una medida de la seguridad relativa del compuesto de ensayo.

**25 Resultados**

Se determinó la inhibición dependiente de la concentración de la desgranulación para todos los compuestos de ensayo sobre un intervalo de concentración, como se muestra en la Figura 1, y los valores de CI50 (concentración a la que se alcanza el 50 % de inhibición máxima) para cada compuesto junto con los valores MTC sobre el mismo intervalo de concentración (Tabla 1). Los resultados se recogen de al menos tres experimentos independientes.

30 **Tabla 1.** Inhibición de la desgranulación: Valores de CI50, MTC y SI

Compuesto	CI50 (µM)	MTC (µM)	SI
<b>1a</b>	3,8	150	39,5
<b>1b</b>	4,9	50	10,2
<b>1c</b>	12,3,	100	8,1
<b>1d</b>	3,1	75	24,2

<b>Miltefosina</b>	4,2	25	6,0
--------------------	-----	----	-----

La MTC de los compuestos de ensayo fue hasta 8-40 veces mayor que sus respectivas CI50 y, por tanto, la inhibición de la desgranulación se puede atribuir a un efecto farmacológico y no a un efecto secundario a la citotoxicidad.

5 Todas las sustancias descritas en la Tabla 1 muestran los valores de CI50 en el intervalo micromolar bajo combinados con altos valores de MTC cuando se comparan con miltefosina. Por tanto, los compuestos de acuerdo con la invención y, en particular los compuestos **1a** a **1d**, tienen un citotoxicidad ventajosamente baja. Un compuesto particularmente preferente de la presente invención es el compuesto **1A**, que tiene una CI50 muy baja y un alto valor de MTC, que proporciona un alta ventana terapéutica (índice de seguridad).

10 La desgranulación de mastocitos es un evento celular clave en reacciones alérgicas e inflamatorias, en particular en eventos patológicos que involucran la liberación de mediadores tales como histamina, leucotrienos y prostaglandinas, así como proteasas. Como consecuencia, la inhibición de la desgranulación de mastocitos es una estrategia valiosa para la prevención o tratamiento de procesos patológicos que afectan a los mediadores mencionados anteriormente. Además, el ensayo de desgranulación de mastocitos proporciona una estimación de la actividad de los compuestos de ensayo en otras células que desempeñan un papel clave en la respuesta inflamatoria, tales como granulocitos, 15 macrófagos y timocitos, que liberan citocinas y quimiocinas proinflamatorias y proteasas que erosionan el tejido.

**Ejemplo 6:** Inhibición de la activación de Akt cinasa.

### Introducción

También se usó el ensayo de desgranulación de mastocitos usando la línea celular RBL-2H3 (véase el ejemplo 5) para determinar el estado del eje PI3K/Akt. La activación de PI3K conduce a la producción de PIP3 en el lado 20 citosólico de la bicapa lipídica. Akt se recluta en el dominio PIP3 y posteriormente se activa por fosforilación en los residuos Ser473 y Thr308. (Franke et al., Cell 81: 727-736, (1995)). Una vez reclutados a la membrana, se fosforilan y activan por otras cinasas (Hemmings, Science 275: 628-630 (1997); Hemmings, Science 276: 534 (1997); Downward, Science 279: 673-674 (1998); Alessi et al., EMBO J. 15: 6541-6551 (1996)). La transferencia de Western del residuo Ser473 fosforilado en Akt (fosfo-Akt Ser473) se usa ampliamente para evaluar el nivel de activación del eje PI3K/Akt.

### 25 Materiales y procedimientos

#### Materiales

30 Todos los tampones y soluciones usados para el ensayo de fosfo-Akt Ser473 eran de Meso Scale Discovery. El tampón de lisis Tris consistía en NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM y Triton-X-100 al 1 %. Se preparó tampón de lisis Tris completo antes de su uso mediante la adición de inhibidor de proteasa, inhibidores de fosfatasa y PMSF. El tampón de lavado Tris 10x consistía en Tris 500 mM, pH 7,5, NaCl 1,5 M y Tween-20 al 0,2 %. El bloqueador A se compone de albúmina de suero bovino en tampón de lavado Tris. Se usó tampón de lectura T de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los kits de lisado de células completas usados fueron fosfo-Akt Ser473 (K11100D, Lote K0011749) y ERK1/2 (K11107D, Lote K0011698) como control de carga.

#### Equipo

35 Se usaron pipetas multicanal de 12 pocillos (30-300 µl) de Eppendorf. Las placas de ensayo se agitaron en un control TiMix 5 (Edmund Buhler). La detección de electroquimioluminiscencia se realizó en un SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery).

### Medición de la fosfo-Akt Ser473

#### Procedimientos experimentales

40 Ensayo de proteínas: la concentración de proteínas se determinó usando el kit de ensayo de proteínas de BCA (ácido bicinonónico) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En pocas palabras, se incubaron muestras duplicadas de 10 µl de patrones de albúmina de suero bovino (BSA), el blanco y lisados en una placa de 96 pocillos con 0,2 ml de reactivo de trabajo durante 30 min a 37 °C. Las placas se enfriaron hasta temperatura ambiente durante 5 min y se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de placa multi-modo. Las concentraciones de proteínas se calcularon usando el software FlexStation 3 (SoftMax Pro versión 5.3). La concentración de proteínas de los lisados se 45 determinó a partir de una curva de patrón (BSA) usando un ajuste de curva lineal.

Ensayo de fosfoproteína: se determinó la fosforilación de proteínas usando el sistema de ensayo MULTI-SPOT® (Meso Scale Discovery), proporcionando detección simultánea de proteínas fosforiladas y totales. En pocas palabras, los anticuerpos de captura contra la proteína fosforilada y total forman patrones en puntos distintos en el mismo

5 pocillo de placas de 96 pocillos. Se combinan inmunoensayo tipo sándwich y tecnología de detección de electroquimioluminiscencia para medir la intensidad de la luz emitida por las manchas de proteínas fosforiladas y totales. El análisis de fósforo-Akt Ser473 se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinó la cantidad óptima de proteína en 5 µg de lisado por pocillo para ERK1/2 y 10 µg/pocillo de fosfo-Akt Ser473. Las placas se bloquearon 25 µl/pocillo de bloqueador A durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Durante este tiempo, se descongelaron los lisados y se diluyeron hasta la concentración deseada de proteína en tampón de lisis Tris completo. Las placas se lavaron cuatro veces en tampón de lavado Tris y se añadieron 25 µl de lisado por pocillo. Las placas se incubaron durante 1-3 horas a temperatura ambiente con agitación de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado Tris, seguido de la adición de 25 µl/pocillo del anticuerpo respectivo de detección e incubación durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación. Después de cuatro lavados finales con tampón de lavado Tris, se añadieron 150 µl/pocillo de tampón de lectura T, y se leyeron las placas en un lector de placa SECTOR Imager 6000.

#### Evaluación de los efectos de fosfo-Akt Ser4 73

15 Se sustrajo la señal media de fondo de cada placa de los datos en bruto promediados. La cantidad de proteína total fosforilados se expresó como % de fosfoproteína de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery).

#### Resultados

20 Los niveles de fosfo-Akt Ser473 se determinaron en células presentadoras de antígeno sensibilizadas a IgE y estimuladas con antígeno después del tratamiento y sin (control positivo) o con compuesto de ensayo 1, 5 y 25 mM y se normalizaron a los niveles de Akt total. Se demostró inhibición dependiente de la concentración de la fosforilación de Akt en Ser473, como se muestra en la Figura 2. La Tabla 2 muestra los niveles de fosfo-Akt normalizado Ser473 como un porcentaje de los del control positivo.

**Tabla 2.** Inhibición de la fosforilación de Akt en Ser473 por el compuesto **1a**

Compuesto	Nivel de fosfo-Akt Ser473 (% del control positivo)		
	1 µM	5 µM	25 µM
<b>1a</b>	81,8±42,5	22,6 ± 15,7	6,8 ± 1,8

25 Se expresa el porcentaje del Akt total fosforilada en Ser473 como el porcentaje de células no tratadas de control, después de la inducción con IgE y antígeno durante 15 min.

30 Se observó una disminución dependiente de la dosis en los niveles de fosfo-Akt Ser473 después del tratamiento con compuesto **1a** (Tabla 2). Por tanto, los compuestos de acuerdo con la invención se pueden usar para reducir los niveles de Akt activada y, en consecuencia, son útiles en la intervención médica en indicaciones en las que Akt hiperactivada desempeña un papel patogénico, tales como enfermedades inflamatorias y alérgicas, enfermedades hiperproliferativas y otras indicaciones.

**Ejemplo 7:** Inhibición de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) en ratones.

#### Introducción

35 Los efectos antiinflamatorios y antialérgicos del compuesto **1a** se evaluaron en un modelo de ratón de reacciones cutáneas de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) y se compararon con un control de vehículo y con el fármaco de referencia, dexametasona. Las reacciones DTH son respuestas inmunitarias mediadas por células específicas de antígeno, impulsadas principalmente por linfocitos T auxiliares de tipo 1 (Th1), similares a la respuesta de la inmunización de la tuberculina. La reacción inmunitaria inducida por exposición a ovoalbúmina en animales previamente sensibilizados con ovoalbúmina en adyuvante completo de Freund, se caracteriza por hinchazón (edema) en el sitio de la exposición, por ejemplo, la oreja del ratón. La dexametasona, un esteroide antiinflamatorio, reduce las respuestas inmunitarias mediadas por células y se empleó para validar la capacidad de respuesta del ensayo al tratamiento farmacológico.

#### Materiales y procedimientos

**Materiales**

La ovoalbúmina (fracción V, polvo liofilizado), el adyuvante completo de Freund (ACF) y la metilcelulosa se obtuvieron de Sigma-Aldrich, la dexametasona de Pharmaceutical Works Polfa (Pabianice, Polonia).

**Animales**

- 5 Se criaron ratones BALB/cJW hembra en la Universidad de Lodz, Lodz, Polonia y se alojaron en grupos de 8 en jaulas Makrolon con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h. A los ratones se les dio acceso libre a la comida (Agropol S.j., Motycz, Polonia) y el agua.

**Sensibilización a antígeno y exposición**

- 10 El tamaño del grupo fue  $n = 8$  ratones a menos que se establezca de otro modo. El compuesto de ensayo estaba recién preparado antes de la administración.

- 15 Sensibilización: El antígeno proteico, ovoalbúmina, se reconstituyó en PBS a 4 mg/ml. Se preparó una emulsión de ovoalbúmina-ACF mezclando la solución de proteína con la suspensión ACF en una proporción de 1:1, utilizando dos jeringas Luer-Lock. La emulsión se sometió a prueba poniendo una gota de emulsión en PBS; si la emulsión se mantenía como una gotita apretada en el PBS, la emulsión se consideraba lista. Los ratones se sensibilizaron por inyección subcutánea de 25  $\mu$ l de emulsión en cada lado de la cola (100  $\mu$ g de ovoalbúmina por ratón).

- 20 Exposición: En el sexto día después de la sensibilización, se provocó DTH exponiendo los animales por vía subcutánea (aguja de calibre 30, B. Braun Melsungen, Melsungen, Alemania) en la oreja izquierda con 10  $\mu$ l de una suspensión al 1 % de ovoalbúmina agregada por calor (HOVA) (100  $\mu$ g de ovoalbúmina por ratón). A la oreja derecha se le administró por vía subcutánea PBS y sirvió para determinar las diferencias individuales en grosores de oreja. Se preparó HOVA calentando una solución al 5 % de ovoalbúmina en solución salina durante 1 hora a 80 °C con agitación ocasional. Después de enfriar hasta temperatura ambiente y centrifugación (400 g, 10 min a 4 °C), el sedimento se lavó dos veces con solución salina, se resuspendió al 2 % en PBS y las alícuotas se almacenaron a -30 °C. Antes de la inyección, se diluyó la HOVA con un volumen igual de PBS y se sonicó. Se midió el grosor de la oreja con un calibre cargado por resorte (Art. n.º 7309, Mitutoyo, Kawasaki, Japón) antes de la exposición y 24 horas después de la exposición.

La sensibilización, la exposición y la medición del grosor de la oreja se realizaron bajo anestesia (ketamina 80 mg/kg más xilazina 8 mg/kg, por vía intraperitoneal).

**Administración del compuesto**

- 30 Los efectos antiinflamatorios del compuesto **1a** se compararon con un control de vehículo (solución de metilcelulosa al 0,5%) y con el fármaco de referencia, dexametasona. El compuesto de ensayo se administró a 25 o 100 mg/kg por vía oral mediante sonda nasogástrica (Art. n.º 432093, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Alemania) 16 h y 3 h antes de la sensibilización y luego dos veces al día con la dosis final administrada 3 h antes de la exposición en la oreja (un total de 14 administraciones). La dexametasona se administró a 0,1 o 1 mg/kg por vía oral mediante sonda nasogástrica 3 h antes de la sensibilización y una vez al día con la dosis final administrada 3 h antes de la exposición al antígeno (un total de 7 administraciones): Todas las administraciones se dan en un volumen de 10 ml/kg.

**Cuantificación de los resultados del ensayo**

- 40 Para tener en cuenta la variabilidad individual, se sustrajo el aumento del grosor de la oreja derecha, antes y 24 h después de la administración de PBS, del aumento inducido por HOVA en el grosor de la oreja izquierda. El aumento en el grosor de la oreja se calculó por la diferencia entre el grosor de la oreja antes y 24 h después de la exposición al antígeno. El porcentaje de inhibición de la hinchazón de la oreja se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times (IET_{\text{vehículo}} - IET_{\text{compuesto}}) / IET_{\text{vehículo}}$$

en la que  $IET = (ET_{24 \text{ h pc}} - ET_{\text{antes de la dosis}})_{\text{orejas tratadas con HOVA}} / (ET_{24 \text{ h pc}} - ET_{\text{antes de la dosis}})_{\text{orejas tratadas con PBS}}$

(IET, aumento en el grosor de la oreja; ET, grosor de la oreja; PC, después de la exposición)

**Evaluación estadística**

- 45 La media y la desviación estándar (DE) se calcularon a partir de valores individuales de edema en la oreja. La evaluación estadística fue un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) con prueba *a posteriori* de Dunnett o prueba de la t de Student según los apropiado.

**Resultados**

- 50 La supresión de la hinchazón de la oreja de ratón por el compuesto **1a**, así como por dexametasona, en comparación con el control de vehículo se muestra en la Figura 3. La Tabla 3 resume la inhibición de DTH para el compuesto 1a.

**Tabla 3.** Efecto del compuesto **1a** sobre la hinchazón en la oreja en la respuesta DTH en ratones.

Compuesto	Inhibición de la hinchazón en oreja de ratón
<b>1a</b> , 25 mg/kg	43*
<b>1a</b> , 100 mg/kg	50*
<b>Dexametasona</b> , 0,1 mg/kg	14
<b>Dexametasona</b> , 1,0 mg/kg	53*

\*p<0,01 frente a control de vehículo (prueba *a posteriori* de Dunnett)

La dexametasona administrada por vía oral a una dosis de 1 mg/kg, una vez al día durante todo el período de sensibilización dio como resultado una respuesta DTH reducida significativamente, con una inhibición de un 53 %. Dicha alta dosificación (sobredosis), sin embargo, no es adecuada para el tratamiento de seres humanos debido a efectos secundarios graves del corticoesteroide y solo se usó para validar la capacidad de respuesta del modelo. Además, en el curso del presente estudio, se observó una pérdida significativa en el peso corporal de un 9 % (p <0,01 frente a control de vehículo con la prueba de la t de Student para muestras relacionadas) en el grupo de dosis alta de dexametasona. Una dosis clínicamente más representativa de dexametasona en ratón es de 0,1 mg/kg, pero a esta dosis la inhibición fue muy baja (14 %) y no alcanzó significación que indicara que solamente las dosis de esteroides que dan como resultado la pérdida significativa de peso corporal tras la administración repetida sean activas en este modelo.

El compuesto **1a**, administrado por vía oral dos veces al día durante todo el período de sensibilización en dos regímenes de dosificación, 25 mg/kg o 100 mg/kg, redujo la respuesta DTH en un 43 % y un 50 %, respectivamente. Por tanto, el compuesto **1a** fue capaz de producir una inhibición casi equivalente a la de la alta dosis de dexametasona (hasta un 94 %). En contraste con la dexametasona, no se observaron efectos secundarios tóxicos significativos de los compuestos **1a** durante el curso del estudio.

La reducción de la respuesta DTH obtenida por tratamiento con el compuesto **1a** demuestra que 5 de los compuestos de acuerdo con la invención y, en particular, el compuesto **1a**, son eficaces en la intervención farmacéutica en enfermedades alérgicas e inflamatorias que involucran respuestas inmunitarias mediadas por células específicas de antígeno. Incluso en la dosis baja, el compuesto **1a** proporcionó la inhibición igual de alta de la respuesta DTH que la obtenida mediante una sobredosis de dexametasona y por tanto, representa un compuesto particularmente preferente de la presente invención.

**Ejemplo 8:** Inhibición de la respuesta inflamatoria por dermatitis alérgica de contacto en ratones.

## 25 Introducción

Los efectos antiinflamatorios y antialérgicos del compuesto **1a** se evaluaron en un modelo de ratón de la dermatitis alérgica de contacto, una respuesta impulsada principalmente por linfocitos T auxiliares de tipo 2 (Th2). Se ha demostrado que los ratones BALB/c son susceptibles al alérgeno 2,4-diisocianato de tolueno (TDI), produciendo una afección inflamatoria de la piel con aspectos similares a los de la dermatitis atópica en seres humanos (Baumer et al., J Pharm Pharmacol, 55: 1107-1114 (2003); Baumer et al., Br J Dermatol. 151: 823-830 (2004); Ehinger et al., Eur J Pharmacol. 392: 93-99 (2000)). En este modelo, se obtiene una respuesta de dermatitis alérgica sensibilizando los ratones a TDI y posteriormente exponiéndolos al antígeno por administración tópica sobre las orejas. Es posible una evaluación cuantitativa de los efectos antiinflamatorios y antialérgicos de los compuestos de ensayo administrados por vía tópica o por vía oral, midiendo la hinchazón resultante de la oreja.

Las ventajas del modelo de dermatitis alérgica de contacto (Zollner et al., Bioessays 26: 693-6 (2004)) son la reproducibilidad y fiabilidad (> 90 % de los ratones BALB/c responder a la sensibilización), un protocolo de inducción corto, evaluación cuantitativa midiendo el grosor de la oreja, pueden inducirse lesiones cutáneas de tipo dermatitis

atópica, y los productos farmacéuticos clínicamente relevantes, tales como los corticoesteroides, los inhibidores de calcineurina y los inhibidores de PDE4, son eficaces en este modelo.

## Materiales y procedimientos

### Materiales

- 5 El dihidrogenofosfato de dexametasona (Dexa-Inject) se obtuvo de Mibe GmbH, Jena, Alemania y el diacetato de diflorasona de Basotherm, Biberach an der Riss, Alemania

### Animales

- 10 Se obtuvieron ratones BALB/c hembra de Charles River (Sulzfeld, Alemania) a la edad de 8 semanas. Todos los animales se alojaron en grupos de ocho por jaula a 22 °C con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. El agua y una dieta convencional (Altromin, Lage/Lippe, Alemania) estaban disponibles ad libitum. Todos los animales se aclimataron durante una semana antes de que se iniciaran los procedimientos experimentales.

### Sensibilización con TDI, exposición al alérgeno y prueba de hinchazón de la oreja de ratón

- 15 Los procedimientos experimentales para los ratones BALB/c alojados, la sensibilización y exposición a TDI, y la medición del grosor de la oreja se realizaron como se describió previamente (Baumer et al., J Pharm Pharmacol. 55: 1107-1114 (2003)) con las siguientes modificaciones. Para la sensibilización activa, se administraron 100 µl de TDI al 5 % (p/v) a la epidermis abdominal afeitada y pelada en el día uno, y durante los siguientes tres días consecutivos, se aplicaron 50 µl de TDI al 5 % (p/v). La reacción alérgica se reforzó 21 días después mediante la aplicación de 50 µl de TDI al 5 % (p/v). Para el examen de los efectos del compuesto de ensayo, se usó la oreja izquierda para la exposición a TDI (20 µl de un 0,5 % en acetona) y el grosor de la oreja se midió 3 horas antes y 24 horas después de la exposición.

### Administración del compuesto para tratamiento sistémico

El tamaño del grupo fue  $n = 7$  ratones a menos que se establezca de otro modo. El compuesto de ensayo estaba recién preparado antes de la administración.

- 25 Tiempo de administración: para determinar el tiempo óptimo para la administración, los grupos de tratamiento se trataron por vía oral mediante sonda nasogástrica con 100 mg/kg del compuesto **1a** (suspendido en tilosa al 0,5 %, 10 ml/kg) 1, 4 o 16 h antes de la exposición tópica a TDI. Un grupo se trató con 100 mg/kg de miltefosina por vía oral, 16 h antes de la exposición (basándose en los datos disponibles para el tiempo óptimo de administración para miltefosina) y los ratones tratados con vehículo recibieron tilosa (10 ml/kg) por vía oral, 4 h antes de la exposición.

- 30 Comparación con dexametasona: un grupo de ratones se trató por vía oral con el compuesto 1a a 100 mg/kg suspendido en tilosa al 0,5 %, 4 h antes de la exposición tópica a TDI. Los ratones tratados con vehículo recibieron tilosa al 0,5 % por vía oral 4 horas antes de la exposición. Como control positivo, se administró dexametasona en solución salina a 1 mg/kg o 3 mg/kg, 2 h y 30 min antes de la exposición y 1 h después de la exposición. La dosis y el esquema de dosificación de dexametasona se basaba en la experiencia previa que muestra un efecto máximo en este modelo.

- 35 *Administración del compuesto para tratamiento tópico*

- 40 El compuesto **1a** se administró a dos grupos de ratones por vía tópica en 20 µl de una solución al 2 % o 6 % en propilenglicol. Se aplicó la solución, 2 h antes de la exposición tópica a TDI mediante la administración de 10 µl en cada una de las superficies interior y exterior de la oreja izquierda. Un grupo de vehículo ( $n = 5$ ) se trató con propilenglicol. Como control positivo, se administró diacetato de diflorasona al 0,01 % (dosis baja) y al 0,05 % (dosis alta) en 20 µl de acetona, 2 h antes de la exposición. Un grupo de control basal se dejó sin tratar.

### Determinación del peso de los ganglios linfáticos locales y recuento de células

- 45 Directamente después del sacrificio, se preparó el ganglio linfático de drenaje del oído (*Ln. auricularis*) y se extirpó. Se determinó el peso de los órganos por medio de una balanza analítica (Kern, Balingen, Alemania). Se prepararon suspensiones de células individuales por medio de un Potter de vidrio (WVR, Darmstadt, Alemania) y las células se contaron con un hemocitómetro (Neubauer, WVR, Alemania).

### Evaluación estadística

- 50 La media y el error estándar de la media (EEM) se calcularon a partir de valores individuales de edema en la oreja. La evaluación estadística fue un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) (si se ha pasado la prueba para la distribución normal) o el ANOVA unidireccional de Kruskal-Wallis sobre los rangos (si no se ha pasado la prueba de distribución normal). Ambos fueron seguidos por una prueba *a posteriori* (procedimiento de Dunnett o prueba de Dunn, respectivamente). Un  $p < 0,05$  se consideró significativo.

## Resultados

La supresión de la hinchazón de oreja de ratón por el compuesto **1a** después de administración oral, en comparación con el control de vehículo se muestra en la Figura 4A. La Tabla 4 resume la inhibición de la respuesta de dermatitis alérgica de contacto por el compuesto **1a**.

- 5 **Tabla 4.** Efecto del compuesto **1a** administrado por vía oral sobre la hinchazón de la oreja en la respuesta de dermatitis alérgica de contacto en ratones.

Compuesto	Inhibición de la hinchazón en oreja de ratón
<b>Tiempo de administración (oral)</b>	
<b>1a</b> , 100 mg/kg, 1 h	43,5*
<b>1a</b> , 100 mg/kg, 4 h	62,9***
<b>1a</b> , 100 mg/kg, 16 h	43,5 <sup>§</sup>
<b>Miltefosina</b> , 100 mg/kg, 16 h	47,3 <sup>§</sup>
<b>Comparación con dexametasona (oral)</b>	
<b>1a</b> , 100 mg/kg	32,0**
<b>Dexametasona</b> , 1 mg/kg	78,6***
<b>Dexametasona</b> , 3 mg/kg	87,1***

\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 frente a control de vehículo (prueba *a posteriori* de Dunnett) en comparación con el vehículo, <sup>§</sup>p <0,05 frente a control de vehículo (prueba de la t)

- 10 En el estudio del tiempo de administración con administración oral, el compuesto **1a** redujo la hinchazón de la oreja significativamente (63 % del control de vehículo) cuando se administraba 4 h antes de la exposición, como también se muestra en la Figura 4A. La miltefosina ha demostrado previamente ser eficaz al máximo después de administración oral cuando se da 16 h antes de la exposición y también en este estudio redujo significativamente la hinchazón de la oreja (47 % del control de vehículo). Sin embargo, la miltefosina no fue tan eficaz al máximo como el compuesto **1a** en su tiempo óptimo de administración de 4 h, alcanzando solamente un 75 % de la eficacia inhibitoria de **1a**.
- 15

En la comparación con dexametasona, el compuesto **1a** administrado 4 h antes de la exposición redujo la hinchazón de la oreja significativamente (32 %) a 100 mg/kg, como se muestra en la Figura 4B. En comparación, la dexametasona administrada por vía oral a dosis de 1 y 3 mg/kg inhibió la hinchazón de la oreja en un 78 y 87 %, respectivamente. Como se analizó en el ejemplo 7 para la respuesta DTH, dichas dosis altas (sobredosis) de

dexametasona son inadecuadas para el tratamiento de seres humanos debido a efectos secundarios graves del corticoesteroide y se usaron para validar la capacidad de respuesta del modelo. No obstante, el compuesto **1a** fue capaz de lograr una inhibición igual al 37 % de la dosis más alta de dexametasona a dosis de **1a**, que no mostraron toxicidad.

5 El compuesto **1a**, a una concentración de 100 mg/kg tuvo un impacto significativo en la reacción inflamatoria inducida por TDI. Por tanto, los compuestos de acuerdo con la invención y, en particular, el compuesto **1a**, son particularmente eficaces y, por tanto, útiles para intervención farmacéutica oral en enfermedades inflamatorias, en particular en dermatitis atópica.

10 La supresión de la hinchazón de oreja de ratón por el compuesto 1a después de administración tópica, en comparación con el control de vehículo se muestra en la Figura 4C. La Tabla 5 resume la inhibición de la respuesta de dermatitis alérgica de contacto por compuestos **1a**.

**Tabla 5.** Efecto del compuesto **1a** administrado por vía tópica sobre la hinchazón de la oreja en la respuesta de dermatitis alérgica de contacto en ratones.

Compuesto	Inhibición de la hinchazón en oreja de ratón
<b>1a</b> , 2 %	67,7***
<b>1a</b> , 6%	82,2***
<b>Diflorasona</b> , 0,1 %	101,1***
<b>Diflorasona</b> , 0,5%	110,8***

15 \*\*\*p<0,001 frente a control de vehículo (prueba *a posteriori* de Dunnett) en comparación con el vehículo. El tratamiento con diflorasona redujo el grosor de la oreja por debajo de la de ratones no tratados.

20 El compuesto **1a** administrado por vía tópica como una solución al 2 % o 6 % redujo muy significativamente la hinchazón de la oreja en un 68 % y 83 %, respectivamente. El control positivo, diflorasona, eliminó completamente la hinchazón de la oreja e incluso redujo el grosor de la oreja por debajo del nivel de los ratones no tratados. Esto indica que las dosis de diflorasona usadas aquí no son representativas de un punto de referencia clínica, pero se usaron para validar la capacidad de respuesta del modelo. También hay que destacar que la diflorasona es uno de los corticoesteroides dérmicos más fuertes y se toma para el eccema severo.

25 Uno de los efectos secundarios más indeseables de la administración de corticoesteroides es la inmunosupresión, que conduce a la incapacidad de abordar eficazmente infecciones parasitarias, la curación de heridas y el crecimiento tumoral. En el estudio actual, se determinó la reacción de los ganglios linfáticos locales después de exposición a TDI (peso de los ganglios linfáticos y el número de células) para evaluar la respuesta de los órganos inmunitarios. La diflorasona produjo una reducción muy significativa en la reacción de los ganglios linfáticos locales, a un 0,1 % y también a un 0,5 %, inhibiendo completamente el aumento en el peso de los ganglios linfáticos y el número de células (Figuras 4D y 4E), incluso reduciendo esto hasta niveles por debajo de los de los animales no tratados. En contraste, el tratamiento tópico con el compuesto **1a** a un 2 % o 6 % tiene un efecto solamente moderado en la reacción de los ganglios linfáticos locales (Figuras 4D y 4E).

35 En vista del fuerte efecto mostrado en el modelo de dermatitis alérgica de contacto, los compuestos de la presente invención, incluyendo el compuesto **1a**, son particularmente eficaces y, por tanto, útiles para la intervención farmacéutica tópica en enfermedades inflamatorias, en particular en dermatitis atópica. Además, los compuestos de la presente invención, incluyendo el compuesto **1a**, no muestran efectos adversos típicos de los corticoesteroides administrados por vía tópica, tales como inhibición de la reacción de los ganglios linfáticos y la pérdida de peso corporal.

**Ejemplo 9:** Inhibición de la artritis inducida por colágeno (AIC) tipo II en ratón.

## Introducción

Se evaluó el efecto inhibitor del compuesto **1a** para la actividad antiinflamatoria y antiartrítica en el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC) tipo II en ratón. La AIC se ha propuesto como un modelo animal pertinente de artritis reumatoide en seres humanos. En este modelo, se provoca una artritis periférica mediante la inyección intradérmica de colágeno de tipo II (CII) homólogo o heterólogo (por ejemplo, bovino, pollo) en adyuvante completo de Freund (ACF) en ratas o ratones (Stuart et al., Ann Rev Immunol. 2: 199-218 (1984); Marty et al., J Clin Invest. 107: 631-640 (2001); Boissier et al., Eur J Immunol. 25: 1184-90 (1995)). El papel central desempeñado por los linfocitos T en el desarrollo de AIC tipo II se demuestra por la respuesta proliferativa de linfocitos T contra CII de ratón en los ratones inmunizados, el éxito de la transferencia adoptiva de la enfermedad con células inmunitarias desde el bazo, y la resistencia de ratones desnudos atímicos a la inducción de la patología (Stuart et al., Ann Rev Immunol. 2: 199-218 (1984); Marty et al., J Clin Invest. 107: 631-640 (2001)). Una ventaja de este modelo de artritis en comparación con otros es el desarrollo de una respuesta artritogénica hacia un antígeno bien definido (CII), que también permite el estudio de fenómenos inmunológicos inducidos por antígeno y su modificación selectiva por intervención inmunofarmacológica.

## 15 Materiales y procedimientos

### *Materiales*

Se disolvió colágeno bovino tipo II (Chondrex, Redmond WA, EE. UU.) a 2 mg/ml en ácido acético 0,05 M mediante agitación suave durante la noche a 4 °C. Se preparó ACF añadiendo *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco, Detroit, MI) a 2 mg/ml a IFA (adyuvante incompleto de Freund, Sigma Aldrich, Milán, Italia). Antes de la inyección, se emulsionó CII con un volumen igual de ACF.

### *Animales*

Se adquirieron ratones DBA/1j macho de 8 a 9 semanas de edad de Harlan Laboratories srl (San Pietro al Natisone, Udine, Italia) y se mantuvieron en condiciones convencionales de laboratorio con acceso libre a comida y agua. A los ratones se les permite adaptarse una semana para su entorno antes de iniciar el estudio.

## 25 *Inducción de artritis inducida por colágeno (AIC)*

El tamaño del grupo fue n = 11 ratones a menos que se establezca de otro modo. Los compuestos de ensayo estaban recién preparados antes de la administración. A los ratones se les inyectó por vía intradérmica en la base de la cola 100 µl de una emulsión que contenía 100 µg de CII, IFA y 100 µg de *Mycobacterium tuberculosis*. El día 21, se administró un refuerzo de CII en IFA.

## 30 *Tratamiento profiláctico*

Cinco grupos de ratones se trataron bajo una pauta profiláctica desde el día 0 hasta el 47 y un grupo adicional de ratones tratados de forma simulada se trató solamente con el vehículo CII, en los días 0 y 21. El compuesto **1a** se administró como una suspensión en carboximetilcelulosa al 0,5 % (10 ml/kg) y, como control positivo, se administró dexametasona a 0,3 mg/kg, como se detalla a continuación:

35 Grupo 1: compuesto **1a** a 25 mg/kg, por vía oral mediante sonda nasogástrica, dos veces al día

Grupo 2: compuesto **1a** a 100 mg/kg, por vía oral mediante sonda nasogástrica, dos veces al día

Grupo 3: dexametasona a 0,3 mg/kg, por vía intraperitoneal, una vez al día

Grupo 4: vehículo (carboximetilcelulosa), por vía oral por sonda nasogástrica

Grupo 5: ratones tratados de forma simulada

40 Los animales se sacrificaron el día 47 después de la inmunización.

### *Tratamientos terapéutico*

Los grupos de ratones se trataron con el compuesto **1a** desde la aparición de los síntomas artríticos, definida como el primer día en el que se observó una puntuación de la enfermedad de 1 o superior, y los ratones que expresaban la puntuación de la enfermedad respectiva se asignaron aleatoriamente a cada grupo experimental. El tratamiento se continuó durante 20 días consecutivos.

45

Grupo 6: compuesto **1a** a 100 mg/kg, por vía oral mediante sonda nasogástrica, dos veces al día

Como el tratamiento se basaba en la expresión individual de síntomas de artritis, los ratones se sincronizan con en el primer día de tratamiento para la evaluación de la progresión de la enfermedad. No se incluyó ningún grupo de vehículo separado para la pauta de tratamiento terapéutico, por tanto, el grupo de vehículo 4 se volvió a analizar

después de la sincronización con el primer día en el que se observó una puntuación de la enfermedad de 1 o superior. Los animales fueron sacrificados después de 20 días de tratamiento.

#### *Evaluación clínica*

5 Los ratones se evaluaron para la artritis a diario por un observador desconocedor de los regímenes de tratamiento de acuerdo con un sistema de puntuación macroscópica: 0 = sin signos de artritis; 1 = hinchazón y/o enrojecimiento de la pata o un dedo; 2 = implicación de 2 articulaciones; 3 = implicación de más de 2 articulaciones; 4 = artritis grave en toda la pata y los dedos. Se calculó un índice de la artritis para cada ratón mediante la suma de las puntuaciones de las patas individuales. La gravedad clínica se determinó también mediante la evaluación del grosor de la pata de ambas patas traseras y delanteras usando un calibre de grosor. Se calculó un índice para cada ratón mediante la  
10 suma del grosor de las patas individuales. También se registró el peso corporal diariamente.

#### *Evaluación estadística*

La media y la desviación estándar (DE) se calcularon a partir de valores individuales de puntuación.

15 Para la puntuación de artritis se realizaron dos cálculos estadísticos diferentes. Para cada día del tratamiento, se compararon las puntuaciones de la artritis de cada grupo con el grupo de control de vehículo usando la prueba de la t de Student y  $p < 0,05$  se consideró significativo.

20 Adicionalmente, se calculó una puntuación acumulativa de la artritis para cada grupo de tratamiento sumando todas las puntuaciones de la artritis durante todo el período de estudio. Las puntuaciones acumulativas de la artritis se compararon mediante la prueba de la t de Student y un  $p < 0,05$  se consideró significativo. La puntuación acumulativa de la artritis requiere que todos los animales se evalúen durante el mismo período de tiempo; para determinar la puntuación acumulativa de la artritis de animales que habían muerto durante el estudio, los valores ausentes se sustituyeron con la media del grupo para el día del valor ausente. La sustitución de los valores ausentes se realizó solamente para la puntuación acumulativa de la artritis y no se usó para otros cálculos.

### **Resultados**

#### *Efectos del tratamiento profiláctico de los compuestos de ensayo en la puntuación artrítica*

25 Como era de esperar, empezando 5-6 días después del refuerzo con CII, los signos clínicos de la artritis se hicieron observables en los ratones de control tratados con vehículo, que consisten en el aumento progresivo de las puntuaciones artríticas, acompañadas por un aumento del grosor de la pata. Se observó una pérdida significativa en el peso corporal de los animales tratados con vehículo en comparación con el grupo tratado de forma simulada después del refuerzo con CII.

30 En relación con los ratones de control tratados con vehículo, el tratamiento profiláctico a 25 y 100 mg/kg de compuesto **1a** redujo significativamente la puntuación artrítica desde el día 34 y 40, respectivamente, hasta el final del estudio en el día 47, como se muestra en la Figura 5A, mostrando la dosis inferior de compuesto **1a** un efecto antiartritis fuerte y muy significativo. Además, la puntuación acumulativa de la artritis y la duración de la enfermedad también se redujeron significativamente por el compuesto **1a**. Desde el día 34 después de la inmunización, los  
35 ratones tratados con 25 mg/kg de compuesto 1a mostraron una reducción significativa en el grosor de la pata en comparación con los ratones tratados con vehículo. La dexametasona suprimía casi completamente los signos clínicos de la artritis, pero también inducía una reducción significativa en el peso corporal desde el día 8 hasta el final del estudio, en comparación con los ratones tratados con vehículo (Figura 5B). Sin embargo, no se observaron efectos sobre el peso corporal en ratones tratados con el compuesto **1a** a las dosis baja y alta (Figura 5B).

#### *Efectos del tratamiento terapéutico de los compuestos de ensayo en la puntuación artrítica*

El compuesto **1a** a 100 mg/kg redujo la puntuación de la artritis y la puntuación acumulativa de la artritis en comparación con los ratones tratados con vehículo (Figura 5C), pero sin alcanzar significación estadística. Además, se observó una tendencia a una reducción en la duración de la enfermedad en comparación con los ratones tratados con vehículo.

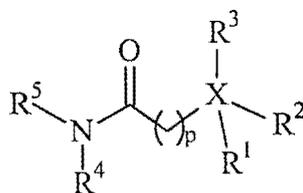
#### *Peso de los órganos inmunitarios*

50 En el momento del sacrificio, se recogieron los timos y los bazo y se pesaron para evaluar el efecto sobre estos órganos inmunitarios importantes. En comparación con los ratones tratados de forma simulada, los animales tratados con el vehículo mostraron un aumento significativo en el peso del bazo, debido a la proliferación de linfocitos en respuesta a la provocación por inyección de CII. Como era de esperar, el tratamiento con el fármaco de control positivo, dexametasona, redujo notablemente el peso de los bazo y también los timos en comparación con el grupo tratado con vehículo y también el grupo simulado, demostrando el efecto inmunosupresor conocido de los corticosteroides (Figura 5D). En contraste, el tratamiento con el compuesto **1a** a la dosis más eficaz en la puntuación de la enfermedad (25 mg/kg) no redujo los pesos del timo y el bazo en comparación con los animales tratados con vehículo (Figura 5D).

5 Los datos demuestran que el compuesto **1a** a 25 o 100 mg/kg ejercía notables efectos antiinflamatorios en la AIC tipo II murina, lo que conduce a una reducción significativa de los parámetros clínicos asociados al desarrollo de la enfermedad. A la dosis clínicamente más eficaz de 25 mg/kg, el compuesto **1a** no mostró ningún efecto tóxico, mientras que la dexametasona provocó una pérdida significativa en el peso corporal y los pesos de bazo y timo. Estos resultados sugieren que los compuestos de la presente invención, incluyendo el compuesto **1a**, son particularmente eficaces y, por tanto, útiles para la intervención médica en artritis reumatoide.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la siguiente fórmula 1



1

en la que:

5 R<sup>1</sup> es un grupo hidrocarburo C<sub>10-20</sub>;

R<sup>2</sup> es un grupo alquilo C<sub>1-4</sub>, y R<sup>3</sup> es H, un grupo alquilo C<sub>1-4</sub> o R<sup>3</sup> está ausente; o R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> están unidos entre sí para formar un anillo de pirrolidina, un anillo de piperidina o un anillo de azepano junto con el átomo de nitrógeno X al que están unidos, en el que dicho anillo de pirrolidina, dicho anillo de piperidina o dicho anillo de azepano está opcionalmente sustituido con uno o más grupos independientemente seleccionados de -OH, -O(alquilo C<sub>1-3</sub>), -OC(O)-(alquilo C<sub>1-3</sub>), alquilo C<sub>1-3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1-3</sub>) o -N(alquilo C<sub>1-3</sub>)(alquilo C<sub>1-3</sub>).

R<sup>4</sup> es H o un grupo alquilo C<sub>1-4</sub>;

15 R<sup>5</sup> es un grupo alquilo C<sub>2-8</sub>, en el que uno o más átomos de hidrógeno de dicho grupo alquilo C<sub>2-8</sub> está remplazado por -OH, o R<sup>5</sup> es un grupo cicloalquilo C<sub>5-7</sub>, en el que un átomo de carbono del anillo de dicho grupo cicloalquilo C<sub>5-7</sub> está opcionalmente remplazado por un átomo de oxígeno y en el que uno o más átomos de hidrógeno de dicho grupo cicloalquilo C<sub>5-7</sub> están remplazados independientemente por -OH o -CH<sub>2</sub>OH;

X es N<sup>+</sup> o, si R<sup>3</sup> está ausente, X es N; y p es 1, 2 o 3;

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R<sup>5</sup> es un grupo alquilo C<sub>2-8</sub>, en el que uno o más átomos de hidrógeno de dicho grupo alquilo C<sub>2-8</sub> están remplazados por -OH.

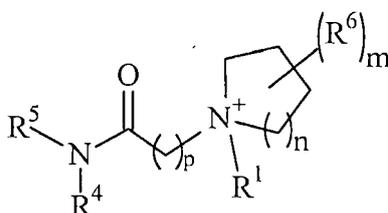
3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que R<sup>1</sup> es un grupo alquilo C<sub>10-20</sub> lineal, un grupo alquenilo C<sub>10-20</sub> lineal, o un grupo alquinilo C<sub>10-20</sub> lineal.

25 4. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R<sup>2</sup> es metilo, y R<sup>3</sup> es -H, metilo o R<sup>3</sup> está ausente.

5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> están unidos entre sí para formar un anillo de piperidina junto con el átomo de nitrógeno X al que están unidos, en el que el anillo de piperidina está opcionalmente sustituido con -OH.

30 6. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que p es 1, en el que R<sup>1</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>-CH<sub>3</sub>, o -(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>-CH<sub>3</sub>, en el que R<sup>4</sup> es metilo, y en el que R<sup>5</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>CH(OH)CH(OH)CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH<sub>2</sub>OH, o -CH(CH<sub>2</sub>OH)CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH<sub>2</sub>OH.

7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto es un compuesto de la siguiente fórmula 2



en la que:

R<sup>1</sup> es un grupo hidrocarburo C<sub>10-20</sub>;

R<sup>4</sup> es H o un grupo alquilo C<sub>1-4</sub>;

R<sup>5</sup> es un grupo alquilo C<sub>2-8</sub>, en el que uno o más átomos de hidrógeno de dicho grupo alquilo C<sub>2-8</sub> está reemplazado por -OH, o R<sup>3</sup> es un grupo cicloalquilo C<sub>5-7</sub>, en el que un átomo de carbono del anillo de dicho grupo cicloalquilo C<sub>5-7</sub> está opcionalmente reemplazado por un átomo de oxígeno y en el que uno o más átomos de hidrógeno de dicho grupo cicloalquilo C<sub>5-7</sub> están reemplazados independientemente por -OH o -CH<sub>2</sub>OH;

cada R<sup>6</sup> se selecciona independientemente de -OH, -O(alquilo C<sub>1-3</sub>), -OC(O)-(alquilo C<sub>1-3</sub>), alquilo C<sub>1-3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo C<sub>1-3</sub>) o -N(alquilo C<sub>1-3</sub>)(alquilo C<sub>1-3</sub>).

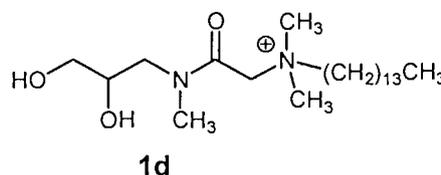
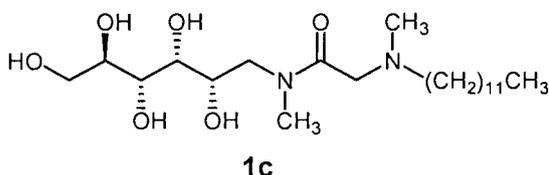
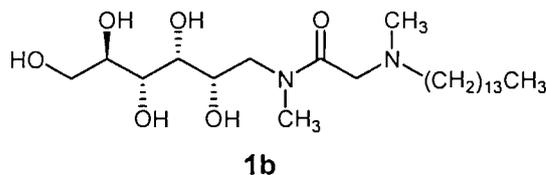
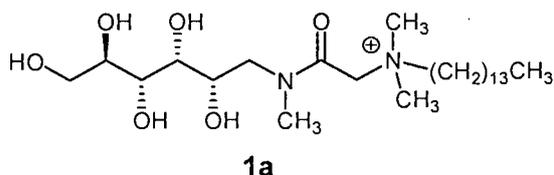
p es 1, 2 o 3;

n es 1, 2 o 3; y

m es un número entero de 0 a 4;

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto es un compuesto de la fórmula **1a**, **1b**, **1c**, o **1d**

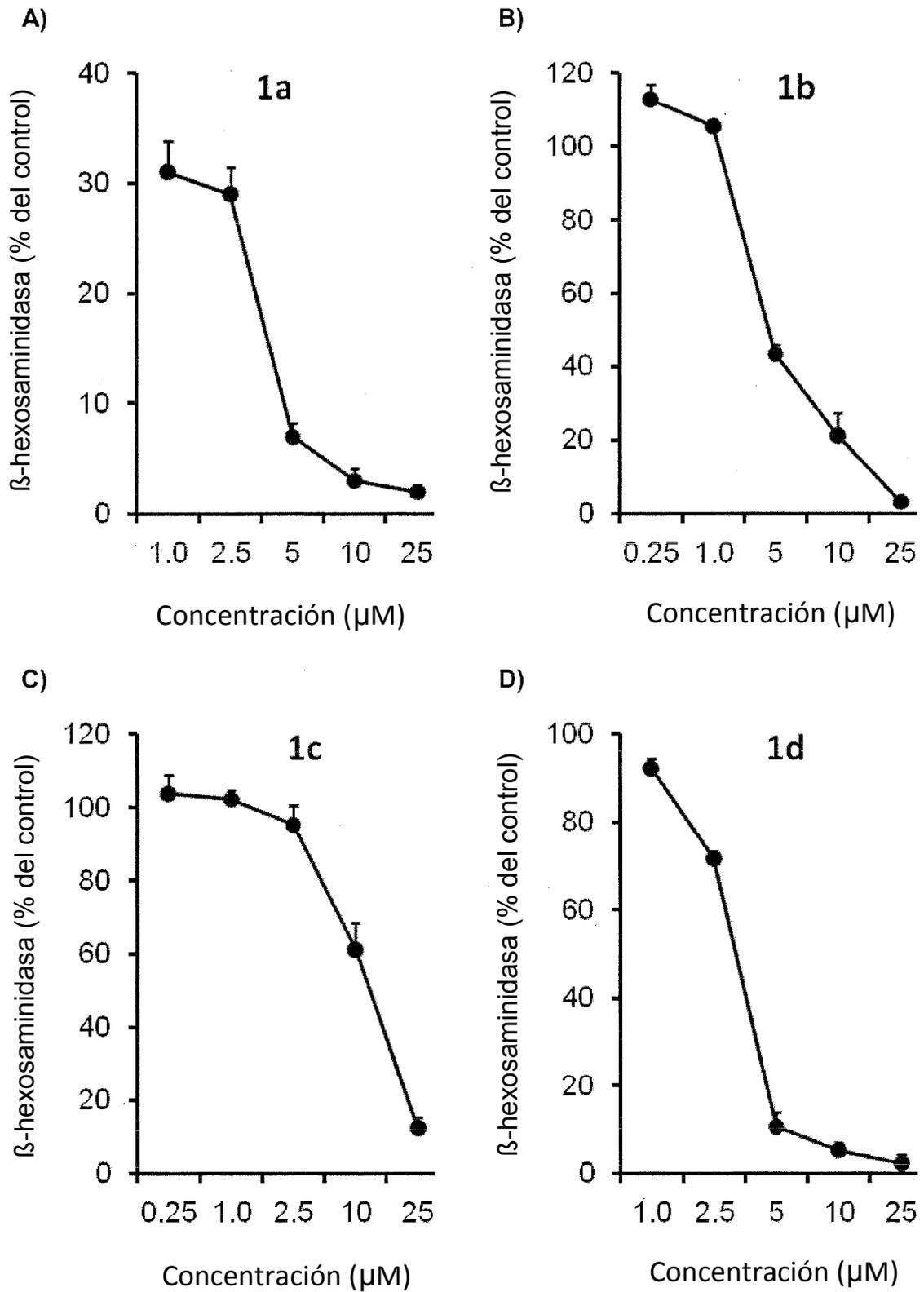


o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

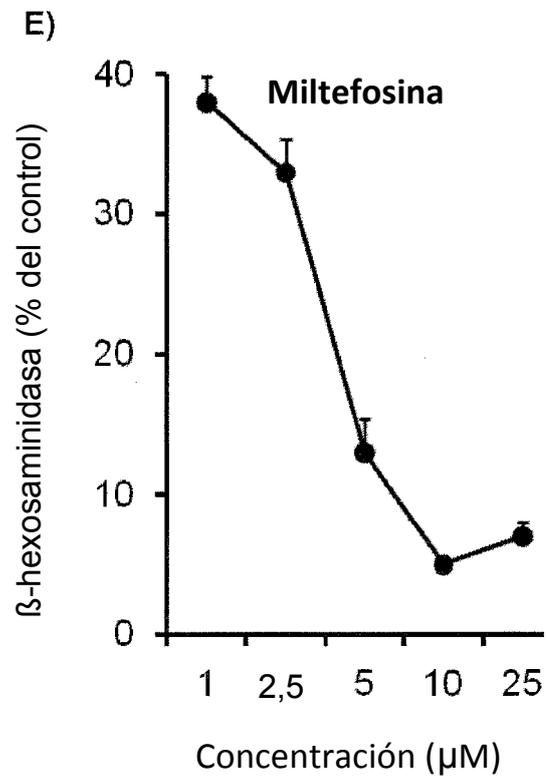
9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
10. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica de la reivindicación 9, para su uso como un medicamento.
11. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica de la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico.
12. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 11 o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho trastorno inflamatorio, autoinmunitario y/o alérgico se selecciona de psoriasis, dermatitis atópica (eccema atópico), dermatitis de contacto, eccema xerótico, dermatitis seborreica, neurodermatitis, dishidrosis, eccema discoide, eccema venoso, dermatitis herpetiforme (enfermedad de Duhring), autoeccematización, dermatomiositis, síndrome de hiper-IgE (Buckley), síndrome de Wiskott-Aldrich, anafilaxia, alergia alimentaria, reacciones alérgicas a picaduras venenosas, urticarias agudas, urticarias crónicas, urticarias físicas incluyendo urticaria acuagénica, urticaria colinérgica, criourticaria (criourticaria crónica), urticaria retardada por presión, dermatografismo, urticaria por calor, urticaria solar, urticaria por vibraciones, urticaria adrenérgica, angioedema con urticaria, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis con desviación (diverticulitis), síndrome de Behçet, colitis indeterminada, enfermedad celíaca, síndrome del intestino irritable, íleon postoperatorio, gastroenteropatía eosinofílica, gastritis, rinitis alérgica crónica, rinitis alérgica estacional (polinosis), conjuntivitis alérgica, conjuntivitis por sustancias químicas, conjuntivitis neonatal, síndrome de Sjögren, glaucoma de ángulo abierto, xerofthalmia, edema macular diabético, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma

- alérgica, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, fibrosis pulmonar, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerodermia, artrosis, artritis reactiva, polimialgia reumática, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves-Basedow, arteritis de la temporal, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmunitaria, alopecia areata, síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS), una enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de huésped contra injerto, un rechazo de trasplante, o una contribución inflamatoria a la enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson.
- 5
13. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12 o el compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, mediante los que se va a administrar dicho compuesto o dicha composición farmacéutica en combinación con uno o más fármacos inmunomoduladores y/o uno o más fármacos antiinflamatorios.
- 10
14. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica de la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad o trastorno proliferativo, neoplásico o displásico.
- 15
15. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 14 o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la enfermedad o trastorno proliferativo, neoplásico o displásico se selecciona de leucemia, carcinoma corticosuprarrenal, un cáncer relacionado con el sida, cáncer de apéndice, astrocitoma, carcinoma basocelular, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, tumor cerebral, cáncer de mama, un adenoma bronquial, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, linfoma de linfocitos T cutáneos, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, un trastorno mieloproliferativo crónico, tumor desmoplásico de células redondas y pequeñas, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, tumor extracraneal de células germinativas, cáncer extrahepático del conducto biliar, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, carcinoide gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal, tumor de células germinativas, glioma, tumor trofoblástico gestacional, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de corazón, cáncer hepatocelular, linfoma hodgkiniano, linfoma no hodgkiniano, cáncer de hipofaringe, glioma hipotalámico y de la vía óptica, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de células renales, cáncer de laringe, cáncer de labio y la cavidad bucal, cáncer de pulmón, macroglobulinemia de Waldenström, osteosarcoma, meduloblastoma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer de boca, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, neoplasia de células plasmáticas, micosis fungoide, una enfermedad mielodisplásica, mieloma múltiple, un trastorno mieloproliferativo, cáncer de la cavidad nasal y los senos paranasales, carcinoma nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer bucal, cáncer orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinativas del ovario, tumor pancreático, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, astrocitoma pineal, germinoma pineal, pineoblastoma, adenoma hipofisario, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células de transición, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivales, síndrome de Sézary, cáncer de piel, carcinoma broncopulmonar microcítico, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de estómago, tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma, cáncer de tiroides, cáncer de útero, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer de vulva o tumor de Wilms.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40

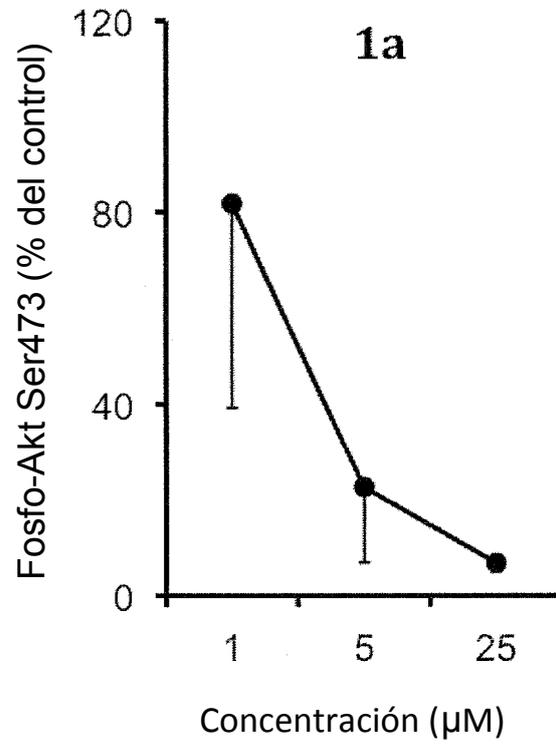
**Fig. 1**



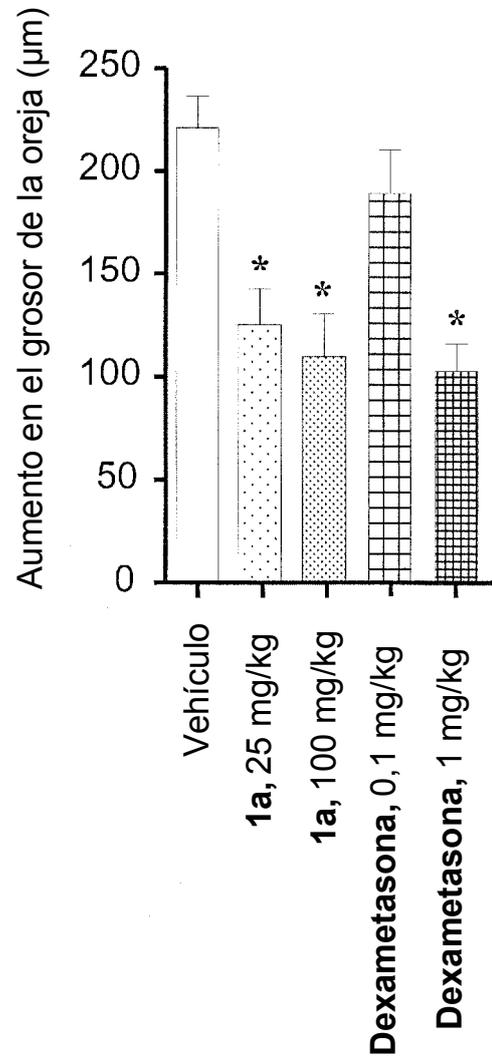
**Fig. 1 (cont.)**



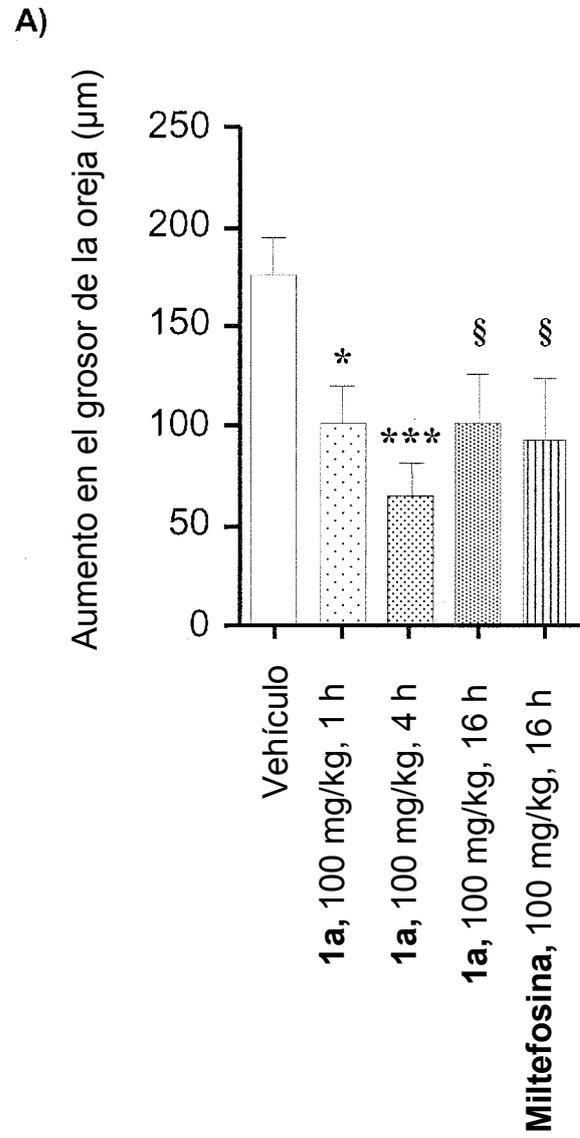
**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**



**Fig. 4 (cont.)**

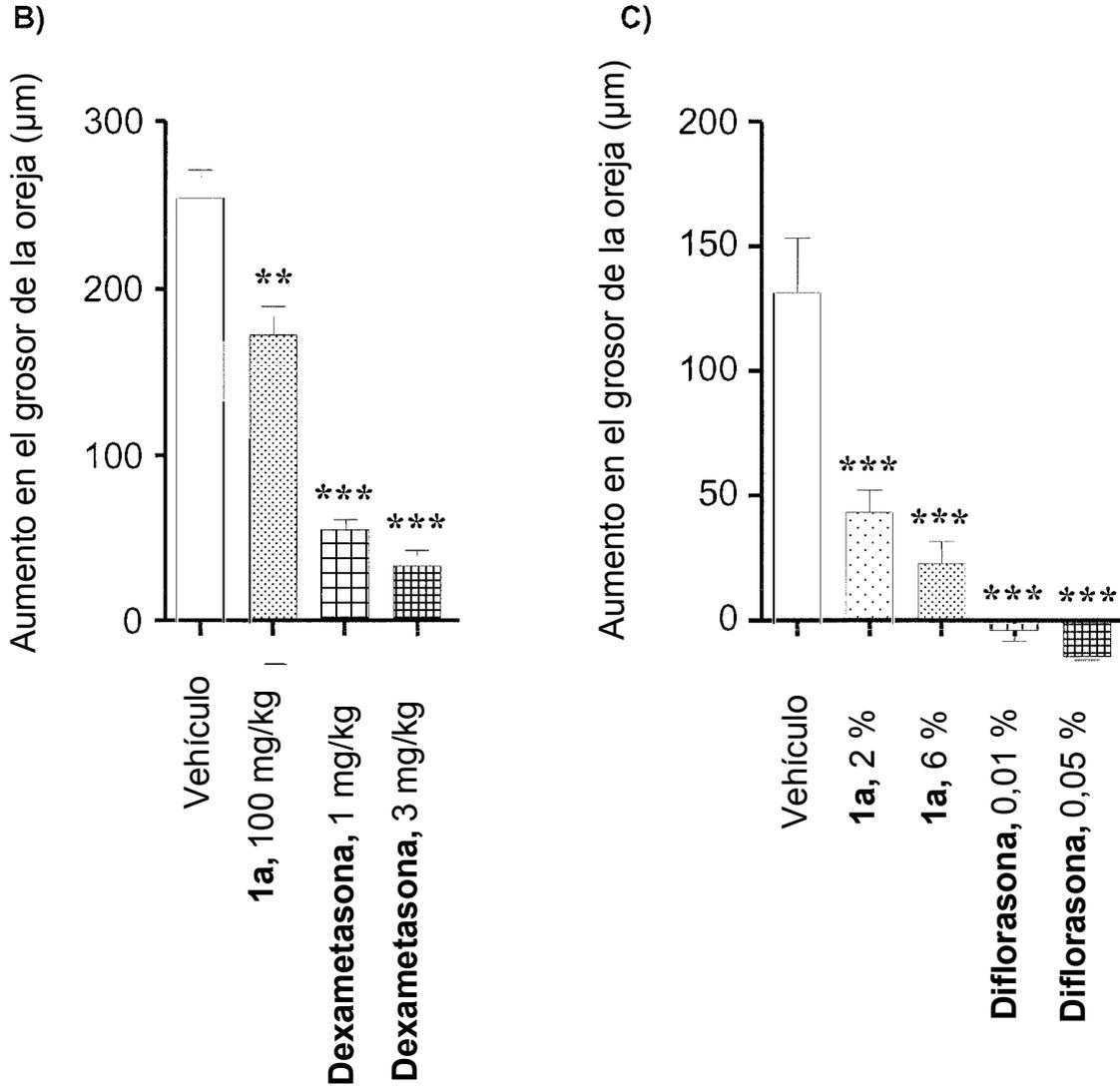
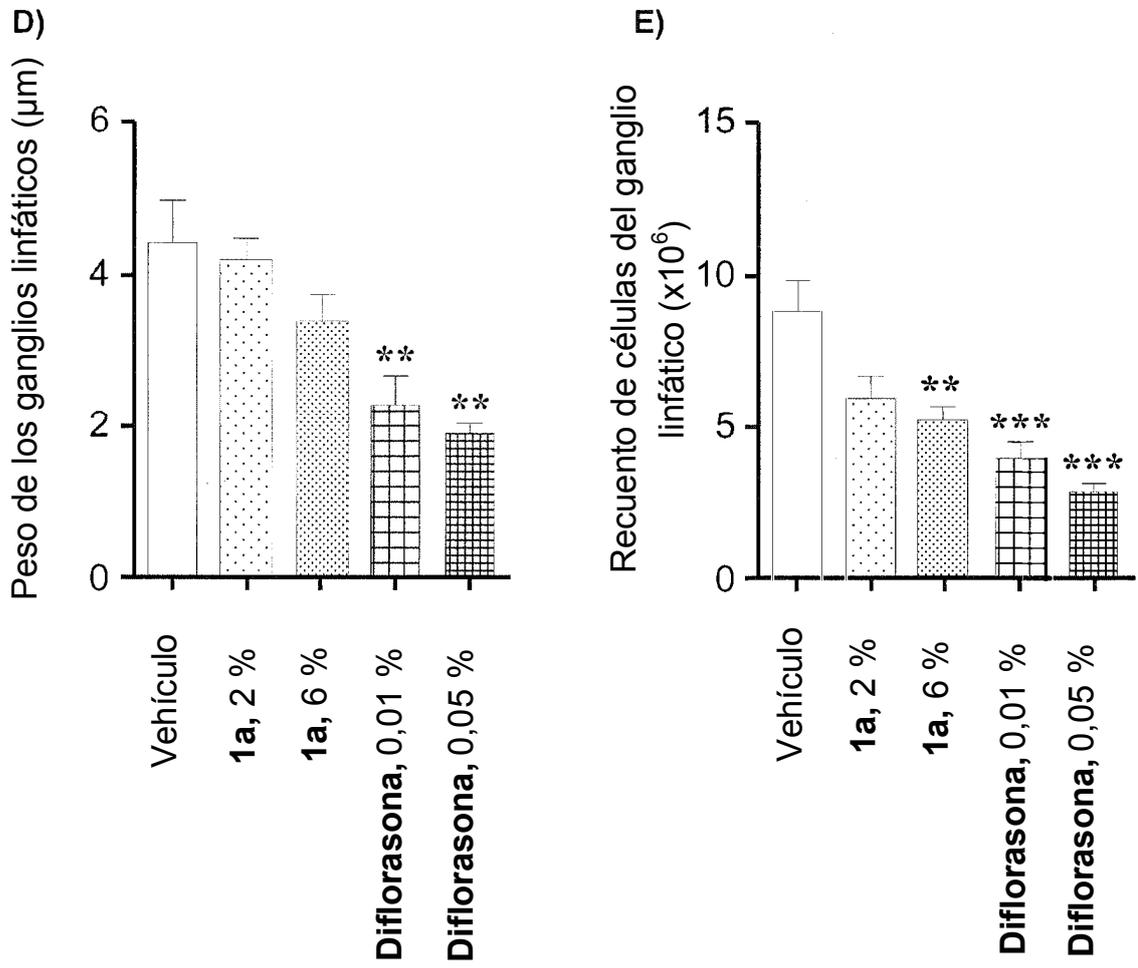


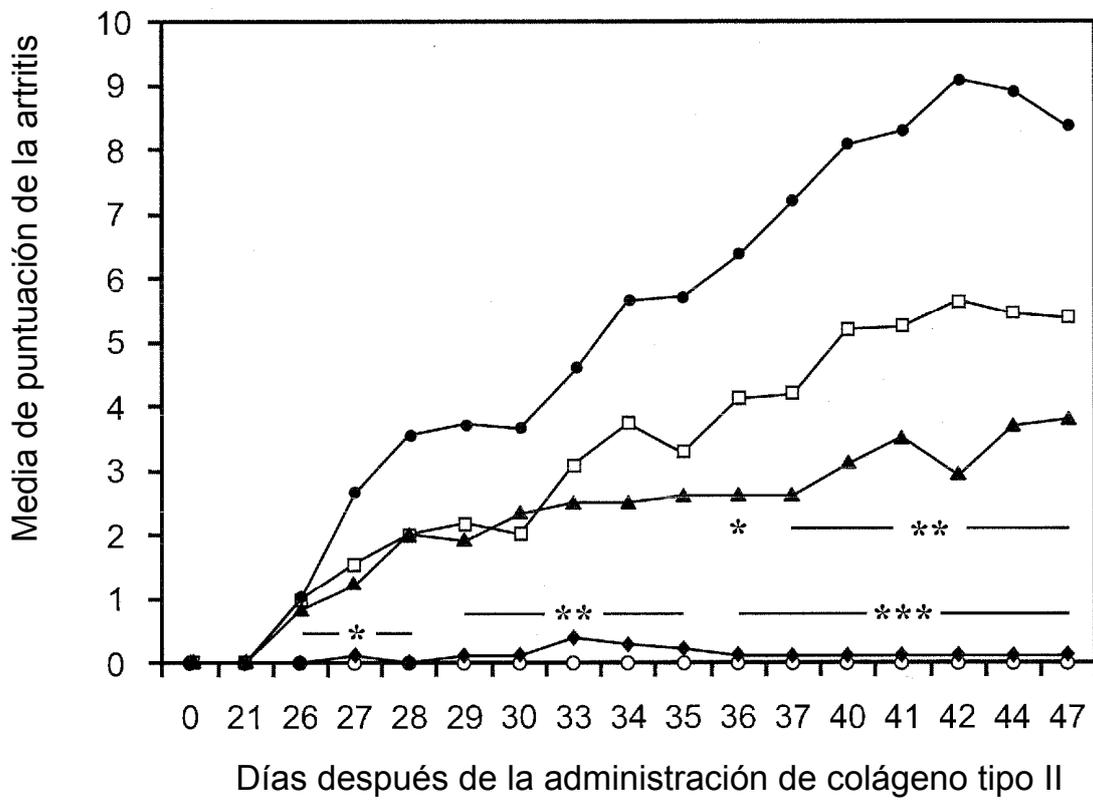
Fig. 4 (cont.)



**Fig. 5**

A)

- ▲ **1a, 25 mg/kg**
- **1a, 100 mg/kg**
- ◆ **Dexametasona, 0,3 mg/kg**
- **Tratados con vehículo**
- **Tratados de forma simulada**



**Fig. 5 (cont.)**

**B)**

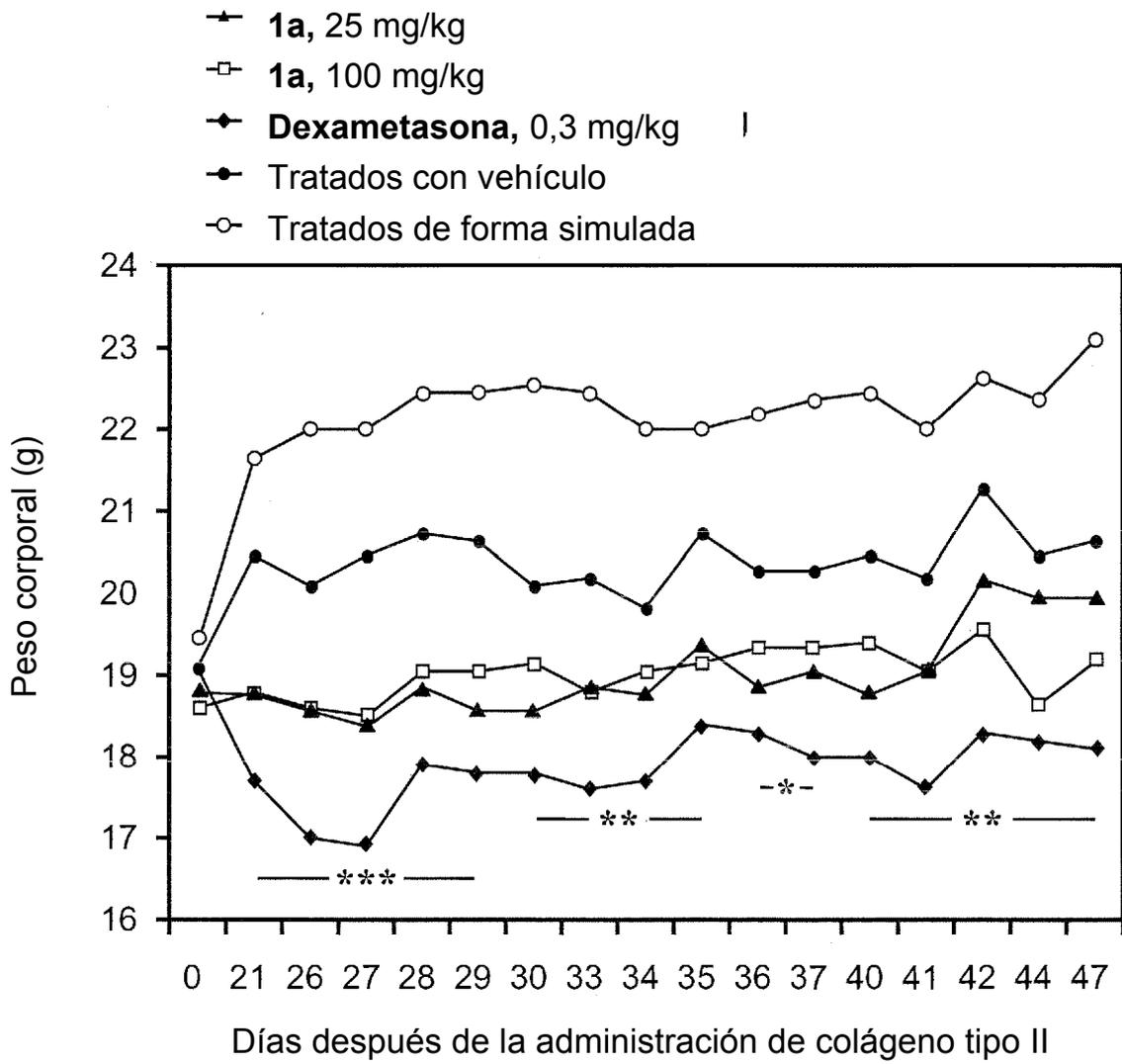


Fig. 5 (cont.)

c)

- **1a**, 100 mg/kg
- Tratados con vehículo
- Tratados de forma simulada

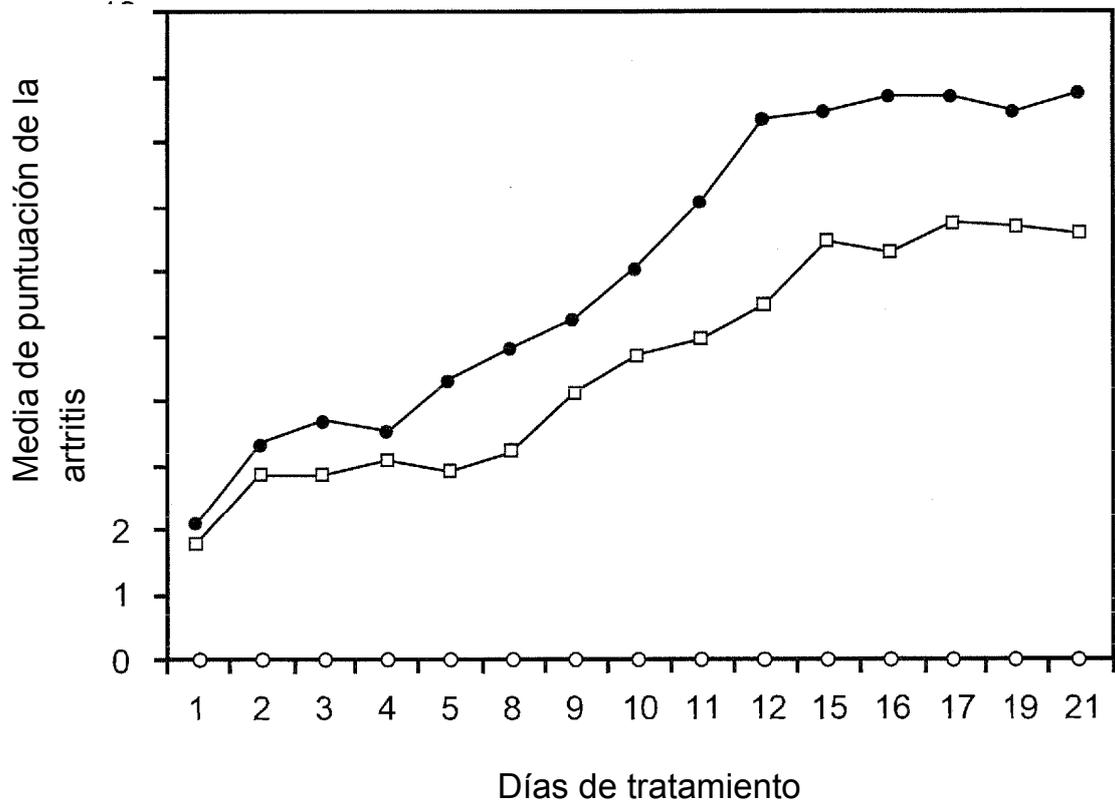


Fig. 5 (cont.)

D)

