

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 406**

51 Int. Cl.:

A01N 33/02	(2006.01)	A61K 31/4025	(2006.01)
A61K 31/14	(2006.01)	A61K 31/472	(2006.01)
G01N 33/53	(2006.01)	A61K 31/4725	(2006.01)
A61P 27/02	(2006.01)	A61K 31/496	(2006.01)
A61K 31/00	(2006.01)	A61K 31/502	(2006.01)
A61K 31/198	(2006.01)	A61K 31/517	(2006.01)
A61K 31/277	(2006.01)	A61K 31/66	(2006.01)
A61K 31/341	(2006.01)	A61K 45/06	(2006.01)
A61K 31/343	(2006.01)	A61K 9/00	(2006.01)
A61K 31/381	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2008 PCT/US2008/011878**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2009 WO09054914**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2008 E 08842113 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2209371**

54 Título: **Composición y procedimientos para el tratamiento de la retinopatía diabética**

30 Prioridad:

19.10.2007 US 999571 P

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

21.08.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BURNIER, JOHN;
GADEK, THOMAS y
SEMBA, CHARLES**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 630 406 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para el tratamiento de la retinopatía diabética

5

Referencia cruzada

Esta solicitud reivindica beneficio sobre la solicitud provisional de EE.UU. número de serie 60/999571, presentada el 19 de octubre de 2007.

10

Antecedentes de la invención

En todo el mundo, una de las causas más importantes de ceguera es la retinopatía diabética (RD), que a menudo incluye un trastorno asociado, el edema macular diabético (EMD), que es una de las complicaciones de la diabetes que da lugar a daño, lesión y degeneración de la microvasculatura en el cuerpo y, en particular, en el ojo. La pérdida de función de lugar de trabajo y personal con posterioridad a dicha pérdida de la función visual puede tener un impacto devastador sobre la persona y en la comunidad que rodea a dicho individuo como un todo. Casi todos los individuos con diabetes demuestran algún grado de retinopatía diabética y el número de pacientes diabéticos es cada vez mayor, por lo tanto, existe la necesidad de tratamientos más eficaces para la pérdida de la visión y los síntomas de la RD y el edema macular asociado.

En el documento US2004/028648 se divulga un procedimiento de tratamiento de la retinopatía diabética mediante la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de LFA-1 en una formulación farmacéuticamente aceptable.

25

Sumario de la invención

Las materias sujeto que no están abarcadas por el alcance de las reivindicaciones no forman parte de la presente invención reivindicada.

30

En un aspecto, la presente invención proporciona un agente terapéutico para su uso en el tratamiento de la retinopatía diabética de acuerdo con la reivindicación 1, que inhibe la interacción de LFA-1 y un ICAM.

Se describe un procedimiento para tratar un sujeto que sufre edema macular, que comprende administrar a dicho sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico que inhibe la interacción de LFA-1 y un ICAM, reduciendo y / o previniendo de este mod. el edema macular en un ojo de dicho sujeto.

35

Se describe un procedimiento para tratar la retinopatía diabética en un sujeto, que comprende realizar una prueba diagnóstica de retinopatía diabética sobre dicho sujeto; determinar si dicho sujeto sufre retinopatía diabética según en los resultados de dicha prueba de diagnóstico; y, tras el diagnóstico de dicha retinopatía diabética, administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un antagonista (LFA-1) en una formulación farmacéuticamente aceptable. Se describe un procedimiento para reducir y / o prevenir la inflamación ocular postoperatoria en un sujeto que sufre diabetes, que comprende administrar a dicho sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1, reduciendo y / o previniendo de este modo la inflamación postoperatoria en un ojo de dicho sujeto.

40

45

En algunos ejemplos, la inflamación postoperatoria es el resultado de vitrectomía, terapia de fotocoagulación con láser, terapia fotodinámica o LASIK. En otros ejemplos, la etapa de diagnóstico se realiza mediante la formación de imágenes de un ojo de dicho sujeto o el análisis de una muestra biológica de un ojo de dicho sujeto.

50

En algunas de las realizaciones de la invención, el ICAM es ICAM-1, ICAM-2 o ICAM-3. En algunas realizaciones, el ICAM es ICAM-1. En algunas realizaciones de la invención, el agente terapéutico es un antagonista de LFA-1. En algunas de las realizaciones de la invención, el antagonista de LFA-1 se une a un sitio de unión de alta afinidad en la subunidad α L de LFA-1 que se superpone al sitio de unión a ICAM-1. En otras realizaciones de la invención, el antagonista de LFA-1 es directamente competidor con la unión de ICAM-1 en la subunidad α L de LFA-1. En algunas realizaciones de la invención, el antagonista de LFA-1 es un inhibidor competitivo de la interacción entre LFA-1 e ICAM-1. En algunas realizaciones de la invención, el antagonista de LFA-1 es un antagonista alostérico de la unión de ICAM-1 en la subunidad α L de LFA-1.

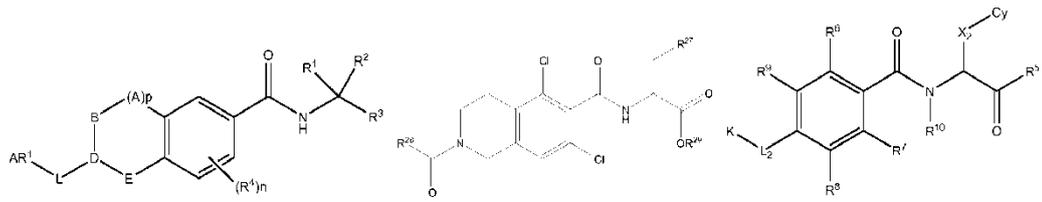
55

En algunos de los ejemplos, la retinopatía diabética es no proliferativa, en algunos, la retinopatía diabética es proliferativa. En algunas realizaciones de la invención, el daño resultante de la retinopatía diabética es edema macular, neovascularización de la retina, crecimiento fibrovascular sobre una retina, pérdida de la visión, engrosamiento de la membrana basal, edema de retina o isquemia retiniana.

60

En algunos de los ejemplos, se proporciona un antagonista de LFA que es un anticuerpo. En algunas de las realizaciones de la invención, se proporciona un antagonista de LFA que es un compuesto de Fórmula II.

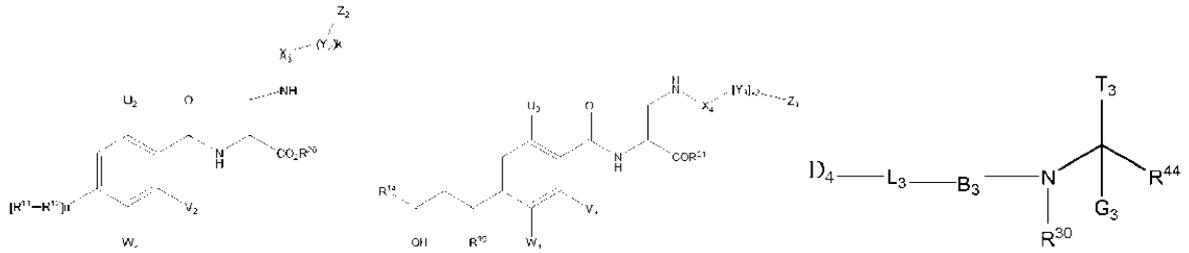
65



Fórmula I

Fórmula II

Fórmula III

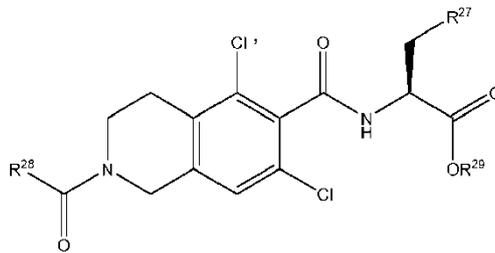


Fórmula IV

Fórmula V

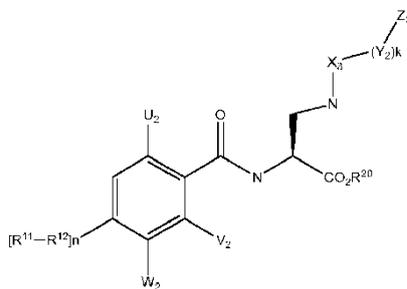
Fórmula VI

Se proporciona el compuesto de Fórmula II que contiene una estereoquímica como en la Fórmula II'.



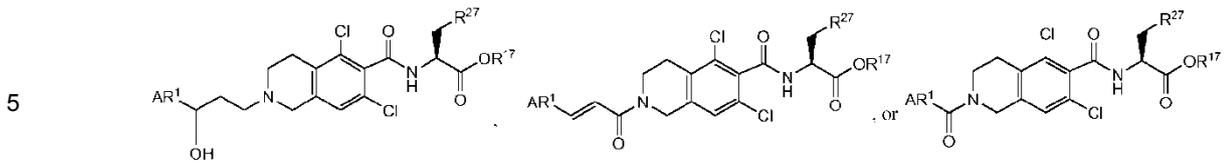
Fórmula II'

En algunos de los ejemplos, se proporciona el compuesto de Fórmula III que contiene una estereoquímica como en la Fórmula III'.



Fórmula III'

En algunas de las realizaciones de la invención, se proporciona un antagonista de LFA que es un compuesto de Fórmula IIIB.

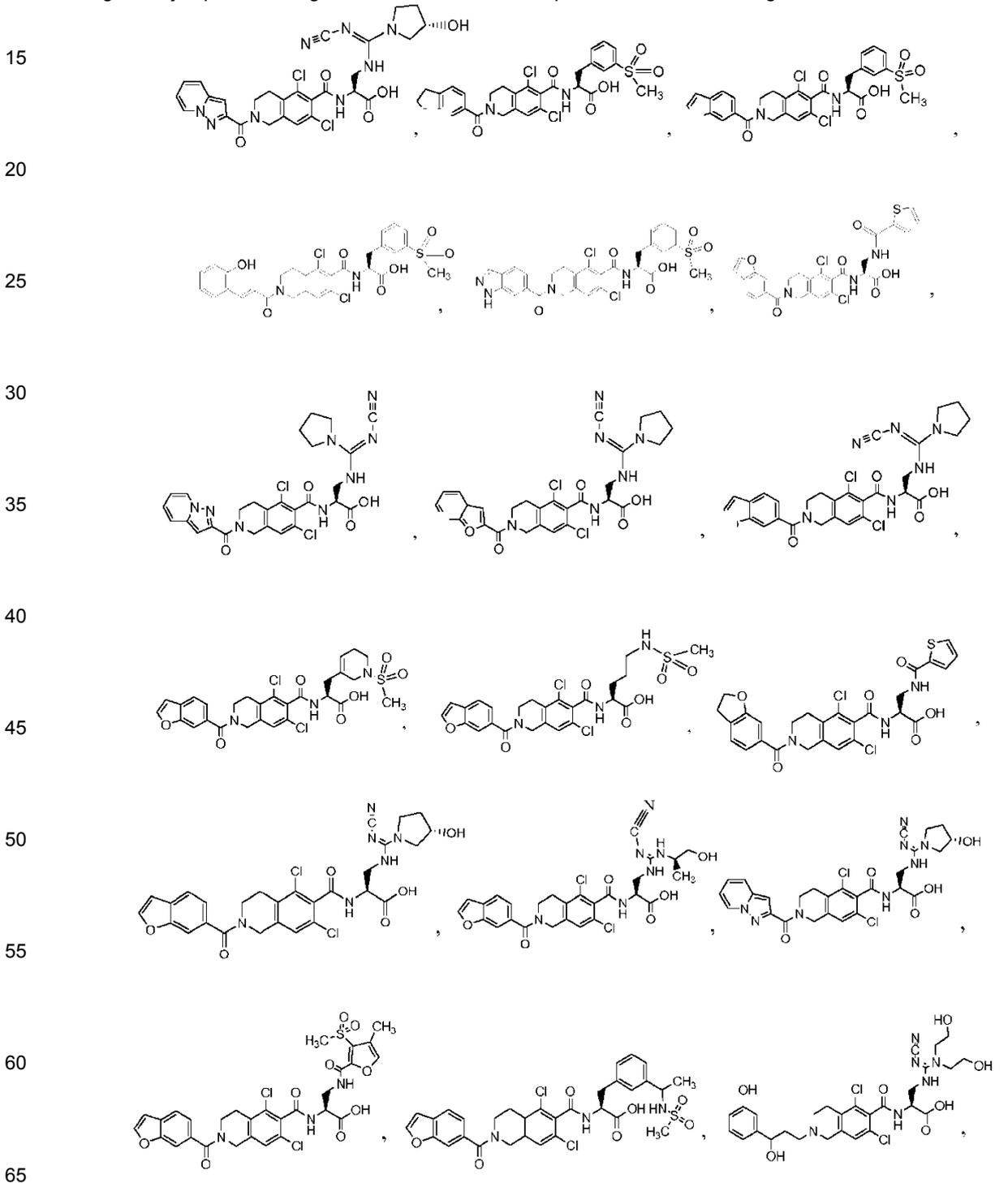


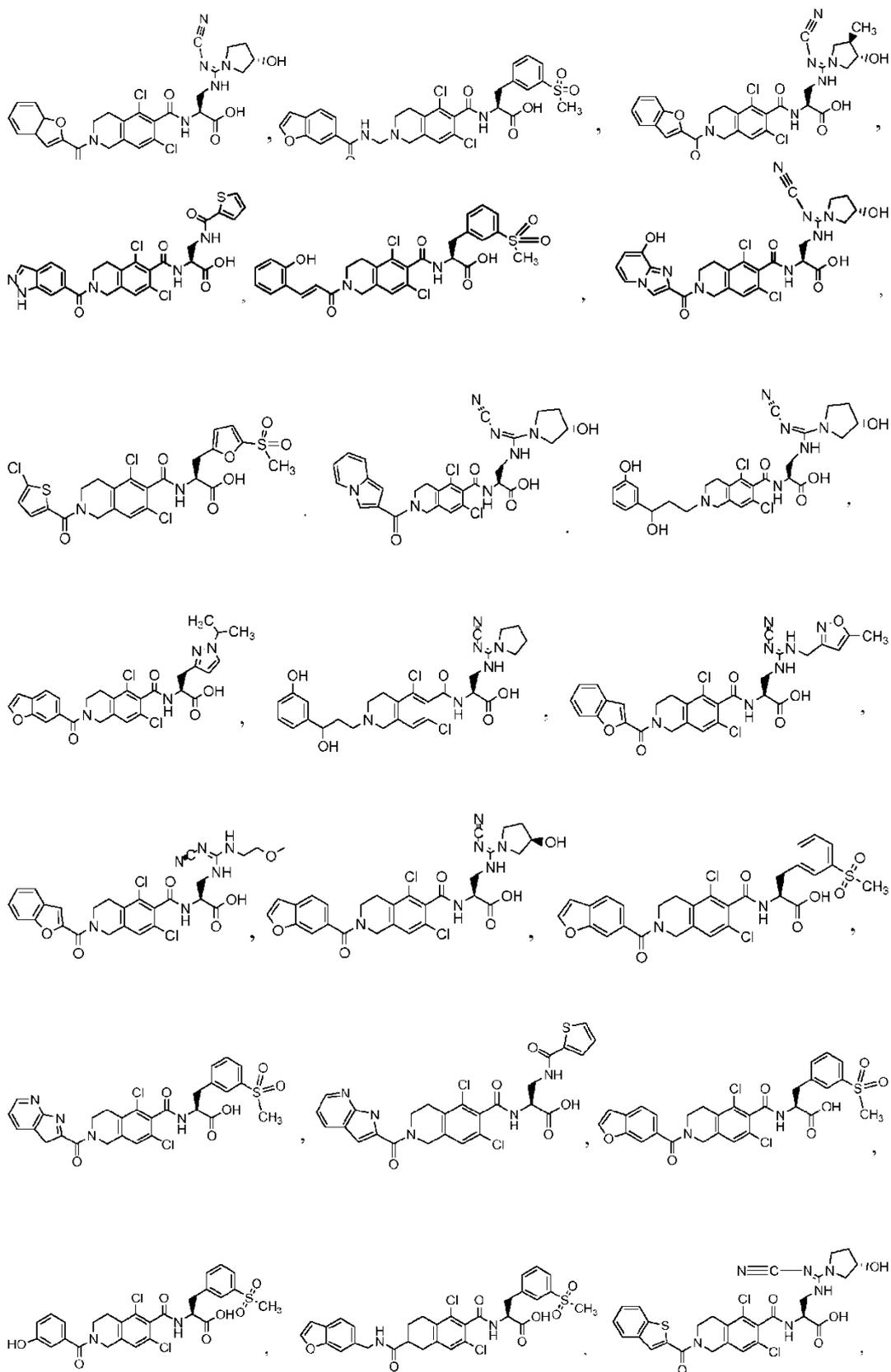
10 Fórmula IA

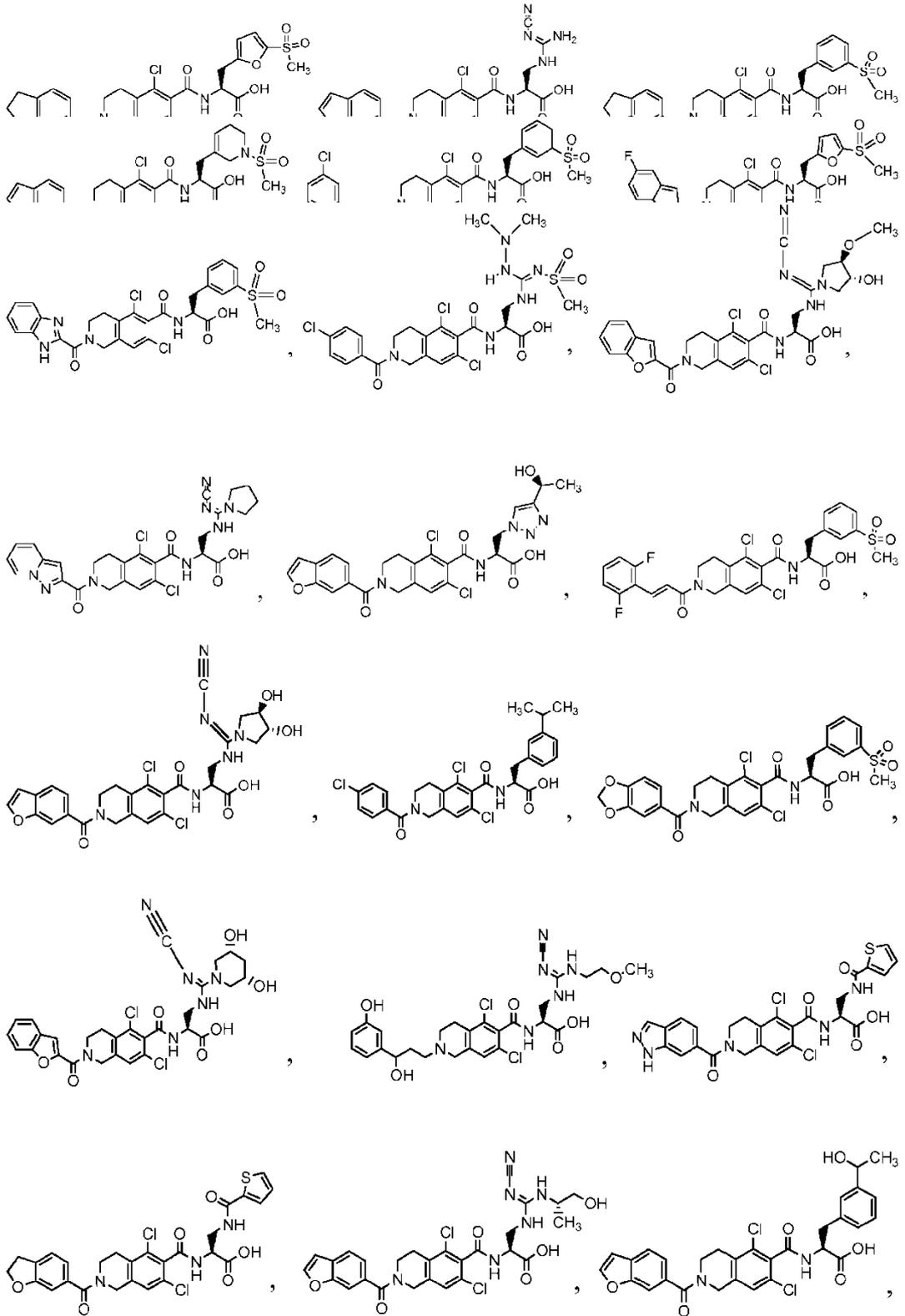
Fórmula IIA

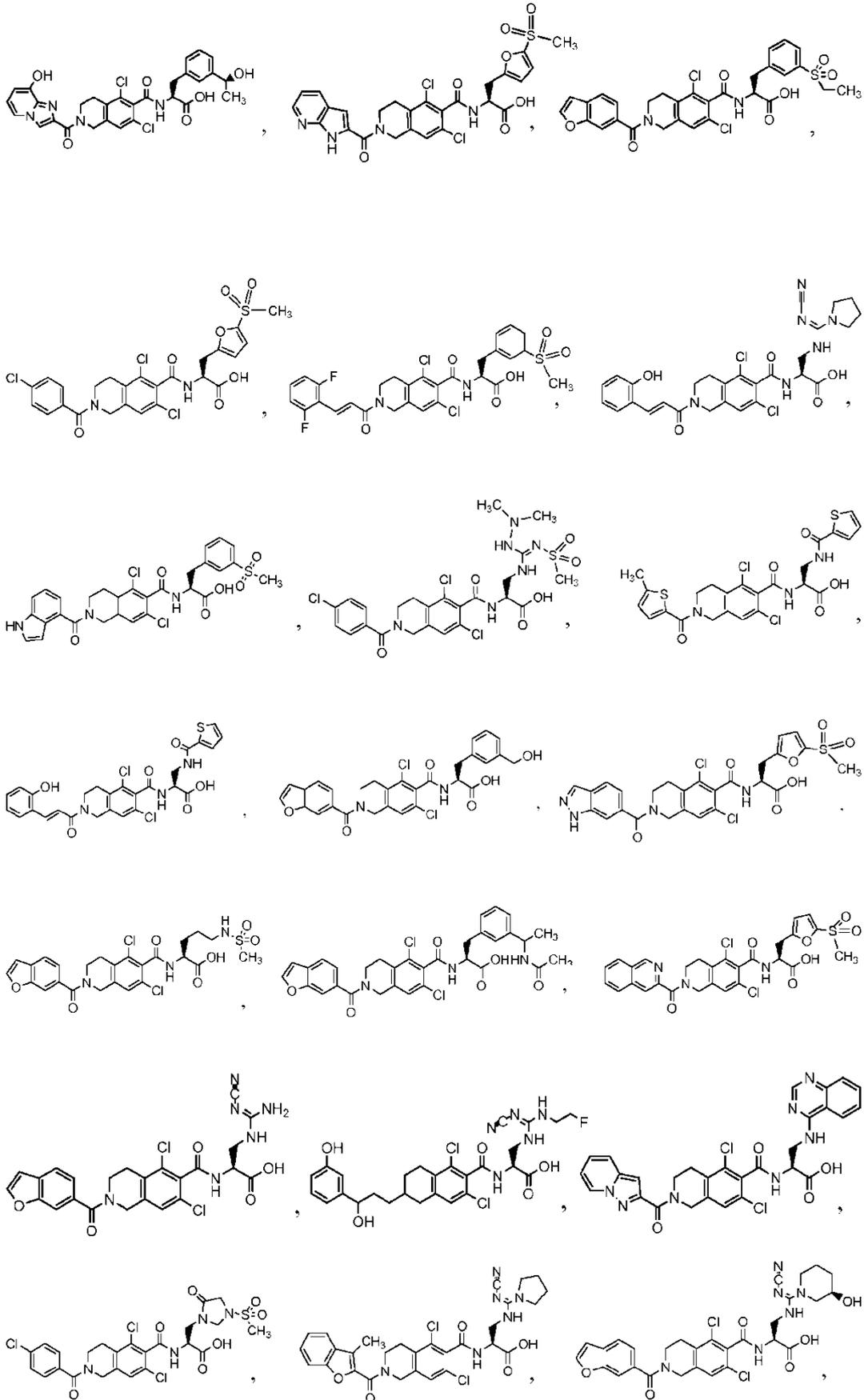
Fórmula IIB

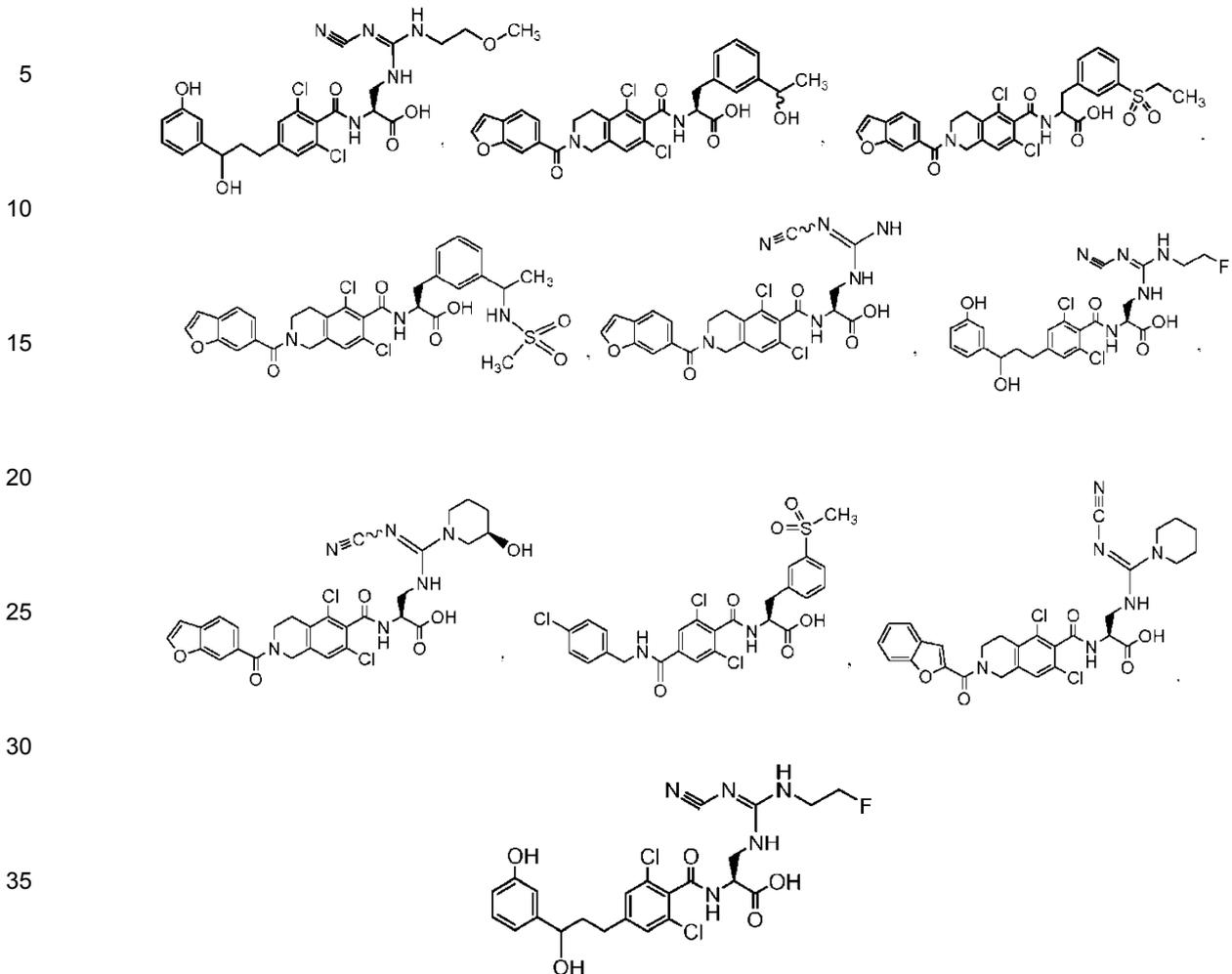
En algunos ejemplos, el antagonista de LFA-1 es un compuesto con una de las siguientes estructuras:





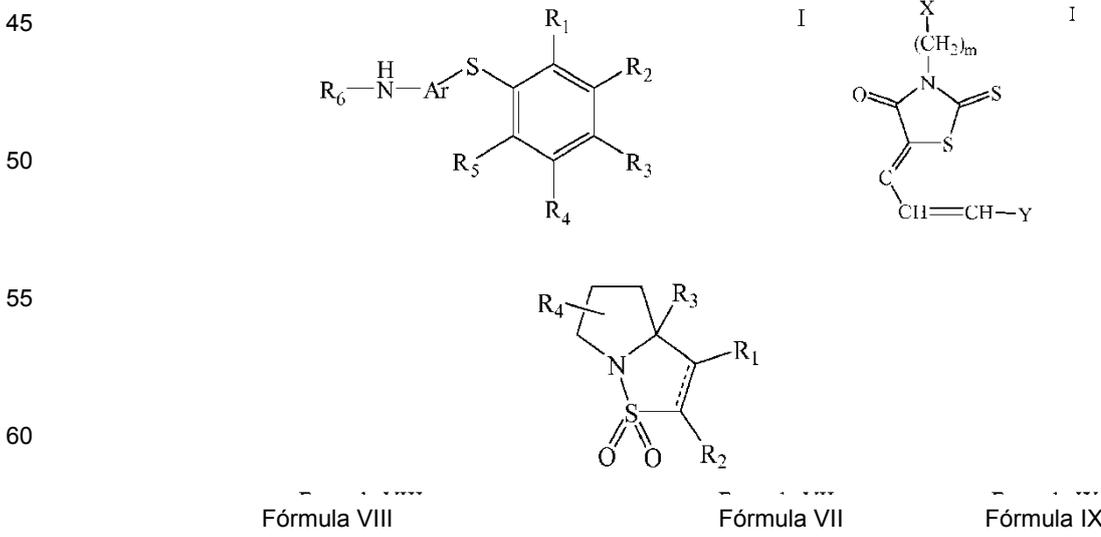






40 y sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables.

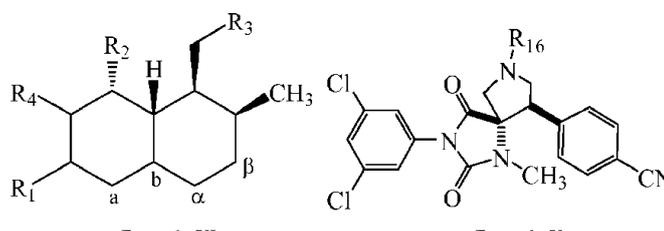
En algunos de los ejemplos, el antagonista de LFA-1 es un compuesto de Fórmula VII, VIII, IX, X o XI o enantiómeros, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo.



65

5

10



Fórmula XI

Fórmula X

15

20

25

En algunas de las realizaciones de la invención, el agente terapéutico se administra por vía tópica, oral, periocular, intraocular, mediante inyección, por vía nasal, a través de un aerosol, a través de un inserto, a través de un dispositivo implantado, o mediante una gota. En otra de las realizaciones de la invención, el agente terapéutico se administra en un vehículo transportador que es gota líquida, lavado líquido, líquido nebulizado, gel, ungüento, aerosol, pulverización, micropartículas y nanopartículas poliméricas, solución, suspensión, sólido, matriz biodegradable, polvo, cristales, espuma o liposomas. En algunas de las realizaciones de la invención, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho agente terapéutico en un ojo de dicho sujeto por medio de administración local o sistémica. En algunas de las realizaciones de la invención, se realiza una administración inyectable por vía intraocular o periocular. En algunas realizaciones de la invención, la administración se lleva a cabo mediante la administración de una instilación intraocular de un gel, crema, polvo, espuma, cristales, liposomas, pulverización, microesferas o nanoesferas poliméricas o en forma de suspensión líquida de dicho compuesto. En algunas de las realizaciones, se utilizan microesferas o nanoesferas poliméricas para administrar el agente terapéutico mediante inyección o implantación periocular o intraocular.

30

En algunas de las realizaciones, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico en un ojo del sujeto por medio de administración local o sistémica.

35

40

45

En algunas de las realizaciones de la invención, el agente terapéutico se administra en un vehículo transportador que es gota líquida, lavado líquido, líquido nebulizado, gel, ungüento, aerosol, pulverización, micropartículas y nanopartículas poliméricas, solución, suspensión, sólido, matriz biodegradable, polvo, cristales, espuma o liposomas. En algunas de las realizaciones de la invención, la administración tópica comprende la infusión de dicho compuesto en dichos ojos a través de un dispositivo seleccionado del grupo que consiste en un sistema de bomba-catéter, un inserto, un dispositivo de liberación continua o selectiva, un implante bioabsorbible, una formulación de liberación continua o sostenida y una lente de contacto. En algunas de las realizaciones de la invención, se realiza una administración inyectable por vía intraocular, intravítrea, periocular, subcutánea, subconjuntiva, retrobulbar o intracameral. También se proporcionan formulaciones de liberación controlada en algunas realizaciones de la invención. En algunas realizaciones de la invención, los compuestos de la invención se formulan como profármacos. En algunas realizaciones de la invención, la formulación del agente terapéutico no incluye ningún conservante. En algunas realizaciones de la invención, la formulación del agente terapéutico incluye al menos un conservante. En algunas realizaciones de la invención, la formulación del agente terapéutico incluye un agente espesante. En otras realizaciones de la invención, la formulación del agente terapéutico utiliza micropartículas o nanopartículas de PLGA.

50

En algunas realizaciones de la invención, el compuesto se administra al sujeto en una cantidad suficiente para alcanzar concentraciones intraoculares o retinianas de aproximadamente 1×10^{-8} a aproximadamente 1×10^{-1} moles / litro. En algunas realizaciones de la invención, el compuesto se administra al menos una vez al año. En otras realizaciones de la invención, el compuesto se administra al menos una vez al día. En otras realizaciones de la invención, el compuesto se administra al menos una vez a la semana. En algunas realizaciones de la invención, el compuesto se administra al menos una vez al mes.

55

60

En algunas realizaciones de la invención, se administra un segundo agente terapéutico antes, en combinación, al mismo tiempo o después de la administración del antagonista de LFA-1. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en antioxidantes, agentes antiinflamatorios, antimicrobianos, esteroides, inhibidores de la proteína quinasa C, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, agentes antiangiogénicos, inhibidores del complemento y agentes antiapoptóticos. En algunas realizaciones de la invención, el segundo agente terapéutico es un agente terapéutico antiadherencia que se une a un sitio de unión alostérico sobre LFA-1. En algunas realizaciones de la invención, el segundo agente terapéutico es un anticuerpo terapéutico antiadherencia o fragmento de anticuerpo.

65

En algunos ejemplos se incluye un ensayo de diagnóstico en un procedimiento de tratamiento con un antagonista de LFA-1. En una realización, se realiza una prueba de diagnóstico para la retinopatía diabética y, después de realizar un diagnóstico de la enfermedad, se administra al sujeto un antagonista de LFA-1 como se describe en el presente

documento. En algunas realizaciones de la invención, la prueba diagnóstica se realiza mediante formación de imágenes de un ojo del sujeto o análisis de una muestra biológica de un ojo del sujeto.

5 La invención proporciona una composición farmacéutica formulada para administración ocular, que comprende un agente terapéutico que inhibe la interacción de LFA-1 y un ICAM y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos ejemplos, la composición farmacéutica comprende un agente terapéutico que inhibe la interacción de LFA-1 y un ICAM, que es un compuesto de Fórmula I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X o XI. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es adecuada para administración tópica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es adecuada para administración mediante inyección. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es adecuada para la administración adecuada para la administración como implante.

10 En otro aspecto, se proporcionan compuestos para su uso en los procedimientos descritos. Los compuestos que son útiles en los procedimientos incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, polipéptidos, péptidos, polímeros y moléculas pequeñas orgánicas. En otro ejemplo, el anticuerpo Raptiva se usa en una formulación ocular para tratar la retinopatía diabética.

Breve descripción de los dibujos

20 Las nuevas características de la invención se exponen, en particular, en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas con referencia a la siguiente descripción detallada que describe ejemplos ilustrativos, y los dibujos adjuntos, de los cuales:

La **figura 1** representa el rodamiento, adhesión y migración transendotelial de los leucocitos a causa de la interacción LFA-1: ICAM-1.

25 La **figura 2** representa la activación del antígeno de la interacción LFA-1: ICAM-1.

La **figura 3** representa la función de coestimulación de la interacción LFA-1: ICAM-1.

La **figura 4** representa antagonistas de molécula pequeña útiles en los procedimientos de identificación.

La **figura 5** representa el análisis SDS-PAGE del LFA - 1 reticulado con el compuesto 5.

30 La **figura 6** representa la unión del compuesto 2B e ICAM-1-Ig a las células 293 que expresan LFA-1 de tipo salvaje o LFA-1 que carece del dominio I.

La **figura 7** representa la competición antagonista por los compuestos 2A, 3, A-286982 y sICAM-1 en los ELISA de LFA-1 / ICAM-1 y LFA-1 / molécula pequeña.

La **figura 8** representa la correlación de los valores de CI_{50} de la competición antagonista en los ELISA de LFA-1/ICAM-1 y LFA - 1 / molécula pequeña.

35 La **figura 9** representa el efecto de los antagonistas sobre la unión del ligando en los ELISA de LFA-1 / ICAM-1 y LFA-1 / molécula pequeña.

La **figura 10** representa regresiones de Schild de sICAM-1 y antagonismo del compuesto 3.

40 La **figura 11** es una representación gráfica del efecto de un antagonista de LFA-1 directamente competidor de la invención sobre la liberación de citocinas inflamatorias, en mononucleocitos humanos (PBMC) estimulados con la enterotoxina B estafilocócica (SEB) en comparación con el efecto de la ciclosporina-A (CsA).

La **figura 12** es una representación gráfica de la distribución en el ojo mediante aplicación tópica de un antagonista de LFA-1 competidor directo marcado con ^{14}C de la invención a un punto de tiempo de 30 minutos y al punto de tiempo de 4 horas después de la administración, medido mediante la detección del radiomarcador.

45 Descripción detallada de la invención

I. Biología y enfermedad: Retinopatía diabética (RD) y el uso de antagonistas de LFA-1 en tratamientos para la RP.

50 La diabetes se describe a menudo como una enfermedad global que conduce a los efectos deletéreos observados en el cuerpo de un individuo que sufre esta enfermedad, que puede aumentar significativamente a medida que el individuo envejece. Las complicaciones oculares de la diabetes son una causa principal de pérdida visual y ceguera en todo el mundo.

55 Un efecto global es el desarrollo de alteraciones en la microvasculatura retiniana que conduce a pérdida de autorregulación microcapilar, una afección conocida como retinopatía diabética (RD).

La retinopatía diabética a menudo se divide en dos categorías para el manejo clínico de la enfermedad: estadio no proliferativo (o estadio basal) y, después, proliferativo.

60 La retinopatía diabética no proliferativa (RDNP) demuestra, al inicio, anomalías de la arquitectura microvascular normal caracterizada por la degeneración de los capilares de la retina, la formación de microaneurismas capilares saculares, capilares deficientes periciticos y oclusión capilar y obliteración capilar. Los mecanismos de acción incluyen inflamación vascular inducida por la diabetes que conduce a la oclusión de la luz vascular por leucocitos y plaquetas, seguido de la muerte eventual tanto de los periciticos como de las células endoteliales. La atracción y la adhesión de los leucocitos a la pared vascular por el proceso inflamatorio hacen que los leucocitos se adhieran temporalmente al endotelio (leucostasis), liberen factores citotóxicos y lesionen o maten a la célula endotelial. La

superficie endotelial dañada inicia la adherencia plaquetaria, la agregación, la formación de microtrombos, la oclusión vascular y la isquemia. Otra consecuencia de la lesión endotelial es la alteración de la barrera hematorretiniana (BHR) que causa una mayor permeabilidad vascular. Esto puede ponerse de manifiesto por la fuga de fluoresceína durante la angiografía con fluoresceína o espesamiento de la retina evaluado mediante tomografía de coherencia óptica (TCO). Las consecuencias de esta fuga pueden ser edema macular clínicamente significativo y depósito de lipoproteínas en la retina (exudados duros) que contribuyen al engrosamiento de la retina. A medida que el proceso continúa, las células ganglionares de la retina se pierden, lo que conduce a pérdida visual o ceguera. La autorregulación interrumpida y la disminución del flujo sanguíneo de la retina causados por los cambios en la vasculatura de las células endoteliales, la muerte de los pericitos y la obliteración capilar son marcadores de la progresión de la RD y conduce al desarrollo de la isquemia retiniana, que permite el desarrollo del estadio proliferativo más grave de la RD.

La RD proliferativa implica neovascularización o angiogénesis, inducida por la isquemia retiniana del disco u otras localizaciones de la retina. Esta nueva vasculatura puede causar hemorragia del humor vítreo y desprendimientos de retina del tejido fibroso contráctil acompañante.

En cualquier momento durante esta progresión de la retinopatía diabética se puede desarrollar edema macular o edema macular diabético (EMD), con un grave impacto sobre la función de la visión. La progresión de este trastorno asociado se predice mediante la fuga vascular retiniana y conduce al tratamiento de fotocoagulación con el fin de reducir el riesgo de pérdida de la visión. Dado que una gran proporción de pacientes con retinopatía diabética padecen este trastorno también, es un objetivo de intervención clínica relevante. Todas estas lesiones o daños degenerativos pueden conducir a deterioro o, incluso, a pérdida completa de la agudeza visual y ofrecen objetivos para la intervención terapéutica. Actualmente no existen opciones terapéuticas eficaces. La fotocoagulación con láser implica la administración de haces de láser a diversas áreas del ojo y se utiliza en el tratamiento de muchos trastornos relacionados con la neovascularización. La neovascularización, en particular, habitualmente se trata con dispersión o fotocoagulación panretiniana. Sin embargo, el tratamiento con láser puede causar puntos ciegos permanentes correspondientes a las áreas tratadas. El tratamiento con láser también puede causar hemorragia persistente o recurrente, aumentar el riesgo de desprendimiento de retina, o inducir neovascularización o fibrosis. Entre otras opciones de tratamiento para trastornos oculares se incluyen termoterapia, vitrectomía, terapia fotodinámica, radioterapia, cirugía, por ejemplo, eliminación del exceso de tejido ocular y similares. Sin embargo, en la mayoría de los casos, todas las opciones de tratamiento disponibles tienen un efecto terapéutico limitado, requieren procedimientos repetidos y costosos y/o están asociados con efectos secundarios peligrosos.

No se ha demostrado que el control hiperglucémico sea suficiente para detener esta progresión. Se han identificado varios procesos que contribuyen a la oclusión capilar de la retina y a la obliteración capilar en la RD, incluyendo microtrombosis, apoptosis y cambios proinflamatorios, que pueden ser puntos de intervención útiles para prevenir la progresión de la RD y/o invertir el daño ya producido. Además, un acontecimiento temprano en el inicio de la rotura de la BHR y la no perfusión capilar parece ser la adhesión de leucocitos a la vasculatura retiniana diabética.

Los leucocitos adherentes están temporalmente y espacialmente asociados con la lesión de las células endoteliales de la retina y la muerte en el plazo de una semana de diabetes experimental inducida por estreptozotocina en ratas. Se ha demostrado que la neutralización basada en anticuerpos de ICAM-1 y CD18 previene tanto la adhesión de leucocitos como la lesión de las células endoteliales de la retina y la muerte. (A. M. Jousen, T. Murata, A. Tsujikawa, B. Kirchof, S-E. Bursell, A. P. Adamis "Leukocyte-Mediated Endothelial Cell Injury and Death in the Diabetic Retina" (2001) A, J. Pathol. 158(1): 147-162.)

La inhibición de los acontecimientos de adhesión, la interrupción de los ciclos de respuesta proinflamatoria y la prevención de la formación de capilares acelulares en tejidos isquémicos, todos los cuales surgen en este estado patológico, pueden ser estrategias ventajosas para la terapia. Las interacciones entre el antígeno-1 asociado a la función linfocitaria (LFA-1)/la molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-1) participan en cada uno de estos acontecimientos moleculares. Por lo tanto, los antagonistas de LFA-1 de la invención pueden ser útiles en terapias contra uno o más de los síntomas patológicos observados en esta enfermedad.

Sin pretender limitar el mecanismo de acción, los procedimientos implican la inhibición del inicio y progresión de la retinopatía diabética (RD) inhibiendo la interacción entre LFA-1 e ICAM-1. LFA-1 e ICAM-1 son moléculas con dominios receptores extracelulares que están implicados en el proceso de adhesión, migración y proliferación de linfocitos/leucocitos, lo que da lugar a una cascada de respuestas inflamatorias. En ejemplos preferentes, tales procedimientos proporcionan efectos antiinflamatorios *In vitro* e *in vivo*, por ejemplo, como se describe con más detalle a continuación, y son útiles en el tratamiento de la RD.

La sangre humana contiene glóbulos blancos (leucocitos) que se clasifican además como neutrófilos, linfocitos (con subtipos B y T), monocitos, eosinófilos y basófilos. Varias de estas clases de leucocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y linfocitos están implicadas en trastornos inflamatorios. LFA-1 es una de un grupo de leucointegrinas que se expresan en la mayoría de los leucocitos y se considera que es la integrina linfoide que interacciona con una serie de ICAM como ligandos. La rotura de estas interacciones y, por lo tanto, la respuesta inmunitaria/inflamatoria, proporciona reducción de la inflamación, en particular, inflamación del ojo.

Por ejemplo, ICAM-1 (CD54) es un miembro de la familia de ICAM de receptores de adhesión (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, ICAM-4) en la superfamilia de las proteínas inmunoglobulinas y se expresa sobre leucocitos activados, fibroblastos dérmicos y células endoteliales. Normalmente se expresa en las células endoteliales que revisten la vasculatura y está regulado por aumento tras la exposición a citocinas tales como IL-1, LPS y TNF durante el inicio inmune/inflamatorio.

Las investigaciones llevadas a cabo durante la última década han ayudado a dilucidar los acontecimientos moleculares involucrados en el movimiento y la activación de las células en el sistema inmunológico, centrándose en las interacciones de activación célula a célula dentro de la cascada. La interacción de las moléculas de adhesión intercelular (ICAM) con las leucointegrinas desempeña un papel en el funcionamiento del sistema inmunológico. Los procesos inmunológicos, tales como la presentación de antígenos, la citotoxicidad mediada por leucocitos, la citotoxicidad mediada por células T y la migración transendotelial de leucocitos (diapedesis) pueden requerir adhesión celular mediada por ICAM que interaccionan con leucointegrinas.

Se ha demostrado que la interacción de ICAM-1 y LFA-1 (LFA-1 también se conoce como $\alpha_L\beta_2$ y CD11a/CD18) está implicada en los procesos de adhesión, migración transendotelial de leucocitos, migración a sitios de lesión y proliferación de linfocitos en el sitio diana activado, como se muestra en la figura 1. Por ejemplo, actualmente se cree que antes de la adhesión de leucocitos y la migración transendotelial, los componentes de la respuesta inflamatoria, la presencia de citocinas/quimiocinas activan las integrinas expresadas constitutivamente en los leucocitos. Las células endoteliales de los vasos sanguíneos también regulan por aumento la ICAM-1 en respuesta a la presencia de las mismas citocinas/quimiocinas. A medida que los leucocitos rodantes se aproximan a las células endoteliales activadas, su progreso se ralentiza primero por estos receptores ICAM-1 regulados por aumento. A esto le sigue una interacción ligando/receptor entre LFA-1 e ICAM-1, expresados en las superficies de las células endoteliales de los vasos sanguíneos, lo que impide que los linfocitos sigan rodando. A continuación, el linfocito se aplana y se produce transmigración. Este proceso es de importancia tanto en la transmigración de linfocitos a través del endotelio vascular como en el tráfico de los linfocitos desde la sangre periférica hasta los ganglios linfáticos. Sin embargo, en la retinopatía diabética (RD), como se ha tratado anteriormente, la leucostasia es el desencadenante inicial de la liberación del factor citotóxico, que daña y/o mata las células endoteliales en el área local. Este daño conduce a la filtración de los vasos y a inflamación, que continua y/o amplifica la respuesta perjudicial.

LFA-1 desempeña un papel en la creación y mantenimiento de la sinapsis inmunológica, que puede definirse como la estructura física de las superficies interactivas de las células T y las células presentadoras de antígeno (CPA), como se muestra en la figura 2. El LFA-1 estabiliza el acoplamiento de las células T con la CPA y, de este modo, conduce a la activación de las células T. La interacción de LFA-1 e ICAM-1 también parece proporcionar señales coestimulantes a las células T en reposo, como se muestra en la figura 3. La proliferación de células T CD4+ y la síntesis de citocinas están mediadas por esta interacción como parte de la respuesta inflamatoria.

Dado el papel que desempeña la interacción de ICAM-1 y LFA-1 en la respuesta inmunitaria/inflamatoria, es deseable modular estas interacciones para conseguir un resultado terapéutico deseado (por ejemplo, inhibición de la interacción en el caso de una respuesta inflamatoria hiperactiva). Asimismo, dado que LFA-1 tiene varios socios ligandos dentro de la familia de ICAM (ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3), que implican una serie de rutas de señalización, en algunas realizaciones de la invención es deseable modular estas interacciones selectivamente. En algunas realizaciones de la invención, se proporcionan agentes terapéuticos que interferirán con la asociación de LFA-1 con ICAM-1, ICAM-2 y/o ICAM-3 para modular de este modo las respectivas rutas de señalización para cada par de interacciones.

Los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento pueden modular uno o más componentes de las rutas descritas en el presente documento. Además de inhibir la interacción entre LFA-1 e ICAM-1, los procedimientos y composiciones también pueden intervenir tanto en porciones tanto anteriores como posteriores del proceso inflamatorio. Por ejemplo, la regulación por aumento de ICAM-1 o LFA-1 (activación) en las células endoteliales o los leucocitos, antes de la unión y la migración transendotelial puede modularse mediante los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento. La presente invención puede ser útil en la modulación de la expresión de citocinas o quimiocinas que activan ICAM-1 y LFA-1 en el curso del tráfico de los leucocitos, en la modulación del transporte de las citocinas o quimiocinas, en la prevención de la transmigración del leucocito detenido, en la modulación de la señalización a través de otros mecanismos que están implicados en la proliferación de leucocitos en el sitio de la lesión o inflamación.

La invención proporciona agentes terapéuticos que interfieren con la asociación de LFA-1 con ICAM-1, que pueden bloquear la adhesión, migración, proliferación y liberación de señales inflamatorias al tejido circundante por células del sistema inmunológico. En algunos ejemplos, los procedimientos de administración de un agente terapéutico que inhibe la interacción entre LFA-1 y un ICAM, en un ejemplo, el agente terapéutico se une a LFA-1 o se une a un ICAM. Más específicamente, la invención proporciona agentes terapéuticos que se unen a LFA-1 para inhibir la asociación de LFA-1 con ICAM-1, ICAM-2 y/o ICAM-3, actuando de este modo como antagonistas de LFA-1. En algunas realizaciones, el agente terapéutico proporcionado por la invención se une en el sitio de unión de alta afinidad en la subunidad α_L que se superpone al sitio de unión a ICAM-1, que es un antagonista directamente

competitivo de LFA-1. En algunas realizaciones, el agente terapéutico proporcionado por la invención inhibe la interacción entre LFA-1 e ICAM-1, pero no bloquea completamente el sitio de unión de alta afinidad en la subunidad α L que se superpone al sitio de unión a ICAM-1 y es un antagonista competitivo pero no directamente competitivo de LFA-1. En algunas realizaciones, el agente terapéutico proporcionado por la invención se une en un sitio fuera del sitio de unión de alta afinidad en la subunidad α L que se superpone al sitio de unión de ICAM-1 y es un antagonista alostérico. En algunas de las realizaciones, el agente terapéutico proporcionado es un antagonista alostérico y es un antagonista competitivo pero no directamente competitivo de LFA-1. En algunas realizaciones de la invención, los agentes terapéuticos son útiles en el tratamiento de la retinopatía diabética y trastornos asociados con dicha afección.

II. Compuestos útiles en el procedimiento

El término "alifático", tal como se utiliza en el presente documento, incluye hidrocarburos alifáticos tanto saturados como insaturados, de cadena lineal (no ramificados) o ramificada, que están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos funcionales. Como apreciará un experto en la materia, en el presente documento se pretende que "alifático" incluya restos alquilo, alquenilo, alquinilo. Por tanto, tal como se usa en el presente documento, el término "alquilo" incluye grupos alquilo lineales y ramificados. Una convención análoga se aplica a otros términos genéricos, tales como "alquenilo", "alquinilo".

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

Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo empleados contienen aproximadamente 1-20 átomos de carbono alifáticos. En algunos otros ejemplos, los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo empleados contienen aproximadamente 1-10 átomos de carbono alifáticos. En todavía otros ejemplos, los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo empleados contienen aproximadamente 1-8 átomos de carbono alifáticos. En todavía otros ejemplos, los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo empleados contienen aproximadamente 1-6 átomos de carbono alifáticos. En todavía otros ejemplos, los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo empleados contienen aproximadamente 1-4 átomos de carbono. Por tanto, entre los grupos alifáticos ilustrativos se incluyen, por ejemplo, restos metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, alilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, n-pentilo, sec-pentilo, isopentilo, terc-pentilo, n-hexilo, sec-hexilo, que, de nuevo, pueden llevar uno o más sustituyentes.

Entre los grupos alquenilo se incluyen, por ejemplo, etenilo, propenilo, butenilo. Entre los grupos alquinilo representativos se incluyen, etinilo, 2-propinilo.

La expresión "alquileo inferior", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una cadena de hidrocarburo que enlaza otros dos grupos, es decir, está unida a otro grupo en cada extremo, por ejemplo metileno, etileno, butileno. Tal sustituyente es, preferentemente, de 1 a 10 carbonos y, más preferentemente, de 1 a 5 carbonos. Dichos grupos pueden estar sustituidos, preferentemente, con un grupo amino, acetilamino (un grupo alquilcarbonilo inferior unido mediante un átomo de nitrógeno) o cicloalquilo inferior. Por esto último se entiende un anillo de hidrocarburo saturado, preferentemente con un total de 3 a 10 metilenos (incluidos los carbonos de unión), más preferentemente de 3 a 6.

El término "alicíclico", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a compuestos que combinan las propiedades de compuestos alifáticos y cíclicos e incluyen hidrocarburos alifáticos monocíclicos o policíclicos y compuestos de cicloalquilo con puentes, que están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos funcionales.

Como apreciará un experto en la materia, con "alicíclico" se pretende, en el presente documento, incluir restos cicloalquilo, cicloalquenilo y cicloalquinilo, que están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos funcionales.

Por lo tanto, entre los grupos alicíclicos ilustrativos se incluyen, por ejemplo, restos ciclopropilo, $-\text{CH}_2$ -ciclopropilo, ciclobutilo, $-\text{CH}_2$ -ciclobutilo, ciclopentilo, $-\text{CH}_2$ -ciclopentilo, ciclohexilo, $-\text{CH}_2$ -ciclohexeniletilo, ciclohexaniletilo, norbornilo que, de nuevo, pueden llevar uno o más sustituyentes.

El término "alcoxi" o "alquiloxi", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un resto molecular parental saturado o insaturado a través de un átomo de oxígeno. En ciertos ejemplos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-20 átomos de carbono alifáticos. En otros ciertos ejemplos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-10 átomos de carbono alifáticos. En todavía otros ejemplos, el grupo alquilo utilizado contiene aproximadamente 1-8 átomos de carbono alifáticos. En todavía otros ciertos ejemplos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-6 átomos de carbono alifáticos. En todavía otros ejemplos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-4 átomos de carbono alifáticos. Entre los ejemplos de alcoxi se incluyen metoxi, etoxi, isopropoxi, n-butoxi, i-butoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, neopentoxi, n-hexiloxi.

El término "alcoxi inferior", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un alquilo inferior como se ha

definido anteriormente que puede ser ramificado o no ramificado, como también se ha definido anteriormente y que está unido por un oxígeno a otro grupo (es decir, éteres alquílicos).

5 El término "tioalquilo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo saturado o insaturado (es decir, S-alqueno y S-alquino) unido al resto molecular principal a través de un átomo de azufre. En ciertos ejemplos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-20 átomos de carbono alifáticos. En otros ciertos ejemplos, el grupo alquilo utilizado contiene aproximadamente 1-8 átomos de carbono alifáticos. En todavía otros ejemplos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-6 átomos de carbono alifáticos. En todavía otros ejemplos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-4 átomos de carbono alifáticos. Entre los ejemplos de tioalquilo se incluyen, pero no se limitan a, metiltio, etiltio, propiltio, isopropiltio, n-butiltio.

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

20 El término "alquilamino" se refiere a un grupo que tiene la estructura $-NHR'$, en la que R' es alquilo, como se define en el presente documento. El término "aminoalquilo" se refiere a un grupo que tiene la estructura NH_2R' , en la que es como se define en el presente documento. En ciertos ejemplos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-20 átomos de carbono alifáticos. En otros ciertos ejemplos, el grupo alquilo utilizado contiene aproximadamente átomos de carbono alifáticos. En todavía otros ejemplos, el grupo alquilo utilizado contiene aproximadamente 1-6 átomos de carbono alifáticos. En todavía otros ejemplos, el grupo alquilo contiene aproximadamente 1-4 átomos de carbono alifáticos. Entre los ejemplos de alquilamino se incluyen metilamino.

25 Entre algunos ejemplos de sustituyentes de los restos alifáticos (y otros) descritos anteriormente de compuestos se incluyen, alifáticos; alicíclicos; heteroalifáticos; heterocíclicos; aromáticos; heteroaromáticos; arilo; heteroarilo; alquilarilo; heteroalquilarilo; alquilheteroarilo; heteroalquilheteroarilo; alcoxi; ariloxi; heteroalcoxi; heteroariloxi; alquiltio; ariltio; heteroalquiltio; R_x incluye, independientemente, alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heteroalquilarilo o heteroalquilheteroarilo, en el que cualquiera de los sustituyentes alifáticos, alicíclicos, heteroalifáticos, heterocíclicos, alquilarilo o alquilheteroarilo descritos anteriormente y en el presente documento pueden estar sustituidos o no sustituidos, ramificados o no ramificados, saturados o insaturados, y en el que cualquiera de los sustituyentes arilo o heteroarilo descritos anteriormente y en el presente documento pueden estar sustituidos o no sustituidos. Ejemplos adicionales de sustituyentes generalmente aplicables se ilustran mediante los ejemplos específicos mostrados en los ejemplos que se describen en el presente documento.

40 En general, la expresión "resto aromático", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un resto insaturado monocíclico o policíclico estable que tiene, preferentemente, de 3 a 14 átomos de carbono, cada uno de los cuales puede estar sustituido o no sustituido. En ciertos ejemplos, la expresión "resto aromático" se refiere a un anillo plano que tiene orbitales p perpendiculares al plano del anillo en cada átomo del anillo y que satisfacen la regla de Huckel, donde el número de electrones pi en el anillo es $(4n + 2)$, donde n es un número entero. Un resto monocíclico o policíclico insaturado que no satisface uno o todos estos criterios de aromaticidad se define en el presente documento como "no aromático" y está englobado en el término "alícíclico".

45 En general, la expresión "resto heteroaromático", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un resto insaturado monocíclico o policíclico estable que tiene, preferentemente, de 3 a 14 átomos de carbono, cada uno de los cuales puede estar sustituido o no sustituido; y que comprende al menos un heteroátomo seleccionado de O, S y N dentro del anillo en lugar de un átomo de carbono del anillo). En ciertos ejemplos, la expresión "resto heteroaromático" se refiere a un anillo plano que comprende al menos un heteroátomo, que tiene orbitales p perpendiculares al plano del anillo en cada átomo del anillo y que satisfacen la regla de Huckel, donde el número de electrones pi en el anillo es $(4n + 2)$, donde n es un número entero.

50 También se apreciará que los restos aromáticos y heteroaromáticos, como se definen en el presente documento, pueden estar unidos por medio de un resto alquilo o heteroalquilo y, por lo tanto, también incluyen restos - (alquil)aromáticos, -(heteroalquil)aromáticos, -(heteroalquil)heteroaromáticos y -(heteroalquil)heteroaromáticos. Por lo tanto, tal como se usa en el presente documento, las expresiones "restos aromáticos o heteroaromáticos" y "(heteroalquil)aromáticos, (heteroalquil)heteroaromáticos y (heteroalquil)heteroaromáticos" son intercambiables. Los sustituyentes incluyen cualquiera de los sustituyentes mencionados anteriormente, por ejemplo, los sustituyentes citados para los restos alifáticos, o para otros restos como se divulga en el presente documento, lo que da como resultado la formación de un compuesto estable.

60 El término "arilo", tal como se utiliza en el presente documento, no difiere significativamente del significado común del término en la materia y se refiere a un resto cíclico insaturado que comprende al menos un anillo aromático. En ciertos ejemplos, "arilo" se refiere a un sistema de anillo carbocíclico monocíclico o bicíclico que tiene uno o dos anillos aromáticos incluyendo fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, indenilo.

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

Se apreciará que los grupos arilo y heteroarilo (incluyendo grupos arilo bicíclicos) pueden estar no sustituidos o sustituidos, en los que la sustitución incluye el reemplazo de uno o más de los átomos de hidrógeno de los mismos independientemente con uno o más de los siguientes restos que incluyen: alifático; alicíclico; heteroalifático; heterocíclico; aromático; heteroaromático; arilo; heteroarilo; alquilarilo; heteroalquilarilo; alquilheteroarilo; heteroalquilheteroarilo; alcoxi; ariloxi; heteroalcoxi; heteroariloxi; alquiltio; ariltio; heteroalquiltio; heteroariltio; F; Cl; Br; I; -OH; -NO₂ -CN; -CF₃; -CH₂CF₃; -CHCl₂; -CH₂OH; -CH₂CH₂OH; -CH₂NH₂; -CH₂SO₂CH₃; -C(=O)R_x; -C(=O)N(R_x)₂; -OC(=O)R_x; -OCO₂R_x; -OC(=O)N(R_x)₂; -N(R_x)₂; -S(O)₂R_x; -NR_x(CO)R_x en los que cada aparición de R_x Incluye, pero no se limita a, alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, aromático, heteroaromático, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heteroalquilarilo o heteroalquilheteroarilo en los que cualquiera de los sustituyentes alifáticos, alicíclicos, heteroalifáticos, heterocíclicos, alquilarilo o alquilheteroarilo descritos anteriormente y en el presente documento pueden estar sustituidos o no sustituidos, ramificados o no ramificados, saturados o insaturados, y en los que cualquiera de los sustituyentes aromáticos, heteroaromáticos, arilo, heteroarilo, -(alquil)arilo o (alquil)heteroarilo descritos anteriormente y en el presente documento pueden estar sustituidos o no sustituidos. Adicionalmente, se apreciará que cualquiera de dos grupos adyacentes tomados juntos pueden representar un resto alicíclico o heterocíclico sustituido o no sustituido de 4, 5, 6, o 7 miembros. Ejemplos adicionales de sustituyentes generalmente aplicables se ilustran mediante los ejemplos específicos mostrados en los ejemplos que se describen en el presente documento.

El término "cicloalquilo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere, específicamente, a grupos que tienen de tres a siete, preferentemente de tres a diez átomos de carbono. Los cicloalquilos adecuados incluyen, pero no se limitan a los mismos, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y similares, los cuales, como en el caso de los restos alifáticos; alicíclicos; heteroalifáticos o heterocíclicos, pueden, opcionalmente, estar sustituidos con sustituyentes que incluyen alifáticos, alicíclicos; heteroalifáticos; heterocíclicos; aromáticos; heteroaromáticos; arilo; heteroarilo; alquilarilo; heteroalquilarilo; alquilheteroarilo; heteroalquilheteroarilo; alcoxi; ariloxi; heteroalcoxi; heteroariloxi; alquiltio; ariltio; heteroalquiltio; heteroariltio; F; Cl; Br; I; -OH; -NO₂ -CN; -CF₃; -CH₂CF₃; -CHCl₂; -CH₂OH; -CH₂CH₂OH; -CH₂NH₂; -CH₂SO₂CH₃; -C(=O)R_x; -C(=O)N(R_x)₂; -OC(=O)R_x; -OCO₂R_x; -OC(=O)N(R_x)₂; -N(R_x)₂; -S(O)₂R_x; -NR_x(CO)R_x en los que cada aparición de R_x Incluye, pero no se limita a, alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, aromático, heteroaromático, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heteroalquilarilo o heteroalquilheteroarilo en los que cualquiera de los sustituyentes alifáticos, alicíclicos, heteroalifáticos, heterocíclicos, alquilarilo o alquilheteroarilo descritos anteriormente y en el presente documento pueden estar sustituidos o no sustituidos, ramificados o no ramificados, saturados o insaturados, y en los que cualquiera de los sustituyentes aromáticos, heteroaromáticos, arilo o heteroarilo descritos anteriormente y en el presente documento pueden estar sustituidos o no sustituidos. Ejemplos adicionales de sustituyentes generalmente aplicables se ilustran mediante los ejemplos específicos mostrados en los ejemplos que se describen en el presente documento.

El término "heteroalifático", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a restos alifáticos en los que uno o más átomos de carbono en la cadena principal han sido sustituidos con un heteroátomo. Por tanto, un grupo heteroalifático se refiere a una cadena alifática que contiene uno o más átomos de oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo o silicio, en lugar de átomos de carbono. Los restos heteroalifáticos pueden ser lineales o ramificados y saturados o insaturados. En ciertos ejemplos, los restos heteroalifáticos están sustituidos mediante el reemplazo independiente de uno o más de los átomos de hidrógeno de los mismos con uno o más restos, que incluyen alifáticos; alicíclicos; heteroalifáticos; heterocíclicos; aromáticos; heteroaromáticos; arilo; heteroarilo; alquilarilo; heteroalquilarilo; alquilheteroarilo; heteroalquilheteroarilo; alcoxi; ariloxi; heteroalcoxi; heteroariloxi; alquiltio; ariltio; heteroariltio; F; Cl; Br; I; -OH; -NO₂ -CN; -CF₃; -CH₂CF₃; -CHCl₂; -CH₂OH; -CH₂CH₂OH; -CH₂NH₂; -CH₂SO₂CH₃; -C(=O)R_x; -C(=O)N(R_x)₂; -OC(=O)R_x; -OCO₂R_x; -OC(=O)N(R_x)₂; -N(R_x)₂; -S(O)₂R_x; -NR_x(CO)R_x en los que cada aparición de R_x Incluye alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, aromático, heteroaromático, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heteroalquilarilo o heteroalquilheteroarilo en los que cualquiera de los sustituyentes alifáticos, alicíclicos, heteroalifáticos, heterocíclicos, alquilarilo o alquilheteroarilo descritos anteriormente y en el presente documento pueden estar sustituidos o no sustituidos, ramificados o no ramificados, saturados o insaturados, y en los que cualquiera de los sustituyentes aromáticos, heteroaromáticos, arilo o heteroarilo descritos anteriormente y en el presente documento pueden estar sustituidos o no sustituidos. Ejemplos adicionales de sustituyentes generalmente aplicables se ilustran mediante los ejemplos específicos mostrados en los ejemplos que se describen en el presente documento.

El término "heterocicloalquilo", "heterociclo" o "heterocíclico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que combinan las propiedades de compuestos heteroalifáticos y cíclicos e incluyen sistemas de anillos

cíclicos monocíclicos o policíclicos saturados e insaturados que tienen 5-16 átomos, en los que al menos un átomo de anillo es un heteroátomo seleccionado entre S y N (en los que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados), en los que los sistemas de anillo están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos funcionales, tal como se define en el presente documento. En ciertos ejemplos, el término "heterocicloalquilo", "heterociclo" o "heterocíclico" se refiere a un anillo no aromático de 5, 6 o 7 miembros o un grupo policíclico en el que al menos un heteroátomo del átomo del anillo seleccionado de S y N (en el que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados), incluyendo un grupo bicíclico o tricíclico, que comprende anillos condensados de seis miembros que tienen entre uno y tres heteroátomos seleccionados independientemente de oxígeno, azufre y nitrógeno, en los que (i) cada anillo de 5 miembros tiene de 0 a 2 enlaces dobles, cada anillo de 6 miembros tiene de 0 a 2 enlaces dobles y cada anillo de 7 miembros tiene de 0 a 3 enlaces dobles, (ii) los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar, opcionalmente, oxidados, (iii) el heteroátomo de nitrógeno puede estar cuaternizado opcionalmente, y (iv) cualquiera de los anillos heterocíclicos anteriores puede estar condensado a un anillo arilo o heteroarilo. Entre los heterociclos representativos se incluyen, pero no se limitan a, heterociclos, tales como furanilo, piranilo, pirrolilo, tienilo, pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, oxazolilo, oxazolidinilo, isooxazolilo, isoxazolidinilo, dioxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tetrazolilo, triazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, morfolinilo, tiazolilo, tiazolidinilo, isotiazolilo, isotiazolidinilo, ditiazolilo, ditiazolidinilo, tetrahidrofurilo, y derivados benzocondensados de los mismos. En ciertos ejemplos, un "grupo heterociclo o heterocicloalquilo o heterocíclico" se utiliza y, como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heterociclo o heterocicloalquilo o heterocíclico, como se ha definido anteriormente, sustituido mediante el reemplazo independiente de uno, dos o tres de los átomos de hidrógeno de los mismos con uno, alifáticos; alicíclicos; heteroalifáticos; heterocíclicos; aromáticos; heteroaromáticos; arilo; heteroarilo; alquilarilo; heteroalquilarilo; alquilheteroarilo; heteroalquilheteroarilo; alcoxi; ariloxi; heteroalcoxi; heteroariloxi; alquiltio; ariltio; heteroariltio; F; Cl; Br; I; -OH; -NO₂; -CN; -CF₃; -CH₂CF₃; -CHCl₂; -CH₂OH; -CH₂CH₂OH; -CH₂NH₂; -CH₂SO₂CH₃; -C(=O)R_x; -C(=O)N(R_x)₂; -OC(=O)R_x; -OCO₂R_x; -OC(=O)N(R_x)₂; -N(R_x)₂; -S(O)₂R_x; -NR_x(CO)R_x en los que cada aparición de R_x incluye alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, aromático, heteroaromático, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heteroalquilarilo o heteroalquilheteroarilo en los que cualquiera de los sustituyentes alifáticos, alicíclicos, heteroalifáticos, heterocíclicos, alquilarilo o alquilheteroarilo descritos anteriormente y en el presente documento pueden estar sustituidos o no sustituidos, ramificados o no ramificados, saturados o insaturados, y en los que cualquiera de los sustituyentes aromáticos, heteroaromáticos, arilo o heteroarilo descritos anteriormente y en el presente documento pueden estar sustituidos o no sustituidos. Adicionalmente, se apreciará que cualquiera de los restos alicíclicos o heterocíclicos descritos anteriormente y en el presente documento pueden comprender un resto arilo o heteroarilo condensado a los mismos.

Los términos "halo" y "halógeno", usados en el presente documento, se refieren a un átomo seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo.

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

El término "amino", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una amina primaria (-NH₂), secundaria (-NHR_x), terciaria (-NR_xR_y) o cuaternaria (-N⁺R_xR_yR_z), donde R_y Y R_z son, independientemente, un resto alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, aromático o heteroaromático, tal como se define en el presente documento. Entre los ejemplos de grupos amino se incluyen, metilamino, dimetilamino, etilamino, dietilamino, dietilaminocarbonilo, isopropilamino, piperidino, trimetilamino y propilamino.

El término "acilo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo que tiene la fórmula -C(=O)R, en la que R es un resto alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, aromático o heteroaromático, tal como se define en el presente documento.

El término "sulfonamido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo de la fórmula general -SO₂NR_xR_y, en la que R_x y R_y son, independientemente, hidrógeno, o un resto alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, aromático, heteroaromático o acilo, como se define en el presente documento.

El término "benzamido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo de la fórmula general PhNR_x, en la que es hidrógeno, o un resto alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, aromático, heteroaromático o acilo, como se define en el presente documento.

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

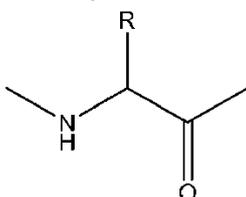
El término "alquilideno C₂₋₆", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical divalente insaturado, lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, que consiste únicamente en átomos de carbono e hidrógeno, que tiene de dos a seis átomos de carbono, que tiene una valencia "-" libre en ambos extremos del radical y en el que la insaturación está presente solo como enlaces dobles y en el que puede existir un doble enlace entre el primer

carbono de la cadena y el resto de la molécula.

Como se usa en el presente documento, los términos "alifático", "heteroalifático", "alquilo", "alqueno", "alquino", "heteroalquilo", "heteroalqueno", "heteroalquino" incluyen grupos sustituidos y no sustituidos, saturados e insaturados y lineales y ramificados. De forma similar, los términos "alíclico", "heterocíclico", "heterocicloalquilo", "heterociclo" abarcan grupos sustituidos y no sustituidos y saturados e insaturados. Además, los términos "cicloalquilo", "cicloalqueno", "cicloalquino", "heterocicloalquilo", "heterocicloalqueno", "heterocicloalquino", "aromático", "heteroaromático", "arilo", "heteroarilo" abarcan grupos tanto sustituidos como no sustituidos.

La expresión "aminoácido natural", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a uno cualquiera de los L-aminoácidos comunes que se encuentran de forma natural en las proteínas naturales: glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu) Isoleucina (Ile), lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), triptófano (Trp). ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), glutamina (Gln), cisteína (Cys) y metionina (Met).

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



en la que la cadena lateral R es distinta de las cadenas laterales de aminoácidos que se producen en la naturaleza.

Más generalmente, el término "aminoácido", tal como se usa en el presente documento, abarca aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales.

El término bioisómeros, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere generalmente a dos o más compuestos o fracciones que poseen formas moleculares y/o volúmenes similares. En ciertos ejemplos, los bioisómeros tienen aproximadamente la misma distribución de electrones. En algunos otros ejemplos, los bioisómeros exhiben propiedades biológicas similares. En ejemplos preferidos, los bioisómeros poseen formas y volúmenes moleculares similares; tienen aproximadamente la misma distribución de electrones; y exhiben propiedades biológicas similares.

La expresión "derivado farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, designa cualquier sal, éster o sal de dicho éster farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto o cualquier otro aducto o derivado que, tras la administración a un sujeto, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto como se describe de otro modo en el presente documento, o un metabolito o residuo de los mismos. Por tanto, entre los derivados farmacéuticamente aceptables se incluyen, entre otros, profármacos. Un profármaco es un derivado de un compuesto, habitualmente con actividad farmacológica significativamente reducida, que contiene un resto adicional, que es susceptible de eliminación in vivo, de modo que producen la molécula parental como especie farmacológicamente activa. Un ejemplo de un profármaco es un éster, que se escinde in vivo para producir un compuesto de interés. Se conocen y pueden adaptarse profármacos de diversos compuestos, y materiales y procedimientos para derivar los compuestos parentales para crear los profármacos. Ciertas composiciones farmacéuticas de ejemplo y derivados farmacéuticamente aceptables se tratarán con más detalle a continuación.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales que son adecuadas para uso farmacéutico, preferentemente para su uso en los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin irritación indebida como respuesta alérgica. En la técnica se conocen bien sales farmacéuticamente aceptables de aminas, ácidos carboxílicos y otros tipos de compuestos. Por ejemplo, S. M. Berge, et al. describen sales farmacéuticamente aceptables con detalle en J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977). Las sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos de la invención o por separado haciendo reaccionar una función de base libre o de ácido libre con un ácido adecuado, como se describe generalmente a continuación. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar una función de base libre con un ácido adecuado. Además, cuando los compuestos portan un resto ácido, sus sales farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden incluir sales metálicas, tales como sales de metales alcalinos, por ejemplo sales de sodio o potasio; y sales de metales alcalinotérreos, por ejemplo, sales de calcio o de magnesio. Ejemplos de sales de adición de ácido no tóxicas farmacéuticamente aceptables son sales de un grupo amino formado con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico, o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico, o usando otros procedimientos usados en la técnica, tal como intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen adipato, alginato, ascorbato, aspartato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, formiato, fumarato,

- glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hernisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroyoduro 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, undecanoato, sales de valerato.
- 5 Sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen, cuando sea adecuado, cationes de amonio, de amonio cuaternario y de amina no tóxicos formados usando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato y sulfonato de arilo.
- 10 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "éster farmacéuticamente aceptable" se refiere a ésteres que se hidrolizan *in vivo* e incluyen aquellos que se rompen fácilmente en el cuerpo humano para dejar el compuesto original o una sal del mismo. Los grupos éster adecuados incluyen, por ejemplo, los derivados de compuestos de alcohol alifático farmacéuticamente aceptables, particularmente alcanos, alquenos, etilenglicol, cicloalcanos, en los que cada resto alquilo o alqueno tiene, ventajosamente, no más de 6 átomos de carbono. Estos son solo ejemplos
- 15 y no limitan en modo alguno las posibilidades de ésteres conocidos en la materia.

- Tal como se usa en el presente documento, la expresión "profármacos farmacéuticamente aceptables" se refiere a los profármacos de los compuestos que son adecuados para uso farmacéutico, preferentemente para su uso con los tejidos de seres humanos y animales inferiores con toxicidad, irritación, respuesta alérgica indebidas y similares, y eficaces para su uso previsto, así como las formas zwitteriónicas, cuando sea posible, de los compuestos de la invención. El término "profármaco" se refiere a compuestos que rápidamente se transforman *in vivo* para dar el compuesto parental de la fórmula anterior mediante, por ejemplo, hidrólisis en sangre. En T. Higuchi y V. Stella, *Pro-drugs as Novel Delivery Systems*, Vol. 14 de la serie A. C. S. Symposium Series y en Edward B. Roche, ed., *Bioreversible Carriers in Drug Design*, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987 se proporciona una discusión exhaustiva.
- 20
- 25

C. Compuestos útiles en la invención que son antagonistas competitivos directos o antagonistas alostéricos de la interacción de LFA-1 con ICAM-1.

- 30 Los antagonistas que son antagonistas directamente competidores de la interacción de LFA-1 con ICAM-1, en un sitio de unión de alta afinidad en la subunidad α L de LFA-1 que se superpone al sitio de unión a ICAM-1, pueden identificarse, por ejemplo, mediante la realización de experimentos de unión competitiva, como se describe S.M. Keating, K.R. Clark, L. D. Stepanich, F. Arellano, C. P. Edwards, S.C. Bodary, S. A. Spencer, T. R. Gadek, J. C. Marsters Jr., M. H. Beresini, "Competition between intercellular adhesion molecule-1 and a small molecule antagonist for a common binding site on the α 1 subunit of lymphocyte function-associated antigen-1." (2006) *Protein Science*, 15:290-303. Se ha demostrado que este sitio de alta afinidad sobre LFA-1 que se superpone con el sitio de unión de ICAM-1 incluye el motivo MIDAS del dominio I en la subunidad α L de LFA-1. El antagonismo alostérico, que puede ser competitivo pero no directamente competitivo, también puede identificarse usando este diseño experimental.
- 35
- 40

1. Identificación del sitio de unión de antagonistas directamente competitivos de la interacción LFA-1: ICAM.

a. Reticulación del Compuesto 5 a la subunidad α L de LFA-1.

- 45 El sitio de unión de los antagonistas de molécula pequeña de esta clase se identificó uniendo el compuesto 5, un análogo fotoactivable marcado con tritio del compuesto 3, a LFA-1 y, después, mediante fotorreticulación (Figura 4). Para maximizar la reticulación específica de alta afinidad, fue necesario filtrar con gel las muestras para eliminar el compuesto 5 no unido o unido débilmente antes de la irradiación (Figura 5, calles e frente a f y g frente a h). En ausencia de filtración en gel, se produjo una reticulación significativa del compuesto 5 a la subunidad α , la subunidad β y el heterodímero (la banda a aproximadamente 200.000) de LFA-1, mientras que no se observó reticulación inespecífica en las muestras filtradas en gel (datos no mostrados). En condiciones de filtración en gel, el compuesto 5 se reticuló específicamente solo a la subunidad α L (Figura 5, calles c y g). Además, la presencia del compuesto 3 durante la incubación redujo sustancialmente la incorporación de tritio en la subunidad α L (Figura 5, calle e frente a g). De manera similar, en presencia del compuesto 3, se produjo una ligera reducción de la incorporación de tritio en la subunidad α L, la subunidad β 2 y heterodímero en ausencia de filtración en gel (Figura 5, calle f frente a h). No se produjo reticulación del compuesto 5 cuando se usaron muestras filtradas en gel de las subunidades α L o β 2 aisladas, estructuralmente intactas (datos no mostrados). Por lo tanto, el sitio de unión de alta afinidad necesario para reticular después de la filtración en gel es proporcionado por el heterodímero de LFA-1 intacto.
- 50
- 55
- 60 El sitio de reticulación se definió adicionalmente fragmentando la subunidad α L marcada por afinidad con hidroxilamina, separando electroforéticamente los fragmentos y realizando, a continuación, la secuenciación N-terminal en los fragmentos radiomarcados para determinar sus ubicaciones dentro de la secuencia de la proteína. Se identificaron dos secuencias, comenzando la primera con el residuo 1 (secuencia encontrada: YNLDVARGARSFS (SEQ ID NO 1)) y la segunda con el residuo 30 (secuencia encontrada: GVIVGAPGEGNST (SEQ ID NO 2)). Ambos péptidos tenían aproximadamente 500 aminoácidos de longitud, como se juzgó por sus tamaños en SDS-PAGE (50 - 60 kDa); este tamaño de fragmento es consistente con los dos sitios de escisión previstos siguientes (N-G) para
- 65

hidroxilamina, N507 y N530. No se incorporó ningún marcador en la mitad C-terminal de la subunidad.

b. Falta de unión del compuesto 2B a LFA-1 que carece del dominio I.

5 El papel del dominio I en la unión del compuesto 2B y análogos relacionados con LFA-1 se demostró mediante la preparación de una construcción de la subunidad α L que carece del dominio I. La construcción β 2 sola (simulada) junto con la construcción que carece del dominio I o α L salvaje se transfeció en células 293 y se examinó la unión del compuesto 2B a las células transfectadas (Figura 6). El compuesto 2B mostró una unión sustancial a las células transfectadas con α L de tipo salvaje, pero no demostró ninguna unión significativa a las células transfectadas con α L que carecían del dominio I con respecto a la unión a células transfectadas simuladas (β 2). Los transfectantes también se analizaron en cuanto a su capacidad para adherirse a ICAM-1-Ig, y como era de esperar, las células transfectadas con LFA-1 que carecían del dominio I y los transfectantes simulados mostraron niveles de unión de fondo indistinguibles, mientras que las células transfectadas con α L de tipo salvaje mostraron una adherencia sólida (Figura 6B). La evaluación de la unión de un panel de anticuerpos frente a LFA-1 a las células transfectadas indicó que, aparte de la pérdida de unión por anticuerpos en el dominio I, el heterodímero de LFA-1 parecía estar intacto en las células transfectadas que carecían del dominio I de α L (datos no mostrados).

Los datos apoyan la conclusión de que el compuesto 3 y moléculas relacionadas se unen a un sitio de alta afinidad sobre LFA-1 que se solapa con el sitio de unión de ICAM-1 que previamente se ha demostrado que incluye el motivo MIDAS del dominio I en la subunidad α L de LFA-1.

En el efecto común de la delección del dominio I sobre la unión tanto de ICAM-1-Ig como del compuesto 2B puede observarse evidencia que corrobora la estrecha proximidad de los sitios de unión del antagonista de ICAM-1 y de molécula pequeña a LFA-1. Tanto el compuesto 2B como ICAM-1 no pudieron unirse al LFA-1 carente del dominio I, el dominio en el que se encuentra el sitio de unión de ICAM-1. Además, la capacidad de A-286982 para modificar alostéricamente la unión tanto de ICAM-1-Ig como del compuesto 2B es consistente con una estrecha proximidad de sus sitios de unión al sitio de unión A-286982 en el motivo IDAS en el dominio I de la subunidad α de LFA-1. La reticulación fotoquímica selectiva del compuesto 5 a la cadena α de LFA-1 localiza su sitio de unión dentro de los residuos 30 - 507 de esta subunidad. Todos los hallazgos indicados anteriormente son consistentes con un único sitio de unión a moléculas pequeñas de alta afinidad localizado en el dominio I de la cadena α de LFA-1.

Un examen cuidadoso del estudio de reticulación fotoquímica realizado con una concentración relativamente alta del compuesto 5 (4,1 μ M, Figura 5) proporciona evidencia directa de un sitio adicional de unión a moléculas pequeñas de baja afinidad en LFA-1. Se observan patrones de proteína y reticulación muy diferentes en presencia y ausencia de filtración en gel. Cuando las muestras se filtran en gel para eliminar las moléculas no unidas y unidas débilmente antes de la irradiación, solo se observa un marcaje de alta afinidad de la subunidad α . Sin embargo, en ausencia de la etapa de filtración en gel, la irradiación del complejo del compuesto 5 con LFA-1 da como resultado una reticulación de alta intensidad a la subunidad α y una reticulación de menor intensidad a un sitio de unión de baja afinidad en la subunidad β , cuyo complejo con el compuesto 5 es demasiado débil para sobrevivir a la filtración en gel. En ambas condiciones, la reticulación observada es parcialmente inhibida por un gran exceso (290 μ M) del compuesto 3 (Figura 5, calles e y g, f y h), lo que demuestra la naturaleza específica de la unión a ambos sitios. Los intentos de reticular el compuesto 5 a cualquiera de las subunidades α o β aisladas no proporcionaron complejos de alta afinidad capaces de sobrevivir al proceso de filtración en gel. En consecuencia, parece que la unión competitiva de alta afinidad de la clase de compuestos representada por el compuesto 3 requiere la presencia de un heterodímero de LFA-1 de longitud completa intacto. Los intentos de capturar este sitio de unión en construcciones de las subunidades LFA-1 o del dominio I aislado dan como resultado una afinidad disminuida de LFA-1 por ICAM-1 y análogos de molécula pequeña del compuesto 3 (por ejemplo, XVA143). Es particularmente interesante destacar la presencia de una banda menor del heterodímero de LFA-1 que aparece en ausencia de filtración en gel (Figura 5, banda a > 200.000 dalton.) La intensidad de la banda de LFA-1 según se juzga mediante tinción con azul de Coomassie y con autorradiografía es consistente con la unión de baja afinidad a un segundo sitio en la cadena β que estabiliza el heterodímero.

El sitio de unión responsable de la estabilización de LFA-1 a SDS-PAGE puede residir en el dominio similar a I de la subunidad β . Como se muestra anteriormente, este sitio de unión de la subunidad β no está relacionado con el sitio de unión de alta afinidad en la subunidad α que es responsable de la inhibición competitiva directa de la unión de ICAM-1. Sin embargo, el sitio de unión de la subunidad β responsable de la estabilización del LFA-1 por el compuesto 3 puede ser el mismo que el sitio de reticulación de la subunidad β de baja afinidad.

Existen dos sitios de unión distintos para la clase de sondas antagonistas de molécula pequeña de LFA-1 utilizadas en el presente documento. El primero es un sitio de unión de alta afinidad en la subunidad α L de LFA-1 a través del cual la molécula pequeña y LFA-1 forman un complejo que es lo suficientemente estable (por ejemplo, $K_d < 25$ nM) para sobrevivir al proceso de filtración en gel. Es este sitio de unión de molécula pequeña que se ha caracterizado en los experimentos de unión indicados en el presente documento descritos como solapante del sitio de unión de ICAM-1 y que se correlaciona con: la potente inhibición de la unión de LFA-1/ICAM-1 por los compuestos 3 y 4 (CI_{50} del compuesto 4 = 1,4 nM); su potente inhibición de la proliferación de linfocitos inducida por LFA-1 (CI_{50} del compuesto CI_{50} = 3 nM) *In vitro*; y su inhibición de la respuesta del sistema inmunológico *in vivo*. El segundo sitio es

un sitio de unión de afinidad menor (por ejemplo, $K_d > 1 \mu\text{M}$) en la subunidad β que está implicado en la estabilización del heterodímero de LFA-1 en SDS-PAGE. Este sitio es más dinámico por naturaleza (es decir, velocidad de disociación más rápida) y no sobrevive al proceso de filtración en gel/fotólisis. Las características de este segundo sitio de baja afinidad son consistentes con las de un sitio de unión al antagonista alostérico α/β de tipo I en el dominio similar a I de la subunidad β . La unión de baja afinidad de los miméticos de ICAM-1 descritos en el presente documento a la subunidad β de LFA-1, presumiblemente al dominio de tipo I, es, probablemente, debida a la homología de secuencia entre los dominios I y de tipo I, particularmente con respecto a las similitudes en los motivos MIDAS y sus afinidades por el resto de ácido carboxílico común a esta clase de antagonistas. Dado que la familia $\beta 2$ de las integrinas, incluyendo MAC-1, comparte esta subunidad, la afinidad de los compuestos para el dominio de tipo I en la subunidad $\beta 2$ debe atenuarse para seleccionar antagonistas que son específicos de LFA-1.

Los experimentos descritos anteriormente justifican la unión de alta afinidad de los compuestos 3 y 4 a LFA-1 de una manera similar a la de ICAM-1, en un sitio que se superpone al sitio de unión de ICAM-1 que implica el motivo MIDAS dentro del dominio I de la subunidad α de LFA-1. Esto es consistente con su mimetismo propuesto del epítipo de ICAM-1 e inconsistente con cualquier conclusión de que funcionan como antagonistas alostéricos α/β de tipo I de LFA-1/ICAM-1. La unión de estos miméticos de ICAM-1 a la subunidad $\beta 2$ de la integrina, aunque con menor afinidad, plantea la cuestión de si la propia ICAM-1 se une a un segundo sitio en el dominio de tipo I como parte de un mecanismo de retroalimentación.

Anteriormente se ha demostrado que las moléculas pequeñas pueden unirse con alta afinidad a la subunidad α -L, que es única para LFA-1. En consecuencia, estos compuestos pueden ser selectivos para LFA-1 ($\alpha\text{L}\beta 2$) sobre Mac-1 ($\alpha\text{M}\beta 2$). Se prefiere utilizar inhibidores selectivos de LFA-1, que pueden conferir ventajas en cuanto a seguridad terapéutica.

2. Experimentos de unión competitiva.

a. Competición antagonista en el ELIS de LFA-1/ICAM-1 y LFA-1/Molécula pequeña.

Los compuestos 2A y 3, A-286982 y sICAM-1 se usaron para ilustrar la inhibición competitiva de la unión de ICAM-1-Ig a LFA-1, mediante titulación en el ELISA de LFA-1/ICAM-1. El formato y los resultados de esta forma del ensayo de LFA-1/ICAM-1 son más sólidos debido a la captura de anticuerpos del LFA-1 en lugar del recubrimiento directo sobre la placa de ELISA. El experimento se realizó mediante la adición de diluciones en serie a 1/5 del compuesto 3 ($-\lambda-$), el compuesto 2A ($-\textcircled{\oplus}-$), A-286982 ($-\blacklozenge-$) y sICAM-1 ($-\textcircled{\ominus}-$) seguido de incubación con ICAM-1-Ig (A) o el compuesto 2B (B) en placas que contenían LFA-1 capturado. Los datos mostrados son el promedio de dos placas de un solo experimento y son representativos de varias mediciones independientes. Las líneas continuas son los ajustes de los datos. Los valores de CI_{50} (nM) se proporcionan en las leyendas.

Las curvas de competición típicas para estos inhibidores en el ELISA se muestran en la Figura 7A. Compuesto 3 inhibió potentemente la unión de ICAM-1-Ig a LFA-1 con una CI_{50} de 2 nM. El compuesto 2A, un análogo del compuesto 3, inhibió la unión pero con un valor de CI_{50} aproximadamente 10 veces superior. A-286982 e sICAM-1 inhibieron la unión de ICAM-1-Ig a LFA-1 pero con valores de CI_{50} que eran más de 100 veces los del compuesto 3.

También se demostró la capacidad de estos mismos compuestos para inhibir la unión de un antagonista de molécula pequeña marcado con FITC, el compuesto 2B, a LFA-1 (Fig. 7B). Las potencias de los compuestos 2A y 3 y la ICAM-1 soluble como inhibidores de la unión del compuesto 2B coincidían con sus potencias como inhibidores de la unión de ICAM-1-Ig. El compuesto 3, el compuesto 2A y sICAM-1 inhibieron la unión del compuesto 2B a LFA-1 con valores de CI_{50} de 3, 56 y 1200 nM, respectivamente. A-286982 no inhibió sino que potenció la unión del compuesto 2B a LFA-1, como indica el aumento transitorio de los valores de absorbancia, alcanzando un efecto máximo a aproximadamente 4 μM antes de disminuir.

La evaluación de los valores de CI_{50} en los ELISA de LFA-1/molécula pequeña y LFA-1/ICAM-1 se extendió a un conjunto más amplio de compuestos que incluían un grupo de péptidos derivados de kistrina y pequeñas moléculas que representaban la evolución de esta clase de antagonistas de molécula pequeña de LFA-1. Como se muestra en la Figura 8 (correlación de los valores de CI_{50} de la competencia antagonista en los ELISA de y LFA-1: ICAM-1 y LFA-1: moléculas pequeñas. Los valores de CI_{50} de un grupo diverso de compuestos (4 péptidos, 5 moléculas pequeñas y sICAM-1) en competencia con el compuesto 2B se representan frente a los valores de CI_{50} determinados en competición con ICAM-1-Ig para la unión a LFA-1. La pendiente del gráfico es 0,964, la intersección y, 0,237 y $R = 0,940$. Cada punto de datos es el promedio de los valores de CI_{50} de dos placas), hay una buena correlación ($R = 0,94$) entre los valores de CI_{50} para la competición en cada uno de los dos ensayos de unión al ligando para este conjunto diverso de compuestos, incluyendo sICAM-1, los compuestos 2A y 3, a través de cinco unidades logarítmicas de potencia. La tendencia común en las potencias entre los dos ELISA de competición antagonista con ICAM-1-Ig y el compuesto 2B como ligandos revela que cada compuesto altera la unión tanto de ICAM-1 como de ligandos de molécula pequeña de una manera similar mecánicamente. Este paralelismo en la potencia de inhibición demuestra que ICAM-1-Ig y el compuesto 2B se unen al mismo sitio en LFA-1. Por lo tanto, los compuestos de la invención son antagonistas competitivos de LFA-1

b. Modulación antagonista en la unión al ligando en los ELISA de LFA-1/ICAM-1 y LFA-1/Molécula pequeña.

Un antagonista, que inhibe a través de la competencia directa con el ligando de interés, exhibe un desplazamiento hacia la derecha no saturable de las curvas de unión al ligando a valores de CE_{50} aparentes más altos con una concentración antagonista creciente y ninguna reducción en la unión máxima del ligando. La inhibición será superable pero requerirá cantidades crecientes de ligando en presencia de concentraciones crecientes de un inhibidor competitivo directo. Los efectos del compuesto 3 directamente competitivo, un antagonista alostérico A-286982 y sICAM-1 en las curvas de unión de ICAM-1-Ig y el compuesto 2B a LFA-1 se muestran en la Figura 9 como ejemplos de antagonistas que muestran competencia directa. Titulación de ICAM-1-Ig (A, C, E) o el compuesto 2B (B, D, F) en ausencia (-◇-) o presencia de antagonista en los ELISA de LFA-1/ICAM-1 y LFA-1/molécula pequeña. Los antagonistas se añadieron en diluciones de dos veces a partir de 2,4 (A) y 2,7 (B) μM de sICAM-1, 0,040 (C) y 0,10 (D) μM del compuesto 3 y 20 (E) y 50 (F) μM de A-286982. El orden de las concentraciones de los antagonistas fue s, -□- (concentración de antagonista más baja), -△-, -④-, -◆-, -■-, -⑩- a -λ- (concentración de antagonista más alta). Los ajustes de los datos se muestran como líneas continuas. Los datos mostrados son de una placa y son representativos de un mínimo de dos experimentos. (Obsérvese que A-286982 (F) dio como resultado un aumento de la unión del compuesto 2B a LFA-1.) Por el contrario, un inhibidor alostérico puede alterar las curvas de unión al ligando, provocando una reducción de la unión máxima o saturación en los desplazamientos hacia la derecha de las curvas. Como se muestra en la Figura 9A, la presencia de concentraciones crecientes de sICAM-1 desplazó claramente las curvas de unión de ICAM-1-Ig hacia la derecha a valores de CE_{50} más altos. Además, se observó la misma extensión máxima de la unión de ICAM-1-Ig a LFA-1 en presencia y ausencia de sICAM-1, como cabe esperar cuando dos formas moleculares del mismo ligando natural compiten directamente por la unión a un sitio en un receptor. De forma similar, las concentraciones crecientes del compuesto 3 también desplazaron la unión de ICAM-1-Ig a valores de CE_{50} más altos con variación mínima en la unión máxima de ICAM-1-Ig (Figura 9C). Aunque los desplazamientos hacia la derecha en las curvas de unión al ligando en presencia de un antagonista competitivo son típicamente paralelos, esto no es siempre el caso. Las pendientes no paralelas para las curvas de unión a LFA-1/ICAM-1-Ig en presencia y ausencia del compuesto 3 pueden deberse a una incapacidad para alcanzar un equilibrio completo en las condiciones heterogéneas del ELISA de unión a ligando con este compuesto. En el formato de LFA-1/compuesto 2B del ELISA de unión al ligando, las concentraciones crecientes del compuesto 3 también desplazaron claramente las curvas de unión del compuesto 2B a valores de CE_{50} más altos sin reducción de la unión máxima (Figura 9D). Las concentraciones crecientes de sICAM-1 también mostraron un efecto similar (Figura 9B), aunque la extensión del desplazamiento en las curvas estaba limitado por la concentración máxima alcanzable de sICAM-1 a 2,7 μM . Por lo tanto, los efectos tanto de sICAM-1 como del compuesto 3 sobre la unión de ICAM-1-Ig y el compuesto 2B a LFA-1 son característicos de la competencia directa, como se ha descrito anteriormente.

El efecto de A-286982 sobre la unión de ICAM-1-Ig y el compuesto 2B al receptor fue claramente diferente (Figuras 9E y 9F). En el ELISA de LFA-1/ICAM-1, las curvas de ICAM-1-Ig se desplazaron hacia la derecha hasta valores de CE_{50} más altos; sin embargo, la unión máxima de ICAM-1-Ig a LFA-1 disminuyó considerablemente con concentraciones crecientes de A-286982. La reducción en la unión máxima y el desplazamiento hacia la derecha de las curvas de unión al ligando con una concentración de A-286982 creciente son reflejo de la inhibición alostérica como se ha descrito anteriormente. A-286982 provoca reducciones en la afinidad del ligando y la capacidad de unión; esto demuestra que A-286982 es un antagonista insalvable de la unión de ICAM-1-Ig. Por el contrario, en el ELISA de LFA/molécula pequeña, la presencia de A-286982 a concentraciones micromolares desplazó las curvas de unión del compuesto 2B a valores de CE_{50} inferiores y parecía mejorar la unión del compuesto 2B a LFA-1 (Figura 9F). Los efectos que contrastan A-286982 sobre la unión de compuesto 2B e ICAM-1-Ig pueden deberse al efecto alostérico conocido de la unión del compuesto al sitio IDAS sobre LFA-1. Los datos de unión de A-286982 sirven como ilustración de la inhibición alostérica para la unión del ligando de molécula pequeña y de proteína a LFA-1 en los experimentos de unión demostrados en este procedimiento.

También se puede utilizar el análisis de Schild para investigar si un compuesto inhibe la unión del ligando a través de la competición directa por un solo sitio de unión. Este modelo se basa en las suposiciones de que las respuestas equiactivas en un ensayo son el resultado de la ocupación equivalente del receptor por el ligando y que la unión máxima no se modifica por la presencia de un antagonista. En un análisis de Schild, la relación de la dosis es la relación de los valores de CE_{50} en presencia y ausencia de antagonista y es una medida de las concentraciones del ligando que conducen a respuestas equiactivas. Esta relación de dosis se determinó para cada concentración de antagonista y las regresiones de Schild se representaron como se muestra en la Figura 10. Una respuesta lineal con una pendiente de 1 en una regresión de Schild indica que la inhibición por un antagonista es directamente competitiva y reversible. El análisis de Schild produciría una relación no lineal y/o una pendiente que se desvía significativamente de 1 en el caso de un inhibidor alostérico que no da como resultado una reducción de la unión máxima. Las regresiones de Schild tanto para sICAM-1 como para el compuesto 3 se muestran en la Figura 10 con pendientes comparables de 1,26 y 1,24, respectivamente. Las regresiones de Schild del antagonismo de s-ICAM-1 (-⑩-) y el compuesto 3 (-λ-) en el ELISA de unión del ligando a LFA-1/ICAM-1 se representan a partir de los datos de la Figura 5 (A) y (C) respectivamente. La pendiente de la gráfica para el compuesto 3 es 1,24 con una intersección y de 10,9 y $R = 0,99832$. La pendiente del gráfico de sICAM-1 es 1,26, la intersección y, 8,51 y $R = 0,99131$. Aunque el análisis de Schild requiere una regresión lineal con una pendiente cercana a 1 para demostrar la inhibición competitiva directa, no hay ninguna orientación en la extensa literatura sobre qué intervalo de valores de

Schild son aceptables. Las pendientes de 1,24 y 1,26 se encuentran dentro de los límites de muchos valores publicados de Schild utilizados para respaldar conclusiones de unión competitivas y, por tanto, estos valores de pendiente no se consideran significativamente diferentes de 1. La linealidad de las gráficas de regresión y la similitud en las pendientes de las relaciones son consistentes con la unión del ligando (ICAM-1-Ig) y ambos antagonistas (sICAM-1 y el compuesto 3) al mismo sitio de una manera similar.

A. Anticuerpos

En la materia se conocen varios anticuerpos adecuados. El bloqueo de las ICAM, tales como, por ejemplo, ICAM-1, o las leucointegrinas, tales como, por ejemplo, LFA-1, por los anticuerpos dirigidos contra una o todas estas moléculas, puede inhibir la respuesta inflamatoria. En estudios previos se han investigado los efectos de los AcMo anti-CD11a sobre muchas funciones inmunitarias dependientes de células T *in vitro* y una serie de respuestas inmunitarias *in vivo*. *In vitro*, los AcMo anti-CD11a inhiben la activación de las células T (véase Kuypers T.W., Roos D. 1989 "Leukocyte membrane adhesion proteins LFA-1, CR3 and p150,95: a review of functional and regulatory aspects" Res. Immunol., 140:461-465; Fischer A, Durandy A, Sterkers G, Griscelli C. 1986 "Role of the LFA-1 molecule in cellular interactions required for antibody production in humans" J. Immunol., 136, 3198; la lisis de las células diana por linfocitos T citotóxicos (Krensky et al., supra), la formación de conjugados inmunitarios (Sanders VM, Snyder JM, Uhr JW, Vitetta ES., "Characterization of the physical interaction between antigen-specific B and T cells". J. Immunol., 137:2395 (1986); Mentzer SJ, Gromkowski SH, Krensky AM, Burakoff SJ, Martz E. 1985 "LFA-1 membrane molecule in the regulation of homotypic adhesions of human B lymphocytes" J. Immunol., 135:9), and the adhesion of T-cells to vascular endothelium (Lo SK, Van Severter GA, Levin SM, Wright SD., Two leukocyte receptors (CD11 a/CD18 and CD11 b/CD18) mediate transient adhesion to endothelium by binding to different ligands., J. Immunol., 143:3325 (1989)). Existen dos AcMo anti-CD11, HI 111 y G43-25B disponibles en Pharmingen/BD Biosciences. Además, en un estudio que incluyó F8.8, CBR LFA 1/9, BL5, May.035, TS1/11, TS1/12, TS 1/22, TS2/14, 25-3-1, MHM2 y efalizumab se evaluó el intervalo de los sitios de unión en LFA-1 que ocuparon estos anticuerpos. Véase Lu, C; Shimaoka, M.; Salas, A.; Springer, T.A. 2004, "The Binding Sites for Competitive Antagonistic, Allosteric Antagonistic, and Agonistic Antibodies to the I Domain of Integrin LFA-1" J. Immun. 173: 3972-3978 y las referencias citadas en el mismo. Se demostró que efalizumab, entre otros anticuerpos dirigidos contra LFA-1, es un antagonista directamente competitivo de LFA-1.

Por lo tanto, para tratar la retinopatía diabética se pueden usar diversos anticuerpos dirigidos contra LFA-1, incluyendo efalizumab (Raptiva).

B. Moléculas pequeñas.

1. Péptidos

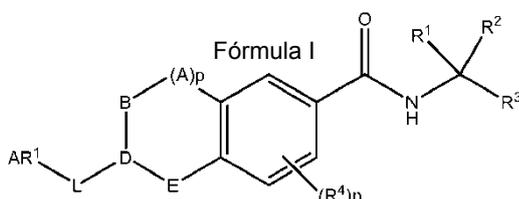
Se han investigado péptidos para su uso en la reducción de la interacción de LFA-1 con ICAM-1. Los polipéptidos que no contienen una región Fc de una IgG se describen en la patente de Estados Unidos n.º 5.747.035, que puede usarse para tratar trastornos mediados por LFA-1, en particular retinopatía diabética. El uso de péptidos duales, el primero un modulador de ICAM-1 y el segundo un péptido bloqueante con una secuencia obtenida de LFA-1 se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.843.885 para reducir las interacciones entre LFA-1 e ICAM-1. Los péptidos cíclicos se han descrito en la patente de Estados Unidos n.º 6.630.447 como inhibidores de la interacción de LFA-1: ICAM-1.

2. Moléculas orgánicas pequeñas

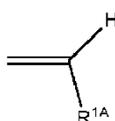
a. Compuestos de ejemplo que son antagonistas directamente competidores de LFA-1

"Molécula orgánica pequeña" generalmente se usa para referirse a moléculas orgánicas de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas generalmente usadas en productos farmacéuticos. La expresión excluye típicamente a biopolímeros orgánicos (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas con más frecuencia varían en tamaño hasta aproximadamente 5.000 Da, en algunos ejemplos, hasta aproximadamente 2.000 Da, o, en otros ejemplos, hasta aproximadamente 1.000 Da.

i. En un ejemplo, los compuestos útiles en los procedimientos incluyen compuestos de Fórmula I:



en la que R^1 y R^2 son cada uno independientemente hidrógeno, una cadena lateral de aminoácido, $-(CH_2)_mOH$, $-(CH_2)_m$ arilo, $-(CH_2)_m$ heteroarilo, en la que m es 0-6, $-CH(R^{1A})(OR^{1B})$, $-CH(R^{1A})(NHR^{1B})$, $U-T-Q$, o un resto alifático, alicíclico, heteroalifático o heteroalíclico opcionalmente sustituido con $U-T-Q$; donde U puede estar ausente o uno de los siguientes: $-O-$, $-S(O)_{0-2}-$, $-SO_2N(R^{1A})-$, $-N(R^{1A})-$, $-N(R^{1A})C(=O)-$, $-N(R^{1A})C(=O)-O-$, $-N(R^{1A})C(=O)-N(R^{1B})-$, $-N(R^{1A})-SO_2-$, $-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-$, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, $-C(=O)-N(R^{1A})-$, $-OC(=O)N(R^{1A})-$, $-C(=N-R^{1E})-$, $-C(=N-R^{1E})-O-$, $-C(=N-R^{1E})-N(R^{1A})-$, $-O-C(=N-R^{1E})-N(R^{1A})-$, $-N(R^{1A})C(=N-R^{1E})-$, $-N(R^{1A})C(=N-R^{1E})-O-$, $-N(R^{1A})C(=N-R^{1E})-N(R^{1B})-$, $-P(=O)(OR^{1A})-O-$ o $-P(=O)(R^{1A})-O-$; en la que T está ausente o es un resto alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo; y Q es hidrógeno, halógeno, ciano, isocianato, $-OR^{1B}$, $-SR^{1B}$, $-N(R^{1B})_2$, $-NHC(=O)OR^{1B}$, $-NHC(=O)N(R^{1B})_2$, $-NHC(=O)R^{1B}$, $-NHSO_2R^{1B}$, $NHSO_2N(R^{1B})_2$, $-NHSO_2NHC(=O)OR^{1B}$, $-NHC(=O)NHSO_2R^{1B}$, $-C(=O)NHC(=O)OR^{1B}$, $C(=O)NHC(=O)R^{1B}$, $-C(=O)NHC(=O)N(R^{1B})_2$, $-C(=O)NHSO_2R^{1B}$, $-C(=O)NHSO_2N(R^{1B})_2$, $C(=S)N(R^{1B})_2$, $-SO_2R^{1B}$, $-SO_2OR^{1B}$, $-SO_2N(R^{1B})_2$, $-SO_2-NHC(=O)OR^{1B}$, $-OC(=O)-N(R^{1B})_2$, $-OC(=O)R^{1B}$, $-OC(=O)NHC(=O)R^{1B}$, $-OC(=O)NHSO_2R^{1B}$, $-OSO_2R^{1B}$, o un resto alifático heteroalifático, arilo o heteroarilo, o en la que R^1 y R^2 en conjunto son un resto alicíclico o heterocíclico, o juntos son



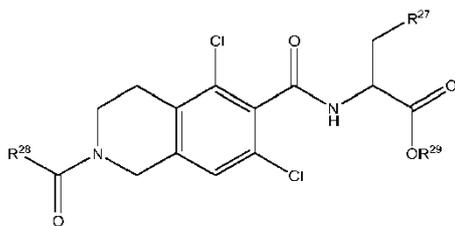
en la que cada vez que R^{1A} y R^{1B} aparecen son, independientemente, hidrógeno, un resto alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo, $-C(=O)R^{1C}$, o $-C(=O)NR^{1C}R^{1D}$; en la que cada vez que R^{1C} y R^{1D} aparecen son, independientemente, hidrógeno, hidroxilo o un resto alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo; y R^{1E} es hidrógeno, un resto alifático, alicíclico, heteroalifático, heterocíclico, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo, $-CN$, $-OR^{1C}$, $-NR^{1C}R^{1D}$ o $-SO_2R^{1C}$; en la que R^3 es $-C(=O)OR^{3A}$, $-C(=O)H$, $-CH_2OR^{3A}$, $-CH_2OC(=O)$ -alquilo, $-C(=O)NH(R^{3A})$, CH_2X^0 ; en la que cada vez que R^{3A} aparece es, independientemente, hidrógeno, un grupo protector, un resto alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, heteroalquilarilo, heteroalquilheteroarilo, o una sal o éster farmacéuticamente aceptable, o R^{3A} , en conjunto con R^1 y R^2 , forma un resto heterocíclico; en la que X^0 es un halógeno seleccionado de F, Br o I; R^4 cada vez que aparece es, independientemente hidrógeno, halógeno, $-CN$, $-NO_2$ un resto alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo, o es GR^{G1} , en la que G es $-O-$, $-S-$, NR^{G2} , $-CO-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $C(=O)O-$, $-C(=O)NR^{G2}$, $C(=O)-$, $-NR^{G2}C(=O)-$ o $-SO_2NR^{G2}$, y R^{G1} y R^{G2} son, independientemente, hidrógeno, un resto alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo; n es un número entero de 0-4;

AR^1 es un resto arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alicíclico o heterocíclico monocíclico o policíclico; A , B , D y E están unidos por un enlace simple o doble, como la valencia lo permite; en la que cada aparición de A , B , D y E es, independientemente, $C=O$, CR^iR^j , NR^i , CR^i , N , O , S , $-S(=O)$ o SO_2 ; en la que cada aparición de R^i y R^j son, independientemente, hidrógeno, halógeno, $-CN$, $-NO_2$, un resto alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo, o es $-GR^{G1}$ en la que G es $-O-$, $-S-$, $-NR^{G2}$, $-CO-$, $-SO-$, $-C(=O)O-$, $-C(=O)NR^{G2}$, $-OC(=O)-$, $-NR^{G2}C(=O)-$ o $-SO_2NR^{G2}$, y R^{G1} y R^{G2} son, independientemente, hidrógeno, un resto alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo, o dos apariciones cualquiera adyacentes tomadas en conjunto, representan un resto alicíclico, heteroalíclico, arilo o heteroarilo;

p es un número entero de 0-4; y

L está ausente o es $V-W-X-Y-Z$, en la que cada aparición de V , W , X , Y y Z está, independientemente, ausente, $C=O$, NR^{L1} , $-O-$, $-C(R^{L1})-$, $=C(R^{L1})-$, $-C(R^{L1})(R^{L2})$, $C(=N-O R^{L1})$, $C(=NR^{L1})$, $-N=$, $S(O)_{0-2}$; una cadena de alquencilideno C_{1-6} o alquencilideno C_{2-6} sustituido o no sustituido, en la que hasta dos unidades de metileno no adyacentes están, independiente y opcionalmente, reemplazadas por $-C(=O)-$, $-CO_2-$, $-C(=O)C(=O)-$, $-C(C=O)NR^{L3}$, $-OC(=O)-$, $-OC(=O)NR^{L3}$, $-NR^{L3}NR^{L4}$, $-NR^{L3}NR^{L4}C(=O)-$, $-NR^{L3}C(=O)-$, $NR^{L3}CO_2-$, $NR^{L3}C(=O)NR^{L4}$, $-S(=O)-$, $-SO_2-$, $-NR^{L3}SO_2-$, $-SO_2NR^{L3}$, $-NR^{L3}SO_2NR^{L4}$, $-O-$, $-S-$, o $-NR^{L3}$; en la que cada aparición de R^{L3} y R^{L4} es, independientemente, hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, arilo, heteroarilo o acilo; o un resto alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo; y cada aparición de R^{L1} y R^{L2} es, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, hidroxilo protegido, amino, amino protegido, tio, tio protegido, halógeno, ciano, isocianato, carboxi, carboxialquilo, formilo, formiloxi, azido, nitro, ureido, tioureido, tiocianato, alcoxi, ariloxi, mercapto, sulfonamido, benzamido, tosilo o un resto alifático, alicíclico, heteroalifático, heteroalíclico, arilo, heteroarilo, alquilarilo o alquilheteroarilo, o en el que una o más apariciones de R^{L1} y R^{L2} , juntos, o junto con uno de V , W , X , Y o Z forman un resto alicíclico o heterocíclico o forman un resto arilo o heteroarilo.

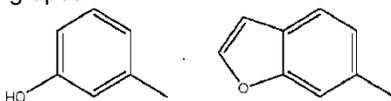
Algunas realizaciones preferidas del procedimiento de la presente invención son de Fórmula II:



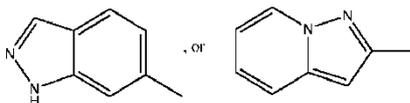
5

en la que R²⁸ es uno de los siguientes grupos:

10



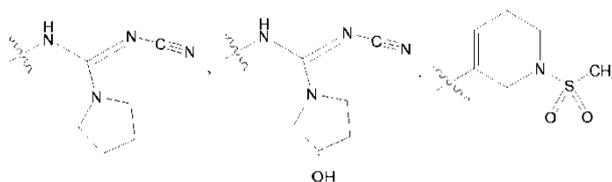
15



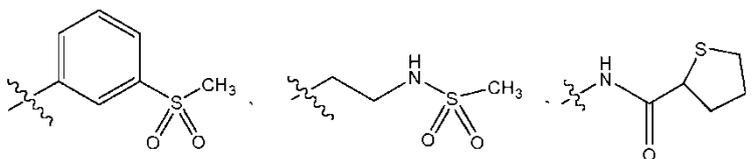
20

y R²⁷ es uno de los siguientes grupos:

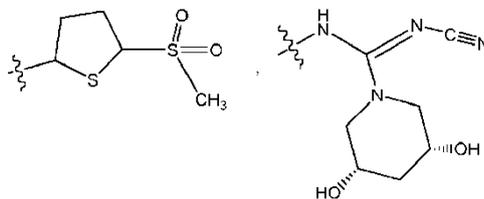
25



30



35

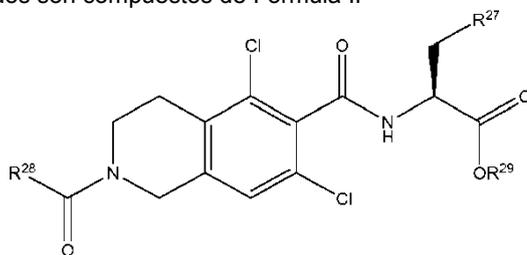


40

45

y R²⁹ es hidrógeno, una sal o éster farmacéuticamente aceptable.
Algunos ejemplos preferidos son compuestos de Fórmula II'

50



55

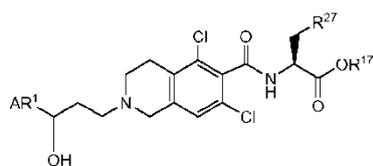
Fórmula II'

en la que la sustitución es como en la Fórmula II.

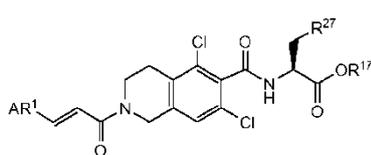
60

Algunas realizaciones particularmente preferidas de compuestos del procedimiento de la presente invención son compuestos de Fórmula IIB.

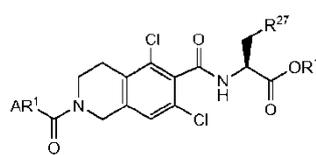
65



Fórmula IA



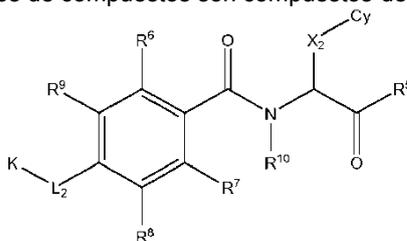
Fórmula IIA



Fórmula IIB

en la que R¹⁷ es hidrógeno, sales o ésteres farmacéuticamente aceptables, y R²⁷ es como en la Fórmula II. Los compuestos de esta clase se divulgan en la patente de Estados Unidos n.º 7314938.

ii. Otro conjunto de ejemplos preferidos de compuestos son compuestos de la Fórmula III:



Fórmula III

en la que Cy es un carbociclo aromático, heterociclo aromático o un carbociclo o heterociclo no aromático opcionalmente sustituido con hidroxilo (–OH), mercapto (–SH), tioalquilo, halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br, I), oxo (=O), tio (=S), amino, aminoalquilo, amidina (–C(NH)–NH₂), guanidina (–NH₂–C(NH)–NH₂), nitro, alquilo o alcoxi. En un ejemplo particular, Cy es un anillo de 3 a 5 miembros. En un ejemplo preferido, Cy es un heterociclo no aromático de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido con hidroxilo, mercapto, halógeno (preferentemente, F o Cl), oxo (= O), tio (= S), amino, amidina, guanidina, nitro, alquilo o alcoxi. En un ejemplo más preferido, Cy es un heterociclo no aromático de 5 miembros opcionalmente sustituido con hidroxilo, oxo, tio, Cl, alquilo C₁₋₄ (preferentemente metilo), o alcanóilo C₁₋₄ (preferentemente acetilo, propanoilo o butanoilo). Más preferentemente, el heterociclo no aromático comprende uno o heteroátomos (N, O o S) y está opcionalmente sustituido con hidroxilo, oxo, mercapto, tio, metilo, acetilo, propanoilo o butilo. En ejemplos particulares, el heterociclo no aromático comprende al menos un átomo de nitrógeno que está opcionalmente sustituido con metilo o acetilo. En un ejemplo particularmente preferido, el heterociclo no aromático se selecciona del grupo que consiste en piperidina, piperazina, morfolina, tetrahidrofurano, tetrahidrotiofeno, oxazolidina, tiazolidina opcionalmente sustituida con hidroxilo, oxo, mercapto, tio, alquilo o alcanóilo. En un ejemplo más preferido, Cy es un heterociclo no aromático seleccionado del grupo que consiste en tetrahidrofuran-2-ilo, tiazolidin-5-ilo, tiazolidin-2-on-5-ilo y tiazolidin-2-tion-5-ilo y pirrolidina. En un ejemplo preferido, Cy es un carbociclo heterociclo aromático de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido con hidroxilo, mercapto, halógeno (preferentemente, F o Cl), oxo (= O), tio (= S), amino, amidina, guanidina, nitro, alquilo o alcoxi. En un ejemplo más preferido, Cy es un carbociclo o heterociclo aromático de 5 miembros opcionalmente sustituido con hidroxilo, oxo, tio, Cl, alquilo C₁₋₄ (preferentemente metilo), o alcanóilo C₁₋₄ (preferentemente acetilo, propanoilo o butanoilo). Más preferentemente, el heterociclo aromático comprende uno o heteroátomos (N, O o S) y está opcionalmente sustituido con hidroxilo, oxo, mercapto, tio, metilo, acetilo, propanoilo o butilo.

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

X₂ es un enlazador de hidrocarburo C₁₋₅ divalente que tiene, opcionalmente, uno o más átomos de carbono sustituidos con N, O, S, SO o SO₂ y que está opcionalmente sustituido con hidroxilo, mercapto, halógeno, amino, aminoalquilo, nitro, oxo o tio. En un ejemplo preferido, X₂ tendrá al menos un átomo de carbono. Los reemplazos y sustituciones pueden formar un resto amida (–NRC(=O)– o –C(=O)NR–) dentro de la cadena hidrocarbonada o en uno o ambos extremos. X es también sulfonamida (–NRSO₂– o –SO₂NR), acilo, éter, tioéter o amina. En un ejemplo particularmente preferido, X₂ es el grupo –CH₂–NR¹⁰–C(O)– en el que la porción carbonilo –C(O)– del mismo es adyacente (es decir, está unida covalentemente) a Cy y R¹⁰ es alquilo, es decir metilo o, más preferentemente, H.

K es un carbociclo o heterociclo opcionalmente sustituido con hidroxilo, mercapto, halógeno, oxo, tio, un hidrocarburo, un hidrocarburo sustituido con halógeno, amino, amidina, guanidina, ciano, nitro, alcoxi o acilo. En un ejemplo particular, K es arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con halógeno o hidroxilo. En un ejemplo

particularmente preferido, K es fenilo, furan-2-ilo, tiofen-2-ilo, fenilo sustituido con un halógeno (preferentemente Cl) o hidroxilo, preferentemente en la posición meta.

L₂ es un hidrocarburo divalente que tiene, opcionalmente, uno o más átomos de carbono sustituidos con N, O, S, SO o SO₂ y que está opcionalmente sustituido con hidroxilo, halógeno oxo, o tio; o tres átomos de carbono del hidrocarburo están reemplazados por un residuo de aminoácido. Preferentemente L₂ tiene menos de 10 átomos de longitud y, más preferentemente, 5 o menos y, lo más preferentemente, 5 o 3 átomos de longitud. En ejemplos particulares, L₂ es -CH=CH-C(O)-NR¹⁰-CH₂-, -CH₂-NR¹⁰-C(O)-, -C(O)-NR¹⁰-CH₂-, -CH(OH)-(CH₂)₂-, -(CH₂)₂-CH(OH)-, -(CH₂)₃-, -C(O)-NR¹⁰-CH(R₇)-C(O)-NR¹⁰-, -NR¹⁰-C(O)-CH(R¹⁶)-NR¹⁰-C(O)-, -CH(OH)-CH₂-O- o -CH(OH)-CF₂-CH₂-, en las que cada R¹⁰ es independientemente H o alquilo y R¹⁶ es una cadena lateral de aminoácidos. Las cadenas laterales de aminoácidos preferidas incluyen cadenas laterales de origen no natural, tales como fenilo o cadenas laterales de origen natural. Las cadenas laterales preferidas son las de Phe, Tyr, Ala, Gln y Asn. En un ejemplo preferido, L₂ es -CH=CH-C(O)-NR¹⁰-CH₂-, en la que el resto -CH=CH- del mismo es adyacente (es decir, está unido covalentemente) a K. En otro ejemplo preferido, L₂ es -CH₂-NR¹⁰-C(O)- en la que el resto metileno (-CH₂-) del mismo es adyacente a K.

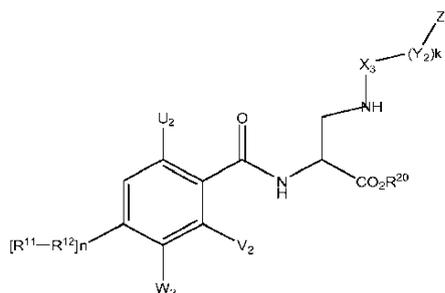
R⁵ es H, OH, amino, O-carbociclo o alcoxi opcionalmente sustituido con amino, un carbociclo, un heterociclo, o una sal o éster farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo preferido, R⁵ es H, fenilo o alcoxi C₁₋₄ opcionalmente sustituido con un carbociclo tal como fenilo. En un ejemplo particular, R⁵ es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

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

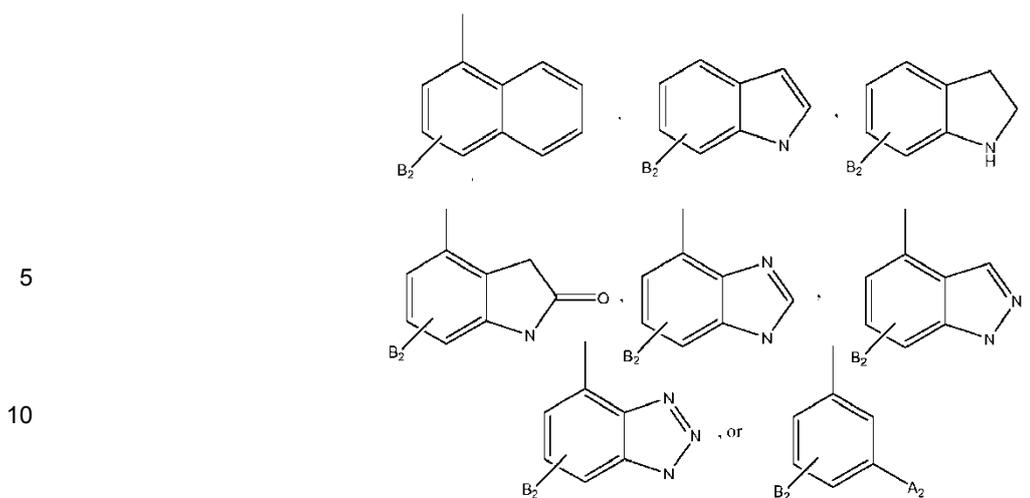
R¹⁰ es H o una cadena de hidrocarburo opcionalmente sustituida con un carbociclo o un heterociclo. En un ejemplo preferido, R¹⁰ es H o alquilo, es decir, metilo, etilo, propilo, butilo, i - butilo, s - butilo o t - butilo. En un ejemplo particular R¹⁰ es H.

Los compuestos de la clase de Fórmula III se divulgan en las patentes de Estados Unidos n.º 6667318, 6872735 y 6803384.

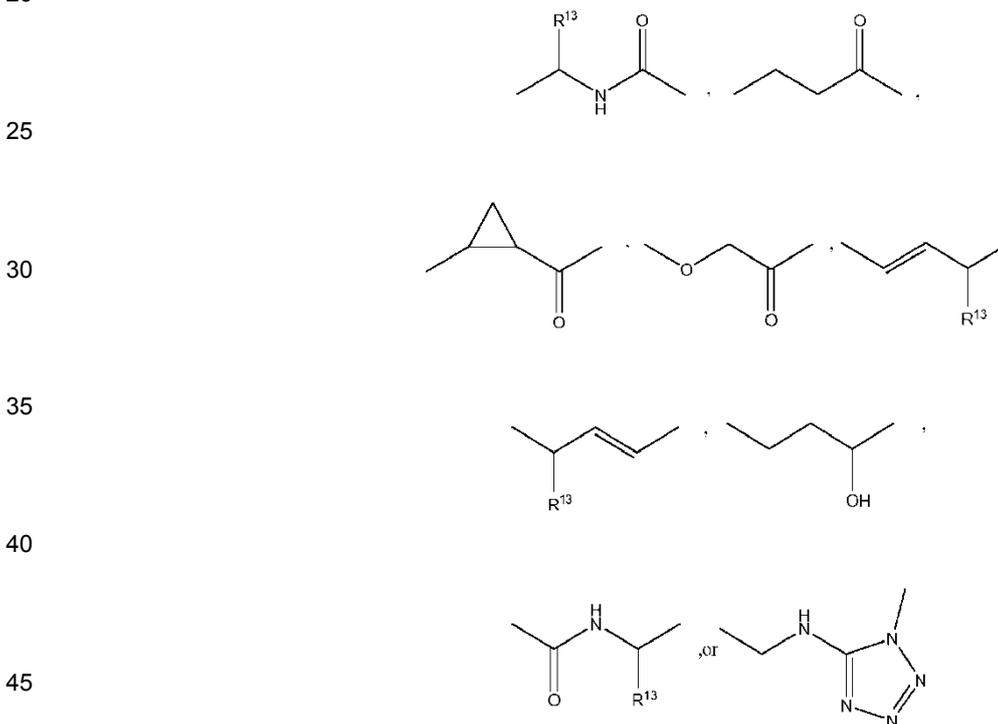
iii. Otros ejemplos preferidos del procedimiento son compuestos de Fórmula IV:



en la que R¹¹ es un grupo de la fórmula



en la que A es hidrógeno, hidroxilo, amino o halógeno y B es amino, carboxi, hidrógeno, hidroxilo, ciano, trifluorometilo, halógeno, alquilo inferior o alcoxi inferior; R¹² es un grupo de la fórmula:



50

55

60

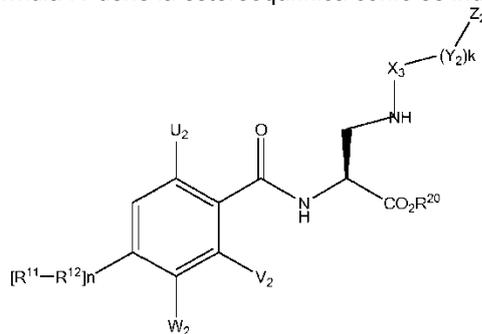
en la que R¹³ es hidrógeno, carboxi o alquilo inferior; N es 0 o 1; U₂, V₂ y W₂ son, independientemente, hidrógeno, halógeno o alquilo inferior siempre que U₂ y V₂ no sean ambos hidrógeno; X₃ es carbonilo, alquileo inferior sustituido con fenilo, imino, imino sustituido o sulfonilo; Y₂ es alquileo inferior que puede estar sustituido con uno o más de amino, amino sustituido, alquilo inferior o cicloalquilo inferior, o Y₂ es alquilenilo inferior o alquilentio inferior; k es 0 o 1; cuando k es 11, Z₂ es hidrógeno, alquilitio inferior, -COOH, -CONH₂, amino; y cuando k es 0 o 1, Z₂ es 1-adamantilo, difenilmetilo, 3-[[[(5-cloropiridin-2-il)amino]carbonil]pirazin-2-ilo], hidroxilo, fenilmetoxi, 2-cloro-4-[[[(3-hidroxifenil)metil]amino]carbonil]fenil, [2,6-diclorofenil]metoxi]fenilo; adicionalmente, cuando k es 0 o 1, Z₂ puede ser cicloalquilo o arilo que contiene de 0 a 3 heteroátomos que pueden ser iguales o diferentes, o un sistema de anillos condensados que contiene dos o tres anillos cuyos anillos son, independientemente, cicloalquilo o arilo que contiene de 0 a 3 heteroátomos que pueden ser iguales o diferentes, cualquiera de cuyos anillos pueden estar no sustituidos o sustituidos con al menos uno de halógeno, ciano, amino, amino sustituido, aminosulfonilo, nitro, oxo, hidroxilo, arilo, ariloxi, alquilo inferior no sustituido, alquilo inferior sustituido con halógeno, alquilo inferior sustituido con alcoxi inferior, alcoxi inferior, alcanosulfonilo

inferior, alquiltio inferior, acetilo, aminocarbonilo, hidrazino, carboxi, alcocarbonilo, acetoxi, o también, además, con aminoalquilo inferior; y R²⁰ es hidrógeno, una sal o éster farmacéuticamente aceptable.
Un ejemplo de compuestos de Fórmula IV tiene la estereoquímica como se indica en la Fórmula IV:

5

10

15



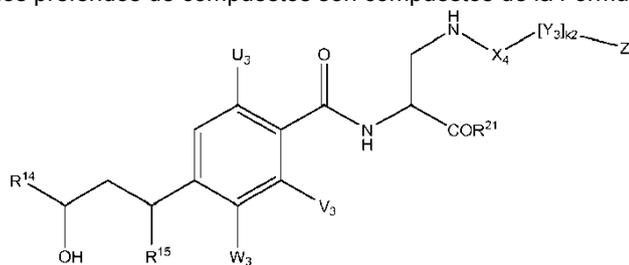
Fórmula IV'

iv. Otro conjunto de ejemplos preferidos de compuestos son compuestos de la Fórmula V:

20

25

30



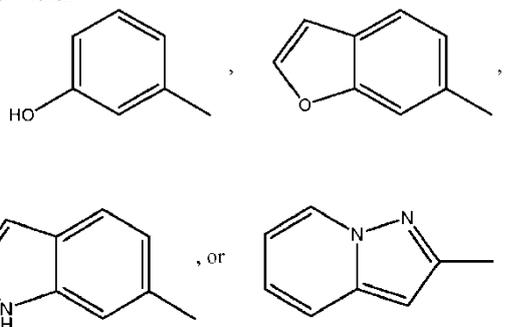
Fórmula V

35

en la que R¹⁴ es un grupo de la fórmula:

40

45



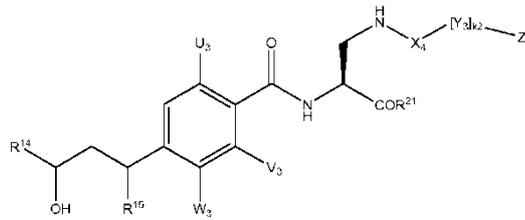
50

55

60

65

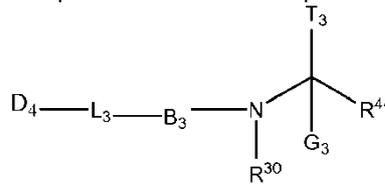
en la que R¹⁵ es hidrógeno, carboxi o alquilo inferior; U₃, V₃ y W₃ son, independientemente, hidrógeno, halógeno; o U₃, V₃ y W₃ Son alquilo inferior siempre que U₃ y V₃ no sean ambos hidrógeno; X₄ es carbonilo, alquilen inferior sustituido con fenilo, imino, imino sustituido que incluye ciano o sulfonilo; Y₃ es alquenileno inferior, alquiltio inferior o es alquilen inferior que puede estar sustituido con amino, acetilamino o cicloalquilo inferior; k₂ es 0 o 1; cuando k₂ es 1, Z es hidrógeno, alquiltio inferior, -COOH, -CONCH₂-, o amino; cuando k₂ es 0 o 1, Z₃ es 1-adamantilo, difenilmetilo, 3-[(5-cloropiridin-2-il)amino]carbonil]pirazin-2-ilo; y cuando k₂ es 0 o 1, Z puede ser cicloalquilo o arilo que contiene de 0 a 3 heteroátomos que pueden ser iguales o diferentes, o un sistema de anillos condensados que contienen dos o tres anillos, en los que los anillos son, independientemente, cicloalquilo o arilo que contiene de 0 a 3 heteroátomos que pueden ser iguales o diferentes, cualquiera de estos anillos pueden estar no sustituidos o sustituidos con al menos uno de halógeno, ciano, amino, amino sustituido, aminosulfonilo, nitro, oxo, hidroxil, arilo, ariloxi, alquilo inferior no sustituido, alquilo inferior sustituido con halógeno, alquilo inferior sustituido con alcoxi inferior, alcoxi inferior, carboxi, alcocarbonilo o acetoxi; y, R²¹ es hidrógeno, sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos.
Un ejemplo preferido de compuestos de Fórmula V tiene la estereoquímica como se indica en la Fórmula V':



Fórmula V'

Otros compuestos de la clase de Fórmula IV y V se divulgan en las patentes de Estados Unidos n.º 7217728, 6331640, 6515124 y 6803384.

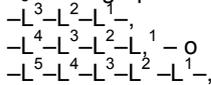
v. Otra clase de compuestos preferidos del procedimiento están representados por la Fórmula VI



Fórmula VI

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

L₃ es un grupo de enlace bivalente que tiene una de las siguientes estructuras;



en la que L¹ es oxo (-O-), S(O)_s, C(=O), CR³², R³², CR³² het, NR³⁰ o N,

L² es oxo (-O-), S(O)_s, C(=O), C(=N-O-R³³), CR³⁴R³⁴, CR³⁴, het NR³⁰ o N,

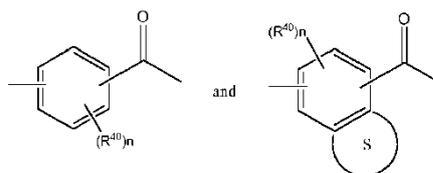
L³ es oxo (-O-), S(O)_s, C(=O), C(=N-O-R³³), CR³⁵R³⁵, CR³⁵, het NR³⁰ o N, L⁴ está ausente, es oxo (-O-), S(O)_s, C(=O), C(=N-O-R³³), CR³⁶R³⁶, CR³⁶, NR³⁰ o N,

L⁵ está ausente, oxo (-O-), S(O)_s, C(=O), CR³⁷R³⁷, CR³⁷, NR³⁰ o N, siempre que solo uno de L¹-L³ puede ser het y que cuando uno de L¹-L³ es het el otro L¹-L⁵ puede estar ausente,

en la que

R³², R³², R³⁴, R³⁴, R³⁵, R³⁵, R³⁶, R³⁶, R³⁷ y R³⁷, son cada uno, independientemente, R³⁸, R³⁹ o U-Q-V-W, opcionalmente, R²⁴ y R³⁴ por separado o conjuntamente pueden formar un anillo condensado saturado, insaturado o aromático con B₃ A través de un sustituyente RP en B, conteniendo el anillo condensado 5, 6 o 7 átomos en el anillo y conteniendo, opcionalmente, 1-3 heteroátomos seleccionados del grupo O, S y N, en el que cualquier S o N puede estar oxidado opcionalmente; opcionalmente, R³⁵ y R³⁵, por separado o juntos, y R³⁶ y R³⁶, por separado o juntos, pueden formar un anillo condensado saturado, insaturado o aromático con D₃ a través de un sustituyente R³¹ en D₃, conteniendo el anillo condensado 5, 6 o 7 átomos en el anillo y conteniendo, opcionalmente, 1-3 heteroátomos seleccionados del grupo O, S y N, en los que cualquier S o N puede estar opcionalmente oxidado;

también opcionalmente, cada R³²-R³⁷, NR³⁰ o N en L¹-L⁵ junto con cualquier otro R³²-R³⁷, NR³⁰ o N en L¹-L⁵ pueden formar un homociclo o heterociclo de 5, 6 o 7 miembros saturados, insaturados o aromáticos que contienen, opcionalmente, 1-3 heteroátomos adicionales seleccionados de N, O y S, donde cualquier átomo de carbono o azufre del anillo puede estar, opcionalmente, oxidado, cada ciclo sustituido con 0-3 R³¹; y donde s es 0-2; B se selecciona del grupo:



en la que



5

es un anillo heterocíclico u homocíclico condensado que contiene 5, 6 o 7 átomos, estando el anillo insaturado, parcialmente saturado o aromático, siendo los heteroátomos seleccionados de 1-3 O, S y N,

10 Y₃ es CH o NR³⁰; n es 0, 1, 3, o 3:

G₃ es hidrógeno o alquilo C₁-C₆, opcionalmente G tomado junto con T puede formar un grupo cicloalquilo C₃-C₆ opcionalmente sustituido con -V-W;

T₃ es uno de los siguientes

15 una cadena lateral de α-aminoácido de origen natural,

y U₄-Q₄-V₄-W₄;

U₄ es un radical bivalente opcionalmente sustituido que tiene una de las siguientes estructuras:

alquilo C₁-C₆, alquilo C₀-C₆-Q, alqueno C₂-C₆-Q, y alquinilo C₂-C₆-Q, en las que los sustituyentes en cualquier alquilo, alqueno o alquinilo son 1-3 R³⁸;

20 Q₄ está ausente o es -O-, -S(O)_s-, -SO₂-N(R³⁰)-, -N(R³⁰)-, -N(R³⁰)-C(=O)-, -N(R³⁰)-C(=O)-N(R³⁰)-,

-N(R³⁰)-C(=O)-O-, -N(R³⁰)-SO₂-, -C(=O)-, -C(=O)-O-het-, -C(=O)-N(R³⁰)-,

-O-C(=O)-N(R³⁰)-, -PO(OR₃₀)O- o -P(O)O-;

en las que

s es 0-2 y

25 het es un anillo heterocíclico monocíclico o bicíclico de 5, 6, 7, 9 o 10 miembros, en el que cada anillo contiene 1-4 heteroátomos seleccionados de N, O y S, en el que el anillo heterocíclico puede estar saturado, parcialmente saturado o aromático y cualquier N o S está opcionalmente oxidado, estando el anillo heterocíclico sustituido con 0-3 R⁴¹;

V₄ está ausente o es un grupo bivalente opcionalmente sustituido con una de las siguientes estructuras, alquilo C₀-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, alquilo C₀-C₆; arilo C₆-C₁₀ y het-alquilo C₀-C₆;

30 en las que los sustituyentes en cualquier alquilo son 1-3 R³⁸ y los sustituyentes en cualquier arilo o het son 1-3 R³¹;

W₄ es hidrógeno, OR³³, SR⁴², NR³⁰ R³⁰, NH-C(=O)-O-R⁴³, NH-C(=O)-NRⁿRⁿ, NH-C(=O)-R⁴³, NH-SO₂-R³⁷, NH-SO₂-NR³⁰R³⁰, NH-SO₂-NH-C(=O)-R⁴³, NH-C(=O)-NH-SO₂-R³⁷, C(=O)-NH-C(=O)-O-R⁴³, C(=O)-NH-C(=O)-R⁴³, C(=O)-NH-C(=O)-NR³⁰R³⁰, C(=O)-NH-SO₂-R³⁷, C(=O)-NH-SO₂-NR³⁰R³⁰, C(=S)-NR³⁰R³⁰, SO₂-R³⁷, SO₂-O-R³⁷, SO₂-NR³⁷R³⁷, SO₂-NH-C(=O)-O-R⁴³, SO₂-NH-C(=O)-NR³⁰R³⁰, SO₂-NH-C(=O)-R⁴³, O-C(=O)-NR³⁰R³⁰, O-C(=O)-R⁴³, O-C(=O)-NH-C(=O)-R⁴³, O-C(=O)-NH-SO₂R⁴⁶ r O-SO₂-R³⁷;

35 R⁴⁴ es C(=O)-R⁴⁵, C(=O)-H, CH₂(OH) o CH₂O-C(=O)-alquilo C₁-C₆;

R³⁸ es R³⁸ⁱ, o R³⁸ⁿ sustituido con 1-3 R³⁸; en la que

40 R³⁸ⁱ es hidrógeno, halo (F, Cl, Br, I), ciano, isocianato, carboxi, carboxi-alquilo C₁-C₁₁, amino, amino-alquilo C₁-C₆, aminocarbonilo, carboxamido, carbamoilo, carbamoiloxi, formilo, formiloxi, azido, nitro, imidazol, ureido, tioureido, tiocianato, hidroxí, alcoxi C₁-C₆, mercapto, sulfonamido, het, fenoxi, fenilo, benzamido, tosilo, morfolino, morfolinilo, piperazinilo, piperidinilo, pirrolinilo, imidazolilo, o indolilo;

45 R³⁸ⁿ es alquilo C₀-C₁₀ -Q-alquilo C₀-C₆, alqueno C₀-C₁₀ -Q-alquilo C₀-C₆, alquinilo C₀-C₁₀ -Q-alquilo C₆-C₆, cicloalquilo C₃-C₁₁ -Q-alquilo C₀-C₆, cicloalqueno C₃-C₁₀ -Q-alquilo C₀-C₆, alquilo C₁-C₆ arilo C₆-C₁₂ -Q-alquilo C₀-C₆, arilo C₆-C₁₀ alquilo -C₁-C₆ -Q-alquilo C₀-C₆, alquilo C₀-C₆-het-Q-alquilo C₀-C₆, alquilo C₀-C₆-Q-het-alquilo C₀-C₆, het-alquilo C₀-C₆-Q-alquilo C₀-C₆, alquilo C₀-C₆-Q-arilo C₆-C₁₂ o -Q-alquilo C₁-C₆;

R⁴³ es hidrógeno y alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido, alqueno C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₁, cicloalqueno C₃-C₁₀, alquilo C₁-C₆ arilo-C₆-C₁₂, arilo C₆-C₁₀ alquilo -C₁-C₆, alquilo C₁-C₆-het, het-alquilo C₁-C₆, arilo C₆-C₁₂ o het,

50 en los que los sustituyentes en cualquier alquilo, alqueno o alquinilo son 1-3 R³⁸ y los sustituyentes en cualquier arilo o het son 1-3 R³¹;

R³¹ es R⁴⁰ o R⁴¹;

55 R⁴¹ es OH, OCF₃, OR⁴³, SR⁴², halo(F, Cl, Br, I), CN, isocianato, NO₂, CF₃, alquilo C₀-C₆ -NR³⁰R³⁰, alilo C₀-C₆ -C(=O)-NR³⁰R³⁰, alquilo C₀-C₆-C(=O)-R³⁸, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, cicloalqueno C₃-C₆, alquilo C₁-C₆-fenilo, fenilo-alquilo C₁-C₆, alquilo carbonilo C₁-C₆, fenilo-alquilo C₀-C₆, alquilo C₁-C₆-het, het-alquilo C₁-C₆, SO₂-het, -O-arilo C₆-C₁₂, -SO₂-arilo C₆-C₁₂, -SO₂-alquilo C₁-C₆ o het,

60 en los que cualquier alquilo, alqueno o alquinilo puede estar opcionalmente sustituido con 1-3 grupos seleccionados de OH, halo (F, Cl, Br, I), nitro, amino y aminocarbonilo y los sustituyentes en cualquier arilo o het son 1-2 hidroxí, halo (F, Cl, Br, I), CF₃, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, nitro y amino;

R⁴² es alquilo S-C₁-C₆, C(=O)-alquilo C₁-C₆, C(=O)-NR³⁰R³⁰, alquilo C₁-C₆, halo(F, Cl, Br, I)-alquilo C₁-C₆, bencilo o fenilo;

65 R³⁰ es R⁴³, NH-C(=O)-O-R⁴³, NH-C(=O)-R⁴³, NH-C(=O)-NHR⁴³, NH-SO₂-R⁴⁶, NH-SO₂-NH-C(=O)-R⁴³, NH-C(=O)-NH-SO₂-R³⁷, C(=O)-O-R⁴³, C(=O)-R⁴³, C(=O)-NHR⁴³, C(=O)-NH-C(=O)-O-R⁴³, C(=O)-NH-C(=O)-R⁴³, C(=O)-NH-SO₂-R⁴⁶, C(=O)-NH-SO₂-NHR³⁷, SO₂-R³⁷, SO₂-O-R³⁷, SO₂-N(R⁴³)₂, SO₂-NH-C(=O)-O-R⁴³, SO₂-NH-C(=O)-O-R⁴³ o SO₂-NH-C(=O)-R⁴³;

R^{30'} es hidrógeno, hidroxilo y alquilo C₁-C₁₁ sustituido o no sustituido, alcoxi C₁-C₁₁, alqueno C₂-C₁₀, alquino C₂-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₁, cicloalqueno C₃-C₁₀, alquilo C₁-C₆ arilo-C₆-C₁₂, arilo C₆-C₁₀ alquilo-C₁-C₆, arilo C₆-C₁₀ alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆-het, het-alquilo C₁-C₆, arilo C₆-C₁₂, het, alquilcarbonilo C₁-C₆, alcocarbonilo C₁-C₆, cicloalquilcarbonilo C₃-C₈, cicloalcoxycarbonilo C₃-C₈, ariloxycarbonilo C₆-C₁₁, arilalcoxycarbonilo C₇-C₁₁, heteroarilalcoxycarbonilo, heteroarilalquilcarbonilo, heteroarilcarbonilo, heteroarilalquilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquilsulfonilo C₁-C₆ o arilsulfonilo C₆-C₁₀, en los que los sustituyentes en cualquier alquilo, alqueno o alquino son 1-3 R³⁸ y los sustituyentes en cualquier arilo, het o heteroarilo son 1-3 R³¹;

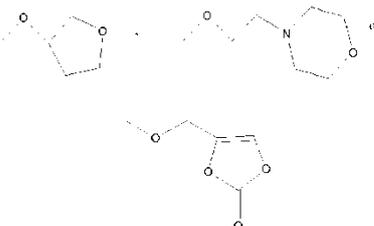
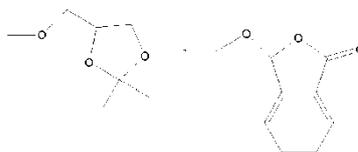
R³⁰ y R^{30'} tomados junto con el nitrógeno común al que están unidos pueden formar un heterociclo opcionalmente sustituido que tiene una de las siguientes estructuras morfolinilo, piperazinilo, tiamorfolinilo, pirrolidinilo, imidazolidinilo, indolinilo, isoindolinilo, 1,2,3,4-tetrahidroquinolinilo, 1, 2,3,4-tetrahidro-isoquinolinilo, tiazolidinilo o azabicyclononilo, en los que los sustituyentes son 1-3 R³⁸;

R³³ es hidrógeno y alquilo C₁-C₆, alquilcarbonilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₈ o benzoilo sustituido o no sustituido, en los que los sustituyentes en cualquier alquilo son 1-3 R³⁸ y los sustituyentes en cualquier arilo son 1-3 R⁴⁰;

R⁴⁰ es OH, halo(F, Cl, Br, I), CN, isocianato, OR⁴³, SR⁴², SOR⁴³, NO₂, CF₃, R⁴³, NR³⁰R^{30'}, NR³⁰C(=O)-O-R⁴³, NRC(=O)-R⁴³, C₀-C₆ alquil-SO₂-R⁴³, C₀-C₆ alquil-SO₂-NR³⁰R^{30'}, C(=O)-R⁴³, O-C(=O)-R⁴³, C(=O)-O-R⁴³, o C(=O)-NR³⁰R^{30'}, en los que los sustituyentes en cualquier alquilo, alqueno o alquino son 1-3 R³⁸ y los sustituyentes en cualquier arilo o het son 1-3 R³¹;

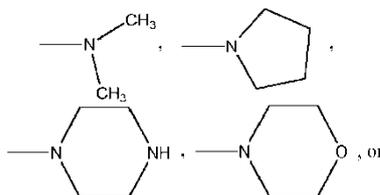
R⁴⁶ es un alquilo C₁-C₈, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, cicloalquilo C₃-C₈, cicloalqueno C₃-C₆, alquilo C₀-C₆-fenilo, fenilo-alquilo C₀-C₆, alquilo C₀-C₆-het o het-alquilo C₀-C₆, en los que los sustituyentes en cualquier alquilo, alqueno o alquino son 1-3 R³⁸ y los sustituyentes en cualquier arilo o het son 1-3 R³¹;

R⁴⁵ es un hidroxilo sustituido o no sustituido, alcoxi C₁-C₁₁, cicloalcoxi C₃-C₁₂, aralcoxi C₈-C₁₂, arcicloalcoxi C₈-C₁₂, ariloxi C₆-C₁₀, alquilcarboniloxialquilo C₃-C₁₀, alcocarboniloxialquilo C₃-C₁₀, alcocarbonilalquilo C₃-C₁₀, cicloalquilcarboniloxialquilo C₅-C₁₀, cicloalcoxycarboniloxialquilo C₅-C₁₀, cicloalcoxycarbonilalquilo C₅-C₁₀, ariloxycarbonilalquilo C₈-C₁₂, ariloxycarboniloxialquilo C₈-C₁₂, arilcarboniloxialquilo C₈-C₁₂, alcocalcilcarboniloxialquilo C₅-C₁₀, (R³⁰)(R^{30'})N(alcoxi C₁-C₁₀)-,

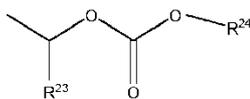


en los que los sustituyentes en cualquier alquilo, alqueno o alquino son 1-3 R³⁸ y los sustituyentes en cualquier arilo o het son 1-3 R³¹ y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

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



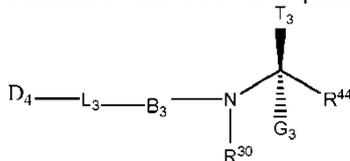
5



en la que R²³ es hidrógeno o metilo y R²⁴ es alquilo inferior o cicloalquilo inferior.

Un ejemplo preferido de compuestos de Fórmula VI tiene la estereoquímica como se indica en la Fórmula VI':

10



15

Fórmula VI'

20

Los compuestos de la clase de Fórmula VI se divulgan en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20050203135.

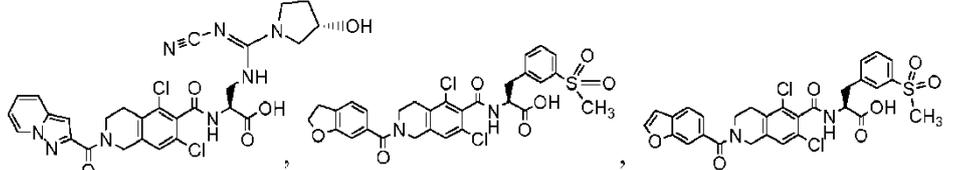
25

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

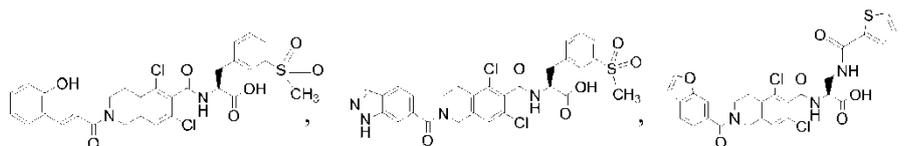
30

En algunos ejemplos preferidos, los procedimientos se realizan con los siguientes compuestos:

35

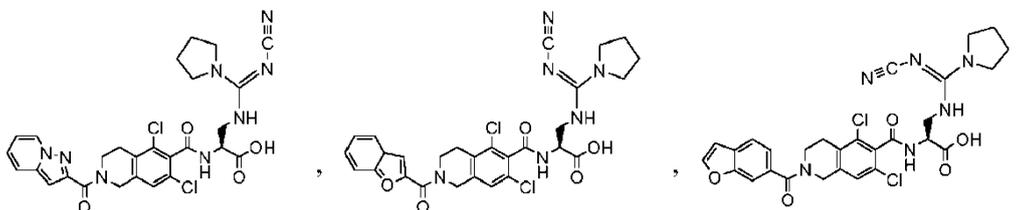


40

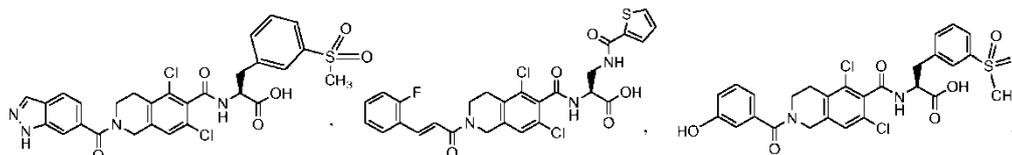


45

50

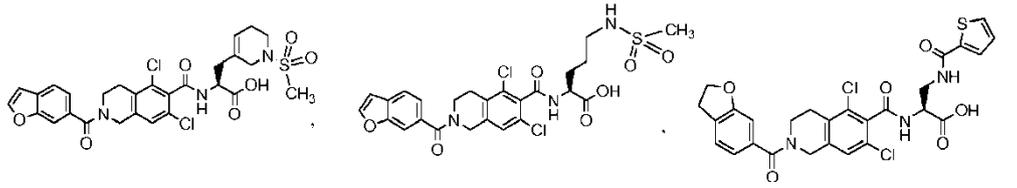


55



60

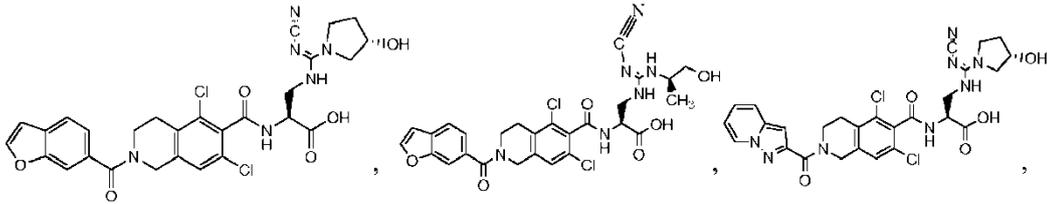
5



y sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables.

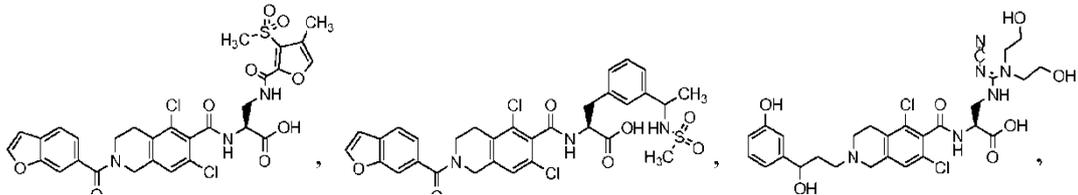
10 Los compuestos incluyen los siguientes:

15



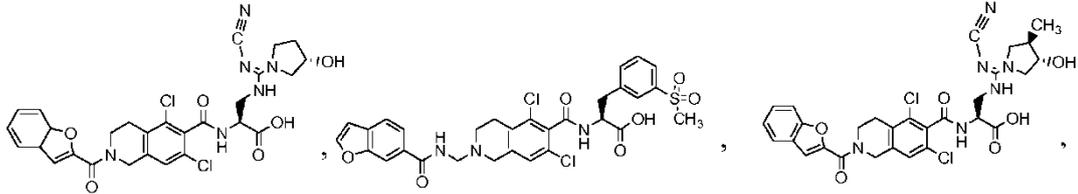
20

25



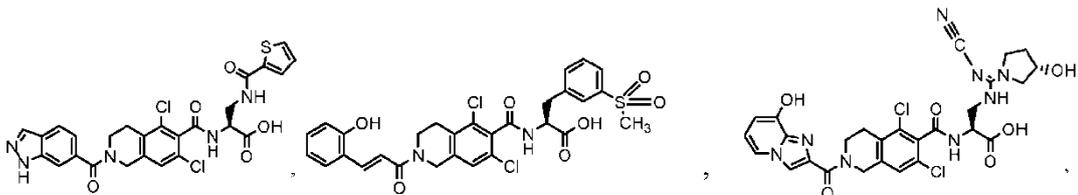
30

35



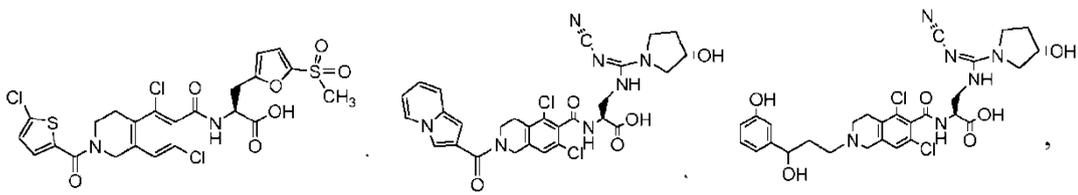
40

45



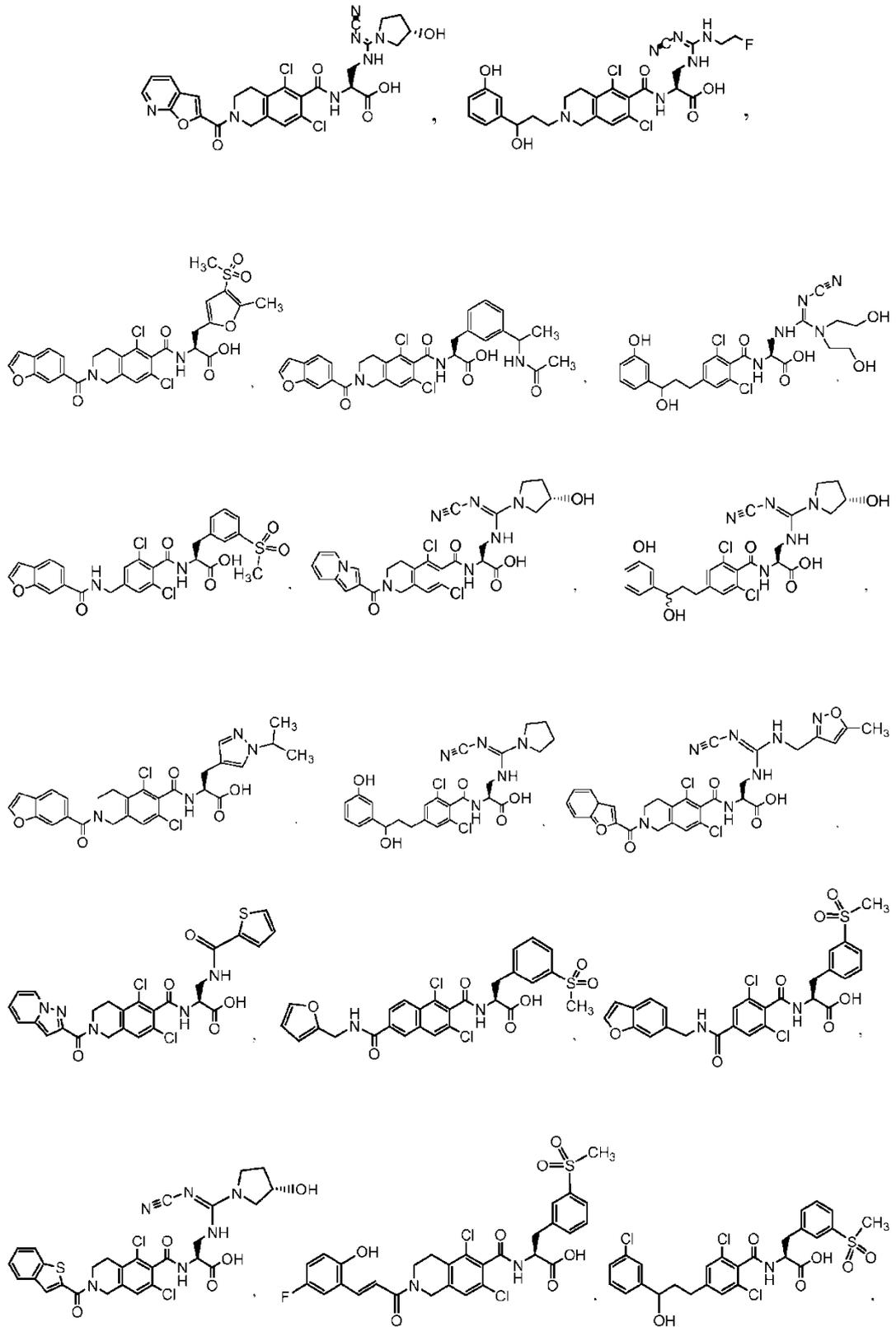
50

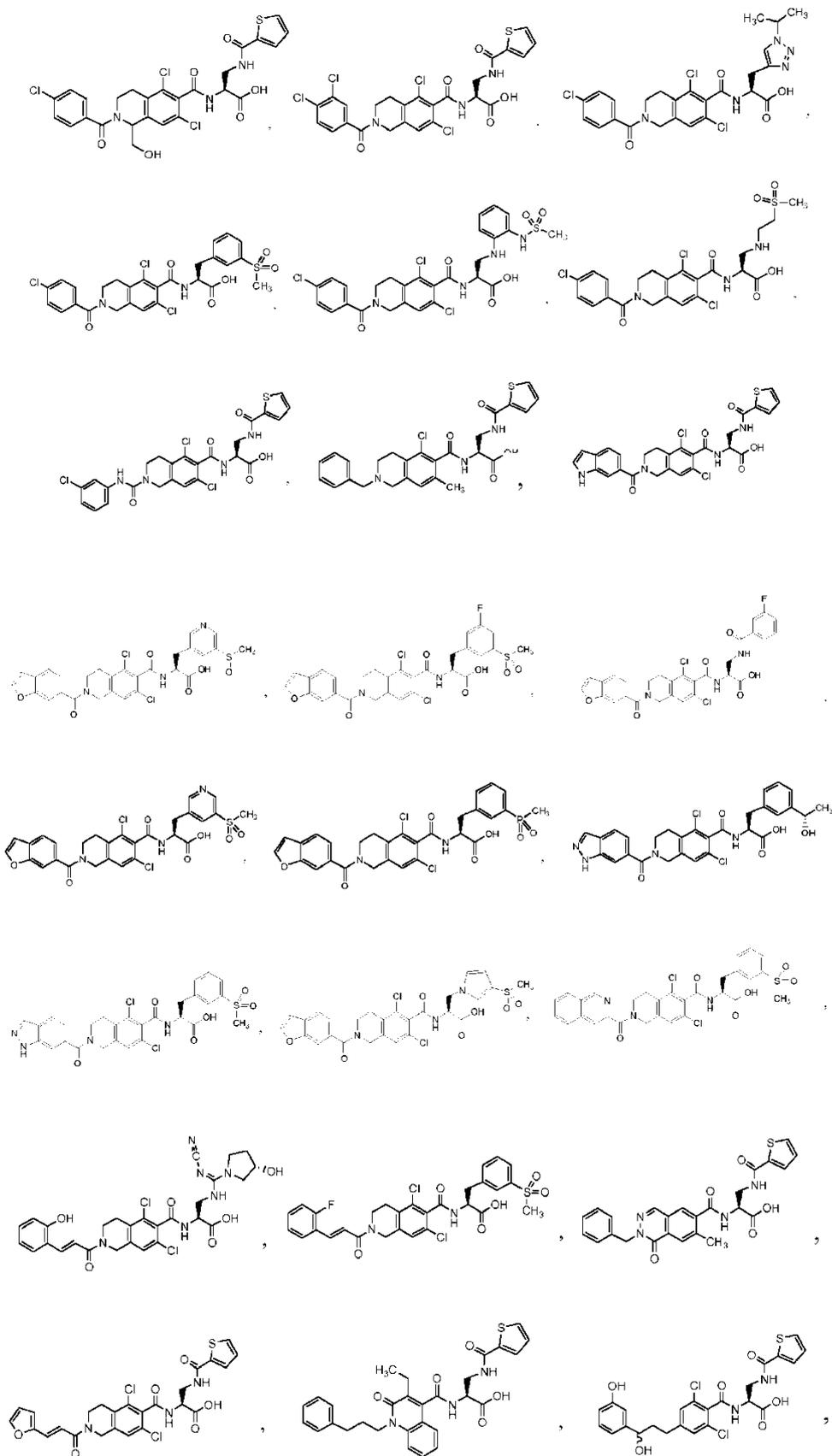
55

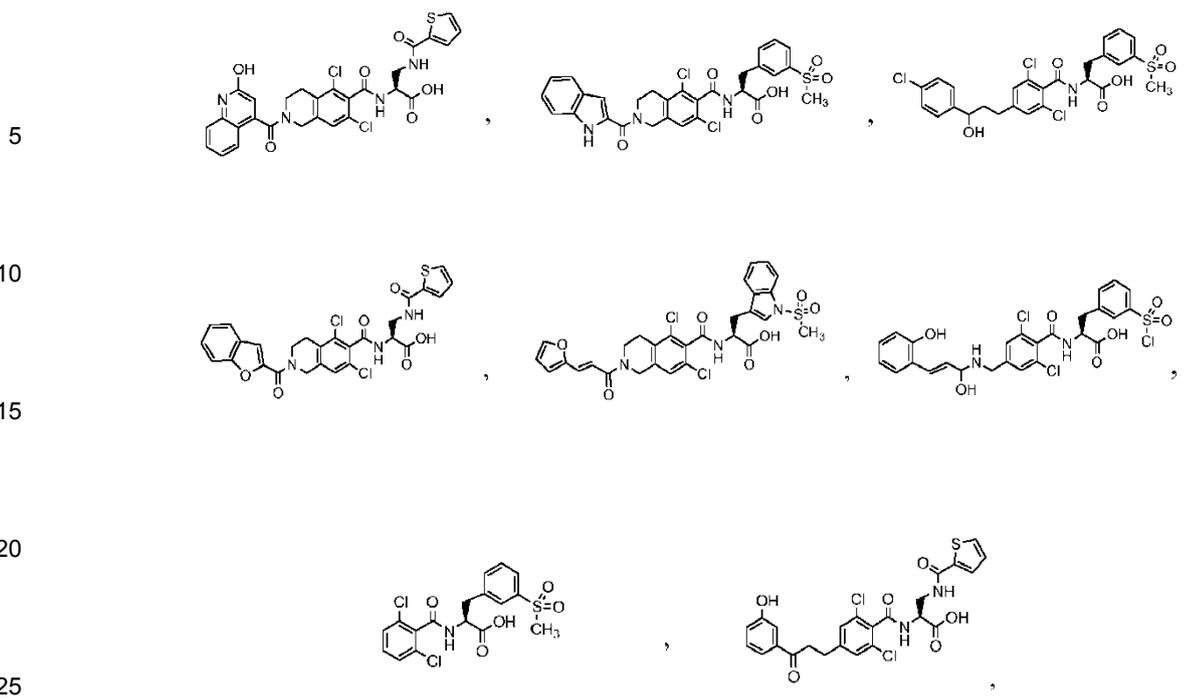


60

65





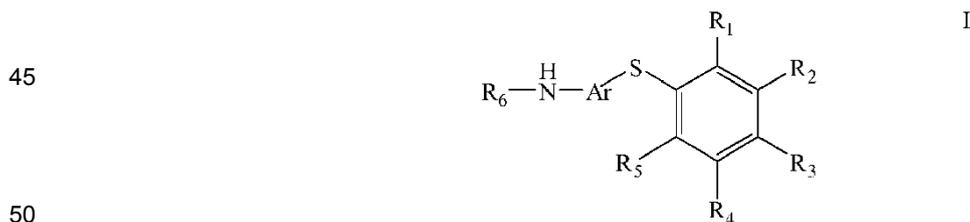


30 y sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables.

b. Compuestos de ejemplo que son antagonistas alostéricos de LFA-1

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

40 Los compuestos de Fórmula VII que son útiles como se divulga en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20080234271, en la que:

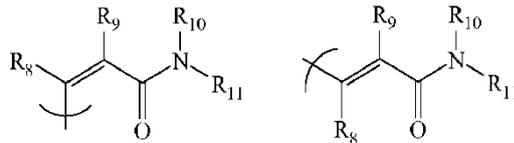


Fórmula VII

y sales y profármacos farmacéuticamente aceptables de las mismos,

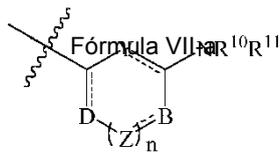
55 en las que R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ son cada uno, independientemente, hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquenoilo, alquinilo, aldehído, alcanóilo, alcoxi, amido, amino, arilo, ariloxi, carboxi, ciano, cicloalquilo, éter, éster, halógeno, heterocíclico, hidroxilo, cetona, nitro, oxo, perfluoroalquilo, sulfonilo, sulfonato, tio u otros grupos que contienen carbonilo, R₆ es alquilo no sustituido, cicloalquilo saturado no sustituido, carboxialquilo no sustituido o heterocíclicialquilo no sustituido, en los que los cicloalquilo saturado no sustituido, carboxialquilo no sustituido y heterocíclicialquilo no sustituido están unidos al NH de fórmula VII a través del grupo alquilo, en los que los carboxialquilo no sustituido comprenden una cadena alquilo ramificada, con la condición de que al menos uno de R₁ y R₃ se selecciona de:

65 A. cinamidas seleccionadas de cis-cinamida o trans-cinamida definidas como

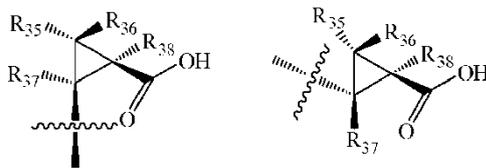


5 cis-cinamida” “trans-cinamida”

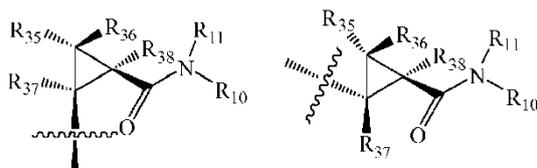
10 en las que R₈ y R₉ son cada uno independientemente hidrógeno, aldehído, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, amido, amino, arilo, carboxi, ciano, cicloalquilo, éster, éter, halógeno, hidroxilo, cetona, nitro, sulfonato, sulfonilo, tio u otros grupos que contienen carbonilo;
B. sustituyentes de fórmula VII-a:



20 en la que D, B, Y y Z son cada uno independientemente -CR³¹-, -CR³²R³³-, -C(O)-, -O-, -SO₂-, -S-, -N=, o -NR³⁴-;
n es un número entero de cero a tres; y R³¹, R³², R³³ y R³⁴ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo, carboxi, hidroxialquilo, monoalquilaminocarbonilalquilo, dialquilaminocarbonilalquilo o carboxialquilo;
C. derivados de ciclopropilo seleccionados de ácido cis-ciclopropanoico, ácido trans-ciclopropanoico, cis-ciclopropanamida y trans-ciclopropanamida definidos como

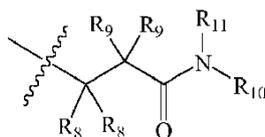


30 “ácido cis-ciclopropanoico” “ácido trans-ciclopropanoico”



40 “cis-ciclopropanamida” “trans-ciclopropanamida”

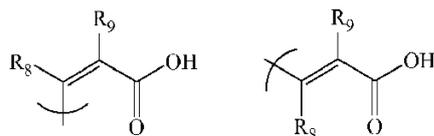
50 en las que R₃₅ y R₃₆ Son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo, carboxi, hidroxialquilo o carboxialquilo, y
en las que R₃₇ y R₃₈ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo, carboxialquilo, monoalquilaminocarbonilalquilo o dialquilaminocarbonilalquilo;
D. sustituyentes de fórmula VII-b:



55 Fórmula VII-b

60 en la que R₈ y R₉ son como se ha definido con anterioridad;
E. ácidos cinámicos de fórmula VII-c:

65



5

“ácido cis-cinámico” “ácido trans-cinámico”
Fórmula VII-c

en la que R_5 y R_9 son como se ha definido con anterioridad;

en la que:

10

R_{10} y R_{11} son cada uno independientemente hidrógeno, alcanoilo, alquilo, alquenoilo, alquinilo, alcoxi, amido, arilo, arilalquilo, carboxi, ciano, cicloalquilo, éster, éter, heterociclilo, hidroxilo, cetona, nitro, sulfoniltilio u otros grupos que contienen carbonilo, o

15

R_{10} y R_{11} se toman en conjunto con N para formar un grupo heterociclilo que comprende al menos un sustituyente que es, independientemente, hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquenoilo, alquinilo, aldehído, alcanoilo, alcoxi, amido, amino, arilo, ariloxi, carboxi, ciano, cicloalquilo, éter, éster, halógeno, heterociclilo, hidroxilo, cetona, nitro, oxo, perfluoroalquilo, sulfonilo, sulfonato, tio u otros grupos que contienen carbonilo, o

20

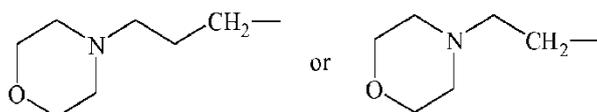
R_1 y R_2 , y/o R_4 y R_5 se unen para formar un anillo de cicloalquilo, arilo o heterociclilo de 5 a 7 miembros cuando R_3 es una cianamida, sustituyente de fórmula VII-a, sustituyente de fórmula VII-b o derivado de ciclopropilo como se ha definido anteriormente; o R_2 y R_3 y/o R_3 y R_4 , y/o R_4 y R_5 se unen para formar un anillo de cicloalquilo, arilo o heterociclilo de 5 a 7 miembros cuando R_1 se selecciona de cinnamidas, sustituyentes de fórmula VII-a, sustituyentes de fórmula VII-b y derivados de ciclopropilo como se han definido anteriormente; y

25

en las que Ar es arilo sustituido o heteroarilo sustituido que tienen al menos un sustituyente que, independientemente, es hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquenoilo, alquinilo, aldehído, alcanoilo, alcoxi, amido, amino, arilo, ariloxi, carboxi, ciano, cicloalquilo, éter, éster, halógeno, heterociclilo, hidroxilo, cetona, nitro, oxo, perfluoroalquilo, sulfonilo, sulfonato, tio u otros grupos que contienen carbonilo.

En algunos ejemplos de los compuestos de Fórmula VII, R_6 no es un heterociclilalquilo no sustituido de las siguientes estructuras:

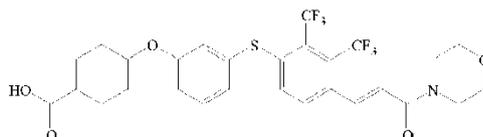
30



35

Algunos compuestos de ejemplo de fórmula VII incluyen:

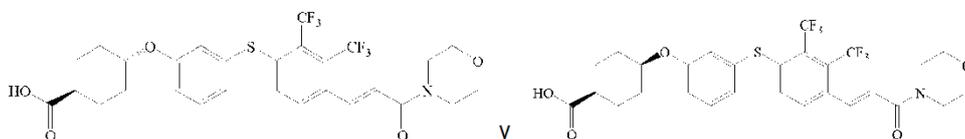
40



45

que incluye sus estereoisómeros, por ejemplo

50



55

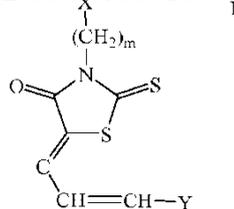
Otros compuestos de esta clase general se divulgan en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20040116518, 20050014746, 20020156314, 20020132807, 2008 0249157 y 20070066585.

60

ii. Otra familia de antagonistas alostéricos de LFA-I de molécula pequeña se divulga en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20080108677. L

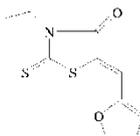
a presente divulgación proporciona compuestos de la Fórmula VIII y sus sales farmacéuticamente aceptables, que son útiles en los procedimientos descritos en el presente documento.

65

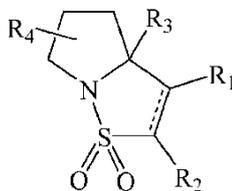


Fórmula VIII

5 El compuesto de fórmula VIII, en el que m es 0, 1 o 2; X es H, cicloalquilo o fenilo, que está no sustituido o
 10 sustituido con uno o más sustituyentes que son alquilo inferior, hidroxilo o halógeno; n es 0 o 1; e Y es fenilo,
 furanilo, indol o pirrol, todos los cuales pueden estar sustituidos con uno o más sustituyentes que son,
 independientemente, alquilo inferior, alcoxi inferior, halógeno, (3,5-dimetilfenoxi)propoxi, o fenilo, en el que el
 fenilo puede estar sustituido adicionalmente con uno o más átomos de halógeno, nitro, amino o grupos carboxilo.
 Un compuesto de ejemplo de fórmula VIII es

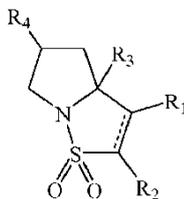


15 iii. Una familia adicional de antagonistas alostéricos de LFA-k de molécula pequeña se divulga en la solicitud de
 20 patente de Estados Unidos n.º 2008/0242710. En otro aspecto, se divulga un 3a, 4,5,6-tetrahidro-pirrolol, 2-b[
 isotiazol, y sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que el azufre está en forma de un dióxido de que es
 un compuesto de Fórmula IX, que es útil en los procedimientos descritos.



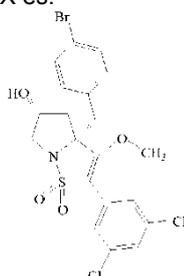
Fórmula IX

Tal como un compuesto de Fórmula IX-a:



Fórmula IX-a

45 en el que la línea de puntos es un enlace o no es un enlace, R₁ es hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido,
 alqueno, alquino, cicloalquilo, alcoxi, arilo, heterociclilo, hidroxilo, SH, SR₅, ciano, halógeno o amino o
 la línea discontinua no es un enlace y R₁ está unido al sistema de anillo mediante un doble enlace y es oxo,
 R₂ es hidrógeno, o cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo o heterociclilo,
 R₃ es hidrógeno, COOR₆, o aminocarbonilo, o alquilo opcionalmente sustituido, alqueno, alquino, aralquilo,
 50 alcoxi, cicloalquiloxi, ariloxi, o heterociciloxi,
 R₄ es hidrógeno, halógeno, hidroxilo, SH, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno, alquino, alcoxi o alquiltio, o
 R₄ es un grupo sililo, tal como trialkilsililo o trialkilsililo, por ejemplo, trialkilsililo o trialkilsililo, por ejemplo
 tri(C₁₋₆)alkilsilil(oxi), N₃, amino, o
 R₄ es heterociclilo que comprende al menos un átomo de nitrógeno como heteroátomo y que está unido a través
 de ese átomo de nitrógeno al compuesto de fórmula IX, o
 55 R₄ está unido al sistema de anillo por un doble enlace y es oxo; y
 R₅ y R₆ independientemente uno de otro son alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo o heterociclilo.
 En algunos ejemplos, el compuesto de Fórmula IX es:

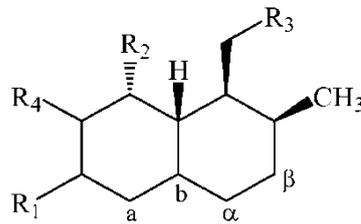


60

65

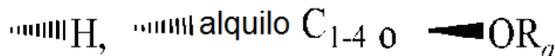
iv. Entre los antagonistas alostéricos de molécula pequeña se incluyen estatinas que se unen al dominio a de CD11 de LFA-1. Véase Kallen, J., Welzenbach, K., Ramage, P., Geyl, D. Kriwacki, R., Legge, G., Cottens, S., Weitz-Schmidt, G., y Hommel, U. 1999. "Structural basis for LFA-1 inhibition upon lovastatin binding to the CD11 a I-domain", J. Mol. Biol., 292: 1-9; y Weitz-Schmidt, G., Welzenbach, K., Brinkmann, V., Kamata, T., Kallen, J., Bruns, C., Cottens, S., Takada, Y., y Hommel, U. 2001. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site, Nature Med., 7: 687-692; y Frenette, P. S. 2001. "Locking a leukocyte integrin with statins", N. Engl. J. Med., 345: 1419-1421. Las moléculas derivadas del motivo mevinolina / compactina también muestran actividad contra LFA-1. See Welzenbach, K., Hommel, U., y Weitz-Schmidt, G. 2002. "Small molecule inhibitors induce conformational changes in the I domain and the I-like domain of Lymphocyte Function-Associated Antigen-1", J. Biol. Chem., 277: 10590-10598 y la patente de Estados Unidos n.º 6.630.492.

Se divulga una familia de antagonistas alostéricos de LFA-1 de la Fórmula X que son útiles en los procedimientos. Véase, la patente de Estados Unidos n.º 6818638. Se proporciona un compuesto de Fórmula X para su uso en los procedimientos descritos, en la que

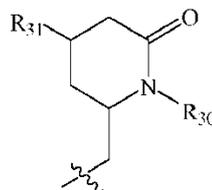


Fórmula x

Cada uno de a --- b y α --- β , independientemente, es un enlace simple o un doble enlace; R1 es



R_a es H, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido con OH o alcoxi C₁₋₄, alqueno C₂₋₆ o aril-alquilo C₁₋₄;
 R₂ es OH; -O-CO-R₅;
 R₄ es H o OR₁₉, en el que R₁₉ es alquilo C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₄-alquilo C₁₋₆, aril-alquilo C₁₋₄ o alcoxi C₁₋₄-carbonil-alquilo C₁₋₄;
 R₅ es alquilo C₁₋₈, cicloalquilo C₃₋₇, cicloalquilo C₃₋₇-alquilo C₁₋₄, arilo o aril-alquilo C₁₋₄; o R₅ es -O-R₆, en el que R₆ es el residuo de un α -aminoácido unido a O a través de su residuo carbonilo; o -R₅ es -CHR₇-COR₈ en el que R₇ es H, alquilo C₁₋₄, heteroalquilo C₁₋₄, cicloalquilo C₃₋₇, cicloalquilo C₃₋₇-alquilo C₁₋₄, arilo o aril-alquilo C₁₋₄ y R₈ es OH, alcoxi C₁₋₄ o NR₉ R₁₀;
 cada uno de R₉ y R₁₀ es, independientemente, H o alquilo C₁₋₄, o R₉ y R₁₀ forman junto con el nitrógeno al que están unidos, un grupo heteroarilo;
 R₃ es una lactama de fórmula Xa:

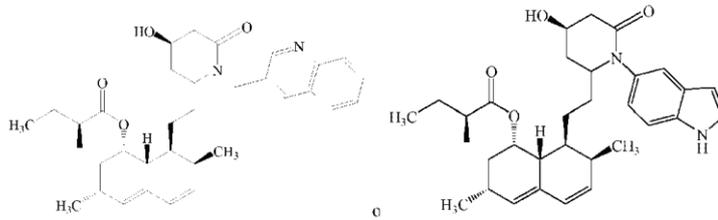


X-a

en la que R₃₀, es alquilo C₁₋₈, cicloalquilo C₃₋₇, arilo, cicloalquilo C₃₋₇-alquilo C₁₋₄, aril-alquilo C₁₋₄, heteroarilo o heteroarilo C₁₋₄; y
 R₃₁, es OH, alcoxi C₁₋₄, alquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄-carbonil-alquilo C₁₋₄, hidroxialcoxi C₁₋₅, alcoxi C₁₋₄-alcoxi C₁₋₅, alcoxi C₁₋₄-carbonil-alquilo C₁₋₄, amino-alcoxi C₁₋₄, HOOC-alcoxi C₁₋₄, HOOC-alquilo C₁₋₄, R_{9a} R_{10a} N-C₁₋₅ alcoxi, en el que R_{9a} y R_{10a} son, independientemente, R₉ o R₁₀.
 En algunas realizaciones, siempre que aparece "arilo" o "aril-alquilo C₁₋₄" la definición anterior, es "fenilo" o "naftilo" opcionalmente sustituido por halógeno, OH, NR₁₁ R₁₂, COOH, CF₃, alcoxi C₁₋₄, alquilo C₁₋₄, hidroxial-

alquilo C₁₋₄, hidroxi-alcoxi C₁, alcoxi C₁₋₄-carbonilo, ciano o CORN₁₁ R₁₂, cada uno de los cuales R₁₁ y R₁₂ es, independientemente, H, alquilo C₁₋₄, fenilo, naftilo, fenil-alquilo C₁₋₄ o naftil-alquilo C₁₋₄ o R₁₁ y R₁₂ junto con el nitrógeno al que están unidos forman heteroarilo; y siempre que aparece "heteroarilo", es un heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente condensado a un anillo de benceno; en forma libre o en forma de sal.

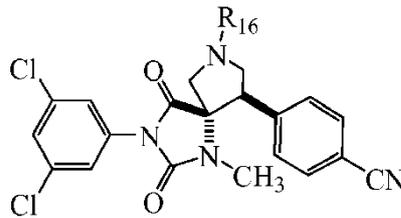
En algunos ejemplos, el compuesto de fórmula X es uno de los siguientes compuestos:



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

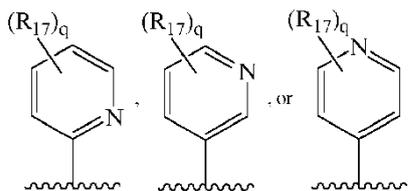
Una familia de tales inhibidores basados en hidantoína de Fórmula XI se divulga en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2006/0148836.

Se proporciona en compuesto de acuerdo con la fórmula XI,



Fórmula XI

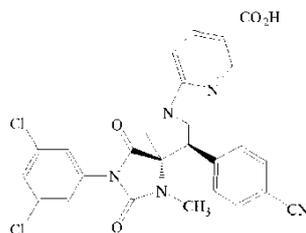
y sus enantiómeros, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, de los mismos, en la que: R₁₆ es:



cada R₁₇ es, independientemente, -OR₁₈, -NR₁₈R₁₉, -C(=O)R₁₈, -CO₂R₁₈, -C(=O)NR₁₈R₁₉, -NR₁₈C(=O)R₁₉, -NR₁₈C(=O)OR₁₉, -S(O)_pR₁₉, -NR₁₈SO₂R₁₉, o -SO₂NR₁₈R₁₉;

R₁₈ y R₁₉ son, independientemente, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; q es 1, 2, o 3; y p es 1 o 2.

En un ejemplo, el compuesto de fórmula XI es:



Otros compuestos de la clase general de compuestos espiro-hidantoína que puede ser útil como antagonistas alostéricos de LFA-1 son las publicaciones de solicitud de Estados Unidos n.º 20060142319, 20060074099, 20060052434, 20050119279, 20050004153, 20040259897, 20040248920, 20040009998 y 20020143035.

5 c. Otros antagonistas de molécula pequeña.

Otras familias de inhibidores de molécula pequeña se dan a conocer en las publicaciones (véase Gadek, T. R., Burdick, D. J., McDowell, R. S., Stanley, M. S., Marsters, J. C. Jr., Paris, K. J., Oare, D. A., Reynolds, M. E., Ladner, C., Zioncheck, K. A., Lee, W. P., Gribbling, P., Dennis, M. S., Skelton, N. J., Tumas, D. B., Clark, K. R., Keating, S. M., Beresini, M. H., Tilley, J. W., Presta, L. G., y Bodary, S. C. 2002. "Generation of an LFA-1 antagonist by the transfer of the ICAM-1 immunoregulatory epitope to a small molecule" *Science*, 295: 1086-1089 y material complementario online.) y en patentes, incluyendo la Patente de EE.UU. n.º 6.872, 735, la patente de Estados Unidos n.º 6.667.318, la patente de Estados Unidos n.º 6803384, la patente de Estados Unidos n.º 6.515.124, la patente de Estados Unidos n.º 6331640, y solicitudes de patentes, incluyendo: documento U.S. 20020119994, documento U.S. 20040058968, documento U.S. 20050080119, documento WO99/49856, documento WO00/21920, documento WO01/58853, documento WO02/59114, documento WO05/044817, y otras. Los compuestos se pueden preparar por procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia o divulgados en las referencias incorporadas en el presente documento y se pueden purificar de varias formas, incluyendo mediante cristalización o precipitación en condiciones variadas para producir una o más polimorfos. Por lo tanto, la presente descripción abarca los compuestos de la invención descritos anteriormente, sus polimorfos, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus solvatos farmacéuticamente aceptables y composiciones farmacéuticamente aceptables que los contienen.

Se pretende que los ejemplos anteriores de las realizaciones preferidas ilustren algunas de los potenciales agentes terapéuticos. También se divulgan anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, péptidos y otras moléculas sintéticas que son inhibidores selectivos e inhibidores competitivo directamente de la interacción entre LFA-1 e ICAM-1, con el fin de tratar los síntomas de la retinopatía diabética.

II. Procedimientos de tratamiento

El término "sujeto" tal como se utiliza en el presente documento incluye animales, en particular seres humanos, así como otros mamíferos.

El término "tratar" y sus equivalentes gramaticales, como se usa en el presente documento, incluye lograr un beneficio terapéutico y / o un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico se entiende la erradicación o mejora de la enfermedad subyacente que está siendo tratada. Además, un beneficio terapéutico se logra con la erradicación o mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con el trastorno subyacente de tal manera que se observa una mejora en el sujeto, a pesar de que el sujeto todavía puede estar afectado por el trastorno subyacente. Para el beneficio profiláctico, las composiciones se pueden administrar a un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad particular, o a un sujeto que refiera uno o más de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, a pesar de que puede que no se haya realizado un diagnóstico de esta enfermedad. Las composiciones se pueden administrar a un sujeto para prevenir la progresión de los síntomas fisiológicos o de la enfermedad subyacente.

En algunos ejemplos, se proporcionan procedimientos para administrar un agente terapéutico a un sujeto para tratar la retinopatía diabética. En algunas realizaciones de la invención, el agente terapéutico es un antagonista de LFA-1. En algunas realizaciones, el antagonista de LFA-1 es un antagonista competitivo directamente de LFA-1. En algunas realizaciones, el antagonista del LFA-1 es un antagonista competitivo de LFA-1. En algunas realizaciones, el antagonista del LFA-1 es un antagonista alostérico de LFA-1. En algunas realizaciones de la invención, el antagonista de LFA-1 puede modular la inflamación mediada por leucocitos. Otro ejemplo trata a un sujeto mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1 para modular la inflamación asociada con la inflamación ocular. En un ejemplo se trata un sujeto con síntomas de la retinopatía diabética mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1. En algunos ejemplos se proporcionan procedimientos para tratar a un sujeto con síntomas de diabetes de tipo II mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1. En algunos ejemplos se proporcionan procedimientos para tratar a un sujeto con síntomas de diabetes de tipo II mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1. En algunos ejemplos se proporcionan procedimientos para tratar a un sujeto mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1 para disminuir el edema de la retina en un ojo del sujeto. En otros ejemplos se proporcionan procedimientos para tratar a un sujeto mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1 para disminuir el edema macular. En otros ejemplos se proporcionan procedimientos para tratar a un sujeto mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1 para disminuir el engrosamiento de la membrana basal en un ojo del sujeto. En todavía otros ejemplos se proporcionan procedimientos para tratar a un sujeto mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1 para disminuir la neovascularización de la retina en un ojo del sujeto. En algunos ejemplos se proporcionan procedimientos para tratar a un sujeto mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1 para retrasar la pérdida de la visión debido a la retinopatía diabética. En algunos ejemplos se proporcionan procedimientos para tratar a un sujeto mediante la administración

de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1 para disminuir la isquemia de la retina en un ojo del sujeto. En otros ejemplos, se proporcionan procedimientos para disminuir el crecimiento fibrovascular sobre una retina en un ojo de un sujeto que sufre retinopatía diabética, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1. En algunos ejemplos, se proporcionan procedimientos para reducir la lesión o la degeneración retiniana debidas a la retinopatía diabética en un ojo de un sujeto que sufre retinopatía diabética, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1. En otros ejemplos, se proporcionan procedimientos para limitar el daño no proliferativo en una retina en un ojo de un sujeto que sufre retinopatía diabética, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1. En otros ejemplos, se proporcionan procedimientos para limitar el daño proliferativo lento en una retina en un ojo de un sujeto que sufre retinopatía diabética, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1. En algunos otros ejemplos, se proporcionan procedimientos para reducir o prevenir el daño de reperfusión isquémica en un ojo de un sujeto que lo necesite mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1. En algunos ejemplos, se proporcionan procedimientos en los que el antagonista de LFA-1 que se administra al sujeto que sufre retinopatía diabética, se une a un sitio de unión de alta afinidad en la subunidad α L de LFA-1 que solapa con el sitio de unión de ICAM-1. Algunas realizaciones de la invención utilizan compuestos que son directamente inhibidores competitivos de la interacción LFA-1/ICAM-1. Algunas de las realizaciones de la invención utilizan compuestos que compiten directamente por un sitio de unión de alta afinidad común para ICAM-1 en LFA-1. En algunos ejemplos, se proporcionan procedimientos mediante que administran a un sujeto en necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1, que es un compuesto de las Fórmulas I, II, II', III, III', IV, IV', V o VI. En algunos ejemplos, se proporcionan procedimientos que administran a un sujeto en necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de LFA-1, que es un compuesto de las Fórmulas VII, VIII, IX, X o XI.

En otras intervenciones terapéuticas que pueden asociarse con complicaciones de la diabetes en el ojo, se pueden utilizar procedimientos de vitrectomía. Se ha demostrado que la dexametasona, un esteroide glucocorticoide, es útil en la reducción de la inflamación postoperatoria que se puede potenciar en sujetos diabéticos en relación con sujetos no diabéticos. Por lo tanto, puede ser deseable utilizar un antagonista de LFA-1 de la invención para reducir la inflamación. En algunos ejemplos, se proporcionan procedimientos para reducir la inflamación postoperatoria en sujetos diabéticos sometidos a procedimientos de vitrectomía mediante la administración de un antagonista de LFA-1 al sujeto en necesidad del mismo. Además, en algunas realizaciones, un antagonista de LFA-1 de la invención se puede administrar a un sujeto antes de un procedimiento de vitrectomía para reducir profilácticamente la inflamación postoperatoria.

En otras intervenciones terapéuticas que se pueden asociar con complicaciones de la diabetes en el ojo, se puede usar terapia fotodinámica para corregir la oclusión o las fugas, y puede causar una inflamación excesiva en un sujeto diabético. Por lo tanto, puede ser deseable utilizar un antagonista de LFA-1 para reducir la inflamación. En algunos ejemplos, se proporcionan procedimientos para reducir la inflamación postoperatoria en sujetos diabéticos sometidos a procedimientos fotodinámicos terapéuticos (FDT) mediante la administración de un antagonista de LFA-1 al sujeto en necesidad del mismo. Además, en algunas realizaciones, un antagonista de LFA-1 se puede administrar a un sujeto antes de un procedimiento de FDT para reducir profilácticamente la inflamación postoperatoria.

En otras intervenciones terapéuticas que se pueden asociar con complicaciones de la diabetes en el ojo, se puede usar terapia de fotocoagulación con láser para corregir la oclusión o las fugas, y puede causar una inflamación excesiva en un sujeto diabético. Por lo tanto, puede ser deseable utilizar un antagonista de LFA-1 para reducir la inflamación. En algunos ejemplos, se proporcionan procedimientos para reducir la inflamación postoperatoria en sujetos diabéticos sometidos a procedimientos terapéuticos de fotocoagulación con láser mediante la administración de un antagonista de LFA-1 al sujeto en necesidad del mismo. Además, en algunas realizaciones, un antagonista de LFA-1 se puede administrar a un sujeto antes de un procedimiento de terapia de fotocoagulación con láser para reducir profilácticamente la inflamación postoperatoria.

En el tratamiento con LASIK de defectos de la visión, los pacientes diabéticos tienen un riesgo mayor de complicaciones postoperatorias de inflamación y defectos en la córnea epitelial que los pacientes no diabéticos, y puede estar indicado un tratamiento con antiinflamatorios. En algunos ejemplos se proporcionan procedimientos para reducir la inflamación debido a complicaciones de la diabetes por el tratamiento LASIK en un ojo de un sujeto del mismo, mediante la administración de un antagonista de LFA-1 y, por lo tanto, reducir tal inflamación. La administración se realiza después de la operación o antes de la operación para prevenir profilácticamente o reducir dicha inflamación.

Los individuos con DME tienen mayor riesgo de desarrollo de cataratas, que es una causa frecuente de pérdida de visión. Los pacientes diabéticos tienen un mayor riesgo de complicaciones del segmento anterior y posterior después de la cirugía de cataratas. Uno de los más significativos de estos es la neovascularización del iris, ya que puede progresar a glaucoma neovascular. Otras complicaciones de la cámara anterior incluyen dispersión de pigmentos con precipitados en la superficie de la lente intraocular (LIO) recién implantada, formación de exudados

de fibrina o de membrana (de la inflamación) en la cámara anterior. En algunos ejemplos se proporcionan procedimientos para reducir las complicaciones del segmento anterior o posterior después de la cirugía de cataratas en un ojo de un sujeto con EMD, mediante la administración de un antagonista de LFA-1 a un sujeto en necesidad del mismo. En algunos ejemplos, se proporcionan procedimientos para administrar profilácticamente un antagonista del LFA-1 a un sujeto con EMD que tiene un mayor riesgo de desarrollar cataratas en comparación con un sujeto sano, de modo que se reduce o previene el desarrollo de cataratas.

Los procedimientos generalmente implican la administración de uno o más fármacos para el tratamiento de la retinopatía diabética, en los que el fármaco se administra o se distribuye posteriormente a la liberación en la retina o la región intraocular del ojo. Se pueden usar combinaciones de agentes para tratar la retinopatía diabética o para modular los efectos secundarios de uno o más agentes en la combinación. Dado que los acontecimientos patológicos en este estado de enfermedad se caracterizan por una combinación de autorregulación alterada, apoptosis, isquemia, tejido reperfundido, neovascularización, y estímulos inflamatorios, puede ser deseable administrar los antagonistas de LFA-1 de la invención en combinación con otros agentes terapéuticos para intervenir adicionalmente o sinérgicamente. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un antioxidante, agente antiinflamatorio, antimicrobiano, agente antiangiogénico, y/o agente antiapoptótico. En algunas realizaciones de la invención, además de la administración de un compuesto que compite directamente por la unión a LFA-1, se puede administrar un agente terapéutico adicional, que es un antagonista alostérico, pero no competitivo directo, de LFA-1 como se ha tratado anteriormente, lo que potencialmente da como resultado una eficacia sinérgica. Un ejemplo de dicho antagonista alostérico es la clase de inhibidores de hidantoína de LFA-1. Otros ejemplos de antagonistas alostéricos incluyen compuestos de las Fórmulas VII, VIII, IX, X o XI.

Otra clase de agentes terapéuticos que pueden ser útiles al administrar en combinación con, antes de, después de o junto con los antagonistas de LFA-1 de la invención es un anticuerpo terapéutico antiadhesión o fragmento de anticuerpo.

Otra clase de agentes terapéuticos que pueden ser útiles para administrar en combinación, antes, después o de forma concomitante con los antagonistas de LFA-1 de la invención es el grupo de fármacos que inhiben el factor de crecimiento endotelial vascular y, por lo tanto, se pueden dirigir a otra ruta de inicio de la neovascularización. Cualquier inhibidor de VEGF puede ser de uso en las composiciones de la invención, que incluyen, 1) anticuerpos monoclonales neutralizantes contra VEGF o su receptor, 2) inhibidores de molécula pequeña de tirosina quinasa de receptores de VEGF, 3) receptores de VEGF solubles que actuar como receptores señuelo para VEGF, 4) ribozimas que se dirigen específicamente a VEGF, y 5) ARNip que están dirigidos específicamente a las proteínas de señalización de VEGF. Algunos ejemplos de anticuerpos que son activos contra VEGF son, por ejemplo, por ejemplo, Lucentis (ranibizumab) y Avastin (bevacizumab). Un ejemplo de un fármaco oligonucleotídico es, por ejemplo, Macugen (inyección de pegaptanib sódico). Entre los inhibidores de la tirosina cinasa de molécula pequeña se incluyen, por ejemplo, pazopanib, sorafenib, sorafenib, sutent.

La inflamación es inducida por la permeabilidad vascular causada por la RD y por el proceso de adhesión de leucocitos y la neovascularización. Por lo tanto, se pueden administrar otros agentes antiinflamatorios en combinación, antes de, después de, o junto con, antagonistas de LFA-1. Los agentes antiinflamatorios se pueden elegir de fármacos relacionados con corticosteroides, que incluyen, pero no se limitan a, dexametasona, fluorometalona, medrisona, betametasona, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, prednisona, prednisolona, hidrocortisona, rimexolona, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, prednicarbo, deflazacort, halometasona, tixocortol, prednilideno, prednival, parametasona, metilprednisolona, meprednisona, mazipredona, isoflupredona, acetato de halopredona, halcinonido, formocortal, flurandrenolida, fluprednisolona, acetato fluprednidina, acetato de fluperolona, fluocortolona, butil fluocortina, fluocinonida, acetónido de fluocinolona, flunisolida, flumetasona, fludrocortisona, fluclorinida, enoxolona, difluprednato, difluocortolona, diacetato de diflorasone, desoximetasona (desoximetasona), desonida, descinolona, cortivazol, corticosterona, cortisona, cloprednol, clocortolona, clobetasona, clobetasol, cloroprednisona, cafestol, budesonida, beclometasona, amcinonida, alopregnano acetónido, aldometasona, 21-acetoxipregnenolona, tralonida, acetato de diflorasona, deacilcortivazol.

Como alternativa, los agentes antiinflamatorios se pueden elegir del grupo de AINE, incluyendo paracetamol, acemetacina, aceclofenaco, alminoprofeno, amfenac, bendazac, benoxaprofeno, bromfenaco, ácido buclórico, butibufeno, carprofeno, celecoxib, cinmetacino, clopirac, diclofenaco, etodolac, etoricoxib, felbinac, ácido fenclórico, fenbufen, fenoprofeno, fentiazac, flunoxaprofeno, flurbiprofeno, ibufenaco, ibuprofeno, indometacina, isofezolac, isoxicam, isoxepac, indoprofeno, ketoprofeno, lonazolac, loxoprofeno, ácido mefenámico, ácido meclofenámico, meloxicam, ácido metiazínico, mofezolac, miroprofeno, naproxeno, niflumic, oxaprozina, pirozolac, pirprofeno, pranoprofeno, ácido protizínico, rofecoxib, ácido salicílico y sus derivados (es decir, por ejemplo, aspirina), sulindac, suprofen, suxibuzona, ácido triaprofénico, tolmetina, valdecoxib, xenbucin, ximoprofeno, zaltoprofeno, zomepirac, aspirina, acemetacina, bumadizon, carprofenac, clidanac, diflunisal, ácido enfenámico, fendosal, ácido flufenámico, flunixina, ácido gentsílico, ketorolac, mesalamina, profármacos de los mismos.

Otro grupo de agentes terapéuticos que pueden ser útiles para administrar en combinación, antes de, después de, o junto con los antagonistas de LFA-1 es el grupo de fármacos que se sabe que inhiben la retinopatía mediante la

inhibición de NFK β . Algunas de estas clases de agentes terapéuticos incluyen inhibidores de PARP, benfotiamina u otros agentes que intervienen en el bloqueo de los AGE (productos finales de glicación avanzada), inhibidores de la aldosa reductasa, inhibidores de iNOS, inhibidores de FasL, o angiopoyetina-1.

- 5 El estrés oxidativo puede inducirse en células con alteraciones de la autorregulación y procesos isquémicos inducidos por la RD. Por lo tanto, los antioxidantes pueden ser útiles para administrar en combinación, antes de, después de, o junto con antagonistas de LFA-1 de la invención. Entre los ejemplos de antioxidantes adecuados se incluyen ácido ascórbico, tocoferoles, tocotrienoles, carotenoides, glutatión, ácido alfa-lipoico, ubiquinoles, bioflavonoides, carnitina y miméticos de superóxido dismutasa, tales como, por ejemplo, 2,2,6,6-tetrametil-1-
10 piperidiniloxi (TEMPO), DOXYL, PROXYL compuestos de nitróxido; 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (Tempol), M-40401, M-40403, M-40407, M-40419, M-40484, M-40587, M-40588.

En algunas etapas de la retinopatía diabética, se produce isquemia retiniana, lo que da lugar a la posterior muerte celular. En algunos ejemplos, se proporcionan procedimientos en los que los agentes terapéuticos antiapoptóticos se
15 pueden administrar en combinación, antes de, después de, o junto con los antagonistas de LFA-1. Los ejemplos de agentes antiapoptóticos adecuados son, por ejemplo, los inhibidores de caspasas, catepsinas, y TNF- α .

Otra clase de agentes terapéuticos que pueden ser útiles para administrar en combinación, antes de, después de, o junto con los antagonistas de LFA-1 de la invención son los inhibidores del complemento. El acontecimiento de unión
20 de LFA-1/ICAM está aguas abajo de la activación del complemento de la regulación por aumento de ICAM en el tejido y en las células epiteliales vasculares/capilares. La administración de tanto un inhibidor del complemento como un antagonista de LFA-1 puede permitir la modulación más completa de leucocitos que expresan LFA-1. Un ejemplo de un inhibidor del complemento es eculizumab. Otros inhibidores del complemento incluyen, pero no se limitan a las mismas, las patentes de Estados Unidos n.º 7166568, 6319897, 5843884, 5135916 y 5624837.

25 Otra clase de agentes terapéuticos que pueden ser útiles para administrar en combinación, antes de, después de o junto con los antagonistas de LFA-1 son medicamentos que se usan en el tratamiento del glaucoma en pacientes con DM de fondo, que incluye glaucoma primario de ángulo abierto, de ángulo cerrado y también neovascular. Algunos de los agentes terapéuticos utilizados para el glaucoma incluyen análogos de prostaglandinas, tales como,
30 por ejemplo, latanoprost, bimatoprost, y travaprost; antagonistas tópicos de receptores beta-adrenérgicos, tales como, por ejemplo, timolol, levobunolol, y betaxolol; agonistas alfa 2- adrenérgicos, tales como, por ejemplo, brimonidina; simpaticomiméticos, tales como, por ejemplo, epinefrina o dipivifrina; agentes mióticos, tales como, por ejemplo, pilocarpina; inhibidores de la anhidrasa carbónica, tales como, por ejemplo, dorzolamida, brinzolamida y acetazolamida; o fisostigmina.

35 Otra clase de agentes terapéuticos que pueden ser útiles para administrar en combinación, antes de, después de, o junto con los antagonistas de LFA-1 de la invención son los agentes antimicrobianos. Compuestos antimicrobianos adecuados incluyen penicilinas, tales como, por ejemplo, amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, nafcilina, penicilina, piperacilina, ticarcilina; inhibidores de beta-lactamasa; carbapenems, tales como, por ejemplo, ertapenem, imipenem, meropenem; cefalosporinas, tales como, por ejemplo,
40 cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozilo, cefuroxima, cefixima, cefdinir, cefditoren, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, cefadroxilo, ceftazidima, ceftibuteno, ceftizoxima, ceftiraxona, cefazolina, cefixima, cefalexina, cefepima; quinolonas, tales como, por ejemplo, ciprofloxacino, enoxacino, gatifloxacino, levofloxacino, lomefloxacino, morifloxacino, norfloxacino, ofloxacino, trovafloxacino; macrólidos, tales como, por ejemplo, azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, milbemicina, troleandomicina, y similares; monbactams, tales como, por ejemplo, aztreonam; tetraciclinas, tales como, por ejemplo, demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraclina, tetraciclina; aminoglucósidos, tales como, por ejemplo, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, estreptomina, tobramicina, y similares; carbacefem, tal como, por ejemplo, loracarbef; estreptograminas; sulfonamidas, tales como, por ejemplo, mefanida, prontosil, sulfacetamida, sulfametizol, sulfanilamida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol; y las combinaciones de fármacos,
50 tales como, por ejemplo, sulfametoxazol y trimetoprim; y polipéptidos, tales como, por ejemplo, bacitracina, colistina, polimixina B.

Entre los ejemplos de otros agentes terapéuticos que pueden ser útiles para administrar en combinación, antes de,
55 después de, o junto con los antagonistas de LFA-1 se incluyen: (a) agentes antidiabéticos, tales como insulina y miméticos de insulina, sulfonilureas (por ejemplo, gliburida, meglinatida), biguanidas, por ejemplo, metformina (Glucophage™), inhibidores de la alfa-glucosidasa (acarbosa), sensibilizantes de la insulina, por ejemplo, compuestos de tiazolidinona, rosiglitazona (Avandia™), troglitazona (Rezulin™), ciglitazona, pioglitazona (Actos™) y englitazona; (b) agentes reductores del colesterol, tales como inhibidores de la HMG-CoA reductasa (por ejemplo, lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina y otras estatinas), secuestrantes de ácidos biliares (por ejemplo, colestiramina y colestipol), vitamina B₃ (también conocida como ácido nicotínico o niacina), vitamina B₆ (piridoxina), vitamina B₁₂ (cianocobalamina), derivados de ácido fibrico (por ejemplo, gemfibrozilo, clofibrato, fenofibrato y benzafibrato), probucol, nitroglicerina, e inhibidores de la absorción de colesterol (por ejemplo, inhibidores de beta-sitosterol y acilCoA-colesterol aciltransferasa (ACAT), tales como melinamida), inhibidores de la HMG-CoA sintasa, inhibidores de la escualeno epoxidasa e inhibidores de la escualeno sintetasa; y (c) agentes
65 antitrombóticos, tales como agentes trombolíticos (por ejemplo, la estreptoquinasa, alteplasa, anistreplasa y

retiplasa), heparina, hirudina y derivados de warfarina, beta-bloqueantes (por ejemplo, atenolol), agonistas beta-adrenérgicos (por ejemplo, isoproterenol), inhibidores de la ECA y vasodilatadores (por ejemplo, nitroprusiato de sodio, hidrocloreto de nicardipina, nitroglicerina y enalaprilat).

5 En algunas realizaciones, el antagonista de LFA-1 está presente en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéutico para reducir los síntomas de la retinopatía diabética en un promedio de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, más de 90 %, o para eliminar sustancialmente los síntomas de la retinopatía diabética.

10 En otros ejemplos, el antagonista de LFA-1 está presente en una cantidad suficiente para reducir la degeneración de la retina en un sujeto en un promedio de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, más de 90 %, o para eliminar sustancialmente la degeneración de la retina.

15 En algunos ejemplos, el antagonista de LFA-1 está presente en una cantidad suficiente para disminuir el edema retiniano en un ojo tratado de un sujeto en un promedio de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, más de 90 %, o para eliminar sustancialmente el edema retiniano.

20 En todavía otros ejemplos, el antagonista de LFA-1 está presente en una cantidad suficiente para disminuir el engrosamiento de la membrana basal en un ojo tratado de un sujeto en un promedio de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, más de 90 %, o para eliminar sustancialmente el engrosamiento de la membrana basal.

25 En algunos ejemplos, el antagonista de LFA-1 está presente en una cantidad suficiente para disminuir la neovascularización de la retina en un ojo tratado de un sujeto en un promedio de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, más de 90 %, o para eliminar sustancialmente la neovascularización de la retina.

30 En algunos ejemplos, el antagonista de LFA-1 está presente en una cantidad suficiente para disminuir el crecimiento fibrovascular sobre la retina en un ojo tratado de un sujeto en un promedio de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, más de 90 %, o para eliminar sustancialmente el crecimiento fibrovascular sobre la retina.

35 En algunos ejemplos, el antagonista de LFA-1 está presente en una cantidad suficiente para retardar la pérdida de la visión en un ojo tratado de un sujeto en un promedio de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, más de 90 %, o para eliminar sustancialmente una mayor pérdida de visión.

40 En algunos ejemplos, el antagonista de LFA-1 está presente en una cantidad suficiente para limitar el daño no proliferativo de una retina de un sujeto en un promedio de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, más de 90 %, o para eliminar sustancialmente el daño no proliferativo a la retina.

En algunos ejemplos, el antagonista de LFA-1 está presente en una cantidad suficiente para ralentizar el daño proliferativo de una retina de un sujeto en un promedio de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, más de 90 %, o para eliminar sustancialmente un mayor daño no proliferativo a la retina.

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

50 La administración del agente terapéutico puede ser por cualquier medio adecuado. En algunas realizaciones, el agente terapéutico se administra por administración oral. En algunas realizaciones, el agente terapéutico se administra por administración transdérmica. En algunas realizaciones, el agente terapéutico se administra mediante instilación. En algunas realizaciones, el agente terapéutico se administra mediante inyección. En algunas realizaciones, el agente terapéutico se administra mediante inyección intravítrea de liberación lenta. En algunas realizaciones, el agente terapéutico se administra mediante implantación intraocular de liberación lenta. En algunas realizaciones, el agente terapéutico se administra mediante implantación periocular. En algunas realizaciones, el agente terapéutico se administra por vía tópica. En algunas realizaciones, el agente terapéutico se administra por vía tópica, a través de una gota ocular. Si las combinaciones de agentes se administran como composiciones separadas, se pueden administrar por la misma vía o por vías diferentes. Si las combinaciones de agentes se administran en una única composición, se pueden administrar por cualquier vía adecuada. En algunas realizaciones, las combinaciones de agentes se administran como una sola composición mediante administración oral. En algunas realizaciones, las combinaciones de agentes se administran como una sola composición mediante administración transdérmica. En algunas realizaciones, las combinaciones de agentes se administran como una sola composición mediante inyección. En algunas realizaciones, las combinaciones de agentes se administran como una sola composición por vía tópica.

65 En algunas realizaciones de la invención, se emplearán procedimientos de diagnóstico para identificar a un sujeto en

necesidad de tratamiento mediante el procedimiento de la invención. Una lista de ejemplos de procedimientos que se pueden utilizar para diagnosticar síntomas de retinopatía diabética, incluye, por ejemplo, exploración oftálmica completa (que puede incluir exploración de la rejilla de Amsler y exploración con lámpara de hendidura), fotografía del fondo, angiografía con fluoresceína, tomografía de coherencia óptica, fotografía no miriádica y barrido de ultrasonidos beta, exploración ocular convencional, tomografía de coherencia óptica, barrido de ultrasonidos beta solo, exploración oftálmica completa con la fotografía del fondo y angiografía con fluoresceína.

El antagonista puede ser un anticuerpo, fragmento de un anticuerpo, péptido o molécula pequeña. En algunos ejemplos, el antagonista del LFA-1 utilizado es un péptido que no es un anticuerpo. En otros ejemplos, el antagonista de LFA-1 utilizado es una molécula pequeña.

En algunos ejemplos, tratar o prevenir los síntomas de la retinopatía diabética mediante el uso de antagonistas de LFA-1 requiere terapia crónica; por lo tanto, se pueden usar inhibidores de molécula pequeña de la interacción LFA-1/ICAM-1, ya que tienen el potencial de administración local como gotas oculares con un coste reducido de los productos. Del mismo modo la administración oral ofrece ventajas en cuanto al coste reducido de los productos. Los dispositivos implantables, que pueden ser biodegradables o bioabsorbibles o formulaciones biodegradables de liberación lenta o de liberación sostenida implantadas o inyectadas en el ojo o cerca del ojo en el tejido periorcular se utilizan para la terapia crónica.

Otro ejemplo es un procedimiento para tratar los síntomas de la retinopatía diabética mediante agentes terapéuticos que son adecuados para la formulación y administración como agentes terapéuticos oculares.

Una formulación de crema de los compuestos de la invención puede ser útil en la administración local de un antagonista de LFA-1 en la piel. Los compuestos útiles en este sentido incluyen antagonistas de LFA-1 y sus profármacos que se transforman en el fármaco activo una vez dentro de la piel. Una crema para la piel aplicada en la superficie exterior de los párpados que libera de este modo un antagonista de LFA-1 a través del párpado al revestimiento interior del párpado y al tejido conjuntival intermedio y a las glándulas lagrimales accesorias y aparece en la lágrima y, por lo tanto, es absorbida en el ojo. Esta forma de liberación puede ser deseable en el tratamiento de la inflamación del ojo mediada por LFA-1, particularmente en el tratamiento de la retinopatía diabética.

III. Administración

El procedimiento puede basarse en muchos modos de administración adecuados para liberar el antagonista del LFA-1 de los procedimientos descritos en el presente documento. Dicha liberación en las regiones afectadas del cuerpo puede lograrse a través de administración local o sistémica. Las formulaciones adecuadas y vehículos adicionales se describen en Remington "The Science and Practice of Pharmacy" (20ª Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD).

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica para la administración a un sujeto que contiene: (i) una cantidad eficaz de un agente terapéutico; y (ii) un excipiente farmacéutico adecuado para administración oral. En algunas realizaciones, la composición contiene además: (iii) una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico. Una composición farmacéutica de la invención puede comprender cualquiera de las moléculas divulgadas en el presente documento.

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

Para la administración mediante inyección, la composición farmacéutica se puede inyectar por vía intraocular, periorcular, intramuscular, intraarterial, subcutánea o intravenosa. Se puede usar un mecanismo de bomba para administrar la composición farmacéutica durante un periodo preseleccionado. Para algunas realizaciones de la invención, es deseable administrar el fármaco de forma local, por lo que las inyecciones se pueden realizar por vía periorcular, intraocular, intravítrea, subconjuntiva, retrobulbar, en la esclerótica o intercameral. Para algunas realizaciones de la invención, se prefiere la administración sistémica.

Para la administración sistémica, los compuestos de la invención pueden formularse para administrarse por vía oral. Para la administración que puede dar lugar a la distribución regional o sistémica de los agentes terapéuticos, la composición de la invención se puede administrar por vía intranasal, transdérmica o por medio de algunas formas de administración oral, por ejemplo, con el uso de un colutorio o pastilla que incorporan un compuesto de la invención que no se absorbe bien en el tracto GI. Para la administración que pueden provocar la administración regional o local de la composición de la invención se puede usar administración iontoforética o tópica.

Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar a la superficie ocular

mediante un sistema de bomba-catéter o se pueden liberar desde un dispositivo de liberación continua o selectiva, tal como, por ejemplo, membranas, tales como, pero sin limitaciones a las mismas, las empleadas en el sistema Ocuser™ (Alza Corp, Palo Alto, CA). Las composiciones farmacéuticas pueden estar incorporadas en el interior, ser portadas o estar unidas a lentes de contacto que luego usará el sujeto. Las composiciones farmacéuticas se pueden pulverizar sobre la superficie ocular.

Como alternativa, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar por vía intraocular o periocular a través de un sistema de bomba-catéter o liberar desde el interior de un dispositivo de liberación continua o selectiva. Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender formulaciones biodegradables de liberación sostenida, lenta y/o retardada, tales como, por ejemplo, microesferas de PLGA, micropartículas o nanopartículas, que se pueden liberar a través de un dispositivo como se ha descrito anteriormente o se inyecta por vía intraocular o periocular.

En algunas realizaciones, el antagonista de LFA-1 se administra en una sola dosis. Una sola dosis de un antagonista de LFA-1 también se puede utilizar cuando se administra junto con otra sustancia (por ejemplo, un analgésico) para el tratamiento de una afección aguda.

En algunas realizaciones, el antagonista de LFA-1 (por sí mismo o en combinación con otros fármacos) se administra en dosis múltiples. La dosis puede realizarse aproximadamente una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, diez veces o más de diez veces al día. La dosificación puede realizarse aproximadamente una vez al año, dos veces al año, cada seis meses, cada 4 meses, cada 3 meses, cada 60 días, una vez al mes, una vez cada dos semanas, una vez a la semana, o una vez cada dos días. En un ejemplo, el fármaco es un analgésico. En otro ejemplo, el antagonista del LFA-1 y otra sustancia terapéutica se administran juntos de aproximadamente una vez al día a aproximadamente 10 veces al día. En otro ejemplo, la administración del antagonista de LFA-1 y otra sustancia terapéutica continúa durante menos de aproximadamente 7 días. En aún otro ejemplo, la coadministración continúa durante más de aproximadamente 6, 10, 14, 28 días, dos meses, seis meses o un año. En algunos casos, la dosis coadministrada se mantiene durante el tiempo necesario, por ejemplo, la dosis para la inflamación crónica.

La administración de las composiciones puede continuar tanto como sea necesario. En algunos ejemplos, una composición se administra durante más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 o 28 días. En algunos ejemplos, una composición se administra durante menos de 28, 14, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 días. En algunos ejemplos, una composición se administra crónicamente de manera continua, por ejemplo, para el tratamiento del dolor crónico.

La dosis para el antagonista de LFA-1 puede encontrarse mediante experimentación de rutina. La dosis diaria puede variar de aproximadamente 1×10^{-8} g a 5.000 mg. El intervalo de dosis diaria puede depender de la forma del antagonista de LFA-1, por ejemplo, los ésteres o sales utilizados y/o la vía de administración, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, para la administración sistémica, los intervalos típicos de las dosis diarias son, por ejemplo aproximadamente 1–5000 mg, o aproximadamente 1–3000 mg, o aproximadamente 1–2000 mg, o aproximadamente 1–1000 mg, o aproximadamente 1–500 mg, o aproximadamente 1–100 mg, o aproximadamente 10–5000 mg, o aproximadamente 10–3000 mg, o aproximadamente 10–2000 mg, o aproximadamente 10–1000 mg, o aproximadamente 10–500 mg, o aproximadamente 10–200 mg, o aproximadamente 10–100 mg, o aproximadamente 20–2000 mg o aproximadamente 20–1500 mg o aproximadamente 20–1000 mg o aproximadamente 20–500 mg o aproximadamente 20–100 mg, o aproximadamente 50–5000 mg, o aproximadamente 50–4000 mg, o aproximadamente 50–3000 mg, o aproximadamente 50–2000 mg, o aproximadamente 50–1000 mg, o aproximadamente 50–500 mg, o aproximadamente 50–100 mg, aproximadamente 100–5000 mg, o aproximadamente 100–4000 mg, o aproximadamente 100–3000 mg, o aproximadamente 100–2000 mg, o aproximadamente 100–1000 mg o aproximadamente 100–500 mg. En algunos ejemplos, la dosis diaria del antagonista de LFA-1 es de 10 mg. En algunos ejemplos, la dosis diaria del antagonista de LFA-1 es de 100 mg. En algunos ejemplos, la dosis diaria del antagonista de LFA-1 es de 500 mg. En algunos ejemplos, la dosis diaria del antagonista de LFA-1 es de 1000 mg.

Para la administración tópica a la superficie ocular, los intervalos típicos de dosis diarias son, por ejemplo, de aproximadamente 1×10^{-8} g to 5,0 g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g to 2,5 g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g to 1,00 g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g to 0,5 g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a 0,25 g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a 0,1 g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a 0,05 g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a 0,025 g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a 1×10^{-2} g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a 5×10^{-3} g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a $2,5 \times 10^{-3}$ g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a 1×10^{-3} g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a 5×10^{-4} g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a 5,0 g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a 2,5 g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a 1,00 g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a 0,5 g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a 0,25 g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a 0,1 g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a 0,05 g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a 0,025 g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a 1×10^{-2} g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a 5×10^{-3} g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a $2,5 \times 10^{-3}$ g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a 1×10^{-3} g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a 5×10^{-4} g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 5,0 g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 2,5 g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 1 g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 0,5 g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 0,25 g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 0,1 g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 5×10^{-2} g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 5×10^{-2} g, o de

aproximadamente 1×10^{-6} g a $2,5 \times 10^{-2}$ g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 1×10^{-2} g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 5×10^{-3} g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a $2,5 \times 10^{-3}$ g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 1×10^{-3} g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 5×10^{-4} g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a 5 g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a $2,5$ g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a 1 g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a $0,5$ g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a $0,25$ g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a $0,1$ g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a $0,05$ g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a $2,5 \times 10^{-2}$ g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a 1×10^{-2} g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a 5×10^{-3} g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a $2,5 \times 10^{-3}$ g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a 1×10^{-3} g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a 5×10^{-4} g. En algunos ejemplos, la dosis diaria del antagonista de LFA-1 es de aproximadamente 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} g, 1×10^{-2} g, 1×10^1 g, o 1 g. En algunos ejemplos, la dosis diaria del antagonista de LFA-1 es de 1×10^{-7} g. En algunos ejemplos, la dosis diaria del antagonista de LFA-1 es 1×10^{-5} g. En algunos ejemplos, la dosis diaria del antagonista de LFA-1 es 1×10^{-3} g. En algunos ejemplos, la dosis diaria del antagonista de LFA-1 es 1×10^{-2} g. En algunos ejemplos, la dosis del sujeto varía de aproximadamente 1×10^{-8} g a $5,0$ g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a $2,5$ g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a $1,00$ g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a $0,5$ g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a $0,25$ g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a $0,1$ g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a $0,05$ g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a $0,025$ g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a 1×10^{-2} g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a 5×10^{-3} g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a $2,5 \times 10^{-3}$ g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a 1×10^{-3} g, o de aproximadamente 1×10^{-8} g a 5×10^{-4} g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a $5,0$ g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a $2,5$ g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a $1,00$ g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a $0,5$ g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a $0,25$ g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a $0,1$ g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a $0,05$ g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a $0,025$ g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a 1×10^{-2} g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a 5×10^{-3} g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a $2,5 \times 10^{-3}$ g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a 1×10^{-3} g, o de aproximadamente 1×10^{-7} g a 5×10^{-4} g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a $5,0$ g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a $2,5$ g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 1 g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a $0,5$ g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a $0,25$ g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a $0,1$ g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 5×10^{-2} g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 5×10^{-2} g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a $2,5 \times 10^{-2}$ g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 1×10^{-2} g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 5×10^{-3} g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a $2,5 \times 10^{-3}$ g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 1×10^{-3} g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 5×10^{-4} g, o de aproximadamente 1×10^{-6} g a 5×10^{-4} g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a 5 g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a $2,5$ g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a 1 g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a $0,5$ g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a $0,25$ g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a $0,1$ g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a $0,05$ g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a $2,5 \times 10^{-2}$ g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a 1×10^{-2} g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a 5×10^{-3} g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a $2,5 \times 10^{-3}$ g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a 1×10^{-3} g, o de aproximadamente 1×10^{-5} g a 5×10^{-4} g. En algunos ejemplos, la dosis individual como se ha descrito anteriormente, se repite 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces al día.

En algunos ejemplos, el colirio, la crema, la loción u otras formulaciones tópicas liberan suficiente agente terapéutico por vía intraocular o periocular para mantener un nivel de antagonista de LFA-1 de al menos aproximadamente 10 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 150 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 250 nM, aproximadamente 300 nM, aproximadamente 350 nM, aproximadamente 500 nM, aproximadamente 600 nM, aproximadamente 700 nM, aproximadamente 800 nM, aproximadamente 900 nM, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 3 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 6 mM, about 7 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 9 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM o aproximadamente 25 mM de una dosis a otra.

En algunos ejemplos, una formulación de colirio libera suficiente agente terapéutico por vía intraocular o periocular para alcanzar un nivel de antagonista de LFA-1 en la retina de al menos aproximadamente 10 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 150 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 250 nM, aproximadamente 300 nM, aproximadamente 350 nM, aproximadamente 500 nM, aproximadamente 600 nM, aproximadamente 700 nM, aproximadamente 800 nM, aproximadamente 900 nM, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 3 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 6 mM, about 7 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 9 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM o aproximadamente 25 mM de una dosis a otra.

Para otras formas de administración, las dosis diarias pueden variar alrededor del intervalo descrito para la administración sistémica o puede variar alrededor del intervalo divulgado para la administración tópica.

Para dispositivos y formulaciones intraoculares o perioculares de liberación lenta o sostenida, en algunos ejemplos, un intervalo de dosis típico es de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg de antagonista de LFA-1 liberado durante el período de dosificación. En otros ejemplos, durante el período de dosificación se liberan de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 25 mg, o de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 50 mg. El período de dosificación para dispositivos y formulaciones intraoculares o perioculares de liberación lenta, típicamente varía de aproximadamente 10 días a aproximadamente 1 año, de aproximadamente 30 días a aproximadamente 1 año, de aproximadamente 60 días a aproximadamente 1

año, de aproximadamente 3 meses a aproximadamente 1 año, de aproximadamente 4 meses a aproximadamente 1 año, de aproximadamente 5 meses a aproximadamente 1 año, o de aproximadamente 6 meses a aproximadamente 1 año. En algunos ejemplos, los dispositivos y formulaciones intraoculares o perioculares de liberación lenta liberan agente terapéutico durante el periodo de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 9 meses, de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 8 meses, de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 7 meses, de aproximadamente 1 mes, a aproximadamente 6 meses, de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 5 meses, de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 4 meses, o de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 3 meses. En otros ejemplos, las formulaciones y dispositivos de liberación lenta liberan agente terapéutico durante hasta 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 12 meses, 18 meses, 2 años, 30 meses o 3 años.

En algunos ejemplos, la formulación y/o implantaciones de liberación sostenida liberan suficiente agente terapéutico por vía intraocular o periorcular para mantener un nivel de antagonista de LFA-1 de al menos aproximadamente 10 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 150 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 250 nM, aproximadamente 300 nM, aproximadamente 350 nM, aproximadamente 500 nM, aproximadamente 600 nM, aproximadamente 700 nM, aproximadamente 800 nM, aproximadamente 900 nM, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 3 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 6 mM, about 7 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 9 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM o aproximadamente 25 mM en un año. En algunos ejemplos, la formulación y/o implantaciones de liberación sostenida liberan suficiente agente terapéutico por vía intraocular o periorcular para mantener un nivel de antagonista de LFA-1 de al menos aproximadamente 10 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 150 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 250 nM, aproximadamente 300 nM, aproximadamente 350 nM, aproximadamente 500 nM, aproximadamente 600 nM, aproximadamente 700 nM, aproximadamente 800 nM, aproximadamente 900 nM, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 3 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 6 mM, about 7 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 9 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM o aproximadamente 25 mM en 6 meses.

IV. Formulaciones

Los compuestos de la invención se pueden formular como una solución o suspensión estéril, en vehículos adecuados, bien conocidos en la materia. Las formulaciones adecuadas y vehículos adicionales se describen en Remington "The Science and Practice of Pharmacy" (20^a Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD).

Para las formulaciones inyectables, el vehículo puede elegirse de entre que en la materia se conoce que son adecuados, incluyendo soluciones acuosas o suspensiones de aceite, o emulsiones, con aceite de sésamo, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, o aceite de cacahuate, así como elixires, manitol, dextrosa o una solución acuosa estéril, y vehículos farmacéuticos similares. La formulación también puede comprender composiciones poliméricas que son biocompatibles, biodegradables, tales como ácido poli(láctico-co-glicólico). Estos materiales se pueden hacer en micropartículas o nanopartículas, cargar con el fármaco y, además, recubrir o derivar para proporcionar un rendimiento superior de liberación sostenida. Los vehículos adecuados para inyección periorcular o intraocular incluyen, por ejemplo, suspensiones de agente terapéutico en agua de calidad inyectable, liposomas y vehículos adecuados para las sustancias lipófilas. Otros vehículos para inyección periorcular o intraocular son bien conocidos en la materia.

La concentración de fármaco se puede ajustar, el pH de la solución se puede tamponar y ajustar la isotonicidad para que sea compatible con la inyección intravenosa, como es bien conocido en la materia.

Cualquiera de las formas de LFA-1 también se puede moler para proporcionar propiedades más adecuadas para formulación. La molturación puede proporcionar un tamaño de partícula menor con una mayor área de superficie de exposición, que puede proporcionar una solubilización *in vivo* más rápida o durante la formulación. Como alternativa, la molturación a un tamaño de partícula más pequeño puede proporcionar la capacidad de pasar a través de barreras biológicas, tales como la piel o la pared intestinal, directamente, sin solubilización inicial, lo que permite su uso como un sólido en la formulación, lo que puede proporcionar beneficios adicionales de estabilidad a la temperatura, vida de almacenamiento, facilidad de transporte y facilidad de uso por el sujeto.

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

En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan habitualmente incluyen lactosa y almidón de maíz, y normalmente se añaden agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los vehículos útiles incluyen lactosa y almidón de maíz. Otros ejemplos no limitantes de

vehículos y excipientes incluyen leche, azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales de los mismos, estearato de calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas y glicoles.

5 El tensioactivo que puede usarse para formar composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a los mismos, tensioactivos hidrófilos, tensioactivos lipófilos y mezclas de los mismos. Es decir, se puede emplear una mezcla de tensioactivos hidrófilos, se puede emplear una mezcla de tensioactivos lipófilos o se puede emplear una mezcla de al menos un agente tensioactivo hidrófilo y al menos un agente tensioactivo lipófilo.

10 Un agente tensioactivo hidrófilo adecuado generalmente puede tener un valor de HLB de al menos 10, mientras que los tensioactivos lipófilos adecuados pueden generalmente tener un valor de HLB de o menor de aproximadamente 10. Un parámetro empírico utilizado para caracterizar la hidrofiliicidad y la hidrofobicidad relativas de los compuestos anfífilos no iónicos es el equilibrio hidrófilo-lipófilo (valor de "HLB"). Los tensioactivos con valores de HLB inferiores son más lipófilos o hidrófobos y tienen mayor solubilidad en aceites, mientras que los tensioactivos con valores de HLB más altos son más hidrófilos y tienen mayor solubilidad en soluciones acuosas. Generalmente, los tensioactivos hidrófilos se consideran los compuestos que tienen un valor de HLB mayor de aproximadamente 10, así como compuestos aniónicos, catiónicos o zwitteriónicos para los que la escala de HLB no suele ser aplicable. Del mismo modo, los tensioactivos lipófilos (es decir, hidrófobos) son compuestos que tienen un valor de HLB igual o menor de aproximadamente 10. Sin embargo, el valor de HLB de un tensioactivo es simplemente una guía aproximada generalmente utilizado para permitir la formulación de emulsiones cosméticas, industriales y farmacéuticas.

20 Los tensioactivos hidrófilos pueden ser iónicos o no iónicos. Los tensioactivos iónicos adecuados incluyen, pero no se limitan a los mismos, sales de alquilamonio; sales de ácido fusídico; derivados de ácidos grasos de aminoácidos, oligopéptidos y polipéptidos; derivados de glicérido de aminoácidos, oligopéptidos y polipéptidos; lecitinas y lecitinas hidrogenadas; lisolecitinas y lisolecitinas hidrogenadas; fosfolípidos y derivados de los mismos; lisofosfolípidos y sus derivados; sales de ésteres de ácido graso carnitina; sales de alquilsulfatos; sales de ácidos grasos; docusato de sodio; lactilatos de acilo; ésteres de ácido tartárico monoacetilado y diacetilado de monoglicéridos y diglicéridos; monoglicéridos y diglicéridos succinilados; ésteres de ácido cítrico de monoglicéridos y diglicéridos; y mezclas de los mismos.

30 Dentro del grupo mencionado anteriormente, los tensioactivos iónicos preferidos incluyen, a modo de ejemplo: lecitina, lisolecitina, fosfolípidos, lisofosfolípidos y derivados de los mismos; sales de ésteres de ácidos grasos carnitina; sales de alquilsulfatos; sales de ácidos grasos; docusato de sodio; lactilatos de acilo; ésteres de ácido tartárico monoacetilados y diacetilados de monoglicéridos y diglicéridos; ésteres de ácido cítrico de monoglicéridos y diglicéridos; y mezclas de los mismos.

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

45 Los tensioactivos no iónicos hidrófilos pueden incluir, pero no se limitan a los mismos, alquilglucósidos; alkylmaltósidos; alquiltiogluccósidos; macroglicéridos de laurilo; éteres de polioxialquilenalquilo, tales como éteres de alquilo de polietilenglicol; alquifenoles de polioxialquileno, tales como alquifenoles de polietilenglicol; ésteres de ácidos grasos de polioxialquilenalquifenol, tales como monoésteres de ácidos grasos de polietilenglicol y diésteres de ácidos grasos de polietilenglicol; ésteres de ácidos grasos de glicerol polietilenglicol; ésteres de ácidos grasos de poliglicerol; ésteres de ácidos grasos de polioxialquileno sorbitán, tales como ésteres de ácidos grasos de sorbitán polietilenglicol; productos de transesterificación hidrófila de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en glicéridos, aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados, ácidos grasos y esteroides; esteroides de polioxietileno, derivados y análogos de los mismos; vitaminas polioxietiladas y derivados de las mismas; copolímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno; y mezclas de los mismos; ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol sorbitán y productos de transesterificación hidrófila de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en triglicéridos, aceites vegetales y aceites vegetales hidrogenados. El poliol puede ser glicerol, etilenglicol, polietilenglicol, sorbitol, propilenglicol, pentaeritritol o un sacárido.

60 Otros tensioactivos hidrófilos no iónicos incluyen, sin limitaciones, laurato de PEG-10, laurato de PEG-12, laurato de PEG-20, PEG-32, laurato de PEG-32, dilaurato de PEG-12, oleato de PEG-12, oleato de PEG-15, oleato de PEG-20, dioleato de PEG-20, oleato de PEG-32, oleato de PEG-200, oleato de PEG-400, estearato de PEG-15, diestearato de PEG-32, estearato de PEG-40, estearato de PEG-100, dilaurato de PEG-20, trioleato de PEG-25 glicerilo, dioleato de PEG-32, laurato de PEG-20 glicerilo, estearato de PEG-20 glicerilo, oleato de PEG-20 glicerilo, oleato de PEG-30 glicerilo, laurato de PEG-30 glicerilo, laurato de PEG-40 glicerilo, aceite de almendra de palma PEG-40, aceite de ricino hidrogenado PEG-50, aceite de ricino PEG-40, aceite de ricino PEG-35, aceite de ricino PEG-60, aceite de ricino hidrogenado PEG-40, aceite de ricino hidrogenado PEG-60, aceite de maíz PEG -60, glicéridos

caprato/caprilato PEG-6, glicéridos de caprato/caprilato PEG-8, laurato de poligliceril-10, colesterol PEG-30, fitoesterol PEG-25, esteroles de soja PEG-30, trioleato PEG-20, oleato de sorbitán PEG 40, laurato de sorbitán PEG-80, polisorbato 20, polisorbato 80, éter de laurilo POE-9, éter de laurilo POE-23, éter de oleilo POE-10, éter de oleilo POE-20, éter de estearilo POE-20, succinato de tocoferilo PEG-100, colesterol PEG-24, oleato de poligliceril-10, Tween 40, Tween 60, monoestearato de sacarosa, monolaurato de sacarosa, monopalmitato de sacarosa, PEG 10-series de PEG-10-100 de nonilfenol, series de PEG 15-100 de octilfenol, y poloxámeros.

Entre los tensioactivos lipófilos adecuados se incluyen, a modo de ejemplo solamente: alcoholes grasos; ésteres de ácidos grasos de glicerol; ésteres de ácidos grasos de glicerol acetilados; ácidos grasos ésteres de alcohol inferior; ésteres de ácidos grasos de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos de sorbitán; ésteres de ácidos grasos de sorbitán polietilenglicol; derivados de esteroides y esteroides; esteroides polioxiethylados y derivados de esteroles; alquil éteres de polietilenglicol; ésteres de azúcar; éteres de azúcar; derivados de ácido láctico de monoglicéridos y diglicéridos; productos de transesterificación hidrófoba de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en glicéridos, aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados, ácidos grasos y esteroides; vitaminas solubles en aceite/derivados de vitaminas; y mezclas de los mismos. Dentro de este grupo, los tensioactivos lipófilos preferidos incluyen ésteres de ácidos grasos de glicerol, ésteres de ácidos grasos de propilenglicol, y mezclas de los mismos, o son productos de transesterificación hidrófoba de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados y triglicéridos.

Los agentes tensioactivos se pueden usar en cualquier formulación en la que su uso no está contraindicado de este modo. En algunos ejemplos, se prefiere el uso de tensioactivos o clases limitadas de agentes tensioactivos.

Entre otros vehículos acuosos adecuados se incluyen, pero no se limitan a, solución de Ringer y cloruro de sodio isotónico. Las suspensiones acuosas pueden incluir agentes de suspensión, tales como derivados de celulosa, alginato de sodio, polivinil-pirrolidona y goma de tragacanto, y un agente humectante tal como lecitina. Los conservantes adecuados para suspensiones acuosas incluyen p-hidroxibenzoato de metilo y n-propilo.

Los agentes quelantes que se pueden utilizar para formar composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), EDTA disódico, edetato de calcio disódico, EDTA trisódico, albúmina, transferrina, desferoxamina, desferal, mesilato de desferoxamina, EDTA tetrasódico y EDTA dipotásico, metasilicato de sodio o combinaciones de cualquiera de estos.

Los conservantes que pueden utilizarse para formar composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas incluyen purita, peróxidos, perboratos, imidazolidinilurea, diazolidinilurea, fenoxietanol, cloruros dealconio, incluyendo cloruros de benzalconio, metilparabeno, etilparabeno y propilparabeno.

Los agentes espesantes que pueden usarse para formar composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas incluyen miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, neopentanoato de isodecilo, escualeno, aceite mineral, benzoato de C₁₂-C₁₅ y poliisobuteno hidrogenado. Particularmente preferidos son los agentes que no alterarían otros compuestos del producto final, tales como agentes espesantes no iónicos. La selección de los agentes espesantes adicionales está bien dentro de la experiencia de un experto en la materia.

Los antioxidantes que se pueden utilizar para formar composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas incluyen ésteres de propilo, octilo y dodecilo de ácido gálico, hidroxianisol butilado (BHA, normalmente adquirido como una mezcla de los isómeros orto y meta), extracto de té verde, ácido úrico, cisteína, piruvato, ácido nordihidroguayarático, ácido ascórbico, sales de ácido ascórbico, tales como palmitato de ascorbilo y ascorbato de sodio, ascorbil glucosamina, vitamina E (es decir, tocoferoles, tales como α-tocoferol), derivados de la vitamina E (por ejemplo, acetato de tocoferilo), retinoides, tales como ácido retinoico, retinol, trans-retinol, cis-retinol, mezclas de trans-retinol y cis-retinol, 3-deshidrorretinol y derivados de la vitamina A (por ejemplo, acetato de retinilo, retinal y palmitato de retinilo, también conocido como el palmitato de tetinilo), citrato de sodio, sulfito de sodio, licopeno, antocianuros, bioflavonoides (por ejemplo, hesperitina, naringina, rutina y quercetina), superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, hidroxitolueno butilado (BHT), indol-3-carbinol, picnogenol, melatonina, sulforafano, pregnenolona, ácido lipoico y 4-hidroxi-5-metil-3[2H]-furanona.

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

La administración intranasal puede utilizar una suspensión en aerosol de partículas respirables compuestas por los compuestos de la invención, que inhala el sujeto. El compuesto de la invención son absorbidos en la circulación sanguínea a través de absorción pulmonar o en contacto con los tejidos lagrimales a través de los conductos nasolacrimales y, posteriormente, se libera en los tejidos retinianos en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Las partículas respirables pueden ser sólidos o líquidos, con partículas de tamaño adecuado, como se conoce en la materia que es eficaz para la absorción. Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, las composiciones se administran por vía respiratoria nasal u oral para un efecto local o sistémico. Las composiciones en preferentemente, disolventes farmacéuticamente aceptables se pueden nebulizar mediante el uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas pueden inhalarse directamente desde el dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede fijarse a una tienda facial o máquina de respiración de presión positiva intermitente. Las composiciones en solución, suspensión o en polvo se pueden administrar, preferentemente, por vía oral o nasal, desde dispositivos que liberan la formulación de una manera apropiada.

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

Para la administración tópica, todas las formulaciones para administración ocular tópica usada en el campo de la oftalmología (por ejemplo, gotas oculares, insertos, paquetes oculares, lentes de contacto impregnadas, sistemas de liberación de la bomba, suspensiones soluciones basadas en dimetilsulfóxido (DMSO), liposomas y ungüento ocular) y todas las formulaciones para uso externo en los campos de dermatología y otorrinolaringología (por ejemplo, ungüento, crema, gel, polvo, pomada, loción, formas cristalinas, espuma y pulverización) pueden utilizarse como se conoce en la materia. En algunas realizaciones, la extraordinaria solubilidad de algunos de los antagonistas de LFA-1 de la invención permiten las formulaciones en solución concentrada que después pueden administrar dosis terapéuticamente relevantes a las regiones del ojo. Adicionalmente, todas las formulaciones adecuadas para administración tópica en la piel y membranas mucosas de los conductos nasales se pueden utilizar para liberar los compuestos de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser una formulación liposómica para administración tópica u oral, cualquiera de los cuales se sabe en la materia que son adecuados para el propósito de la presente invención.

Los lubricantes que pueden utilizarse para formar composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas de la invención incluyen, pero no se limitan a los mismos, estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, lauril sulfato de sodio, talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja), estearato de cinc, oleato de etilo, laurato de etilo, agar, o mezclas de los mismos. Entre otros lubricantes adicionales se incluyen, por ejemplo, un gel de sílice Syloid, un aerosol coagulado de sílice sintética, o mezclas de los mismos. Opcionalmente, se puede añadir un lubricante en una cantidad de menos de aproximadamente 1 por ciento en peso de la composición farmacéutica.

Los agentes protectores de la piel son agentes que protegen la piel contra irritantes químicos y/o irritantes físicos, por ejemplo, luz UV, incluyendo filtros solares, aditivos antiacné, antiarrugas y agentes antiatrofia de la piel. Entre los protectores solares adecuados como agentes de protección de la piel se incluyen p-metoxicinnamato de 2-etilhexilo, N,N-dimetil-p-aminobenzoato de 2-etilhexilo, ácido p-aminobenzoico, ácido 2-fenilbenzimidazole-5-sulfónico, octocrilén, oxibenzona, salicilato de homomentilo, salicilato de octilo, 4,4'-metoxi-t-butildibenzoilmetano, 4-isopropil dibenzoilmetano, 3-benziliden alcanfor, 3-(4-metilbenziliden)alcanfor, antanilatós, dióxido de titanio ultrafino, óxido de cinc, óxido de hierro, sílice, éster de ácido 4-N,N-(2-etilhexil)metilaminobenzoico de 2,4-dihidroxibenzofenona, éster de ácido 4-N,N-(2-etilhexil)-metilaminobenzoico con 4-hidroxidibenzoilmetano, éster de ácido 4-N,N-(2-etilhexil)-metilaminobenzoico de 2-hidroxi-4-(2-hidroxietoxi)benzofenona y éster de ácido 4-N,N(2-etilhexil)-metilaminobenzoico de 4-(2-hidroxietoxi)dibenzoilmetano. Entre los agentes antiacné adecuados se incluyen ácido salicílico; ácido 5-octanoilalílico; resorcinol; retinoides, tales como ácido retinoico y sus

derivados; aminoácidos D y L que contienen azufre distintos de cisteína; ácido lipoico; antibióticos y antimicrobianos, tales como peróxido de benzoílo, octopirox, tetraciclina, éter de 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenilo, 3,4,4'-triclorobanilida, ácido azelaico, fenoxietanol, fenoxipropanol, fenoxisopropanol, acetato de etilo, clindamicina y melclociclina; flavonoides; y sales biliares, tales como sulfato de escimnol, desoxicolato y colato. Entre los ejemplos de agentes antiarrugas y agentes antiatrofia de la piel son ácido retinoico y sus derivados, retinol, ésteres de retinilo, ácido salicílico y sus derivados, aminoácidos D y L que contienen azufre, excepto cisteína, alfa-hidroxiácidos (por ejemplo, ácido glicólico y ácido láctico), ácido fítico, ácido lipoico y ácido lisofosfatídico.

Las formulaciones también pueden contener aditivos de mitigación de la irritación para minimizar o eliminar la posibilidad de irritación de la piel o daños en la piel causados por los otros componentes de la composición. Entre los aditivos de mitigación de la irritación adecuados se incluyen, por ejemplo: -tocoferol; inhibidores de la monoamina oxidasa, en particular alcoholes de fenilo tales como 2-fenil-1-etanol; glicerina; ácidos salicílicos y salicilatos; ácidos ascórbicos y ascorbatos; ionóforos, tales como monensina; aminas anfifílicas; cloruro amónico; N-acetilcisteína; ácido cis-urocánico; capsaicina; y cloroquina. El aditivo de mitigación de la irritación, si está presente, se puede incorporar en las presentes formulaciones a una concentración eficaz para mitigar la irritación o el daño en la piel, que representa normalmente no más de aproximadamente 20 % en peso, más típicamente no más de aproximadamente 5 % en peso, de la composición.

Un modificador de la sensación seca es un agente que, cuando se añade a una emulsión, imparte una "sensación seca" a la piel cuando se seca la emulsión. Los modificadores de la sensación seca pueden incluir talco, caolín, tiza, óxido de cinc, fluidos de silicona, sales inorgánicas, tales como sulfato de bario, sílice tratada superficialmente, sílice precipitada, sílice apirógena, tal como un Aerosil disponible en Degussa Inc. de New York, NY, EE.UU. Otro modificador de la sensación seca es un almidón de glicerilo reticulado de epiclorohidrina del tipo que se divulga en la patente de Estados Unidos. N.º 6.488.916.

También se pueden añadir otros agentes, tales como agentes antimicrobianos, para evitar el deterioro durante el almacenamiento, es decir, para inhibir el crecimiento de microbios, tales como levaduras y mohos. Los agentes antimicrobianos adecuados se seleccionan, típicamente, del grupo que consiste en los ésteres de metilo y propilo de ácido p-hidroxibenzoico (es decir, metilparabeno y propilparabeno), benzoato de sodio, ácido sórbico, imidurea, purita, peróxidos, perboratos y combinaciones de los mismos.

La formulación también puede contener un agente estético. Entre los ejemplos de agentes estéticos se incluyen fragancias, pigmentos, colorantes, aceites esenciales, sensibilizadores de la piel y astringentes. Entre los agentes estéticos adecuados se incluyen aceite de clavo, mentol, alcanfor, aceite de eucalipto, eugenol, lactato de metilo, bisabolol, destilado de hamamelis (preferido) y extracto de té verde (preferido).

Las fragancias son sustancias aromáticas que pueden impartir un aroma estéticamente agradable a la composición de filtro solar. Entre las fragancias típicas se incluyen materiales aromáticos extraídos de fuentes botánicas (es decir, pétalos de rosas, capullos de gardenia, flores de jazmín, etc.) que pueden usarse solos o en cualquier combinación para crear aceites esenciales. Como alternativa, se pueden preparar extractos alcohólicos para componer fragancias. Sin embargo, debido a los costes relativamente altos de obtención de fragancias a partir de sustancias naturales, la tendencia moderna es el uso de fragancias preparadas sintéticamente, sobre todo en productos de alto volumen. Opcionalmente, se pueden incluir una o más fragancias en la composición de filtro solar en una cantidad que varía de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5 por ciento en peso, preferentemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 por ciento en peso. También pueden usarse conservantes adicionales, si se desea, e incluyen composiciones conservantes, tales como alcohol bencílico, alcohol feniletílico y ácido benzoico, diazolidinilo, urea, clorfenesina, carbamato de yodopropinilo y butilo, entre otros.

Se ha previsto además, que los compuestos de la invención pueden estar unidos de manera liberable a polímeros biocompatibles para su uso en formulaciones de liberación sostenida sobre, dentro o fijados a insertos para administración tópica, intraocular, periocular o sistémica. La liberación controlada desde un polímero biocompatible se puede utilizar con un polímero soluble en agua para formar una formulación instilable, también. La liberación controlada desde un polímero biocompatible, tal como, por ejemplo, microesferas de PLGA, micropartículas o nanopartículas, se puede utilizar en una formulación adecuada para la implantación intraocular o inyección para la administración de liberación sostenida, así como cualquier polímero o matriz biodegradable y biocompatible adecuado.

Las gotas oculares se pueden preparar disolviendo el principio activo en una solución acuosa estéril, tal como solución salina fisiológica, solución tampón, etc., o mediante la combinación de composiciones en polvo que se disolverán antes de usar. Se pueden usar otros vehículos, como se conoce en la materia, incluyendo una solución de sal de equilibrio, solución salina, poliéteres solubles en agua, tales como polietilenglicol, polivinilos, tales como alcohol de polivinilo y povidona, derivados de celulosa, tales como metilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa, derivados de petróleo, tales como aceite mineral y vaselina blanca, grasas animales, tales como lanolina, polímeros de ácido acrílico, tales como gel de carboxipolimetileno, grasas vegetales, tales como aceite de cacahuete y polisacáridos, tales como dextranos, y glicosaminoglicanos, tales como hialuronato de sodio. Si se desea, se pueden añadir aditivos utilizados normalmente en las gotas oculares. Tales aditivos incluyen agentes isotonzantes (por

ejemplo, cloruro de sodio, etc.), agente tampón (por ejemplo, ácido bórico, monohidrógeno fosfato de sodio, dihidrógeno fosfato de sodio, etc.), conservantes (por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, clorobutanol, etc.), espesantes (por ejemplo, sacáridos, tales como lactosa, manitol, maltosa, etc.; por ejemplo, ácido hialurónico o su sal, tal como hialuronato de sodio, hialuronato de potasio, etc.; por ejemplo, mucopolisacárido, tal como sulfato de condroitina, etc.; por ejemplo, poliacrilato de sodio, polímero de carboxivinilo, poliacrilato reticulado, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa u otros agentes conocidos por los expertos en la materia).

La solubilidad de los componentes de las presentes composiciones se puede mejorar mediante un tensioactivo u otro codisolvente adecuado en la composición. Tales codisolventes incluyen polisorbato 20, 60, y 80, Pluronic F68, F-84 y P-103, ciclodextrina, u otros agentes conocidos por los expertos en la materia. Tales codisolventes se pueden emplear a un nivel de aproximadamente 0,01 % a 2 % en peso.

La composición puede formularse como un tipo de dosis unitaria estéril que no contiene conservantes.

Las composiciones pueden envasarse en forma de multidosis. Se pueden preferir los conservantes para prevenir la contaminación microbiana durante el uso. Los conservantes adecuados incluyen: cloruro de benzalconio, timerosal, clorobutanol, metilparabeno, propilparabeno, alcohol feniletílico, edetato disódico, ácido sórbico, perborato de sodio, Onamer M u otros agentes conocidos por los expertos en la materia. En los productos oftálmicos de la técnica anterior, tales conservantes se pueden emplear a un nivel de 0,004 % a 0,02 %. En las composiciones de la presente solicitud, el conservante, preferentemente cloruro de benzalconio, se puede emplear a un nivel de 0,001 % a menos de 0,01 %, por ejemplo de 0,001 % a 0,008 %, preferentemente de aproximadamente 0,005 % en peso. Se ha encontrado que una concentración de cloruro de benzalconio de 0,005 % puede ser suficiente para preservar las composiciones de la presente invención del ataque microbiano.

La cantidad de administración y el número de administraciones del principio activo utilizado varían en función del sexo, la edad y el peso corporal del sujeto, los síntomas a tratar, los efectos terapéuticos deseables, las vías de administración y el período de tratamiento. Para las gotas oculares para un adulto, las formulaciones que contienen los compuestos pueden variar en concentración de aproximadamente 0,0001 to 10,0 % P/V, de aproximadamente 0,005 a 10,0 % P/V, de aproximadamente 0,01 a 10,0 % P/V, de aproximadamente 0,05 a 10,0 % P/V, de aproximadamente 0,1 a 10,0 % P/V, de aproximadamente 0,5 a 10,0 % P/V, de aproximadamente 1,0 a 10,0 % P/V, de aproximadamente 20 a 10,0 % P/V, de aproximadamente 3,0 a 10,0 % P/V, de aproximadamente 4,0 a 10,0 % P/V, o de aproximadamente 5,0 a 10,0 % P/V. Un ejemplo tiene una formulación de aproximadamente 1,0 a 10,0 % P/V de los compuestos. Un ejemplo tiene una formulación de aproximadamente 0,01 a 10,0 % P/V de los compuestos. La administración puede administrarse varias veces al día por ojo, preferentemente de una a diez veces, más preferentemente una a cuatro veces, lo más preferentemente una vez al día. El tamaño de la gota administrada puede estar en el intervalo de aproximadamente 10–100 µl, aproximadamente 10–90 µl, aproximadamente 10–80 µl, aproximadamente 10–70 µl, aproximadamente 10–60 µl, aproximadamente 10–50 µl, aproximadamente 10–40 µl, aproximadamente 10–30 µl, aproximadamente 20–100 µl, aproximadamente 20–90 µl, aproximadamente 20–80 µl, aproximadamente 20–70 µl, aproximadamente 20–60 µl, aproximadamente 20–50 µl, aproximadamente 20–40 µl o aproximadamente 20–30 µl. Un ejemplo administra una gota en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 µl. Un ejemplo administra una gota en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 µl. Un ejemplo administra una gota en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 µl. Un ejemplo administra una gota en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 µl. Un ejemplo administra una gota en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 µl.

Las formulaciones se pueden administrar en varias gotas por hora, de una a cuatro gotas, preferentemente de una a tres gotas, más preferentemente de una a dos gotas y, lo más preferentemente, una gota al día. En un ejemplo, las formulaciones se administran en aproximadamente una gota cada vez y una vez al día.

En las formulaciones de ungüento, crema, loción o pulverización, la concentración de los compuestos en las formulaciones pueden variar de aproximadamente 0,0001 to 10,0 % P/V, de aproximadamente 0,005 a 10,0 % P/V, de aproximadamente 0,01 a 10,0 % P/V, de aproximadamente 0,05 a 10,0 % P/V, de aproximadamente 0,1 a 10,0 % P/V, de aproximadamente 0,5 a 10,0 % P/V, de aproximadamente 1,0 a 10,0 % P/V, de aproximadamente 20 a 10,0 % P/V, de aproximadamente 3,0 a 10,0 % P/V, de aproximadamente 4,0 a 10,0 % P/V, o de 5,0 a 10,0 % P/V. Un ejemplo tiene una formulación de aproximadamente 1,0 a 10,0 % P/V de los compuestos. Un ejemplo tiene una formulación de aproximadamente 0,01 a 10,0 % P/V de los compuestos. Un ejemplo tiene una formulación de aproximadamente 5,0 a 10,0 % P/V de los compuestos. Estas formulaciones pueden aplicarse o pulverizarse varias veces al día, preferentemente de una a seis veces, más preferentemente de una a cuatro veces y, lo más preferentemente, una vez al día. La relación de mezcla de cada ingrediente se puede aumentar o disminuir adecuadamente según el grado de inflamaciones o infecciones.

Las formulaciones de la invención pueden incluir además otros principios activos farmacológicos en la medida que no contradigan el propósito de la presente invención. En una combinación de principios activos plurales, sus respectivos contenidos pueden aumentarse o disminuirse adecuadamente en consideración de sus efectos y la

seguridad.

V. Kits

- 5 La divulgación también proporciona kits. Los kits incluyen un compuesto en un envase adecuado y el material escrito que puede incluir instrucciones de uso, análisis de estudios clínicos, listado de efectos secundarios. El kit puede contener además otro agente terapéutico que se administra conjuntamente con el antagonista de LFA-1. En algunos ejemplos, el agente terapéutico y el antagonista del LFA-1 se proporcionan como composiciones separadas en recipientes separados dentro del kit. En algunos ejemplos, el agente terapéutico y el antagonista del LFA-1 se proporcionan como una sola composición dentro de un recipiente en el kit. Los envases y artículos adicionales adecuados para su uso (por ejemplo, una taza de medir para preparaciones líquidas, una envoltura de aluminio para reducir al mínimo la exposición al aire, dispensadores, y similares) son conocidos en la técnica y pueden estar incluidos en el kit.

15 VI. Ejemplos

Ejemplo 1: Mediciones de afinidad

- 20 Las afinidades de las moléculas pequeñas por LFA-1 se midieron utilizando polarización de fluorescencia (PF) en un formato competitivo con antagonista de molécula pequeña, compuesto 1 (Figura 2), como se ha descrito anteriormente. Todas las mediciones se realizaron en tampón que contenía Hepes 50 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM, 0,05 % de n-octilglucósido y 0,05 % de gamma globulinas bovinas (BGG) y MnCl₂ 1 mM o CaCl₂ 1 mM y MgCl₂ y 1 mM. La afinidad del compuesto 1 para LFA-1 se midió primero mediante la adición de compuesto 12 nM a diluciones en serie de LFA-1 a partir de 1 μM en tampón que contenía MnCl₂ o CaCl₂ y MgCl₂. Los experimentos de competición se realizaron mediante la adición de diluciones en serie de antagonistas al compuesto 1 2 nM (utilizando LFA-1 3 nM (en MnCl₂) o LFA-1 40 nM (en CaCl₂ y MgCl₂)). En los experimentos de competición de ICAM-1-Ig, las concentraciones de LFA-1 se redujeron a LFA-1 2 y 20 nM en las dos condiciones de tampón de cationes divalentes para maximizar la inhibición por ICAM-1-Ig. Las diferentes concentraciones de LFA-1 utilizadas en los experimentos se tuvieron en cuenta en los cálculos de afinidad (véase más adelante). Las soluciones se incubaron en placas de 30 96 pocillos negras HE96 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) durante 2 horas a 37 °C. Las mediciones de polarización de fluorescencia (PF) se realizaron en un lector de placas Analyst (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) usando excitación a 485 nm, emisión a 530 nm de y filtros dicróicos de 505 nm. Todos los datos de intensidad brutos se corrigieron para las emisiones de fondo mediante sustracción de las intensidades medidas desde las muestras apropiadas sin el compuesto 1. Los datos de unión de LFA-1 y de competición del antagonista se analizaron usando 35 ajuste de mínimos cuadrados no lineal de una ecuación de cuatro parámetros con el software Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA) para obtener valores de CE₅₀ para la titulación de LFA-1 y los valores de CI₅₀ de los antagonistas. La ecuación utilizada para ajustar los datos es $Y = \frac{(A-D)}{(1+(X/C)^B)} + D$, en la que Y es la respuesta del ensayo, A es Y - valor en la asíntota superior, B es el factor de pendiente, C es la CI₅₀ o CE₅₀ y D es Y - el valor de la asíntota inferior. En general, los datos medidos tanto en la PF homogénea como los formatos de ELISA heterogéneos descritos a continuación, contienen relaciones señal-fondo relativamente grandes y las estimaciones de error en los ajustes son, típicamente, de menos del 10 % del valor final del parámetro ajustado. Las constantes de disociación de equilibrio (K_d) de LFA-1 para el compuesto 1 con y sin A-286982 se calcularon utilizando análisis de Klotz y Hill. Las afinidades (K_i) de los antagonistas de LFA-1 se calcularon utilizando los valores de el CI₅₀, la K_d del compuesto 1/LFA-1, y las concentraciones de compuesto 1 y LFA-1 en los experimentos de 45 competición.

Ejemplo 2: Ensayos de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA) de LFA-1/ICAM-1 y LFA-1/molécula pequeña

- 50 (A) Competición del antagonista: Las moléculas pequeñas y las sICAM-1 se analizaron para determinar la capacidad de alterar la unión de ICAM-1-Ig o un antagonista de molécula pequeña marcado con fluoresceína, compuesto 2B, a LFA-1 en un formato competitivo. El compuesto 2B es similar al compuesto 1, pero con un enlazador más largo entre la molécula pequeña y la fluoresceína para maximizar la unión del anticuerpo de detección anti-fluoresceína. Se revistieron placas de 96 pocillos con 5 μg/ml (33,3 nM) de integrina β2 anti-humana de ratón (un anticuerpo de bloqueo sin función) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con tampón de ensayo (Hepes 20 mM, pH 7,2, NaCl 140 mM, MnCl₂ 1 mM, 0,5 % de seroalbúmina bovina (BSA) y 0,05 % de Tween-20) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado en tampón (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, MnCl₂ 1 mM y 0,05 % de Tween-20), se añadieron LFA-1 8 nM (ELISA de LFA-1/ICAM-1) o LFA-1 2 nM (ELISA de LFA-1/molécula pequeña), seguido de 60 incubación durante 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron y para el ELISA de LFA-1/ICAM-1 se añadieron diluciones en serie de los antagonistas de molécula pequeña o sICAM-1 a las placas durante 30 minutos, seguido de la adición de ICAM-1-Ig 0,89 nM (concentración final) durante 2 horas a 37 °C. Después de un lavado adicional, se añadió anti-huIgG de cabra (específico de Fc)-HRP y se incubó durante una hora a 37 °C. En el ELISA de LFA-1/molécula pequeña, los antagonistas diluidos y el compuesto 2B 25 nM se añadieron 65 simultáneamente a las placas, seguido de una incubación de 2 horas a 37 °C. Se añadió anti-fluoresceína-HRP de oveja después de un lavado y se incubó durante una hora a 37 °C. Para ambos ensayos, después del lavado,

los anticuerpos conjugados con HRP unidos se detectaron mediante la adición de tetrametilbencidina (TMB), seguido de la medición de la absorbancia de la producto a 450 nm después de la adición de H₃PO₄ 1M para detener la reacción. Los valores de CI₅₀ para cada curva se determinaron mediante ajuste a la ecuación de

5 (B) *Unión del ligando*: Los ELISA de LFA-1/ICAM-1 y LFA-1/molécula pequeña se realizaron como se ha descrito anteriormente, excepto que las diluciones en serie de cualquiera de ICAM-1-Ig o el compuesto 2B se añadieron a las placas, ya sea en la presencia o ausencia de antagonista. En todos los casos se añadió el ligando simultáneamente con el antagonista. Las placas se incubaron durante 6 horas a 37 °C para acercarse a las condiciones de equilibrio después de la adición del antagonista y el ligando, antes del lavado y la adición del anticuerpo de detección. Los valores de CE₅₀ para cada curva se determinaron mediante el ajuste con un modelo de cuatro parámetros como se ha descrito anteriormente. Los valores de CE₅₀ generados en presencia y ausencia de antagonista se analizaron por regresión de Schild. Los gráficos de Schild de Log (relación de la conc. -1) frente a la concentración de antagonista se calculan a partir de (relación de la conc. -1) = ((CE₅₀ del ligando con antagonista)/(CE₅₀ del ligando sin antagonista))-1. Las pendientes de los gráficos del Log (relación de la conc. -1) frente a la concentración del antagonista se calculan mediante el ajuste de la línea a la ecuación lineal, Y = A+ BX.

20 Ejemplo 3: Reticulación de un análogo fotoactivable radiomarcado del compuesto 3 a LFA-1

El LFA-1 humano de longitud completa asociado a la membrana o BSA (0,35 mg/ml [1,4 y 5,3 μM, respectivamente] en Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, MgCl₂ 5 mM, MnCl₂ 1 mM y 1 % de n-octilglucósido, pH 7,2) se incubó durante la noche a 37 °C con compuesto 5 4,1 μM, un análogo fotoactivable marcado con tritio del compuesto 3, en presencia o ausencia del compuesto 3 290 μM. la relación molar entre el compuesto 5 y LFA-1 fue de 3:1. Se usó una placa de 96 pocillos revestida previamente con 1 % de BSA para la incubación. Justo antes de la reticulación, el exceso de compuesto 5 se retiró rápidamente mediante filtración en gel con una columna de MicroSpin G-25 en un formato de 96 pocillos equilibrada con el mismo tampón. El complejo de LFA-1/compuesto 5 se reticuló mediante exposición a una lámpara de mercurio de alta presión de vapor (450 vatios, Ace glass, Vineland, NJ). Durante la irradiación, las muestras se enfriaron en hielo y se protegieron mediante una placa de 5 mm de espesor de vidrio de borosilicato para minimizar la degradación de proteínas. El compuesto no unido residual 5 se eliminó por filtración en gel (G-25) como anteriormente. A continuación, el complejo reticulado se desnaturalizó en clorhidrato de guanidina 8 M (GuHCl) y se redujo y se alquiló. Las proteínas tratadas se sometieron a SDS-PAGE, seguido de tinción con azul de Coomassie. Las proteínas radiomarcadas se visualizaron mediante autorradiografía.

35 Para identificar los sitios de unión del compuesto 5, las subunidades αL y β2 tratadas se separaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño en presencia de GuHCl 6M, Hepes 20 mM, EDTA 10 mM, pH 6,8 y, después, se escindieron químicamente con hidroxilamina 2,6 M en 10 % de ácido acético con GuHCl 7M durante 4 horas a 75 °C. Los fragmentos de proteína radiomarcados se separaron mediante SDS-PAGE y o se visualizaron mediante autorradiografía o se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno, se tiñeron con azul de Coomassie y después se identificaron mediante secuenciación de proteínas N-terminal.

40 Ejemplo 4: Generación de la construcción de αL que carece del dominio I

45 La construcción utilizada, pLFA.hulD.Δp, contiene la secuencia del gen de αL desde el sitio de restricción Nar1 en 5' del dominio I al segundo sitio de restricción PflM1 en 3' del dominio I en el que el primer sitio de restricción PflM1 en 3' del dominio I se suprimió (Edwards et al. 1995). Para generar el mutante que carece del dominio I, se hicieron los siguientes cebadores: el cebador directo CACTGTGGCGCCCTGGTTTTTCAGGAAGGTAGTGGATCAGGCACAAGCAAACAGGACCTGACTTC (SEQ ID NO 3), que contiene la secuencia del sitio de Nar1 para el inicio del dominio I, una secuencia de ADN que codifica GSGSG (SEQ ID NO 3) y los 23 pb de la secuencia αL después del final del dominio I y el cebador inverso TCTGAGCCATGTGCTGGTATCGAGGGGC (SEQ ID NO 5), que ceba en el segundo sitio de restricción PflM 1 después del dominio I. La PCR se realizó usando estos cebadores y pLFA.hulD.Δp linealizado con Bgl II, que corta en un sitio dentro del dominio I. Se amplificó un fragmento de ADN que contenía la secuencia desde el sitio Nar 1 al segundo sitio PflM 1 y en el que todo el dominio I, de C125 a G311, se reemplazó con una secuencia de ADN que codifica GSGSG. Este fragmento de ADN se purificó, se digirió con Nar1 y PflM1 y se insertó en el plásmido de αL humano (pRKLFAαm) en los correspondientes sitios Nar1 y PflM1. La inserción correcta de la secuencia de ADN que codifica GSGSG se confirmó mediante análisis de secuencia.

60 Ejemplo 5: Unión de LFA-1 que carece del dominio I de la ICAM-1 o Compuesto 2B

65 Células 293 se transfectaron con la construcción β2 sola (simulado) o con la construcción de αL de tipo salvaje (wt) o la construcción de αL que carece del dominio I (sin I) y se dejaron recuperar durante 3 días. Las células se desprendieron y se resuspendieron en tampón de adhesión (HEPES 0,02 M, pH 7,2, NaCl 0,14 M, 0,2 % de glucosa). La unión a la CAM-1-Ig unida a la placa se llevó a cabo como se ha descrito (Edwards et al. 1998). Para la unión del compuesto 2B, se añadieron 2 x 10⁵ por pocillo en una placa de fondo redondo de 96 pocillos en tampón

de adhesión que contenía 0,5 % de BGG, MnCl₂ 0,1 mM, anticuerpo activador anti-β2 1 μg/ml MEM-48 y compuesto 2B 1 μM. Las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C, se lavaron con PBS frío y se fijaron con formaldehído al 1 %/PBS. A continuación, las células se incubaron con una dilución 1:500 de anti-fluoresceína de oveja-HRP durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se incubaron con TMB durante 15 minutos. La reacción se detuvo con H₃PO₄ 1M y se leyó a 450 nm. En paralelo, los transfectantes se analizaron para determinar la integridad estructural de los complejos de αL/β2 expresados en la superficie y la presencia o ausencia del dominio I por análisis FACS utilizando un panel de anticuerpos con epítotos de unión conocidos.

Ejemplo 6: Modelo de retinopatía diabética en ratas inducida por estreptozocina

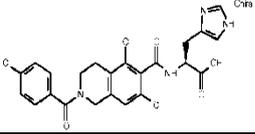
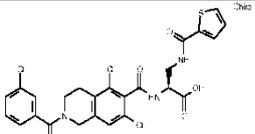
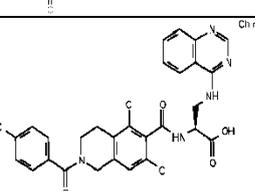
A 15 ratas de laboratorio adultas (Sprague-Dawley) se inyecta por vía intraperitoneal el día 1 estreptozocina (SZT), 65 mg/kg, para hacerlos hiperglucémicos y para inducir diabetes. Se trata a 5 ratas adicionales con un volumen similar de solución salina, para crear un grupo de control no diabético. Poco después y durante un total de 6 días, 8 de las ratas diabéticas recibieron una instilación de un antagonista de LFA-1 en un vehículo portador adecuado en cada ojo. 7 de los animales diabéticos reciben instilaciones similares del mismo volumen de vehículo portador solo, de acuerdo con el mismo programa de dosificación. Los animales del grupo de control no diabéticos reciben instilaciones de vehículo portador solo y permanecen normoglucémicos.

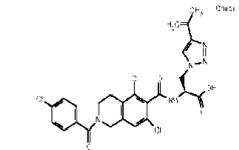
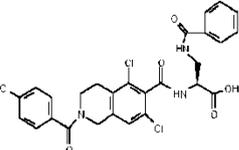
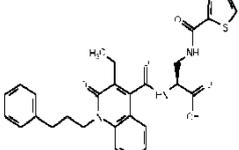
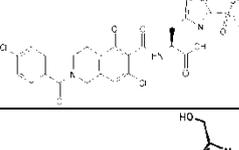
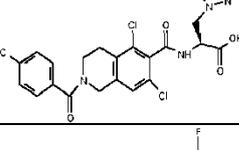
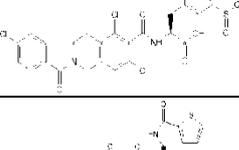
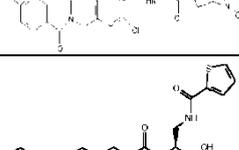
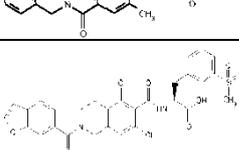
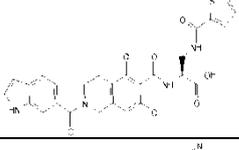
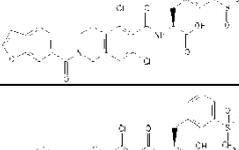
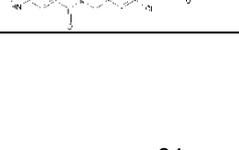
El día 14, se examinan los ojos de todos los animales mediante angiografía con fluoresceína, después se sacrifica a todos los animales de los tres grupos y sus ojos se extirpan quirúrgicamente y se aísla el tejido de la retina a partir de ellos. El tejido de la retina es examinado mediante micropictografía. La medida en que las anomalías en la microvasculatura se desarrollan en el tejido corneal del control diabético, su inhibición mediante la administración del antagonista de LFA- en el grupo de tratamiento de diabetes y la comparación con el grupo control normoglucémico se cuantifican mediante análisis morfométrico estandarizado de las fotomicrografías.

Ejemplo 7: Ensayo de adhesión de células T humanas

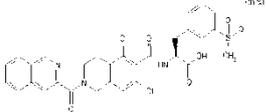
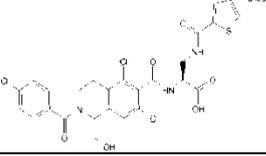
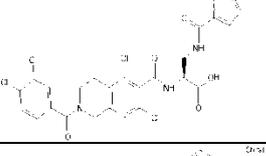
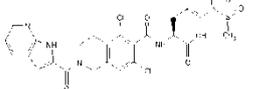
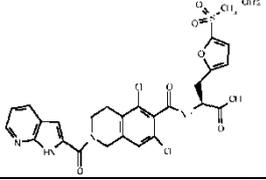
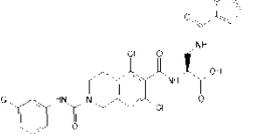
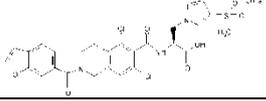
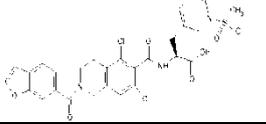
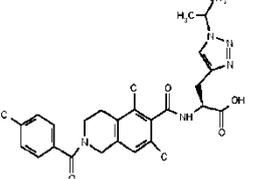
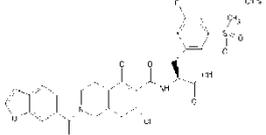
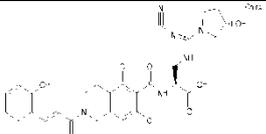
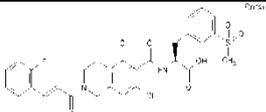
El ensayo de adhesión de células T se realizó usando la línea celular linfocitoide T humana HuT 78 (ATCC TIB-161). Se diluyó el anticuerpo anti-HulG(Fc) de cabra a 2 μg/ml en PBS y las placas de 96 pocillos se recubrieron con 50 μl/pocillo a 37 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron con PBS y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 1 % de BSA en PBS. La ICAM-1g con dominio 5 se diluyó a 100 ng/ml en PBS y se añadieron 50 μl/pocillo a las placas de O/N a 4 °C. Las células HuT 78 se centrifugaron a 100 g y el sedimento celular se trató con EDTA 5 mM durante ~ 5' a 37 °C en un incubadora con CO₂ al 5 %. Las células se lavaron en NaCl 0,14 M, Hepes 0,02 M, 0,2 % de glucosa y MnCl₂ 0,1 mM (tampón de ensayo) y se centrifugaron. Las células se resuspendieron en tampón de ensayo a 3,0 X 10⁶ c/ml. Los inhibidores se diluyeron en tampón de ensayo a una concentración final 2X y se pre-incubaron con células HUT78 durante 30' a temperatura ambiente. Se añadieron 100 μl/pocillo de las células y los inhibidores a las placas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron 100 μl/pocillo de PBS y las placas se sellaron y se centrifugaron invertidas a 100 g durante 5'. Las células no unidas se movieron hacia fuera de la placa y el exceso de PBS se transfirió sobre una toalla de papel. Se añadieron 60 μl/pocillo de p-nitrofenilo n-acetil-β-D-glucosaminida (0,257 g a 100 ml de tampón citrato) a la placa y se incubó durante 1,5 horas a 37 °C. La reacción enzimática se detuvo con 90 μl/pocillo de glicina 50 mM/EDTA 5 mM y se leyeron en un lector de placas a 405 nm. La adhesión de las células HUT 78 a 5 dICAM-1g se midió usando el procedimiento de p-nitrofenil n-acetil-β-D-glucosaminida de Landegren, U. (1984). J. Immunol. Methods 57, 379-388. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de los ensayos de adhesión y resultados de solubilidad para antagonistas de LFA-1 directamente competidores seleccionados de la invención

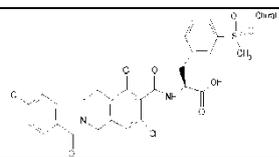
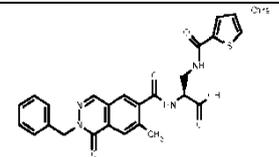
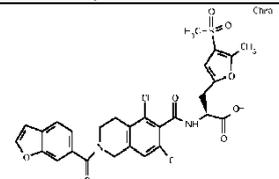
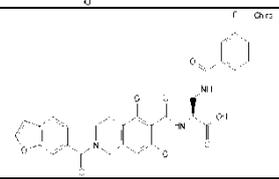
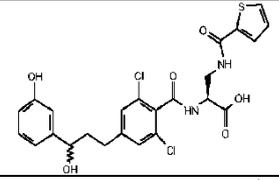
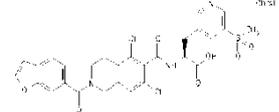
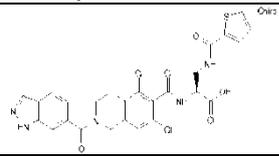
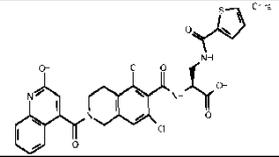
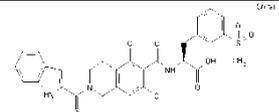
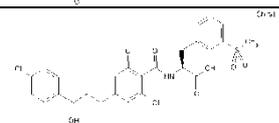
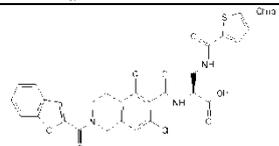
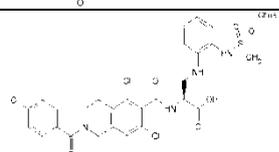
N.º de compuesto	Estructura	Hut78 (CE ₅₀)	Solubilidad
1		**	
2		****	+++
3		****	

4		***	
5		****	
6		****	+++
7		****	
8		***	
9		****	++
10			+++
11		*	
12		****	+++
13		****	
14		****	
15		****	+++

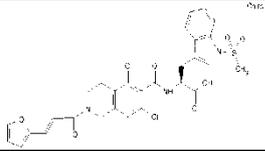
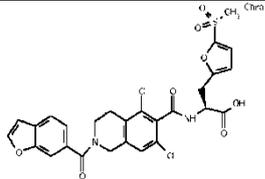
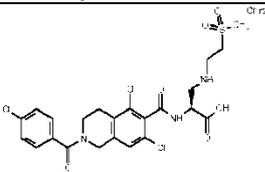
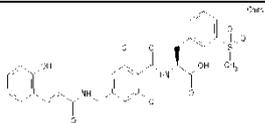
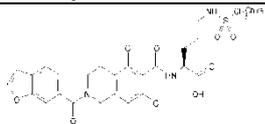
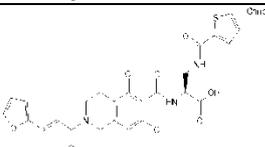
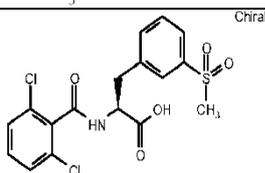
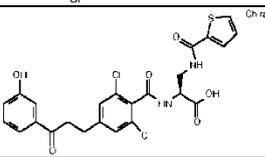
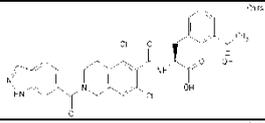
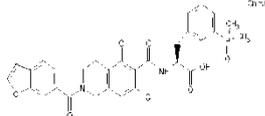
(Continua)

16		****	+++
17		****	
18		****	
19		****	++
20		****	+++
21		****	+++
22		****	
23		****	
24		***	
25		****	+++
26		****	
27		****	+++

(Continua)

28		****	
29		*	+++
30		****	
31		****	++
32		****	++
33		****	
34		****	
35		****	+++
36		****	++
37		***	
38		****	
39		****	

(Continua)

40		**	
41		****	+++
42		*	+++
43		****	
44		****	+++
F 45		****	+++
46		***	+++
47		****	
48		****	
49		***	

La escala de la tabla representa los valores de CE₅₀ de la siguiente manera: * representa 3 μM o menos, ** representa 300 nM o menos, *** representa 100 nM o menos, y **** representa 50 nM o menos.
La escala de la tabla representa los valores de solubilidad de la siguiente manera: + representa más de 10 mg/ml, ++ representa más de 50 mg/ml, y +++ representa más de 100 mg/ml.

Ejemplo 8: Inhibición in vitro de la liberación estimulada por antígeno de las citocinas de monocitos de sangre periférica humana (PBMC)

Un antagonista competitivo directamente de LFA-1 de la invención se evaluó por su capacidad para inhibir la liberación de citocinas inflamatorias, en mononucleocitos humanos (PBMC) estimulados con la enterotoxina B estafilocócica (SEB). Las soluciones madre de antagonista, rebamipida (un agente protector de la mucosa) y ciclosporina A (CsA) se prepararon en medio de cultivo y las diluciones se prepararon mediante la adición de medios de cultivo para conseguir la concentración deseada. Los controles negativos se prepararon sin estimulación con SEB. La estimulación con SEB con vehículo (0,25 % de DMSO/media) se utilizó como control positivo.

Los PBMC humanos, congelados en los medios de crioconservación, se descongelaron, se lavaron con medio de cultivo RPMI que contiene 10 % de SFB en medio de crecimiento y se sembraron en una placa de 96 pocillos a 20.000 células/pocillo que contiene 180 µl de medios de cultivo. Las células se incubaron en presencia de antagonista, rebamipida o CsA a 37 °C durante 1 hora antes de la estimulación con SEB. Se añadió SEB a 1 ng/ml y los sobrenadantes celulares se cosecharon a las 6, 16 y 48 horas. Los niveles de citocinas en los sobrenadantes de ensayo se determinaron usando un ensayo multiplex Luminex.

El antagonista demostró una potente inhibición de la liberación de citocinas inflamatorias, en particular las citocinas que regulan las células T, IL-2 e IL-4, con una dosis creciente. Los resultados se muestran en las Tablas 2, 3 y 4 y se representan gráficamente en la Figura 11. El patrón de liberación de citocinas inhibidas en más del 50 % con el antagonista competitivo directamente de LFA-1 es similar al observado en comparación con CsA. Las excepciones a esta similitud, IL-3, IL-6 e IL-12 p40, no se ha demostrado que sea importante para la inflamación mediada por células T.

Tabla 2. Concentraciones CE₅₀ para la inhibición de IL-2, IFN γ , MIP-1 α y TNF- α .

	CE ₅₀ µM Liberación de citocinas			
	IL-2	IFN γ	MIP-1 α	TNF- α
Antagonista de LFA-1	0,0018	0,0016	0,020	0,076
Rebamipida	>1000	>1000	>1000	>1000
Ciclosporina A	0,00094	0,00050	0,0011	0,00049

Tabla 3. Concentraciones CE₅₀ para la inhibición de IL-4, IL-10, IP-10, GM-CSF y MCP-1.

	CE ₅₀ µM Liberación de citocinas				
	IL-4	IL-10	IP-10	GM- CSF	MCP-1
Antagonista de LFA-1	0,143	0,147	1,158	0,545	0,0050
Rebamipida	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Ciclosporina A	0,0063	0,0292	0,167	0,0202	0,0926

Tabla 4. Concentraciones CE₅₀ para la inhibición de IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-5, IL-6, IL-12 p40 e IL-13.

	CE ₅₀ µM Liberación de citocinas						
	IL-1 α	IL-1 β	IL-3	IL-5	IL-6	IL-12 p40	IL-13
Antagonista de LFA-1	0,24	0,36	52,23	0,11	43,51	>1000	0,36
Rebamipida	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Ciclosporina A	0,002	0,003	0,002	0,073	0,001	0,002	0,074

Ejemplo 9: Formulaciones de un antagonista de LFA-1

Un antagonista directamente competitivo LFA-1 de la invención se formula en varias composiciones para la administración como geles, lociones, ungüentos y soluciones, para la administración mediante varias vías, incluyendo, pero sin limitaciones, mediante instilación, aerosol, parche transdérmico, a través de inserto o administración oral.

Tabla 5. Formulaciones en gel 1 y 2 del antagonista de LFA-1.

	Formulación 2 (% p/p)
Antagonista de LFA-1	Antagonista de LFA-1
15 % de dimetil isosorbida	15 % de dimetil isosorbida
25 % Transcutol	25 % Transcutol
12 % de hexilenglicol	12 % de hexilenglicol
5 % de propilenglicol	5 % de propilenglicol
0,15 % de metilparabeno	0,15 % de metilparaben
0,05 % de propilparabeno	0,05 % de propilparabeno
0,01 % de EDTA	0,01 % de EDTA
0,5 % de Penmulen TR-1	1 % de hidroxietilcelulosa
c.s. pH 6,0 25 % de trolamina	c.s. pH 4,5 25 % de trolamina
c.s.100 Agua	c.s.100 Agua

Tabla 6. Formulaciones en loción 3 y 4 del antagonista de LFA-1.

	Formulación 4 (% p/p)
1 % del antagonista de LFA-1	1 % del antagonista de LFA-1
13 % de dimetil isosorbida	13 % de dimetil isosorbida
20 % Transcutol	20 % Transcutol
10 % de hexilenglicol	10 % de hexilenglicol
4 % de propilenglicol	4 % de propilenglicol
0,15 % de metilparaben	0,15 % de metilparaben
0,05 % de propilparabeno	0,05 % de propilparabeno
0,01 % de EDTA	0,01 % de EDTA
0,5 % de Carbopol Ultrez 10	0,3 % de Carbopol Ultrez 10
0,2 % de Penmulen TR-1	0,2 % de Penmulen TR-1
3 % de miristato de isopropilo	2 % de alcohol cetílico
5 % de alcohol oleílico	5.5 % de aceite mineral ligero
5 % de vaselina blanca	5 % de ácido oleico
0,02 % de hidroxitolueno butilado	0,02 % de hidroxitolueno butilado
c.s. pH 6,0 25 % de trolamina	c.s. pH 6,0 25 % de trolamina
c.s.100 Agua	c.s.100 Agua

Tabla 7. Formulaciones en ungüento 5 y 6 del antagonista de LFA-1.

	Formulación 6 (% p/p)
1 % del antagonista de LFA-1	1 % del antagonista de LFA-1
15 % de PEG 400	10 % de dimetil isosorbida
0,02 % de hidroxitolueno butilado	0,02 % de hidroxitolueno butilado
2 % de Span 80	2 % de Span 80
10 % de cera blanca	10 % de cera blanca
71,98 % de vaselina blanca	76,98 % de vaselina blanca

Tabla 8. Formulaciones en solución 7, 8 y 9 del antagonista de LFA-1.

Formulación 7 (% p/p) 1 % del antagonista de LFA-1	Formulación 8 (% p/p) 1 % del antagonista de LFA-1	Formulación 9 (% p/p) 1 % del antagonista de LFA-1
15 % de dimetil isosorbida	15 % de dimetil isosorbida	99 % de dimetilsulfóxido
25 % Transcutol	25 % Transcutol	
12 % de hexilenglicol	12 % de hexilenglicol	
5 % de propilenglicol	5 % de propilenglicol	
c.s. pH 4,5 25 % de trolamina	c.s. pH 6,0 25 % de trolamina	
c.s.100 Agua	c.s.100 Agua	

Tabla 9. Formulaciones en solución 10, 11, 12, 13 y 14 del antagonista de LFA-1.

% P/P	Formulación 10	Formulación 11	Formulación 12	Formulación 13	Formulación 14
Antagonista de LFA-1	0,1 %	0,3 %	1 %	3 %	5 %
Bicarbonato sódico	0,015 %	0,046 %	0,15 %	0,46 %	0,77 %
	0,1 % de EDTA				
	0,12 % de fosfato sódico monobásico				
	0,4 % de metilparaben				
	0,02 % de propilparabeno				
	c.s. Osmolalidad 270, cloruro sódico				
	c.s. pH 7,0 1 % de hidróxido sódico				
	c.s. pH 7,0 1 % de HCl				
	c.s. de Agua				

Tabla 10. Formulación en solución 15 del antagonista de LFA-1.

Formulación 15
1 ml de una solución del antagonista de LFA-110 % P/P en agua, más 0,158 mmol de bicarbonato sódico
Diluir con 9 ml de PBS

Ejemplo 10. Absorción percutánea in vitro de un antagonista competitivo directamente de LFA-1 de la invención tras aplicación tópica.

] La biodisponibilidad tras la aplicación tópica *in vivo* se evaluó a través de procedimientos de ensayo de absorción percutánea in vitro, mediante procedimientos adaptados de Skelly et al., *Pharmaceutical Research* 1987 4(3): 265–276, "FDA and AAPS Report of the Workshop on Principles and Practices of In-Vitro Percutaneous Penetration Studies: Relevance to Bioavailability and Bioequivalence".

Las formulaciones 1-9 se aplicaron a tejido de piel humana con dermatoma escindido de un solo donante en una sola dosis clínicamente relevante de 5 mg/cm², que es equivalente a una dosis 30-35 µg. El espesor del tejido varía desde 0,023 a 0,039 pulgadas (0,584 a 0,991 mm) con una desviación media +/- estándar en espesor de 0,030 +/- 0,004 pulgadas (0,773 +/- 0,11 mm) y un coeficiente de variación de 14,4 %. Las muestras de tejido se montaron en Bronaugh Flow a través de células de difusión. Las células se mantuvieron a una temperatura constante de 32 1C usando la recirculación de los baños de agua. Las células tienen un área de difusión nominal de 0,64 cm². Se utilizó PBS, a pH 7,4, con 0,1 % de azida sódica y 4 % de seroalbúmina bovina como la fase receptora debajo del tejido montado. La fase receptora fresca se bombeó continuamente bajo el tejido a un caudal de, nominalmente, 1,0 ml/h y se recogió en intervalos de 6 horas. Las fases receptoras se recogieron para su análisis.

Las muestras de tejido fueron expuestas a las formulaciones 1-9 durante 24 horas. El exceso de formulación que reside en el estrato córneo en ese punto de tiempo se eliminó mediante cinta de arrastre con discos de desbroce CuDerm D-Squame. Las tiras de cinta se descartaron. La epidermis y la dermis se separaron por disección roma.

5 Epidermis, la dermis y la fase de receptor se analizaron para determinar el contenido del antagonista de LFA-1. Los resultados se representan en la tabla 11.

10 Los niveles de penetración del tejido (la fase receptora) del antagonista de LFA-1 para todas las formulaciones, excepto para la Formulación 9, que contenía 99 % de DMSO, se encontraban por debajo de los límites de cuantificación, que era 0,54 ng/ml (que es equivalente a 0,013 % de la dosis aplicada). La Formulación 9, por el contrario, proporcionó un 1,4 % de la dosis aplicada, que penetra a través de todas las capas de tejido de la piel durante el período de exposición de 24 horas.

15 La deposición epidérmica del antagonista de LFA-1 durante el período de exposición de 24 horas era muy alta y consistente con un gran porcentaje de la dosis aplicada retenido en las capas superiores de la epidermis. Los niveles indicados en la Tabla 10 se obtuvieron de muestras de volumen pequeño, que no se pudo reanalizar y, por lo tanto, se consideran una subestimación de la cantidad de fármaco presente en la epidermis.

20 Los datos analíticos para la dermis cayeron dentro del intervalo de linealidad establecido para el antagonista de LFA-1 y son cuantitativos. La deposición dérmica del antagonista de LFA-1 después de una exposición de 24 horas varió de 0,66 % (Formulación 6, 0,258 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a 4,4 % (Formulación 7, 34,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de la dosis aplicada. La concentración del antagonista de LFA-1 en la dermis se calcula como 6,7 μM (Formulación 6) o mayor (es decir, la Formulación 7 proporciona una concentración en la dermis de 54,1 μM) para las Formulaciones 1 a 9 en la dermis. Estas concentraciones están muy por encima de la concentración CE50 *in vitro* para el efecto semimáximo en la inhibición de la liberación de citocinas inflamatorias por la clase de los antagonistas de LFA-1 mostrados en el Ejemplo 7 y la correspondiente tabla 1. Estos resultados son, por lo tanto, predictivos de la capacidad de una variedad de formulaciones, que incorporan un 1 % PAV del antagonista de LFA-1, para proporcionar niveles terapéuticamente eficaces de inhibición *in vivo* de la liberación de citocinas.

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 11. Niveles acumulados de fase receptora y de tejido del antagonista de LFA-1 después de 24 horas de exposición tópica.

n.º de formulación	Contenido en la fase receptora a 24 horas		Epidermis		Dermis			
	µg/cm ²	% de dosis aplicada	µg/cm ²	% de dosis aplicada	µg/cm ²	µg/ml	% de dosis aplicada	
1	Media	< Límite de cuantificación		3,93	7,48	1,14	18,8	2,15
	SD ¹			2,92	5,50	0,91	14,9	1,73
	%CV ²			74	74	80	80	80
2	Media	< Límite de cuantificación		6,03	11,9	0,750	12,3	1,49
	DE			2,56	5,1	0,304	5,0	0,63
	% CV			43	42	40	40	42
3	Media	< Límite de cuantificación		6,03	12,1	1,40	23,0	2,74
	DE			2,97	6,4	0,27	4,4	0,47
	% CV			49	53	19	19	17
4	Media	< Límite de cuantificación		7,92	17,0	0,975	16,0	2,10
	DE			3,41	7,2	0,350	5,8	0,75
	% CV			43	42	36	36	36
5	Media	< Límite de cuantificación		5,71	14,6	0,670	11,0	1,71
	DE			1,73	4,2	0,351	5,8	0,87
	% CV			30	29	52	52	51
6	Media	< Límite de cuantificación		6,47	16,8	0,258	4,25	0,657
	DE			1,07	2,7	0,158	2,6	0,394
	% CV			17	16	61	61	60
7	Media	< Límite de cuantificación		7,22	15,0	2,08	34,3	4,35
	DE			2,15	4,5	0,84	13,7	1,83
	% CV			30	30	40	40	42
8	Media	< Límite de cuantificación		8,58	18,0	1,48	24,3	3,09
	DE			3,53	7,7	0,99	16,2	2,07
	% CV			41	43	67	67	67
9	Media	0,660	1,43	5,78	13,2	1,19	19,6	2,63
	DE	0,253	0,49	3,18	8,3	0,49	8,1	1,15
	%CV	38	34	55	63	41	41	44
1. Desviación estándar								

2. Porcentaje del coeficiente de variación**55 Ejemplo 11: Ensayo de proliferación de células T.**

Este ensayo es un modelo *in vitro* de la proliferación de linfocitos resultante de la activación, inducida por el acoplamiento del receptor de células T y LFA-1, tras la interacción con las células presentadoras de antígeno (Springer, Nature 346: 425 (1990)).

60 Las placas de microtitulación (Nunc de 96 pocillos para ELISA certificada) se revisten previamente durante la noche a 4 °C, con 50 µl de 2 µg/ml de Fc anti-humano de cabra (Caltag H 10700) y 50 µl de 0,07 µg/ml de anticuerpo monoclonal frente a CD3 (Immunotech 0178) en PBS estéril. Las soluciones de la capa del día siguiente se aspiran. Después, las placas se lavan dos veces con PBS y se añade n 100 µl de 17 ng/ml de 5d-ICAM-I-IgG durante 4 horas a 37 °C. Las placas se lavan dos veces con PBS antes de la adición de las células T CD4+. Los linfocitos de sangre periférica se separan de la sangre entera heparinizada sangre extraída de donantes sanos. Un procedimiento

alternativo es la obtención de sangre completa de donantes sanos mediante leucoforesis. La sangre se diluye 1:1 con solución salina, se estratifica y se centrifuga a 2.500xg durante 30 minutos en LSM (6,2 g Ficoll y 9,4 g de diztrizoato de sodio por 100 ml) (Organon Technica, NJ.). Los monocitos se agotan utilizando un procedimiento de reactivo de depleción de células mieloides (Myeloclear, Cedarlane Labs, Hornby, Ontario, Canadá). Las PBL se resuspenden en 90 % de suero bovino fetal inactivado con calor y 10 % de DMSO, se alicuotan y se almacenan en nitrógeno líquido. Después de la descongelación, las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con suero bovino fetal al 10 % inactivado con calor (Intergen, Purchase, NY), piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 3 mM, aminoácidos no esenciales 1 mM, 500 µg/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin, 50 µg/ml de gentamicina (Gibco).

La purificación de las células T CD4+ se obtienen por el procedimiento de selección negativa (kit de columna de recuperación de células CD4 humanas n.º CLL 10-5 Accurate). 100.000 células T CD4+ purificadas (90 % de pureza) por pocillo de microtitulación se cultivan durante 72 horas a 37 °C. en 5 % de CO₂ en 100 ml de medio de cultivo (RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10 % de FBS inactivado con calor (Intergen), aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato sódico 1 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 50 µg/ml de gentamicina, Hepes 10 mM y glutamina 2 mM). Los inhibidores se añaden a la placa en el inicio del cultivo. Las respuestas proliferativas en estos cultivos se miden mediante la adición de 1 µCi/pocillo de timidina tritiada durante las últimas 6 horas antes de la recolección de las células. Incorporación del marcador radiactivo se mide por recuento de centelleo líquido (cosechadora Packard de 96 y contador). Los resultados se expresan en cuentas por minuto (cpm).

Ejemplo 12: Modelo de cultivo de linfocitos mixtos *in vitro*

El modelo de cultivo de linfocitos mixtos, que es un modelo *in vitro* de trasplante (A. J. Cunningham, "Understanding Immunology, Transplantation Immunology" páginas 157–159 (1978) examina los efectos de diversos antagonistas de LFA-1 tanto en las ramas de proliferación como efectoras de la respuesta de linfocitos mixtos humanos.

Aislamiento de células: Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se separan de la sangre entera heparinizada extraída de donantes sanos. La sangre se diluye 1:1 con solución salina, se estratifica y se centrifuga a 2.500xg durante 30 minutos en LSM (6,2 g Ficoll y 9,4 g de diztrizoato de sodio por 100 ml) (Organon Technica, NJ.). Un procedimiento alternativo es la obtención de sangre completa de donantes sanos mediante leucoforesis. Las PBMC se separan como anteriormente, se resuspenden en 90 % de suero bovino fetal inactivado con calor y 10 % de DMSO, se alicuotan y se almacenan en nitrógeno líquido. Después de la descongelación, las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con suero bovino fetal al 10 % inactivado con calor (Intergen, Purchase, NY), piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 3 mM, aminoácidos no esenciales 1 mM, 500 µg/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin, 50 µg/ml de gentamicina (Gibco).

Respuesta de linfocitos mixtos (RLM): Una forma de establecer los cultivos de linfocitos mixtos humanos de una vía es en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano. 1,5 x 10⁵ de PBMC de respuesta se cocultivan con un número igual de PBMC alogénicos irradiados (3000 rads durante 3 minutos, 52 segundos de estimulación en 200 µl de medio completo. Los antagonistas de LFA-1 se añaden al principio de los cultivos. Los cultivos se incuban a 37 °C en 5 % de CO₂ durante 6 días, a continuación se pulsaron con 1 µCi/pocillo de 3H-timidina (6,7 Ci/mmol, NEN, Boston, Mass.) durante 6 horas. Los cultivos se recogen en un cosechador de células Packard (Packard, Canberra, Canadá). La incorporación de [³H] TdR se mide por recuento de centelleo líquido. Los resultados se expresan en cuentas por minuto (cpm).

Ejemplo 13: Ensayo de adhesión de células T usando células Jurkat

El propósito de este estudio es evaluar las propiedades anti-adhesivas de los **antagonistas de LFA-1** sobre la unión de las células Jurkat a ICAM-1 después de la exposición *in vitro*.

Las soluciones madre del antagonista de LFA-1 y el control positivo se preparan en DMSO/agua (1:1) y se diluyen en medio de ensayo y se preparan diluciones posteriores mediante la adición de medio de ensayo para alcanzar la concentración deseada. Se usa un antagonista de LFA-1 indicado como control positivo.

Las células Jurkat se marcan con una solución 8 µM de BCECF-AM (2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(y-6) carboxifluoresceína) en medio de crecimiento a la temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células marcadas se incuban en 70 µl de medio de ensayo en cada pocillo de una placa de 96 pocillos a 500.000 células por pocillo con 70 µl de antagonista de LFA-1 o control positivo en medio de ensayo a 37 °C durante 30 minutos. Se permite reposar un alícuota de 100 µl de esta suspensión de células Jurkat marcadas con fluorescencia en presencia de antagonista de LFA-1 o el control positivo en los pocillos de una placa de 96 pocillos recubierta con ICAM-1 recombinante humana expresada como una quimera de Fc a 37 °C durante 1 hora. Las células no adherentes se eliminan mediante lavado y centrifugación a 100 g durante 1 minuto. Las células adherentes se determinan como unidades fluorescentes adherente sobre un lector de placa fluorescente.

Ejemplo 14. Liberación dérmica de un antagonista de LFA-1 directamente competitivo de la invención

mediante aplicación tópica en la circulación sanguínea

Se realiza un estudio para determinar la liberación de un antagonista de LFA-1 directamente competitivo de la invención mediante aplicación tópica sobre la piel, a la circulación sanguínea. Las formulaciones de gel (formulado como en la Formulación n.º 1, Tabla 5), loción (formulada como en la Formulación n.º 3, Tabla 6), ungüento (formulado como en la Formulación n.º 5, Tabla 6) y una solución de DMSO al 1 % (control) se evalúan en ratas Sprague Dawley macho, como se muestra en la Tabla 12.

Administración de la dosis Los animales no se mantienen en ayunas para este estudio. Todas las dosis únicas y múltiples se dan sobre una base fija (200 µl de formulación /animal/dosis). Los pesos del aparato para la dosis cargado y vacío se registran para la determinación de los pesos reales de la formulación administrados.

Dérmica. Para la administración dérmica en los Grupos 1 a 4 (Grupo 1 (gel); Grupo 2 (ungüento); Grupo 3 (loción); Grupo 4 (DMSO), estudio de un solo día, datos no mostrados), cada animal recibe una sola aplicación tópica en la piel dorsal el día 1. Para la administración dérmica en los Grupos de 6 a 9 (Grupo 6 (gel); Grupo 7 (ungüento); Grupo 8 (loción); Grupo 9 (DMSO, dérmica)), cada animal recibe 3 aplicaciones tópicas aplicadas diariamente (separadas por aproximadamente 4 horas) en la piel dorsal durante 7 días consecutivos.

Intradérmica. Para cada animal en el Grupo 5 (DMSO, intradérmica), la dosis intradérmica de 200 µl se administra el día 1 como dos, inyecciones de 100 µl administradas secuencialmente a través de una jeringa y la aguja en un área afeitada de la región subescapular.

Obtención de muestras: Sangre (todos los grupos). Para la administración de la dosis final según sea aplicable basado en el grupo de estudio, se recoge la sangre de cada animal antes de la dosis y a las 0,25, 0,5, 1, 2, y 4 horas después de la dosis.

Obtención de muestras: Sitios de aplicación (solo grupos dérmicos). Tras el sacrificio para la muestra de sangre terminal, la sección de la piel expuesta a la formulación del artículo de prueba se escinde. El estrato córneo y cualquier formulación del artículo de prueba no absorbido que queda en la superficie de la piel se elimina mediante separación por arrastre de cinta. Las tiras se combinaron en un vial de muestra para cada animal y la sección restante de la piel se colocó en un segundo vial de muestra. Se registraron los pesos de la muestra.

Tabla 12. Dosis administradas a ratas Sprague Dawley macho dan dosis dérmicas o intradérmicas de un antagonista de LFA-1 directamente competitivo de la invención en varias formulaciones (grupos 5 a 9)

Número de animal	Formulación del antagonista	Vía de la dosis	Concentración de la dosis (mg/g)	Nivel diana de la dosis (mg/animal)	Dosis nominal administrada		
					(g/animal) ^a	(mg/animal)	(mg/kg)
B11704	Gel 1 %	Dérmica	10	2	0,2088	2,09	6,76
B11705	Gel 1 %	Dérmica	10	2	0,2080	2,08	6,69
B11706	Gel 1 %	Dérmica	10	2	0,2079	2,08	6,79
B11707	Ungüento 1 %	Dérmica	10	2	0,1669	1,67	5,06
B11708	Ungüento 1 %	Dérmica	10	2	0,1722	1,72	5,63
B11709	Ungüento 1 %	Dérmica	10	2	0,1744	1,74	5,64
B11710	Loción, 1 %	Dérmica	10	2	0,2075	2,08	6,69
B11711	Loción, 1 %	Dérmica	10	2	0,2003	2,00	6,34
B11712	Loción, 1 %	Dérmica	10	2	0,2063	2,06	6,92
B11713	DMSO 1 %	Dérmica	10	2	0,2195	2,20	7,13
B11714	DMSO 1 %	Dérmica	10	2	0,2180	2,18	6,96
B11715	DMSO 1 %	Dérmica	10	2	0,2201	2,20	6,94
B11716	DMSO 1 %	Intradérmica	10	2	0,2209	2,21	6,97

Resultados: Los datos de la Tabla 13 demuestran que el fármaco apreciable penetra en la piel en las formulaciones de ensayo y se detectó circulante en plasma después de la absorción de los capilares en la dermis y la epidermis.

5 **Tabla 13.** Concentración de un antagonista de LFA-1 competitivo directamente en sangre a través de la liberación en varias formulaciones después de 7 días (dérmica) o 1 día (intradérmica).

	Nº animal	Punto de tiempo	Grupo	Vía de la dosis	Conc. (ng /ml)
	B11704	Antes de la dosis	Gel 1 %	Dérmica	<0,500
10	B11704	4 h	Gel 1 %	Dérmica	<0,500
	B11705	Antes de la dosis	Gel 1 %	Dérmica	<2,00~
	B11705	4 h	Gel 1 %	Dérmica	<0,500
15	B11706	Antes de la dosis	Gel 1 %	Dérmica	NR
	B11706	4 h	Gel 1 %	Dérmica	<0,500
	B11707	Antes de la dosis	Ungüento 1 %	Dérmica	<0,500
	B11707	4 h	Ungüento 1 %	Dérmica	<0,500
20	B11708	Antes de la dosis	Ungüento 1 %	Dérmica	<0,500
	B11708	4 h	Ungüento 1 %	Dérmica	<0,500
	B11709	Antes de la dosis	Ungüento 1 %	Dérmica	<0,500
25	B11709	4 h	Ungüento 1 %	Dérmica	<0,500
	B11710	Antes de la dosis	Loción, 1 %	Dérmica	<2,00~
	B11710	4 h	Loción, 1 %	Dérmica	<0,500
	B11711	Antes de la dosis	Loción, 1 %	Dérmica	<2,00~
30	B11711	4 h	Loción, 1 %	Dérmica	<0,500
	B11712	Antes de la dosis	Loción, 1 %	Dérmica	<2,00~
	B11712	4 h	Loción, 1 %	Dérmica	<0,500
35	B11713	Antes de la dosis	DMSO 1 %	Dérmica	<2,00~
	B11713	4 h	DMSO 1 %	Dérmica	2,08
	B11714	Antes de la dosis	DMSO 1 %	Dérmica	<0,500
	B11714	4 h	DMSO 1 %	Dérmica	2,81
40	B11715	Antes de la dosis	DMSO 1 %	Dérmica	<2,00~
	B11715	4 h	DMSO 1 %	Dérmica	2,22
	B11716	Antes de la dosis	DMSO 1 %	Intradérmica	<2,00~
45	B11716	4 h	DMSO 1 %	Intradérmica	93,9
	B11717	Antes de la dosis	DMSO 1 %	Intradérmica	<2,00~
	B11717	4 h	DMSO 1 %	Intradérmica	214
50	B11718	Antes de la dosis	DMSO 1 %	Intradérmica	<0,500
	B11718	4 h	DMSO 1 %	Intradérmica	136

<0,500 = por debajo del límite de cuantificación (BLQ).

<2,00 = por debajo del límite de cuantificación (BLQ) debido a una dilución por 4,00.

55 NR = respuesta estándar interna baja. Insuficiente volumen de la muestra para reanalizar.

60 **Ejemplo 15. Farmacocinética ocular en ratas.**

60 Se usa un modelo de rata para medir la distribución de un antagonista de LFA-1 competitivo directamente a los tejidos en el ojo, en particular a la retina. (Véase S. P. Ayalasonmayajula y U. B. Kompella, European Journal of Pharmacology, (2003)"Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits retinal vascular endothelial growth factor expression and vascular leakage in a streptozotocin-induced diabetic rat model", 458: 283-289.) Se
65 administra una sola gota de una formulación de solución al 1 % de un antagonista de LFA-1 radiomarcado con ¹⁴C(formulación 12, la Tabla 9 o Formulación 15, Tabla 10) en el ojo de ratas, y la radiactividad se siguió con el

tiempo. Los datos para $t = 30$ min. y $t = 4$ horas, se representan gráficamente en la Figura 12. En la Figura 12, la concentración de antagonista radiomarcado medida en cada región anatómica se indica por el aumento de la escala de grises de la caja correspondiente a la región anatómica como etiquetado. Los valores numéricos de estos datos se muestran en la Tabla 14 y se dan en equivalentes de nanogramos de antagonista de LFA-1 radiomarcado por gramo de tejido.

Tabla 14. Concentración del antagonista de de LFA-1, ng Equivalentes [14 C]-LFA-1 tejido/antagonista

Región física	0,5 h después de la administración	4,0 h después de la administración
Humor acuosa	1770	116
Conjuntiva (bulbar)	31500	4480
Conjuntiva (palpebral)	26300	21830
Córnea	17150	1346
Cuerpo iris-capilar	17550	500
Cristalino	38,8	9,69
Nervio óptico	796	0
Retina y coroides (con RPE)	510	46,7
Esclerótica	2750	387
Humor vítreo	1330	183

Los resultados muestran que se consiguen niveles terapéuticos de antagonista de LFA-1 en la retina, que se extiende hasta el punto de tiempo de 4 horas después de la administración, donde se ve una concentración de 50 ng/g de fármaco en la retina. Esto está muy por encima del umbral esperado de 10 nM requerido para la inhibición de la adhesión de los leucocitos y la función en el edema macular diabética/retinopatía diabética, por un antagonista con una CI_{50} en el ensayo de adhesión celular de Hut78 de aproximadamente 2 a 6 nM.

Ejemplo 16: Estudio con humanos de fase 1-

Se reclutó a sujetos sanos. Se realiza un estudio aleatorizado, controlado, de aumento de de administraciones únicas y múltiples del antagonista de LFA-1. Cohortes de 7 sujetos cada una (5 de tratamiento, 2 de placebo) se tratan a cada uno de 6-8 niveles de dosis de antagonistas de LFA-1 formulados como soluciones acuosas estériles, neutras, isotónicas, tamponadas. Los sujetos reciben una única instilación el Día 1. Se obtienen muestras para las evaluaciones farmacocinética y farmacodinámica durante la semana posterior. A partir del día 8, los sujetos reciben la misma dosis de Antagonista de LFA-1 al día durante un total de 14 días. Se evalúan las evaluaciones de PK/PD, estudios de laboratorio de seguridad, exámenes oftalmológicos, tinción corneal con fluoresceína y angiografías.

Ejemplo 17: Estudio con humanos de fase II

Se reclutan a sujetos adultos con retinopatía diabética en dos grupos se separaron en los que tienen y los que no tienen edema macular diabético según la definición de los criterios clave de inclusión/exclusión. Se realiza un ensayo controlado aleatorizado de búsqueda de dosis de los antagonistas de LFA-1. Tres grupos de sujetos reciben instilaciones de cualquier vehículo portador solo, o, uno de los dos niveles de dosis del antagonista de LFA-1, formulados como una solución neutra, tamponada, isotónica acuosa, al día durante doce semanas. Se sigue a los sujetos para la seguridad y para la evidencia de mejora en la angiografía con fluoresceína, fotografía del fondo y las exploraciones generales de la agudeza visual durante un periodo de seguimiento de tres meses.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> SARCODE CORPORATION

<120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

<140> EP 08 842113,6
 <141> 2008-10-17

10 <150> US 60/999,571
 <151> 2007-10-19

<160> 5

15 <170> PatentIn versión 3,5

<210> 1
 <211> 12

20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 1

30 Tyr Asn Leu Asp Val Arg Gly Ala Arg Ser Phe Ser
 1 5 10

<210> 2
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 2

40 Gly Val Ile Val Gly Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Thr
 1 5 10

<210> 3
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

50 <400> 3

cactgtggcg ccctggtttt caggaaggta gtggatcagg cacaagcaaa caggacctga 60

55 ctcc 64

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 4

65 Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5

<210> 5
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 5
10 tctgagccat gtgctggtat cgaggggc 28

15

20

25

30

35

40

45

50

55

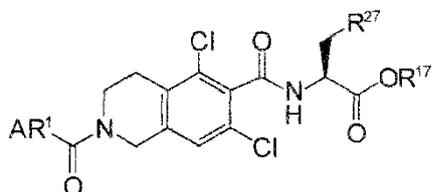
60

65

Reivindicaciones

1. Un agente terapéutico que inhibe la interacción de LFA-1 y una ICAM para su uso en el tratamiento de la retinopatía diabética, en el que el agente terapéutico tiene la fórmula IIB, o sus sales o ésteres farmacéuticamente aceptables,

10

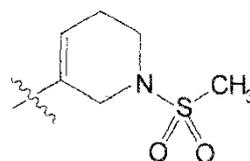
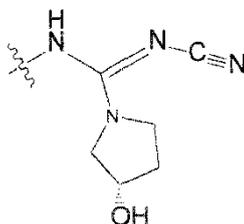
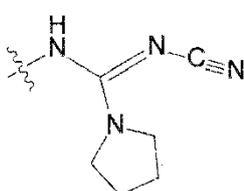


15

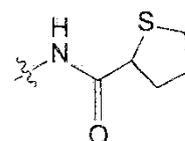
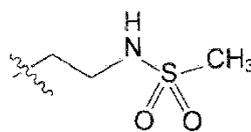
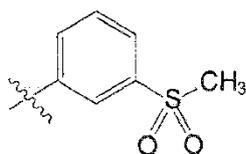
Fórmula IIB

AR¹ es un resto arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alicíclico o heterocíclico monocíclico o policíclico; en la que R¹⁷ es hidrógeno, sales o ésteres farmacéuticamente aceptables; y en la que R²⁷ es

20

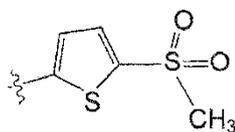


25

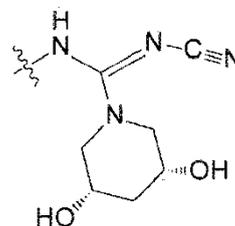


30

35



or



40

2. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 para el tratamiento del daño resultante de la retinopatía diabética seleccionado de edema macular, neovascularización de la retina, crecimiento fibrovascular sobre una retina, pérdida de la visión, engrosamiento de la membrana basal, edema de retina o isquemia retiniana.

3. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha ICAM-1, ICAM-2 o ICAM-3, o en el que dicho agente terapéutico es un antagonista de LFA-1, preferentemente en el que dicho antagonista de LFA-1 se une a un sitio de unión de alta afinidad en la subunidad αL de LFA-1 que se superpone al sitio de unión de ICAM-1 o en el que dicho antagonista de LFA-1 es directamente competitivo con la unión de ICAM-1 en la subunidad αL de LFA-1.

4. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 de fórmula II.

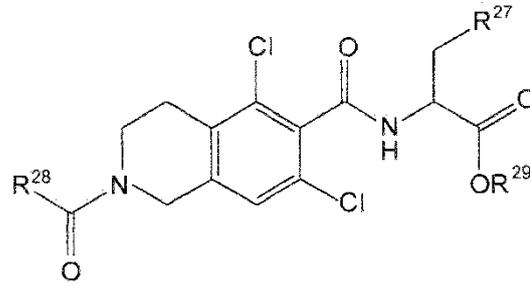
60

65

II:

5

10

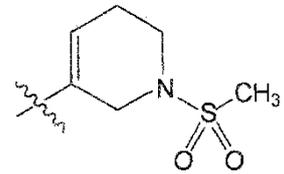
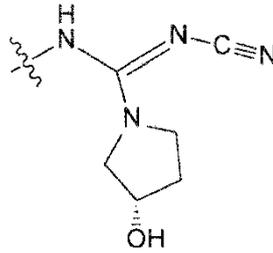
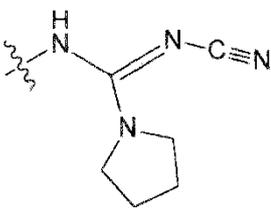


15

Fórmula II

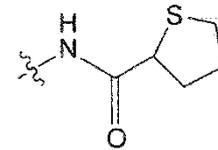
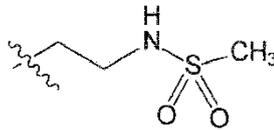
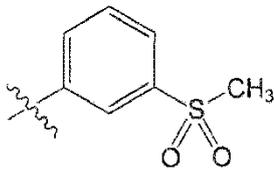
en la que R²⁷ es:

20



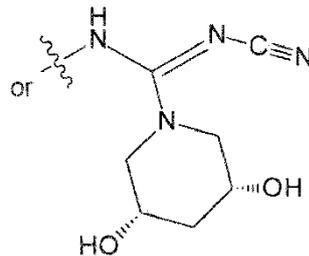
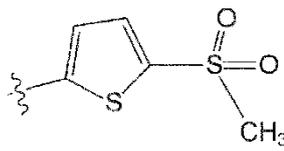
25

30



35

40

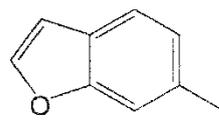
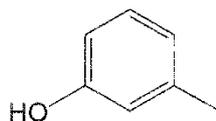


45

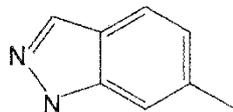
50

R²⁸ es:

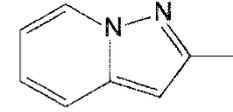
55



60



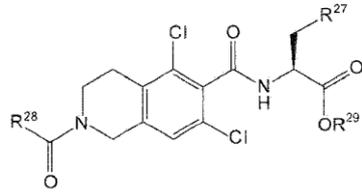
or



65

y R²⁹ es hidrógeno, una sal o éster farmacéuticamente aceptable, en el que los compuestos de Fórmula II comprenden estereoquímica como en la Fórmula II',

5

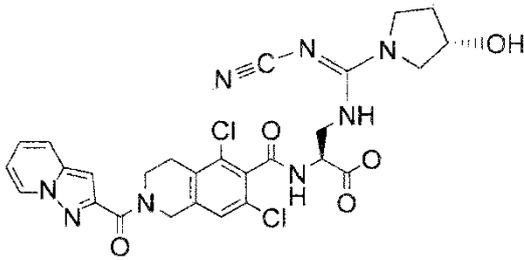


10

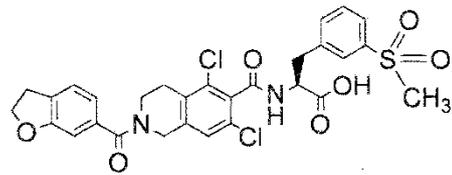
Fórmula II'

5. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 de la fórmula:

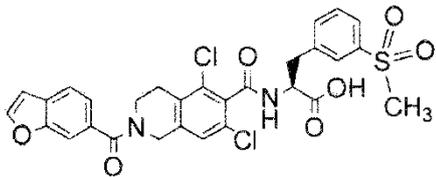
15



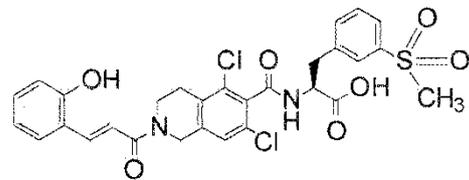
20



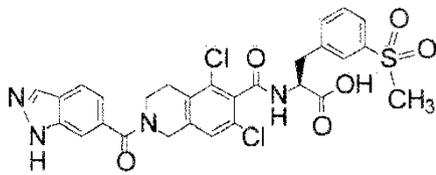
25



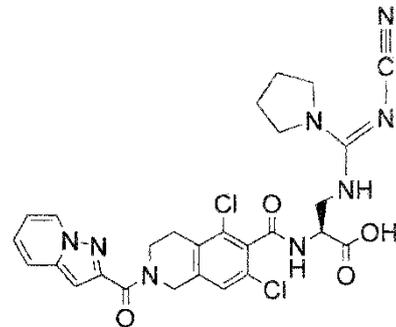
30



35

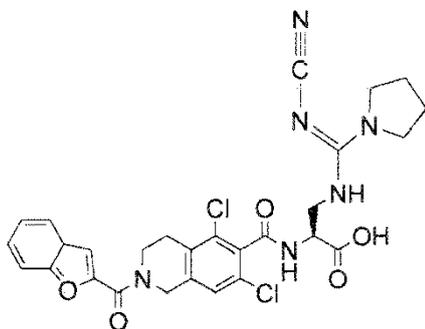


40

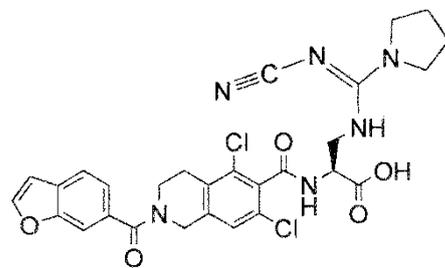


45

50

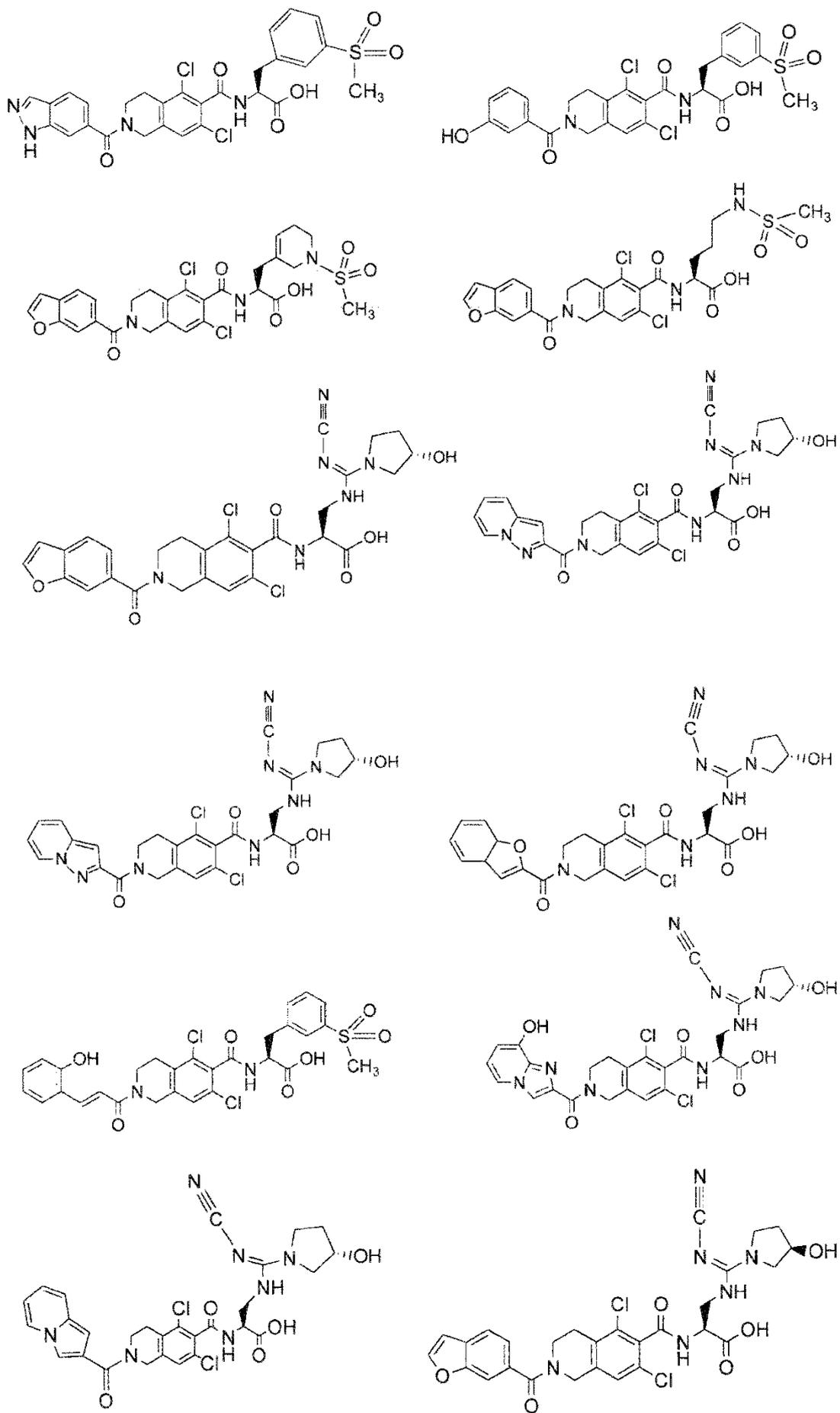


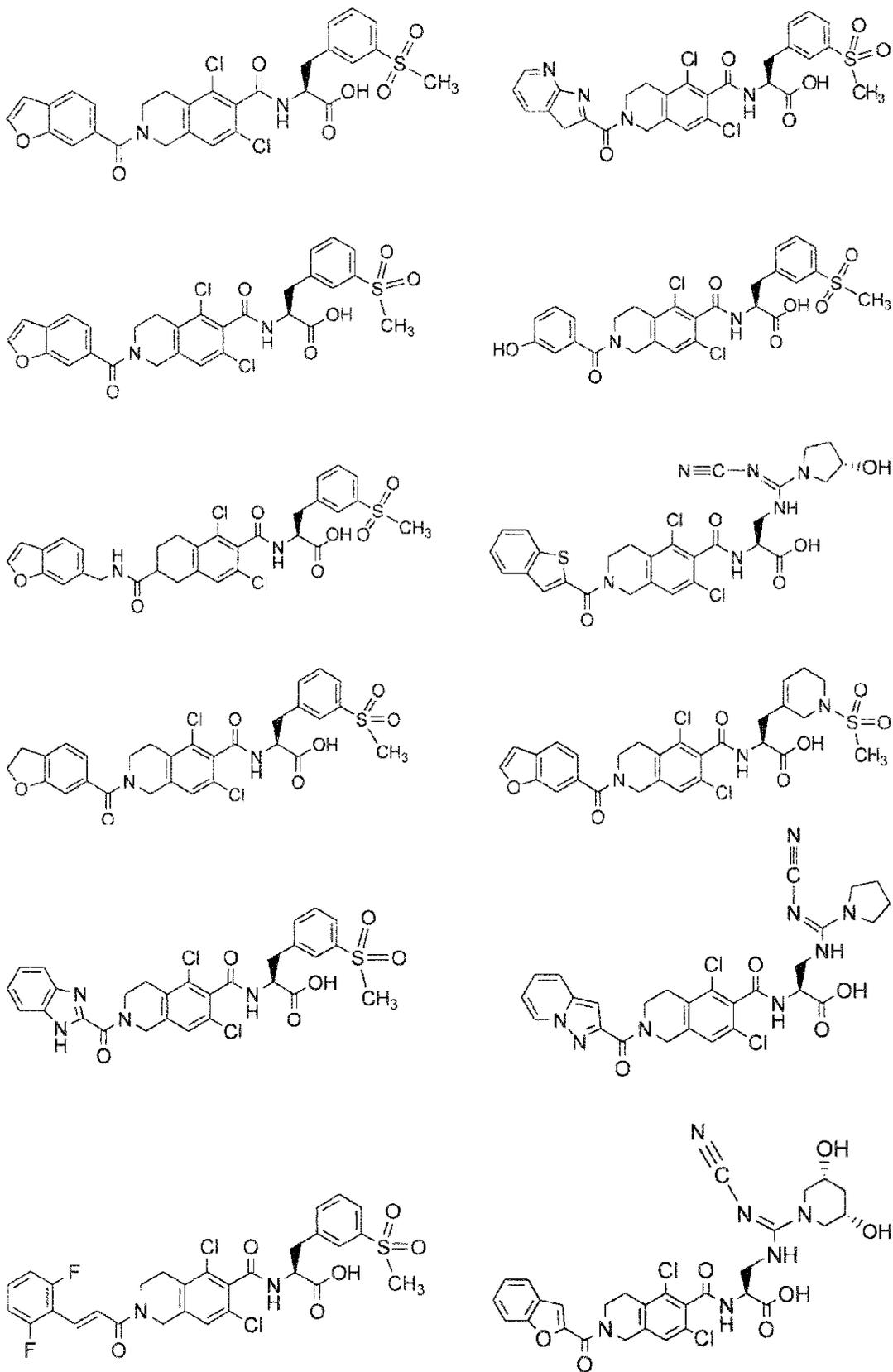
55

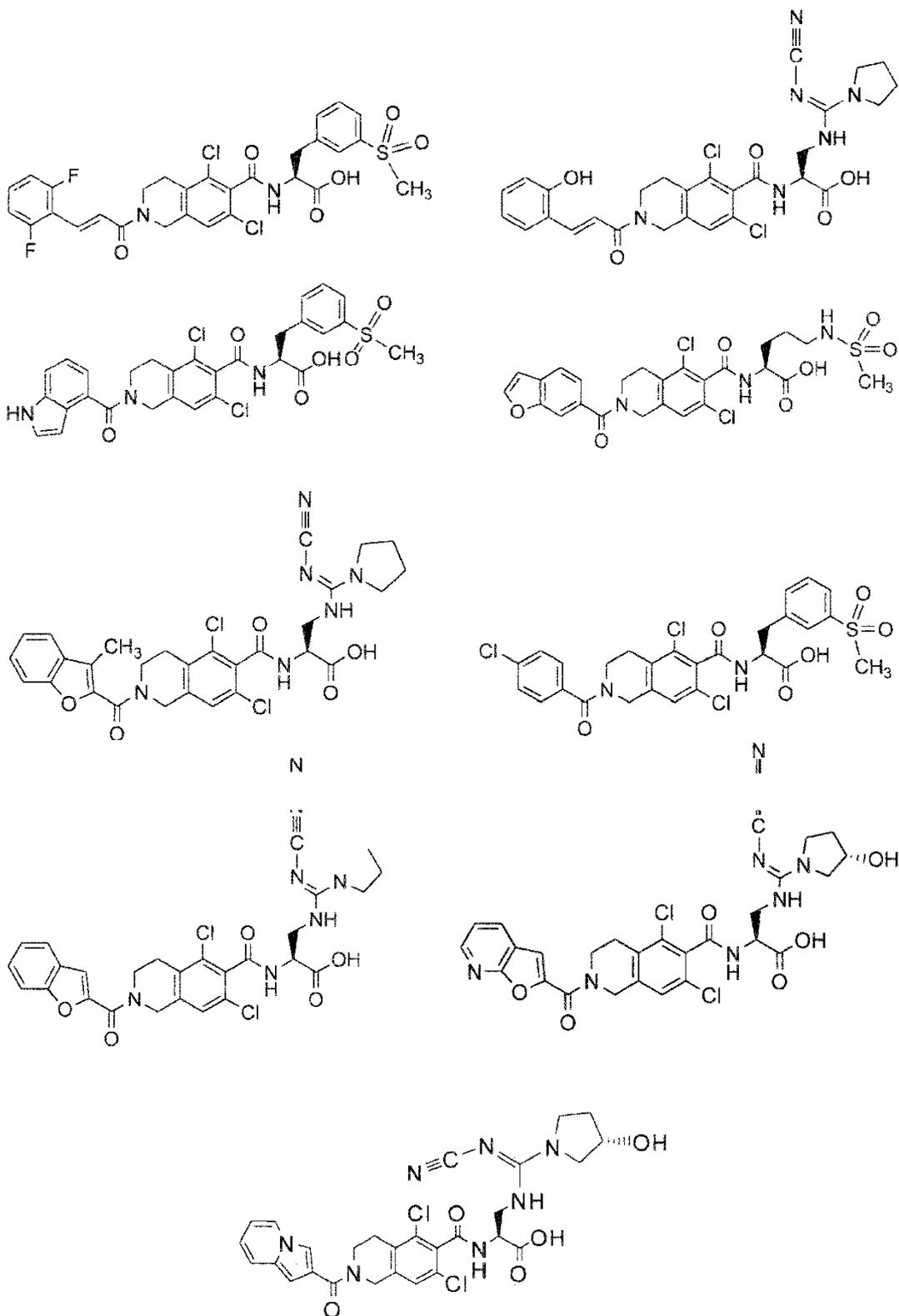


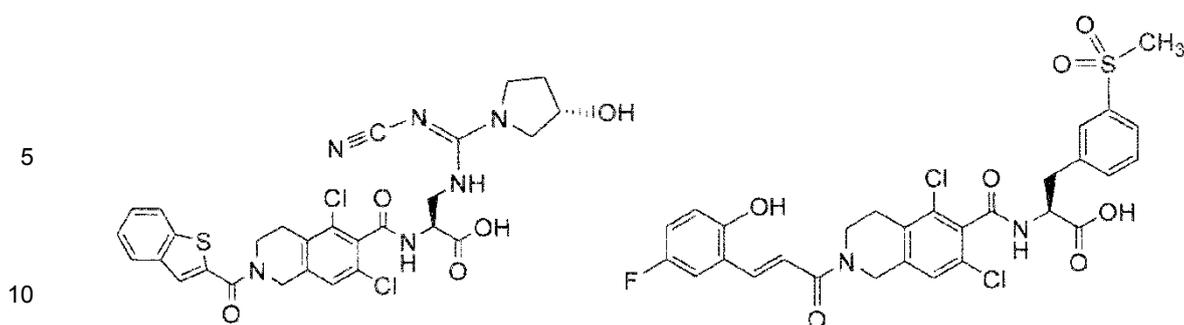
60

65







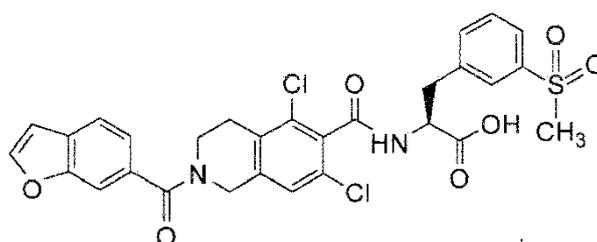


o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 de la fórmula

15

20



25 7. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho agente terapéutico se administra por vía tópica, oral, periocular, intraocular, mediante inyección, por vía nasal, a través de un aerosol, a través de un inserto, a través de un dispositivo implantado o mediante una gota; preferentemente, en el que dicho agente terapéutico se administra en un vehículo portador que es gotas líquidas, líquido de lavado, líquido nebulizado, gel, ungüento, aerosol, pulverización, micropartículas y nanopartículas de polímero, solución, suspensión, matriz sólida biodegradable, polvo, cristales, o liposomas, opcionalmente, en el que dicho agente terapéutico se administra tópicamente y dicha administración tópica comprende la infusión de dicho compuesto a dichos ojos a través de un dispositivo seleccionado del grupo que consiste en un sistema de bomba-catéter, un inserto, un dispositivo de liberación continua o selectiva, un implante bioabsorbible, una formulación de liberación continua o sostenida, y una lente de contacto; o, como alternativa, en el que dicho agente terapéutico se administra mediante inyección y dicha inyección se realiza por vía intraocular, intravítrea, periocular, subcutánea, subconjuntival, retrobulbal o intracameraral.

8. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en el que una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho agente terapéutico se libera en el ojo a través de liberación local o sistémica, o en el que la administración se logra administrando una instilación intraocular de un gel, crema, polvo, espuma, cristales, liposomas, pulverización, micro o nanopartículas poliméricas o forma de suspensión líquida de dicho compuesto, preferentemente, en donde dicho compuesto se administra a dicho sujeto en una cantidad suficiente para alcanzar concentraciones intraoculares o retinianas desde 1×10^{-8} a 1×10^{-1} moles / litro.

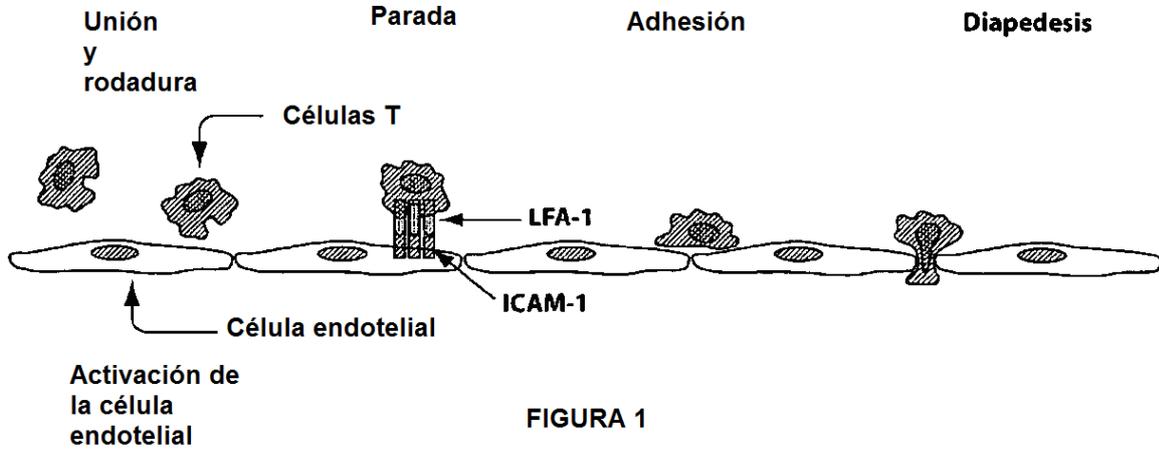
9. Un agente terapéutico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en el que dicho compuesto se administra al menos una vez al año, al menos una vez al día, al menos una vez por semana o al menos una vez al mes y, opcionalmente, en el que dicha administración comprende además la etapa de determinar que dicho sujeto necesita tratamiento para la retinopatía diabética.

10. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, que comprende además administrar un segundo agente terapéutico antes, en combinación con, al mismo tiempo o después de la administración de dicho antagonista de LFA - 1, preferentemente, en el que el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en antioxidantes, agentes antiinflamatorios, antimicrobianos, esteroides, inhibidores de la proteína quinasa C, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, agentes antiangiogénicos, inhibidores del complemento y agentes antiapoptóticos; opcionalmente, en el que el segundo agente terapéutico es un agente terapéutico antiadherente con un sitio de unión competitivo alostérico sobre LFA-1, por ejemplo, en el que el segundo agente terapéutico es un anticuerpo terapéutico anti-adhesión o fragmento de anticuerpo.

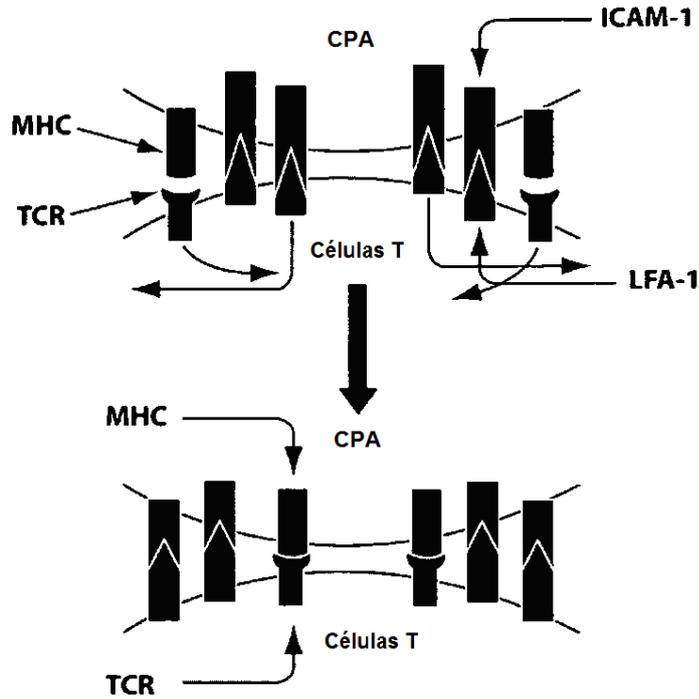
11. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en el que la retinopatía diabética ha sido diagnosticada realizando una prueba diagnóstica de retinopatía diabética sobre un sujeto y determinando si dicho sujeto sufre retinopatía diabética según los resultados de dicha prueba diagnóstica.

65

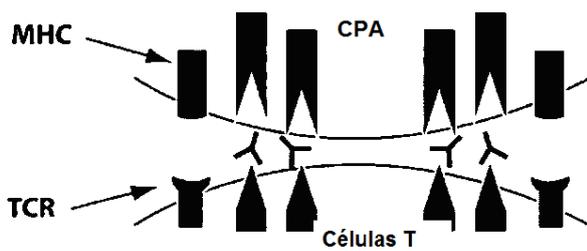
Tráfico de leucocitos a través del endotelio vascular



Interacción de LFA-1 Formación de sinapsis inmunológicas



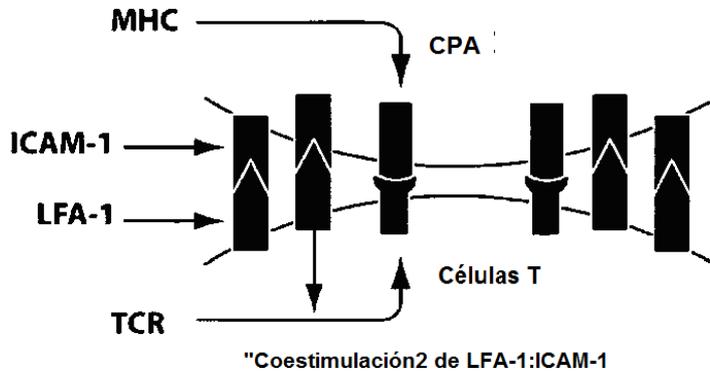
Formación de sinapsis inmunológicas



Inhibición de la formación correcta de sinapsis inmunológica mediante inhibición de LFA-1

FIGURA 2

Interacción de LFA-1 con coestimulación de ICAM



coestimulación

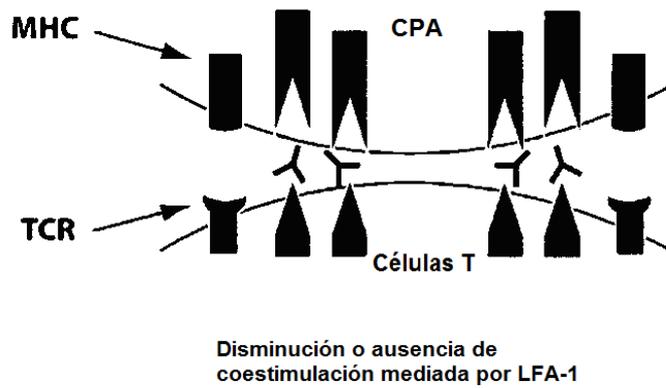


FIGURA 3

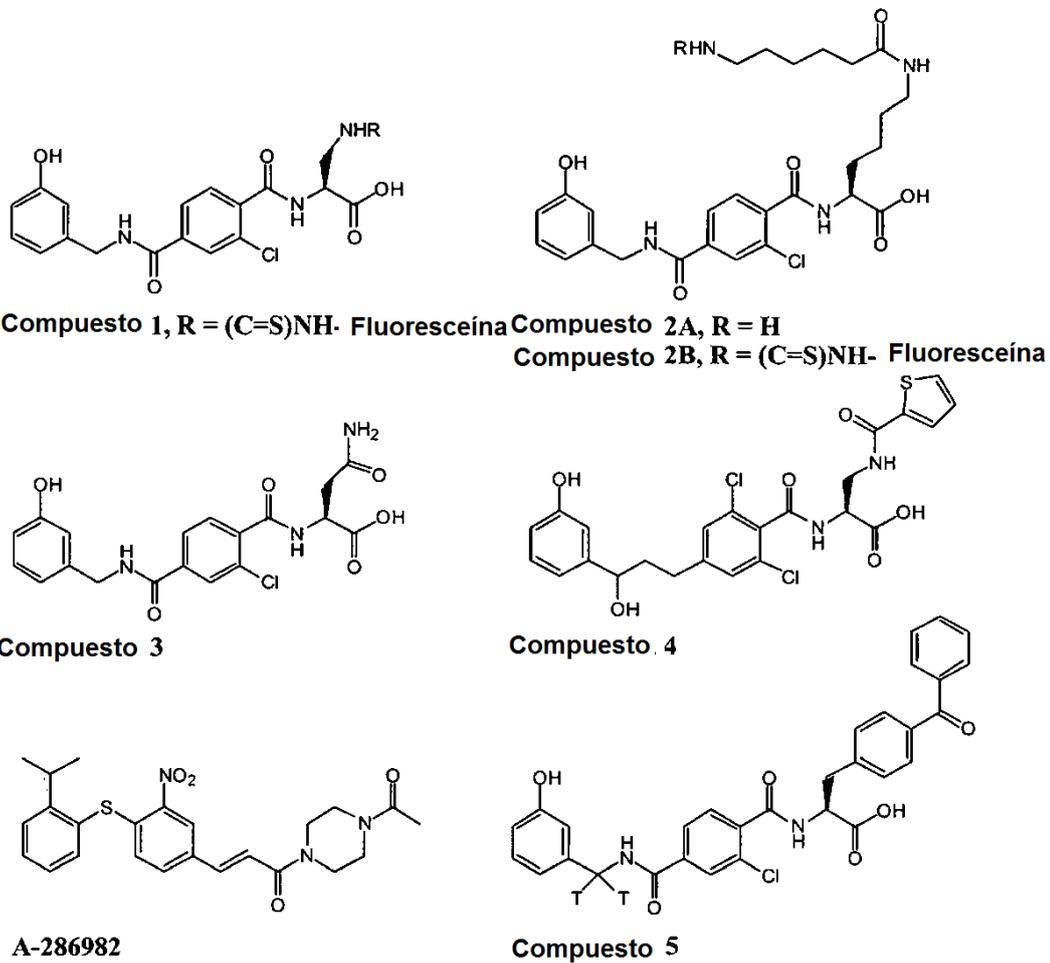


FIGURA 4

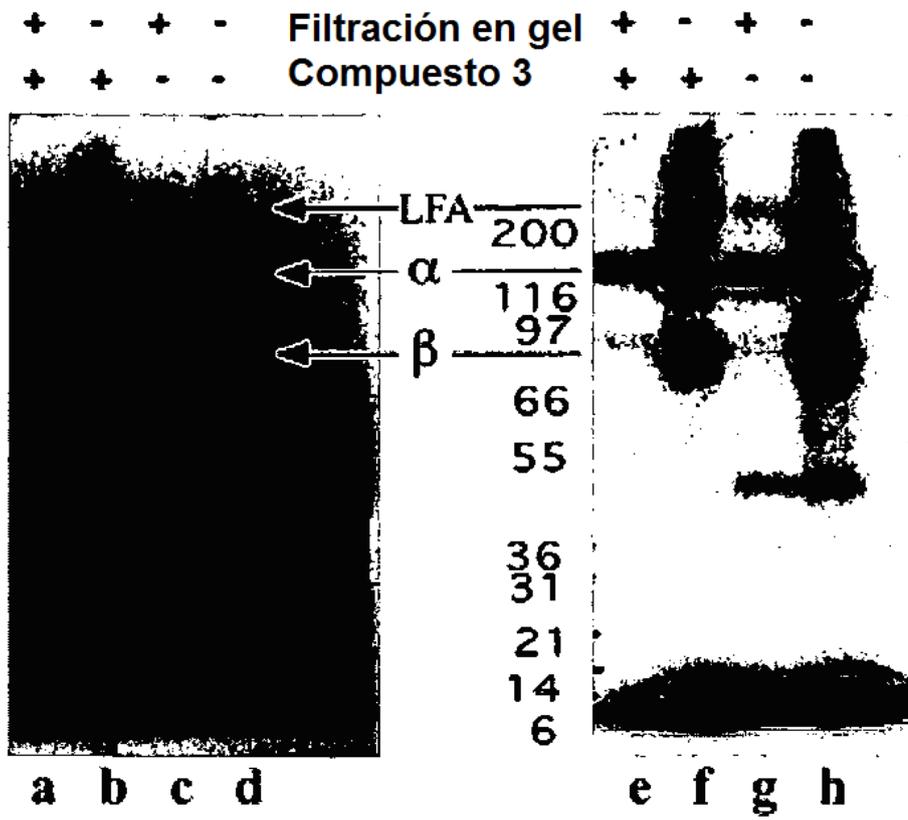


FIGURA 5

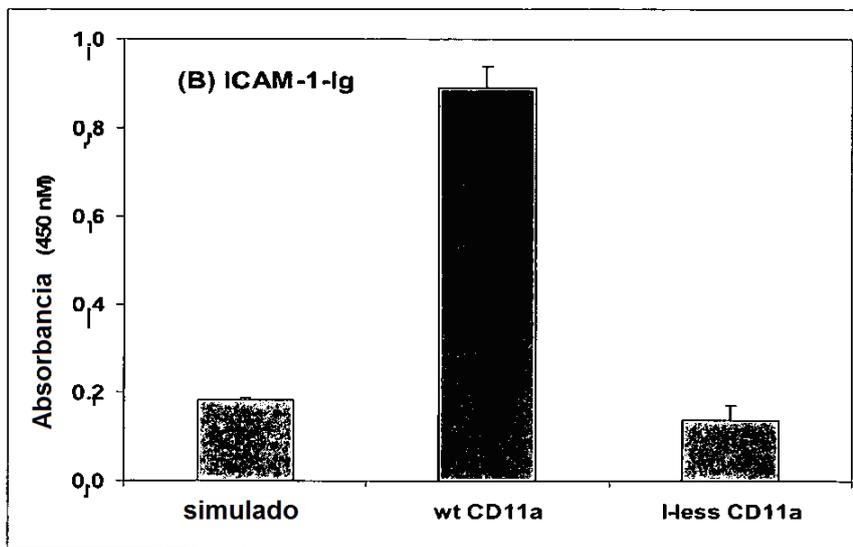
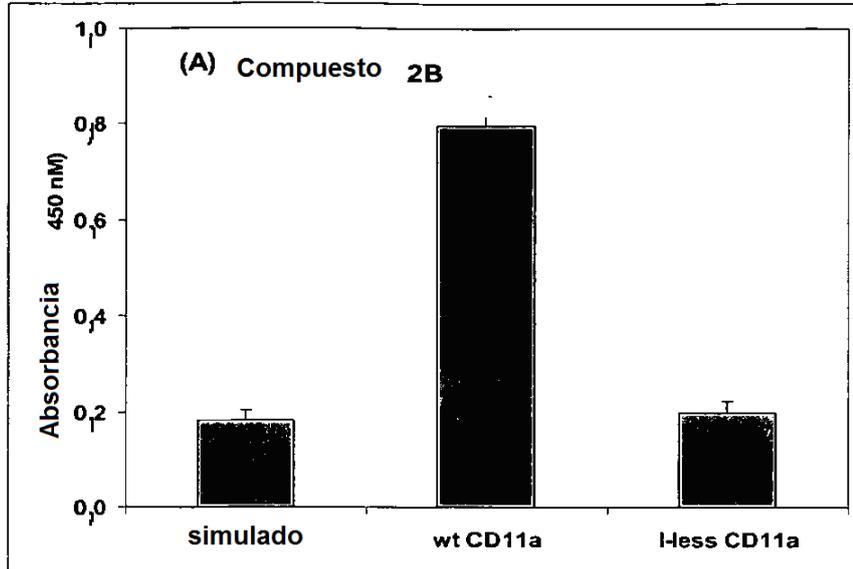


FIGURA 6

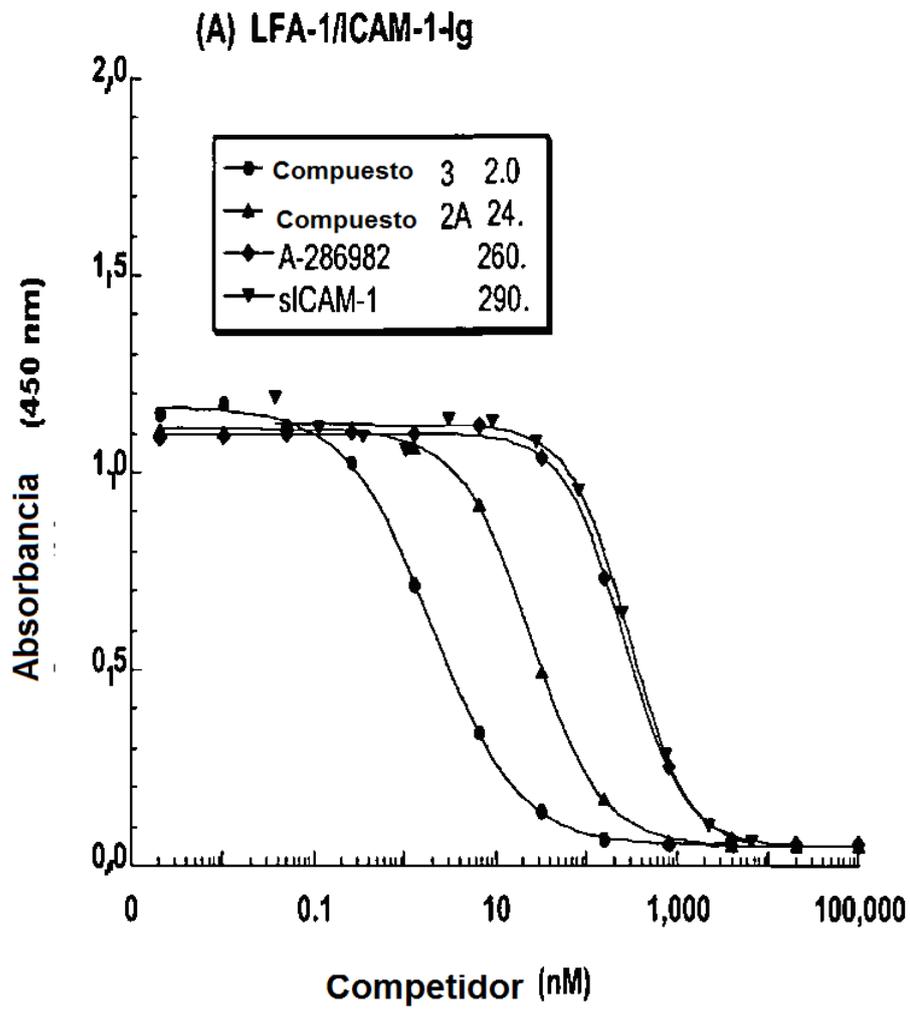


FIGURA 7

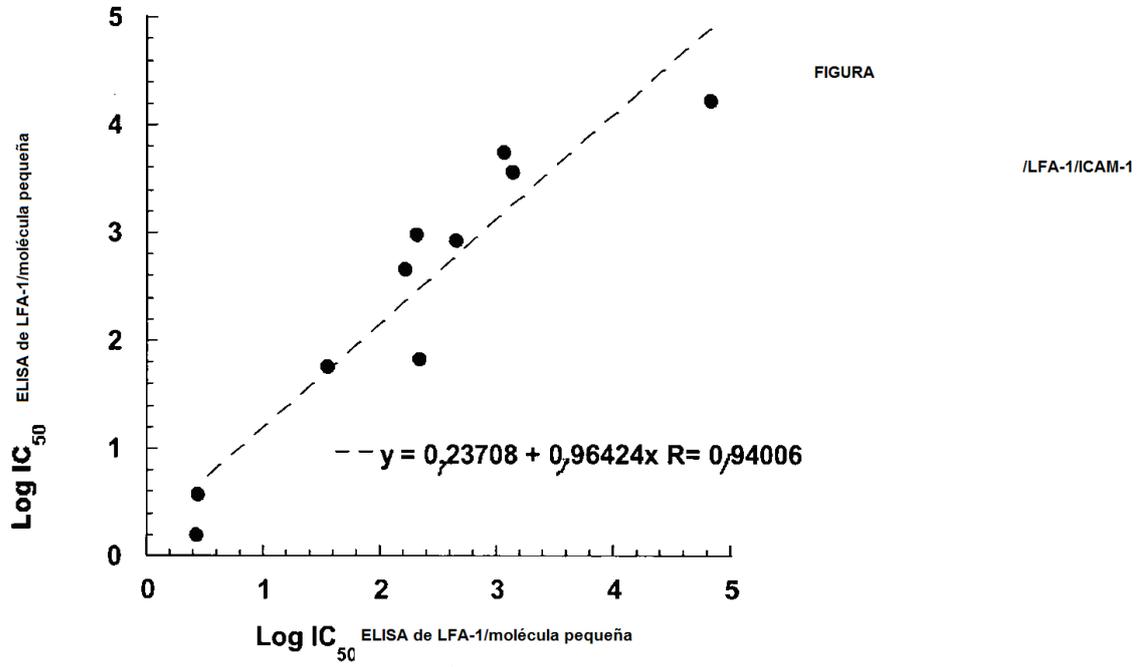


FIGURA 8

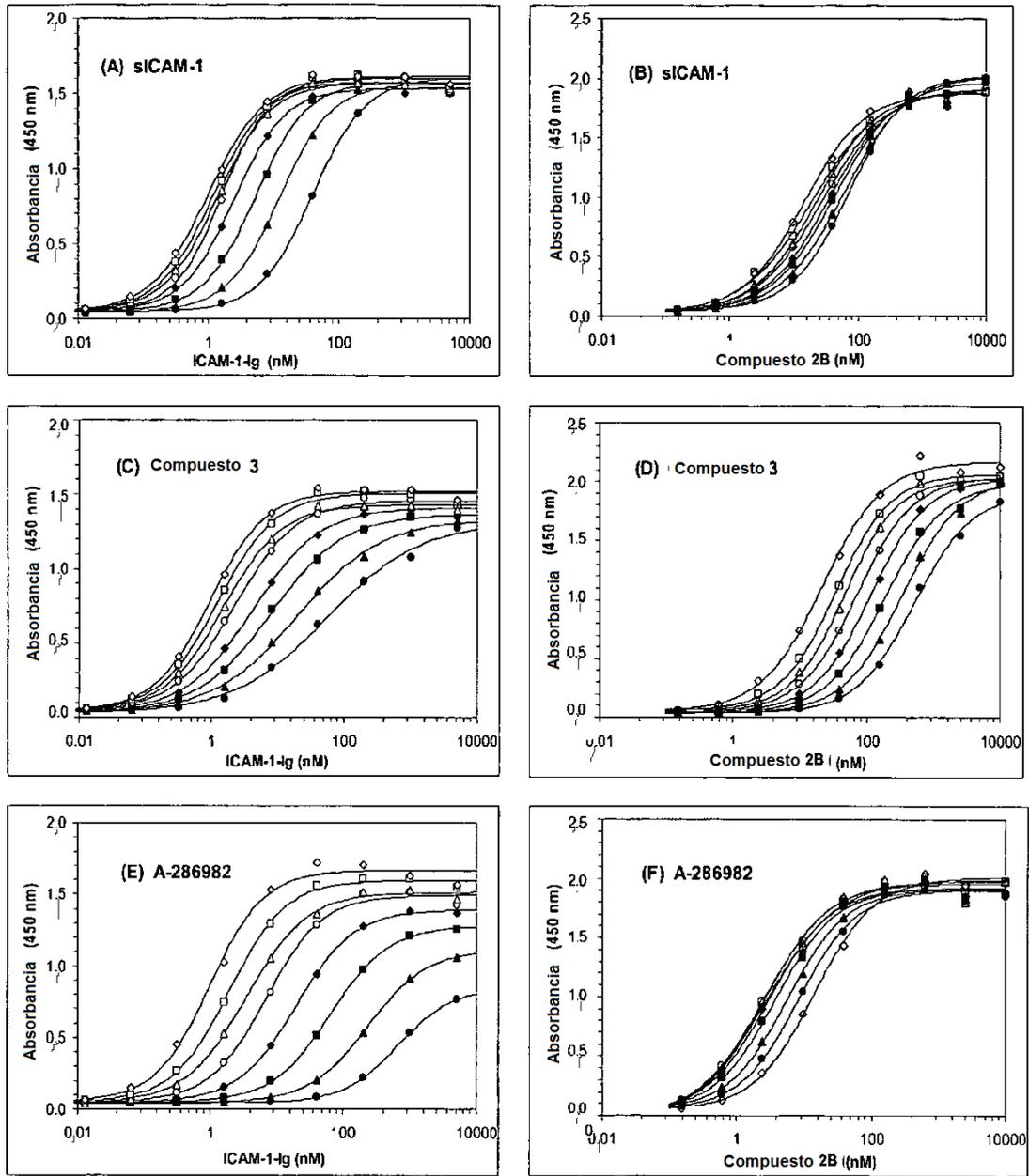


FIGURA 9

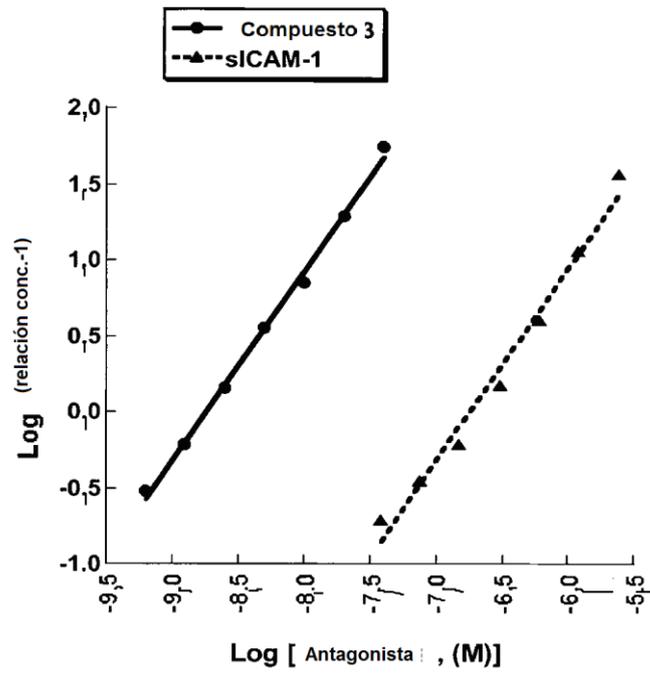


FIGURA 10

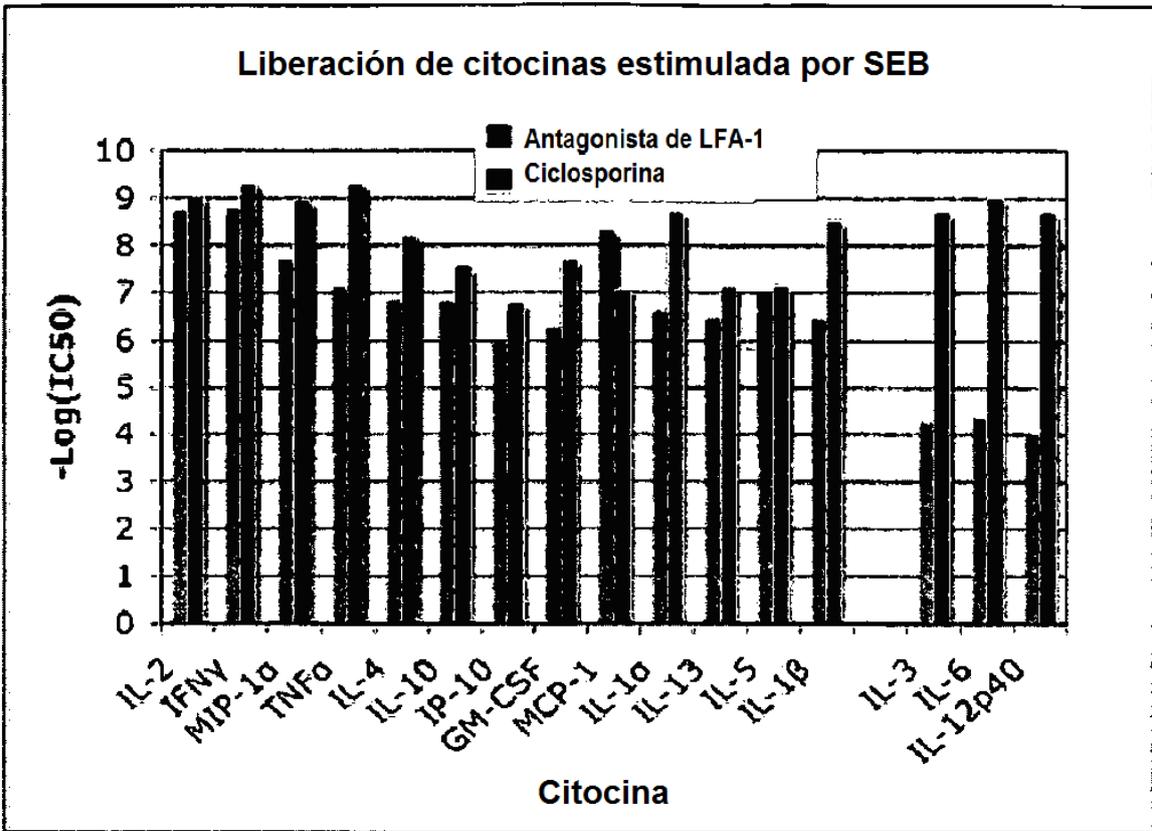
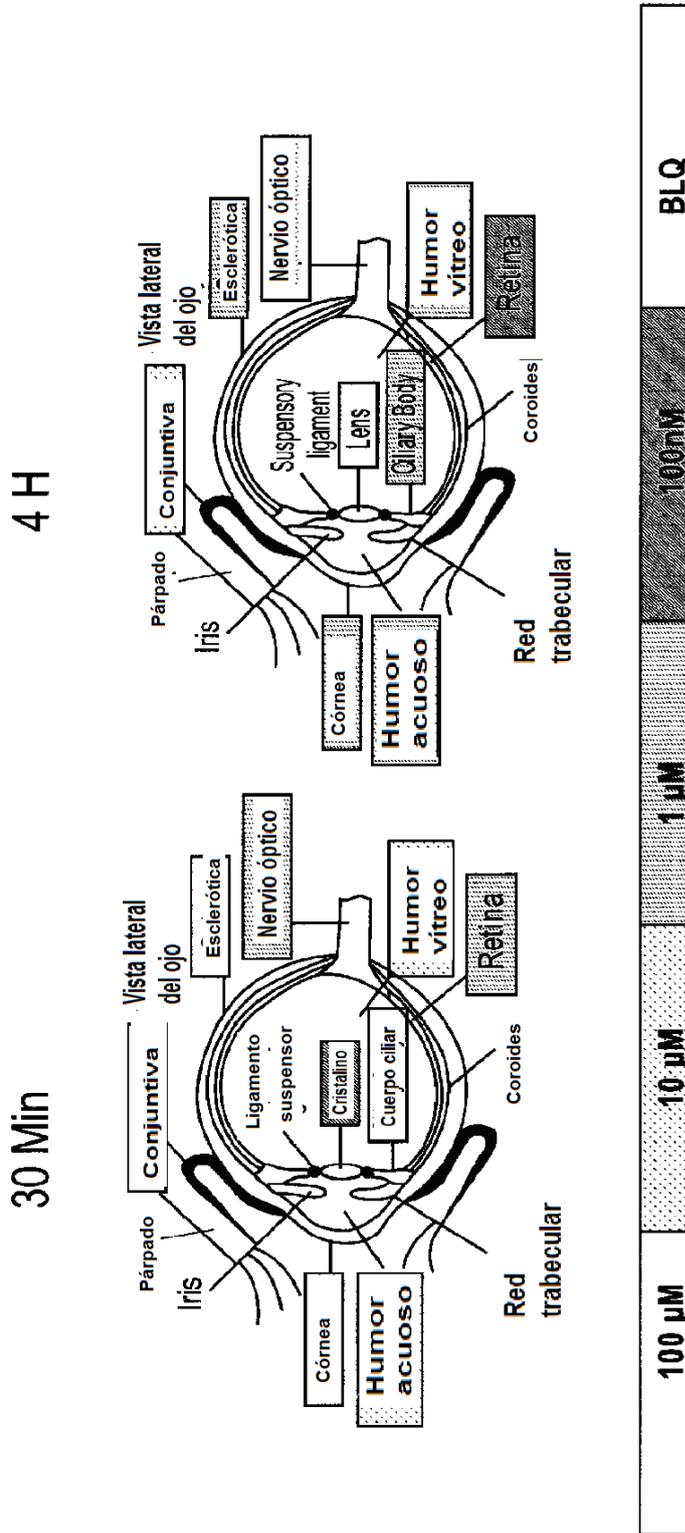


FIGURA 11

Farmacocinética ocular en ratas



[Concentración del antagonista de LFA-1]

FIG. 12