

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 194**

51 Int. Cl.:

A61K 31/17	(2006.01)	A61P 17/06	(2006.01)
A61K 31/4164	(2006.01)	A61P 19/02	(2006.01)
A61K 31/4168	(2006.01)	A61P 25/02	(2006.01)
A61K 31/4178	(2006.01)	A61P 37/00	(2006.01)
A61K 31/421	(2006.01)		
A61P 1/00	(2006.01)		
A61P 3/10	(2006.01)		
A61P 7/06	(2006.01)		
A61P 11/06	(2006.01)		
A61P 17/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2011 PCT/US2011/047426**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012 WO12024161**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2011 E 11751717 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2605771**

54 Título: **Método para activar células T reguladoras con agonistas de receptor adrenérgico alfa 2B**

30 Prioridad:

16.08.2010 US 374124 P

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

17.07.2018

73 Titular/es:

**ALLERGAN, INC. (100.0%)
2525 Dupont Drive
Irvine, CA 92612, US**

72 Inventor/es:

**GIL, DANIEL W.;
DONELLO, JOHN E.;
LUHRS, LAUREN M.B. y
VISWANATH, VEENA**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 676 194 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

Método para activar células T reguladoras con agonistas de receptor adrenérgico alfa 2B

5 **Antecedentes**

Descrito en la presente memoria se encuentra el descubrimiento de que existen receptores adrenérgicos alfa 2B sobre un subtipo de células T y que es posible usar agonistas de los receptores alfa 2 para modular la actividad de dichas células T y así tratar aquellas enfermedades en las que la disfunción de las células T desempeña un papel, incluidas la neuritis, el síndrome de Guillain-Barré, la artritis reumatoide, la diabetes tipo I, multiple sclerosis (esclerosis múltiple - MS), graft-versus-host disease (enfermedad de injerto contra huésped - GVHD), la uveítis autoinmune, la inflamación ocular, la queratoconjuntivitis seca (síndrome del ojo seco), el síndrome de Sjögren, la dermatitis atópica, la psoriasis, la enfermedad inflamatoria del intestino, el síndrome del intestino irritable, el asma y la anemia aplásica. La patente WO 2011/014332 describe una imidazolina o compuesto de imidazolina en el contexto de una indicación médica para tratar la enfermedad del ojo seco, pero no describe los compuestos específicos según se define en las reivindicaciones.

Breve resumen de la invención

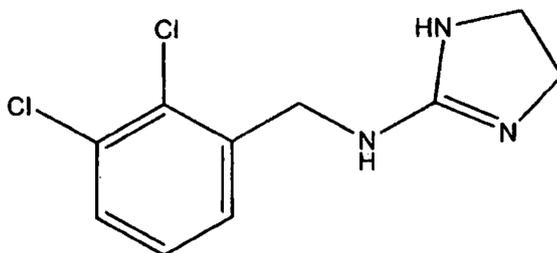
La presente memoria descriptiva proporciona un método para aumentar la función reguladora de las células T en un paciente, el método comprende la administración de un agonista de receptor alfa 2B a un paciente que necesita dicho aumento.

En otra realización, la presente memoria descriptiva proporciona un método para aumentar la función reguladora de las células T en un paciente, el método comprende la administración de un agonista del receptor alfa 2 que carece de actividad agonista del receptor alfa 2A significativa a un paciente que necesita dicho aumento.

En otra realización, la célula T reguladora mencionada en los dos párrafos anteriores es una célula T CD25+ y FoxP3+.

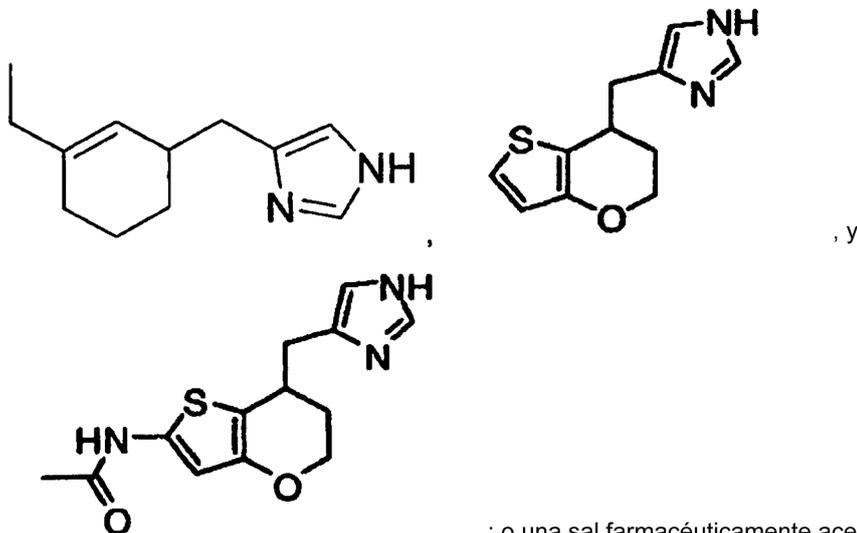
La presente invención proporciona un agonista del receptor alfa 2B para su uso en un método para tratar la enfermedad del ojo seco, en donde el agonista alfa 2 se selecciona del grupo consistente en:

i) una imidazolina, en donde dicha imidazolina es un compuesto de la fórmula



35 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

ii) un imidazol, en donde el imidazol es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

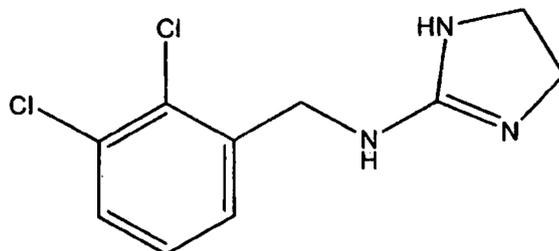


; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización, la presente invención proporciona un agonista del receptor alfa 2 que carece de actividad agonista del receptor alfa 2A significativa para su uso en un método para tratar la enfermedad del ojo seco, en donde el agonista alfa 2 se selecciona del grupo que consiste en:

i) una imidazolina, en donde dicha imidazolina es un compuesto de la fórmula

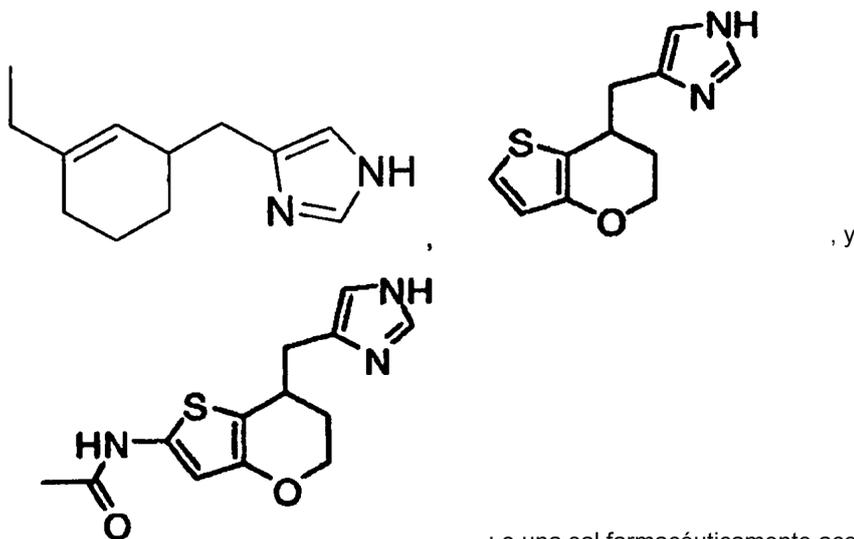
5



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

ii) un imidazol, en donde el imidazol es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

10



; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

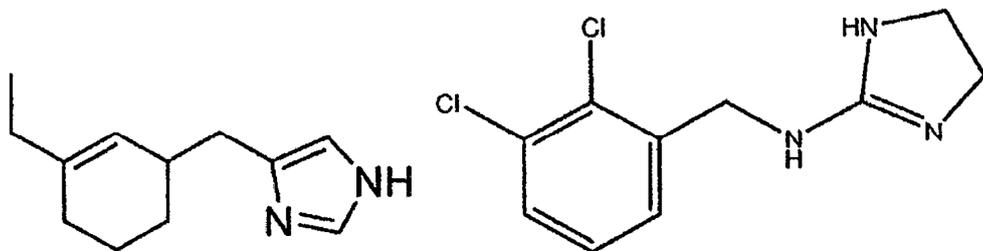
En otra realización, el agonista del receptor alfa 2 de la presente invención se administra durante un período inicial y después se administra de nuevo durante un segundo período después de que haya transcurrido un período de retirada.

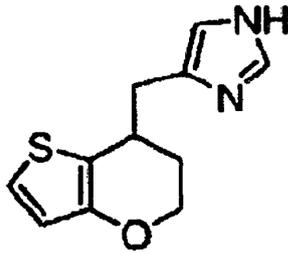
15

En otra realización, el agonista del receptor alfa 2 de la presente invención se administra durante un período inicial y después se administra de nuevo durante un segundo período después de que haya transcurrido un período de retirada, en donde el período inicial, el segundo período y el período de retirada son de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce días, o una, dos, tres o cuatro semanas.

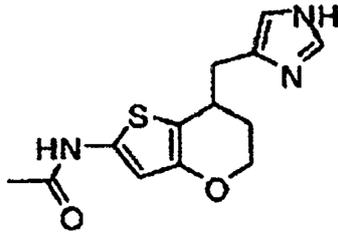
20

En otra realización, el agonista del receptor alfa 2 de la presente invención se selecciona del grupo consistente en:





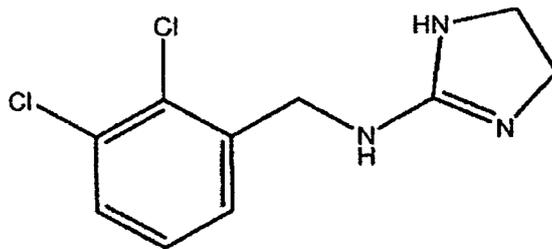
, y



;

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

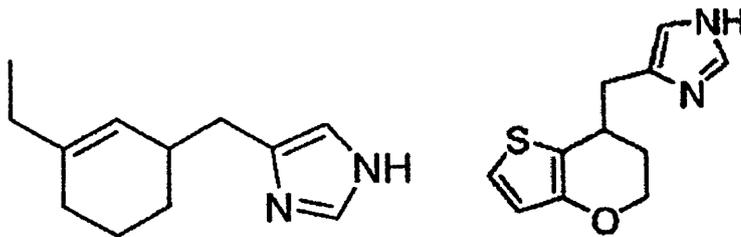
En otra realización, la imidazolina agonista de alfa 2 es un compuesto de la fórmula



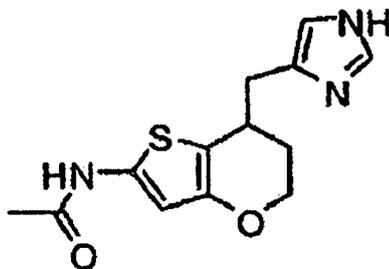
10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización, el imidazol agonista de alfa 2 es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



, y



15

; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 muestra la expresión del receptor α_{2B} , pero no del receptor α_{2A} en subconjuntos de células T humanas por medio de PCR cuantitativa.

La figura 2 muestra un aumento constante en la frecuencia de células T CD4+ del bazo que son células T reguladoras CD4+/CD25+ por compuesto B en el modelo de ligadura del nervio espinal (SNL) en ratas para dolor neuropático alodínico.

5 La figura 3 muestra que el compuesto B agonista del receptor α_{2B} es analgésico en el dolor de MS establecido y muestra la modulación de células T reguladoras.

La figura 4 muestra que el compuesto B tiene un efecto significativo en la trayectoria clínica de la enfermedad en el modelo inducido por proteólisis de recidiva-remisión en encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).

10 La figura 5 muestra que el compuesto B redujo significativamente la presencia de células inmunitarias en el modelo del SNC inducido por PLP de recidiva-remisión en EAE.

15 La figura 6 muestra que el compuesto C tiene un efecto significativo en la trayectoria clínica de la enfermedad en el modelo inducido por proteólisis de recidiva-remisión en EAE.

La figura 7 muestra que el compuesto C aumenta significativamente la frecuencia de las células T reguladoras en la médula espinal en el modelo de modelo inducido por PLP de recidiva-remisión en EAE.

20 La figura 8 muestra que el compuesto B tiene un efecto significativo en la enfermedad clínica y en la cantidad de células inflamatorias en el humor acuoso de ratas con uveítis anterior autoinmune experimental (EAAU).

La figura 9 muestra que el compuesto B tiene un efecto significativo sobre la concentración de proteínas en el humor acuoso de ratas con uveítis inducida por endotoxinas (EIU).

25 La figura 10 muestra que el compuesto B normaliza los niveles de neutrófilos y linfocitos en sangre en el modelo de ratas con EIU.

30 La figura 11 muestra que el tratamiento del donante con el compuesto B comenzando al inicio de la tensión de desecación redujo significativamente los niveles TNF-alfa y IL17 de resistencia al desgarro del receptor.

La figura 12 muestra que el tratamiento con el compuesto C en un modo terapéutico comenzando después de la exposición de los ratones a tensión de desecación redujo significativamente la pérdida de células calciformes y la infiltración de células T en la conjuntiva.

35

Descripción detallada de la invención

Agonistas del receptor alfa 2

40 Los agonistas del receptor alfa 2 son aquellos compuestos que activan los receptores adrenérgicos alfa 2. Existen tres subtipos de este receptor, designados A, B y C. Un compuesto es un “agonista del receptor alfa 2B” si tiene una eficacia superior a 25 % en relación con la brimonidina en el receptor adrenérgico alfa 2B; un compuesto es un “agonista del receptor alfa 2C” si tiene una eficacia superior a 25 % en relación con la brimonidina en el receptor adrenérgico alfa 2C; y un compuesto es un “agonista del receptor alfa 2B/2C” si tiene una eficacia superior a 25 % en relación con la brimonidina en ambos receptores adrenérgicos alfa 2B y alfa 2C. Las definiciones no se excluyen mutuamente: un compuesto que es un agonista del receptor alfa 2B también puede ser un agonista del receptor alfa 2B/2C; y el compuesto que es un agonista del receptor alfa 2C también puede ser un agonista del receptor alfa 2B/2C.

50 En una realización, los métodos de la presente invención usan agonistas de alfa 2 que carecen de actividad significativa en el subtipo del receptor alfa 2A. Un agonista carece de actividad significativa del receptor alfa 2A si el agonista presenta una eficacia de la brimonidina inferior a 40 % en el subtipo del receptor alfa 2A. Los compuestos de la invención incluyen, por lo tanto, agonistas del receptor alfa 2B; agonistas del receptor alfa 2B que carecen de actividad alfa 2A significativa; agonistas del receptor alfa 2C que carecen de actividad alfa 2A significativa; y agonistas del receptor alfa 2B/2C que carecen de actividad alfa 2A significativa. Puede usarse cualquiera de los compuestos anteriores, incluso si se unen a receptores que no sean los receptores alfa 2; por ejemplo, pueden usarse agonistas del receptor alfa 1, siempre que los agonistas alfa 1 tengan también una eficacia superior a 25 % en relación con la brimonidina en uno o ambos subtipos del receptor alfa 2B y alfa 2C y carezcan de actividad del receptor alfa 2A significativa.

60 La eficacia, también conocida como la actividad intrínseca, es una medida de la activación de receptor máxima obtenida por un compuesto y puede determinarse utilizando cualquier ensayo aceptado de la activación del receptor adrenérgico alfa, tal como el cAMP o la Receptor Selection and Amplification Technology (Tecnología de selección y amplificación del receptor - RSAT). La eficacia se representa como una relación o porcentaje entre el efecto máximo del fármaco y el efecto máximo de un agonista estándar para cada subtipo de receptor. La brimonidina, en sí misma un agonista del receptor alfa 2B (es tiene una eficacia de brimonidina en el receptor adrenérgico alfa 2B de 100 %), se usa como el agonista estándar para los receptores adrenérgicos alfa 2B.

65

La actividad agonista se puede caracterizar utilizando cualquiera de entre varios ensayos de rutina que incluyen, por ejemplo, ensayos de Receptor Selection and Amplification Technology (Tecnología de selección y amplificación del receptor - RSAT) (Messier y col., *Pharmacol. Toxicol.* 76:308-11 (1995)); ensayos de AMP cíclico (Shimizu y col., *J. Neurochem.* 16:1609-1619 (1969)); y ensayos de microfisiometría de citosensor (Neve y col., *J. Biol. Chem.* 267:25748-25753 (1992)). Generalmente, estos ensayos se realizan utilizando células que de forma natural expresan un único subtipo de receptor adrenérgico alfa o utilizando células transfectadas que expresan un único subtipo de receptor recombinante adrenérgico alfa. El receptor adrenérgico puede ser un receptor humano u homólogo de un receptor humano con una farmacología similar.

El ensayo RSAT mide la pérdida de inhibición de contacto mediante receptor cuyo resultado es la proliferación selectiva de células que contienen el receptor en una población mixta de células confluentes. El aumento del número de células se evalúa con un gen marcador detectable adecuado, tal como la beta galactosidasa, si se desea, en un formato de ensayo de alto rendimiento o ultra alto rendimiento. Los receptores que activan la proteína G (Gq) provocan la respuesta proliferativa. Los receptores adrenérgicos alfa, que normalmente se acoplan a la proteína Gi, activan la respuesta RSAT cuando se coexpresan con una proteína Gq híbrida que contiene un dominio de reconocimiento del receptor Gi, designado Gq/i5. Conklin y col., *Nature* 363:274-6 (1993)).

A modo de ejemplo, un ensayo RSAT se puede realizar prácticamente de la siguiente manera. Las células NIH-3T3 se colocan a una densidad de 2×10^6 células en placas de 15 cm y se mantienen en el medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco suplementado con 10 % de suero de ternera. Un día después, las células se cotransfectan por precipitación de fosfato cálcico con plásmidos de expresión de mamíferos que codifican la p-SV-β-galactosidasa (5-10 μg), el receptor (1-2 μg) y la proteína G (1-2 μg). También puede incluirse un ADN portador, por ejemplo, 40 μg de ADN de esperma de salmón, para aumentar la eficiencia de la transfección. El medio fresco se añade al siguiente día; entre uno y dos días después, las células se cosechan y se congelan en 50 alícuotas de ensayo. Las células transfectadas se descongelan y 100 μl de células se añade a 100 μl de alícuotas del compuesto que se va a probar, con diversas concentraciones probadas por triplicado, por ejemplo, en placas de 96 pocillos. La incubación continúa durante 72-96 horas a 37 °C. Después del lavado con solución salina fosfatada y tamponada, la actividad de la β-galactosidasa se determina añadiendo 200 μl de sustrato cromogénico (3,5 mM de O-nitrofenil-β-D-galactopiranosido/0,5 % NP-40 en solución salina fosfatada y tamponada), con incubación durante la noche a 30 °C y medición de la densidad óptica a 420 Nm. La absorbencia es una medida de la actividad enzimática que depende de la cantidad de células y refleja la proliferación celular mediada por el receptor. Se establece la CE₅₀ y el efecto máximo (a saber, la eficacia) de cada fármaco en cada receptor.

Los agonistas del receptor alfa 2B y 2C, que incluyen aquellos que carecen de actividad del receptor alfa 2A significativa, son conocidos en la técnica. Se puede encontrar información detallada respecto a los agonistas alfa 2, incluida su estructura, síntesis y actividad, en la patente estadounidense n° 6.329.369, n° 6.534.542, n° 6.545.182, n° 6.787.517, n° 6.841.684 y n° 7.091.232; en la publicación de solicitud de patente estadounidense n° 2003/0092766, n° 2004/0132824, n° 2004/0220402, n° 2005/0075366 y n° 2005/0267186; y en la solicitud de patente estadounidense n° 11/172.229, n° 11/232.323, n° 11/232.341, n° 60/613.870, n° 60/695.650, n° 60/747.444, n° 60/884.718, n° 60/917.828, n° 60/911.422, n° 60/911.478 y n° 60/948.389.

Es posible usar cualquier sal farmacéuticamente aceptable, profármaco, isómero o racemato del agonista del receptor alfa 2 reivindicado en los métodos de la invención.

“Alquilo” significa un grupo hidrocarburo alifático que puede ser recto o ramificado y que comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquilo preferidos contienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono en la cadena. Otros grupos alquilo más preferidos contienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono en la cadena. Ramificado significa que uno o más grupos alquilo inferiores tales como el metilo, etilo o propilo están unidos a una cadena alquílica lineal. “Alquilo inferior” significa un grupo que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono en la cadena, que puede ser lineal o ramificada. El “alquilo” puede ser no sustituido u opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes, cada sustituyente se selecciona independientemente del grupo que consiste en halo, alquilo, arilo, heterociclilo, heteroarilo, cicloalquilo, ciano, hidroxilo, alcoxi, alquiltio, amino, oxima (p. ej., =N-OH), -NH(cicloalquilo), -N(alquilo)₂, -O-C(O)-alquilo, -O-C(O)-arilo, -O-C(O)-cicloalquilo, -SF₅, carboxi -C(O)O-alquilo. Ejemplos no limitativos de grupos alquilo adecuados incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y t-butilo.

“Alquenilo” significa un grupo hidrocarburo alifático que contiene por lo menos un doble enlace carbono-carbono y que puede ser recto o ramificado y que comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquenilo tienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono en la cadena; y, más preferiblemente, de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono en la cadena. Ramificado significa que uno o más grupos alquilo inferiores tales como el metilo, etilo o propilo, están unidos a una cadena de alquenilo lineal. “Alquenilo inferior” significa de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono en la cadena, que puede ser recta o ramificada. El “alquenilo” puede ser no sustituido u opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes, cada sustituyente se selecciona independientemente del grupo que consiste en halo, alquilo, arilo, cicloalquilo, ciano, alcoxi y -S(alquilo). Ejemplos no limitativos de grupos alquenilo adecuados incluyen etenilo, propenilo, n-butenilo, 3-metil 2-butenilo, n-pentenilo, octenil y decenilo.

“Alquileo” significa un grupo difuncional obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un grupo alquilo definido anteriormente. Ejemplos no limitativos de alquileo incluyen metileno, etileno y propileno.

5 “Alquinilo” significa un grupo hidrocarburo alifático que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono, que puede ser recto o ramificado y que comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquinilo preferidos tienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono en la cadena; y, más preferiblemente, de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 átomos de carbono en la cadena. Ramificado significa que uno o más grupos alquilo inferiores, tales como metilo, etilo o propilo, están unidos a una cadena alquinilo lineal. “Alquinilo inferior” significa de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono en la cadena, que puede ser recta o
10 ramificada. Ejemplos no limitativos de grupos alquinilo adecuados incluyen etinilo, propinilo, 2-butinilo y 3-metilbutinilo. “Alquinilo” puede ser no sustituido u opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes, cada sustituyente se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo, arilo y cicloalquilo.

15 “Arilo” significa un sistema anular monocíclico o multicíclico aromático que comprende de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 átomos de carbono, preferiblemente, de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 átomos de carbono. El grupo arilo puede sustituirse opcionalmente por uno o más “sustituyentes del sistema anular”, que pueden ser iguales o diferentes, según se definen en la presente descripción. Ejemplos no limitativos de grupos arilo adecuados incluyen fenilo y naftilo.

20 “Heteroarilo” significa un sistema anular monocíclico o multicíclico aromático que comprende de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 átomos en el anillo, preferiblemente, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos en el anillo, donde uno o más de los átomos del anillo son un elemento que no es carbono, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno o azufre, solo o en combinación. Los heteroarilos preferidos contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. El “heteroarilo” puede sustituirse opcionalmente por uno o más “sustituyentes del sistema anular”, que pueden
25 ser iguales o diferentes, según se definen en la presente descripción. El prefijo aza, oxa o tia antes del nombre raíz heteroarilo significa que al menos un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, respectivamente, está presente como un átomo del anillo. Un átomo de nitrógeno de un heteroarilo puede oxidarse opcionalmente al N-óxido correspondiente. “Heteroarilo” también puede incluir un heteroarilo como se ha definido anteriormente fusionado a un arilo como se ha definido anteriormente. Ejemplos no limitativos de heteroarilos adecuados incluyen piridilo, pirazinilo, furanilo, tienilo, pirimidinilo, piridona (incluidas las piridonas N-sustituidas), isoxazolilo, isotiazolilo, oxazolilo, tiazolilo, pirazolilo, furazanil, pirrolilo, pirazolilo, triazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, pirazinilo, piridazinilo, quinoxalinilo, ftalazinilo, oxindolil, imidazo[1,2-a]piridinilo, imidazo[2,1-b]tiazolilo, benzofurazanil, indolilo, azaindolilo, bencimidazolilo, benzotienilo, quinolinilo, imidazolilo, tienopiridilo, quinazolinilo, tienopirimidilo, pirrolopiridilo, imidazopiridilo, isoquinolinilo, benzoazaindolil, 1,2,4-triazinilo, benzotiazolilo y similares. El término “heteroarilo” también se refiere a fracciones
35 heteroarilas parcialmente saturadas tales como, por ejemplo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrahidroquinolilo y similares.

“Aralquilo” o “arilalquilo” significa un grupo arilalquilo en el que el arilo y el alquilo son como se ha descrito anteriormente. Los arilalquilos preferidos comprenden un grupo alquilo inferior. Ejemplos no limitativos de grupos arilalquilo adecuados incluyen bencilo, 2-fenetilo y naftalenilmetilo. La unión a la fracción de origen ocurre a través del alquilo.

40 “Alquilarilo” significa un grupo alquilarilo, donde alquilo y arilo son como se ha descrito anteriormente. Los alquilarilos preferidos comprenden un grupo alquilo inferior. Un ejemplo no limitativo de un grupo alquilarilo adecuado es el tolilo. La unión a la fracción de origen ocurre a través del arilo.

45 “Cicloalquilo” significa un sistema anular monocíclico o multicíclico no aromático que comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono y, preferiblemente, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono. Los anillos cicloalquilo preferidos contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 7 átomos en el anillo. El cicloalquilo puede sustituirse opcionalmente por uno o más “sustituyentes del sistema anular”, que pueden ser iguales o diferentes, según se han definido anteriormente. Los ejemplos no limitativos de cicloalquilos monocíclicos adecuados incluyen ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y similares. Los ejemplos no limitativos de cicloalquilos multicíclicos adecuados incluyen 1-decalinilo, norbornilo, adamantilo y similares.

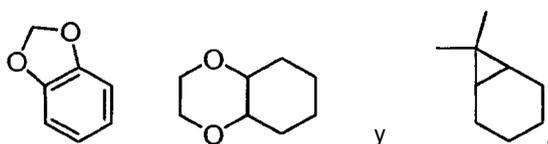
50 “Cicloalquilo” significa la fracción del cicloalquilo como se ha definido anteriormente, unida a través de una fracción alquilo (definida anteriormente) a un núcleo de origen. Ejemplos no limitativos de cicloalquilalquilos adecuados incluyen ciclohexilmetilo, adamantimetilo y similares.

55 “Cicloalqueno” significa un sistema anular monocíclico o multicíclico no aromático que comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono y, preferiblemente, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono, y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los anillos cicloalqueno preferidos contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 7 átomos en el anillo. El cicloalqueno puede sustituirse opcionalmente por uno o
60 más “sustituyentes del sistema anular”, que pueden ser iguales o diferentes, según se ha definido anteriormente. Ejemplos no limitativos de cicloalquenos monocíclicos adecuados incluyen ciclopentenilo, ciclohexenilo, ciclohepta-1,3-dienilo y similares. Un ejemplo no limitativo de un cicloalqueno multicíclico adecuado es el norbornenilo.

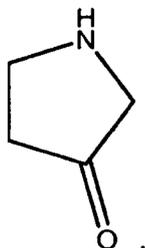
“Cicloalquenilalquilo” significa una fracción cicloalquenila, como se ha definido anteriormente, unida mediante una fracción alquilo (definida anteriormente) a un núcleo de origen. Ejemplos no limitativos de cicloalquenilalquilo adecuados incluyen ciclopentenilmetilo, ciclohexenilmetilo y similares.

5 “Halógeno” significa flúor, cloro, bromo o yodo. Se prefieren el flúor, el cloro y el bromo.

El “sustituyente del sistema anular” significa un sustituyente unido a un sistema anular aromático o no aromático que, por ejemplo, reemplaza un hidrógeno disponible en el sistema anular. Los sustituyentes del sistema anular pueden ser iguales o diferentes, cada uno independientemente seleccionado del grupo que consiste en alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, alquilarilo, heteroaralquilo, heteroarilalqueno, heteroarilalquinil, alquilheteroarilo, hidroxil, hidroxialquilo, alcoxi, ariloxi, aralcoxi, acilo, aroil, halógeno, radicales nitro, ciano, carboxilo, alcocarbonilo, ariloxicarbonilo, aralcoxicarbonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquiltio, ariltio, heteroariltio, aralquiltio, heteroaralquiltio, cicloalquilo, heterociclilo, $-SF_5$, $-OSF_5$ (para arilo), $-O-C(O)$ -alquilo, $-O-C(O)$ -arilo, $-O-C(O)$ -cicloalquilo, $-C(=N-CN)-NH_2$, $-C(=NH)-NH_2$, $-C(=NH)-NH$ (alquilo), oxima (p. ej., $=N-OH$), $-NY_1Y_2$, $-alquilo-NY_1Y_2$, $-C(O)NY_1Y_2$, $-SO_2NY_1Y_2$ y $-SO_2NY_1Y_2$, en donde Y_1 e Y_2 pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo y aralquilo. “Sustituyente del sistema anular” también puede significar una fracción individual que reemplaza simultáneamente dos hidrógenos disponibles en dos átomos de carbono adyacentes (un H en cada carbono) en un sistema anular. Ejemplos de tales fracciones son el metileno dioxi, etilendioxi, $-C(CH_3)_2$ y similares, que forman fracciones tales como, por ejemplo:



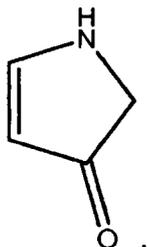
“Heteroarilalquilo” significa una fracción heteroarilo, como se ha definido anteriormente, unida mediante una porción alquilo (definida anteriormente) a un núcleo de origen. Ejemplos no limitativos de heteroarilos adecuados incluyen 2 piridinilmetilo, quinolinilmetil y similares. “Heterociclilo” significa un sistema anular monocíclico o multicíclico saturado no aromático que comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos en el anillo y, preferiblemente, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos en el anillo, donde uno o más átomos del sistema anular son un elemento que no es carbono, por ejemplo, un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, solo o en combinación. No hay átomos de oxígeno y/o azufre adyacentes presentes en el sistema anular. Los heterociclilos preferidos contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. El prefijo aza, oxa o tia antes del nombre raíz heterociclilo significa que al menos un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, respectivamente, está presente como un átomo del anillo. Cualquier $-NH$ en un anillo heterocíclico puede estar protegido, tal como, por ejemplo, como grupo $-N(Boc)$, $-N(Cbz)$, $-N(Tos)$ y similares; dichas protecciones también se consideran parte de esta invención. El heterociclilo puede sustituirse opcionalmente por uno o más “sustituyentes del sistema anular”, que pueden ser iguales o diferentes, según se define en la presente memoria. El átomo de nitrógeno o de azufre del heterociclilo puede oxidarse opcionalmente al correspondiente óxido de N, óxido de S o dióxido de S. Ejemplos no limitativos de anillos heterocíclicos monocíclicos adecuados incluyen piperidinilo, pirrolidinilo, piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tiazolidinilo, 1,4-dioxanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, lactama, lactona y similares. “Heterociclilo” incluye, además, anillos heterocíclicos como se describen anteriormente, en donde $=O$ reemplaza dos hidrógenos disponibles en el mismo átomo de carbono del anillo. Un ejemplo de dicha fracción es la pirrolidona:



“Heterociclilalquilo” significa una fracción heterociclilo como se define anteriormente unida mediante una fracción alquilo (definida anteriormente) a un núcleo de origen. Ejemplos no limitativos de heterocicloalquilos adecuados incluyen piperidinilmetilo, piperazinilmetilo y similares.

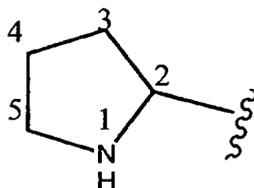
“Heterocicloalquil” significa un sistema anular monocíclico o multicíclico no aromático que comprende de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos en el anillo y, preferiblemente, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos en el anillo, donde uno o más átomos en el sistema anular son un elemento que no es carbono, por ejemplo, un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, solo o en combinación, y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono o doble enlace carbono-nitrógeno. No hay átomos de oxígeno y/o azufre adyacentes presentes en el sistema anular. Los anillos heterocíclicos preferidos contienen de aproximadamente 5 a

aproximadamente 6 átomos en el anillo. El prefijo aza, oxa o tia antes del nombre raíz heterociclenilo significa que al menos un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, respectivamente, está presente como un átomo del anillo. El heterociclenilo puede sustituirse opcionalmente por uno o más sustituyentes anulares, en donde el “sustituyente del sistema anular” es como se ha definido anteriormente. El átomo de nitrógeno o de azufre del heterociclenilo puede oxidarse opcionalmente al correspondiente óxido de N, óxido de S o dióxido de S. Ejemplos no limitativos de grupos heterociclenilos adecuados incluyen 1,2,3,4-tetrahidropiridinilo, 1,2-dihidropiridinilo, 1,4-dihidropiridinilo, 1,2,3,6-tetrahidropiridinilo, 1,4,5,6-tetrahidropirimidinilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, 2-imidazolinilo, 2-pirazolinilo, dihidrotiazolilo, dihidrooxazolilo, dihidrooxadiazolilo, dihidrotiazolil, 3,4-dihidro-2H-pirano, dihidrofuranilo, fluorodihidrofuranilo, 7-oxabicyclo[2.2.1]heptenilo, dihidrotiofenilo, dihidrotiofenilo y similares. “Heterociclenil” también incluye anillos heterocíclicos como se ha descrito anteriormente, en donde =O reemplaza dos hidrógenos disponibles en el mismo átomo de carbono del anillo. Un ejemplo de dicha fracción es la pirrolidinona:



“Heterociclenilalquilo” significa una fracción heterociclenil, como se define anteriormente, unida mediante una fracción alquilo (definida anteriormente) a un núcleo de origen.

Debe observarse que en los sistemas anulares de esta invención que contienen heteroátomos, no hay grupos hidroxilo en los átomos de carbono adyacentes a un N, O o S, así como no hay grupos N o S en carbonos adyacentes a otro heteroátomo. Así, por ejemplo, en el anillo:



no hay -OH unido directamente a los carbonos marcados como 2 y 5.

También debe observarse que las formas tautoméricas como, por ejemplo, las fracciones:



se consideran equivalentes en ciertas realizaciones de esta invención.

“Alquinilalquilo” significa un grupo alquinilalquilo en el que el alquinilo y el alquilo son como ha descrito anteriormente. Los alquinilalquilos preferidos contienen un grupo alquinilo y un grupo alquilo inferiores. La unión a la fracción de origen ocurre a través del alquilo. Un ejemplo no limitativo de grupos alquinilalquilo adecuados incluye el propargilmetilo.

“Heteroaralquilo” significa un grupo heteroaril alquilo, donde el heteroarilo y el alquilo son como se describe anteriormente. Los heteroaralquilos preferidos contienen un grupo alquilo inferior. Ejemplos no limitativos de grupos aralquilo adecuados incluyen piridilmetilo y quinolin-3-metilo. La unión a la fracción de origen ocurre a través del alquilo.

“Hidroxiálquilo” significa un grupo HO-alquilo en el que el alquilo es como se ha definido anteriormente. Los hidroxiálquilos preferidos contienen un alquilo inferior. Ejemplos no limitativos de grupos hidroxiálquilo adecuados incluyen hidroximetilo y 2-hidroxietilo.

“Acilo” significa un grupo H-C(O)-, alquilo-C(O)- o cicloalquilo-C(O)-, grupo en el que los diversos grupos son como se ha descrito anteriormente. La unión a la fracción de origen ocurre a través del carbonilo. Los acilos preferidos contienen un alquilo inferior. Ejemplos no limitativos de grupos acilo adecuados incluyen formilo, acetilo y propanoilo.

“Aroilo” significa un grupo arilo-C(O)- en el que el grupo arilo es como se ha descrito anteriormente. La unión a la fracción de origen ocurre a través del carbonilo. Ejemplos no limitativos de grupos adecuados incluyen benzoil y 1-naftilol.

5 “Alcoxi” significa un grupo alquilo-O en el que el grupo alquilo es como se ha descrito anteriormente. Ejemplos no limitativos de grupos alcoxi adecuados incluyen metoxi, etoxi, N-propoxi, isopropoxi y N-butoxi. La unión a la fracción de origen ocurre a través del oxígeno de éter.

10 “Arioxi” significa un grupo arilo-O en el que el grupo arilo es como se ha descrito anteriormente. Ejemplos no limitativos de grupos arioxi adecuados incluyen fenoxi y naftioxi. La unión a la fracción de origen ocurre a través del oxígeno de éter.

“Aralquiloxi” significa un grupo aralquilo-O en el que el grupo aralquilo es como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos no limitativos de grupos aralquiloxi adecuados incluyen benciloxi y 1- o 2- naftalenometoxi. La unión a la fracción de origen ocurre a través del oxígeno de éter.

15 “Alquiltio” significa un grupo alquilo S en el que el grupo alquilo es como se ha descrito anteriormente. Ejemplos no limitativos de grupos alquiltio adecuados incluyen metiltio y etiltio. La unión a la fracción de origen ocurre a través del azufre.

20 “Arlitio” significa un grupo arilo S en el que el grupo arilo es como se ha descrito anteriormente. Ejemplos no limitativos de grupos ariltio adecuados incluyen feniltio y naftiltio. La unión a la fracción de origen ocurre a través del azufre.

25 “Aralquiltio” significa un grupo aralquilo S en el que el grupo aralquilo es como se ha descrito anteriormente. Un ejemplo no limitativo de un grupo aralquiltio adecuado es el benciltio. La unión a la fracción de origen ocurre a través del azufre.

“Alcoxicarbonilo” significa un grupo alquilo-O-CO. Los ejemplos no limitativos de grupos alcoxicarbonilo adecuados incluyen metoxicarbonilo y etoxicarbonilo. La unión a la fracción de origen ocurre a través del carbonilo.

30 “Ariloxicarbonilo” significa un grupo arilo-O-C(O). Ejemplos no limitativos de grupos ariloxicarbonilo adecuados incluyen fenoxicarbonil y naftoxicarbonil. La unión a la fracción de origen ocurre a través del carbonilo.

“Aralcoxicarbonilo” significa un grupo aralquilo O-C(O). Un ejemplo no limitativo de un grupo aralcoxicarbonilo adecuado es el bencilloxicarbonilo. La unión a la fracción de origen ocurre a través del carbonilo.

35 “Alquilsulfonilo” significa un grupo alquilo S(O₂). Los grupos preferidos son aquellos en los que el grupo alquilo es un alquilo inferior. La unión a la fracción de origen ocurre a través del sulfonilo.

“Ariilsulfonilo” significa un grupo arilo S(O₂). La unión a la fracción de origen ocurre a través del sulfonilo.

40 El término “sustituido” significa que uno o más hidrógenos en el átomo designado se reemplazan por una selección del grupo indicado, siempre que no se exceda la valencia normal del átomo designado en las circunstancias existentes y que la sustitución resulte en un compuesto estable. Las combinaciones de sustituyentes y/o variables solo están permitidas en caso de que dichas combinaciones produzcan compuestos estables. Por “compuesto estable” o “estructura estable” se entiende un compuesto que es suficientemente robusto para sobrevivir al aislamiento en un grado útil de pureza de una mezcla de reacción, formulado para obtener un agente terapéutico eficaz.

El término “sustituido opcionalmente” significa una sustitución opcional con grupos, radicales o fracciones especificadas.

50 El término “purificado”, “en forma purificada” o “en forma aislada y purificada” respecto a un compuesto se refiere al estado físico de dicho compuesto después de ser aislado de un proceso sintético (p. ej., a partir de una mezcla de reacción), o una fuente natural o una combinación de los mismos. Así, el término “purificado”, “en forma purificada” o “en forma aislada y purificada” respecto a un compuesto se refiere al estado físico de dicho compuesto después de ser obtenido de un proceso o procesos de purificación descritos en la presente memoria o bien conocido por los expertos en la técnica (p. ej., cromatografía, recristalización y similares) con una pureza suficiente para ser caracterizable por las técnicas analíticas estándar descritas en la presente memoria o bien conocidas por el experto en la materia.

60 Debe observarse también que se presupone que cualquier carbono o heteroátomo con valencias no satisfechas en el texto, los esquemas, los ejemplos y las tablas de la presente invención tiene el número suficiente de átomos de hidrógeno para satisfacer dichas valencias. Y uno o más de estos átomos de hidrógeno pueden ser deuterio.

65 Cuando un grupo funcional de un compuesto se denomina “protegido”, esto significa que el grupo está en forma modificada para evitar reacciones secundarias no deseadas en el sitio protegido cuando el compuesto se somete a una reacción. Los expertos en la técnica reconocerán los grupos protectores adecuados, así como por referencia a libros de texto estándar tales como, por ejemplo, T. W. Greene *et al*, *Protective Groups in organic Synthesis* (1991), Wiley, Nueva York.

Cuando cualquier variable (p. ej., arilo, heterociclo, R², etc.) se produce más de una vez en cualquier constituyente o en la fórmula I, su definición en cada caso es independiente de su definición en todos los demás casos.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término “composición” pretende abarcar un producto que comprende los ingredientes detallados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes detallados en las cantidades especificadas.

Sales farmacéuticamente aceptables

10 Los agonistas del receptor alfa 2 pueden utilizarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables.

15 Una “sal farmacéuticamente aceptable” es cualquier sal que retenga la actividad del compuesto de origen y no transmita ningún efecto perjudicial adicional o efectos adversos sobre el sujeto al que se administra y en el contexto que se administra, en comparación con el compuesto de origen. Una sal farmacéuticamente aceptable también se refiere a cualquier sal que pueda formarse in vivo como resultado de la administración de un ácido, otra sal o un profármaco que se convierte en un ácido o sal.

20 Las sales farmacéuticamente aceptables de grupos funcionales ácidos pueden derivarse de bases orgánicas o inorgánicas. La sal puede comprender un ion mono o polivalente. Son de particular interés los iones inorgánicos de litio, sodio, potasio, calcio y magnesio. Las sales orgánicas se pueden preparar con aminas, en particular, sales de amonio tales como las mono, di y trialkilaminas o etanolaminas. Las sales también se pueden formar con cafeína, trometamina y moléculas similares. El ácido clorhídrico o algún otro ácido farmacéuticamente aceptable puede formar una sal con un compuesto que incluye un grupo básico, tal como una amina o un anillo de piridina.

25 Profármacos - Aspecto de referencia

Se puede usar en las composiciones y métodos un profármaco de cualquier agonista del receptor alfa 2.

30 Un “profármaco” es un compuesto que se convierte en un compuesto terapéuticamente activo después de la administración y el término debe interpretarse tan ampliamente en la presente memoria como se entiende generalmente en la técnica. Sin pretender limitar el alcance de la invención, la conversión puede ocurrir por hidrólisis de un grupo éster o algún otro grupo biológicamente voluble. En general, pero no necesariamente, un profármaco es inactivo o menos activo que el compuesto terapéuticamente activo en el que se convierte. Se contemplan específicamente los profármacos de éster de los compuestos descritos en la presente memoria. Un éster puede derivarse de un ácido carboxílico del C1 (es decir, el ácido carboxílico terminal de una prostaglandina natural) o un éster puede derivarse de un grupo funcional ácido carboxílico en otra parte de la molécula, tal como en un anillo de fenilo. Si pretender ser limitativo, un éster puede ser un éster alquilo, un éster arilo o un éster de heteroarilo. En este contexto (definición de “profármaco”), el término “alquilo” tiene el significado generalmente entendido por los expertos en la técnica y se refiere a fracciones alquilo lineales, ramificadas o cíclicas. Los ésteres de alquilo C₁₋₆ son especialmente útiles, donde la parte alquilo del éster tiene de 1 a 6 átomos de carbono e incluye, aunque no de forma limitativa, metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, *iso*-butilo, *t*-butilo, isómeros de pentilo, isómeros de hexilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y combinaciones de los mismos con 1-6 átomos de carbono, etc.

45 Los agonistas del receptor alfa 2 de la invención se pueden producir sintéticamente o dentro del cuerpo después de la administración de un profármaco. Por lo tanto, el término “agonista del receptor alfa 2” abarca los compuestos producidos mediante un proceso de fabricación y aquellos compuestos que se forman in vivo solamente cuando se administra otro fármaco.

50 Isómeros y racematos

En las composiciones y métodos de la invención se puede usar un enantiómero, estereoisómero u otro isómero de un agonista del receptor alfa 2. También se pueden usar en las composiciones y métodos de la invención una mezcla racémica o uno o ambos racematos, en cualquier proporción.

55 Dosis

60 La dosis y la frecuencia de administración precisa dependen de la gravedad y la naturaleza de la afección del paciente, de la forma de administración, de la potencia y la farmacocinética del compuesto particular utilizado, así como del juicio del médico que lo recete. Determinar la dosis es una cuestión rutinaria que se encuentra dentro de las capacidades de los expertos en la técnica. En general, los agonistas del receptor alfa 2 se administran en dosis terapéuticamente eficaces, es decir, en una dosis suficiente para producir el efecto terapéutico deseado.

65 En una realización, los compuestos de la invención (agonistas del receptor alfa 2B; agonistas del receptor alfa 2B que carecen de actividad alfa 2A significativa; agonistas del receptor alfa 2C que carecen de actividad alfa 2A significativa; y agonistas del receptor alfa 2B/2C que carecen de actividad alfa 2A significativa) proporcionan un alivio a largo plazo, es decir, un alivio que dura uno o más días después de retirar los compuestos. Por lo tanto, en una realización, el método de

la invención comprende administrar a un paciente un compuesto de la invención durante un período inicial y después administrar el compuesto de nuevo durante un segundo período tras haber transcurrido un período de retirada. El período inicial, el segundo período y el período de retirada pueden ser de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce días, o de una, dos, tres o cuatro semanas, y pueden ser iguales o diferentes. Por lo tanto, por ejemplo, se puede administrar un compuesto de la invención durante tres días y luego administrar el compuesto nuevamente durante tres días, no antes de los tres días después de haber administrado el compuesto la vez anterior; o se puede administrar un compuesto de la invención durante dos semanas y, después, administrar el compuesto de nuevo durante una semana, no antes de una semana después de haber administrado el compuesto la vez anterior.

En otra realización, el período inicial y el segundo período son variables, pero el período de retirada es fijo. En dichas realizaciones, el período inicial y el segundo período son de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce días, o una, dos, tres o cuatro semanas. Por lo tanto, por ejemplo, se puede administrar un compuesto de la invención durante al menos tres días y después administrar el compuesto de nuevo durante al menos tres días, no antes de los seis días después de haber administrado el compuesto la vez anterior; o se puede administrar un compuesto de la invención durante al menos una semana y, después, administrar el compuesto de nuevo durante al menos una semana, no antes de una semana después de haber administrado el compuesto la vez anterior.

Excipientes y formas de dosificación

Los expertos en la técnica comprenderán fácilmente que los agonistas del receptor alfa 2 pueden mezclarse con excipientes farmacéuticamente aceptables que son bien conocidos en la técnica.

Una composición farmacéutica que se vaya a administrar de forma sistemática puede fabricarse en forma de polvo, píldora, tableta o similares, o como una solución, emulsión, suspensión, aerosol, jarabe o elixir adecuado para la administración por vía oral o parenteral, la inhalación o la administración tópica en el ojo o la piel.

En formas de dosificación o medicamentos sólidos, los portadores sólidos no tóxicos incluyen, aunque no de forma limitativa, grados farmacéuticos del manitol, la lactosa, el almidón, el estearato de magnesio, la sacarina sódica, los polialquilen glicoles, el talco, la celulosa, la glucosa, la sacarosa y el carbonato de magnesio. Las formas de dosificación sólidas pueden no estar recubiertas o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas para retrasar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y así proporcionar una acción constante durante un período más prolongado. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo de tiempo, tal como el monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. También se pueden recubrir mediante la técnica descrita en las patentes estadounidenses n° 4.256.108, n° 4.166.452 y n° 4.265.874 para formar comprimidos terapéuticos osmóticos para control de liberación. Las formas de dosificación de administración farmacéutica líquidas pueden comprender, por ejemplo, una solución o suspensión de uno o más de los compuestos actualmente útiles y coadyuvantes farmacéuticos opcionales en un portador, tales como por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar así una solución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica que se pretende administrar también puede contener cantidades mínimas de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH y similares. Ejemplos típicos de estos agentes auxiliares son el acetato de sodio, el monolaurato de sorbitán, la trietanolamina, el acetato de sodio, el oleato de trietanolamina, etc. Los métodos actuales para preparar estas formas de dosificación son conocidos o serán claros para los expertos en la técnica; por ejemplo, véase *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 16ª edición, 1980. La composición de la formulación que se va a administrar, en cualquier caso, contiene una cantidad de uno o más de los compuestos actualmente útiles en un volumen eficaz para proporcionar el efecto terapéutico deseado.

Por lo general, la administración parenteral se caracteriza por inyección, bien subcutánea, intramuscular o intravenosa. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en líquido antes de la inyección o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y similares. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas inyectables que se pretende administrar también pueden contener cantidades mínimas de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH y similares.

Activar las células T

Las células T son una clase de linfocitos que tienen T cell receptors (receptores específicos de células T - TCR) que se producen como resultado del reordenamiento genético. Las células T desempeñan diversos papeles, los cuales se logran mediante la diferenciación de subconjuntos distintos de células T, reconocibles por patrones discretos de expresión génica. Varios subconjuntos de células T principales se reconocen con base en la expresión del receptor, tales como TCR- α/β , TCR γ/δ y células asesinas naturales invariables. Otros subconjuntos de células T están definidos por las moléculas superficiales y las citocinas que estas secretan. Por ejemplo, las células T auxiliares (células CD4) secretan citocinas y ayudan a las células B y células T citotóxicas a sobrevivir y llevar a cabo funciones efectoras. Las cytotoxic T cells (células T citotóxicas - CTL) son, por lo general, células CD8 especializadas para destruir células objetivo, tales como células infectadas o células tumorales. Las células natural killer (asesinas naturales - NK) están

relacionadas con las células T, pero no tienen TCR y tienen una menor longevidad, aunque comparten algunas funciones con las células T y son capaces de secretar citocinas y destruir algunos tipos de células objetivo.

5 La sangre periférica humana y de ratón contiene una pequeña población de células T, linfocitos que expresan el fenotipo T regulador (“Treg”), a saber, positivo en ambos antígenos CD4 y CD25 (es decir, aquellas células T CD4⁺ que son también claramente positivas para CD25). Identificadas en primer lugar en ratones, donde constituyen 6-10 % de la población de células T CD4⁺ de los ganglios linfáticos y el bazo, esta población de células CD4⁺CD25⁺ solo representa aproximadamente 5-10 % de las peripheral blood mononuclear cells (células mononucleares en sangre periférica - PBMC) en humanos, o 2-7 % en el caso de las células T CD4⁺, aunque algunos donantes presentan una población más diferenciada de células CD4⁺ y CD25⁺. Aproximadamente 1-2 % de PBMC de la sangre periférica humana es positiva para células CD4 (CD4⁺) y más claramente positiva para células CD25 (CD25⁺).

15 Existen varios subconjuntos de células T reguladoras (Bluestone y col., *Nature Rev. Immunol.*, 3:253 (2003)). Un subconjunto de células reguladoras se desarrolla en el timo. Las células T reguladoras derivadas del timo funcionan mediante un mecanismo independiente de la citocina, que involucra el contacto entre células (Shevach, *Nature Rev. Immunol.* 2:389 (2002)). Son esenciales para la inducción y el mantenimiento de la autotolerancia y la prevención de la autoinmunidad (Shevach, *Annu. Rev. Immunol.* 18:423-449 (2000); Stephens y col., 2001; Taams y col., 2001; Thornton y col., 1998; Salomon y col., *Immunity* 12:431-440 (2000); Sakaguchi y col., *Immunol. Rev.* 182:18-32 (2001)). Estas células reguladoras profesionales evitan la activación y la proliferación de células T autorreactivas que han escapado a la eliminación tímica o reconocen antígenos fuera del timo, por lo que son críticas para la homeostasis y la regulación inmunitaria, así como para proteger al huésped contra el desarrollo de autoinmunidad (Suri-Payer y col., *J. Immunol.* 157:1799-1805 (1996); Asano y col., *J. Exp. Med.* 184:387-396 (1996); Bonomo y col., *J. Immunol.* 154:6602-6611 (1995); Willerford y col., *Immunity* 3:521-530 (1995); Takahashi y col., *Int. Immunol.* 10:1969-1980 (1998); Salomon y col., *Immunity* 12:431-440 (2000); Read y col., *J. Exp. Med.* 192:295-302 (2000). Por lo tanto, las células T inmunoreguladoras CD4⁺CD25⁺ a menudo se denominan “células profesionales”.

30 Sin embargo, las células T reguladoras también puede ser generadas por la activación de células T CD4⁺ maduras periféricas. Los estudios han indicado que las células T reguladoras de procedencia periférica realizan sus actividades inhibitorias mediante la producción de citocinas inmunodepresoras tales como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) e IL-10 (Kingsley y col., *J. Immunol.* 168:1080 (2002); Nakamura y col., *J. Exp. Med.* 194:629-644 (2001)). Después de la activación específica del antígeno, estas células T reguladoras pueden suprimir la proliferación de células T CD4⁺ o CD25⁺ de forma no específica (esto quedó demostrado en los estudios de separación de FACS en cultivo conjunto del supresor inmovilizado anti-CD3 con base mAb en baja dosis de Baecher-Allan y col., *J. Immunol.* 167(3):1245-1253 (2001)).

35 Recientemente, Riley y col. (“Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning,” *Immunity*, 30(5), 656-665 (2009)) han demostrado que las células T reguladoras son críticas en varias patologías relacionadas con la activación inmunológica (Riley y col., 2009). Las T reguladoras CD25⁺, FoxP3⁺ tienen la capacidad de bloquear la inflamación por respuesta inmune y la destrucción de tejido mediante la supresión de las funciones de una gama de tipos celulares, incluidas las células T auxiliares convencionales CD4⁺, las células B de producción de anticuerpos, la actividad citotóxica CD8⁺, la función de las células presentadoras de antígenos y la maduración (Tang & Bluestone, 2008). Se ha informado de una menor frecuencia o disfunción de las células T reguladoras en muchas enfermedades humanas (Tran & Shevach, 2009).

45 En una realización, el método de la invención comprende administrar un agonista de alfa 2 para aumentar la función de las células T reguladoras en pacientes en los que dicho aumento sería beneficioso. En otra realización, la célula T reguladora es una célula T CD25⁺, FoxP3⁺. En otra realización, el método de la invención comprende la administración de un agonista alfa 2 para tratar enfermedades como la neuritis, el síndrome de Guillain-Barré, la artritis reumatoide, la diabetes tipo I, multiple sclerosis (esclerosis múltiple - MS), graft-versus-host disease (enfermedad del injerto contra huésped - GVHD), la uveítis autoinmune, la inflamación ocular, la enfermedad del ojo seco, la dermatitis atópica, la psoriasis, la enfermedad inflamatoria del intestino, el asma y la anemia aplásica.

Ejemplos

55 La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos. Estos se proporcionan únicamente a título ilustrativo; son posibles muchas realizaciones más.

Pruebas de la acción de alfa 2B en las células T reguladoras

60 Los inventores han puesto a prueba si los componentes selectivos de α_{2B} regulan los estados de dolor neuropático mediante mecanismos relacionados con la inmunidad. El tratamiento con el agonista α_{2B} , el Compuesto A, atenuó los niveles incrementados de IL-2 (Tabla 1) inducidos por cirugía de ligadura del nervio espinal. IL-2 es una citocina proinflamatoria esencial para regular la proliferación de linfocitos T. Este hallazgo indica que el efecto del agonista α_{2B} en la inversión de la alodinia aguda y crónica (como se describe en US-7.345.065,) podría ocurrir a través de las células inmunes, especialmente, las células T. Los inventores también observaron la expresión del receptor α_{2B} , pero no del receptor α_{2A} , en diferentes subtipos de linfocitos T humanos mediante qPCR. A conocimiento de los inventores, se trata de

la primera demostración de expresión del subtipo de receptor α_{2B} en células T (Figura 1). Se obtuvieron pruebas adicionales para el rol de las células inmunitarias en los mecanismos de mitigación del dolor persistente mediados por los agonistas del receptor α_{2B} gracias al hecho de que el efecto analgésico de un segundo agonista α_{2B} con una estructura diferente, el Compuesto B, se podía inhibir con el fármaco inmunosupresor FK506 (Tabla 2). Este hallazgo sugiere que la inversión de la alodinia a largo plazo inducida por el receptor α_{2B} requiere la presencia de linfocitos activados, puesto que FK506 ha mostrado ser un potente inhibidor de la activación de los linfocitos T (Small y col., 1996). Este hallazgo se confirmó con otro agonista de α_{2B} con una estructura diferente, el Compuesto C, donde FK506 fue capaz de inhibir la actividad analgésica a largo plazo del Compuesto C en el modelo de ligadura del nervio espinal (Tabla 3).

5 Además, los inventores han explorado el subtipo de células T involucradas en los efectos mediados por el receptor α_{2B} y han observado un incremento significativo y persistente en el número de células T reguladoras en los órganos linfáticos en animales con dolor neuropático tratados con agonistas del receptor α_{2B} (Figura 2). Los inventores no observaron efecto alguno del compuesto sobre el número de células T reguladoras en animales previamente no tratados. Esto sugiere que el efecto de los agonistas del receptor α_{2B} en las células T reguladoras depende de la estimulación del antígeno y que puede haber una expansión selectiva de antígenos en las células T reguladoras.

Efecto de los agonistas alfa 2B en un modelo de esclerosis múltiple

20 Los inventores han demostrado que este mecanismo de los agonistas del receptor α_{2B} se puede generalizar a un segundo modelo de activación patológica de las células T, un modelo de esclerosis múltiple y una segunda especie. En ratones inmunizados con proteína proteolítica, que provoca una forma de recidiva-remisión de la encefalomiелitis autoinmune experimental, el Compuesto B (3 mg/kg/día por minibomba osmótica) reforzó de forma selectiva el número de células T reguladoras y redujo el dolor [Figura 3].

25 Tabla 1 Atenuación de los niveles de IL-2 en varios tejidos de ratas SNL tratadas con el Compuesto A (2,4 mg/kg/día por medio de minibomba osmótica) o con vehículo

	Ipsilateral DRGL4	Ipsilateral DRGL5, L6	Médula espinal ipsilateral	Suero
Sin tratamiento previo	68 ± 8,5	138 ± 0,88	397,33 ± 44,58	233,33 ± 56,25
Ratas SNL Vehículo	139,33 ± 15,76	586 ± 7,21	523 ± 44,80	768,33 ± 271,94
Ratas SNL Compuesto A 24 horas	101,63 ± 20,55	211 ± 33,72**	345 ± 19,34	978 ± 77,13
Ratas SNL Compuesto A 5 días	69,52 ± 9,42 **	138,35 ± 22,59**	351,75 ± 17,19*	380,25 ± 61,67

Los datos se expresan como pg/ml ± error estándar de la media. n=3 - 4 en todos los grupos. Valores de significación respecto al vehículo: *p< 0,05; **p< 0,01.

30 Tabla 2. Inversión del dolor mediante el Compuesto B +/- FK506 en el modelo de rata SNL del dolor neuropático alodínico

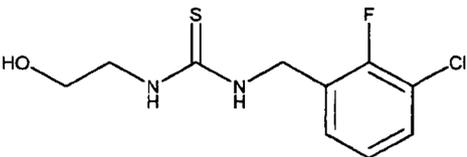
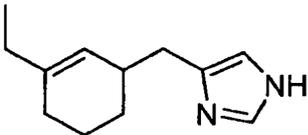
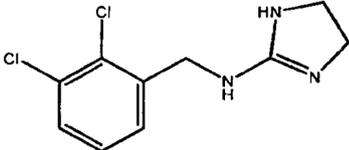
Dosis del fármaco en ratas SNL (enmascarada)	% inversión de la alodinia	
	Tras 24 horas	Tras 7 días
Vehículo (50 % de DMSO)	-1,98 ± 6,90	-7,23 ± 6,22
3 mg/kg FK506 BID SC	-5,77 ± 3,43	-6,39 ± 4,85
1 mg/kg/día del Compuesto B en minibomba osmótica (tratamiento de 7 días)	78,50 ± 7,85**	73,35 ± 11,95**
1 mg/día/kg del Compuesto B en minibomba osmótica + 3 mg/kg FK506 BID SC (Compuesto B tratado durante 7 días y FK506 tratado durante 5 días)	57,06 ± 14,52*	16,43 ± 19,42

35 Tabla 3. Inversión del dolor mediante el Compuesto C +/- FK506 en el modelo de rata SNL del dolor neuropático alodínico

Dosis del fármaco en ratas SNL (enmascarada)	% inversión de la alodinia	
	Tras 24 horas	Tras 23 días
Vehículo (50 % de DMSO)	0,94 ± 5,65	1,72 ± 5,08
3 mg/kg FK506 BID SC	-0,53 ± 6,21	2,01 ± 5,86
1 mg/kg/día del Compuesto C TID durante 5 días	66,06 ± 10,71**	81,48 ± 6,00**
1 mg/kg/día del Compuesto C TID para el cuidado bucal durante 5 días + 3 mg/kg FK506 BID SC durante 5 días	49 ± 13,15*	21,82 ± 4,26

Los datos se expresan como % del efecto máximo posible, que representa el % de la inversión de alodinia partiendo del valor antes del fármaco, \pm error estándar de la media. n=6 en todos los grupos. Valores de significación frente a vehículo: *p< 0,05; **p< 0,01.

5 La **Tabla 4**, a continuación, muestra las estructuras de los compuestos A, B y C:

COMPUESTO	ESTRUCTURA
A	
B	
C	

Estudios en otros modelos de enfermedad mediada por células T

10 Estudios del mecanismo los efectos mediados por los agonistas del receptor α_{2B} en el modelo de Chung del dolor neuropático y en el modelo de dolor inducido por MS apuntaron a un aumento importante y persistente en el número de células T reguladoras putativas en los órganos linfáticos. Los inventores investigaron los agonistas del receptor α_{2B} más a fondo en el modelo MS para los efectos en la trayectoria clínica de la enfermedad, así como en la uveítis autoinmune, la uveítis inducida por endotoxina y la enfermedad del ojo seco. En los ratones inmunizados con proteína proteolipídica, que provoca una forma de recidiva-remisión de experimental autoimmune encephalomyelitis (encefalomielitis autoinmune experimental - EAE), el tratamiento con el Compuesto B durante el desarrollo de la enfermedad clínica tiene un efecto significativo sobre los síntomas atenuantes de MS (Figura 4). El tratamiento de los días 7 a 10 redujo la puntuación clínica durante las recaídas en los días 14 (p<0,01) y 24. Se obtienen resultados similares cuando los ratones reciben un tratamiento continuado. En la EAE, las células T proinflamatorias CD4+ y otras células inflamatorias proliferan en la periferia y se infiltran en el sistema nervioso central (SNC), lo que conduce a la desmielinización caracterizada por una parálisis progresiva. El análisis de la infiltración de células inmunitarias en el SNC mediante citometría de flujo al final del estudio reveló que el tratamiento con el Compuesto B redujo significativamente la presencia de células inmunitarias (Figura 5). Esto indica que el Compuesto B evitó la presencia de células T patógenas en el SNC, dando como resultado una encefalomielitis atenuada. El Compuesto C también mostró una eficacia similar en la EAE. Después de la dosificación oral de TID (3 mg/kg/día) del día 7 al 13, la puntuación clínica se redujo significativamente en comparación con los ratones tratados con el vehículo entre los días 13 y 24 (Figura 6). El análisis de las células inmunitarias en el SNC mediante citometría de flujo en el día 37 reveló que el Compuesto C aumentó la frecuencia de las células T reguladoras (CD4+CD25hiFoxP3+) en la médula espinal (Figura 7). Los inventores también realizaron estudios para investigar la utilidad de los agonistas alfa 2B en modelos de inflamación ocular mediada por células T. Experimental autoimmune uveitis (uveítis autoinmune experimental - EAAU) representa una respuesta autoinmune a un antígeno específico mediada por células T que produce la enfermedad en el segmento anterior. El Compuesto B, con una dosificación de 1 mg/kg/día desde los días 1-18 o los días 7-18 tras la inducción de EAAU (3 días de dosificación de TID oral seguidos por la administración mediante minibomba osmótica), fue eficaz en la suspensión parcial de la inflamación anterior.

35 El Compuesto B disminuyó las puntuaciones clínicas de la uveítis anterior, así como el número de células inflamatorias en el humor acuoso (Figura 8). Además, el Compuesto B pareció ser efectivo en la normalización de la respuesta inmune, como demostró la reducción del recuento de neutrófilos en sangre, la normalización de poblaciones de linfocitos en sangre y la normalización de la población de células T CD4⁺ en el bazo. También se observó un efecto similar del Compuesto B en el modelo de endotoxin-induced uveitis (uveítis inducida por endotoxina - EIU) aguda. El Compuesto B (1 mg/kg/día suministrado por minibomba osmótica) inhibió significativamente la exudación de proteínas en el humor acuoso de las ratas con EIU, en comparación con los controles en ratones no tratados o tratados con vehículo (salino) (Figura 9). El aumento de los neutrófilos en sangre y la disminución de las poblaciones de linfocitos en sangre como resultado de la estimulación LPS se normalizó significativamente con el Compuesto B, pero no con el vehículo de tratamiento (Figura 10).

Un estudio de transferencia adoptiva en un modelo de enfermedad del ojo seco muestra que el efecto del agonista α_{2B} sobre la inflamación ocular implica células T. Después de 10 días de tensión de desecación inducida por soplador en ratones tratados con 3 mg/kg/día de Compuesto B o vehículo (3 días de dosificación de TID por vía oral seguidos de dosificación por minibomba osmótica), se cosecharon las células T CD4+ y se transfirieron a ratones singénicos desnudos. Los ratones receptores que recibieron las células T de ratones tratados con el Compuesto B (durante 10 días durante la exposición al soplador) presentaban niveles significativamente reducidos de citocinas IL-17 y TNF α , citocinas clave que contribuyen a la enfermedad del ojo seco (Figura 11). El Compuesto B también se probó en un modo terapéutico, donde el tratamiento (3 mg/kg/día mediante minibomba osmótica) se suministró a ratones que habían sido expuestos al soplador anteriormente. En este modo, el Compuesto B también evitó significativamente la pérdida de células caliciformes y la infiltración de células T en la conjuntiva comparable a la ciclosporina A (Figura 12). Estos estudios sostienen la hipótesis de que el mecanismo del Compuesto B, el Compuesto C y otros agonistas α_{2B} implican la modulación inmunitaria.

Métodos

15 Modelo de ligadura del nervio espinal en ratas

El modelo SNL (o Chung) en ratas es un modelo animal estándar aceptado de dolor neuropático y se cree que imita la causalgia en humanos con respecto a los síntomas (comportamiento de protección, alodinia mecánica) y el alivio mediante agentes farmacológicos. Por ejemplo, la morfina no mitiga la alodinia táctil, mientras que la gabapentina (30 mg/kg por vía oral) da como resultado 50 % de mitigación de la alodinia. El modelo SNL se realiza ligando estrechamente los nervios espinales L-5 y L-6, lo que produce alodinia táctil o sensibilidad al tacto ligero como se describe (Kim y Chung, 1992). Ratas macho Sprague Dawley (100-120 gramos); Charles River, Wilmington, MA) fueron anestesiadas mediante la inhalación de una mezcla de isoflurano y oxígeno. La zona quirúrgica se afeitó y se preparó con peróxido de hidrógeno. Se hizo una incisión de la vértebra torácica XIII hacia el sacro. El músculo se separó de la vértebra espinal (lado izquierdo) en los niveles L4-S2. Se ubicó la vértebra L6, tras lo cual el proceso transversal se retiró cuidadosamente con unas pequeñas pinzas para identificar visualmente los nervios espinales L4 - L6. Los nervios espinales L5 y L6 se aislaron y se ligaron estrechamente con hilo de seda 6-0. Se confirmó una homeostasis completa y, después, la herida se suturó. La duración de la cirugía fue de aproximadamente 20 minutos. Se aplicó una pequeña cantidad de ungüento antibiótico a la zona de la incisión y se transfirió a los animales a una jaula plástica de recuperación bajo una lámpara de temperatura regulada. Los animales no recibieron ningún anestésico tópico o local postoperativo, pues ello habría inhibido el desarrollo del síndrome del dolor, que es el fenómeno que se deseaba estudiar.

La alodinia se cuantificó en los animales que recibieron la cirugía Chung por estimulación con una serie de 8 pelos de Von Frey en el área media de siembra de la pata trasera quirúrgica de arriba hacia abajo, como se describe en la literatura (Dixon, 1980). Los pelos de Von Frey se aplican de arriba hacia abajo en función de la respuesta hasta que se establece el umbral de 50 %. Los pelos de Von Frey se aplican a la superficie plantar de la pata quirúrgica con una fuerza suficiente para doblarlos. Se registra una respuesta positiva si la pata se retira de forma repentina. Se usaron ocho pelos de Von Frey (3,61, 3,84, 4,08, 4,31, 4,56, 4,74, 4,93 y 5,18) produciendo una fuerza de milinewtons (gramos) de 2,45-147 mN (0,25-15 gramos).

Análisis de Von Frey:

$$\% \text{ de inversión de alodinia} = \left[\frac{\text{Después del umbral del fármaco} - \text{Antes del umbral del fármaco}}{15 - \text{Antes del umbral del fármaco}} \right] \times 100$$

Media \pm MEB:

Media = promedio de reversión de alodinia
MEB = STDEV/ raíz SQ de n

La prueba con compuestos se realiza 2-3 semanas después de la cirugía para establecer la alodinia estable. En todos los animales de laboratorio, se tomaron las mediciones de referencia antes de la administración de fármacos y después a 24 horas y 5-23 días tras la dosificación con minibomba osmótica Alzet. El investigador desconocía la identidad de los grupos de fármacos. El % de inversión de alodinia se calcula como: [(Umbral postfármaco - Umbral prefármaco)/(15-Umbral prefármaco)] x 100.

55 Encefalomiелitis autoinmune experimental inducida por proteolipidos en ratones

El modelo de ratones en experimental autoimmune encephalomyelitis (encefalomiелitis autoinmune experimental - EAE) se ha utilizado ampliamente para comprender los mecanismos que subyacen a la inmunopatogénesis de MS. Los ratones inmunizados con proteínas de mielina, tales como la Myelin Binding Protein (Proteína de unión de mielina - MBP), la Proteo-Lipid Protein (Proteína proteolipídica - PLP) y la Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (Mielina de oligodendrocitos glicoproteína - MOG), presentan muchas semejanzas respecto a los pacientes que padecen MS (Friese y col., 2006). Los componentes del sistema inmunológico, incluidos las células T, los macrófagos y los anticuerpos, son contribuyentes

importantes a la destrucción de la mielina en ratones con EAE. Además, la inflamación también da origen a regiones multifocales de desmielinización que culmina en signos clínicos de disfunción neurológica que incluyen la pérdida de tono en la cola, el desplazamiento anormal y la parálisis de extremidad trasera de parcial a completa. El modelo EAE inducido por PLP ofrece la capacidad de investigar simultáneamente los mecanismos patógenos de la inflamación y desmielinización del SNC y el dolor asociado a MS, un concepto de múltiples objetivos que se ha optimizado aquí en Allergan. Utilizando péptido de mielina de proteína proteolípida (PLP) por técnica estéril (139-159: CHCLGKWLGHDPKDFVGYAL), se mezcla al 1:1 con incomplete Freund's adjuvant (adyuvante de Freund incompleto - IFA) (concentración final de 2 mg/ml de PLP). Se inyecta por vía subcutánea a ratones hembra SJL de 8-10 semanas de edad (Taconic) con 100 μ l de PLP/IFA (200 μ g de PLP/inyección) tanto en el flanco posterior derecho como el izquierdo (día 0) utilizando una aguja de 26 G. Los ratones inmunizados con este protocolo experimentan una trayectoria clínica de recidiva-remisión con episodios de deterioro motor intercalados con períodos de remisión/mejora clínica. Además, estos ratones presentan un resistente fenotipo del dolor que es más pronunciado durante los períodos de remisión clínica.

Con este protocolo, la aparición de la EAE inducida por PLP en ratones SJL se produce a una incidencia de (~90 - 100 %) y, generalmente, resulta evidente unos 12 días después de la inmunización, alcanzando el pico de la enfermedad a los 14-21 días. Los ratones con EAE inducida por PLP presentan síntomas físicos de deterioro neurológico, que van de la pérdida parcial de la tonicidad de la cola hasta la parálisis de la extremidad posterior de parcial a completa. Hasta 75 % de los ratones experimenta una trayectoria clínica de recidiva-remisión con períodos de remisión flanqueados por episodios de deterioro motor (debilitación y parálisis de la extremidad posterior). Histológicamente, los ratones presentan una amplia inflamación dentro de tractos de materia blanca (áreas que contienen axones mielinizados) del cerebro y la médula espinal, infiltración progresiva y acumulación de células inflamatorias, desmielinización y pérdida axonal. Los ratones con EAE severa muestran gran infiltración celular y focos extendidos de desmielinización. Los ratones inmunizados por PLP exhiben, típicamente, la enfermedad clínica más severa durante el primer episodio de deterioro neurológico (días 14-21). En general, el fenotipo del dolor es más pronunciado a partir de la remisión después del evento inicial de desmielinización y se mantiene hasta la eutanasia de los ratones.

Los ratones se puntuaron visualmente de forma rutinaria respecto a anomalías en el comportamiento en una escala de 0 a 5; 0-sin anomalías, 1-pérdida parcial de la tonicidad de la cola (cola parcialmente débil), 2-pérdida de la tonicidad de la cola y debilidad de la extremidad posterior, 3-marcha inestable y parálisis parcial de la extremidad posterior, 4-parálisis completa de la extremidad posterior y 5-moribundos o muertos. La puntuación se llevó a cabo cada dos o tres días a partir del séptimo día después de la inmunización hasta que se sacrificó a los ratones. La alodinia se midió mediante el método de pelos de Von Frey, como se ha descrito anteriormente. Al final del estudio, el bazo, el nodo linfático cervical, la médula espinal y el cerebro se recolectaron para realizar la citometría de flujo.

Desiccating Stress (Tensión de desecación - DS) seca en ratones

Se adquirió C57BL/6 (C57BL/6NTac) y B6.Cg/NTac-Foxn1nuNE9 suministrados por Taconic, Inc. (Germantown, NY). Los ratones se usaron a las 6-10 semanas de edad. El Comité de Cuidado y Uso Animal de Allergan autorizó el estudio en animales. Todos los estudios cumplieron con la declaración de la Asociación de investigaciones en visión y oftalmología para el Uso de animales en investigaciones oftálmicas y de visión. Como se describe en la literatura, el ojo seco se indujo tratando a los ratones con inyecciones subcutáneas de bromhidrato de escopolamina (0,5 mg/0,2 ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) tres veces al día alternando entre los flancos izquierdo y derecho (Neiderkorn y col., 2006). Los ratones se colocaron en una jaula con pantallas de plástico perforadas en cada lado de la jaula para permitir el flujo del aire procedente de ventiladores (un ventilador en cada lado de la jaula) durante 16 horas/día en una campana (AirClean Systems, Raleigh, NC). La humedad ambiental se mantuvo por debajo de 40 %. Desiccating Stress (Tensión de desecación - DS) se indujo durante 10 días consecutivos. Se recogieron bazos y cervical lymph nodes (nódulos linfáticos cervicales - CLN) de ratones sometidos a DS y NS y se transfirieron células CD4⁺ de bazo o CLN de donante equivalente a ratones singénicos desnudos. Un equivalente de bazo a células T fue igual a 5×10^7 células. Tres días después se recolectaron muestras para su análisis. Para la recolección de desgarramiento, se colocó 1,5 μ l de PBS en cada ojo y, después, se recolectó 1 μ l de desgarro de ambos ojos y se colocó en 8 μ l de tampón de citocina de ensayo (Beadlyte; Millipore, Billerica, MA). El tampón y el fluido lagrimal se recolectaron por acción capilar con un tubo capilar de vidrio de 1 μ l de volumen (Drummond Scientific, Broomhall, PA) que se colocó en el menisco desgarrado del canto lateral. Las muestras se congelaron a -80 °C hasta el momento del ensayo. Se realizó un análisis histológico mediante la tinción de las muestras de la glándula lacrimal con anticuerpo a CD4 y tinción de hematoxilina y eosina para cuantificar las células calciformes y las células T en la conjuntiva. Para probar los compuestos en un modo terapéutico, los animales se exponen a tensión de desecación durante dos semanas, a lo que sigue un período de reposo de 7 días en jaulas de alojamiento normales. Después, los animales se vuelven a exponer a tensión de desecación durante 7 días más para imitar la forma de recidiva de la enfermedad crónica del ojo seco. El tratamiento con el Compuesto B se inició 2 días antes de la nueva exposición a la tensión de desecación. En ambos estudios del Compuesto B, se dosificó a 3 mg/kg/día. Se realizó la transferencia adoptiva, el análisis de citocinas por desgarre y el análisis histológico, como se describe anteriormente.

Uveoretinitis anterior autoinmune experimental en ratas

Se inmunizó a ratas macho Lewis (180-200 g) por medio de una única inyección en la almohadilla plantar trasera izquierda con 150 μ g (en 100 μ l) de un complejo MAA purificado de ojo bovino. Las proteínas MAA se suspendieron en solución salina fosfatada y tamponada (PBS, pH 7,2) y emulsionada (1:1 v/v) en complete Freund's adjuvant

(adyuvante completo de Freund - CFA; VWR Scientific) con 1 µg/100 µL de mezcla de emulsión de la Pertussis Toxin (PTx) (Toxina Pertussis - PT). Se inyectó a los animales de control con PBS emulsionado con CFA y PT.

5 La evaluación de la inflamación intraocular se llevó a cabo en el día 7 después de la inmunización, los animales se examinaron cada dos días entre los días 7 y 19 después de la inmunización, observando los signos clínicos y síntomas de uveítis mediante el uso de microscopio con lámpara de hendidura. El humor acuoso se recolectó para evaluar el número de células inflamatorias y los niveles de proteína. Se realizaron recuentos de células con 10 uL y un hemacitómetro bajo el microscopio óptico. La concentración de proteína se midió con una solución de proteínas de ensayo Bio-Rad usando BSA como la proteína estándar. Los niveles de citocina proinflamatoria y quimocina se midieron en Luminex (Biosource-Invitrogen, Carlsbad, CA). La sangre, el bazo y los ojos se cosecharon en los días 11, 14 y 19 para determinar la diferenciación de leucocitos en sangre y el estado de activación de las células T del bazo por citometría de flujo, así como la histopatología.

15 Uveítis inducida por endotoxinas en ratas:

Las ratas hembra Lewis (180-200 gramos) se adquirieron del Charles River Laboratory. Se inyectó a las ratas en la almohadilla plantar (lado izquierdo posterior) con 100 µl de solución de 1 mg/ml LPS (Sigma) (en solución salina estéril sin pirógenos) o 150 µl de solución salina estéril libre de pirógenos. Los animales se sacrificaron 24 horas después de la inyección de LPS. Se recolectó el humor acuoso y se analizó para determinar el recuento de células inflamatorias, la concentración de los niveles de citocinas y quimocinas, así como el total de concentraciones de proteína. También se determinó la diferenciación de leucocitos en sangre y la histopatología cuando fue necesario.

Formulaciones:

25 El Compuesto A se formuló en DMSO a 50 % (Sigma, St. Louis, MO). Esta solución se cargó en las minibombas osmóticas (modelo 1007D, Alzet Corp., Palo Alto, CA) configuradas para suministrar el fármaco a una velocidad de 0,5 mm³/h (0,5 uL/h), dando como resultado una dosis final de 2,4 mg/kg/día. El vehículo para estos estudios es DMSO a 50 % administrado por minibombas osmóticas a una velocidad de 0,5 mm³/h/kg (0,5 uL/h/kg).

30 El Compuesto B se formuló en DMSO a 50 % (sulfóxido de dimetilo; Sigma, St. Louis, MO). Esta solución se dosificó por vía oral TID en una dosis de 0,3 o 1 mg/kg. Para la dosificación en las minibombas osmóticas (modelo 1007D, Alzet Corp., Palo Alto, CA), el compuesto se cargó en las bombas configuradas para suministrar una dosis final de 1 o 3 mg/kg/día. El vehículo para estos estudios es DMSO a 50 %.

35 El Compuesto C se formuló primero en DMSO a 100 % (Sigma, St. Louis, MO), después se diluyó en DMSO a 30 % para una solución de 10 mg/ml; DMSO a 15 % para una solución de 3 mg/ml y diluciones posteriores en agua. El compuesto se dosificó por vía oral TID en una dosis de 0,3 o 1 mg/kg para una dosis diaria total de 1 o 3 mg/kg/día, respectivamente.

Citometría de flujo

40 Las células de nódulos linfáticos cervicales y las células de bazo se obtuvieron mediante un procesamiento mecánico moderado. Se aislaron células CD4⁺ utilizando una columna de aislamiento CD4⁺ (Miltenyi Biotech, Auburn, CA), según el protocolo del fabricante. El cerebro y la médula espinal se dividieron mecánicamente y las células mononucleares de SNC se aislaron usando Percoll a 37,5 % (Sigma-Aldrich).

45 Para determinar la expresión superficial de CD4 (células T auxiliares), CD8 (células T asesinas), CD25 (células T auxiliares y células T reguladoras activadas), CD45 (células macrófagas y microgliales) y F4/80 (células macrófagos y microgliales), se incubó 5 x 10⁵ células/100 µl de tampón FACS (PBS, 0,02 % de Azida de sodio [Sigma-Aldrich] y 2 % de albúmina de suero bovino) con anticuerpos adecuados de BD Biosciences, Mountain View, CA. Se usaron anticuerpos de control de isotipo para cada uno de los anticuerpos. Las células se lavaron dos veces en tampón FACS y se volvieron a suspender en 5 x 10⁵ células/100 µl de tampón. Los tubos que contenían anticuerpo marcado con biotina recibieron 1,5 µl de un pigmento de tinción adicional (Streptavidin PerCP; BD-Pharmingen) y se colocaron en hielo durante 20 minutos en la oscuridad. Se analizó la expresión (FACScalibur con el software CellQuest; BD Biosciences, Mountain View, CA).

55 Análisis de citocinas Luminex

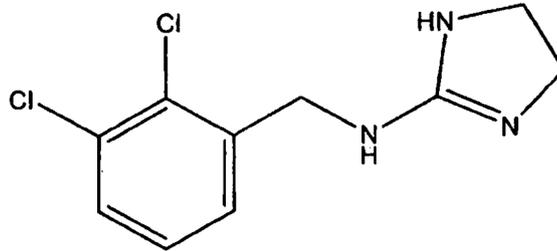
Los niveles de citocinas se midieron con un ensayo de inmunoesferas sensibles, fluorescentes y multiplexares (Luminex; Biosource-Invitrogen, Carlsbad, CA). Se usó un panel de citocina/quimocina de 9 plexos para ratas (RCYTO-80K-09) de Millipore. Los niveles de citocinas en las muestras se analizaron utilizando los correspondientes pares de citocinas de Millipore. Para el ensayo de Luminex, se humedeció previamente una placa de filtro de 96 pocillos (Millipore) con 25 µl de tampón de ensayo de citocina Beadlyte. Se usó un colector al vacío (Millipore, Billerica, MA) para aspirar el tampón de los pocillos. Se colocó 25 µl de muestra en cada pocillo. Las esferas (25 µl) se pipetearon dentro de los pocillos. Las curvas estándar para cada citocina se generaron por duplicado al colocar 25 µl de la dilución adecuada de estándares comprados a Millipore. La placa se incubó durante la noche con agitación suave en la oscuridad a 4 °C. Las esferas se lavaron con tampón de ensayo de citocina Beadlyte (Millipore) y el tampón de lavado se eliminó mediante el uso de un colector al vacío. Se añadieron 25 µl del

5 anticuerpo secundario adecuado conjugado con biotina (Millipore) en cada pocillo durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Las esferas se incubaron con estreptavidina ficoeritrina Beadlyte (dilución al 1:25 en tampón de ensayo Beadlyte) durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Las esferas se lavaron, se volvieron a suspender en 125 μ l de tampón Beadlyte y se analizaron mediante el instrumento Luminex 100 (Luminex Corporation, Austin, TX). Las intensidades de fluorescencia media obtenidas de las 50 esferas por cada mínimo de citocinas se analizaron con el uso del programa informático Upstate Beadview. Se generaron curvas estándar (8 puntos de datos incluido un patrón estándar cero por duplicado) utilizando cuatro (o cinco) curvas logísticas paramétricas. Los valores R al cuadrado fueron de entre 0,99 y 1. Los datos se expresan en pg/ml o ng/ml.

REIVINDICACIONES

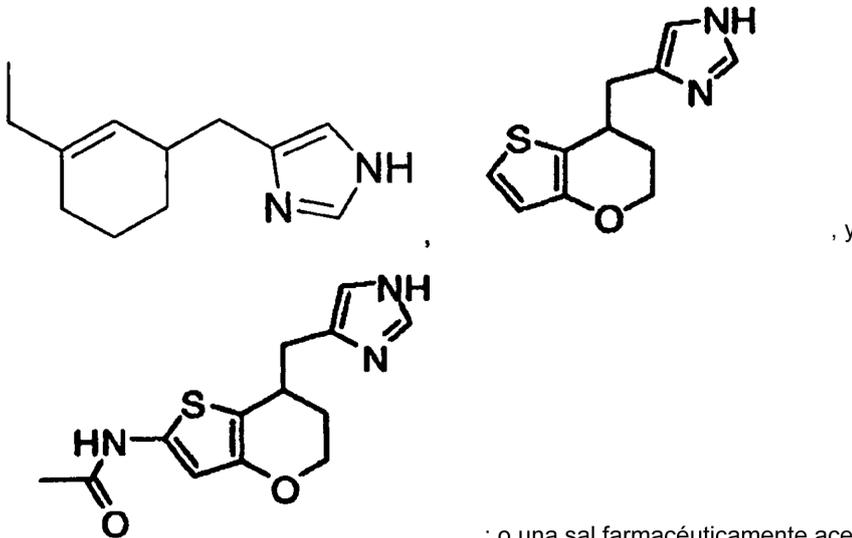
1. Un agonista del receptor alfa 2B para usar en un método para tratar la enfermedad del ojo seco, en donde el agonista alfa 2 se selecciona del grupo que consiste en:

5 i) una imidazolina, en donde dicha imidazolina es un compuesto de la fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

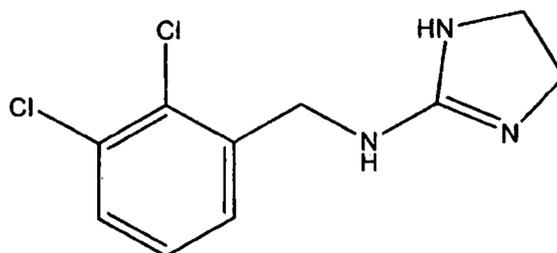
- 10 ii) un imidazol, en donde el imidazol es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

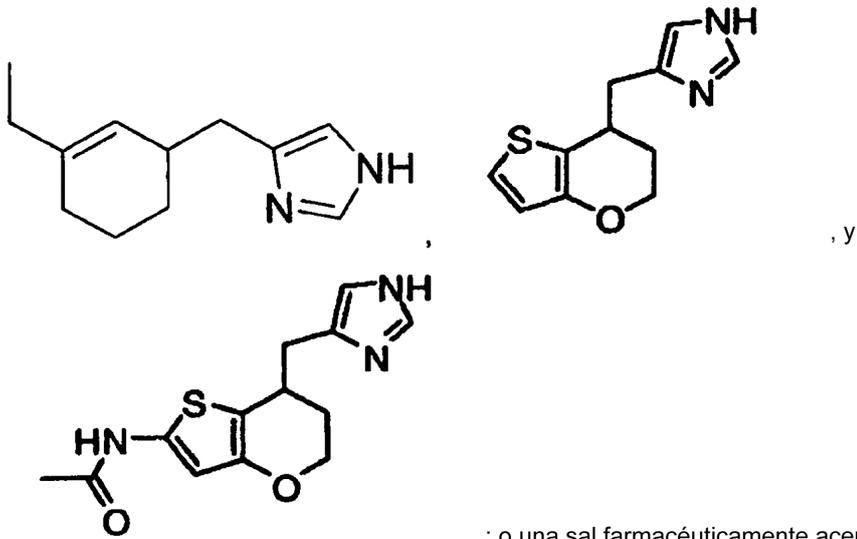
- 15 2. Un agonista del receptor alfa 2 que carece de actividad agonista del receptor alfa 2A significativa para usar en un método para tratar la enfermedad del ojo seco, en donde el agonista alfa 2 se selecciona del grupo consistente en:

i) una imidazolina, en donde dicha imidazolina es un compuesto de la fórmula



20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

- ii) un imidazol, en donde el imidazol es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



3. El agonista de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el agonista está adaptado para un período de administración inicial, y después un segundo período de administración tras haber transcurrido un período de retirada.
4. El agonista de la reivindicación 3 para el uso de la reivindicación 3, en donde los períodos inicial, segundo, y de retirada son de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, o catorce días, o una, dos, tres, o cuatro semanas.

Figura 1

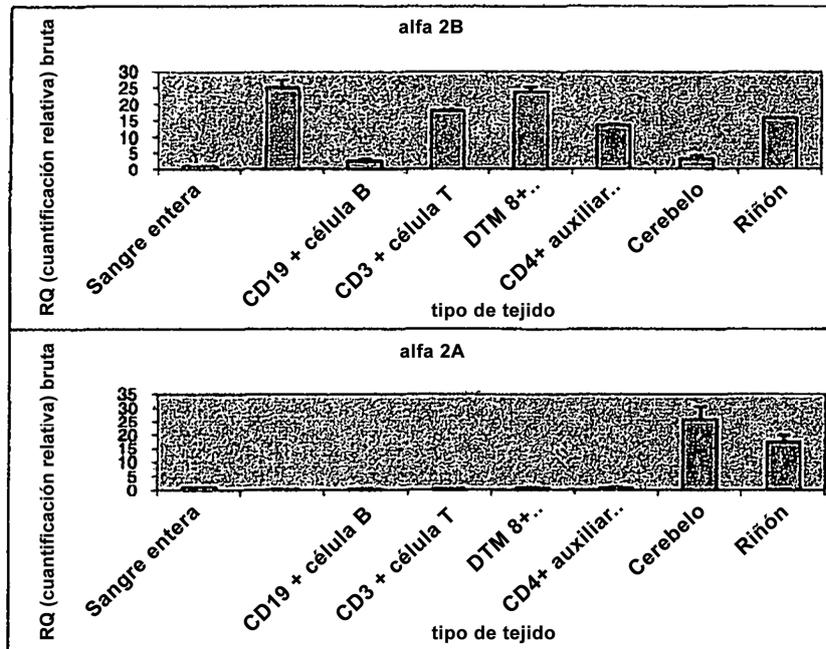


Figura 2

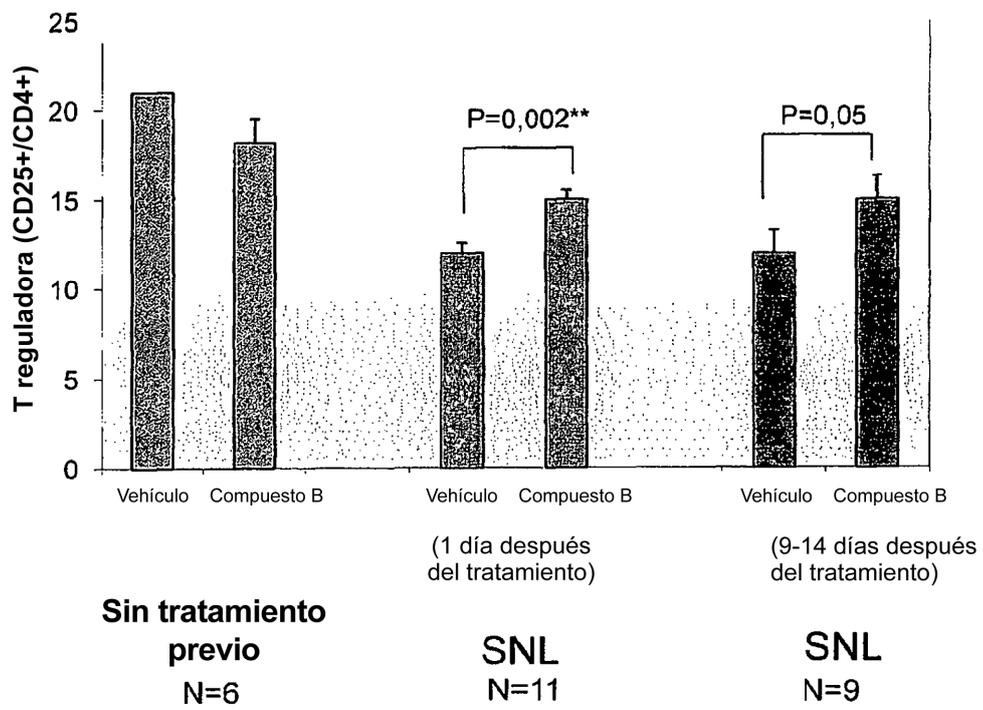
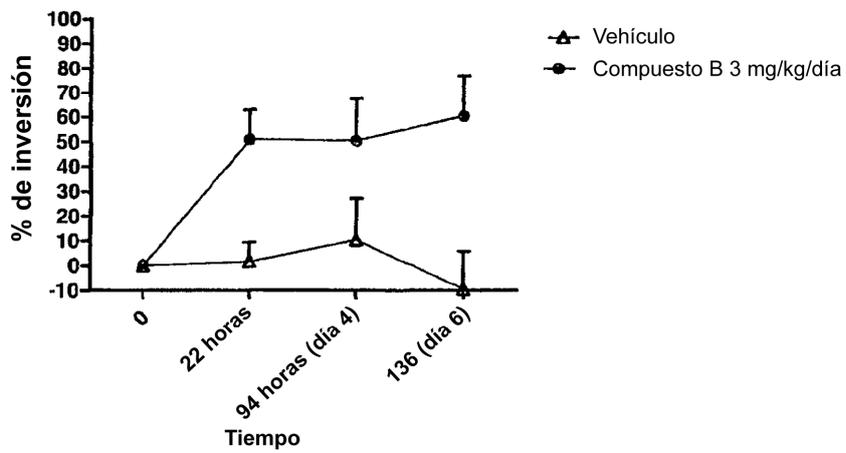
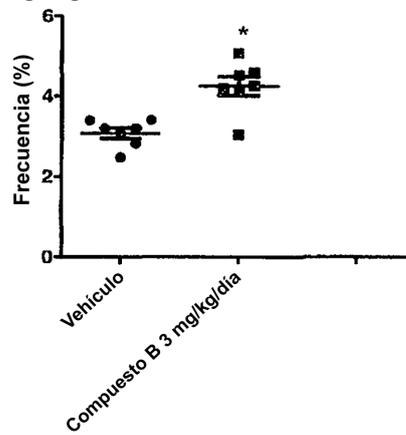


Figura 3



Frecuencia de células T CD4+ que son CD25hi (T reguladoras) dentro de los ganglios linfáticos cervicales



* $p < 0,01$ en comparación con el vehículo, ANOVA unidireccional con prueba posterior de Bonferroni

Figura 4

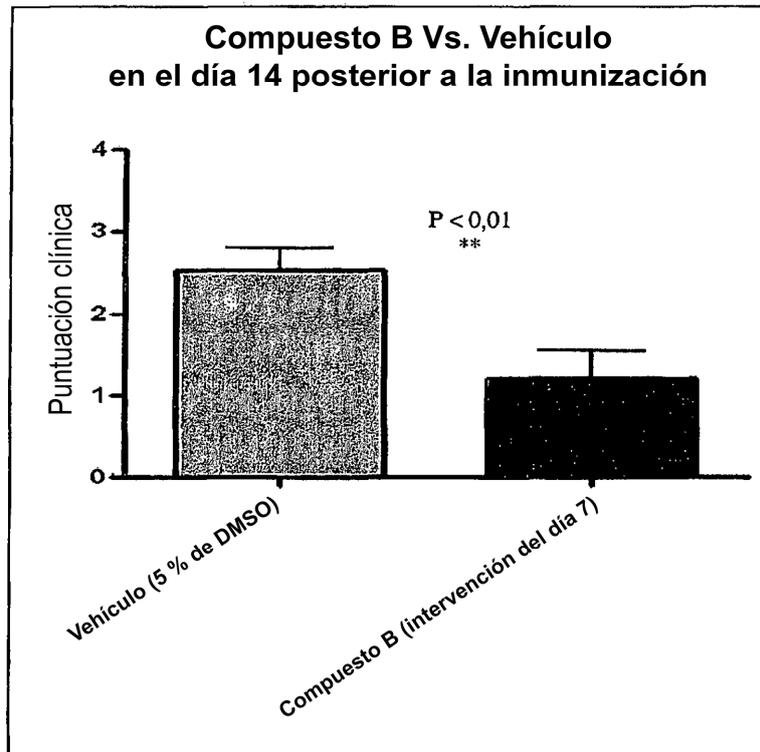
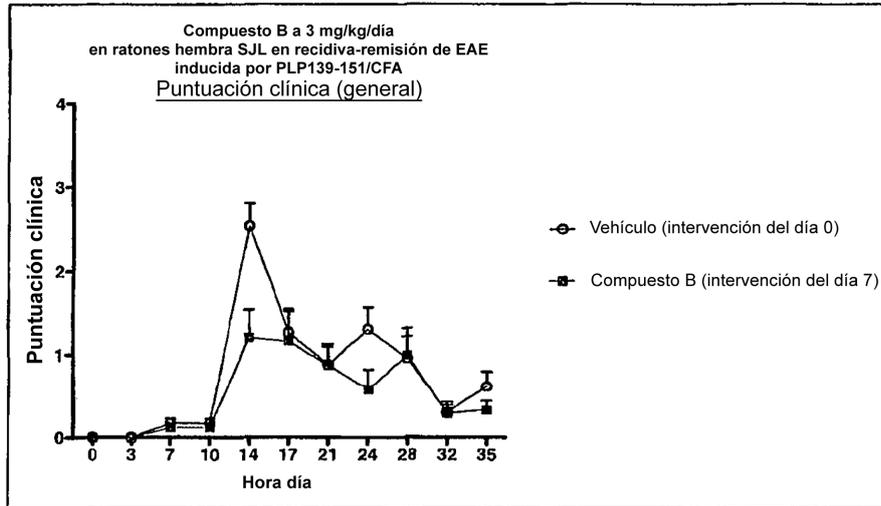


Figura 5

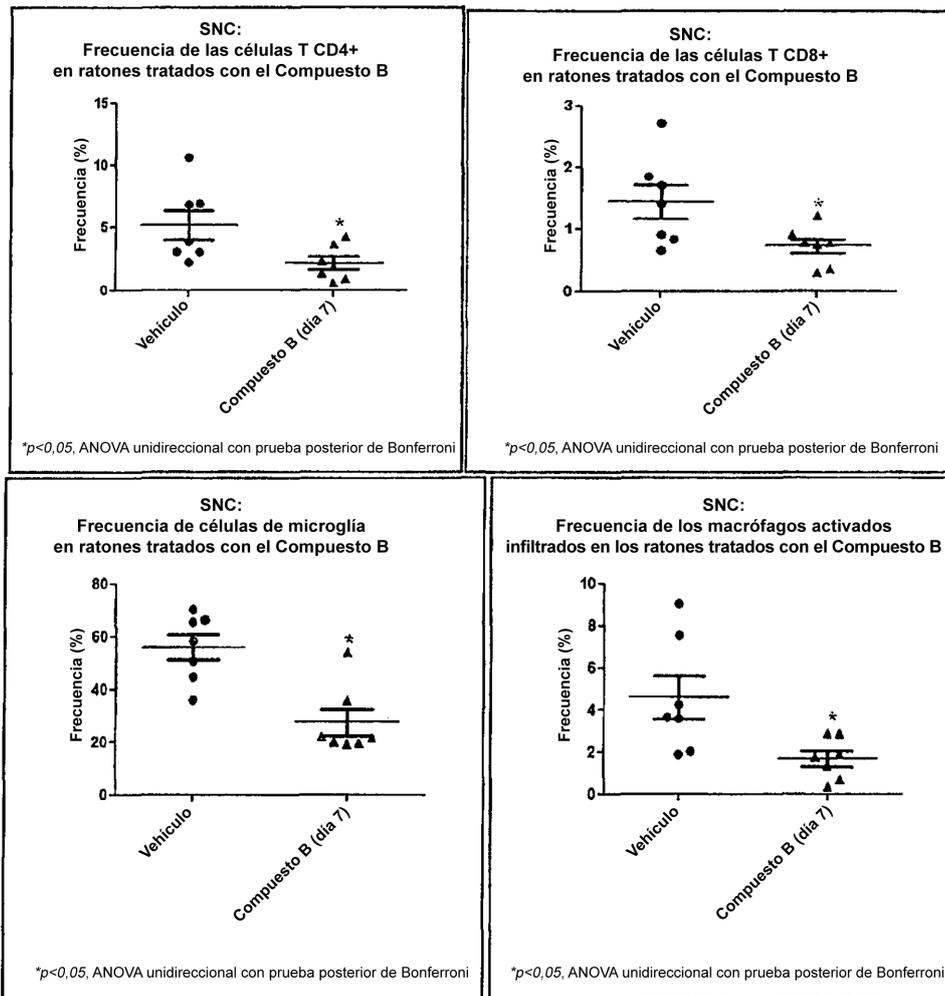


Figura 6

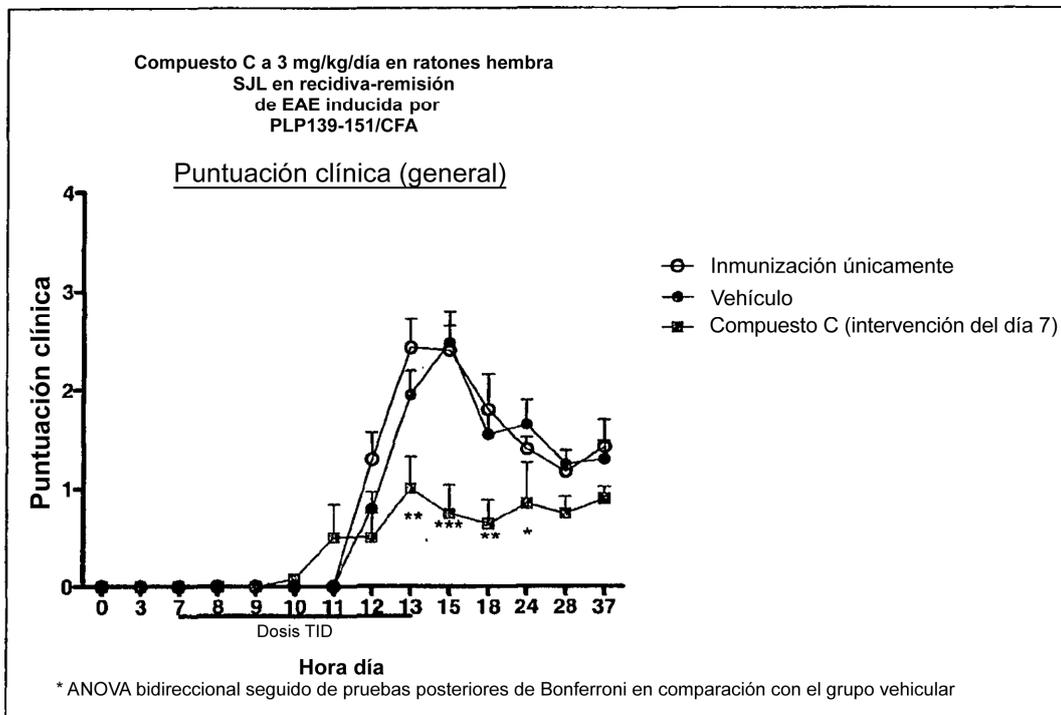


Figura 7

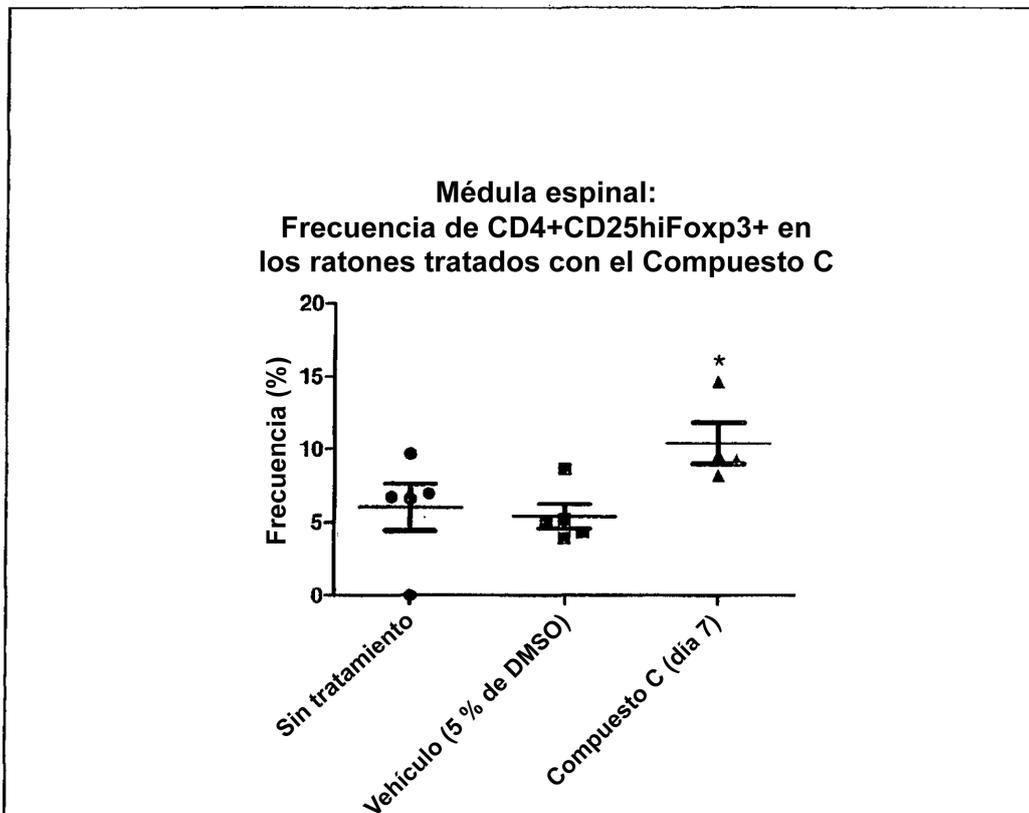


Figura 8

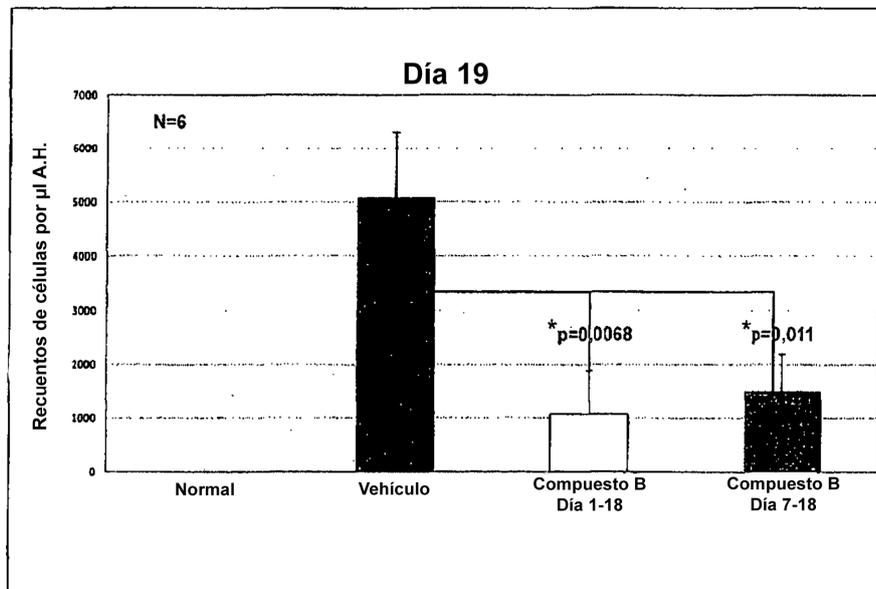
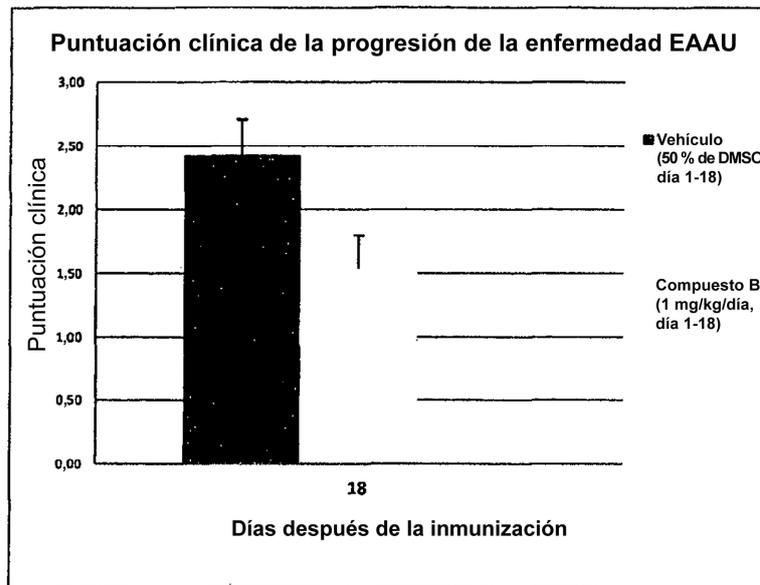


Figura 9

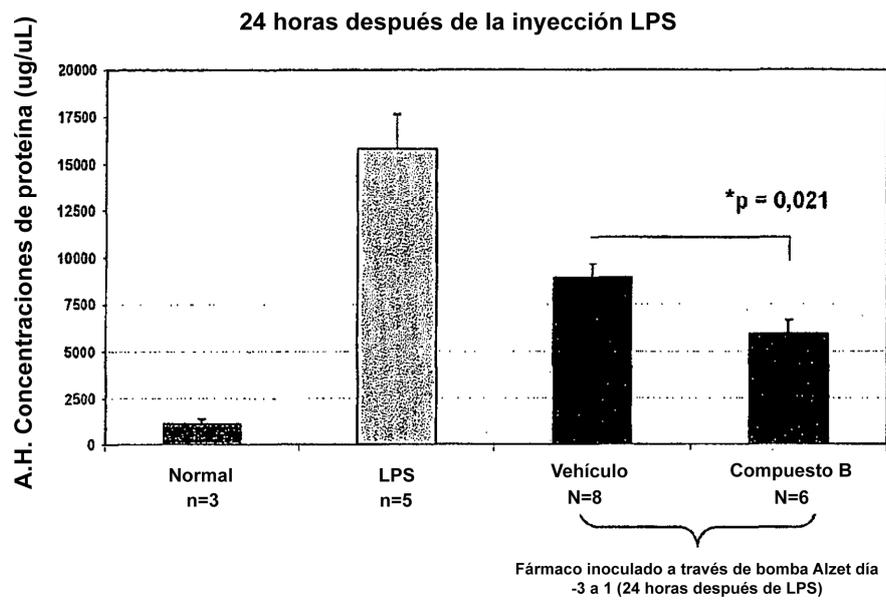


Figura 10

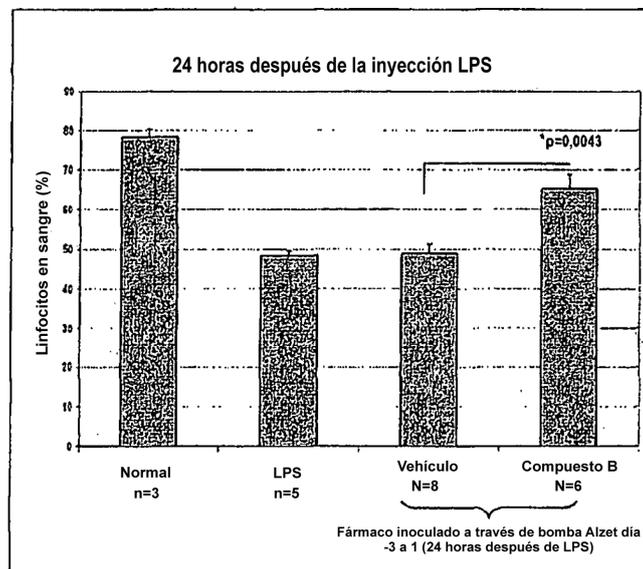
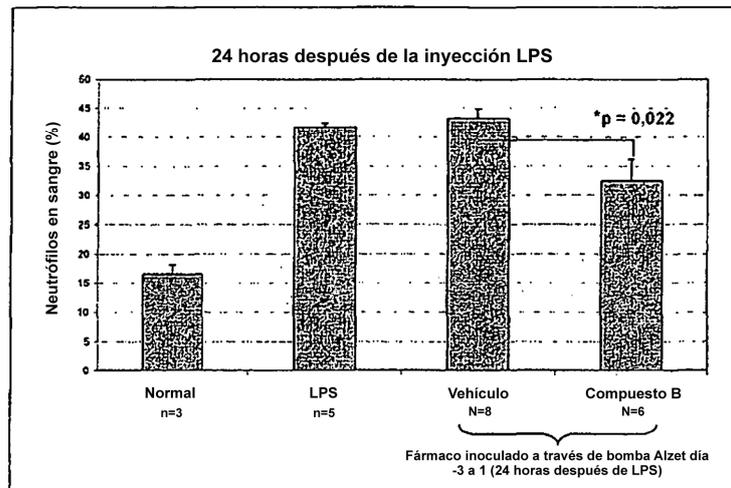


Figura 11

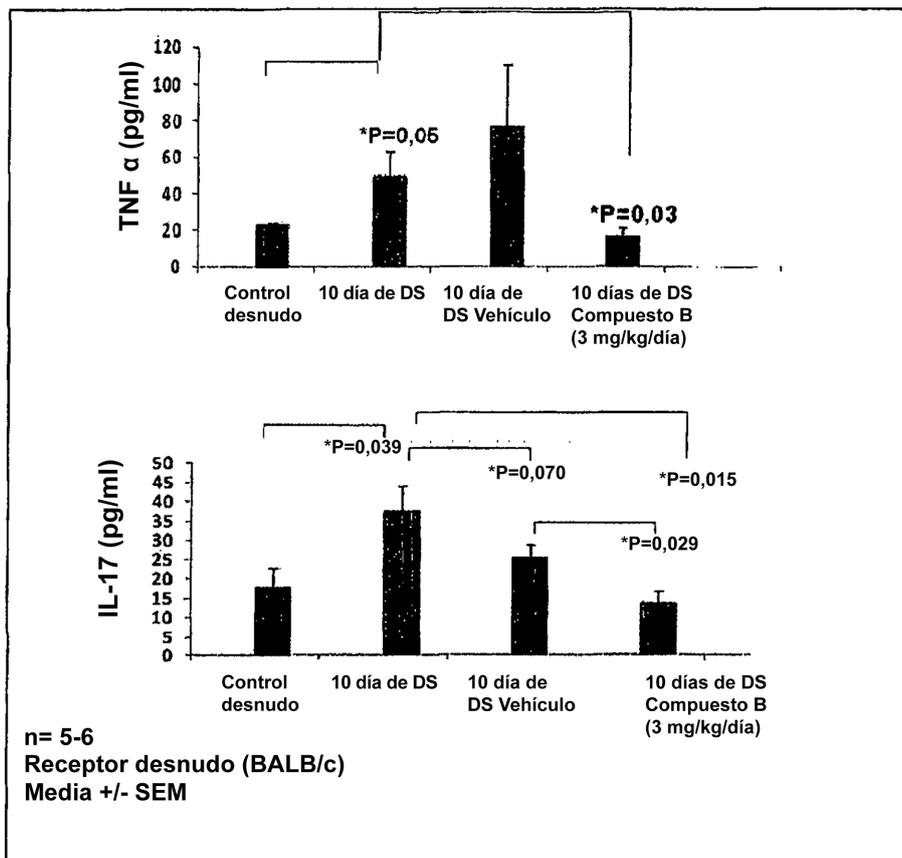


Figura 12

