

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 379**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2015 PCT/IB2015/051932**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15140701**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2015 E 15714032 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 3119780**

54 Título: **Derivados de ácido azaindol acético y su uso como moduladores del receptor de prostaglandina D2**

30 Prioridad:

18.03.2014 WO PCT/IB2014/059927

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

11.02.2019

73 Titular/es:

**IDORSIA PHARMACEUTICALS LTD (100.0%)
Hegenheimermattweg 91
4123 Allschwil, CH**

72 Inventor/es:

**AISSAOUI, HAMED;
BOSS, CHRISTOPH;
BOUIS, PATRICK;
HAZEMANN, JULIEN y
SIEGRIST, ROMAIN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 699 379 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de ácido azaindol acético y su uso como moduladores del receptor de prostaglandina D₂

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a derivados de ácido azaindol acético de fórmula (I) y a su uso como moduladores del receptor de prostaglandina, de manera más particular como moduladores del receptor de prostaglandina D₂ (“receptor PD”), en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos mediadas por prostaglandina, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos y a procedimientos para su preparación. En particular, dichos derivados pueden utilizarse solos o en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades/trastornos alérgicos/inmunes tanto crónicos como agudos tales como asma, asma alérgica, asma eosinofílica, asma grave, rinitis, rinitis alérgica, angioedema, alergia a veneno de insecto, alergias a fármacos, sinusitis alérgica, nefritis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial, alergia a alimentos, trastornos de mastocito sistémicos, choque anafiláctico, urticaria, eczema, colitis ulcerante, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria del intestino y artritis reumatoide; enfermedades relacionadas con eosinófilos que comprenden vasculitis de vaso sanguíneo pequeño tal como síndrome de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener, poliangiitis microscópica (y subconjuntos específicos de órgano de esta última), síndromes hipereosinofílicos tal como neumonía eosinofílica, esofagitis eosinofílica, esofagitis de reflujo, endocarditis eosinofílica (endocarditis de Loeffler), síndrome de eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, foliculitis pustulosa eosinofílica (enfermedad de Ofuji), úlceras eosinofílicas, hiperplasia angioliñoide con eosinofilia (ALHE por sus siglas en inglés), celulitis eosinofílica (síndrome de Wells), leucemia eosinofílica crónica y síndrome DRESS (Erupción cutánea por fármaco con eosinofilia y síntomas sistémicos (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms)); y enfermedades relacionadas con basófilos, que comprenden leucemia basofílica y leucocitosis basofílica.

Antecedentes de la invención

25 Como una respuesta a la exposición a alérgenos en condiciones alérgicas, los mastocitos se activan y liberan mediadores como histamina, tromboxano A₂ (TxA₂), cisteinil-leucotrienos (CysLTs) y prostaglandina D₂ (PGD₂). Estos mediadores interactúan con sus receptores respectivos y causan efectos fisiológicos tales como permeabilidad vascular aumentada, edema, prurito, congestión nasal y pulmonar, broncoconstricción, y secreción de moco. Una permeabilidad vascular aumentada por ejemplo, permite infiltración excesiva de leucocitos eosinofílicos y basofílicos en el tejido y por lo tanto amplifica la respuesta alérgica.

30 Los tratamientos actuales de enfermedades alérgicas comprenden agentes que pueden bloquear o de algún otro modo interrumpir dichas interacciones, por ejemplo antihistamínicos (antagonistas del receptor de histamina H₁), antagonistas del receptor de leucotrieno, agonistas del receptor beta-adrenérgico y corticosteroides. En términos generales, los tratamientos con antihistamínicos y antagonistas de leucotrieno están limitados en eficacia, y el uso a largo plazo de corticosteroides con frecuencia está asociado con efectos secundarios indeseados.

35 PGD₂ es un agonista que se sabe actúa sobre dos receptores acoplados a proteína G, el receptor de PGD₂ DP₁ y el receptor recientemente identificado CRTH₂ (molécula homóloga a receptor quimioatrayente expresada en células Th₂) (también referido como “receptor DP₂”).

40 Se considera que los niveles elevados de PGD₂ causan inflamación tal como se observa en enfermedades alérgicas tales como rinitis alérgica, asma alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica y similares. Por lo tanto, el bloqueo de la interacción de PGD₂ con sus receptores es considerado como una estrategia terapéutica útil para el tratamiento de dichas enfermedades.

45 El documento GB 2388540 desvela el uso de ramatrobán (ácido (3*R*)-3-(4-fluorobencen-sulfonamido)-1,2,3,4-tetrahidro-carbazol-9-propiónico), un antagonista del receptor de TxA₂ (también referido como “receptor TP”) con actividad antagonista adicional sobre CRTH₂, para la profilaxis y tratamiento de enfermedades alérgicas, tales como asma, rinitis alérgica o conjuntivitis alérgica. En T. Ishizuka y col., *Cardiovascular Drug Rev.* 2004, 22(2), 71-90 se describen los efectos de ramatrobán sobre la inflamación de fase tardía. Asimismo, se ha informado la biodisponibilidad oral de ramatrobán y su capacidad para inhibir la migración de eosinófilos inducida por prostaglandina D₂ *in vitro* (*Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305(1), p.347-352 (2003)).

50 Los derivados de ácido azaindol acético con actividad antagonista de CRTH₂ han sido descritos en los documentos WO 2010/054113, WO 2010/054114 y en B.A. Stearns y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 4647-4651.

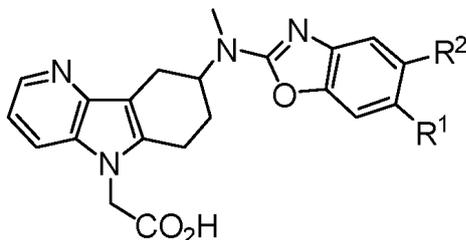
Los documentos WO 2011/117798 y WO 2012/140612 describen derivados del ácido (3-heteroarilamino-1,2,3,4-tetrahidro-9H-carbazol-9-il)-acético y del ácido (7-heteroarilamino-6,7,8,9-tetrahidropirido[1,2-*a*]indol-10-il)acético, respectivamente, cuyos derivados tienen actividad antagonista de CRTH₂.

55 Actualmente se ha descubierto de manera sorprendente que los derivados particulares de ácido azaindol acético sustituidos con un grupo benzoxazol-2-ilamino halogenado tienen propiedades significativamente mejoradas en una prueba de citotoxicidad *in-vitro* en hepatocitos de rata cultivados primarios. Por lo tanto se espera que los presentes

compuestos tengan un perfil de toxicidad mejorado *in-vivo*.

Descripción de la invención

1) La presente invención se refiere a derivados de ácido azaindol acético de la fórmula (I),



(I)

5 en la que

uno de R¹ y R² representa hidrógeno y el otro representa halógeno;
y a las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

10 Se pretende que las definiciones proporcionadas en el presente documento se apliquen de manera uniforme a los compuestos de fórmula (I) como se define en cualquiera de las realizaciones 1) a 13), y, cambiando lo que se tenga que cambiar, a través de toda la descripción y las reivindicaciones a menos que otra definición expresamente provea una definición más amplia o más estrecha. Es bien entendido que una definición o definición preferida de un término define y puede reemplazar el término respectivo independientemente de (y en combinación con) cualquier definición o definición preferida de cualquiera o todos los otros términos como se definen en la presente solicitud.

15 Los compuestos de fórmula (I) como se definen en cualquiera de las realizaciones 1) a 13), pueden contener uno o más centros estereogénicos o asimétricos, tales como uno o más átomos de carbono asimétricos. Los compuestos de fórmula (I) por lo tanto pueden estar presentes como mezclas de estereoisómeros o en forma estereoisoméricamente enriquecida, preferentemente como estereoisómeros puros.

20 El término "enriquecido", por ejemplo cuando se utiliza en el contexto de enantiómeros, se entiende en el contexto de la presente invención que significa especialmente que el enantiómero respectivo está presente en una relación (cambiando donde haya que cambiar: pureza) de al menos 70:30, y notablemente de al menos 90:10 (cambiando donde haya que cambiar: pureza de 70 %/90 %) con respecto al otro enantiómero respectivo. Preferentemente el término se refiere al enantiómero esencialmente puro respectivo. El término "esencialmente", por ejemplo cuando se utiliza en una expresión tal como "esencialmente puro" se entiende en el contexto de la presente invención que significa especialmente que el estereoisómero / la composición / el compuesto etcétera, respectivo, consiste en una cantidad de al menos 90, especialmente de al menos 95, y notablemente de al menos 99 por ciento en peso del estereoisómero / composición / compuesto puro respectivo etc. El término halógeno significa fluro, cloro, bromo o yodo; se prefieren fluro y cloro.

30 2) Una realización adicional de la invención se refiere a compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la realización 1), en la que R¹ representa halógeno y R² representa hidrógeno; y a las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

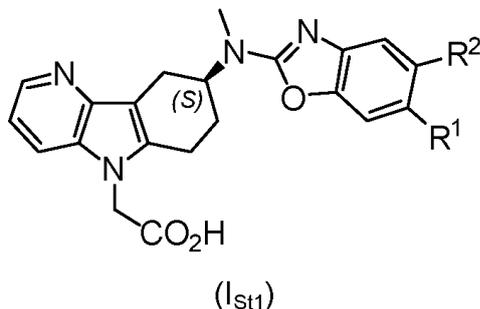
35 3) Una realización adicional de la invención se refiere a compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la realización 1), en la que R¹ representa cloro y R² representa hidrógeno; y a las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

40 4) Una realización adicional de la invención se refiere a compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la realización 1), en la que R¹ representa hidrógeno y R² representa halógeno; y a las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

45 5) Una realización adicional de la invención se refiere a compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la realización 1), en la que R¹ representa hidrógeno y R² representa fluro o cloro; y a las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

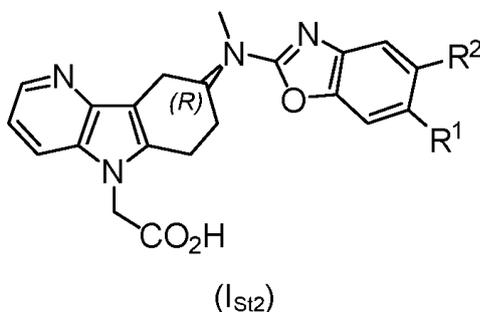
6) Una realización adicional de la invención se refiere a compuestos de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 5), en los que la configuración absoluta del centro estereogénico es como se representa en la

fórmula (I_{St1})



y a las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

- 5 7) Una realización adicional de la invención se refiere a compuestos de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 5), en los que la configuración absoluta del centro estereogénico es como se representa en la fórmula (I_{St2})



y a las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

- 10 8) Los ejemplos de compuestos de fórmula (I) como se definen en la realización 1) se seleccionan del grupo que consiste en:

15 ácido 2-(8-((5-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;
 ácido 2-(8-((5-fluorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético; y
 ácido 2-(8-((6-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;
 o las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos;
 debe entenderse para cualquiera de los compuestos antes listados, que un centro estereogénico, el cual no
 está específicamente asignado, puede estar en la configuración absoluta (R) o en la configuración absoluta
 (S); por ejemplo un compuesto listado como ácido 2-(8-((6-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-
 tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético puede ser ácido (R)-2-(8-((6-clorobenzo[d]oxazol-2-
 20 il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético, ácido (S)-2-(8-((6-clorobenzo[d]oxazol-2-
 il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético o cualquier mezcla de los mismos.

- 9) Los ejemplos preferidos de compuestos de fórmula (I) como se definen en la realización 1) se seleccionan del grupo que consiste de:

25 ácido (S)-2-(8-((5-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;
 ácido (S)-2-(8-((5-fluorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético; y
 ácido (S)-2-(8-((6-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;
 o las sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos;

- 10) En una realización preferida el compuesto de fórmula (I) como se define en la realización 1) es:

30 ácido 2-(8-((5-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético (y
 notablemente ácido (S)-2-(8-((5-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-
 5-il)acético);
 o una sal (en particular una sal farmacéuticamente aceptable) del compuesto;

- 11) En otra realización preferida el compuesto de fórmula (I) como se define en la realización 1) es:

35 ácido 2-(8-((5-fluorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético (y
 notablemente ácido (S)-2-(8-((5-fluorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-
 b]indol-5-il)acético);

o una sal (en particular una sal farmacéuticamente aceptable) del compuesto;

12) En otra realización preferida el compuesto de fórmula (I) como se define en la realización 1) es:

ácido 2-(8-((6-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético (y notablemente ácido (S)-2-(8-((6-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético);

o una sal (en particular una sal farmacéuticamente aceptable) del compuesto;

13) La invención, por lo tanto, se refiere a compuestos de fórmula (I) como se definen en la realización 1), y a dichos compuestos limitados además por las características de una cualquiera de las realizaciones 2) a 12), todas bajo consideración de sus dependencias respectivas; a sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; y al uso de dichos compuestos como medicamentos especialmente en el tratamiento de enfermedades que se seleccionan del grupo que consiste en enfermedades/trastornos alérgicos/inmunes crónicos y agudos, que comprenden asma, asma alérgica, asma eosinofílica, asma grave, rinitis, rinitis alérgica, angioedema, alergia a veneno de insecto, alergias a fármacos, sinusitis alérgica, nefritis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial, alergia a alimentos, trastornos de mastocito sistémicos, choque anafiláctico, urticaria, eczema, colitis ulcerante, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria del intestino y artritis reumatoide; enfermedades relacionadas con eosinófilos que comprenden vasculitis de vaso sanguíneo pequeño tal como síndrome de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener, poliangiitis microscópica (y subconjuntos específicos de órgano de esta última), síndromes hipereosinofílicos tal como neumonía eosinofílica, esofagitis eosinofílica, esofagitis de reflujo, endocarditis eosinofílica (endocarditis de Loeffler), síndrome de eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, foliculitis pustulosa eosinofílica (enfermedad de Ofuji), úlceras eosinofílicas, hiperplasia angioliñoide con eosinofilia (ALHE), celulitis eosinofílica (síndrome de Wells), leucemia eosinofílica crónica y síndrome DRESS (Erupción cutánea por fármaco con eosinofilia y síntomas sistémicos); y enfermedades relacionadas con basófilos, que comprenden leucemia basofílica y leucocitosis basofílica. Especialmente las siguientes realizaciones referentes a los compuestos de la fórmula (I) son por lo tanto posibles y pensadas y con la presente se describen específicamente en forma individualizada: 1, 2+1, 3+1, 4+1, 5+1, 6+1, 6+2+1, 6+3+1, 6+4+1, 6+5+1, 7+1, 7+2+1, 7+3+1, 7+4+1, 7+5+1, 8+1, 9+1, 10+1, 11+1, y 12+1; en la lista anterior los números se refieren a las realizaciones de acuerdo con sus numeraciones provista anteriormente en la presente mientras que “+” indica la dependencia de otra realización. Las diferentes realizaciones individualizadas están separadas por comas. En otras palabras, “6+2+1” por ejemplo se refiere a la realización 6) que depende de la realización 2), que depende de la realización 1), es decir la realización “6+2+1” corresponde a los compuestos de la realización 1) limitados también por las características de las realizaciones 2) y 6).

En caso de que se utilice la forma plural para compuestos, sales, composiciones farmacéuticas, enfermedades o similares, se pretende que esto signifique también un compuesto, sal, composición farmacéutica, enfermedad o similares individuales.

Debe entenderse que cualquier referencia a un compuesto de fórmula (I) como se define en una cualquiera de las realizaciones 1) a 13) se refiere también a las sales (y especialmente las sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos, según sea apropiado y conveniente.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto en cuestión y exhiben efectos toxicológicos indeseados mínimos. Dichas sales incluyen sales de adición de ácido y/o base inorgánicos u orgánicos dependiendo de la presencia de grupos ácidos y/o básicos en el compuesto en cuestión. Para referencia véase por ejemplo 'Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use.', P. Heinrich Stahl, Camille G. Wermuth (Eds.), Wiley-VCH, 2008 y 'Pharmaceutical Salts and Co-crystals', Johan Wouters y Luc Quéré (Eds.), RSC Publishing, 2012.

La presente invención también incluye compuestos isotópicamente marcados, especialmente compuestos de fórmula (I) marcados con ^2H (deuterio), cuyos compuestos son idénticos a los compuestos de fórmula (I) excepto que uno o más átomos han sido remplazados cada uno con un átomo que tiene el mismo número atómico pero una masa atómica diferente de la masa atómica usualmente encontrada en la Naturaleza. Los compuestos isotópicamente marcados, especialmente compuestos de la fórmula (I) marcados con ^2H (deuterio) y sales de los mismos están dentro del alcance de la presente invención. La sustitución de hidrógeno con el isótopo ^2H (deuterio) más pesado puede llevar a mayor estabilidad metabólica, lo que da como resultado por ejemplo tiempo de vida media *in vivo* aumentado o requerimientos de dosificación reducidos, o pueden llevar a inhibición reducida de las enzimas del citocromo P450, lo que da como resultado por ejemplo un perfil de seguridad mejorado. En una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) no están isotópicamente marcados, o éstos están marcados solamente con uno o más átomos de deuterio. En una sub-realización, los compuestos de fórmula (I) no están marcados isotópicamente en lo absoluto. Los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar en analogía a los procedimientos descritos posteriormente en la presente solicitud, pero utilizando la variación isotópica apropiada de reactivos o materiales de partida apropiados.

Cada vez que se utilice la palabra “entre” para describir un intervalo numérico, se debe entender que los puntos finales del intervalo indicado están explícitamente incluidos en el intervalo. Por ejemplo: si se describe que un intervalo de temperatura está entre 40 °C y 80 °C, esto significa que los puntos finales 40 °C y 80 °C están incluidos en el intervalo; o si una variable se define como un número entero entre 1 y 4, esto significa que la variable es el número entero 1, 2, 3 o 4.

A menos que se utilice con respecto a temperaturas, el término “aproximadamente” (o de manera alternativa “alrededor de”) colocado antes de un valor numérico “X” se refiere en la solicitud actual a un intervalo que se extiende desde X menos 10 % de X hasta X más 10 % de X, y preferentemente a un intervalo que se extiende desde X menos 5 % de X hasta X más 5 % de X. En el caso particular de temperaturas, el término “aproximadamente” (o de manera alternativa “alrededor de”) colocado antes de una temperatura “Y” se refiere en la solicitud actual a un intervalo que se extiende desde la temperatura Y menos 10 °C hasta Y más 10 °C, y preferentemente a un intervalo que se extiende desde Y menos 5 °C hasta Y más 5 °C. Además, el término “temperatura ambiente” tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una temperatura de aproximadamente 25 °C.

Los compuestos de fórmula (I) como se definen en cualquiera de las realizaciones 1) a 13) y sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden utilizar como medicamentos, por ejemplo en forma de composiciones farmacéuticas para administración entérica (tal como especialmente oral) o parenteral (incluyendo aplicación tópica o inhalación).

La producción de las composiciones farmacéuticas se puede efectuar en una manera que será familiar para cualquier experto en la materia (véase por ejemplo Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª Edición (2005), Parte 5, “Pharmaceutical Manufacturing” [publicado por Lippincott Williams & Wilkins]) llevando los compuestos de la fórmula (I) descritos o sus sales farmacéuticamente aceptables, opcionalmente en combinación con otras sustancias terapéuticamente valiosas, a una forma de administración galénica junto con materiales de vehículo sólidos o líquidos terapéuticamente compatibles, inertes, no tóxicos, apropiados, y, si se desea, coadyuvantes farmacéuticos habituales.

La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno mencionados en el presente documento que comprende administrar a un individuo una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto de fórmula (I) como se define en una cualquiera de las realizaciones 1) a 13).

En una realización preferida de la invención, la cantidad administrada está comprendida entre 1 mg y 1000 mg por día, particularmente entre 5 mg y 500 mg por día, de manera más particular entre 25 mg y 400 mg por día, especialmente entre 50 mg y 200 mg por día.

Para evitar cualquier duda, si los compuestos se describen como útiles para la prevención o tratamiento de ciertas enfermedades, dichos compuestos probablemente son apropiados para uso en la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de dichas enfermedades.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un procedimiento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno como se menciona más adelante en un paciente que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto de fórmula (I) como se define en cualquiera de las realizaciones 1) a 13) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 13), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden utilizarse para la preparación de un medicamento, y son apropiados para la prevención y/o tratamiento de enfermedades que se seleccionan a partir del grupo que consiste en enfermedades/trastornos alérgicos/inmunes crónicos y agudos, que comprenden asma, asma alérgica, asma eosinofílica, asma grave, rinitis, rinitis alérgica, angioedema, alergia a veneno de insecto, alergias a fármacos, sinusitis alérgica, nefritis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial, alergia a alimentos, trastornos de mastocito sistémicos, choque anafiláctico, urticaria, eczema, colitis ulcerante, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria del intestino y artritis reumatoide; enfermedades relacionadas con eosinófilos que comprenden vasculitis de vaso sanguíneo pequeño tal como síndrome de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener, poliangiitis microscópica (y subconjuntos específicos de órgano de esta última), síndromes hipereosinofílicos tal como neumonía eosinofílica, esofagitis eosinofílica, esofagitis de reflujo, endocarditis eosinofílica (endocarditis de Loeffler), síndrome de eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, foliculitis pustulosa eosinofílica (enfermedad de Ofuji), úlceras eosinofílicas, hiperplasia angioloide con eosinofilia (ALHE), celulitis eosinofílica (síndrome de Wells), leucemia eosinofílica crónica y síndrome DRESS (Erupción cutánea por fármaco con eosinofilia y síntomas sistémicos); y enfermedades relacionadas con basófilos, que comprenden leucemia basofílica y leucocitosis basofílica.

En otra realización, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 13), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden utilizar para la preparación de un medicamento, y son apropiados para la prevención y/o tratamiento de enfermedades que se seleccionan a partir del grupo que consiste en poliposis nasal, enfermedad de Still (artritis idiopática juvenil de inicio sistémico) y fibrosis quística.

En una realización preferida, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 13), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden utilizar para la preparación de un medicamento, y son apropiados para la prevención y/o tratamiento de enfermedades que se seleccionan a partir del grupo que consiste en asma, asma alérgica, asma eosinofílica, asma grave, rinitis alérgica, angioedema, alergia a veneno de insecto, alergias a fármacos, sinusitis alérgica, nefritis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, alergia a alimentos, trastornos de mastocito sistémicos, choque anafiláctico, urticaria y eczema.

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 13), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden utilizar para la preparación de un medicamento, y son apropiados para la prevención y/o tratamiento de enfermedades que se seleccionan a partir del grupo que consiste en enfermedades relacionadas con eosinófilos que comprenden vasculitis de vaso sanguíneo pequeño tal como síndrome de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener, poliangiitis microscópica (y subconjuntos específicos de órgano de esta última), síndromes hipereosinofílicos tal como neumonía eosinofílica, esofagitis eosinofílica, esofagitis de reflujo, endocarditis eosinofílica (endocarditis de Loeffler), síndrome de eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, foliculitis pustulosa eosinofílica (enfermedad de Ofuji), úlceras eosinofílicas, hiperplasia angiolofoide con eosinofilia (ALHE), celulitis eosinofílica (síndrome de Wells), leucemia eosinofílica crónica y síndrome DRESS (Erupción cutánea por fármaco con eosinofilia y síntomas sistémicos).

Incluso en otra realización preferida, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 13), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden utilizar para la preparación de un medicamento, y son apropiados para la prevención y/o tratamiento de enfermedades que se seleccionan a partir del grupo que consiste en enfermedades relacionadas con basófilo, que comprenden leucemia basofílica y leucocitosis basofílica.

En una realización muy preferida, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 13), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden utilizar para la preparación de un medicamento, y son apropiados para la prevención y/o tratamiento de enfermedades que se seleccionan a partir del grupo que consiste en asma, asma eosinofílica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, poliposis nasal, alergia a alimentos (notablemente alergia a alimentos mediada por IgE), urticaria (notablemente urticaria crónica), esofagitis eosinofílica, síndrome de Churg Strauss, síndrome hipereosinofílico, neumonía eosinofílica (notablemente neumonía eosinofílica crónica), síndrome DRESS, enfermedad de Still, EPOC y fibrosis quística (y especialmente asma, asma eosinofílica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, alergia a alimentos mediada por IgE, urticaria crónica, esofagitis eosinofílica y síndrome de Churg Strauss).

La invención también se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 13) para la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento y/o profilaxis de las enfermedades antes mencionadas.

La presente invención también se refiere a sales farmacéuticamente aceptables y a composiciones y formulaciones farmacéuticas de los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 13).

Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención contiene al menos un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 13) (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) como el principio activo y opcionalmente vehículos y/o diluyentes y/o coadyuvantes.

Se debe entender que cualquier referencia a un compuesto de fórmula (I), (I_{ST1}) o (I_{ST2}) en este texto se refiere también a las sales (y especialmente las sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos, según sea apropiado y conveniente. Las preferencias indicadas para los compuestos de fórmula (I) se aplican desde luego cambiando lo que haya que cambiar a los compuestos de fórmula (I_{ST1}) y a los compuestos de fórmula (I_{ST2}) así como a las sales y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I), de fórmula (I_{ST1}) o de fórmula (I_{ST2}). Lo mismo se aplica a estos compuestos como medicamentos, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos como principios activos o a los usos de estos compuestos para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades de acuerdo con esta invención.

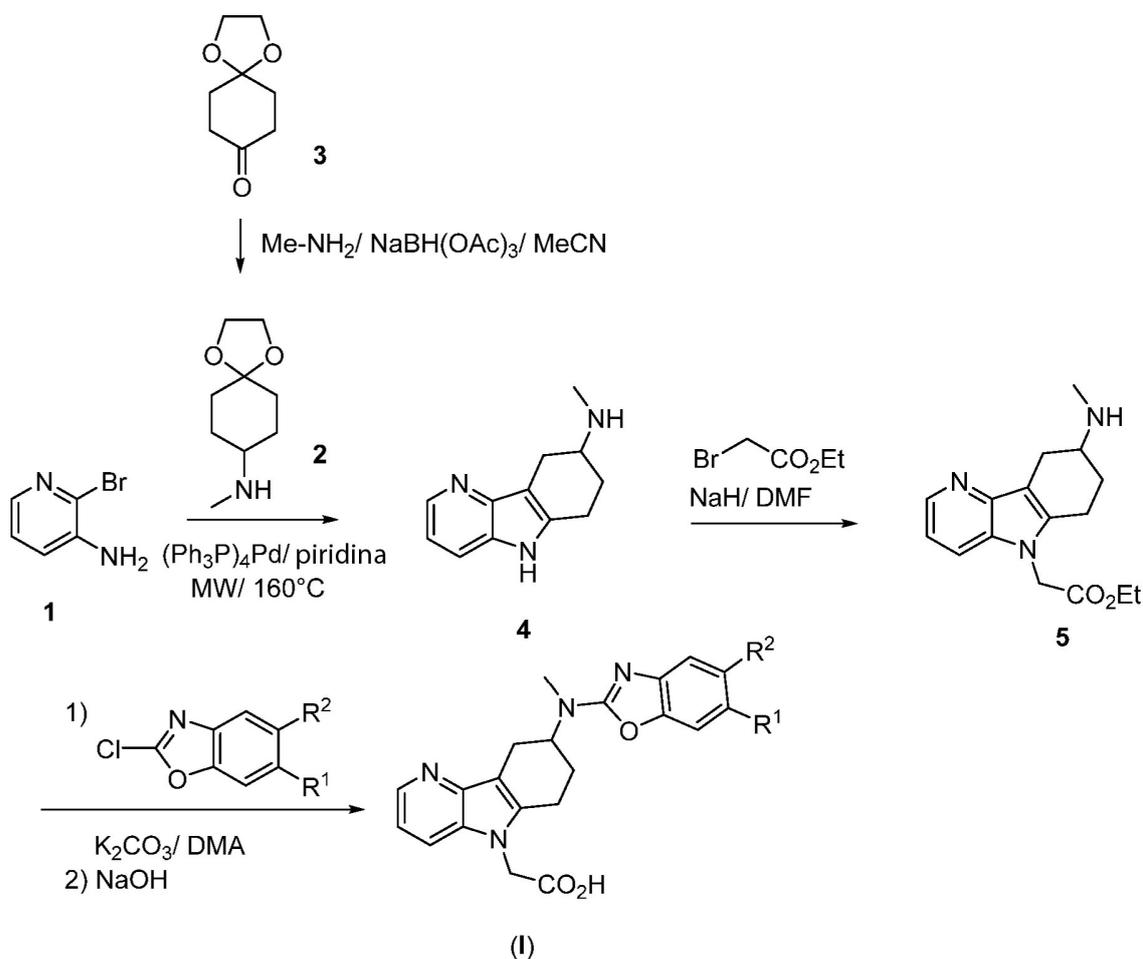
Como se mencionó anteriormente, los compuestos de fórmula (I) modulan como antagonistas la activación con PGD₂ del receptor CRTH2. El efecto biológico de dichos compuestos se puede analizar en una diversidad de pruebas *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. La capacidad de los compuestos de fórmula (I) para unirse al receptor CRTH2 se puede medir utilizando procedimientos similares a aquellos descritos en la bibliografía (Arimura A. y col., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, 298(2), 411-419; y Sawyer N. y col., *Br. J. Pharmacol.* 2002, 137, 1163-1172, respectivamente) y mediante las pruebas descritas más adelante en la parte experimental.

Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la preparación de los compuestos de fórmula (I). Los compuestos de acuerdo con la fórmula (I) de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con la secuencia de reacciones indicada en los siguientes esquemas de reacción en los cuales R¹ y R² son como se definieron para la fórmula (I). Otras abreviaturas utilizadas se definen en la sección experimental.

En general, todas las transformaciones químicas se pueden efectuar de acuerdo con metodologías convencionales bien conocidas como se describe en la bibliografía, o como se describe en los procedimientos más adelante. Los

compuestos obtenidos también se pueden convertir en sales farmacéuticamente aceptables de los mismos en una manera conocida en sí misma.

Los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar a partir del derivado azaindol (4) el cual por sí mismo se puede sintetizar mediante irradiación de microondas de 3-amino-2-bromo-piridina (1) con *N*-metil-1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-amina (2) en presencia de un catalizador tal como Pd(Ph₃P)₄ en piridina. La *N*-metil-1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-amina (2) se puede preparar mediante aminación reductiva de 1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-ona (3) comercialmente disponible con metilamina en presencia de un agente reductor tal como NaBH(OAc)₃ en un disolvente aprótico tal como MeCN. La alquilación del derivado azaindol (4) con bromoacetato de etilo en presencia de una base tal como NaH en un disolvente aprótico tal como DMF produce el éster etílico del ácido azaindol acético (5) deseado; los derivados de azaindol (5) enantioméricamente enriquecidos se pueden preparar de acuerdo con el procedimiento dado en la parte experimental. La reacción de la amina (5) con el derivado 2-cloro-benzoxazol respectivo en presencia de una base tal como K₂CO₃ en un disolvente aprótico tal como DMA seguido por saponificación con una base tal como NaOH permite obtener los compuestos de fórmula (I).



Esquema 1: Ruta general de síntesis para la preparación de los compuestos de fórmula (I)

Cada vez que los compuestos de fórmula (I) o un intermedio de las estructuras 4 o 5 se obtengan en forma de mezclas de enantiómeros, los enantiómeros se pueden separar utilizando procedimientos conocidos por el experto en la materia: por ejemplo mediante formación y separación de las sales diastereoméricas o mediante HPLC sobre una fase estacionaria quiral tal como una columna Regis Whelk-O1(R,R) (10 μm), una columna Daicel ChiralCel OD-H (5-10 μm), o una columna Daicel ChiralPak IA (10 μm) o columna AD-H (5 μm). Las condiciones típicas de HPLC quiral son una mezcla isocrática de eluyente A (EtOH, en presencia o ausencia de una amina tal como TEA y/o DEA) y eluyente B (hexano), a una velocidad de flujo de 0,8 a 150 ml/min.

Sección experimental

Abreviaturas (como se utilizan en el presente documento)

Ac acetilo
ac. acuoso

	APC	alofococianina
	Boc	terc-butoxicarbonilo
	BSA	seroalbúmina de bovino
	d	doblete
5	DCM	diclorometano
	DEA	dietilamina
	DMA	dimetilacetamida
	DMF	dimetilformamida
	DMSO	dimetilsulfóxido
10	dpm	desintegraciones por minuto
	EA	acetato de etilo
	EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
	eq	equivalente o equivalentes
	ESI-EM	espectroscopía de masas de ionización por electropulverizado
15	Et	etilo
	FC	cromatografía de vaporización instantánea
	h	hora u horas
	HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etansulfónico
20	HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
	HSA	seroalbúmina de humano
	iPrOH	isopropanol
	l	litro o litros
	CL-EM	cromatografía líquida-espectroscopia de masas
25	m	multiplete
	Me	metilo
	MeCN	acetonitrilo
	min	minuto o minutos
	EM	espectroscopia de masas
	MO	microondas
30	N	Normalidad de la solución
	RMN	resonancia magnética nuclear
	PBS	solución salina tamponada con fosfato
	PEI	polietilenimina
35	PGD2	prostaglandina D2
	Ph	fenilo
	Pr	propilo
	TA	temperatura ambiente
	s	segundo o segundos
	s	singlete
40	sat	saturado
	t	triplete
	tBu	terc-butilo
	TEA	trietilamina
	TFA	ácido trifluoroacético
45	t _R	tiempo de retención
	Tris	tampón de Tris-(hidroximetil)aminometano

Química

Comentarios generales

50 Todos los disolventes y reactivos se utilizan tal como se obtienen a partir de fuentes comerciales a menos que se indique lo contrario.

Las temperaturas están indicadas en grados Celsius (°C). A menos que se indique lo contrario, las reacciones tienen lugar a temperatura ambiente (TA).

En las mezclas, las relaciones de las partes de las mezclas de disolvente o eluyente o reactivo en forma líquida se proporcionen como relaciones en volumen (v/v), a menos que se indique lo contrario.

55 Las condiciones de HPLC analítica tal como se utiliza en los Ejemplos más adelante:
Los análisis de HPLC/MS se efectúan en un sistema Agilent 1100, equipado con una bomba binaria Dionex P580, un detector de matriz de fotodiodos Dionex PDA-100 y un espectrómetro de masas Finnigan AQA.

Los tiempos de retención de LC se obtienen utilizando la siguiente condición de elución:

- HPLC analítica en una columna Zorbax® SB-AQ (4,6x50 mm, 3,5 µm, Agilent); gradiente lineal de agua/TFA al 0,04 % (A) y MeCN (B) de 5 % a 95 % de B en el transcurso de 1,5 min; velocidad de flujo 4,5 ml/min, detección a 210 nm.

5 Las purificaciones con HPLC preparativa/MS (condiciones ácidas) se efectúan en un sistema de bomba de gradiente de alta presión binaria Gilson 333/334 con un automuestreador y recolector de fracciones Gilson 215, un detector Dionex UVD340U DAD, un detector polymerlabs PL-ELS 1000 ELS y un detector de MS Thermo MSQ Plus, utilizando una columna Waters Atlantis T3 (10 µm, 30 x 75 mm), con un gradiente lineal de agua/ácido fórmico al 0,5 % (B) y MeCN (A) iniciando de 80/20 a 5/95 de (B)/(A) en el transcurso de 5 min; velocidad de flujo 75 ml/min.

10 Las purificaciones con HPLC preparativa/EM (condiciones básicas) se efectúan en un sistema de bomba de gradiente de alta presión binaria Gilson 333/334 con un automuestreador y recolector de fracciones Gilson 215, un detector Dionex UVD340U DAD, un detector polymerlabs PL-ELS 1000 ELS y un detector de MS Thermo MSQ Plus, utilizando una columna C18 Waters XBridge (10 µm, 30 x 75 mm), con un gradiente lineal de agua/0,5 %-25 % de NH₄OH (B) y MeCN (A) iniciando de 80/20 a 5/95 de (B)/(A) en el transcurso de 5 min; velocidad de flujo 75 ml/min.

15 La HPLC analítica sobre una fase estacionaria quiral se efectúan en una columna Daicel ChiralPak AD-H (4,6 x 250 mm, 5 µm) o una columna Chiralpak AY-H (4,6 x 250 mm, 5 µm). Las condiciones típicas de HPLC quiral son una mezcla isocrática de 30 % de heptano + 0,05 % de DEA y 70 % de EtOH + 0,05 % de DEA, a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min, detección a 210 nm (HPLC quiral 1) o una mezcla isocrática de 40 % de heptano y 60 % de EtOH + 0,1 % de TFA, a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min., detección a 210 nm (HPLC quiral 2).

20 La HPLC preparativa sobre una fase estacionaria quiral se efectúa en una columna Daicel ChiralPak AD-H (20 x 250 mm, 5 µm). Las condiciones típicas de HPLC quiral son una mezcla isocrática de 50 % de EtOH y 50 % de heptano, a una velocidad de flujo de 16 ml/min, detección a 210 nm (HPLC quiral 3).

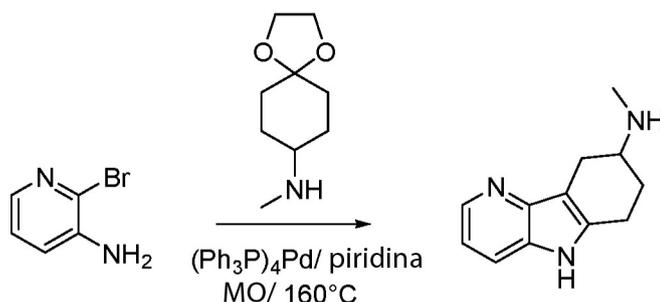
A. Síntesis de derivados de ácido 2-(8-((benzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético

A.1. Síntesis de N-metil-1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-amina

25 Una mezcla de 1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-ona (1,0 eq.), metilamina (8M en EtOH, 1,0 eq.), y NaBH(OAc)₃ (3,0 eq.) en MeCN (10 ml/6,2 mmol) se agita a temperatura ambiente durante 20 horas. La mezcla de reacción después se concentra al vacío, se disuelve en una mezcla de EA/iPrOH (4/1) y se lava con NaHCO₃ saturado y salmuera. La fase acuosa se extrae con EA/iPrOH (4/1). Los extractos orgánicos combinados se secan (MgSO₄), se filtran y se concentran al vacío para producir el producto deseado el cual se utiliza en el siguiente paso sin purificación adicional.

30 RMN ¹H (CDCl₃) δ: 1,35 (m, 2H); 1,45 (m, 2H); 1,75 (m, 2H); 1,95 (m, 2H); 3,45 (m, 4H); 3,95 (s, 4H).

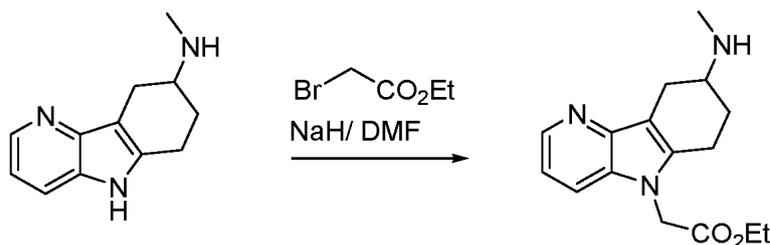
A.2. Síntesis de N-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-8-amina



35 Una solución de 3-amino-2-bromopiridina (1,0 eq.), N-metil-1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-amina (1,2 eq.) y (Ph₃P)₄Pd (0,05 eq.) en piridina (1 ml/0,07 mmol) se irradia con microondas (MO) a 160 °C durante 1 hora. Después de enfriar a TA, la mezcla de reacción se vierte en agua y se extrae con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se concentran al vacío y el residuo se purifica mediante HPLC preparativa (condiciones básicas) para proporcionar el compuesto deseado.

CL-EM: t_R = 0,37 min; [M+H]⁺ = 202,21,

40

A.3 Síntesis de 2-(8-(metilamino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato de etilo

A una solución fría (0 °C) de N-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-8-amina (1,0 eq.) en DMF seca (1 ml/0,04 mmol), se añade NaH (1,1 eq., dispersión al 60 % en aceite mineral). La mezcla de reacción se agita a 0 °C durante 10 min, se añade bromoacetato de etilo (1,0 eq.) y la mezcla de reacción se deja calentar a temperatura ambiente y se agita durante la noche. Se añade agua y la mezcla de reacción se purifica directamente mediante HPLC preparativa (condiciones básicas) para proporcionar el compuesto deseado. CL-EM: $t_R = 0,38$ min; $[M+H]^+ = 288,28$.

A.4 Síntesis de derivados de ácido 2-(8-((benzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético**Procedimiento general:**

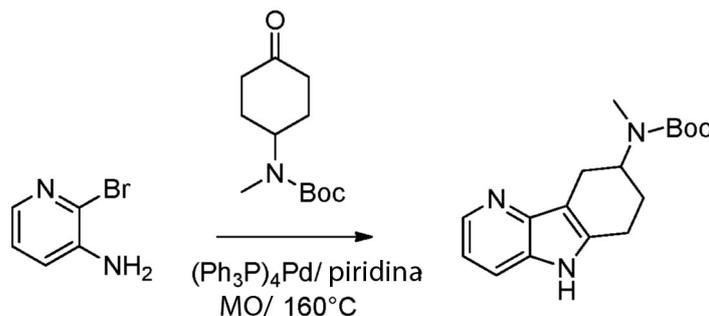
Una mezcla de 2-(8-(metilamino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato de etilo (0,06 mmol), el derivado de 2-cloro-benzo[d]oxazol respectivo (0,06 mmol) y K_2CO_3 (0,24 mmol) en DMA (0,5 ml) se agita a 80 °C durante 12 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añaden agua (0,07 ml) y NaOH acuoso al 30 % (0,07 ml) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agita a 50 °C durante 2 horas y después se añade HCl acuoso al 37 % (0,07 ml). Los productos se purifican directamente mediante HPLC preparativa (condiciones ácidas) para proporcionar los compuestos respectivos de la fórmula (I).

Preparación de los ejemplos

Los siguientes derivados de ácido 2-(8-((benzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético se sintetizan de acuerdo con el procedimiento general anterior.

Tabla 1

Ejemplo	Nombre	$[M+H]^+$ m/z	t_R [min.] CL-EM
1	Ácido 2-(8-((6-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	411,10	0,65
2	Ácido 2-(8-((5-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	411,12	0,65
3	Ácido 2-(8-((5-fluorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	395,12	0,62

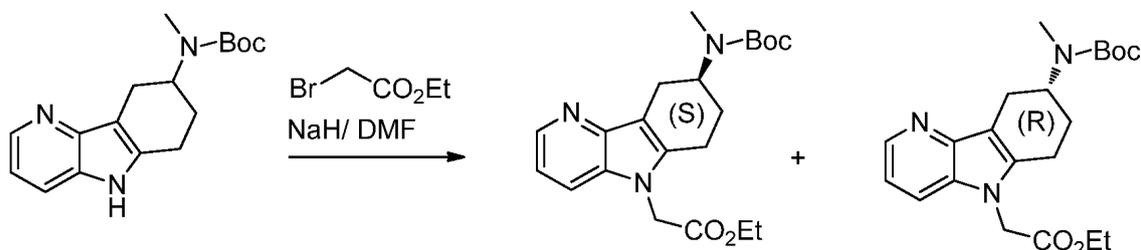
A.5 Síntesis de (S)-2-(8-(metilamino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato de etilo**A.5.1 Síntesis de metil(6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-8-il)carbamato de terc-butilo**

En un vial, se disuelven 3-amino-2-bromopiridina (2,0 g, 11,6 mmol, 1,0 eq.), 4-(N-Boc-N-metilamino)ciclohexanona (3,15 g, 13,9 mmol, 1,2 eq.) y $(Ph_3P)_4Pd$ (668 mg, 0,58 mmol, 0,05 eq.) en piridina (7,6 ml). El vial se calienta mediante irradiación con MO a 160 °C durante 60 min. La mezcla de reacción se vierte en agua (9,5 ml) y el sólido resultante se recolecta mediante filtración, se seca, se tritura en éter dietílico y se recolecta nuevamente mediante

filtración para obtener el compuesto del título.
CL-EM: $t_R = 0,63$ min; $[M+H]^+ = 302,15$.

A.5.2 Síntesis de (S)-2-(8-((terc-butoxicarbonil)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato de etilo y (R)-2-(8-((terc-butoxicarbonil)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato de etilo

5



A una solución fría (0 °C) de metil(6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-8-il)carbamato de terc-butilo (1,37 g, 4,56 mmol) en DMF seca (12,5 ml), se añade NaH (120 mg, 5,02 mmol, dispersión al 60 % en aceite mineral). La mezcla de reacción se agita a 0 °C durante 10 min, se añade bromoacetato de etilo (0,52 ml, 4,56 mmol) y la mezcla de reacción se deja calentar a temperatura ambiente y se agita en el transcurso de la noche. Se añade agua y el precipitado resultante se recolecta mediante filtración y se lava con agua. El sólido crudo se purifica mediante FC (MeOH al 8 % en DCM) seguido por trituración con éter dietílico para producir el producto deseado como un racemato.

10

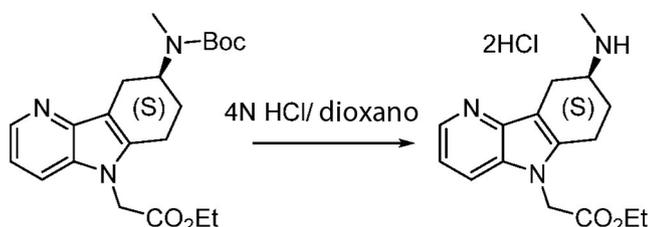
CL-EM: $t_R: 0,7$ min/ $[M+H]^+ : 388,50$.

15 Los dos enantiómeros del producto obtenido se separaron mediante HPLC quiral preparativa (HPLC quiral 3):

(R)-2-(8-((terc-butoxicarbonil)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato de etilo (487 mg, 28 %): HPLC (HPLC quiral 1): $t_R: 6,03$ min.

(S)-2-(8-((terc-butoxicarbonil)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato de etilo (491 mg, 28 %): HPLC (HPLC quiral 1): $t_R: 7,36$ min.

20 **A.5.3. Síntesis de (S)-2-(8-(metilamino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato de etilo**



A (S)-2-(8-((terc-butoxicarbonil)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato de etilo (100 mg, 0,258 mmol) se añade HCl 4N en dioxano (0,895 ml). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora y se concentra para producir el producto deseado como una sal clorhidrato la cual se puede utilizar en la siguiente etapa sin purificación adicional.

25

CL-EM: $t_R: 0,38$ min./ $[M+H]^+ : 288,25$.

Pruebas biológicas

Preparación de membranas de receptor de hCRTH2 y prueba de desplazamiento de radioligando:

Primero, las células HEK293-hCRTH₂ recombinantes se desprenden de las placas de cultivo en 5 ml de tampón A/placa (tampón A: Tris 5 mM, 1 mM de MgCl₂·6H₂O pH=7,4) utilizando un policia de goma. Las células después se transfieren a tubos para centrifugación y se centrifugan durante 5 min a 400 g. El comprimido celular se vuelve a suspender en el mismo tampón y los tubos se congelan a -80 °C. Las células se descongelan y se generan fragmentos de membrana mediante homogeneización utilizando un homogeneizador polytron (30 segundos). Los fragmentos de membrana después se centrifugan a 3000 g durante 20 minutos y se vuelven a suspender en tampón C (tampón C: Tris 75 mM, 25 mM de MgCl₂, 250 mM de sacarosa pH 7,4). Las alícuotas de fragmentos de membrana se almacenan a -20 °C.

30

35

La prueba de unión se realizó en un volumen de prueba final de 250 µl. Primero, se colocan 25 µl del compuesto de prueba, previamente diluido en tampón de unión (tampón para unión: Tris-Base 50 mM, 100 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, BSA al 0,1 % (libre de proteasa), NaN₃ al 0,01 %, 10mM de MnCl₂ pH 7,0) en cada pocillo. Después de la adición de 75 µl de tampón de unión, se añaden 50 µl del radioligando ³H-PGD₂ (a 2,5 nM (220 000 dpm/pocillo) de ANAWA ART0662) a cada pocillo. La prueba de unión se inicia mediante la adición de 100 µl de fragmentos de

40

- membrana CRTH₂, alcanzando una concentración final de 20 µg/pocillo. Para la unión no específica, se añade PGD₂ a la mezcla de reacción hasta una concentración final de 10 mM. Esta mezcla para prueba se incuba durante 90 minutos a temperatura ambiente y después se filtra a través de una placa de 96 pocillos con filtro de GF/C la cual se pre-remoja durante 3 horas en polietilenimina (PEI) al 0,5 %. Los pocillos con filtro se lavan tres veces con tampón de unión enfriado en hielo. Después, se añaden 40 µl de Microscint-40 (Packard) a cada pocillo y la radioactividad retenida se cuantifica en un aparato Topcount (Packard).

Las actividades antagonistas de los compuestos ejemplificados se muestran en la tabla 2.

Ejemplo	Nombre	CI ₅₀ [nM]
1	Ácido 2-(8-((6-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	11
2	Ácido 2-(8-((5-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	35
3	Ácido 2-(8-((5-fluorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	31

Prueba de desplazamiento de radioligando-seroalbúmina de humano (HSA)

- La prueba de desplazamiento de radioligando en presencia de seroalbúmina de humano (HSA) se efectúa como se describió anteriormente, con las siguientes modificaciones. Tampón de unión-HSA: tampón de unión + 0,5 % de seroalbúmina de humano Sigma A1887 (en lugar de BSA al 0,1 %). Se coloca un volumen de 25 µl de compuesto de prueba, previamente diluido en tampón de unión-HSA en cada pocillo. Después de la adición de 75 µl de tampón de unión-HSA, se añaden 50 µl de ³H-PGD₂ (a 2,5 nM (220 000 dpm/pocillo) de ANAWA ART0662) a cada pocillo. El resto del protocolo es idéntico como se describió anteriormente.

Las actividades antagonistas de los compuestos ejemplificados se muestran en la tabla 3.

Ejemplo	Nombre	CI ₅₀ [nM]
1	Ácido 2-(8-((6-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	31

Prueba de cambio de forma de eosinófilo con plasma de humano

- Después de obtener consentimiento informado, se extraen muestras de sangre mediante venopunción de acuerdo con el protocolo aprobado por el comité de ética de Basilea, Suiza. Se aíslan leucocitos polimorfonucleares (que contienen eosinófilos, basófilos y neutrófilos) utilizando el procedimiento Polymorphprep™ (Axis-Shield). En breve, se deposita sangre entera anticoagulada sobre un gradiente de Polymorphprep (densidad 1,113 g/ml) y se centrifuga a 500 g durante 30 min. Se cosecha la fracción de células polimorfonucleares y se agota respecto a eritrocitos mediante lisis con solución salina hipotónica.

- Las células polimorfonucleares se vuelven a suspender en tampón de prueba (PBS 1x con Ca²⁺/Mg²⁺ suplementado con BSA al 0,1 %, 10 mM de HEPES y 10 mM de glucosa, pH 7,4) a 5 x 10⁶ células/ml y se tiñen con anti-CD49d-APC ((APC=aloficocianina) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los compuestos de prueba, a diversas concentraciones, se preincuban 10 min en plasma humano (anticoagulado con un inhibidor de trombina). Después, se añade plasma humano a las células polimorfonucleares hasta 50 % del volumen de prueba final con células polimorfonucleares a 4 x10⁶ células/ml. Después de incubación durante 10 minutos a 37 °C, las células polimorfonucleares son activadas durante 5 min a 37 °C mediante la adición de PGD₂ a una concentración final de 100 nM. La activación se detiene mediante la adición de 0,5 ml de paraformaldehído (1 %).

- Inmediatamente después de la fijación con paraformaldehído, las muestras se analizan mediante citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences) y las células objetivo se identifican por medio de sus características de dispersión frontal (FSC) y de dispersión lateral (SSC). Los eosinófilos se identifican por medio de la señal anti-CD49d-APC y su perfil de dispersión lateral (SSC) característico. Las respuestas de cambio de forma, indicativas de la activación de eosinófilo, se cuantifican como el por ciento de células con una dispersión frontal aumentada.

Las actividades antagonistas de los compuestos ejemplificados se muestran en la tabla 6.

Ejemplo	Nombre	CI ₅₀ [nM]
1	Ácido 2-(8-((6-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético	31

Prueba de movilización de calcio intracelular (FLIPR)

Se cultivan células (HEK-293), que expresan de manera estable el receptor hCRTH₂ bajo el control del promotor de citomegalovirus a partir de una inserción individual del vector de expresión pcDNA5 (Invitrogen), hasta confluencia en medio DMEM (bajo en glucosa, Gibco) suplementado con suero fetal de ternera al 10 % (Bioconcept, Suiza) bajo condiciones de cultivo de células de mamífero estándar (37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO₂). Las células se desprenden de las placas para cultivo utilizando un tampón para disociación (EDTA al 0,02 % en PBS, Gibco) durante 1 min, y se recolectan mediante centrifugación a 200 g a temperatura ambiente durante 5 min en tampón para prueba (partes iguales de BSS de Hank (HBSS, Bioconcept) y DMEM (bajo en glucosa, sin rojo de fenol, Gibco)). Después de incubación durante 45 min (37 °C y 5 % de CO₂) en presencia de 1 µM de Fluo-4 y Pluronic F-127 al 0,04 % (ambos de Molecular Probes), y 20 mM de HEPES (Gibco) en tampón de prueba, las células se lavan con y se vuelven a suspender en tampón para prueba, después se siembran en placas para prueba FLIPR de 384 pocillos (Greiner) a 50,000 células en 66 µl por pocillo, y se sedimentan mediante centrifugación.

Se elaboran soluciones de reserva de los compuestos de prueba a una concentración de 10 mM en DMSO, y se diluyen en serie en tampón para prueba hasta concentraciones requeridas para curvas dosis-respuesta de inhibición. Se utiliza prostaglandina D₂ (Biomol, Plymouth Meeting, PA) como un agonista.

Se opera un instrumento FLIPR Tetra (Molecular Devices) de acuerdo con las instrucciones estándar del fabricante, agregando 4 µl del compuesto de prueba disuelto a 10 mM en DMSO y diluido antes del experimento en tampón para prueba para obtener la concentración final deseada. Después se añaden 10 µl de prostaglandina D₂ 80 nM (Biomol, Plymouth Meeting, PA) en tampón para prueba, suplementado con seroalbúmina de bovino al 0,8 % (contenido de ácido graso <0,02 %, Sigma), para obtener una concentración final de 10 nM y 0,1 %, respectivamente. Se monitorean los cambios en la fluorescencia antes y después de la adición de los compuestos de prueba a $\lambda_{ex}=488$ nm y $\lambda_{em}=540$ nm. Los valores pico de emisión por encima del nivel base después de la adición de prostaglandina D₂ se exportan después de sustraer la línea basal. Los valores se normalizan respecto al control de nivel alto (ningún compuesto de prueba agregado) después de la sustracción del valor de la línea basal (sin prostaglandina D₂ agregada). Se utiliza el programa XLfit 3,0 (IDBS) para ajustar los datos a una curva dosis-respuesta de sitio individual de la ecuación $(A + ((B-A)/(1 + ((C/x)^D))))$ y para calcular los valores CI₅₀.

Citotoxicidad *in vitro* en hepatocitos de rata cultivados primarios

1. Procedimientos

1.1 Aislamiento y cultivo de hepatocitos de rata

Se narcotizan ratas Wistar de género masculino adultas con pentobarbital sódico y los hepatocitos se aíslan de acuerdo con un procedimiento convencional, es decir mediante perfusión *in situ* del hígado con una solución de colagenasa. La viabilidad de los hepatocitos purificados, comprobada mediante el procedimiento de exclusión con colorante azul de tripano es mayor de 85 %. Los hepatocitos aislados se vuelven a suspender en Medio E estándar de Williams, sin rojo de fenol, suplementado (WME suplementado) con transferrina (100 µg/ml), triyodotironina (10 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml), hemisuccinato de hidrocortisona (13,36 µg/ml), glucagón (5 µg/ml), HEPES (10 mM), inosina (10 µg/ml), insulina (10 µg/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y penicilina (100 U/ml) y suero fetal de bovino al 10 % (FBS). Las células se siembran en placas de 24 pocillos recubiertas con colágeno a una densidad inicial de 2×10^5 células/pocillo. Después de 4 horas para unión a las placas de cultivo, el medio se aspira y se reemplaza con WME suplementado fresco sin FBS que contiene los compuestos de prueba y se incuba durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera de 95 % de O₂ y 5 % de CO₂. Para cada experimento, es decir, con cada lote de hepatocitos, se realizan tratamientos con los compuestos de prueba por cuadruplicado. También están presentes controles por cuadruplicado (tratamiento solamente con el vehículo) en cada placa de cultivo.

1.2 Exposición *in vitro* a los compuestos de prueba

Se preparan soluciones de reserva de los compuestos de prueba en DMSO unas cuantas horas antes de que comience el tratamiento. Se añaden diluciones apropiadas de dichas soluciones de reserva a los medios de cultivo justo antes del tratamiento con el fin de producir concentraciones finales de 0, 3, 10, 30, 100 y 300 µM. La concentración final del vehículo DMSO es de 1 % (v/v).

1.3 Viabilidad de los cultivos celulares

1.3.1 Monitorización de la morfología de monocapa

Se monitoriza la morfología de las monocapas de hepatocitos mediante microscopía de luz después de 24 horas de exposición a los compuestos de prueba. Los efectos relacionados con el tratamiento se describen de acuerdo con la siguiente clasificación:

0 Ninguna alteración morfológica observada después del tratamiento cuando se compara con los cultivos de control.
1-3 Tratamiento que da como resultado cualquier cambio morfológico, por ejemplo granulación intracelular,

vacuolización o muerte celular. Dependiendo de la gravedad, estos cambios se consideran como ligeros (1), moderados (2) o fuertes (3).

K Tratamiento que da como resultado el 100 % de células muertas y/o el desprendimiento completo de la monocapa produciendo una placa transparente libre de células.

5 1.3.2 Fuga de lactato deshidrogenasa

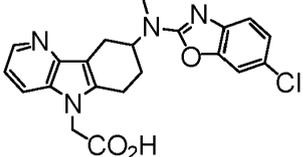
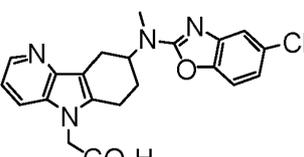
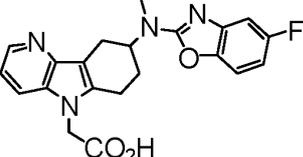
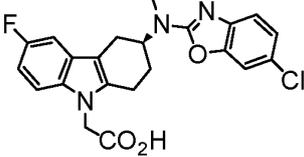
Después de 24 horas de tratamiento de los cultivos de hepatocitos, se recolectan cuidadosamente alícuotas del medio de cultivo y se utilizan para el análisis de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) mediante espectrofotometría utilizando el kit para detección de citotoxicidad de LDH de Clontech (N.º de cat. 630117, Mountain View, CA, E.U.A.). Para cada experimento, se utilizan cultivos adicionales para la determinación de la actividad de LDH intracelular total al inicio del tratamiento. Para este propósito, se lavan 4 pocillos de cultivo celular por experimento con solución salina fría antes del inicio del tratamiento, se someten a tratamiento con energía sónica en medio fresco y el homogeneizado se analiza respecto a actividad de LDH total. Las actividades enzimáticas en los medios de cultivo se evalúan y se expresan como porcentaje de la actividad total presente en los hepatocitos cultivados al comienzo de los tratamientos.

15 2. Análisis de datos

Se dan la concentración citotóxica más baja (LCC) y la concentración sin efecto (NoEC) para cada compuesto, tomando como base la morfología celular y la fuga de LDH después de tratamiento de 24 horas. La LCC se define como la concentración más baja del compuesto de prueba que lleva a un efecto claro sobre los hepatocitos de rata cultivados (clasificación de morfología ≥ 2 o incremento ≥ 2 veces en la fuga de LDH). Un valor de LCC de $>300 \mu\text{M}$ indica la ausencia de efecto en ambos puntos finales a la concentración de prueba más alta de $300 \mu\text{M}$. Los compuestos que exhiben solamente una citotoxicidad ligera (clasificación de morfología 1 o incremento < 2 veces en la fuga de LDH) a la concentración de prueba más alta se marcan como "300s". La NoEC se define como la concentración de prueba más alta del compuesto que no tiene un efecto sobre los hepatocitos de rata cultivados (morfología y fuga de LDH).

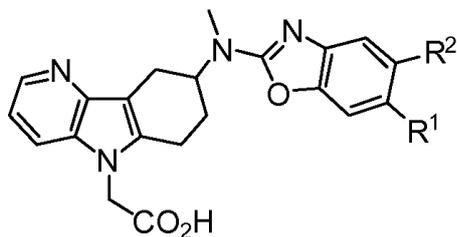
25 3. Resultados

Tabla 7. Valores de LCC de los compuestos de ejemplo

Ejemplo	LCC [μM]	NoEC [μM]	Ejemplo	LCC [μM]	NoEC [μM]
 Ejemplo 1	>300	>300	 Ejemplo 2	300s	100
 Ejemplo 3	300s	100	 Ejemplo de referencia (ejemplo 40 del documento WO 2011/117798)	100	30

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



(I)

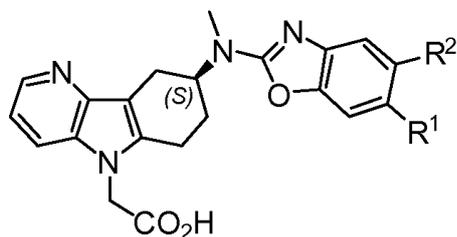
en la que

5 uno de R¹ y R² representa hidrógeno y el otro representa halógeno;
o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que
R¹ representa halógeno y R² representa hidrógeno;
o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto.

10 3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que
R¹ representa hidrógeno y R² representa halógeno;
o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto.

4. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1) a 3), en el que la configuración absoluta del centro estereogénico es como se representa en la fórmula (I_{St1})

(I_{St1})

15

o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:

20 Ácido 2-(8-((5-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;
Ácido 2-(8-((5-fluorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético; y
Ácido 2-(8-((6-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;
o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:

25 Ácido (S)-2-(8-((5-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;
Ácido (S)-2-(8-((5-fluorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético; y
Ácido (S)-2-(8-((6-clorobenzo[d]oxazol-2-il)(metil)amino)-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético;
o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto.

7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como un medicamento.

9. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en

5 enfermedades/trastornos alérgicos/inmunes crónicos y agudos, que comprenden asma, asma alérgica, asma eosinofílica, asma grave, rinitis, rinitis alérgica, angioedema, alergia a veneno de insecto, alergias a fármacos, sinusitis alérgica, nefritis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial, alergia a alimentos, trastornos de mastocito sistémicos, choque anafiláctico, urticaria, eczema, colitis ulcerante, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria del intestino y artritis reumatoide; enfermedades relacionadas con eosinófilos que comprenden vasculitis de vaso sanguíneo pequeño tal como síndrome de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener, poliangiitis microscópica (y subconjuntos específicos de órgano de esta última), síndromes hipereosinofílicos tal como neumonía eosinofílica, esofagitis eosinofílica, esofagitis de reflujo, endocarditis eosinofílica (endocarditis de Loeffler), síndrome de eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, foliculitis pustulosa eosinofílica (enfermedad de Ofuji), úlceras eosinofílicas, hiperplasia angiolíinfoide con eosinofilia (ALHE), celulitis eosinofílica (síndrome de Wells), leucemia eosinofílica crónica y síndrome DRESS (Erupción cutánea por fármaco con eosinofilia y síntomas sistémicos); y enfermedades relacionadas con basófilos, que comprenden leucemia basofílica y leucocitosis basofílica.

10