

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 544**

21 Número de solicitud: 201731240

51 Int. Cl.:

C07D 241/24 (2006.01)

A61K 31/4965 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.10.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.04.2019

71 Solicitantes:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (83.3%)

Avda. de la Constitución 18

41071 Sevilla ES y

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (16.7%)

72 Inventor/es:

TORRES JAEN, María José;

MONTAÑEZ VEGA, María Isabel;

MAYORGA MAYORGA, Cristobalina;

MARTÍN-SERRANO ORTIZ, Ángela;

DOÑA DIAZ, Inmaculada y

PEREZ-INESTROSA VILLATORO, Ezequiel

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **Nuevos compuestos de tipo pirazolona para el diagnóstico de alergias a antibióticos betalactámicos**

57 Resumen:

Nuevos compuestos de tipo pirazolona, su uso para el diagnóstico de alergias a antibióticos betalactámicos, preferiblemente aminocetolsporinas y/o aminopenicilinas, y procedimiento de preparación.

ES 2 710 544 A1

DESCRIPCIÓN

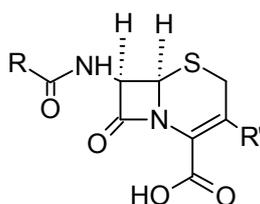
**NUEVOS COMPUESTOS DE TIPO PIRAZOLONA PARA EL DIAGNÓSTICO DE
ALERGIAS A ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS**

CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención pertenece al campo de la medicina, la farmacia y la química biológica, y se refiere, fundamentalmente, al uso y preparación de nuevos compuestos de tipo pirazolona para el diagnóstico de alergias a antibióticos betalactámicos, preferiblemente aminocefalosporinas y/o aminopenicilinas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las cefalosporinas, una clase de antibióticos betalactámicos, derivados del ácido cefalosporánico son, después de las penicilinas, los agentes antibacterianos más extensamente usados para el tratamiento y profilaxis de enfermedades infecciosas, pero también una de las principales causas de reacciones adversas inmunológicas.



Cefalosporinas

Sin embargo, a diferencia de las penicilinas, para las que se han identificado las estructuras responsables de la alergia, los metabolitos de las cefalosporinas que presentan carácter antigénico, y por tanto responsables de las respuestas inmunológicas a cefalosporinas, todavía no están totalmente caracterizados.

Aunque no se sabe con certeza en qué consiste esta estructura, sí existe una evidencia clínica e inmunoquímica de que la cadena lateral R puede contribuir a la inducción de Inmunoglobulina E (IgE) específica y así como al desarrollo de respuestas de reactividad cruzada entre diferentes cefalosporinas. De hecho, algunos pacientes pueden reaccionar selectivamente frente a la cefalosporina implicada en la reacción, otros frente a varias cefalosporinas con igual o similar cadena lateral R, (Antunez *et al. J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 404-410, 2006; Romano, A. *et al. J. Allergy Clin. Immunol.* 106, 1177-1183, 2000; Saenz de San Pedro, B. *et al. Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 89, 101-103, 2002) y un tercer grupo de pacientes puede presentar reactividad cruzada con otras betalactamas, sobre todo penicilinas, con igual o similar R (Romano, A. *et al. J. Allergy Clin. Immunol.* 106, 1177-

1183, 2000; Kelkar, P.S. *et al. N. Engl. J. Med.* 345, 804-809, 2001; Miranda, A. *et al. J. Allergy Clin. Immunol.* 98, 671-677, 1996; Novalbos, A. *et al. Clin. Exp. Allergy* 31, 438-443 (2001).

Antunez *et al.* prepararon una serie de conjugados monoméricos de cefalosporinas a butilamina, y evaluaron su reconocimiento molecular por IgE en pacientes alérgicos a diferentes cefalosporinas (Antunez *et al. J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 404-410, 2006). Como consecuencia de esta conjugación a butilamina, se forman una serie de diferentes estructuras, difíciles de caracterizar, pero se asume que la mayor parte de los conjugados formados incluyen en su estructura la cadena lateral R. En pacientes alérgicos a cefalosporinas, se observó un reconocimiento selectivo de la cadena lateral R en el 67% de los casos, con algún grado de reactividad cruzada a cefalosporinas con cadena lateral R idéntica o similar. Este estudio fue muy útil para confirmar la importancia de la cadena lateral en el reconocimiento por IgE específica a cefalosporinas, pero no da más información acerca de la estructura concreta que forma el epitopo o determinante antigénico.

Existen 3 estudios que han abordado este problema mediante la síntesis de estructuras perfectamente definidas, como posibles determinantes antigénicos de cefalosporinas, las cuales han sido evaluadas inmunológicamente.

Sánchez-Sancho *et al.* han identificado una posible estructura básica del determinante antigénico, que permanece unida a la proteína portadora en el proceso de conjugación de las cefalosporinas (Sanchez-Sancho, F. *et al. J. Mol. Recognit.* 16, 148-156, 2003). Estos investigadores postularon la formación de un conjugado cefalosporilo que sufría una fragmentación de la porción dihidrotiazina tan pronto como se formaba, dando lugar a una compleja mezcla de compuestos inestables difíciles de aislar y analizar. La estructura propuesta por estos investigadores fue una α -N-acil-L-alanilbutanamida, que comprende la cadena lateral acil R de las cefalosporinas y el residuo aminoacídico incluido en la estructura betalactámica de las cefalosporinas, perdiendo el sustituyente R'. En esta estructura propuesta, la cadena de N-butilo pretende emular la cadena alquílica de los residuos de lisina presentes en las proteínas. Sin embargo, el grupo funcional presente en el Carbono 3 de dichos derivados (llamado grupo G=CH₃) no fue totalmente determinado, puesto que éste carbono podría presentar diversas funcionalizaciones. Posteriormente se desarrollaron una serie de moléculas derivadas con diferentes grupos funcionales G (CH₂OH, C(OCH₃)₂), que demostraron refinar el reconocimiento molecular por las IgE de pacientes alérgicos a cefalosporinas (Montañez, M.I. *et al. Chem. Res. Toxicol.* 24, 706-717,

2011). Estos resultados fueron satisfactorios para una serie de cefalosporinas, pero no pudo demostrarse con las α -amino-cefalosporinas.

En el caso de las α -amino-cefalosporinas, se plantea como hipótesis que los determinantes antigénicos podrían presentar una estructura tipo pirazinona, derivada de una ciclación intramolecular del grupo amino de la cadena lateral al grupo carbonilo, que se propone que se forma en el carbono 6 del producto intermedio de aminólisis de la cefalosporina con proteínas. En el caso de las aminocefalosporinas cefaclor y cefalexina, se ha descrito la formación de un producto de degradación tipo pirazinona (1,6-dihidro-5-fenil-6-oxo-N-propilpirazin-carboxamida) al hacerlos reaccionar en el laboratorio con propilamina en medio acuoso (Venemalm, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 1869-1870, 2001). Sin embargo, la evaluación inmunoquímica de esta pirazinona no pudo realizarse debido al bajo rendimiento obtenido y la dificultad que entraña su síntesis química por otros procedimientos (síntesis total), recurriéndose a la síntesis un compuesto similar (ácido 1,6-dihidro-5-fenil-6-oxo-pirazin-acético) que se conjugó a moléculas portadoras para su evaluación inmunológica. Los resultados indican que un 60% de los pacientes con IgE positivos, mediante ImmunoCAP, al cefaclor presentaban IgE dirigida a esta estructura. No obstante, el compuesto sintetizado presenta como sustituyente en el anillo de pirazinona un radical carboximetilo, lo que supone respecto a la hipótesis de degradación *in vivo* la introducción de un grupo metileno adicional (entre el anillo de pirazinona y el grupo carbonilo) en un fragmento de la molécula con notable influencia en el reconocimiento molecular.

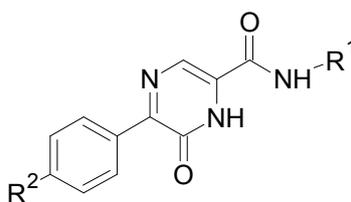
Por tanto, el hecho de que la estructura química del determinante antigénico de las cefalosporinas no se haya caracterizado totalmente, está dificultando el desarrollo de herramientas diagnósticas que permitan evaluar de manera adecuada la existencia de una reacción alérgica a este grupo de antibióticos. Actualmente, solo existe un método comercial, immunoCAP-FEIA, para detectar IgE específica a cefaclor (Ariza, A. *et al. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 25, 12-25, 2015), el cual no tiene la sensibilidad adecuada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar un método que permita la evaluación de la reacción alérgica a cefalosporinas y que presente una sensibilidad adecuada. De este modo, los autores de la presente invención han descubierto un compuesto de fórmula (I) que recrea el determinante antigénico de aminocefalosporinas, así como un método para su síntesis, que es útil para la detección de anticuerpos IgE

generados por la hipersensibilidad a betalactamas, preferiblemente aminocefalosporinas y/o aminopenicilinas.

Así pues, un **primer aspecto** de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I):



Fórmula (I)

5

o cualquiera de sus sales, tautómeros o hidratos, donde:

R1 se selecciona entre alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, alquenilo (C₂-C₁₀) lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, y alquinilo (C₂-C₁₀) lineal o ramificado, sustituido o no sustituido.

10 R2 se selecciona entre hidrógeno e hidroxilo

Con la condición de que se excluya el compuesto:

N-propil-6-oxo-5-fenil-1,6-dihidropiracín-2-carboxamida

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a una composición que comprende o consiste en al menos un compuesto de la presente invención, o cualquiera de sus combinaciones, de ahora en adelante composición de la invención.

15

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un compuesto de la invención, o una composición de la invención, para su uso en medicina.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un compuesto de la invención, o una composición de la invención, para la detección de anticuerpos IgE generados por la hipersensibilidad a betalactamas.

20

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un método de obtención de los compuestos de la invención de fórmula (I) tal y como se describe más adelante.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un método *in vitro* de obtención de datos útiles para la prevención, identificación, cribado y/o diagnóstico de la hipersensibilidad a las aminocefalosporinas de un individuo.

25

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un método *in vitro* para la prevención, identificación, cribado y/o diagnóstico de la hipersensibilidad a las aminocefalosporinas de un individuo.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende o consiste en al menos un compuesto de la invención o en la composición de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Resultados de inhibición de RAST, utilizando como inhibidores el compuesto 1, el compuesto 3 y el conjugado cefaclor-butilamina, a concentraciones 10 y 100 mM, en 10 casos de pacientes alérgicos a cefaclor.

10 **Figura 2.** Resultados de inhibición de RAST, utilizando como inhibidores el compuesto 2, el compuesto 4 y el conjugado cefadroxilo-butilamina, a concentraciones 10 y 100 mM, en 11 casos de pacientes alérgicos a amoxicilina. Los casos del grupo A presentan reactividad cruzada con bencilpenicilina mientras que los del grupo B presentan hipersensibilidad selectiva a amoxicilina.

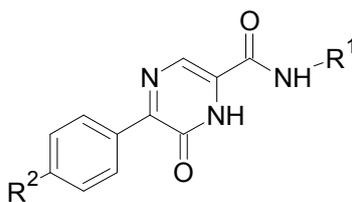
15 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

El hecho de que la estructura química del determinante antigénico de las cefalosporinas no se haya caracterizado totalmente, está dificultando el desarrollo de herramientas diagnósticas que permitan evaluar de manera adecuada la existencia de una reacción alérgica a este grupo de antibióticos.

20 Los autores de la presente invención han identificado una familia de compuestos, con estructura de pirazolona, derivados de alfa-aminocefalosporinas que permite la detección de anticuerpos IgE generados en las reacciones alérgicas a betalactamas, preferiblemente aminocefalosporinas y/o aminopenicilinas, y que eleva la sensibilidad del inmunoensayo comparado con los determinantes sintéticos propuestos hasta la fecha.

25 COMPUESTOS DE LA INVENCION

Así, un **primer aspecto** de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I):



Fórmula (I)

o cualquiera de sus sales, tautómeros o hidratos, donde:

R1 se selecciona entre alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, alquenilo (C₂-C₁₀) lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, y alquinilo (C₂-C₁₀) lineal o ramificado, sustituido o no sustituido;

R2 se selecciona entre hidrógeno, hidroxilo y alquilo, donde la cadena hidrocarbonada de la función éter es un alquilo, lineal o ramificado, de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, terc-butilo, etc.

Con la condición de que se excluya el compuesto:

10 *N*-propil-6-oxo-5-fenil-1,6-dihidropiracín-2-carboxamida

El término "alquilo" se refiere en la presente invención, y a no ser que se indique lo contrario, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo, n-hexilo, etc. Preferiblemente la cadena hidrocarbonada saturada tiene entre 1 y 6 átomos de carbono. Más preferiblemente es n-butilo. Los radicales alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico o un grupo sustituido o no seleccionado de entre amino, amida, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino o carboxiamida; preferiblemente el sustituyente es hidroxilo o azida.

20 El término "alquenilo" se refiere en la presente invención, y a no ser que se indique lo contrario, a cadenas alifáticas insaturadas con al menos un doble enlace, lineales o ramificadas, que tienen de 2 a 10 átomos de carbono.

25 El término "alquinilo" se refiere en la presente invención, y a no ser que se indique lo contrario, a cadenas alifáticas insaturadas con al menos un triple enlace, lineales o ramificadas, que tienen de 2 a 10 átomos de carbono.

En la presente invención, las cadenas hidrocarbonadas insaturadas, alquenilo y alquinilo, pueden estar opcionalmente sustituidas por uno o más sustituyentes tales como

halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico o un grupo sustituido o no sustituido seleccionado de entre amino, amida, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino o carboxiamida; preferiblemente el sustituyente es hidroxilo o azida.

5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, R1 es un alquilo (C₁-C₁₀) lineal o ramificado, sustituido o no sustituido; mas preferiblemente es un n-butilo.

En otra realización preferida de este aspecto, R1 está sustituido por un grupo azida o un grupo alcohol; preferiblemente R1 es un alquilo sustituido; y aun más preferiblemente R1 es un n-butilo sustituido.

En otra realización preferida de este aspecto, R2 es hidrógeno o hidroxilo.

10 En otra realización preferida de este aspecto, el compuesto se selecciona de la lista que consiste en *N*-butil-6-oxo-5-fenil-1,6-dihidropiracín-2-carboxamida y/o *N*-butil-5-(4-hidroxifenil)-6-oxo-1,6-dihidropiracín-2-carboxamida o cualquiera de sus sales, tautómeros o hidratos.

15 En otra realización preferida de este aspecto, los compuestos de fórmula (I) de la presente invención están unidos a moléculas portadoras o soporte sólido. Ejemplos ilustrativos, no limitantes, de moléculas portadoras son proteínas, polímeros sintéticos (como poli-L-Lisina (PLL)), y dendrímeros. Ejemplos ilustrativos, no limitantes, de soporte sólido son nanopartículas, micropartículas, esferas/láminas de sílice, celulosa, zeolitas, plástico, látex, vidrio, Sepharose (material polimérico polisacárido) y fenil-octil Sepharose CL4B; más
20 preferiblemente los compuestos de fórmula (I) de la presente invención están unidos a dendrímeros.

La unión a moléculas portadoras o soporte sólido se puede realizar, pero sin limitarnos, a través de al menos un sustituyente presente en la cadena hidrocarbonada R1, en base a la reactividad general de tal sustituyente, y siguiendo las metodologías habitualmente
25 descritas en la materia. Preferiblemente tal sustituyente es hidroxilo o azida.

COMPOSICIÓN DE LA INVENCION

Otro **aspecto** de la invención se refiere a una composición que comprende o consiste en al menos un compuesto de la presente invención, o cualquiera de sus combinaciones, y a la que nos referimos de ahora en adelante como composición de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la concentración del compuesto de la invención se encuentra entre 0.5 mM y 500 mM, más preferiblemente entre 10 mM y 200 mM, y aún más preferiblemente es 100 mM.

5 En otra realización preferida de este aspecto, la composición comprende al menos otro principio activo.

Como se emplea en esta invención el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o
10 prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

15 En otra realización preferida de este aspecto, la composición además comprende al menos un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización alternativa de este aspecto, la composición consiste en al menos un compuesto de la presente invención, o cualquiera de sus combinaciones como único o
únicos principios activos, aunque puede comprender excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

20 En otra realización preferida, la composición de la invención es una composición farmacéutica.

Asimismo, dentro del alcance de la presente invención se encuentran los profármacos de las composiciones farmacéuticas de la invención. El término "prodroga" o "profármaco" tal y como aquí se utiliza incluye cualquier derivado de un compuesto de la invención, tal y como
25 un compuesto de fórmula (I), que al ser administrado a un individuo o adicionada a una muestra biológica aislada de un individuo puede ser transformado directa o indirectamente en dicho compuesto, tal y como el compuesto de fórmula (I), en el mencionado individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto cuando se administra a un individuo o adicionada a una muestra biológica
30 aislada de un individuo o que potencia la liberación del compuesto en un compartimento biológico. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Dentro del alcance de la presente invención se encuentran los "derivados" que incluyen tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que puedan ser utilizados en la elaboración de un medicamento o composiciones alimentarias, como derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser
5 útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables. Los derivados pueden incluir estereoisómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples, o de centros quirales. Los estereoisómeros (enantiómeros, diaestereoisómeros, formas meso) y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término estereoisómero también se refiere a cualquier mezcla de estereoisómeros
10 (racémicos o mezclas en distintas proporciones de los distintos estereoisómeros). Los diaestereoisómeros, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Cualquiera de los compuestos de la invención puede estar en forma cristalina, o en estado líquido, por ejemplo aceites, como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el
15 término "solvato", tal y como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto que puedan ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica, siempre y cuando sea
20 farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

Para su aplicación en diagnóstico o terapia como composiciones farmacéuticas, los compuestos de la invención, sus sales, profármacos o solvatos, se encontrarán,
25 preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tengan un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al
30 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

Por otro lado, hacemos notar que los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en las composiciones farmacéuticas de la invención son los

adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con
5 otros fármacos o principios activos adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea, o no, a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato del mismo.

10 USOS MÉDICOS DE LA INVENCION

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un compuesto de la invención, o una composición de la invención, para su uso en medicina, o alternativamente al uso del compuesto de la invención o una composición de la invención en la elaboración de un medicamento.

Los compuestos de la presente invención pueden emplearse para el diagnóstico de alergias
15 a antibióticos con estructuras de tipo betalactamas.

Por tanto, otro **aspecto** de la invención se refiere a un compuesto de la invención, o una composición de la invención, para la detección de anticuerpos IgE generados por la hipersensibilidad a betalactamas, o alternativamente, al uso de al menos un compuesto de la invención, o una composición de la invención, en la elaboración de un medicamento para
20 la detección de anticuerpos IgE generados por la hipersensibilidad a betalactamas.

En una realización preferida de este aspecto, las betalactamas son aminopenicilinas y/o aminocefalosporinas; más preferiblemente las betalactamas son aminocefalosporinas, y aun más preferiblemente cefaclor y cefadroxilo.

En otra realización preferida de la invención, el compuesto para uso en medicina o para la
25 detección de anticuerpos IgE generados por la hipersensibilidad a betalactamas se selecciona de la lista que consiste en N-butil-6-oxo-5-fenil-1,6-dihidropiracin-2-carboxamida y/o N-butil-5-(4-hidroxifenil)-6-oxo-1,6-dihidropiracin-2-carboxamida o cualquiera de sus sales, tautómeros o hidratos.

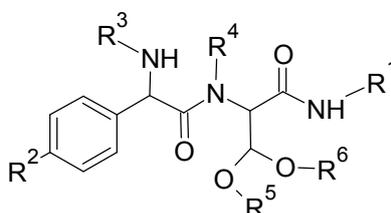
*El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia
30 usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y*

los animales. En el contexto de la presente invención, se emplea para el diagnóstico de alergias a compuestos con estructuras de tipo beta lactamas.

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS

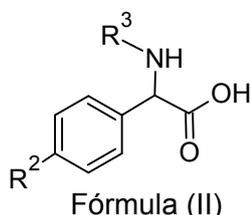
Otro **aspecto** de la invención se refiere a un método de obtención de los compuestos de la invención de fórmula (I), de ahora en adelante primer método de la invención, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

(1) Obtención de un compuesto de fórmula (VI)

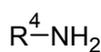


Fórmula (VI)

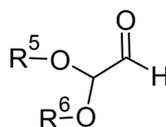
10 haciendo reaccionar los compuestos de fórmula (II), (III), (IV) y (V) en un disolvente orgánico



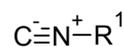
Fórmula (II)



Fórmula (III)



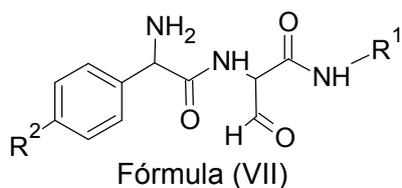
Fórmula (IV)



Fórmula (V)

15 donde R3 y R4 son grupos protectores de aminas que se seleccionan de forma independiente; donde el compuesto de formula (IV) presenta en posición alfa al grupo aldehído un grupo acetal como grupo protector de un grupo carbonilo, de modo que R5 y R6 se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en cadena carbonada lineal, ramificada, cíclica, heterocíclica, saturada e insaturada, por ejemplo metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, etc.; y donde R5 y R6 también pueden estar unidos por un enlace covalente carbono-carbono formando un acetal cíclico, por ejemplo del tipo 1,3-dioxolanos o 1,3-dioxanos; y donde R1 y R2 se definen tal y como se han definido los compuestos de
20 fórmula (I) de la presente invención.

(2) obtención de un compuesto fórmula (VII) a partir del compuesto de fórmula (VI) por eliminación de los grupos protectores de aminas R3 y R4 y ruptura del acetal formado por –OR5 y –OR6.



(3) obtención de un compuesto de fórmula (I) por ciclación intramolecular del compuesto de fórmula (VII), a través de un ataque nucleofílico del grupo amino primario sobre el grupo aldehído, y posterior aromatización.

- 5 Dicho método también sirve para la obtención del compuesto *N*-propil-6-oxo-5-fenil-1,6-dihidropiracín-2-carboxamida.

Como se utiliza en la presente invención el término “grupo protector de aminas” se entiende, a menos que se indique expresamente lo contrario, un grupo de los utilizados habitualmente en química orgánica que puede estar unido a un átomo de nitrógeno para proteger dicho
 10 átomo de nitrógeno de participar en una reacción no deseada y que puede retirarse fácilmente después de la reacción. Ejemplos ilustrativos de estos grupos protectores, pero sin limitarse, son un grupo *t*-butoxicarbonilo (Boc), fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), benciloxicarbonilo (CBz) o 2,5-dimetoxibencilo. Otros grupos protectores adecuados pueden encontrarse en textos tales como Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis,
 15 4th ed.; Wuts, P. G. M.; Greene, T. W.; John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey, 2007.

La eliminación de los grupos protectores y ruptura del acetal del paso (2) tiene lugar según métodos conocidos en la bibliografía y que pueden encontrarse en textos tales como el anterior. Por ejemplo, el grupo Boc puede escindirse con medio ácido, el grupo CBz con medio ácido o con H₂/Pd, etc.

- 20 En una realización preferida de este aspecto de la invención, R3 y R4 se seleccionan de forma independiente entre *tert*-butoxicarbonilo (Boc), 2,5-dimetoxibencilo, tritilo, fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y benciloxicarbonil (CBz); más preferiblemente R3 es *tert*-butoxicarbonilo (Boc) y R4 es 2,5-dimetoxibencilo.

En otra realización preferida de este aspecto, R5 y R6 son cadenas carbonadas lineales o
 25 ramificadas (C₁-C₅) que se seleccionan de forma independiente; más preferiblemente son metilos.

En otra realización preferida de este aspecto, R5 y R6 se encuentran unidas por un enlace carbono-carbono formando un acetal cíclico de 5 o 6 miembros; más preferiblemente un acetal cíclico de 5 miembros.

En otra realización preferida de este aspecto, R3 es tert-butoxicarbonilo (Boc), R4 es 2,5-dimetoxibencilo, y R5 y R6 son metilos.

En otra realización preferida de este aspecto, la etapa (2) de desprotección se lleva a cabo por tratamiento del compuesto de fórmula (VI) con un medio ácido, y opcionalmente con un
5 tratamiento previo o posterior con un medio básico suave.

En otra realización preferida de este aspecto, la etapa (2) se lleva a cabo por tratamiento del compuesto de fórmula (VI) con un medio ácido; más preferiblemente el medio ácido es una disolución de ácido trifluoroacético (TFA).

En otra realización preferida de este aspecto, las etapas (2) y (3) del método se realizan en
10 un único paso de reacción por tratamiento del compuesto de fórmula (VI) con un medio ácido; más preferiblemente el medio ácido es una disolución de ácido trifluoroacético (TFA); aún más preferiblemente es una disolución de ácido trifluoroacético (TFA) en un disolvente orgánico clorado; y aún más preferiblemente es ácido trifluoroacético (TFA) al 30% en dicloroetano.

15 METODO DE LA INVENCION

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un método *in vitro* de obtención de datos útiles para la prevención, identificación, cribado y/o diagnóstico de la hipersensibilidad a las aminocefalosporinas de un individuo, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende o consiste en los siguientes pasos:

- 20 a. Recoger una muestra de sangre de un sujeto, e incubar su suero con un compuesto o una composición tal y como se han definido en la presente invención;
- b. Cuantificar la cantidad de anticuerpos IgE específicos que se generan contra el compuesto del apartado a); y
- c. comparar la cantidad obtenida en la etapa b) con la cantidad obtenida en una
25 muestra control negativa.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la cuantificación de la etapa b) se lleva a cabo mediante una técnica seleccionada de entre el grupo que consiste en: RAST (test de radioalergoadsorción), ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), FAST (test de fluorescencia alergoadsorción), MAST (test múltiple de
30 quimioluminiscenciaalergoadsorción), LAST (test látex-alergoadsorción), e inmunoensayo

realizado en soporte de microarray con detección fluorescente; más preferiblemente se lleva a cabo mediante RAST.

La muestra control puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Las comparaciones descritas en los métodos de la presente invención pueden ser realizadas manualmente o asistida por ordenador.

Los pasos (a), (b) y/o (c), del método descrito anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la cuantificación en el paso (a) y (b) o la comparación en el paso (c).

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un método *in vitro* para la prevención, identificación, cribado y/o diagnóstico de la hipersensibilidad a las aminocefalosporinas de un individuo, de ahora en adelante tercer método de la invención, que comprende los pasos (a) – (c) según se han descrito en el segundo método de la invención, y además comprende:

d. diagnosticar al individuo como alérgico cuando el valor obtenido en la etapa c) es superior al control negativo.

Un "individuo" o "sujeto", como se usa aquí, se refiere a un mamífero, humano o no humano, en observación, y más preferiblemente un ser humano. El individuo puede ser cualquiera, un individuo predispuesto a la alergia a las aminocefalosporinas o un individuo que padece la alergia.

20 KIT O DISPOSITIVO DE LA INVENCION

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende o consiste en al menos un compuesto de la invención o en la composición de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención además comprende los elementos necesarios para la realización de un test de detección de anticuerpos Inmunoglobulina E (IgE) generados en reacciones alérgicas a aminocefalosporinas.

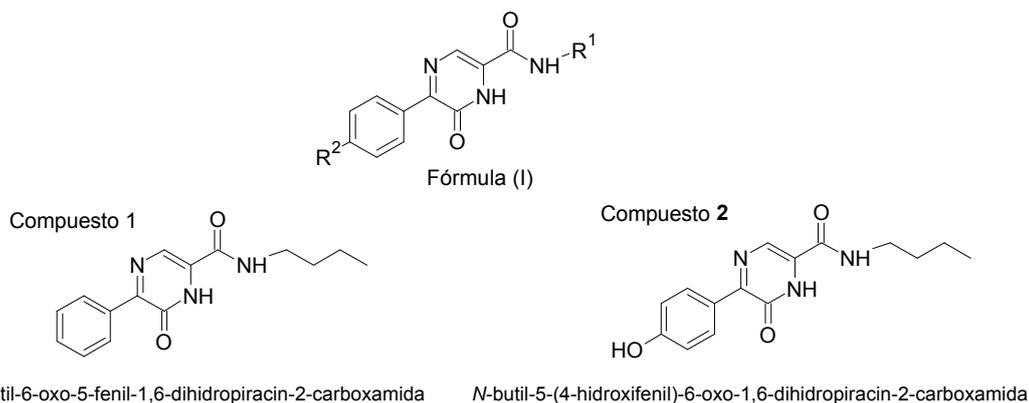
En otra realización alternativa de este aspecto, el kit o dispositivo consiste en al menos un compuesto de la invención o en la composición de la invención, aunque además puede comprender los elementos necesarios para la realización de un test de detección de

anticuerpos Inmunoglobulina E (IgE) generados en reacciones alérgicas a aminocefalosporinas.

El kit o dispositivo de la invención puede incluir otro dispositivo adicional para la toma de la muestra biológica aislada, preferiblemente suero sanguíneo.

5 EJEMPLO DE LA INVENCION

A continuación se ilustra la invención mediante la síntesis de algunos compuestos químicos que responden a la formula general (I), tal y como se define en la presente invención, junto con ensayos inmunoquímicos realizados por los inventores con estos compuestos sintéticos y que ponen de manifiesto su utilidad en el campo de la medicina y química biológica, y en particular, para la detección de anticuerpos IgE generados en las reacciones alérgicas a aminocefalosporinas.



Síntesis y caracterización de los compuestos sintetizados

Se emplean cantidades equimolares de todos los reactivos: solución acuosa al 60% de 2,2-dimetoxiacetaldehído, isocianuro de butilo, 2,5-dimetoxibencilamina y N-Boc-fenilglicina (para la síntesis del compuesto 1) o N-Boc-hidroxifenilglicina (para la síntesis del compuesto 2), y se dejan reaccionar en metanol a temperatura ambiente durante un mínimo de 48 horas. Cuando la reacción ha terminado se añade diclorometano (CH₂Cl₂) y dos equivalentes de ácido para-toluensulfónico soportado sobre una resina de poliestireno (PS-p-TsOH) y se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante un mínimo de una hora para la eliminación de posibles restos del isocianuro. Transcurrido ese tiempo, se filtra para eliminar PS-p-TsOH y éste se lava tres veces con methanol (MeOH), acetato de etilo (AcOEt) y diclorometano (CH₂Cl₂). Las fracciones orgánicas se unen y se elimina los disolventes para obtener un residuo que corresponde al aducto de UGI. Para la etapa de desprotección, se añade ácido trifluoracético (TFA) al 30% en dicloroetano (DCE) y se

mantiene a reflujo (80°C) durante dos horas, tiempo tras el cual se deja enfriar, se basifica con disolución saturada de NaHCO₃ hasta pH 8 y se extrae con AcOEt. La fase orgánica se seca sobre MgSO₄ anhidro y, tras eliminar el disolvente, se obtiene un sirope amarillo que se purifica mediante cromatografía en gel de sílica con mezclas de CH₂Cl₂/MeOH para
5 obtener el compuesto final (compuesto 1 o en su caso compuesto 2) en forma de sólido amarillo. Las estructuras se caracterizaron mediante resonancia magnética nuclear (RMN-¹H, RMN-¹³C) y espectrometría de masas (EM).

Compuesto 1: N-butil-6-oxo-5-fenil-1,6-dihidropiracin-2-carboxamida

RMN-¹H (400 MHz, MeOD): δ (ppm) 8.52 (s, 1H; N-CH=CCO), 8.19 (m, 2H; Ar-ortho), 7.45
10 (m, 3H; Ar-meta+para), 3.41 (t, ³J(H,H) = 7.2 Hz, 2H; -CONH-CH₂-), 1.62 (m, 2H; -CH₂-CH₂-CH₂-), 1.43 (m, 2H; -CH₂-CH₂-CH₃), 0.98 (t, ³J(H,H) = 7.6 Hz, 3H; -CH₂-CH₃).

RMN-¹³C (100 MHz, MeOD): δ (ppm) 164.3, 157.7, 149.8, 136.9, 133.5, 131.0, 130.29, 129.1(x2), 40.41, 32.61, 21.14, 14.08.

ESI EM calculado para C₁₅H₁₇N₃O₂ (M + H)⁺ 271.13, encontrado: 272.1393.

15 Compuesto 2: N-butil-5-(4-hidroxifenil)-6-oxo-1,6-dihidropiracin-2-carboxamida

RMN-¹H (400 MHz, MeOD): δ (ppm) 8.39 (s, 1H; N-CH=CCO), 8.17 (d, ³J(H,H) = 9.5 Hz, 2H; Ar-ortho), 6.86 (d, ³J(H,H) = 9.5 Hz, 2H; Ar-meta), 3.39 (t, 2H; -CONH-CH₂-), 1.60 (m, 2H; -CH₂-CH₂-CH₂-), 1.40 (m, 2H; -CH₂-CH₂-CH₃), 0.97 (t, ³J(H,H) = 7.6 Hz, 3H; -CH₂-CH₃).

RMN-¹³C (150 MHz, MeOD): δ (ppm) 164.1, 160.9, 157.1, 150.5, 135.6, 131.7, 130.4, 128.0,
20 115.9, 40.4, 32.6, 21.1, 14.1.

ESI EM calculado para C₁₅H₁₇N₃O₃ (M + H)⁺ 287.13, encontrado: 288.1342.

Estudio del reconocimiento de las estructuras sintéticas por anticuerpos IgE específicos

El estudio del reconocimiento de las estructuras sintéticas tipo (I) por anticuerpos IgE
25 específicos se han realizado por estudios de inhibición competitiva de inmunoensayo RAST, usando suero humano de pacientes que han ido padeciendo reacciones alérgicas a aminocefalosporinas (concretamente cefaclor) o penicilinas que poseen las mismas cadenas laterales (concretamente amoxicilina). En estos estudios de inhibición se ha empleado como fase sólida discos activados con BrCN, acoplados a PLL y conjugados a la
30 betalactama que provocó el episodio alérgico de cada paciente. Como productos en fase fluida se han utilizado las estructuras sintéticas tipo (I).

Antes de realizar el estudio de inhibición con las nuevas estructuras sintéticas, es necesario hacer el RAST directo para poder conocer a qué es alérgico cada paciente.

Radioinmunoensayo para la determinación de IgE: RAST

5 La determinación in vitro de la presencia de anticuerpos IgE se realizó por RAST a cefaclor, amoxicilina y bencilpenicilina, empleando como fase sólida discos de celulosa funcionalizados con cada uno de los fármacos conjugados a poli-L-Lisina.

A partir de sangre periférica se obtuvo el suero que se mantuvo a -20°C hasta su inclusión en los ensayos. Brevemente, los ensayos se realizan por duplicado, incubando 30 µl de suero con la fase sólida previamente funcionalizada con los conjugados betalactama-PLL durante 3 horas. Tras tres lavados con tampón PBS-tween, se añade anti-IgE marcada radioactivamente y se deja incubando durante toda la noche. Los discos se lavan 3 veces con tampón PBS-tween y su radiactividad se mide con un contador gamma. Los resultados se calculan como un porcentaje respecto a un máximo y se consideraron positivos si eran superiores a 2%, valor resultado de la media (M) más dos desviaciones estándar (SD) de un grupo control negativo.

Estudio del reconocimiento inmunoquímico: Inhibición de RAST

Para determinar el reconocimiento de los anticuerpos IgE a las diferentes estructuras sintéticas se realizaron inmunoensayos competitivos en aquellos sueros que mostraron unos niveles altos de RAST (>7%). Para ello, en la fase sólida se usó la betalactama implicada en la reacción alérgica conjugada a PLL. El test de inhibición del RAST consiste en un estudio de competición entre los conjugados en fase fluida frente a un conjugado en fase sólida, por captar la IgE específica disponible en fase fluida. Los resultados se calcularon a través de la siguiente fórmula: % Inhibición = (%RAST suero no inhibido - %RAST suero inhibido) x 100 / %RAST suero no inhibido.

25 En particular, el test de inhibición del RAST se realizó incubando en la fase fluida el suero de los pacientes a diferentes concentraciones (100 mM y 10 mM) de los compuestos de fórmula (I) durante toda la noche (16h). Posteriormente se añade la fase sólida para su incubación y se sigue el mismo protocolo empleado para el RAST. El test de inhibición del RAST se considera significativo, esto es, que las IgE muestran un reconocimiento específico, cuando la inhibición del RAST es igual o superior al 50%.

Resultados:

Se han sintetizado moléculas derivadas de cefaclor y cefadroxilo, que corresponden a determinantes antigénicos de fórmula (I) (Compuesto 1 y Compuesto 2) de acuerdo con la degradación de aminocefalosporinas. La estrategia sintética empleada ha consistido en la reacción de Ugi/Desprotección/Ciclación (UDC). Esta estrategia ha empleado la reacción multicomponente de Ugi (U-4CR), en la que se emplean simultáneamente un aldehído o cetona, un isocianuro, una amina y un ácido carboxílico para dar lugar a una bisamida (aducto de Ugi). En dicho aducto, el aldehído y los grupos amino están adecuadamente protegidos. La posterior eliminación de los grupos protectores y aromatización, da lugar a estructuras tipo pirazinona. Se trata de un método bastante eficiente en el que todos los productos de partida son comerciales y la molécula objetivo se consigue tras sólo dos pasos sintéticos y una etapa de purificación.

Se evaluó el reconocimiento inmunológico de estos nuevos compuestos 1 y 2 (estructuras tipo pirazinona), junto con determinantes sintéticos anteriormente descritos (Compuesto 3 y Compuesto 4 – estructuras en Figura 1 y Figura 2. Montañez, M.I. *et al.* Chem. Res. Toxicol. 24, 706-717, 2011) y los conjugados monoméricos con butilamina (Antunez *et al.* J. Allergy Clin. Immunol. 117, 404-410, 2006) mediante estudios de inhibición del radioalergosorbent test (RAST) empleando suero de pacientes alérgicos a betalactamas. De esta manera se comparó el reconocimiento de las estructuras sintéticas perfectamente definidas, compuesto 1 y compuesto 2, con la mezcla de compuestos resultante de la conjugación cefalosporina-butilamina.

La evaluación inmunológica de las estructuras derivadas de cefaclor (1, 3 y cefaclor-butilamina) se realizó a dos concentraciones (100 y 10 mM) con 10 sueros de pacientes alérgicos a cefaclor. El ensayo consiste en una competición entre el reconocimiento de la IgE por la fase sólida (poli-L-lisina-cefaclor) vs los inhibidores (compuesto 1, compuesto 3 y cefaclor-butilamina) en fase fluida. Los resultados de inhibición de RAST se muestran en la Figura 1.

Los resultados comparando ambas estructuras sintéticas, a concentración 100 mM, mostraron que en el 70% de los casos el compuesto 1 presentó un mayor porcentaje de inhibición, es decir mayor reconocimiento, que el compuesto 3. En general, a concentración 10 mM, el reconocimiento decayó siendo similar para ambas estructuras. Considerando el porcentaje de inhibición significativo cuando es mayor al 50%, el reconocimiento a la concentración más alta, fue significativo en el 50% de los casos para el compuesto 1, en el 30% para el compuesto 3 y en el 60% de los casos para el conjugado cefaclor-butilamina.

La evaluación inmunológica de las estructuras derivadas de cefadroxilo (2, 4 y cefadroxilo-butilamina) se realizó a dos concentraciones (de 100 y 10 mM) con un grupo de pacientes con reactividad cruzada amoxicilina/bencilpenicilina (6 casos) y otro grupo con hipersensibilidad selectiva a amoxicilina (5 casos), todos con RAST directo positivo a cefadroxilo. El ensayo consiste en una competición entre el reconocimiento de la IgE por la fase sólida (poli-L-lisina-amoxicilina) vs los inhibidores (compuesto 2, compuesto 4 y cefadroxilo-butilamina) en fase fluida. Los resultados de inhibición de RAST se muestran en la Figura 2.

Los resultados comparando ambas estructuras sintéticas en 6 pacientes con reactividad cruzada, a concentración 100 mM, considerando el porcentaje de inhibición significativo cuando es mayor al 50%, mostraron que el reconocimiento fue significativo en el 50% de los casos para el compuesto 2, en el 83% de los casos para el compuesto 4 y en el 100% de los casos para el conjugado cefadroxilo-butilamina.

Los resultados comparando ambas estructuras sintéticas en 5 pacientes con hipersensibilidad selectiva a amoxicilina, a concentración 100 mM, mostraron que el reconocimiento fue significativo en el 40% de los casos tanto para el compuesto 2 como para el compuesto 4, y en el 80% de los casos para el conjugado cefadroxilo-butilamina.

Estos resultados confirman que el reconocimiento en caso de los pacientes con reactividad cruzada a otras betalactamas va dirigida a la región nuclear de la misma (anillo betalactámico), presente en la estructura 4 y modificada en la estructura 2. Por el contrario, en los pacientes con hipersensibilidad selectiva, el reconocimiento de ambas estructuras sintéticas es muy similar, tal como cabía esperar debido a que el reconocimiento está dirigido a la cadena lateral R1, presente en ambas estructuras.

Los resultados englobando los 11 casos de pacientes alérgicos a amoxicilina muestran un 54% de casos en los que el compuesto 2 inhibe más que el 4. Sin embargo, considerando el porcentaje de inhibición significativo cuando es mayor al 50%, el reconocimiento fue significativo en el 45% de los casos para la estructura 2, el 64% para la estructura 4 y el 91% para el conjugado cefadroxilo-butilamina.

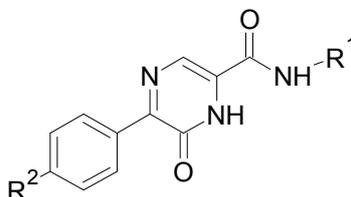
Conclusión: se han preparado con éxito estructuras bien definidas, que corresponden a determinantes sintéticos de fórmula (I) derivados de las aminocefalosporinas (con las cadenas laterales de cefaclor y cefadroxilo). Estos compuestos son reconocidos por las IgE de pacientes alérgicos a aminocefalosporinas y/o penicilinas en mayor grado que las estructuras sintéticas previamente descritas. Su empleo como inhibidores en la inhibición

del RAST es útil para determinar el grado de reconocimiento y si existen reactividades cruzadas. El uso de estas estructuras ancladas a fase sólida en la cuantificación de IgE específica mediante RAST, puede incrementar la sensibilidad del ensayo.

Estas estructuras de fórmula (I) abarcan también los correspondientes determinantes antigénicos de otras aminocefalosporinas con las mismas cadenas laterales R1, como cefprozilo, cefaloglicina y cefalexina.

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de formula general (I):



Fórmula (I)

o cualquiera de sus sales, tautómeros o hidratos, donde:

- 5 R1 se selecciona entre alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, alqueniilo (C₂-C₁₀) lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, y alquinilo (C₂-C₁₀) lineal o ramificado, sustituido o no sustituido.
- R2 se selecciona entre hidrógeno e hidroxilo
- Con la condición de que se excluya el compuesto:
- 10 *N*-propil-6-oxo-5-fenil-1,6-dihidropiracin-2-carboxamida
- 2.- El compuesto según la reivindicación 1, donde R1 es un alquilo (C₁-C₁₀) lineal o ramificado, sustituido o no sustituido.
- 3.- El compuesto según las reivindicaciones 1-2, donde R1 está sustituido por un grupo azida o un grupo alcohol
- 15 4.- El compuesto según las reivindicaciones 1-2, donde R1 es butilo
- 5.- El compuesto según las reivindicaciones 1 a 4, donde R2 es hidrógeno
- 6.- El compuesto según las reivindicaciones 1 a 4, donde R2 es hidroxilo
- 7.- Una composición que comprende al menos un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o cualquiera de sus combinaciones.
- 20 8.- La composición según la reivindicación anterior, que además comprende al menos un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 9.- Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, para su uso en medicina.

10.-Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7-8 para la detección de anticuerpos IgE generados por la hipersensibilidad a beta-lactamas.

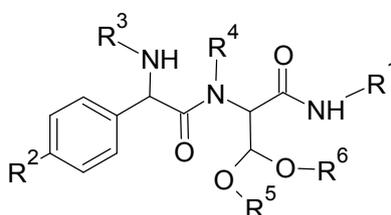
11.- El compuesto o la composición según la reivindicación anterior donde las betalactamas son aminopenicilinas y/o aminocefalosporinas.

12.- El compuesto o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, donde las betalactamas son aminocefalosporinas, preferiblemente cefaclor y cefadroxilo.

13.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 9-12, seleccionado de la lista que consiste en N-butil-6-oxo-5-fenil-1,6-dihidropiracin-2-carboxamida y/o N-butil-5-(4-hidroxifenil)-6-oxo-1,6-dihidropiracin-2-carboxamida o cualquiera de sus sales, tautómeros o hidratos

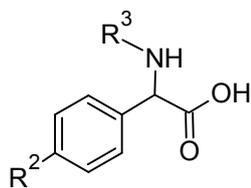
14.- Un método de obtención de un compuesto de fórmula (I) como el descrito en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

(1) Obtención de un compuesto de fórmula (VI)

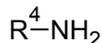


Fórmula (VI)

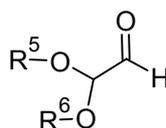
haciendo reaccionar los compuestos de fórmula (II), (III), (IV) y (V) en un disolvente orgánico



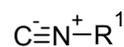
Fórmula (II)



Fórmula (III)



Fórmula (IV)

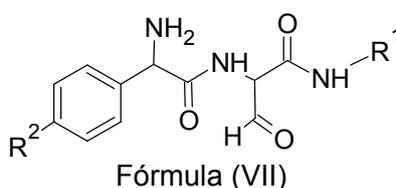


Fórmula (V)

20 donde R³ y R⁴ son grupos protectores de aminas que se seleccionan de forma independiente; donde el compuesto de formula (IV) presenta en posición alfa al grupo aldehído un grupo acetal como grupo protector de un grupo carbonilo, de modo que R⁵ y

R6 se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en cadena carbonada lineal, ramificada, cíclica, heterocíclica, saturada e insaturada y donde R5 y R6 también pueden estar unidos por un enlace covalente carbono-carbono formando un acetal cíclico; y donde R1 y R2 se definen tal y como se han definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

(2) obtención de un compuesto fórmula (VII) a partir del compuesto de fórmula (VI) por eliminación de los grupos protectores de aminas R3 y R4 y ruptura del acetal formado por –OR5 y –OR6.



(3) obtención de un compuesto de fórmula (I) por ciclación intramolecular del compuesto de fórmula (VII), a través de un ataque nucleofílico del grupo amino primario sobre el grupo aldehído, y posterior aromatización.

15.- El método según la reivindicación anterior, donde R3 y R4 se seleccionan de forma independiente entre tert-butoxicarbonilo (Boc), 2,5-dimetoxibencilo, tritilo, fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y benciloxicarbonilo (CBz).

16.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 14-15, donde R4 es tert-butoxicarbonilo (Boc), R5 es 2,5-dimetoxibencilo y R5 y R6 son metilos.

17.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 14-16, donde la etapa (2) se lleva a cabo por tratamiento del compuesto de fórmula (VI) con un medio ácido, y opcionalmente con un tratamiento previo o posterior con un medio básico suave.

18.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 14-16, donde la etapa (2) se lleva a cabo por tratamiento del compuesto de fórmula (VI) con un medio ácido.

19.- El método según la reivindicación anterior donde las etapas (2) y (3) se realizan en un único paso de reacción por tratamiento del compuesto de fórmula (VI) con un medio ácido.

20.- Un método *in vitro* de obtención de datos útiles para diagnosticar la hipersensibilidad a las aminocefalosporinas que comprende los siguientes pasos:

a. Recoger una muestra de sangre de un sujeto, e incubar su suero con un compuesto, tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o con una composición, tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 7-8;

5 b. Cuantificar la cantidad de anticuerpos IgE específicos que se generan contra el compuesto del apartado a);

c. comparar la cantidad obtenida en la etapa b) con la cantidad obtenida en una muestra control negativa; y

21.- Un método *in vitro* para diagnosticar la hipersensibilidad a las aminocetolsporinas que
10 comprende los pasos (a), (b) y (c) según la reivindicación anterior, y además comprende:

d. diagnosticar al individuo como alérgico cuando el valor obtenido en la etapa c) es superior al control negativo.

22. El método según cualquiera de las reivindicaciones 20-21, en el que el paso (b) se lleva
15 a cabo mediante una técnica seleccionada de entre el grupo que consiste en: RAST (test de radioalergoadsorción), ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), FAST (test de fluorescencia alergoadsorción), MAST (test múltiple de quimioluminiscenciaalergoadsorción), LAST (test látex-alergoadsorción), e inmunoensayo realizado en soporte de microarray con detección fluorescente.

23.- Un kit o dispositivo que comprende al menos un compuesto según cualquiera de las
20 reivindicaciones 1-6 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7-8.

24.- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior que además comprende los elementos necesarios para la realización de un test de detección de anticuerpos Inmunoglobulina E (IgE) generados en reacciones alérgicas a aminocetolsporinas.

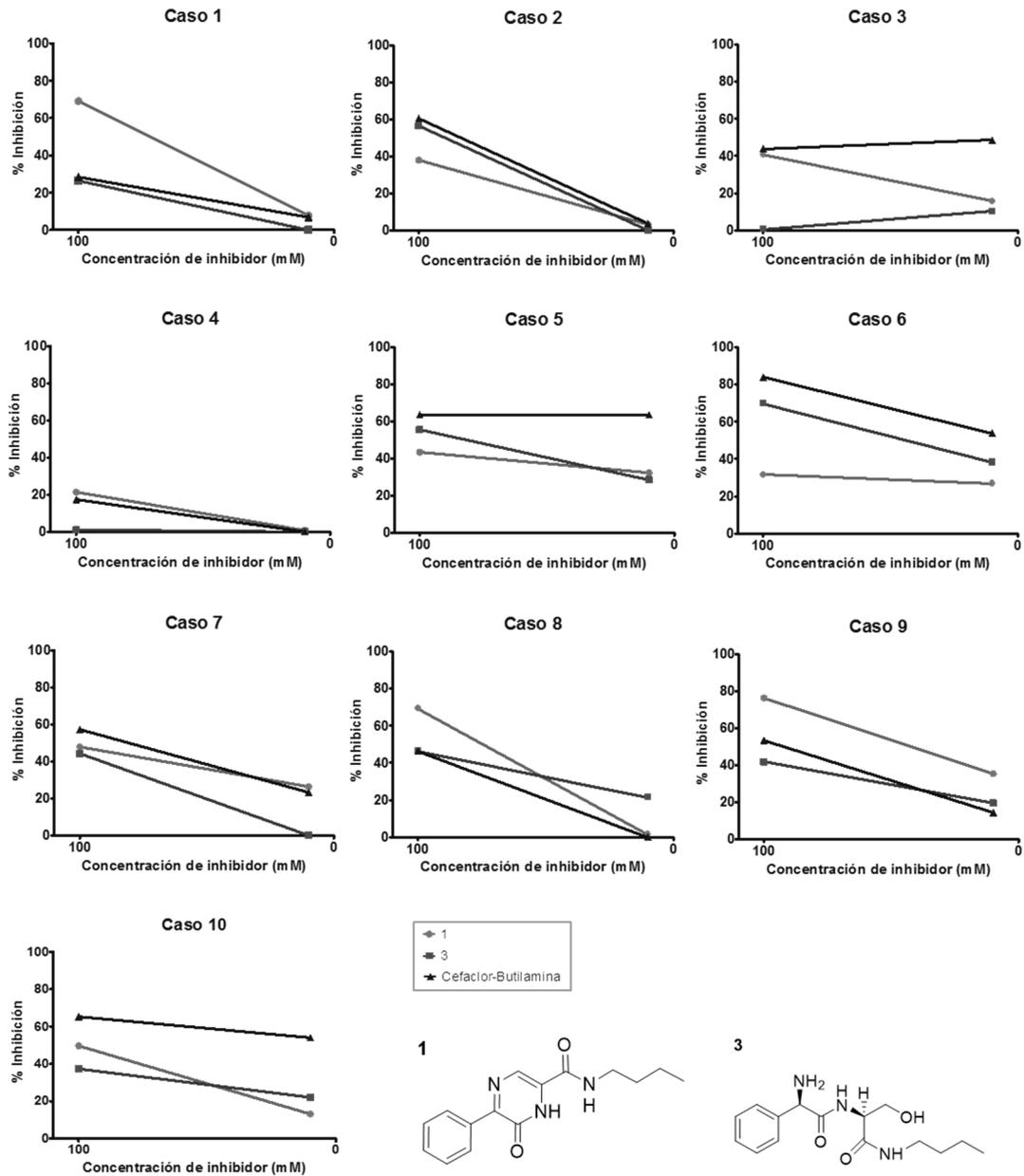


Figura 1

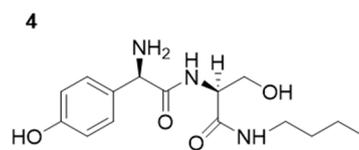
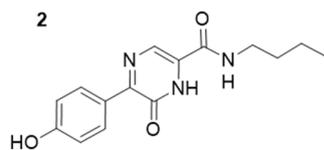
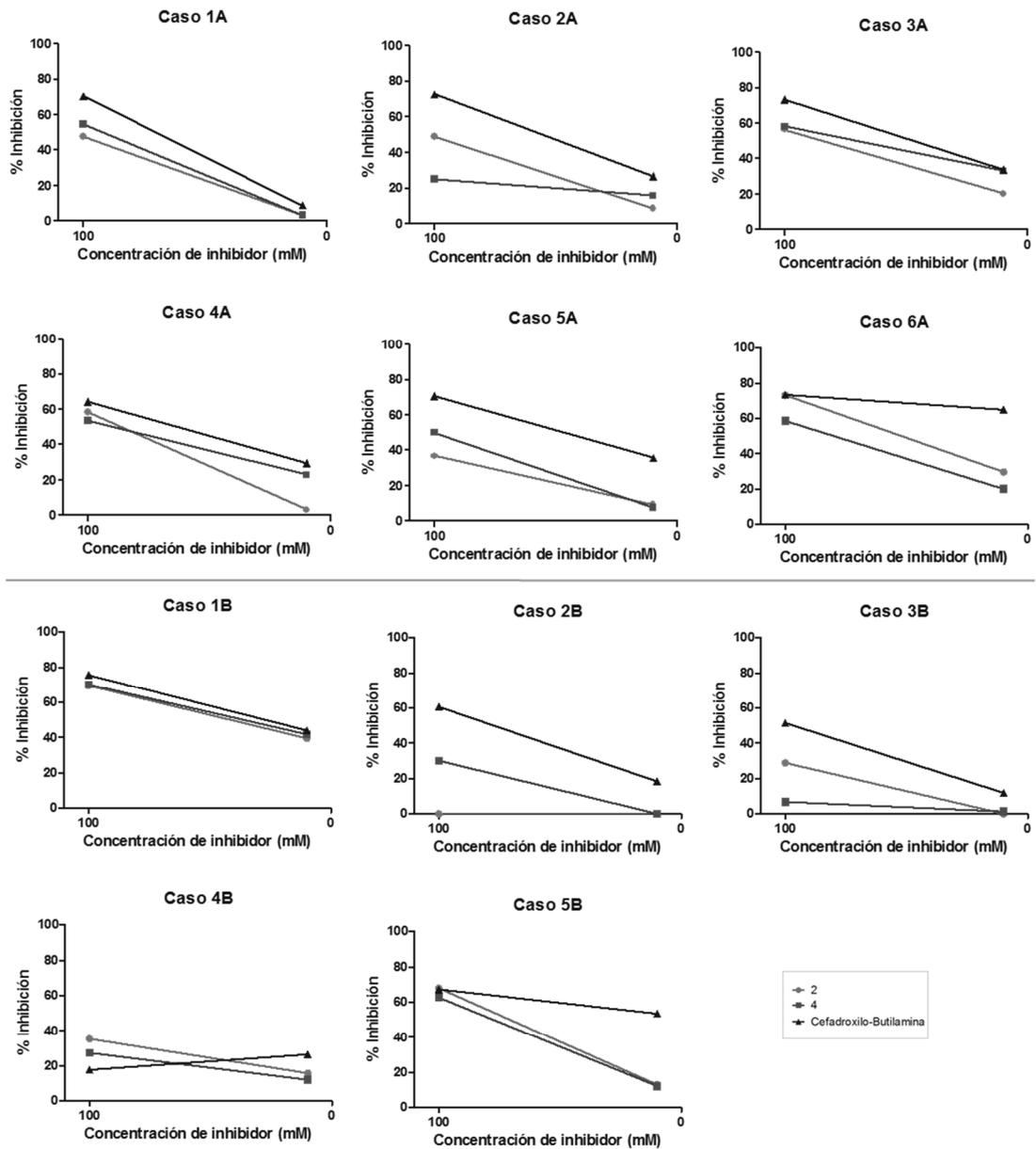


Figura 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201731240

②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.10.2017

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	VENEMALM, L. "Pyrazinone Conjugates as Potential Cephalosporin Allergens". Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 2001, Volumen 11, Número 14, páginas 1869-1870. ISSN: 0960-894X. DOI: 10.1016/S0960-894X(01)00348-1. Ver página 1869, resumen y esquema 1; página 1870, columna 1, párrafo 1-columna 2-párrafo 2.	1-13, 20-24
Y		14-19
Y	AZUAJE, J. et al. "Multicomponent Assembly of Diverse Pyrazin-2(1H)-one Chemotypes". Journal of Organic Chemistry 2013, Volumen 78, Número 9, páginas 4402-4409. [Disponible en línea el 03.04.2013]. DOI: 10.1021/jo4003163. ISSN: 0022-3263. Ver página 4402, resumen y columna 2, párrafo 2; página 4403, esquemas 1 y 2.	14-19
A	DORMAN, D.E. et al. "Isolation and Structure Elucidation of the Major Degradation Products of Cefaclor in the Solid State". Journal of Pharmaceutical Sciences 1997, Volumen 86, Número 5, Páginas 540-549. ISSN: 0022-3549. DOI: 10.1021/JS960428P. Ver página 540, resumen; página 541, cuadro 1.	1-24
A	FAGGI, C. et al. "Studies on isocyanides and related compounds: A facile synthesis of 1,6-dihydro-6-oxopyrazine-2-carboxylic acid derivatives via Ugi four-component condensation". Synthesis 2003, Volumen 10, páginas 1553-1558. ISSN: 0039-7881. Ver página 1553, resumen y esquema 1; página 1554, esquema 2.	1-19
A	SALAZAR, A. et al. "Allergen-Based Diagnostic: Novel and Old Methodologies with New Approaches". Allergen, Capítulo 5, páginas 77-99 [en línea]. IntechOpen. Editado por Seyyed Shamsadin Athari. ISBN: 978-953-51-3568-5. DOI: 10.5772/65229. [Publicado el 04.10.2017]. [Recuperado el 20.08.2018]. Recuperado de: < http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69276 >. Ver página 77, resumen; páginas 79-87, apartado 3.	20-24

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
21.08.2018

Examinador
G. Esteban García

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D241/24 (2006.01)

A61K31/4965 (2006.01)

G01N33/532 (2006.01)

G01N33/543 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D, A61K, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP, NPL, GOOGLE SCHOLAR, NCBI