

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 125**

51 Int. Cl.:

C07C 217/14 (2006.01)
A61K 31/138 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 11/08 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
C07C 217/20 (2006.01)
C07C 217/80 (2006.01)
C07C 233/25 (2006.01)
C07C 217/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2014 PCT/BR2014/000266**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15017906**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2014 E 14834562 (2)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 3031794**

54 Título: **Derivados de difeniloxialquilamina y derivados de ariloxialquilamina, composición farmacéutica, uso de dicha composición farmacéutica para tratar, prevenir o inhibir enfermedades inflamatorias pulmonares crónicas y método para tratar o prevenir tales enfermedades**

30 Prioridad:
09.08.2013 BR 102013020313

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2019

73 Titular/es:
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (100.0%)
Avenida Brasil 4365, Manguinhos
21045-900 Rio de Janeiro, RJ, BR

72 Inventor/es:
MARTINS, MARCO, AURÉLIO;
DA COSTA, JORGE, CARLOS, SANTOS;
DA SILVA, EMERSON, TEIXEIRA;
FARIA, ROBSON, XAVIER;
DE SOUZA, MARCUS, VINICIUS, NORA y
SERRA, MAGDA, FRAGUAS

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 717 125 T3

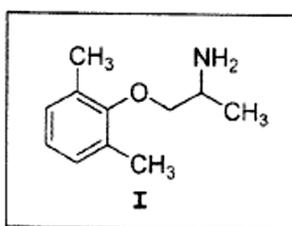
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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 difeniloxialquilamina y derivados de ariloxialquilamina, composición farmacéutica, uso de dicha composición farmacéutica para tratar, prevenir o inhibir enfermedades inflamatorias pulmonares crónicas y método para tratar o prevenir tales enfermedades

5 La presente invención se refiere a ciertos derivados de difeniloxialquilamina y ariloxialquilamina que son estructuralmente análogos a la mexiletina, con importantes actividades biológicas. Estos análogos mostraron una mayor potencia de relajación del músculo liso respiratorio y una marcada acción antiinflamatoria en el tejido pulmonar, en comparación con el prototipo de mexiletina. Es importante destacar que los derivados de la presente invención carecen de los efectos secundarios indeseables presentes en el prototipo, así como también, en otros fármacos de la misma clase terapéutica que el prototipo.

10 La mexiletina, 2-(2-aminopropoxi)-1,3-dimetilbenzene, representada en la siguiente fórmula (I), registrada con la marca Mexitil®, es una contrapartida del anestésico local lidocaína, que se usa clínicamente por vía oral para controlar las arritmias cardíacas (Campbell, 1987) y aliviar el dolor de diferentes orígenes, incluido el dolor neuropático (Jarvis *et al.*, 1998) y las cefaleas difíciles de tratar (Marmura *et al.*, 2008).



15

Fórmula I

Los documentos de patente de los EE. UU. números US-A-3659019 y US-A-3954872 describen la estructura y el uso de la mexiletina. Las formulaciones farmacéuticas que usan mexiletina se pueden encontrar en el documento de patente de los EE. UU. número US-A-4031244 (para controlar las arritmias) y en el documento de patente internacional número WO-A-2012/050884 (para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, como el asma).

20

La mexiletina actúa inhibiendo la propagación del potencial de acción en la red de Purkinje, con una baja interferencia en el sistema nervioso autónomo, al bloquear los canales de sodio rápidos (Monk *et al.*, 1990). También por vía oral, la mexiletina es capaz de inducir la relajación de las vías respiratorias en pacientes asmáticos, lo que sugiere un potencial, como el uso terapéutico, en el control farmacológico del asma (Groeben *et al.*, 1996). Sin embargo, esta aplicación se enfrenta a importantes limitaciones derivadas de la acción misma de la mexiletina como inhibidor del canal de sodio, que se vincula inherentemente con efectos secundarios graves, tales como toxicidad cardiovascular, así como también, trastornos gastrointestinales y centrales (Campbell, 1987).

25

Los pulmones desempeñan un papel central en el intercambio de gases y se conectan directamente con el ambiente externo. Debido a esto, los trastornos alérgicos, infecciosos y ocupacionales del sistema respiratorio se encuentran entre las enfermedades más frecuentes e incapacitantes que afectan a los seres humanos (Saraiva *et al.*, 2011). El asma se caracteriza por una hiperreactividad bronquial inespecífica y un marcado infiltrado inflamatorio eosinofílico en los pulmones. Los episodios recurrentes de disnea, sibilancias y tos son los principales síntomas de esta enfermedad que, de no tratarse pueden causar la muerte (Lemanske *et al.*, 2010; Mannam *et al.*, 2010). Los datos recientes indican que el número de asmáticos está aumentando en el mundo. La enfermedad afecta a personas de todas las edades y, en Brasil, es la causa de muerte de seis personas por día (Brightling *et al.*, 2012). La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) incluye a aquellos pacientes que, en general, se ven afectados simultáneamente con enfisema y bronquitis crónica. El enfisema destruye las paredes de los sacos alveolares, reduciendo drásticamente el área de superficie disponible para el intercambio de gases. La bronquitis provoca la constricción de las vías respiratorias pulmonares y las bloquea, con una producción exagerada de moco (Brody, 2012). La EPOC es uno de los principales asesinos a nivel mundial, y es difícil de diagnosticar, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (Dance, 2012).

35

40

Por lo tanto, sería muy conveniente desarrollar sustancias que actúen en el tratamiento, la prevención o la inhibición de los trastornos inflamatorios pulmonares, sin las desventajas indicadas por el estado de la técnica.

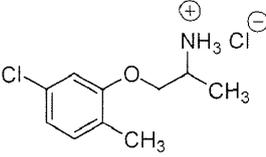
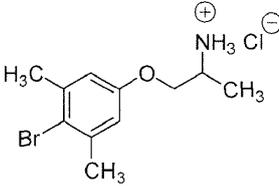
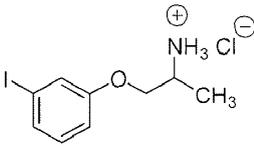
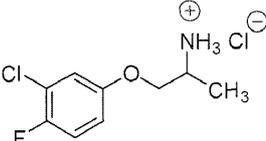
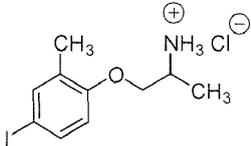
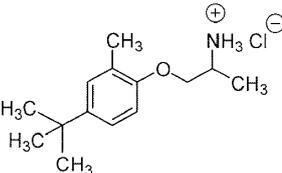
45

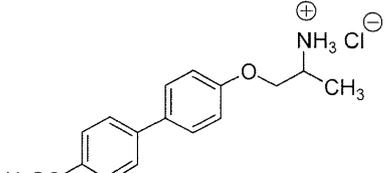
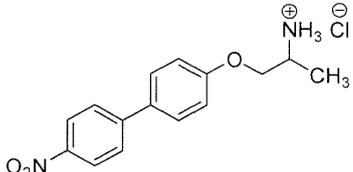
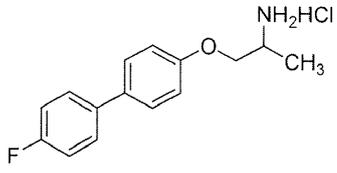
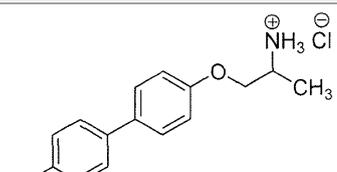
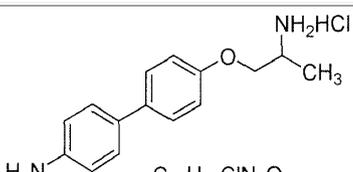
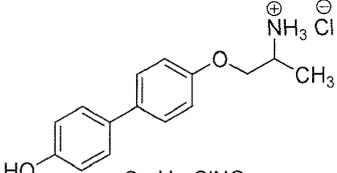
La presente invención se refiere a derivados estructuralmente análogos a la mexiletina, es decir, difeniloxialquilaminas y ariloxialquilaminas, con propiedades antiinflamatorias y broncodilatadoras. Por su menor actividad en los canales de sodio, hay indicios de que los nuevos derivados de difeniloxialquilamina y los derivados de ariloxialquilamina carecen de los efectos secundarios presentes en otros fármacos de la misma clase terapéutica. Más específicamente, la invención se refiere a modificaciones estructurales en la molécula de mexiletina, produciendo nuevos derivados que contienen un patrón estructural sin precedentes y una baja actividad en el canal de sodio. Lo curioso es que estos análogos son capaces de inhibir la contracción del músculo liso respiratorio, además de bloquear la respuesta

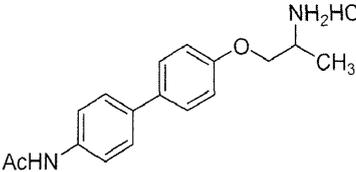
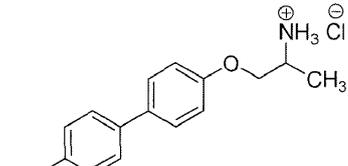
50

inflamatoria pulmonar provocada por diversos estímulos, incluidos los alérgenos y el humo del cigarrillo.

Así, en un primer aspecto, la presente invención proporciona derivados de difeniloxialquilamina y derivados de ariloxialquilamina seleccionados de las estructuras a presentadas a continuación:

| Estructura | Código |
|---|---------|
|  <p data-bbox="598 622 742 651">$C_{10}H_{15}Cl_2NO^+$</p> <p data-bbox="544 660 799 689">Peso molecular: 236,14</p> | JME-170 |
|  <p data-bbox="592 936 748 965">$C_{11}H_{17}BrClNO^+$</p> <p data-bbox="544 974 799 1003">Peso molecular: 294,62</p> | JME-173 |
|  <p data-bbox="603 1182 737 1211">$C_9H_{13}ClINO^+$</p> <p data-bbox="544 1220 799 1249">Peso molecular: 313,56</p> | JME-141 |
|  <p data-bbox="598 1435 742 1464">$C_9H_{12}Cl_2FNO^+$</p> <p data-bbox="544 1473 799 1503">Peso molecular: 240,10</p> | JME-188 |
|  <p data-bbox="598 1691 742 1720">$C_{10}H_{15}ClINO^+$</p> <p data-bbox="544 1729 799 1758">Peso molecular: 327,59</p> | JME-207 |
|  <p data-bbox="603 1971 737 2000">$C_{14}H_{24}ClINO^+$</p> <p data-bbox="544 2009 799 2038">Peso molecular: 257,80</p> | JME-208 |

| Estructura | Código |
|---|-----------|
|  <p data-bbox="624 488 751 517">$C_{15}H_{18}ClNO$</p> <p data-bbox="544 526 799 555">Peso molecular: 263,76</p> | JME-209 |
|  <p data-bbox="639 750 767 779">$C_{16}H_{20}ClNO_2$</p> <p data-bbox="544 788 799 817">Peso molecular: 293,79</p> | JME-209-1 |
|  <p data-bbox="608 1008 751 1037">$C_{15}H_{17}ClN_2O_3$</p> <p data-bbox="544 1046 799 1075">Peso molecular: 308,76</p> | JME-209-2 |
|  <p data-bbox="592 1265 735 1294">$C_{15}H_{17}ClFNO$</p> <p data-bbox="544 1303 799 1332">Peso molecular: 281,75</p> | JME-209-3 |
|  <p data-bbox="608 1523 751 1552">$C_{15}H_{17}BrClNO$</p> <p data-bbox="544 1561 799 1590">Peso molecular: 342,66</p> | JME-209-4 |
|  <p data-bbox="639 1765 767 1794">$C_{15}H_{19}ClN_2O$</p> <p data-bbox="544 1803 799 1832">Peso molecular: 278,78</p> | JME-209-5 |
|  <p data-bbox="608 2022 751 2051">$C_{15}H_{18}ClNO_2$</p> | JME-209-6 |

| Estructura | Código |
|---|-----------|
| <p>Peso molecular: 279,76</p> | |
|  <p>$C_{17}H_{21}ClN_2O_2$ Peso molecular: 320,81</p> | JME-209-7 |
|  <p>$C_{17}H_{20}ClNO_3$ Peso molecular: 321,8</p> | JME-209-8 |

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica caracterizada por contener al menos uno de los derivados según se los define en el primer aspecto de la invención, o una de sus sales formadas por ácidos orgánicos o minerales, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 En un aspecto adicional más, la presente invención proporciona una composición, tal como se la define en otro aspecto de la invención, para usar en el tratamiento, la prevención o la inhibición de la enfermedad inflamatoria pulmonar, mediante la administración en una cantidad farmacológicamente eficaz, por medio de cualquier vía de administración.

10 Tabla 1. Efecto comparativo de la inhibición de la corriente de sodio, evidenciada por la mexiletina y análogos, de las clases de difeniloxialquilaminas y ariloxialquilaminas, en células GH3 evaluadas en el sistema de fijación de membranas [*patch clamp*].

Tabla 2. Valores de potencia (IC_{50}) y efecto máximo (EMAX) de la inhibición de la respuesta de contracción inducida por el carbacol (10 μ M) en anillos traqueales de rata, pretratados con mexiletina, JME-173 o JME-207, representantes de la clase de ariloxialquilaminas. Los datos representan la media \pm SEM [*standard error of the mean*, error estándar de la media] de 4 a 7 anillos traqueales.

15 Tabla 3. Valores comparativos de la potencia de inhibición (IC_{50}) y el efecto máximo (EMAX) de mexiletina, JME-207, JME-173 y JME-209, de las clases de difeniloxialquilaminas y ariloxialquilaminas, en relación con el bloqueo de la desgranulación de células del mástil anafiláctico.

Figura 1. Efecto relajante de los compuestos ariloxialquilaminas JME-173 y JME-207, en comparación con el de la mexiletina en la tráquea pre-contraída con carbacol.

20 Figura 2. Efecto antiespasmódico de la ariloxialquilamina JME-173 (Parte A) y del salmeterol (Parte B) en la contracción anafiláctica de los anillos traqueales.

Figura 3. Efecto estabilizador de los mastocitos exhibido por los compuestos de las clases de difeniloxialquilaminas y ariloxialquilaminas, JME-173, JME-207, JME-209, JME-141 y la mexiletina.

25 Figura 4. Efecto antiespasmódico de la difeniloxialquilamina JME-209 (30 y 100 mg/kg, por vía oral) o del vehículo (NaCl al 0,9%), evaluado en ratones sometidos a la estimulación con metacolina.

Figura 5. Efecto antiespasmódico de la ariloxialquilamina JME-207 (30 y 100 mg/kg, por vía oral) o del vehículo (NaCl al 0,9%), evaluado en ratones sometidos a la estimulación con metacolina.

Figura 6. Protocolo para la sensibilización, la estimulación con antígenos y el tratamiento utilizado para evaluar la actividad de los compuestos probados en el modelo experimental de asma en ratones.

30 Figura 7. Efecto de la nebulización con las ariloxialquilaminas JME-141, JME-173, JME-188 o JME-207 sobre la hiperreactividad de las vías respiratorias, en ratones sensibilizados y expuestos a ovoalbúmina.

Figura 8. Efecto de la nebulización con las ariloxialquilaminas JME-141, JME-173, JME-188 o JME-207 sobre la

infiltración de leucocitos, evaluada en lavado broncoalveolar en ratones sensibilizados y expuestos a ovoalbúmina.

Figura 9. Efecto de la nebulización con las ariloxialquilaminas JME-141, JME-173, JME-188 o JME-207 sobre la generación de citoquinas en tejido pulmonar de ratones sensibilizados y expuestos a ovoalbúmina.

5 Figura 10. Efecto de la nebulización con la ariloxialquilamina JME-173 (0,5-2%) sobre la hiperreactividad de las vías respiratorias en ratones sensibilizados y expuestos a ovoalbúmina.

Figura 11. Efecto de la nebulización con la ariloxialquilamina JME-173 sobre la producción de moco en las vías respiratorias en ratones sensibilizados y expuestos a ovoalbúmina.

Figura 12. Efecto de la nebulización con la ariloxialquilamina JME-173 sobre la respuesta de las vías aéreas con fibrosis subepitelial, en ratones sensibilizados y expuestos a la ovoalbúmina.

10 Figura 13. Efecto del tratamiento oral con la difeniloxialquilamina JME-209 sobre el aumento del recuento total de leucocitos, células mononucleares, eosinófilos y neutrófilos observados en el lavado broncoalveolar, después de la estimulación con LPS en ratones.

Figura 14. Efecto del tratamiento oral con la difeniloxialquilamina JME-209 sobre la hiperreactividad pulmonar observada después de la estimulación con LPS en ratones.

15 Figura 15. Efecto del tratamiento oral con la difeniloxialquilamina JME-209 o dexametasona sobre el aumento del recuento total de leucocitos en el lavado broncoalveolar de ratones expuestos al humo del cigarrillo.

Figura 16. Efecto del tratamiento oral con la difeniloxialquilamina JME-209 o dexametasona sobre el aumento del recuento total de células mononucleares, neutrófilos y eosinófilos, en el lavado broncoalveolar de ratones expuestos al humo del cigarrillo.

20 Los inventores han observado que las modificaciones estructurales adecuadas en la molécula de mexiletina dan como resultado la obtención de análogos con propiedades antiinflamatorias y broncodilatadoras. Un aspecto importante reside en que dichos derivados tienen una baja actividad en el canal de sodio, a diferencia del prototipo, como se observa en los ensayos electrofisiológicos que utilizan la técnica de "fijación de membranas" en células GH3. Sobre la base de estos datos, la presente invención propone un nuevo método terapéutico para el tratamiento de enfermedades
25 relacionadas con la obstrucción e inflamación de las vías respiratorias, tales como el asma y la EPOC, mediante la administración tópica o sistémica de derivados de difeniloxialquilamina y ariloxialquilamina, sin anestesia local y actividad antiarrítmica, tales como los derivados de difeniloxialquilamina y los derivados de ariloxialquilamina de esta invención.

30 Los ejemplos que se muestran en el presente documento cumplen meros fines ilustrativos, sin limitar el alcance de la invención.

Según se utiliza en el presente documento, el término alquilo significa un grupo alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica, de hasta ocho (8) átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo utilizados en la presente invención son metilo, etilo, propilo, butilo. El "alquiléter" —es decir, alcoxi— se puede interpretar en el presente documento como grupo alquilo, por ejemplo, metoxi, etoxi.

35 Según se utiliza en el presente documento, el término alqueno significa un grupo alqueno de cadena lineal, ramificada o cíclica, de hasta ocho (8) átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alqueno usados en la presente invención son metileno, etileno, propileno.

Según se utiliza en el presente documento, el término alquilo cíclico significa un cicloalcano, alqueno o heteroátomos que contienen, por ejemplo, oxígeno o azufre.

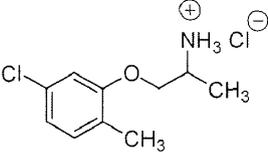
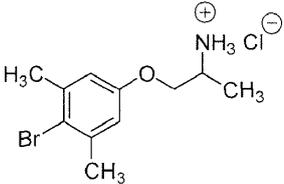
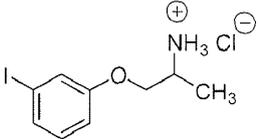
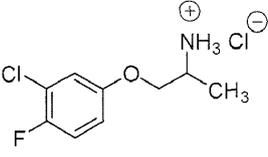
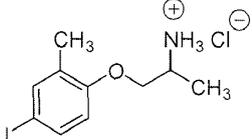
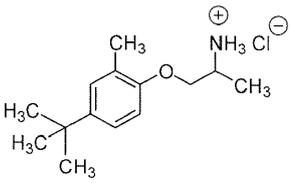
40 Según se utiliza en el presente documento, "temperatura ambiente" incluye un intervalo de 20 a 35 °C.

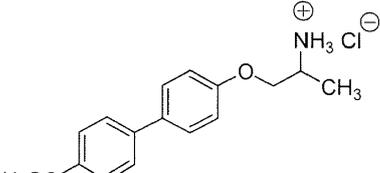
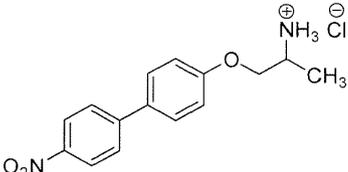
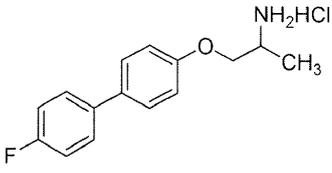
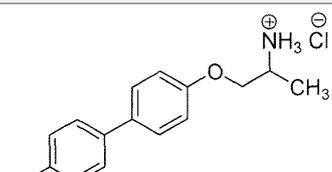
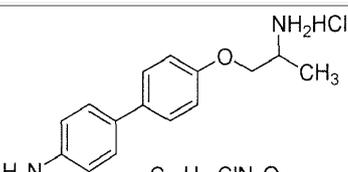
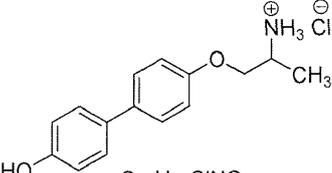
Según se utiliza en el presente documento, la frase agrupación de eliminadores de electrones incluye grupos nitro, ciano, azida, carbonilo, carboxilo, amidina, halógeno.

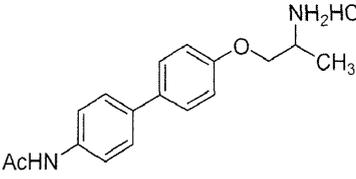
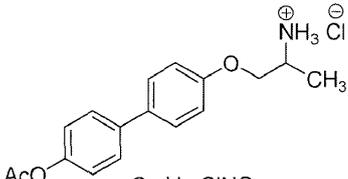
Según se utiliza en el presente documento, la expresión grupo de donadores de electrones incluye grupos metoxilo, etoxilo, hidroxilo, alquilamina, amina.

45 Los compuestos de la presente invención se definen por las siguientes estructuras en la tabla I:

Tabla I

| Estructura | Código |
|---|---------|
|  <p data-bbox="596 546 743 573">$C_{10}H_{15}Cl_2NO^+$</p> <p data-bbox="544 584 802 611">Peso molecular: 236,14</p> | JME-170 |
|  <p data-bbox="592 835 754 862">$C_{11}H_{17}BrClNO^+$</p> <p data-bbox="544 873 802 900">Peso molecular: 294,62</p> | JME-173 |
|  <p data-bbox="603 1081 743 1108">$C_9H_{13}ClINO^+$</p> <p data-bbox="544 1120 802 1146">Peso molecular: 313,56</p> | JME-141 |
|  <p data-bbox="596 1339 743 1366">$C_9H_{12}Cl_2FNO^+$</p> <p data-bbox="544 1377 802 1404">Peso molecular: 240,10</p> | JME-188 |
|  <p data-bbox="596 1585 743 1612">$C_{10}H_{15}ClINO^+$</p> <p data-bbox="544 1624 802 1650">Peso molecular: 327,59</p> | JME-207 |
|  <p data-bbox="603 1877 743 1904">$C_{14}H_{24}ClNO^+$</p> <p data-bbox="544 1915 802 1942">Peso molecular: 257,80</p> | JME-208 |

| Estructura | Código |
|---|-----------|
|  <p data-bbox="624 488 751 517">$C_{15}H_{18}ClNO$</p> <p data-bbox="544 526 799 555">Peso molecular: 263,76</p> | JME-209 |
|  <p data-bbox="643 750 770 779">$C_{16}H_{20}ClNO_2$</p> <p data-bbox="547 788 802 817">Peso molecular: 293,79</p> | JME-209-1 |
|  <p data-bbox="611 1008 754 1037">$C_{15}H_{17}ClN_2O_3$</p> <p data-bbox="547 1046 802 1075">Peso molecular: 308,76</p> | JME-209-2 |
|  <p data-bbox="595 1265 738 1294">$C_{15}H_{17}ClFNO$</p> <p data-bbox="547 1303 802 1332">Peso molecular: 281,75</p> | JME-209-3 |
|  <p data-bbox="611 1523 754 1552">$C_{15}H_{17}BrClNO$</p> <p data-bbox="547 1561 802 1590">Peso molecular: 342,66</p> | JME-209-4 |
|  <p data-bbox="643 1758 770 1787">$C_{15}H_{19}ClN_2O$</p> <p data-bbox="547 1796 802 1825">Peso molecular: 278,78</p> | JME-209-5 |
|  <p data-bbox="611 2016 754 2045">$C_{15}H_{18}ClNO_2$</p> | JME-209-6 |

| Estructura | Código |
|---|-----------|
| Peso molecular: 279,76 | |
|  <p>$C_{17}H_{21}ClN_2O_2$ Peso molecular: 320,81</p> | JME-209-7 |
|  <p>$C_{17}H_{20}ClNO_3$ Peso molecular: 321,8</p> | JME-209-8 |

Los ejemplos que contemplan la síntesis de los compuestos estructuralmente análogos a la mexiletina, de acuerdo con la presente invención, se mostrarán a continuación.

5 Los ejemplos que se muestran en el presente documento cumplen meros fines ilustrativos, sin limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1. Síntesis de los derivados de difeniloxialquilamina de la fórmula estructural II.

10 El material de partida, fenil-fenol sustituido (29,38 mmol) se disolvió en acetona junto con carbonato de sodio (1-5 eq.) y una cantidad catalítica de yoduro de potasio. Después del reflujo previo, se añadió una solución de cloroacetona (1-3 eq.), durante 0,5 a 2 horas, permaneciendo a reflujo durante 2 a 5 horas. El medio se evaporó a sequedad, seguido de la adición de agua (30 ml) y la extracción con acetato de etilo. La fase orgánica se secó y se evaporó, para obtener el primer intermedio en forma de un aceite oscuro (70-90 %).

15 La propanona, obtenida como se indicó con anterioridad (29,32 mmol), se disolvió en metanol, y el medio se enfrió en un baño de hielo, para seguir con la adición de exceso de borohidruro de sodio (2-5 eq.). El medio de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2-5 horas. Después de la adición de agua, el medio de reacción se mantuvo bajo agitación durante otros 30-60 minutos. El medio se concentró a presión reducida y se extrajo con acetato de etilo. Se obtuvo un aceite incoloro después de secar y evaporar la fase orgánica.

20 El aceite anterior se disolvió en piridina (10-30 ml), y el medio se enfrió en un baño de hielo. Se añadió un exceso de cloruro de tosilo (de 1 a 5 eq.), durante un lapso de hasta 15 minutos. Después de 12-24 horas de reacción, al medio se le añadió una solución de HCl, hasta alcanzar un pH de 2 a 5. Después de agitar a temperatura ambiente, se precipitó un sólido blanco en el medio de reacción, que se eliminó por filtración. Después del secado, el sólido se disolvió en metanol, y la reacción se realizó con azida sódica (3 eq.) a reflujo, durante 2-6 horas. Después de la evaporación del disolvente, se añadió agua y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó y se evaporó para obtener el segundo intermedio, en forma de un aceite amarillento (50-70 %).

25 La azida, obtenida del mismo modo que antes (16,6 mmol), se disolvió en metanol y se añadió catalizador Pd/C a esta solución. Se realizó el burbujeo del medio con H_2 durante un lapso de hasta 10 minutos y luego se permitió la agitación en presencia de este gas durante 2 a 10 horas. Después de filtrar el paladio, el filtrado se evaporó para obtener un aceite que luego se disolvió en acetona y volvió a filtrarse. Esta solución se enfrió en un baño de hielo y se trató con un flujo de gas HCl, hasta alcanzar un pH de 1-5. El precipitado se aisló por filtración, seguido por un lavado con acetona fría. El producto final se obtuvo después del secado, como un sólido blanco, cuyos datos espectrales se enumeran a continuación:

35 JME 209 [obtenido a partir de 4-fenil-fenol, de acuerdo con la síntesis que se describe en el ejemplo 1]: punto de fusión: 252-254 °C; 1H RMN (MeOD, 500 MHz) 7,1-7,6 (m; 9H; ArH); (4,0-4,2; m; 2H; -O-CH₂-); 3,75 (m; 1H; -CH-); 1,44 (d; 3H; CH₃); ^{13}C RMN (MeOD; 125 MHz): 159,13; 141,97; 136,18; 130,60; 129,94; 129,34; 128,68; 128,38; 127,39; 127,10; 116,83; 115,55; 69,98; 47,87; 15,11; IR (KBr): 4368; 3047; 1924; 1608; 1049; 883; 812; 437; GC-MS (100 %): m/z 227 (base libre).

JME 257 [obtenido a partir de 4-(4'-bromo-fenil)-fenol de acuerdo con la síntesis que se describe en el ejemplo 1] punto de fusión: >300 °C; ¹H RMN (MeOD, 400 MHz): 7,1-7,6 (m; 8H; ArH); 4,0-4,3 (m; 2H; -O-CH₂-); 3,75 (m; 1H; -CH-); 1,44 (d; 3H; CH₃; J = 6,76Hz); ¹³C RMN (MeOD; 100 MHz): 159,45; 141,06; 134,86; 130,60; 133,07; 129,55; 129,26; 122,01; 116,36; 70,17; 48,56; 15,59; IR (KBr): 3000; 2989; 1603; 1485; 1247; 1041; 810; 734; GC-MS (99 %): m/z 305 (base libre).

JME 260 [obtenido a partir de 4-(4'-fluoro-fenil)-fenol de acuerdo con la síntesis que se describe en el ejemplo 1] punto de fusión: 225-227 °C; ¹H RMN (MeOD; 400 MHz): 7,0-7,6 (m; 8H; ArH); (4,0-4,3; m; 2H; -O-CH₂-); 3,75 (m; 1H; -CH-); 1,45 (d; 3H; CH₃; J = 6,80Hz); ¹³C RMN (MeOD; 100 MHz): 164,94; 162,51; 159,14; 138,31; 135,16; 129,54; 129,46; 129,25; 116,69; 116,48; 116,30; 70,16; 48,56; 15,61; IR (KBr): 2968; 2879; 1597; 1498; 1230; 1041; 815; 559; 513; GC-MS (100 %): m/z 245 (base libre).

Ejemplo 2. Síntesis de los derivados de ariloxialquilamina de la fórmula estructural III

El derivado de fenol apropiadamente sustituido (24,88 mmol) se disolvió en acetona, junto con carbonato de potasio (de 1 a 5 eq.) y una cantidad catalítica de yoduro de potasio. Bajo reflujo, se añadió una solución de cloroacetona (1 a 3 eq.) en acetona, durante un período de 0,5 a 2 horas, permaneciendo en esta condición durante un período adicional de 2 a 5 horas. Luego, se añadió agua y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó y se evaporó, para obtener el primer intermedio en forma de un aceite oscuro (70-95 %).

La propanona, obtenida como se indicó con anterioridad (24,51 mmol), se disolvió en metanol y el medio se enfrió en un baño de hielo, para seguir con la adición de exceso de borohidruro de sodio (2-5 eq.). El medio de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2-5 horas. Después de la adición de agua, el medio de reacción se mantuvo bajo agitación durante otros 30-60 minutos. El medio se concentró a presión reducida y se extrajo con acetato de etilo. Se obtuvo un aceite incoloro después de secar y evaporar la fase orgánica.

El aceite anterior se disolvió en piridina (20-50 ml), y la solución formada se enfrió en un baño de hielo. Se añadió un exceso de cloruro de tosilo (de 1 a 5 eq.), durante un lapso de hasta 15 minutos. Después de 12-24 horas de reacción, al medio se le añadió una solución de HCl, hasta alcanzar un pH de 2 a 5. Después de agitar a temperatura ambiente, se precipitó un sólido blanco en el medio de reacción, que se eliminó por filtración. Después del secado, el sólido se disolvió en metanol y la reacción se realizó con azida sódica (3-7 eq.) a reflujo, durante un lapso de hasta 20 horas. Después de la evaporación del disolvente, se añadió agua y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó y se evaporó para obtener el segundo intermedio, en forma de un aceite amarillento (50-70 %).

La azida, obtenida del mismo modo que antes (12,32 mmol), se disolvió en tetrahidrofurano, y a esta solución se le añadió trifetilfosfina (1-2 eq.). El medio se agitó entonces a temperatura ambiente durante un lapso de hasta 20 horas. Luego, se añadió agua y el medio de reacción se calentó hasta reflujo, después de lo cual se mantuvo hasta por 3 horas. El disolvente orgánico se eliminó por evaporación para formar un aceite que se disolvió de nuevo en acetona (30 ml). Después de enfriar, la solución se sometió a un flujo de gas HCl, hasta alcanzar un pH de 2-3, se añadió agua y se extrajo con éter etílico. La fase acuosa se basificó hasta lograr un pH 10-12 y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó y se concentró, para obtener un aceite que posteriormente se disolvió en acetona. La solución se enfrió en un baño de hielo y se sometió a un flujo de gas HCl, hasta que el pH del medio se ubicó entre 1 y 5, lo cual condujo a la formación de un precipitado. El precipitado se aisló por filtración, seguido por un lavado con acetona fría. El producto final se obtuvo después del secado, como un sólido blanco, cuyos datos espectrales se enumeran a continuación:

JME 141 (obtenido a partir de 3-yodo-fenol, de acuerdo con la síntesis que se describe en el ejemplo 2): punto de fusión: 204-206 °C; ¹H RMN (D₂O; 500 MHz): 7,0-7,5 (m; 4H; ArH); 4,0-4,3 (m; 2H; -O-CH₂-); 3,8 (m; 1H; -CH-); 1,4 (d; 3H; -CH₃ J = 6,5 Hz); ¹³C RMN (MeOD; 125 MHz): 158,17; 131,88; 130,58; 123,84; 114,39; 94,56; 73,06; 55,76; 16,28; IR (KBr): 3109; 2985; 1585; 1502; 1465; 1290; 1008; 763; 682; GC-MS (100 %): m/z 277 (base libre).

JME 170 (obtenido a partir de 2-cloro-5-metil-fenol, de acuerdo con la síntesis que se describe en el ejemplo 2): punto de fusión: 220-222 °C; ¹H RMN (D₂O; 400 MHz): 7,22 (m; 1H; ArH₆); 7,05 (m; 2H; ArH_{2,4}); 4,0-4,3 (m; 2H; -O-CH₂-); 3,90 (m; 1H; -CH-); 2,27 (s; 3H; ArCH₃); 1,51 (d; 3H; -CH₃; J = 6,8Hz); ¹³C RMN (MeOD; 100 MHz): 156,32; 131,63; 131,33; 125,88; 121,31; 112,37; 68,98; 47,09; 30,26; 14,90; 14,39; IR (KBr): 3028; 1593; 1492; 1246; 1049; 854; 655; MS (ES): 200 (M + H).

JME-173 (obtenido a partir de 3,5-dimetil-4-bromo-fenol, de acuerdo con la síntesis que se describe en el ejemplo 2): punto de fusión: 220-222 °C; ¹H RMN (D₂O; 500 MHz): 6,8 (m; 2H; ArH); 4,0-4,2 (m; 2H; -O-CH₂-); 3,80 (m; 1H; -CH-); 2,3 (s; 6H; ArCH₃); 1,4 (d; 3H; -CH₃ J = 10Hz); ¹³C RMN (MeOD; 125 MHz): 156,28; 139,78; 118,54; 114,27; 68,52; 47,00; 23,06; 14,16; IR (KBr): 3066; 2978; 2120; 1739; 1585; 1468; 1319; 1172; 1018; 856; 812; 663; CG-MS (100 %): m/z 227 (base libre).

JME 207 (obtenido a partir de 2-metil-4-yodo-fenol de acuerdo con la síntesis que se describe en el ejemplo 2): punto de fusión: 233-235 °C; ¹H RMN (MeOD; 500 MHz): 7,4 (m; 3H; ArH); 4,0-4,2 (m; 2H; -O-CH₂-); 3,7 (m; 1H; -CH-); 2,2 (s; 3H; ArCH₃); 1,4(d; 3H; -CH₃ J = 6,8 Hz); ¹³C RMN (MeOD; 125 MHz): 157,59; 139,84; 136,44; 130,71; 114,40; 84,66; 47,79; 15,67 IR (KBr): 3066; 2978; 2120; 1739; 1585; 1468; 1319; 1172; 1018; 856; 812; 663; CG-MS (100 %): m/z 291 (base libre).

Los puntos de fusión se determinaron en 130 aparatos fisatom y están sin corregir. Los análisis de resonancia magnética de protones (^1H RMN) se determinaron en el espectrómetro Bruker AC 400, a 400 MHz o 500 MHz. Las multiplicidades se designaron como: s, singlete; d, doblete; t, triplete; dd, doblete doble; m, multiplete; bs [*broad signal*], señal amplia. Los análisis de resonancia magnética de carbono (^{13}C RMN) se determinaron a 100 MHz o 125 MHz.

- 5 Los espectros de infrarrojos se obtuvieron en un espectrómetro Perkin-Elmer 467 FTIR, utilizando gránulos de bromuro de potasa. Los espectros de masas se obtuvieron en el aparato Agilent con columna GC/MS 122 5532, por impacto de electrones. El desarrollo de todas las reacciones se controló mediante cromatografía en capa fina, utilizando películas de cromato de aluminio (2,0 x 6,0 cm, 0,25 mm; gel de sílice 60, HF-254, Merck), con la ayuda de luz ultravioleta a 264 nm. Para la purificación por columna de cromatografía, se usó gel de sílice (malla 230-400).
- 10 Los siguientes ejemplos ilustran las propiedades farmacológicas de los compuestos de la presente invención, en comparación con el compuesto prototipo: mexiletina. También ilustran el potencial de estos análogos en la inhibición de enfermedades inflamatorias pulmonares, como el asma y la EPOC.

Ejemplo 3. Evaluación de la potencia de bloqueo de la corriente de sodio exhibida por la mexiletina, en comparación con los análogos JME-141, JME-173, JME-188, JME-207, JME-209, JME-257 y JME-260.

15 A. Método y evaluación

- Unas células GH3 pituitarias obtenidas de ratones se cultivaron en un medio RPMI 1640, que contenía suero bovino fetal al 10 %, penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO_2 al 5 % y se cultivaron en portaobjetos durante 1-2 [SIC] antes de su uso. Las corrientes de los canales iónicos en las células GH3 se registraron de acuerdo con la técnica "Patch Clamp" [fijación de membranas], como se describió anteriormente (Neher *et al.*, 1992). Los portaobjetos que contenían células adheridas se colocaron en una cámara conectada a un microscopio y se infundieron continuamente con solución salina con la siguiente composición (mM): NaCl (150), KCl (5), MgCl_2 (1), CaCl_2 (0,01) EGTA (1), HEPES (10), BaCl_2 (2) y CdCl_2 (0,1). El pH de la solución se ajustó a 7,4, a temperatura ambiente con la ayuda de una solución de NaOH. Las células se observaron en microscopio invertido en modo de contraste de fase (Axiovert 100, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).
- 20 Los registros de la pinza de voltaje en la configuración de "célula completa" con sellado de gigaohmios ($> 10 \text{ G}\Omega$) se obtuvieron utilizando un amplificador Axopatch-1D (Axon Instruments, San Mateo, CA). Las corrientes de sodio se registraron en solución salina con o sin los compuestos probados. La resistencia en serie fue de 6-10 M Ω para todos los experimentos, cuando la pipeta se llenaba con solución salina intracelular con la siguiente composición (mM): KCl (150), NaCl (5), MgCl_2 (1), HEPES (10) y EGTA (0,1). El pH de la solución salina se ajustó a 7,4, a temperatura ambiente con la ayuda de una solución de NaOH. Quince minutos después de la ruptura del parche de membrana, se iniciaron los registros de las corrientes iónicas. Los protocolos de pulsos y la adquisición de datos se controlaron mediante una interfaz (Axon Instruments, Palo Alto, CA) y se adquirieron con el *software* Clampex 9. Los registros de las corrientes de sodio se filtraron a 1 kHz y se tomaron muestras a 8 kHz. Alrededor del 26 % de la resistencia en serie fue compensada electrónicamente. Los fármacos se aplicaron a la cámara por gravedad. La velocidad de infusión se mantuvo de 0,8 a 1,1 ml/minuto y el volumen del baño fue de aproximadamente 50 μl .

B. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas se determinaron utilizando pruebas de análisis de varianza, seguidas de la prueba de Student-Newman-Keuls. Los valores *p* inferiores o iguales a 0,05 se consideraron significativos.

40 C. Resultados

- La tabla 1 muestra las concentraciones de las sustancias capaces de inhibir en un 50 % (IC_{50}) la corriente de sodio en las células diana. Mediante la técnica de fijación de membrana, se encontró que la despolarización (-90 mV a 60 mV) de las células pituitarias de la rata (línea celular GH3) generaba corrientes de sodio que se inhibían, en una forma dependiente de la concentración, mediante un tratamiento previo con tetrodotoxina ($\text{IC}_{50} = 304 \text{ nM}$) (datos no que se muestran), mientras que la sustancia prototipo mexiletina mostró una IC_{50} para bloquear la corriente de sodio del orden de 278 μM . La tabla 1 también refleja que los compuestos análogos mostraron valores de IC_{50} entre 178 y 1208 veces más altos que los que se muestran por coincubación con mexiletina.

- Tabla 1. Efecto comparativo de la inhibición de la corriente de sodio, evidenciado por la mexiletina y análogos de la invención, de las clases de difeniloxialquilaminas y ariloxialquilaminas, en células GH3 evaluadas en el sistema de fijación de membranas.

| Compuestos | IC_{50} (mM) | N |
|------------|-----------------------|---|
| Mexiletina | 0,278 | 4 |
| JME-141 | 222 | 3 |
| JME-207 | 177 | 4 |

| Compuestos | IC ₅₀ (mM) | N |
|------------|-----------------------|---|
| JME-173 | 183 | 4 |
| JME-188 | 199 | 4 |
| JME-209 | 49 | 4 |
| JME-257 | 336 | 4 |
| JME-260 | 107 | 4 |

Por lo tanto, la clasificación de la potencia de bloqueo de la corriente de sodio en este sistema sería la mexiletina >>> JME-209> JME-260> JME-207> JME-173> JME-188> JME-141> JME-257.

- 5 Dado que los principales efectos no deseados de la mexiletina (incluida la depresión cardiovascular) son el resultado directo de la actividad supresora de las corrientes de sodio, es posible suponer que los compuestos análogos tienen un potencial de toxicidad menor en comparación con el prototipo mexiletina.

Ejemplo 4. Actividad inhibitoria de la contracción del músculo liso traqueal de las ratas, presentada por los compuestos mexiletina, JME-173 y JME-207.

A. Método y evaluación

- 10 Todos los procedimientos experimentales que involucran animales con respecto a esta solicitud de patente fueron aprobados por el Comité de Ética sobre Uso Animal de la Fundación Oswaldo Cruz (Licencia CEUA-LW-23/10).

15 En este estudio, se utilizaron unas ratas Wistar de ambos sexos, que pesaban entre 200 y 250 g, procedentes del Centro de Cría de Animales de Laboratorio de la Fundación Oswaldo Cruz. Como se describió anteriormente (Coelho *et al.*, 2008), los animales se sacrificaron por exposición a una atmósfera de aire enriquecida con CO₂. Luego, se abrió la región cervical anterior para poder localizar y extirpar la tráquea. Esta se transfirió después a una placa de Petri que contenía solución de Krebs, con la siguiente composición (mM): NaCl (118), KC1 (4,8), CaCl₂ (2,5), MgSO₄ (1,2), KH₂PO₄ (1,2), NaHCO₃ (24) y glucosa (11). El segmento total se dividió en fragmentos de aproximadamente 3 a 4 anillos, que se mantuvieron en otra placa de Petri que contenía solución de Krebs. Cada fragmento se montó verticalmente en una cubeta de 10 ml, con solución de Krebs, mantenida a 37 °C y se aireó con una mezcla de carbógeno (95 % de O₂ y 5 % de CO₂). La barra inferior se fijó a la base de la cubeta y la parte superior se unió al transductor isométrico, para medir la variación de voltaje del fragmento. El transductor se conectó a un dispositivo que transforma la variación de voltaje en el registro digital. Los fragmentos se sometieron a un voltaje basal de 1 g y se calibraron, de modo que las contracciones posteriores podrían expresarse como un porcentaje de este voltaje de 1 g. Las soluciones se introdujeron dentro de las cubetas con la ayuda de una pipeta automática. El extremo de la punta siempre se colocó a la misma altura y posición, sin tocar el músculo. Los anillos traqueales se contrajeron inicialmente con 2,5 µM de carbacol. Cuando las contracciones alcanzaban la meseta, cada segmento se lavaba hasta la relajación total del músculo liso. Los compuestos mexiletina (30-1000 µM) JME-173 (30-100 µM) y JME-207 (10-100 µM) se agregaron 10 minutos antes de la adición de concentraciones crecientes de carbacol (10⁻⁸-10⁻⁴ M). Todos los resultados se expresaron como porcentaje de la contracción producida por 2,5 µM de carbacol (Coelho *et al.*, 2008).

30 B. Análisis estadístico

Los valores de la media ± error estándar de la media de los grupos investigados se analizaron estadísticamente, mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA), seguida por la prueba de Student-Newman-Keuls. Los valores *p* inferiores o iguales a 0,05 se consideraron significativos.

C. Resultados

- 35 La tabla 2 muestra que los compuestos JME-173 y JME-207 fueron muy efectivos para bloquear la respuesta contráctil de los anillos traqueales de rata inducida por el agonista muscarínico carbacol (10 µM), con valores de IC₅₀ de 44,4 y 40,9 µM, respectivamente. El tratamiento previo durante 10 minutos con JME-173 y JME-207 (100 µM) alcanzó niveles de inhibición de la contracción muscarínica del orden del 98 % y 93 %, respectivamente. Los análogos fueron aproximadamente 10 veces más potentes que el prototipo mexiletina que, en las mismas condiciones, inhibió el 50 % de la respuesta (IC₅₀) a la concentración de 466,4 µM, alcanzando el bloqueo de aproximadamente el 88 % de la contracción muscarínica a la concentración de 1000 µM.

45 Tabla 2. Valores de potencia (IC₅₀) y efecto máximo (EMAX) de la inhibición de la respuesta de la contracción inducida por carbacol (10 µM) en anillos traqueales de rata pretratados durante 10 minutos con mexiletina, JME-173 o JME-207, representantes de la clase de ariloxialquilaminas. Los datos representan la media ± SEM de 4 a 7 anillos traqueales.

| Compuestos | IC ₅₀ (µM) | EMAX |
|------------|-----------------------|------------|
| Mexiletina | 466,4 | 87,7 ± 4,9 |
| JME-173 | 44,3 | 97,9 ± 4,7 |
| JME-207 | 40,9 | 92,9 ± 4,3 |

Ejemplo 5. Efecto de la mexiletina, JME-173 y JME-207 en la relajación de la tráquea previamente contraída por carbacol.

A. Método y evaluación

- 5 Para evaluar el potencial efecto relajante del músculo liso respiratorio, se obtuvieron unas tráqueas de rata y se mantuvieron en un baño orgánico aislado, como se describió anteriormente (Coelho *et al.*, 2008). Entonces, los segmentos traqueales se contrajeron previamente con carbacol, a una concentración de 2,5 µM y se sometieron a concentraciones crecientes de los compuestos probados. Todos los resultados se expresaron como porcentaje de la contracción producida por el carbacol (Coelho *et al.*, 2008).

10 B. Análisis estadístico

Los valores de la media ± error estándar de la media de los grupos investigados se analizaron estadísticamente mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA), seguida por la prueba de Student-Newman-Keuls. Los valores *p* inferiores o iguales a 0,05 se consideraron significativos.

C. Resultados

- 15 La figura 1 muestra el efecto relajante de los compuestos JME-173 y JME-207, en comparación con el compuesto prototipo, mexiletina. Se observó que en las condiciones de pre-contracción por el carbacol, la adición de mexiletina (10 µM-100 mM), en un sistema de anillo traqueal aislado, causaba una relajación que se incrementaba conforme aumentaba la concentración del prototipo mexiletina, para lograr un efecto de relajación máximo del 40 % ± 3 % (n = 10). Por otro lado, los tratamientos con JME-173 y JME-207 (10 µM-10 mM) dieron como resultado una relajación máxima de 118 % ± 21 % (N = 11) (media ± SEM) y 111 % ± 8 % (N = 9), respectivamente. En estas condiciones, los valores de relajación de EC₅₀ para la mexiletina, JME-173 y JME-207 fueron de 146,4 mM ± 39,2 mM (media ± SEM; N = 10), 3,1 mM ± 0,8 mM (N = 9) y 1,0 mM ± 0,3 mM (N = 8), respectivamente. Los hallazgos muestran que la potencia relajante de los análogos es significativamente mayor que la evidenciada por el prototipo en esta preparación. De un modo más específico, los compuestos JME-173 y JME-207 fueron, en este orden, 47 y 146 veces más potentes como inductores de relajación que la mexiletina. Los resultados refuerzan la interpretación de que estos análogos tienen aplicación terapéutica en el control del espasmo de las vías respiratorias.

Ejemplo 6. Actividad antiespasmódica del compuesto JME-173, evaluado en el sistema de contracción anafiláctica del anillo traqueal.

A. Método y evaluación

- 30 En este estudio, se utilizaron ratas Wistar de ambos sexos, que pesaban entre 200 y 250 g, procedentes del Centro de Cría de Animales de Laboratorio de la Fundação Oswaldo Cruz. Como se describió anteriormente (da Costa *et al.*, 2007), los animales se sensibilizaron mediante una inyección en el tejido subcutáneo dorsal, con una mezcla que contenía 50 µg de ovoalbúmina y 5 mg de hidróxido de aluminio, los días 0 y 7. El día 14 después de la primera sensibilización, los animales fueron sacrificados para la extirpación de la tráquea. Después de un período de estabilización de 30 minutos, los anillos traqueales se contrajeron inicialmente con carbacol (2,5 µM), para probar la viabilidad y reproducibilidad de las respuestas de la preparación.

Tratamiento y estimulación de la anafilaxia

- Los anillos traqueales se expusieron a concentraciones crecientes de JME-173 (3-30 µM) o vehículo (NaCl al 0,9 %), durante 30 minutos antes de que se desencadenase la respuesta contráctil disparada por la ovoalbúmina (100 µg/ml).
40 Se utilizó salmeterol (30 µM) como tratamiento de referencia. Las respuestas se expresaron como la media ± error estándar de la media de por lo menos 5 segmentos traqueales. Todos los resultados se expresaron como porcentaje de la contracción producida por 2,5 µM de carbacol.

B. Análisis estadístico

- 45 Los valores de la media ± error estándar de la media de los grupos investigados se analizaron estadísticamente mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA), seguida por la prueba de Student-Newman-Keuls. La evaluación estadística de los datos obtenidos para el tratamiento con salmeterol se realizó mediante la prueba T de Student. Los

valores p inferiores o iguales a 0,05 se consideraron significativos.

C. Resultados

La figura 2A muestra el efecto antiespasmódico, dependiente de la concentración, del compuesto JME-173 sobre la respuesta contráctil inducida por la adición del alérgeno. Se observó que el JME-173 inhibía el 50 % de la respuesta de contracción anafiláctica (EC_{50}), a una concentración de 8,3 μ M. La respuesta se inhibió completamente después del tratamiento con 30 μ M de JME-173. Es importante destacar que, a la misma concentración (30 μ M), el bloqueo exhibido por el salmeterol fue solo del 52 % (figura 2B). Los hallazgos demuestran que el JME-173 fue más potente que el salmeterol para bloquear la contracción anafiláctica. También fue evidente la mayor actividad antiespasmódica de JME-173 en el sistema de contracción anafiláctica, en comparación con el bloqueo exhibido por este compuesto en la contracción inducida por el carbacol.

Ejemplo 7-Actividad anti-anafiláctica de los compuestos mexiletina, JME-173, JME-207 y JME-209, evaluados en el sistema de desgranulación de mastocitos sensibilizados, inducida por un antígeno.

A. Método y evaluación

Para este estudio, se usaron mastocitos de la línea RBL-2H3, como se informó anteriormente (Beaven *et al.*, 1987). Las células se mantuvieron en medio D-MEM, suplementado con suero bovino fetal al 15 %, penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (0,1 mg/ml) y se colocaron en un horno a 37 °C y a una atmósfera de CO₂ al 5 % hasta alcanzar confluencia. Las células se disociaron luego de la placa usando tripsina, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos y se distribuyeron en placas de 48 pocillos, a una densidad de 125.000 células por pocillo. Las células se sensibilizaron con IgM específica de DNP monoclonal (1 μ g/ml), diluida en el mismo medio utilizado para el cultivo y se mantuvieron en el horno durante 20 horas. Después de este período, las células se lavaron con Tyrode-gelatina y se sometieron a tratamiento con concentraciones crecientes de JME-173, JME-207, JME-209 o mexiletina, durante 60 minutos. Luego, la incubación se realizó con DNP-BSA (10 ng/ml) durante un período adicional de 60 minutos. Después de este período, se recogieron 10 μ L de sobrenadante de cada pocillo y se colocaron en una placa de 96 pocillos. Las células se lisaron con 200 μ l de Triton X-100 al 0,1 % y se colocaron 10 μ l del lisado de cada placa en la placa de 96 pocillos. Luego, se agregaron 40 μ l de sustrato para la enzima β -hexosaminidasa a las muestras. Después de 40 minutos de reacción, se añadió la solución de detención de la reacción (glicina 0,2 M), generando una respuesta colorimétrica, que se midió mediante espectrofotómetro ($\lambda = 405$ nm).

Los compuestos JME-173, JME-207, JME-209 y mexiletina también se evaluaron para determinar su potencial citotóxico, según el ensayo de Alamar Blue, como se informó anteriormente (Czekanska, 2011). En esta prueba, el compuesto terfenadina se utilizó como control positivo.

B. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición. Las diferencias estadísticas se determinaron utilizando pruebas de análisis de varianza, seguidas por la prueba de Student-Newman-Keuls. Los valores p inferiores o iguales a 0,05 se consideraron significativos.

C. Resultados

Varios agentes anestésicos locales, como la lidocaína, inhiben la desgranulación de los mastocitos inducida por mecanismos mediados o no mediados por IgE, al bloquear los canales de calcio (Yanagi *et al.*, 1996). Nuestros resultados mostraron que el compuesto mexiletina también inhibía la desgranulación anafiláctica de los mastocitos, en concentraciones que oscilaban entre 100 μ M y 1000 μ M (figura 3). La misma figura muestra que los análogos estudiados JME-173, JME-207 y JME-209 fueron igualmente efectivos para bloquear la desgranulación de los mastocitos causada por la exposición al alérgeno, evidenciando, sin embargo, una mayor potencia de los análogos estudiados en comparación con la mexiletina.

La tabla 3 muestra los valores de potencia comparativos (IC_{50}) y la eficacia (EMAX) de los compuestos estudiados. Todos ellos inhibieron en aproximadamente el 100 % la respuesta de desgranulación, mientras que los valores de IC_{50} disminuyeron de 381,8 μ M, obtenidos después del tratamiento con mexiletina, a 28,6 μ M, 3,4 μ M y 2,3 μ M después de JME-209, JME-173 y JME-207, respectivamente.

Estos resultados, obtenidos con mastocitos sensibilizados pasivamente con IgE, indican que los análogos JME-173, JME-207 y JME-209 fueron capaces de inhibir la activación anafiláctica de los mastocitos con mayor potencia (hasta dos órdenes de magnitud), en comparación con el prototipo.

Tabla 3. Valores comparativos de la potencia de inhibición (IC_{50}) y del efecto máximo (EMAX) de mexiletina, JME-207, JME-173 y JME-209, de las clases de difeniloxialquilaminas y ariloxialquilaminas, en relación con el bloqueo de la desgranulación anafiláctica de los mastocitos.

| Compuestos | IC ₅₀ (μM) | EMAX |
|------------|-----------------------|------|
| Mexiletina | 381,8 | 100 |
| JME-207 | 2,3 | 94 |
| JME-173 | 3,4 | 97 |
| JME-209 | 28,6 | 100 |

Ejemplo 8. Actividad broncodilatadora de los compuestos JME-207 y JME-209 *in vivo*

A. Método y evaluación

5 Se utilizaron ratones A/J de ambos sexos, que pesaban entre 18 y 20 g, provenientes del Centro de Cría de Animales de Laboratorio de la Fundación Oswaldo Cruz. Usando pletismografía barométrica de cuerpo entero (Buxco Research System, Wilmington, NC), se midieron las respuestas de broncoespasmo causadas por inhalaciones subsiguientes de metacolina (12, 25 y 50 mg/ml durante 2,5 minutos, intervalos de 5 minutos) en ratones A/J estándar, despiertos, no inmovilizados, como se informó anteriormente (Coelho *et al.*, 2008; Hamelmann *et al.*, 1997). Las mediciones de Penh en respuesta a la estimulación con metacolina se realizaron 1 hora y 3 horas después del tratamiento con JME-207 y 10 JME-209 (30 y 100 mg/kg), administrados por vía oral (sonda).

B. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media ± error estándar de la media. Las diferencias estadísticas se determinaron utilizando pruebas de análisis de varianza, seguidas por la prueba de Student-Newman-Keuls. Los valores *p* inferiores o iguales a 0,05 se consideraron significativos.

15 C. Resultados

La figura 4 muestra el efecto del tratamiento con JME-209 (30 y 100 mg/kg, por vía oral) o del vehículo (NaCl al 0,9 %), sobre la respuesta del aumento de Penh (indicativo del aumento de la resistencia pulmonar), inducida por la exposición a la metacolina (12-50 mg/ml), después de 1 hora y de 3 horas del tratamiento. Hubo un ligero bloqueo del broncoespasmo colinérgico con ambas dosis utilizadas (30 y 100 mg/kg) en el análisis realizado 1 hora después del 20 tratamiento. El bloqueo demostró ser activo solo a la dosis más alta, cuando las pruebas de respuesta de estimulación con metacolina se repitieron 3 horas después del tratamiento, lo que sugiere que el compuesto tiene un tiempo de acción de al menos 3 horas cuando la sustancia se administra por vía oral, a una dosis de 100 mg/kg.

Se obtuvieron resultados similares cuando los animales se trataron con JME-207. Administrado por vía oral, a dosis de 30 y 100 mg/kg, el compuesto inhibió significativamente la respuesta de la broncoconstricción inducida por metacolina 3 horas después del tratamiento (figura 5). Los resultados juntos demuestran la actividad antiespasmódica de los compuestos JME-209 y JME-207, *in vivo*, confirmando nuestros datos obtenidos en el sistema orgánico aislado (*in vitro*). 25

Ejemplo 9. Efecto terapéutico de los compuestos JME-141, JME-173, JME-207 y JME-188 sobre la inflamación pulmonar y la hiperreactividad en modelos de asma en ratones.

30 A. Método y evaluación

En los experimentos, se usaron unos ratones A/J machos (18-20 g), procedentes del Centro de Cría de Animales de Laboratorio de la Fundación Oswaldo Cruz. Los procedimientos de sensibilización y estimulación con antígenos utilizados en este estudio siguieron el protocolo experimental que se muestra en la figura 6. Los animales se sensibilizaron previamente con una mezcla de ovoalbúmina (OVA) (50 μg) (Grado V; Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) e hidróxido de aluminio (5 mg), administrada por vía subcutánea el día 0, con un refuerzo en el día 14 (igual suspensión, administrada por vía intraperitoneal). Las instilaciones nasales de OVA (25 μg/25 μl en NaCl al 0,9 % estéril) se administraron los días 14, 21, 28 y 35, y el análisis de hiperreactividad se realizó 24 horas después de la última estimulación. Como se muestra en la figura 6, los tratamientos con JME-141, JME-173, JME-207 y JME-188 se realizaron solo los días 28 y 35, 1 hora antes de la estimulación con OVA, mediante nebulización durante 30 minutos. Es decir, los tratamientos se llevaron a cabo después de la instalación del cuadro asmático, lo que refleja una acción terapéutica de los compuestos respectivos analizados. 35 40

Se investigó el efecto de los tratamientos sobre la hiperreactividad bronquial midiendo los cambios de resistencia y la elastancia pulmonar, utilizando el sistema de pletismografía barométrica invasiva de cuerpo entero (Buxco, EE. UU.), como se describió anteriormente (Olsen *et al.*, 2012). 45

B. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas se determinaron utilizando pruebas de análisis de varianza, seguidas por la prueba de Student-Newman-Keuls. Los valores p inferiores o iguales a 0,05 se consideraron significativos.

5 C. Resultados

Como se muestra en la figura 7, la nebulización de los animales durante 30 minutos con los compuestos JME-141, JME-173, JME-207 y JME-188 (2 %), a partir de la tercera semana de estimulación con alérgenos, abolió el marco de hiperreactividad de las vías respiratorias, observada en animales sensibilizados y estimulados antigénicamente, tratados solo con vehículo (Tween-80, 0,2 %). Se encontró que la inhibición era efectiva tanto en la respuesta en aumento de la resistencia pulmonar, como en el incremento de la elastancia pulmonar observada después de la exposición a la metacolina.

10 Todos los compuestos fueron igualmente activos en el bloqueo de la infiltración de leucocitos, evaluada por lavado broncoalveolar, especialmente para la inhibición de la infiltración eosinofílica, inhibida en un 50 % por todos los compuestos analizados (figura 8). Los análisis de la celularidad también se llevaron a cabo 24 horas después de la última prueba de antígeno.

15 Nuestros resultados indicaron que la inhibición de la hiperreactividad y las respuestas de reclutamiento celular, según lo evidenciado por el tratamiento con JME-173, demostró estar asociada al bloqueo de la generación de citoquinas proinflamatorias, incluidas la eotaxina-2, la IL-5 y la IL-13, sin cambio en los mayores niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (figura 9).

20 La producción de las citoquinas IL-5 e IL-13 fue igualmente sensible al tratamiento con JME-207 o JME-188, pero solo esta última inhibió la eotaxina-2, mientras que ninguna de las dos modificó el aumento de la producción de eotaxina-1. Estos datos indican que, con pequeñas particularidades, los compuestos JME-141, JME-173, JME-207 y JME-188, administrados por nebulización (2 %), son activos en el bloqueo de la inflamación pulmonar y la hiperreactividad asociada con la respuesta asmática. Los resultados conjuntos también sugieren que la inhibición de la generación de las citocinas Th₂ proinflamatorias puede participar en el bloqueo de las características patológicas del perfil de asma observado en este modelo.

25 Ejemplo 10. Efecto de la nebulización con JME-173 sobre la inflamación, la producción de moco y la remodelación pulmonar en un modelo murino de asma

A. Método y evaluación

30 Se usaron unos ratones A/J machos (18-20 g), procedentes del Centro de Cría de Animales de Laboratorio de la Fundación Oswaldo Cruz, en los experimentos. Los procedimientos de sensibilización, tratamiento y estimulación con antígeno utilizados en este estudio siguieron el protocolo experimental que se muestra en la figura 6. Se usaron técnicas histológicas para la cuantificación de moco y fibrosis peribronquial, siguiendo protocolos experimentales previamente informados y validados (Serra *et al.*, 2012).

35 B. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas se determinaron utilizando pruebas de análisis de varianza, seguidas por la prueba de Student-Newman-Keuls. Los valores p inferiores o iguales a 0,05 se consideraron significativos.

C. Resultados

40 El tratamiento por nebulización con JME-173 en concentraciones de 0,5 %, 1 % o 2 % durante 30 minutos, que comenzó a la tercera semana de estimulación con el alérgeno (figura 10), confirmó el efecto antiasmático de este compuesto.

45 Fue evidente en las tres concentraciones en aerosol probadas que el compuesto JME-173 fue capaz de bloquear la respuesta de la hiperreactividad de las vías respiratorias, incluso a la concentración más baja (0,5 %), como se ilustra en la figura 11. En este modelo, la estimulación con ovoalbúmina causó un significativo aumento en la cantidad de mucosidad presente en las vías respiratorias de los animales sensibilizados (micrografía B de la figura 11) (tinción con PAS, puntas de flecha), en comparación con los animales de control estimulados a solución salina al 0,9 % (micrografía B). En la figura 11, parte C, se observa que la exacerbación de la producción de moco en ratones asmáticos se inhibió sustancialmente mediante el tratamiento con JME-173 (0,5 %). La figura 11D muestra el resultado del análisis cuantitativo, donde es evidente que JME-173 inhibió la producción de moco en aproximadamente un 70 %.

50 La tinción de las secciones histológicas del tejido pulmonar con la tintura de Gömöri tricrómica evidenció una acumulación marcada de matriz extracelular en la región peribronquial (indicada por la punta de flecha) en los animales expuestos a la ovoalbúmina (figura 12, parte B), en comparación con los animales del grupo de control negativo (parte A). El tratamiento con JME-173 abolió claramente la respuesta fibrótica, como lo ilustra la imagen representativa, así

como el análisis cuantitativo realizado en función de la morfometría (figura 12, partes C y D, respectivamente). En conjunto, los datos sugieren que el tratamiento de nebulización con JME-173 es capaz de revertir la hiperreactividad de las vías respiratorias, así como de inhibir la producción de moco en las vías respiratorias inferiores y la fibrosis peribronquial causada por la instilación intranasal del agente alergénico en ratones sensibilizados.

5 Ejemplo 11. Efecto del compuesto JME-209 sobre la inflamación pulmonar y la hiperreactividad de las vías respiratorias causada por LPS

A. Método y evaluación

Se usaron unos ratones A/J machos (18-20 g), procedentes del Centro de Cría de Animales de Laboratorio de la Fundación Oswaldo Cruz, en los experimentos. Los ratones se anestesiaron con halotano en aerosol (Cristália, SP, Brasil) para recibir la administración intranasal de LPS (25 µg/25 µl de NaCl al 0,9 %, instilación) o NaCl al 0,9 % (25 µl) (control negativo). Los animales se trataron previamente con JME-209 (30 y 100 mg/kg, por vía oral) 1 hora antes de la instilación de LPS, y el análisis del impacto del tratamiento sobre el reclutamiento de leucocitos en el espacio aéreo se realizó 18 horas después de la estimulación. La obtención del lavado broncoalveolar, así como los recuentos de leucocitos totales y diferenciales realizados en este efluente, se realizaron como se describió anteriormente (Kummerle *et al.*, 2012). Así, después de 18 horas de instilación de LPS, los ratones se sacrificaron con anestesia terminal con tiopental (500 mg/kg). Luego, se les hizo la disección y canulación de la tráquea. El lavado broncoalveolar (BAL, *bronchoalveolar lavage*) se realizó mediante 3 lavados consecutivos de 800 µl de PBS, que contenía EDTA (10 mM). Los lavados se sometieron luego a centrifugación (1500 rpm-10 minutos) y el "pelet" celular se resuspendió en el volumen de 0,5 ml de solución de PBS/EDTA 10 mM. El recuento total de leucocitos del lavado se realizó en una cámara de Neubauer, mediante microscopía óptica (aumento de 100x), diluyendo una alícuota de la suspensión celular del lavado en líquido Türk (1:40). El recuento diferencial se realizó en citocentrifugados, que se tiñeron con May-Grunwald-Giemsa y se evaluaron utilizando un objetivo de inmersión en aceite (magnificación de 1000 x) (Kummerle *et al.*, 2012).

La hiperreactividad de las vías respiratorias también se evaluó 18 horas después del LPS, exponiendo a los animales a concentraciones crecientes de metacolina en aerosol (3-27 mg/ml) en el sistema FinePoint R/C Buxco® (Buxco Electronics, Sharon, CT, EE. UU.). Los ratones se anestesiaron con Nembutal (60 mg/kg, i.p.) para el procedimiento de traqueotomía y la conexión del animal a la ventilación mecánica y el neumotacógrafo de la plataforma FinePoint. La actividad neuromuscular se bloqueó con bromuro de pancuronio (1 mg/kg, iv) para permitir los registros de resistencia pulmonar (cm H₂O/mL/s) y la elastancia (cm H₂O/ml) en cada ciclo respiratorio, como se informó anteriormente (Olsen *et al.*, 2011).

B. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media ± error estándar de la media. Las diferencias estadísticas se determinaron utilizando pruebas de análisis de varianza, seguidas por la prueba de Student-Newman-Keuls. Los valores *p* inferiores o iguales a 0,05 se consideraron significativos.

35 C. Resultados

En este modelo de inflamación pulmonar aguda causada por endotoxina, los tratamientos con JME-209 (30 y 100 mg/kg, por vía oral) administrados 1 hora antes del LPS (25 µg/animal), inhibieron la infiltración de leucocitos en el espacio broncoalveolar, reduciendo en particular los niveles de eosinófilos y neutrófilos, sin alterar en gran medida el aumento en el número de células mononucleares (figura 13).

40 En estas condiciones, el tratamiento también inhibió los cambios mecánicos de ventilación (hiperreactividad de las vías respiratorias), representados por el aumento significativo de la resistencia pulmonar y los valores de elastancia, que son indicadores de la reducción del flujo de aire en las vías respiratorias centrales y de la reducción de la capacidad de expansión del parénquima pulmonar, respectivamente (figura 14).

45 En conclusión, los resultados muestran que hubo una clara inhibición de la inflamación pulmonar y de la hiperreactividad de las vías respiratorias causadas por el LPS, gracias al tratamiento oral con JME-209, lo que sugiere que este compuesto tiene un potencial para inhibir las enfermedades inflamatorias pulmonares crónicas, como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Ejemplo 12. Efecto protector de JME-209 sobre la inflamación aguda de las vías respiratorias inducida por el humo del tabaco en ratones

50 A. Método y evaluación

Se usaron unos ratones A/J machos (18-20 g), procedentes del Centro de Cría de Animales de Laboratorio de la Fundación Oswaldo Cruz, en los experimentos. Los animales se colocaron en una cámara y se sometieron a una atmósfera enriquecida con 100 ml de humo, proveniente de 4 cigarrillos con filtro (marca registrada) durante 1 minuto, en cuatro días consecutivos. Los animales de control se expusieron a condiciones en las que el humo del cigarrillo se reemplazó por el igual volumen de aire ambiental (Castro *et al.*, 2009).

Los tratamientos con dexametasona (1 mg/kg) o JME-209 (30 y 100 mg/kg) se realizaron por vía oral, 1 hora antes de cada exposición al humo. Los compuestos se disolvieron en NaCl al 0,9 % justo antes de la administración.

5 La obtención del lavado broncoalveolar, así como los recuentos de leucocitos totales y diferenciales realizados en este efluente, se realizaron como se describió anteriormente (Olsen *et al.*, 2011). Así, después de 24 horas de la última exposición al humo del cigarrillo, los ratones se sacrificaron mediante anestesia terminal con tiopental (500 mg/kg). Luego, se les diseccionó y canuló la tráquea. Se realizó el BAL mediante 3 lavados consecutivos de 800 µl de PBS que contenía EDTA (10 mM). Los lavados se sometieron luego a centrifugación (1500 rpm - 10 minutos) y el "pelet" celular se resuspendió en el volumen de 0,5 ml de solución de PBS/EDTA 10 mM. El recuento total de leucocitos del lavado se realizó en una cámara de Neubauer, mediante microscopía óptica (aumento de 100x), diluyendo una alícuota de la suspensión celular del lavado en líquido Türk (1:40). El recuento diferencial se realizó en citocentrifugados, que se tiñeron con May-Grunwald-Giemsa y se evaluaron utilizando un objetivo de inmersión en aceite (magnificación de 1000 x).

B. Análisis estadístico

15 Los resultados se expresaron como la media ± error estándar de la media. Las diferencias estadísticas se determinaron utilizando pruebas de análisis de varianza, seguidas por la prueba de Student-Newman-Keuls. Los valores *p* inferiores o iguales a 0,05 se consideraron significativos.

C. Resultados

20 En este modelo de inflamación pulmonar aguda causada por el humo de cigarrillo establecido en ratones (Castro *et al.*, 2009), el tratamiento con JME-209 (30 y 100 mg/kg, vía oral), 1 hora antes de la estimulación con el humo, inhibió significativamente la acumulación de leucocitos en el espacio broncoalveolar, mientras que el tratamiento con dexametasona (3 mg/kg, por vía oral) no fue efectivo (figura 15).

25 El aumento en los leucocitos totales resultó sustancialmente por los aumentos en el número de neutrófilos, eosinófilos y células mononucleares en el efluente broncoalveolar, cuyos cambios fueron bloqueados por el JME-209. El tratamiento con la dexametasona antiinflamatoria esteroidea (1 mg/kg, por vía oral) también inhibió el ligero aumento en el número de eosinófilos, pero no pudo inhibir la acumulación de células mononucleares y solo inhibió parcialmente la infiltración de neutrófilos (figura 16).

30 En conclusión, considerando que el humo del cigarrillo es una causa importante del empeoramiento del asma y de la EPOC, los resultados presentados aquí sugieren de manera muy marcada que el tratamiento con JME-209 tiene el potencial de prevenir la inflamación pulmonar asociada con el humo del cigarrillo, un factor importante de patogénesis en estos pacientes.

Los derivados de la presente invención, como se describen en este documento, se administran usualmente como una composición farmacéutica. Dichas composiciones pueden prepararse mediante procedimientos que son de amplio conocimiento en la técnica farmacéutica y que comprenden al menos un compuesto activo de la invención.

35 Los compuestos de esta invención suelen administrarse en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Por lo general, será el médico quien determine la cantidad real del compuesto administrado, a la luz de las circunstancias pertinentes, incluida la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto administrado, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y así sucesivamente.

40 Los derivados y las composiciones que se describen en esta solicitud de patente pueden administrarse a un sujeto, con preferencia, a un mamífero, con mayor preferencia, a un ser humano, para tratar y/o prevenir la enfermedad por cualquier vía adecuada.

Las composiciones que contienen los derivados de la presente invención se pueden formular de la siguiente manera:

- (1) comprimidos, cápsulas, polvos para reconstitución;
- (2) solución oral;
- (3) suspensión oral
- 45 (4) o solución para inhalación.

Por lo general, las composiciones de la presente invención se formulan con vehículos adecuados y pueden ejemplificarse según se explica a continuación.

- (1) Formulación de base para comprimidos, cápsulas y polvos para reconstitución.

ES 2 717 125 T3

| Componente (función) | Vehículos farmacéuticamente aceptables | Cantidad (%) |
|-------------------------|--|--------------|
| Principio activo | | 10,0-80,0 |
| Desintegrante | Croscarmelosa sódica, glicolato de almidón sódico, crospovidona | 1,0-7,0 |
| Agente deslizamiento de | Dióxido de silicio coloidal, talco | 0,5-4,0 |
| Aglutinante | Polivinilpirrolidona (PVP), hidroxipropil-metilcelulosa (HPMC), hidroxipropil-celulosa (HPC) | 0,5-4,0 |
| Diluyente | Lactosa, manitol, fosfato de calcio, celulosa microcristalina, almidón pregelatinizado | 5,0-70,0 |
| Saborizante | Fresa, cereza, naranja | 0,05-1,00 |
| Colorante | Rojo n.º 3 de FD&C, amarillo n.º 6 de FD&C | c. s. |
| Edulcorante | Aspartamo, ciclamato de sodio, sucralosa, sacarina | 0,05-0,5 |
| Lubricante | Estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, fumarato de estearilo sódico | 0,5-3,0 |

(2) Solución oral

| Componente (función) | Vehículos farmacéuticamente aceptables | Cantidad (%) |
|----------------------|---|--------------|
| Principio activo | | 10.0-80.0 |
| Antioxidante | Acido ascórbico, metabisulfito de potasio, metabisulfito de sodio, hidroxianisol butilado (BHA, <i>Butylated hydroxyanisole</i>), hidroxitolueno butilado (BHT, <i>Butylated hydroxytoluene</i>), ácido cítrico | 0.005-2.0 |
| Conservantes | Benzoato de sodio, benzoato de potasio, propilparabeno, metilparabeno, butilparabeno, sorbato de potasio | 0.05-0.5 |
| Corrector de pH | Ácido cítrico, ácido fumárico, trietanolamina | |
| Saborizante | Fresa, cereza, naranja | 0.05-1.00 |
| Colorante | Rojo n.º 3 de FD&C, amarillo n.º 6 de FD&C | 0.01-0.5 |
| Edulcorante | Aspartamo, ciclamato de sodio, sucralosa, sacarina, sacarosa | 0.05-60.0 |
| Solubilizante | Propilenglicol, ciclodextrina | c. s. |
| Disolvente | Agua | c. s. |

(3) Suspensión oral

| Componente (función) | Vehículos farmacéuticamente aceptables | Cantidad (%) |
|----------------------|---|--------------|
| Principio activo | | 10,0-80,0 |
| Agente de suspensión | Goma de xantano, carboximetil-celulosa sódica, metil-celulosa | 0,5-5,0 |
| Antioxidante | Ácido ascórbico, metabisulfito de potasio, metabisulfito de sodio, hydroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), ácido cítrico | 0,005-2,0 |
| Conservantes | Benzoato de sodio, Benzoato de potasio, propilparabeno, metilparabeno, butilparabeno, sorbato de potasio | 0,05-0,5 |
| Corrector del pH | Ácido cítrico, ácido fumárico, trietanolamina | |
| Edulcorante | Aspartamo, ciclamato de sodio, sucralosa, sacarina, sacarosa | 0,05-60,0 |
| Saborizante | Fresa, cereza, naranja | 0,05-1,00 |
| Colorante | Rojo n.º 3 de FD&C, amarillo n.º 6 de FD&C | c. s. |
| Disolvente | Agua | c. s. |

(4) Solución para inhalación

| Componente (función) | Vehículos farmacéuticamente aceptables | Cantidad (%) |
|----------------------|--|--------------|
| Principio activo | | 1,0-20,0 |
| Agente isotonicante | Cloruro de sodio | 1,0-10,0 |
| Tensioactivo | Ácido oleico, lecitina, Span 85, PVP K25 | 0,5-5,0 |
| Corrector del pH | Ácido sulfúrico | c. s. |
| Disolvente | Agua | c. s. |

5 Los vehículos (componentes) descritos con anterioridad para las composiciones son meramente representativos. Otros materiales, así como también, las técnicas de procesamiento y similares, se encuentran en publicaciones específicas, como Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a edición, 1990, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 18042.

10 Aunque la presente invención se ha descrito con respecto a realizaciones específicas, resulta claro que son evidentes muchas alternativas y variaciones para los expertos en la técnica. Estas alternativas y variaciones deben considerarse respaldadas por el alcance de las reivindicaciones.

Los documentos que pertenecen al estado de la técnica del conocimiento de los inventores y citados en la presente memoria descriptiva se enumeran a continuación.

1. Patente de los EE. UU. n.º US 3.659.019.

15 2. Patente de los EE. UU. n.º US 3.954.872.

3. Patente de los EE. UU. n.º US 4.031.244.

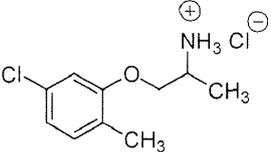
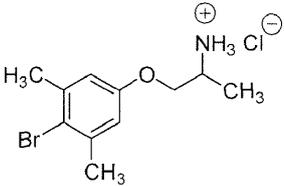
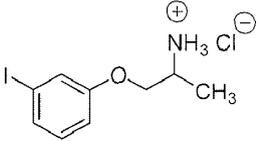
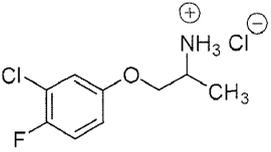
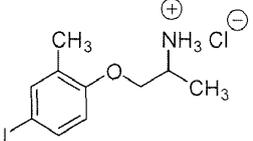
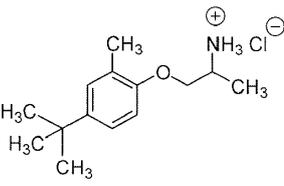
4. Beaven MA, Maeyama K, Wolde-Mussie E, Lo TN, Ali H, Cunha-Melo JR (1987). Mechanism of signal transduction in mast cells and basophils: studies with RBL-2H3 cells. Agents Actions 20(3-4): 137-145.

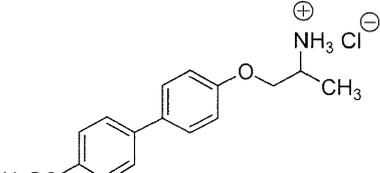
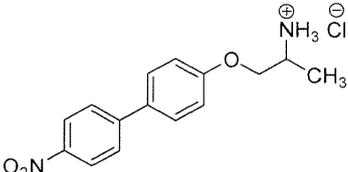
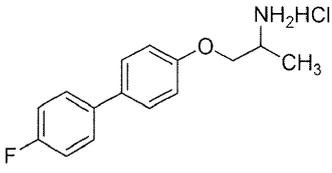
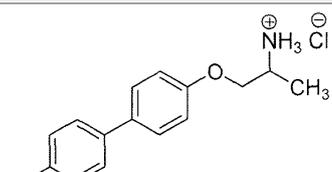
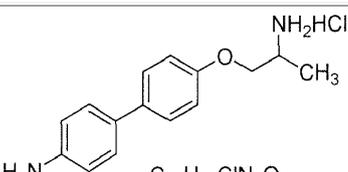
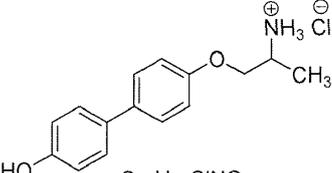
20 5. Brightling CE, Gupta S, Gonem S, Siddiqui S (2012). Lung damage and airway remodelling in severe asthma. Clin. Exp. Allergy 42(5): 638-649.

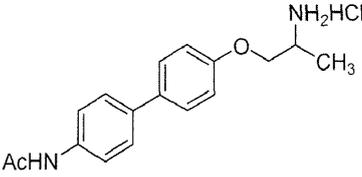
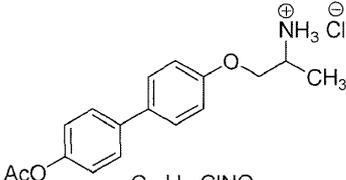
6. Brody H (2012). Chronic obstructive pulmonary disease. *Nature* 489(7417): S1.
7. Campbell RW (1987). Mexiletine. *N. Engl. J. Med.* 316(1): 29-34.
8. Castro P, Nasser H, Abrahao A, Dos Reis LC, Rica I, Valenca SS, et al. (2009). Aspirin and indomethacin reduce lung inflammation of mice exposed to cigarette smoke. *Biochem. Pharmacol.* 77(6): 1029-1039.
- 5 9. Coelho LP, Serra MF, Pires AL, Cordeiro RS, Rodrigues e Silva PM, dos Santos MH, et al. (2008). 7-Epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-cGMP pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327(1): 206-214.
10. Czekanska EM (2011). Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. *Methods Mol. Biol.* 740: 27-32.
- 10 11. da Costa JC, Olsen PC, de Azeredo Siqueira R, de Frias Carvalho V, Serra MF, Alves LA, et al. (2007). JMF2-1, a lidocaine derivative acting on airways spasm and lung allergic inflammation in rats. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119(1): 219-225.
12. Dance A (2012). Health impact: Breathless. *Nature* 489 (7417): S2-3.
- 15 13. Groeben H, Foster WM, Brown RH (1996). Intravenous lidocaine and oral mexiletine block reflex bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154(4 Pt 1): 885-888.
14. Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, et al. (1997). Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156(3 Pt 1): 766-775.
- 20 15. Jarvis B, Coukell AJ (1998). Mexiletine. A review of its therapeutic use in painful diabetic neuropathy. *Drugs* 56(4): 691-707.
16. Kummerle AE, Schmitt M, Cardozo SV, Lugnier C, Villa P, Lopes AB, et al. (2012). Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of N-Acylhydrazones and Novel Conformationally Constrained Compounds as Selective and Potent Orally Active Phosphodiesterase-4 Inhibitors. *J. Med. Chem.*
- 25 17. Marmura MJ, Passero FC, Jr., Young WB (2008). Mexiletine for refractory chronic daily headache: a report of nine cases. *Headache* 48(10): 1506-1510.
18. Monk JP, Brogden RN (1990). Mexiletine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in the treatment of arrhythmias. *Drugs* 40(3): 374-411.
19. Neher E, Sakmann B (1992). The patch clamp technique. *Sci. Am.* 266(3): 44-51.
- 30 20. Olsen PC, Coelho LP, da Costa JC, Cordeiro RS, Silva PM, Martins MA (2012). Two for one: Cyclic AMP mediates the anti-inflammatory and anti-spasmodic properties of the non-anesthetic lidocaine analog JMF2-1. *Eur. J. Pharmacol.* 680: 102-107.
21. Olsen PC, Ferreira TP, Serra MF, Farias-Filho FA, Fonseca BP, Viola JP, et al. (2011). Lidocaine-derivative JMF2-1 prevents ovalbumin-induced airway inflammation by regulating the function and survival of T cells. *Clin. Exp. Allergy* 41(2): 250-259.
- 35 22. Serra MF, Anjos-Valotta EA, Olsen PC, Couto GC, Jurgilas PB, Cotias AC, et al. (2012). Nebulized lidocaine prevents airway inflammation, peribronchial fibrosis, and mucus production in a murine model of asthma. *Anesthesiology* 117(3): 580-591.
23. Yanagi H, Sankawa H, Saito H, Iikura Y (1996). Effect of lidocaine on histamine release and Ca²⁺ mobilization from mast cells and basophils. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 40(9): 1138-1144.
- 40 24. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edição, 1990, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 18042.

REIVINDICACIONES

1. Derivados de difeniloxialquilamina y derivados de ariloxialquilamina seleccionados de las siguientes estructuras:

| Estructura | Código |
|--|---------|
|  <p>$C_{10}H_{15}Cl_2NO^+$ Peso molecular: 236,14</p> | JME-170 |
|  <p>$C_{11}H_{17}BrClNO^+$ Peso molecular: 294,62</p> | JME-173 |
|  <p>$C_9H_{13}ClINO^+$ Peso molecular: 313,56</p> | JME-141 |
|  <p>$C_9H_{12}Cl_2FNO^+$ Peso molecular: 240,10</p> | JME-188 |
|  <p>$C_{10}H_{15}ClINO^+$ Peso molecular: 327,59</p> | JME-207 |
|  <p>$C_{14}H_{24}ClNO^+$ Peso molecular: 257,80</p> | JME-208 |

| Estructura | Código |
|---|-----------|
|  <p data-bbox="624 488 751 517">$C_{15}H_{18}ClNO$</p> <p data-bbox="544 526 799 555">Peso molecular: 263,76</p> | JME-209 |
|  <p data-bbox="643 750 770 779">$C_{16}H_{20}ClNO_2$</p> <p data-bbox="547 788 802 817">Peso molecular: 293,79</p> | JME-209-1 |
|  <p data-bbox="611 1008 754 1037">$C_{15}H_{17}ClN_2O_3$</p> <p data-bbox="547 1046 802 1075">Peso molecular: 308,76</p> | JME-209-2 |
|  <p data-bbox="595 1265 738 1294">$C_{15}H_{17}ClFNO$</p> <p data-bbox="547 1303 802 1332">Peso molecular: 281,75</p> | JME-209-3 |
|  <p data-bbox="611 1523 754 1552">$C_{15}H_{17}BrClNO$</p> <p data-bbox="547 1561 802 1590">Peso molecular: 342,66</p> | JME-209-4 |
|  <p data-bbox="643 1765 770 1794">$C_{15}H_{19}ClN_2O$</p> <p data-bbox="547 1803 802 1832">Peso molecular: 278,78</p> | JME-209-5 |
|  <p data-bbox="611 2022 754 2051">$C_{15}H_{18}ClNO_2$</p> | JME-209-6 |

| Estructura | Código |
|---|-----------|
| <p>Peso molecular: 279,76</p> | |
|  <p>$C_{17}H_{21}ClN_2O_2$ Peso molecular: 320,81</p> | JME-209-7 |
|  <p>$C_{17}H_{20}ClNO_3$ Peso molecular: 321,8</p> | JME-209-8 |

2. Una composición farmacéutica caracterizada por contener al menos uno de los derivados que se definen en la reivindicación 1, o una de sus sales formadas por ácidos orgánicos o minerales, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, formulada como comprimidos, cápsulas, polvos para reconstitución, solución oral, suspensión oral o solución para inhalación.
4. Una composición farmacéutica según la reivindicación 3, caracterizada por que la composición en forma de comprimidos, cápsulas y polvos para reconstitución contiene agentes seleccionados del grupo que consiste en disgregantes, agentes de deslizamiento, aglutinantes, diluyentes, saborizantes, colorantes, edulcorantes o lubricantes.
- 10 5. Una composición farmacéutica según la reivindicación 3, caracterizada por que la composición en forma de solución oral contiene agentes seleccionados del grupo que consiste en antioxidantes, conservantes, correctores de pH, aromatizantes, colorantes, edulcorantes, solubilizantes o disolventes.
- 15 6. Una composición farmacéutica según la reivindicación 3, caracterizada por que la composición en forma de suspensión oral contiene agentes seleccionados del grupo que consiste en suspensores, antioxidantes, conservantes, correctores de pH, edulcorantes, saborizantes, colorantes o disolventes.
7. Una composición farmacéutica según la reivindicación 3, caracterizada por que la composición en forma de solución para inhalación contiene agentes seleccionados del grupo que consiste en agentes isotonicantes, tensioactivos, correctores de pH o disolventes.
- 20 8. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, para usar en el tratamiento, la prevención o la inhibición de la enfermedad inflamatoria pulmonar, mediante la administración en una cantidad farmacológicamente eficaz, por cualquier vía de administración.

Figura 1

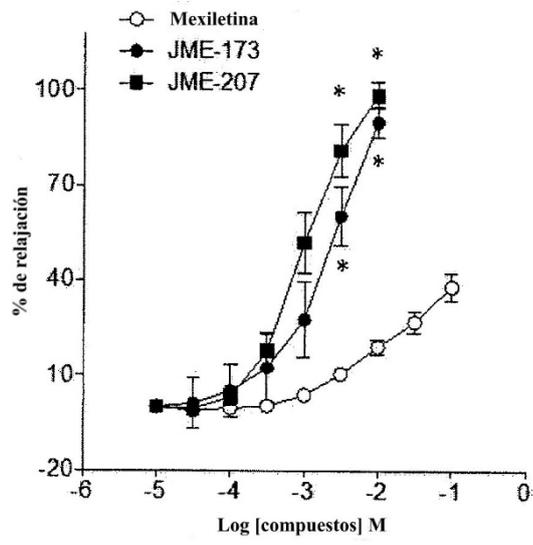


Figura 2

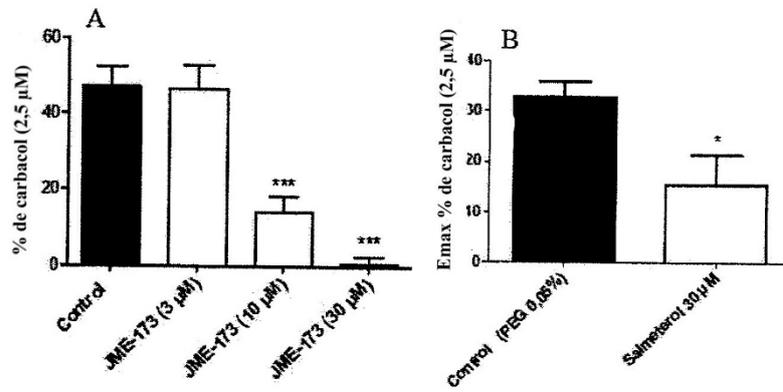


Figura 3

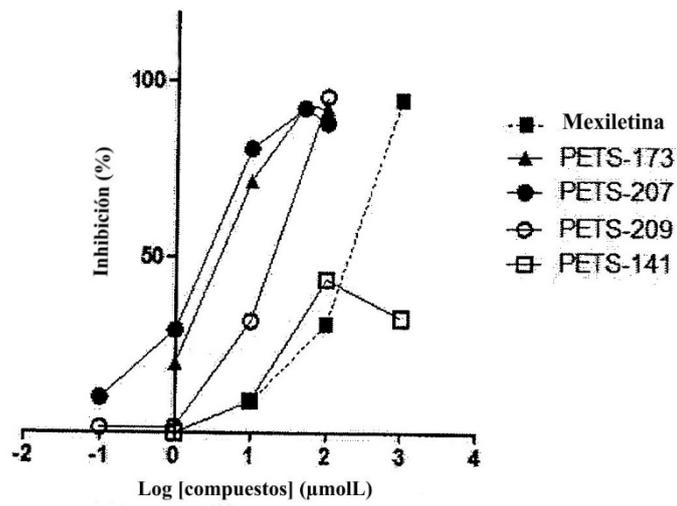


Figura 4

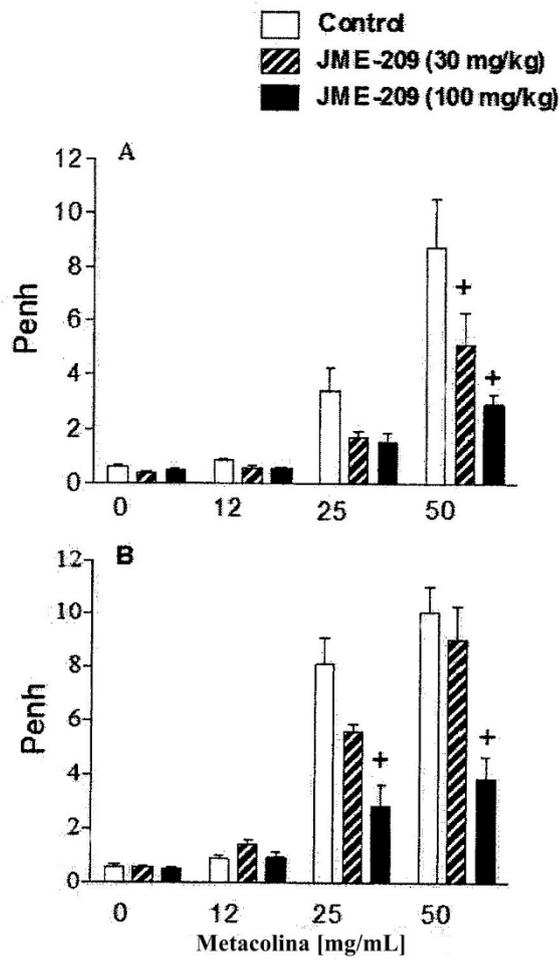


Figura 5

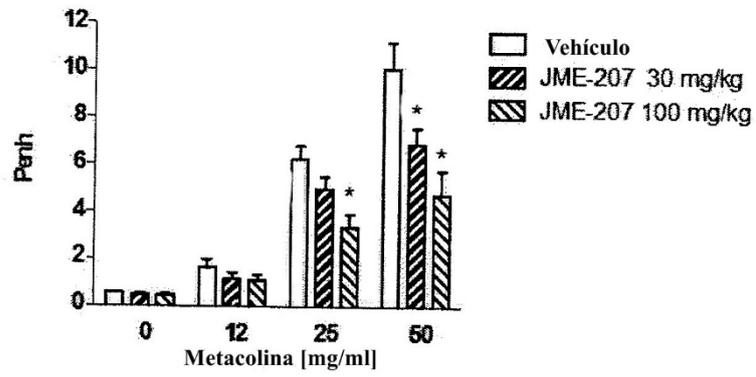


Figura 6

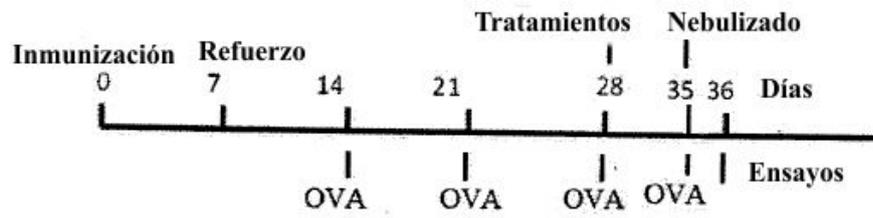


Figura 7

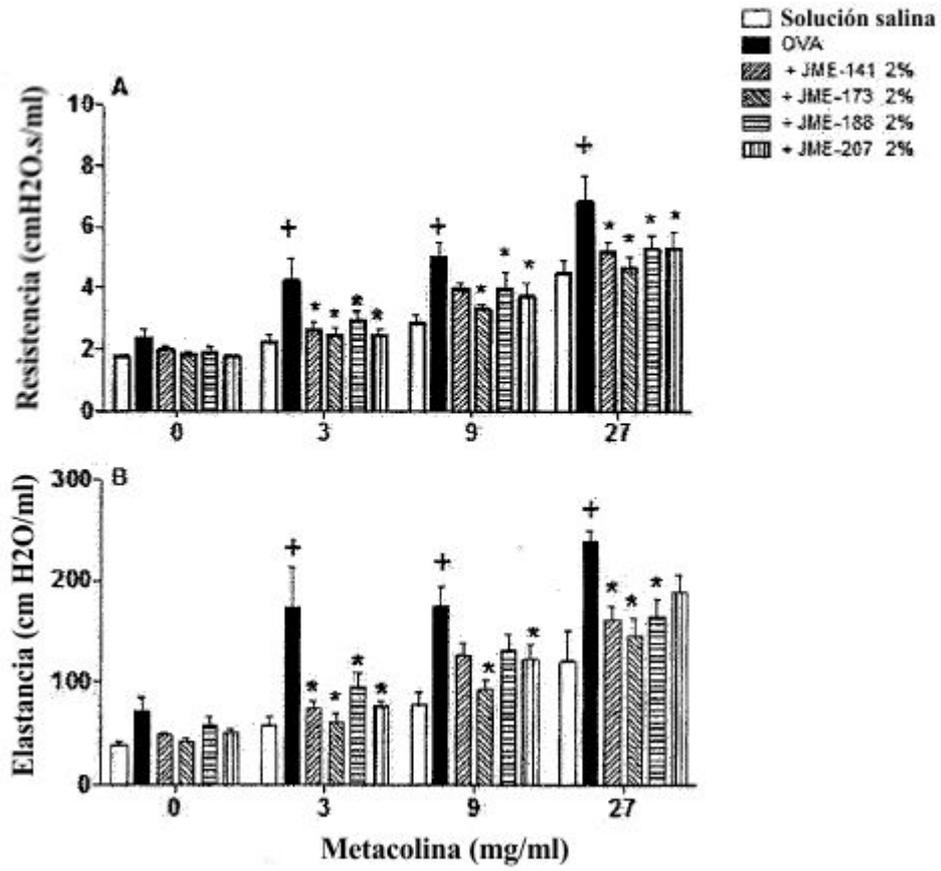


Figura 8

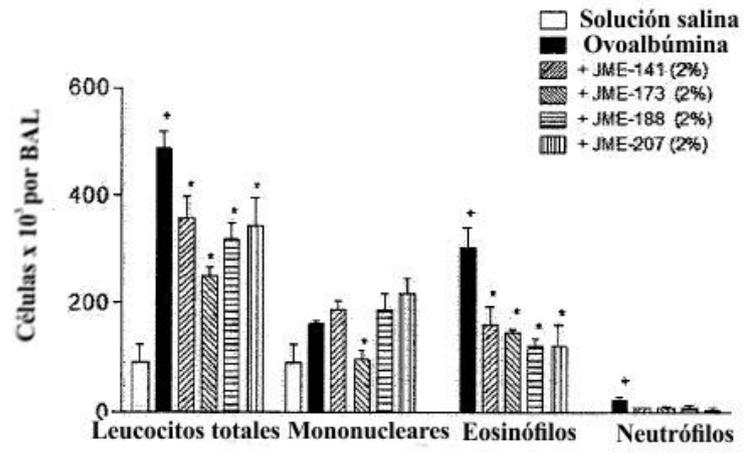


Figura 9

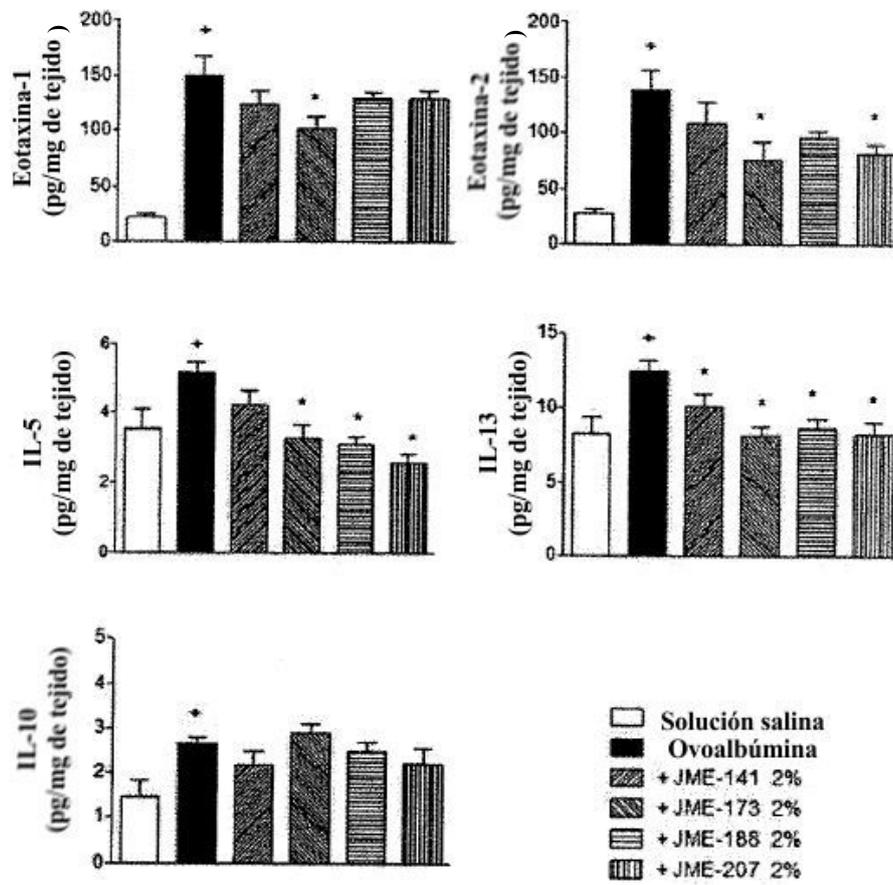


Figura 10

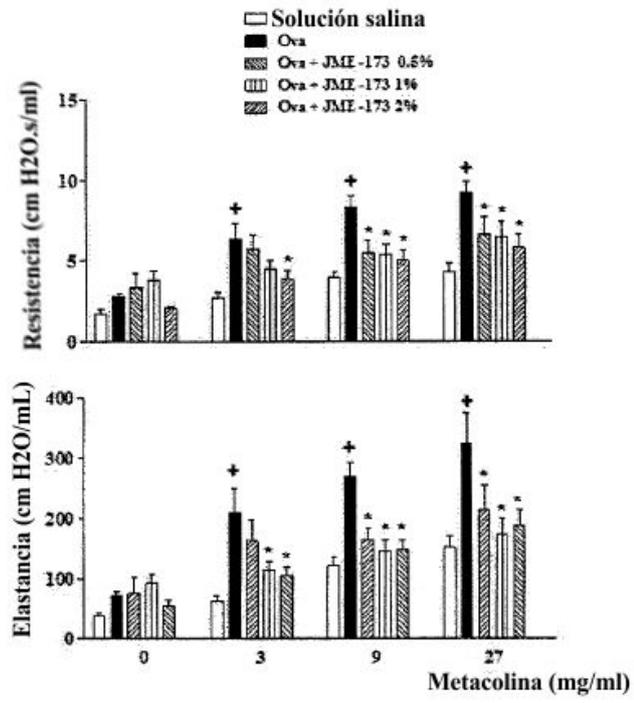


Figura 11

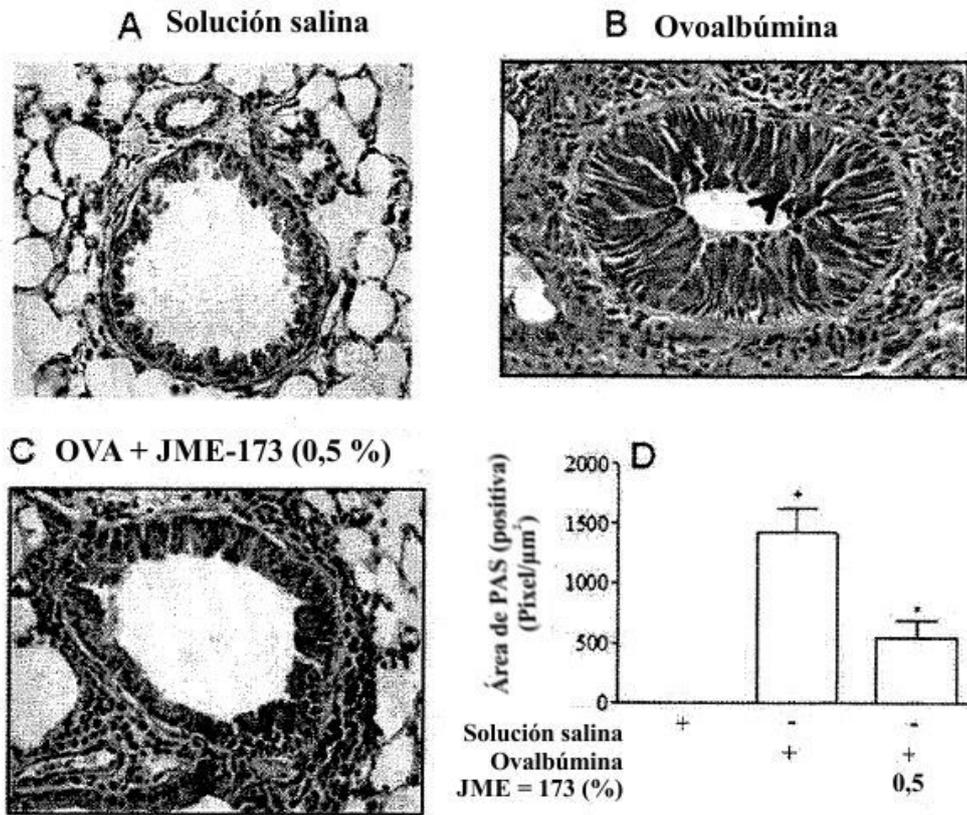


Figura 12

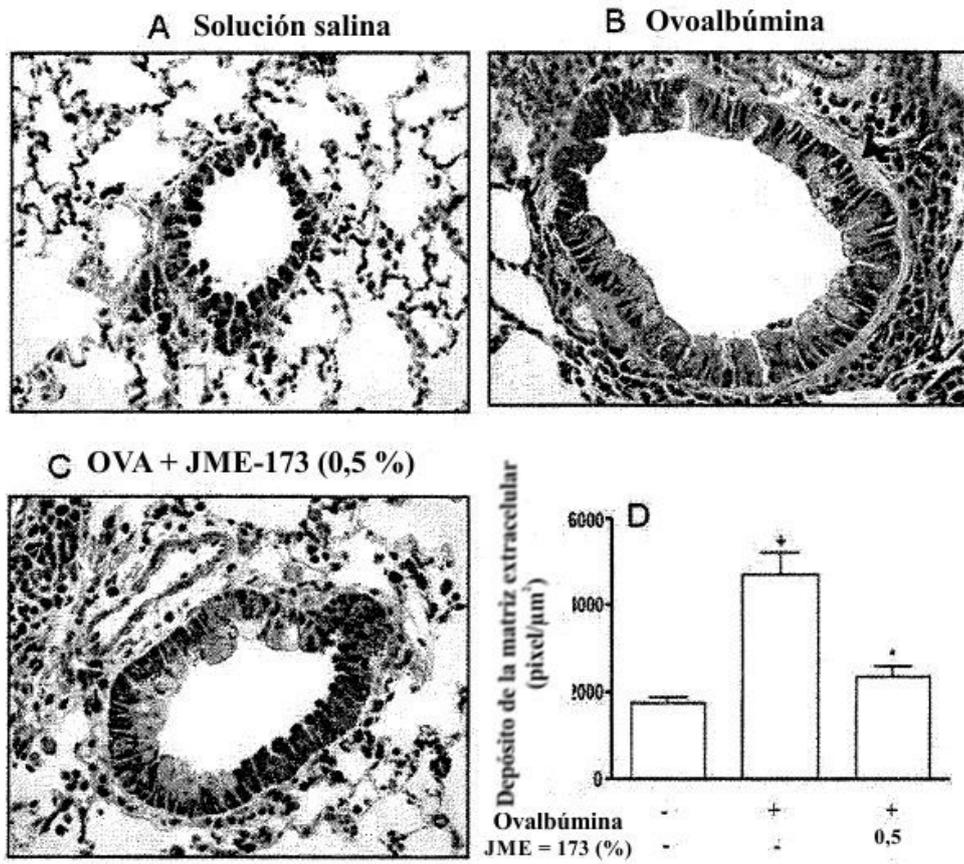


Figura 13

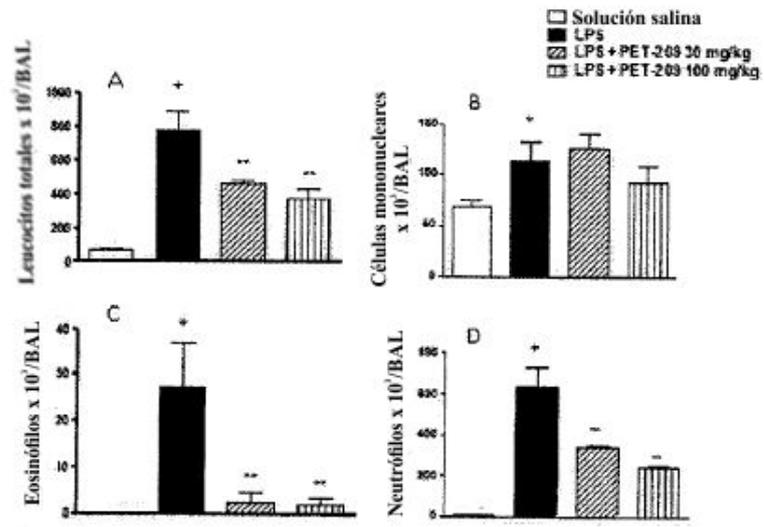


Figura 14

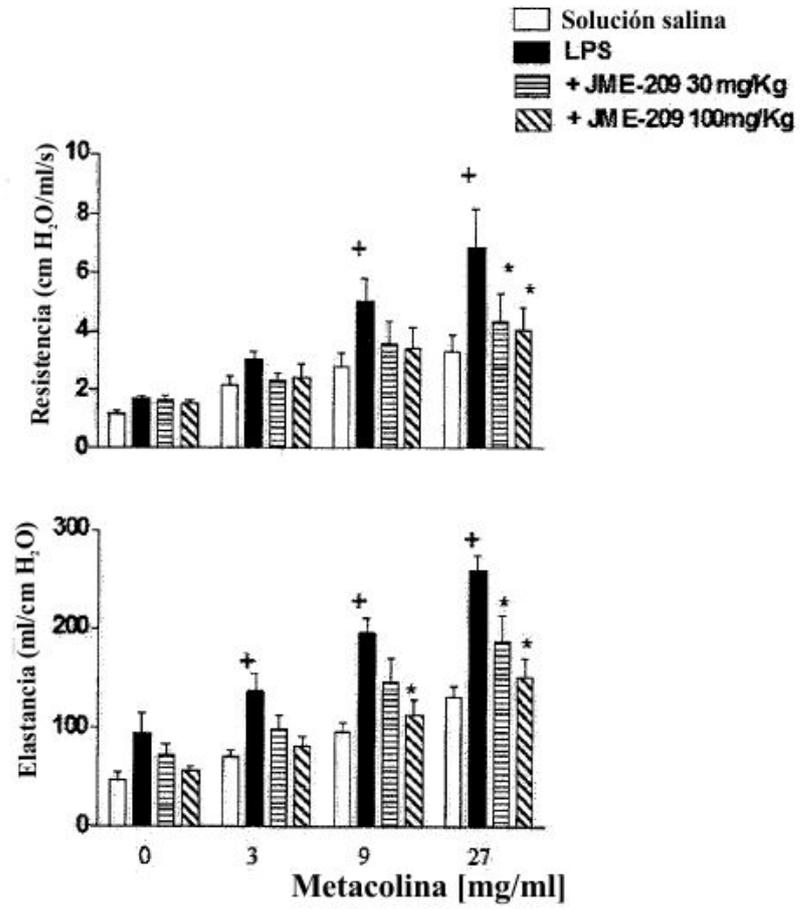


Figura 15

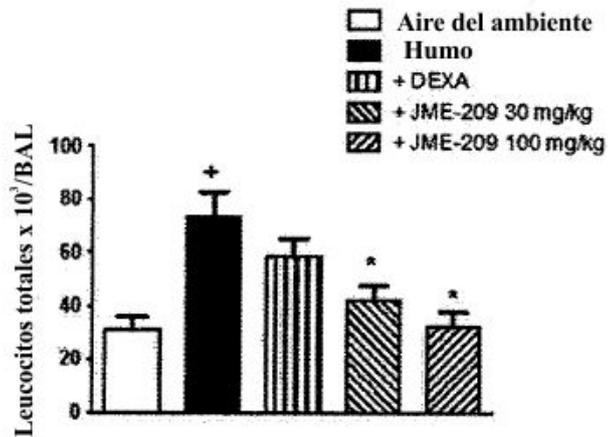


Figura 16

