

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 368**

51 Int. Cl.:

C07D 271/06 (2006.01)

A61K 31/4245 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2009 E 15158887 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 2913326**

54 Título: **Nuevos moduladores de receptores de fosfato de esfingosina**

30 Prioridad:

14.05.2008 US 127603

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

23.03.2021

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
10550 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**ROBERTS, EDWARD;
ROSEN, HUGH;
BROWN, STEVEN;
GUERRERO, MIGUEL A.;
PENG, XUEMEI y
PODDUTOORI, RAMULU**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 813 368 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).

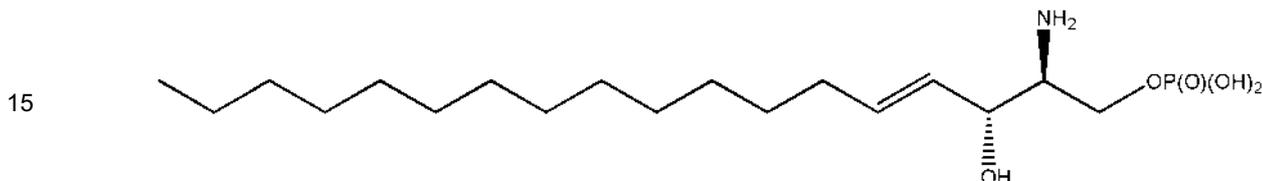
DESCRIPCIÓN

Nuevos moduladores de receptores de fosfato de esfingosina

5 Esta solicitud es una solicitud divisional de la solicitud de patente europea número 09762826.7.

Antecedentes

10 La esfingosina-1-fosfato (S1P), cuya estructura se muestra a continuación, es un fosfolípido con una amplia gama de actividades biológicas, notablemente, involucradas en la señalización celular.



20 Por ejemplo, S1P modula la proliferación celular, como de células epidérmicas. La bioactividad de S1P está mediada por múltiples subtipos de receptores. Por ejemplo, los subtipos de receptores 1 y 3 (S1P1 y S1P3, respectivamente) se expresan en células endoteliales y desempeñan un papel en las funciones endoteliales pulmonares y linfoides. Por lo tanto, los agonistas de los receptores, tales como los agonistas de S1P1, podrían ser valiosos en el tratamiento de afecciones graves tales como esclerosis múltiple, rechazo de trasplante y síndrome de dificultad respiratoria del adulto. La estimulación del agonista del receptor S1P1 está modulada por la degradación del receptor. La estimulación del ligando induce la fosforilación, internalización, poliubiquitinación y degradación del receptor (Gonzalez-Cabrera, Hla y otros 2007).

25 Los oxadiazoles y los oxazoles se han descrito para su uso como ligandos del receptor de esfingosina-1-fosfato, véase, por ejemplo, los números de publicación de solicitud de patente PCT WO2006/131336, WO2008/037476 y WO2008074821.

Resumen

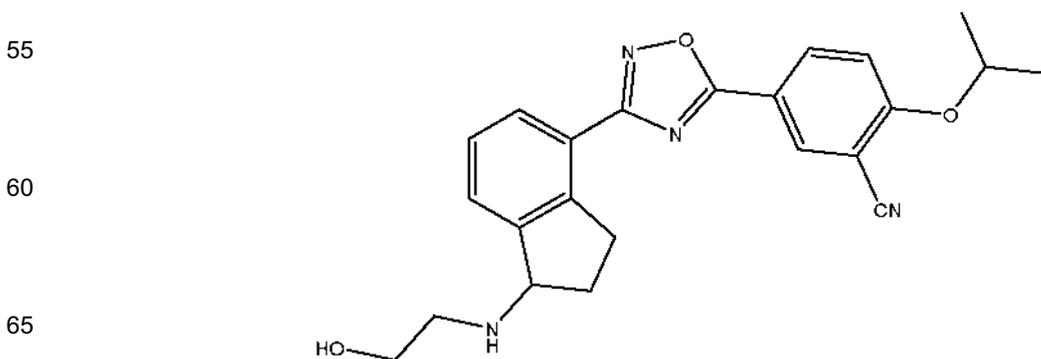
35 La presente invención está dirigida a compuestos heterocíclicos adaptados para actuar como agonistas del receptor S1P subtipo 1, compuestos S1P1 para usar en el tratamiento de una afección grave mediado por la activación de S1P1, o cuando la activación de S1P1 está médicamente indicada.

Las modalidades de la presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

40 En una modalidad, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula 265 como se describe en la presente descripción, o una sal, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde la composición farmacéutica está en forma de una cápsula, tableta, aerosol, solución, suspensión o está formulada para aplicación tópica.

45 En una modalidad, la composición farmacéutica de la invención es para usar en el tratamiento de un trastorno o afección grave en donde la activación o inhibición de un receptor de esfingosina-1-fosfato subtipo 1 está médicamente indicado seleccionado del grupo que consiste en esclerosis múltiple, rechazo de trasplante y síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

50 En una modalidad, la invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula 265 o una sal, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno o afección grave en donde la activación o inhibición de un receptor de esfingosina-1-fosfato subtipo 1 está médicamente indicado seleccionado del grupo que consiste en esclerosis múltiple, rechazo de trasplante y síndrome de dificultad respiratoria del adulto. La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula 265 o una sal, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo:



265.

En diversas modalidades, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un excipiente adecuado.

5 En diversas combinaciones, se proporciona una combinación farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un segundo medicamento. En diversas modalidades, el segundo medicamento está médicamente indicado para el tratamiento de la esclerosis múltiple, el rechazo de trasplante o el síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

10 Diversas modalidades de la invención proporcionan el uso de un compuesto para la preparación de un medicamento adaptado para el tratamiento de un trastorno o una afección grave en donde la activación o inhibición de un receptor de esfingosina-1-fosfato subtipo 1 está médicamente indicado, que comprende un compuesto de fórmula 265 o una sal, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 Diversas modalidades de la divulgación proporcionan un compuesto para usar en un método de activación, agonismo, inhibición o antagonismo de un receptor de esfingosina-1-fosfato subtipo 1 que comprende poner en contacto el receptor subtipo 1 con una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula 265 o una sal, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 El compuesto anterior activa o agoniza, o inhibe o antagoniza, el receptor de esfingosina-1-fosfato subtipo 1 en mayor grado que el compuesto que activa o agoniza, o inhibe o antagoniza, otro subtipo de receptor de esfingosina-1-fosfato, por ejemplo, un receptor de esfingosina-1-fosfato subtipo 3.

25 En diversas modalidades, se proporciona un compuesto para usar en el tratamiento de una afección grave en un paciente para el cual la activación o agonismo o inhibición o antagonismo de un receptor S1P1 está médicamente indicado, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto como se muestra anteriormente al paciente para proporcionar un efecto beneficioso.

30 La activación selectiva o el agonismo de un receptor S1P1, tal como con respecto a un receptor S1P3, está médicamente indicado. En diversas modalidades, la afección grave comprende esclerosis múltiple, rechazo de trasplante o síndrome de dificultad respiratoria del adulto. Además, la inhibición selectiva o el antagonismo de un receptor S1P1 está médicamente indicado, por ejemplo, con respecto a un receptor S1P3.

Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 muestra los resultados de un bioensayo, como se describe en los ejemplos, para la activación de S1P1, que implica la detección de la ubiquitinación que es consecuencia de la activación de S1P1. Los lisados celulares de HEK 293-S1P1-GFP se inmunoprecipitaron (IP) y se inmunotransfirieron (IB, por sus siglas en inglés) con anticuerpos P4D1 (anti ubiquitina) para detectar la ubiquitinación de S1P1. A. La ubiquitinación de S1P1-GFP se detectó como una banda que corre entre 64 y 82 kDa (carril 1 control de vehículo, carril 2 AFD-R 0,5 uM, carril 2 control de vehículo para SR-917, carril 4 SR917 1 uM). B. Localización celular de S1P1-GFP con Veh (control del vehículo; 0,01; 0,1 y 1 uM de SR-917. C. Las células S1P1-GFP se marcaron con P32 y se estimularon con agonista. S1P1-GFP se inmunoprecipitó, se resolvió mediante PAGE, se transfirió a nitrocelulosa y se expuso a película Kodak XAR durante la noche. Carril 1 control del vehículo, carriles 2 y 3, S1P a 0,5 y 0,05 uM, carriles 4 y 5, AFD-R a 0,5 y 0,05 uM, carriles 6 y 7 SR-917 a 10 y 1 uM. SR-917 es un conocido agonista del receptor S1P1, indexado en el NIH Molecular Libraries Small Molecule Repository (MLMSR). La ID del compuesto es 976135. Está disponible comercialmente en Chem-Bridge Screening Library.

40 La figura 2 muestra que el compuesto de referencia 32 induce de manera robusta la internalización y la poliubiquitinación, y estos efectos son bloqueados por el antagonista de S1P1, W146R.

50 La figura 3 muestra que el compuesto de referencia 236, como otros compuestos de la serie, induce la poliubiquitinación de S1P1.

La figura 4 muestra que el compuesto de referencia 236 induce linfopenia en ratones. El compuesto se disolvió en DMSO al 10 %, Tween-20 y se administró por sonda.

La figura 5 muestra un estudio farmacocinético de SR-917, 1 mg/mL en 10/10/80 DMSO/Tween/Agua suministrado 1 mg/kg iv.

55 La figura 6 muestra mutaciones de bolsillo de unión al ligando polar de S1P1. Las células CHO se transfectaron con constructos de ADNc de S1P1. Las células se privaron de suero durante la noche y se estimularon con diluciones seriadas 3 veces de S1P o CYM-5442. La fosforilación de ERK1/2 se detectó con el ELISA Phospho-ERK (Cell Signaling). A. mutantes de S1P1, E121A y R292A. B. S1P1 de tipo salvaje (wt) y mutantes de S1P1, R120A.

60 Descripción detallada

Como se usa en la especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

65 Como se usa en la presente descripción, "individual" (como en el sujeto del tratamiento) significa tanto mamíferos como no mamíferos. Los mamíferos incluyen, por ejemplo, humanos; primates no humanos, por ejemplo, simios y

monos; vacas; caballos; oveja; y cabras. Los no mamíferos incluyen, por ejemplo, peces y pájaros.

El término "S1P1", como se usa en la presente descripción, se refiere al subtipo 1 de un receptor de esfingosina-1-fosfato, mientras que otros subtipos de receptor de esfingosina-1-fosfato se mencionan de manera correspondiente, por ejemplo, el subtipo 3 de receptor de esfingosina-1-fosfato se refiere como "S1P3".

Un "receptor", como es bien conocido en la técnica, es una entidad biomolecular que generalmente comprende una proteína que se une específicamente a una clase estructural de ligandos o un solo ligando nativo en un organismo vivo, cuya unión provoca que el receptor transduzca la señal de unión a otro tipo de acción biológica, tal como señalar una célula en la que se ha producido un evento de unión, lo que provoca que la célula altere su función de alguna manera. Un ejemplo de transducción es la unión al receptor de un ligando que provoca la alteración de la actividad de una "proteína G" en el citoplasma de una célula viva que está acoplada con el receptor. Cualquier molécula, natural o no, que se une a un receptor y lo activa para la transducción de señal, se refiere como un "agonista" o "activador". Cualquier molécula, de origen natural o no, que se une a un receptor, pero no provoca que se produzca la transducción de señal, y que puede bloquear la unión de un agonista y su consiguiente transducción de señal, se refiere como un "antagonista".

Un "compuesto de S1P1" o "agonista de S1P1" o "activador de S1P1" o "inhibidor de S1P1" o "antagonista de S1P1" como los términos que se usan en la presente descripción se refieren a compuestos que interactúan de alguna manera con el receptor S1P subtipo 1. Pueden ser agonistas o activadores, o pueden ser antagonistas o inhibidores. Un "compuesto de S1P1" de la invención puede ser selectivo para la acción sobre el subtipo 1 de la familia de receptores S1P; por ejemplo, un compuesto de la invención puede actuar a una concentración menor en el subtipo 1 de la familia de receptores S1P que en otros subtipos de la familia de receptores S1P; más específicamente, un "compuesto de S1P1" de la invención puede actuar selectivamente sobre los receptores del subtipo 1 en comparación con su acción sobre los receptores del subtipo 3 o "S1P3".

En ciertas modalidades, los compuestos de la invención son agonistas ortostáticos. En ciertas otras modalidades, los compuestos de la invención son agonistas alostéricos. Los agonistas de los receptores pueden clasificarse en ortostéricos o alostéricos. Un agonista ortostérico se une a un sitio en el receptor que se superpone significativamente con la unión del ligando natural y replica las interacciones clave del ligando natural con el receptor. Un agonista ortostérico activará el receptor mediante un mecanismo molecular similar al del ligando natural, será competitivo para el ligando natural y será antagonizado competitivamente por agentes farmacológicos que son antagonistas competitivos para el ligando natural. Un agonista alostérico se une a un sitio en el receptor que hace que algunas interacciones significativas no se solapen parcial o totalmente con el ligando natural. Los agonistas alostéricos son verdaderos agonistas y no potenciadores alostéricos. En consecuencia, activan la señalización del receptor solo y sin un requerimiento de una concentración submáxima del ligando natural. Los agonistas alostéricos pueden identificarse cuando un antagonista conocido que es competitivo para el ligando ortostérico muestra un antagonismo no competitivo. El sitio agonista alostérico también se puede mapear por mutagénesis del receptor. La introducción de mutaciones de un solo punto en los receptores que retienen la activación del receptor por el agonista alostérico, mientras disminuye o elimina la señalización inducida por el agonista ortostérico o viceversa, proporciona evidencia formal de las diferencias en las interacciones de unión. Los agonistas ortostéricos pueden desestabilizar la estructura y conformación del GPCR ("receptor acoplado a la proteína G"), mientras que los agonistas alostéricos pueden estabilizar o desestabilizar la estructura y conformación del GPCR. Los agonistas alostéricos, en virtud de sus diferentes interacciones con el receptor, pueden ser farmacéuticamente útiles porque el sitio alostérico puede conferir oportunidades adicionales para la potencia y selectividad del agonista dentro de una familia relacionada de subtipos de receptores que comparten un ligando ortostérico similar. Además, el sitio alostérico puede requerir propiedades físicas y químicas muy diferentes de un agonista en comparación con el ligando ortostérico. Estas propiedades químico-físicas, que incluyen hidrofobicidad, aromaticidad, distribución de carga y solubilidad, también pueden proporcionar ventajas en la generación de agonistas de diferentes perfiles farmacocinéticos, de biodisponibilidad oral, de distribución y de metabolismo que facilitan el desarrollo de sustancias farmacéuticas eficaces.

"Sustancialmente" como se usa el término en la presente descripción significa completamente o casi completamente; por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de un componente no tiene nada del componente o contiene una cantidad traza tal que cualquier propiedad funcional relevante de la composición no se ve afectada por la presencia de la cantidad traza; o un compuesto que es "sustancialmente puro" tiene solo rastros insignificantes de impurezas presentes.

"Tratar" o "tratamiento" dentro del significado en la presente descripción se refiere a un alivio de los síntomas asociados con un trastorno, afección grave o enfermedad, o la inhibición de la progresión o empeoramiento de esos síntomas, o la prevención o profilaxis del trastorno, afección grave o enfermedad.

La expresión "cantidad eficaz", cuando se usa para describir el uso de un compuesto de la invención en la administración de terapia a un paciente que padece un trastorno o afección grave mediado por un receptor de esfingosina-1-fosfato del subtipo 1, se refiere a la cantidad de un compuesto de la invención que es eficaz para unirse como agonista o como antagonista a un receptor S1P1 en los tejidos del individuo, en donde el receptor S1P1 está implicado en el trastorno, en donde dicha unión ocurre en un grado suficiente para producir un efecto terapéutico

beneficioso en el paciente. De manera similar, como se usa en la presente descripción, una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto de la invención se refiere a una cantidad del compuesto que alivia, en su totalidad o en parte, los síntomas asociados con el trastorno o afección grave, o se detiene o ralentiza la progresión o empeoramiento adicional de esos síntomas, o previene o proporciona profilaxis para el trastorno o afección grave. En particular, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado al actuar como un agonista o activador de la actividad del receptor de esfingosina-1-fosfato subtipo 1 (S1P1). Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que los efectos tóxicos o perjudiciales de los compuestos de la invención se compensan por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Por ejemplo, en el contexto de tratar una afección grave mediada por la activación de S1P1, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de S1P1 de la invención es una cantidad suficiente para controlar la afección grave, mitigar el progreso de la afección grave o aliviar los síntomas de la afección grave. Los ejemplos de afecciones graves que pueden tratarse de este modo incluyen esclerosis múltiple, rechazo de trasplante y síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

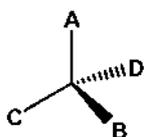
Todas las formas quirales, diastereoméricas, racémicas de una estructura están destinadas, a menos que se indique específicamente una forma estereoquímica o isomérica particular. Los compuestos usados en la presente invención pueden incluir isómeros ópticos enriquecidos o resueltos en cualquiera o en todos los átomos asimétricos, como son evidentes a partir de las representaciones, en cualquier grado de enriquecimiento. Tanto las mezclas racémicas como las diastereoméricas, así como los isómeros ópticos individuales, pueden aislarse o sintetizarse de modo que estén sustancialmente libres de sus parejas enantioméricas o diastereoméricas, y todas estas están dentro del alcance de la invención.

Isomería en compuestos de la invención

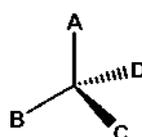
Isomería óptica

Se entenderá que cuando los compuestos de la presente invención contienen uno o más centros quirales, los compuestos pueden existir y pueden aislarse como formas enantioméricas o diastereoméricas puras o como mezclas racémicas. Por lo tanto, la presente invención incluye cualquier posible enantiómero, diastereómero, racemato o mezclas de los mismos de los compuestos de la invención que son biológicamente activos en el tratamiento de enfermedades mediadas por S1P1.

Los isómeros resultantes a partir de la presencia de un centro quiral comprenden un par de isómeros no superponibles que se denominan "enantiómeros." Los enantiómeros individuales de un compuesto puro son ópticamente activos, es decir, son capaces de girar el plano de luz polarizada plana. Los enantiómeros individuales se designan de acuerdo con el sistema *Cahn-Ingold-Prelog*. Una vez que se determina la clasificación de prioridad de los cuatro grupos, la molécula se orienta de manera que el grupo de clasificación más bajo se dirija lejos del visor. Luego, si el orden de la clasificación descendente de los otros grupos procede en sentido de las agujas del reloj, la molécula se designa (R) y si la clasificación descendente de los otros grupos procede en sentido contrario a las agujas del reloj, la molécula se designa (S). En el ejemplo del esquema 14, la clasificación de *Cahn-Ingold-Prelog* es A > B > C > D. El átomo de clasificación más bajo, D, está orientado lejos del visor.



configuración (R)



configuración (S)

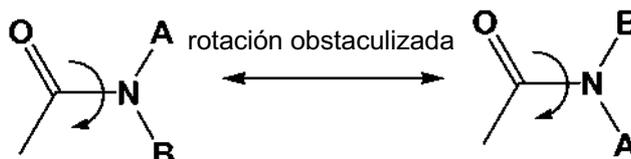
La presente invención pretende abarcar diastereómeros, así como sus formas racémicas y resueltas, diastereomérica y enantioméricamente puras y sales de las mismas. Los pares diastereoméricos pueden resolverse mediante técnicas de separación conocidas que incluyen cromatografía de fase normal e inversa y cristalización.

"Isómero óptico aislado" o "enantiómero aislado" significa un compuesto que se ha purificado sustancialmente a partir del isómero óptico correspondiente (enantiómero) de la misma fórmula. Preferentemente, el isómero aislado es al menos aproximadamente 80 % puro, más preferentemente al menos 90 % puro, incluso más preferentemente al menos 98 % puro, lo más preferentemente al menos aproximadamente 99 % puro, en peso.

Los isómeros ópticos aislados se pueden purificar a partir de mezclas racémicas mediante técnicas de separación quiral bien conocidas. De acuerdo con uno de tales métodos, una mezcla racémica de un compuesto de la invención, o un intermedio quiral del mismo, se separa en 99 % en peso de isómeros ópticos puros por HPLC mediante el uso una columna quiral adecuada, tal como un miembro de la serie de la familia de columnas DAICEL® CHIRALPAK® (Daicel Chemical Industries, Ltd., Tokio, Japón). La columna se opera de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

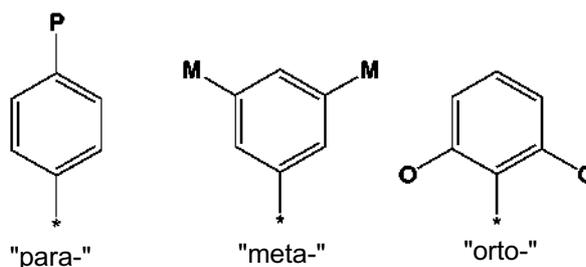
Isomería rotacional

Se entiende que debido a las propiedades químicas (*es decir*, la resonancia que otorga cierto carácter de doble enlace al enlace C-N) de rotación restringida alrededor de la unión del enlace amida (como se ilustra a continuación), entre otros tipos de enlaces, es posible observar especies de rotámeros separadas e incluso, en algunas circunstancias, aislar tales especies, ejemplo que se muestra a continuación. Se entiende además que ciertos elementos estructurales, incluidos el volumen estérico o los sustituyentes en el nitrógeno de la amida, pueden mejorar la estabilidad de un rotámero en la medida en que un compuesto puede aislarse y existir indefinidamente como un rotámero estable individual. Por lo tanto, la presente invención incluye cualquier posible rotámero estable de compuestos de la invención que sean biológicamente activos en el tratamiento de cáncer u otros estados de enfermedades proliferativas.



Regioisomerismo

Los compuestos preferidos de la presente invención tienen una disposición espacial particular de sustituyentes en los anillos aromáticos, que está relacionada con la relación estructura actividad demostrada por la clase del compuesto. A menudo, dicha disposición de sustitución se denota mediante un sistema de numeración; sin embargo, los sistemas de numeración a menudo no son consistentes entre diferentes sistemas de anillo. En los sistemas aromáticos de seis miembros, las disposiciones espaciales se especifican mediante la nomenclatura común "para" para la sustitución 1,4, "meta" para la sustitución 1,3 y "orto" para la sustitución 1,2 como se muestra a continuación.



Los compuestos de la invención pueden contener uno o más centros estereogénicos (quirales) o asimétricos, tales como uno o más átomos de carbono asimétricos. Los sustituyentes en un doble enlace pueden estar presentes en forma cis ("Z") o trans ("E") a menos que se indique lo contrario. Los sustituyentes en un anillo también pueden disponerse cis o trans entre sí, o una mezcla de los mismos. Los compuestos de la invención pueden estar presentes, por lo tanto, como mezclas de estereoisómeros o preferentemente como estereoisómeros sustancialmente puros. Los estereoisómeros puros pueden obtenerse al separar mezclas de estereoisómeros o mediante síntesis estereoselectivas o estereoespecíficas de maneras conocidas por los expertos en la técnica.

Todas las estructuras abarcadas en una reivindicación son "químicamente factibles", lo que significa que la estructura representada por cualquier combinación o subcombinación de sustituyentes opcionales destinados a ser citados por la reivindicación es físicamente capaz de existir con al menos algo de estabilidad como puede determinarse mediante las leyes de la química estructural y por la experimentación. Las estructuras que no son químicamente factibles no están dentro de un conjunto de compuestos reivindicados.

Los términos "que comprende", "que incluye", "que tiene", "compuesto de" son términos abiertos tal como se usan en la presente descripción, y no excluyen la existencia de elementos o componentes adicionales. En un elemento de reivindicación, el uso de las formas "que comprende", "que incluye", "que tiene" o "compuesto de" significa que cualquier elemento que esté comprendido, tenido, incluido o compuesto no es necesariamente el único elemento abarcado por el sujeto de la cláusula que contiene esa palabra.

Una "sal", como es bien conocido en la técnica, incluye un compuesto orgánico tal como un ácido carboxílico, un ácido sulfónico o una amina, en forma iónica, en combinación con un contraión. Por ejemplo, los ácidos en su forma aniónica pueden formar sales con cationes tales como cationes metálicos, por ejemplo, sodio y potasio; con sales de amonio, tales como NH_4^+ o los cationes de diversas aminas, que incluyen sales de tetraalquilamonio tales como tetrametilamonio, u otros cationes tales como trimetilsulfonio. Una sal "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" es una sal formada a partir de un ion que ha sido aprobado para consumo humano y generalmente no es tóxica, tal como una sal de cloruro o una sal de sodio. Un "zwitterion" es una sal interna que puede formarse en una molécula que tiene al menos dos grupos ionizables, uno que forma un anión y el otro un catión, que sirven para equilibrarse entre sí. Por ejemplo, los aminoácidos tales como glicina pueden existir en forma zwitteriónica. Un "zwitterion" es una sal dentro del significado en la presente descripción. Los compuestos de la presente invención

pueden tomar la forma de sales. El término "sales" abarca sales de adición de ácidos libres o bases libres que son compuestos de la invención. Las sales pueden ser "sales farmacéuticamente aceptables." El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que poseen perfiles de toxicidad dentro de un intervalo que proporciona utilidad en aplicaciones farmacéuticas. Sin embargo, las sales farmacéuticamente inaceptables pueden poseer propiedades tales como alta cristalinidad, que tienen utilidad en la práctica de la presente invención, tal como, por ejemplo, utilidad en el proceso de síntesis, purificación o formulación de compuestos de la invención.

Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden prepararse a partir de un ácido inorgánico o de un ácido orgánico. Los ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, carbónico, sulfúrico y fosfórico. Los ácidos orgánicos apropiados pueden seleccionarse a partir de clases de ácidos orgánicos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos, aralifáticos, heterocíclicos, carboxílicos y sulfónicos, cuyos ejemplos incluyen ácido fórmico, acético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, 4-hidroxibenzoico, fenilacético, mandélico, embónico (pamoico), metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, trifluorometanosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, p-toluenosulfónico, sulfanílico, ciclohexilaminosulfónico, esteárico, algínico, β -hidroxibutírico, salicílico, galactárico y galacturónico. Los ejemplos de sales de adición de ácidos farmacéuticamente inaceptables incluyen, por ejemplo, percloratos y tetrafluoroboratos.

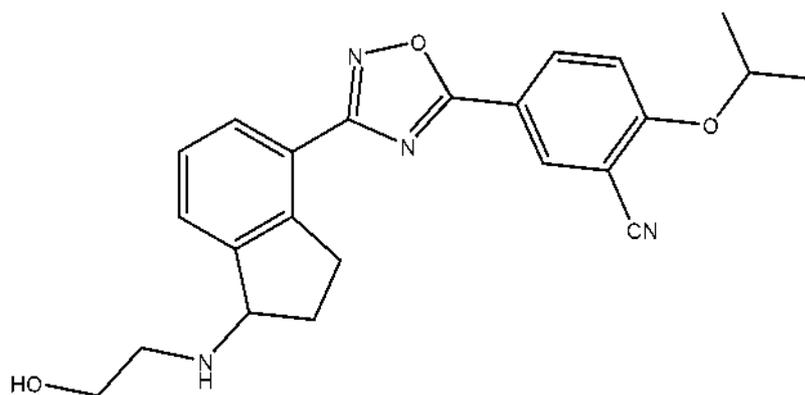
Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables adecuadas de los compuestos de la invención incluyen, por ejemplo, sales metálicas que incluyen sales de metales alcalinos, alcalinotérreos y de metales de transición tales como, por ejemplo, sales de calcio, magnesio, potasio, sodio y zinc. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables también incluyen sales orgánicas hechas de aminas básicas tales como, por ejemplo, *N,N'*-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (*N*-metilglucamina) y procaína. Los ejemplos de sales de adición de bases farmacéuticamente inaceptables incluyen sales de litio y sales de cianato. Aunque las sales farmacéuticamente inaceptables no son generalmente útiles como medicamentos, tales sales pueden ser útiles, por ejemplo, como intermediarios en la síntesis del compuesto 265, por ejemplo, en su purificación por recristalización. Todas estas sales pueden prepararse por medios convencionales a partir del compuesto correspondiente al reaccionar, por ejemplo, el ácido o base apropiado con el compuesto de acuerdo con el compuesto 265. El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales de adición de ácidos y/o bases inorgánicas u orgánicas no tóxicas, véase, por ejemplo, Lit y otros, Salt Selection for Basic Drugs (1986), Int J. Pharm., 33, 201-217.

Un "hidrato" es un compuesto que existe en una composición con moléculas de agua. La composición puede incluir agua en cantidades estequiométricas, tal como un monohidrato o un dihidrato, o puede incluir agua en cantidades aleatorias. Como el término se usa en la presente descripción, un "hidrato" se refiere a una forma sólida, es decir, un compuesto en solución acuosa, mientras pueda hidratarse, no es un hidrato como el término se usa en la presente descripción.

Un "solvato" es una composición similar, excepto que un disolvente diferente al agua reemplaza al agua. Por ejemplo, el metanol o el etanol pueden formar un "alcoholato", que puede ser de nuevo estequiométrico o no estequiométrico. Como el término se usa en la presente descripción, un "solvato" se refiere a una forma sólida, es decir, un compuesto en solución en un disolvente, mientras pueda solvatar, no es un solvato como el término se usa en la presente descripción.

En diversas modalidades, el compuesto o conjunto de compuestos, per se o como se usan en la práctica de modalidades de los métodos inventivos, puede ser una de cualquiera de las combinaciones y/o sub-combinaciones de las diversas modalidades citadas.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula 265 o una sal, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo:



265.

En diversas modalidades, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de

la invención y un excipiente adecuado.

En diversas modalidades, la invención proporciona una combinación farmacéutica que comprende el compuesto de la invención y un segundo medicamento. Por ejemplo, el segundo medicamento puede estar médicamente indicado para el tratamiento de esclerosis múltiple, rechazo de trasplante o síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

Diversas modalidades de la invención proporcionan el uso de un compuesto para la preparación de un medicamento adaptado para el tratamiento de un trastorno o una afección grave en donde la activación o inhibición de un receptor de esfingosina-1-fosfato subtipo 1 está médicamente indicado, que comprende un compuesto de fórmula 265 o una sal, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Diversas modalidades de la divulgación proporcionan un compuesto para usar en un método de activación, agonismo, inhibición o antagonismo de un receptor de esfingosina-1-fosfato subtipo 1 que comprende poner en contacto el receptor subtipo 1 con una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula 265 o una sal, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En diversas modalidades, el compuesto de la invención activa o agoniza el receptor de esfingosina-1-fosfato subtipo 1 en un grado mayor que el compuesto activa o agoniza otro subtipo del receptor de esfingosina-1-fosfato. Por ejemplo, el otro subtipo del receptor de esfingosina-1-fosfato puede ser el subtipo 3.

En diversas modalidades, el receptor de esfingosina-1-fosfato subtipo 1 puede disponerse dentro de un mamífero vivo.

En diversas modalidades, la divulgación proporciona un compuesto para usar en el tratamiento de una afección grave en un paciente para el cual la activación, agonismo, inhibición o antagonismo de un receptor S1P1 está médicamente indicado, que comprende poner en contacto el receptor S1P1 de acuerdo con un método de la divulgación al administrar el compuesto al paciente con una frecuencia y durante un período de tiempo suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al paciente. Por ejemplo, la activación o agonismo selectivo de un receptor S1P subtipo 1 con respecto a otros subtipos de receptor S1P está médicamente indicada. Más específicamente, la afección grave puede comprender esclerosis múltiple, rechazo de trasplante o síndrome de dificultad respiratoria del adulto. La modalidad puede comprender además administrar una cantidad eficaz de un segundo medicamento al paciente, tal que en donde el segundo medicamento está adaptado para el tratamiento de esclerosis múltiple, rechazo de trasplante o síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

Composiciones y tratamientos combinados

El compuesto de S1P1 de fórmula 265 o sus sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden combinarse con un portador farmacéuticamente aceptable para proporcionar composiciones farmacéuticas útiles para tratar las afecciones o trastornos biológicos observados en la presente descripción en especies de mamíferos, y más preferentemente, en humanos. El portador particular empleado en estas composiciones farmacéuticas puede variar en dependencia del tipo de administración deseada (por ejemplo, intravenosa, oral, tópica, supositorio o parenteral).

En la preparación de las composiciones en formas de dosificación líquidas orales (por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones), pueden emplearse medios farmacéuticos típicos, tales como agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes y agentes colorantes. De manera similar, cuando se preparan formas de dosificación sólidas orales (por ejemplo, polvos, tabletas y cápsulas), pueden emplearse portadores tales como almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes y agentes desintegrantes.

Otro aspecto de una modalidad de la invención proporciona composiciones de los compuestos de la invención, solos o en combinación con otro inhibidor de S1P1 u otro tipo de agente terapéutico, o ambos. Como se establece en la presente descripción, los compuestos de la invención incluyen estereoisómeros, solvatos, hidratos, sales que incluyen sales farmacéuticamente aceptables y mezclas de los mismos. Las composiciones que contienen un compuesto de la invención pueden prepararse mediante técnicas convencionales, por ejemplo, como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995. Las composiciones pueden aparecer en formas convencionales, por ejemplo, cápsulas, tabletas, aerosoles, soluciones, suspensiones o aplicaciones tópicas.

Las composiciones típicas incluyen un compuesto de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable que puede ser un portador o un diluyente. Por ejemplo, el compuesto activo generalmente se mezclará con un portador, o se diluirá con un portador, o se incluirá dentro de un portador que puede tener la forma de una ampolla, cápsula, bolsita, papel u otro envase. Cuando el compuesto activo se mezcla con un portador, o cuando el portador sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido que actúa como vehículo, excipiente o medio para el compuesto activo. El compuesto activo puede adsorberse en un portador sólido granular, por ejemplo, contenido en una bolsita. Algunos ejemplos de portadores adecuados son agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, aceite de ricino polihidroxietoxilado, aceite de maní, aceite de oliva, gelatina, lactosa, terra alba, sacarosa, dextrina, carbonato de magnesio, azúcar, ciclodextrina, amilosa, estearato de magnesio, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, ácido esteárico o alquil éteres inferiores de celulosa, ácido silícico, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de pentaeritrol, polioxietileno, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona. De manera similar, el portador o diluyente puede incluir cualquier material de

liberación sostenida conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o mezclado con una cera.

5 Las formulaciones se pueden mezclar con agentes auxiliares que no reaccionan perjudicialmente con los compuestos activos. Dichos aditivos pueden incluir agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, sal para influir en la presión osmótica, tampones y/o sustancias colorantes, agentes conservantes, agentes edulcorantes o agentes aromatizantes. Las composiciones también pueden esterilizarse si se desea.

10 La ruta de administración puede ser cualquier ruta que transporte eficazmente el compuesto activo de la invención que inhibe la actividad enzimática de la quinasa de adhesión focal al sitio de acción apropiado o deseado, tal como oral, nasal, pulmonar, bucal, subdérmico, intradérmico, transdérmica o parenteral, por ejemplo, solución rectal, de depósito, subcutánea, intravenosa, intrauretral, intramuscular, intranasal, oftálmica o una pomada, la vía oral a de ser la preferida.

15 Para la administración parenteral, el portador típicamente comprenderá agua estéril, aunque también se pueden incluir otros ingredientes que ayudan a la solubilidad o sirven como conservantes. Además, también se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear portadores líquidos apropiados y agentes de suspensión.

20 Para la administración tópica, los compuestos de la presente invención pueden formularse mediante el uso de bases blandas hidratantes tales como ungüentos o cremas.

25 Si se usa un portador sólido para la administración oral, la preparación puede comprimirse, colocarse en una cápsula de gelatina dura en polvo o en forma de gránulos o puede ser en forma de troche o pastilla. Si se usa un portador líquido, la preparación puede estar en forma de jarabe, emulsión, cápsula de gelatina blanda o líquido inyectable estéril, tal como una suspensión o solución líquida acuosa o no acuosa.

30 Las formas de dosificación inyectables generalmente incluyen suspensiones acuosas o suspensiones de aceite que pueden prepararse mediante el uso de un dispersante o agente humectante adecuado y un agente de suspensión. Las formas inyectables pueden estar en fase de solución o en forma de una suspensión, que se prepara con un disolvente o diluyente. Los disolventes o vehículos aceptables incluyen agua esterilizada, solución de Ringer o una solución salina acuosa isotónica. Alternativamente, los aceites estériles se pueden emplear como disolventes o agentes de suspensión. Preferentemente, el aceite o ácido graso es no volátil, incluidos aceites naturales o sintéticos, ácidos grasos, mono, di o triglicéridos.

35 Para inyección, la formulación también puede ser un polvo adecuado para la reconstitución con una solución apropiada como se describió anteriormente. Los ejemplos de estos incluyen, pero no se limitan a, polvos liofilizados, secados por rotación o secados por pulverización, polvos amorfos, gránulos, precipitados o partículas. Para inyección, las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizadores, modificadores de pH, tensioactivos, modificadores de biodisponibilidad y combinaciones de estos. Los compuestos pueden formularse para administración parenteral por inyección, tal como por inyección en bolo o infusión continua. Una forma de dosificación unitaria para inyección puede estar en ampollas o en envases multidosis.

45 Las formulaciones de la invención pueden diseñarse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de la administración al paciente mediante el empleo de procedimientos bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, las formulaciones también pueden formularse para liberación controlada o para liberación lenta.

50 Las composiciones contempladas por la presente invención pueden incluir, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden administrarse en una forma de liberación prolongada para proporcionar un efecto de almacenamiento y/o liberación prolongado. Por lo tanto, las formulaciones pueden comprimirse en gránulos o cilindros e implantarse por vía intramuscular o subcutánea como inyecciones de depósito. Tales implantes pueden emplear materiales inertes conocidos tales como siliconas y polímeros biodegradables, por ejemplo, polilactida-poglicólido. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos).

55 Para la administración nasal, la preparación puede contener un compuesto de la invención que inhibe la actividad enzimática de la quinasa de adhesión focal, disuelta o suspendida en un portador líquido, preferentemente un portador acuoso, para aplicación en aerosol. El portador puede contener aditivos tales como agentes solubilizantes, por ejemplo, propilenglicol, tensioactivos, potenciadores de la absorción tal como lecitina (fosfatidilcolina) o ciclodextrina, o conservantes tales como parabenos.

60 Para la aplicación parenteral, son particularmente adecuadas soluciones o suspensiones inyectables, preferentemente soluciones acuosas con el compuesto activo disuelto en aceite de ricino polihidroxiado.

65 Las tabletas, grageas o cápsulas que tienen talco y/o un portador o aglutinante de carbohidratos o similares son particularmente adecuadas para la aplicación oral. Los portadores preferibles para tabletas, grageas o cápsulas incluyen lactosa, almidón de maíz y/o almidón de papa. Se puede usar un jarabe o elixir en los casos en que se pueda

emplear un vehículo endulzado.

Una tableta típica que se puede preparar mediante técnicas de tabletas convencionales puede contener:

5	<u>Núcleo:</u>	
	Compuesto activo (como compuesto libre o sal del mismo)	250 mg
	Dióxido de silicio coloidal (Aerosil)®	1,5 mg
	Celulosa, microcristales. (Avicel)®	70 mg
10	Goma de celulosa modificada (Ac-Di-Sol)®	7,5 mg
	Estearato de magnesio	Ad.
	<u>Recubrimiento:</u>	
	HPMC aprox.	9 mg
	*Mywacett 9-40 T aprox.	0,9 mg
15	<u>*Monoglicérido acilado usado como plastificante para el recubrimiento de película.</u>	

20 Una cápsula típica para administración oral contiene compuestos de la invención (250 mg), lactosa (75 mg) y estearato de magnesio (15 mg). La mezcla se pasa a través de un tamiz de 60 mesh y se empaqueta en una cápsula de gelatina No. 1. Una preparación inyectable típica se produce al colocar asépticamente 250 mg de compuestos de la invención en un vial, liofilizarlo y sellarlo asépticamente. Para usar, el contenido del vial se mezcla con 2 mL de solución salina fisiológica estéril, para producir una preparación inyectable.

25 Los compuestos de la invención pueden administrarse a un ser humano necesitado de dicho tratamiento, prevención, eliminación, alivio o mejora de una afección grave que está mediada por la acción de S1P1, por ejemplo, esclerosis múltiple, rechazo de trasplante y síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

30 Las composiciones farmacéuticas y los compuestos de la presente invención generalmente pueden administrarse en forma de una unidad de dosificación (por ejemplo, tableta, cápsula, etc.) en una cantidad de aproximadamente 1 µ/kg de peso corporal a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal, preferentemente de aproximadamente 5 µ/kg de peso corporal a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 10 µ/kg de peso corporal a aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal, lo más preferentemente de aproximadamente 20 µ/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Los expertos en la técnica reconocerán que la cantidad particular de composición farmacéutica y/o compuestos de la presente invención administrados a un individuo dependerá de una serie de factores que incluyen, sin limitación, el efecto biológico deseado, la condición del individuo y la tolerancia individual para el compuesto.

40 Los compuestos de la invención son eficaces en un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, en el tratamiento de humanos adultos, se pueden usar dosificaciones de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5000 mg, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 2000 mg, y más preferentemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 2000 mg por día. Una dosificación típica es de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1000 mg por día. Al elegir un régimen para pacientes, con frecuencia puede ser necesario comenzar con una dosificación más alta y cuando la condición está bajo control, reducir la dosificación. La dosificación exacta dependerá de la actividad del compuesto, el modo de administración, la terapia deseada, la forma en que se administró, el sujeto a tratar y el peso corporal del sujeto a tratar, y la preferencia y experiencia del médico o veterinario a cargo. La bioactividad del agonista de S1P1 de los compuestos de la invención se puede determinar mediante el uso de un sistema de ensayo *in vitro* que mide la activación de S1P1, que se puede expresar como valores de CE₅₀, como es bien conocido en la técnica los inhibidores de la invención se pueden determinar por el método descrito en los ejemplos.

50 Generalmente, los compuestos de la invención se dispensan en forma de dosificación unitaria que incluye de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 1000 mg de ingrediente activo junto con un portador farmacéuticamente aceptable por dosificación unitaria.

55 Usualmente, las formas de dosificación adecuadas para administración oral, nasal, pulmonar o transdérmica incluyen de aproximadamente 125 µg a aproximadamente 1250 mg, preferentemente de aproximadamente 250 µg a aproximadamente 500 mg, y más preferentemente de aproximadamente 2,5 mg a aproximadamente 250 mg, de los compuestos mezclados con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

60 Las formas de dosificación se pueden administrar diariamente, o más de una vez al día, como dos o tres veces al día. Alternativamente, las formas de dosificación se pueden administrar con menos frecuencia que diariamente, tal como días alternos o semanalmente, si un médico que lo prescribe lo encuentra aconsejable.

65 En otra modalidad, se proporcionan métodos de preparación de una composición de un compuesto descrito en la presente descripción, que incluye formular un compuesto de la invención con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, el portador o diluyente farmacéuticamente aceptable es

adecuado para administración oral. En algunas de tales modalidades, los métodos pueden incluir además la etapa de formular la composición en una tableta o cápsula. En otras modalidades, el portador o diluyente farmacéuticamente aceptable es adecuado para administración parenteral. En algunas de tales modalidades, los métodos incluyen además la etapa de liofilizar la composición para formar una preparación liofilizada.

Los compuestos de la invención pueden usarse terapéuticamente en combinación con i) uno o más de otros inhibidores de S1P1 y/o ii) uno o más de otros tipos de inhibidores de proteína quinasas y/o uno o más de otros tipos de agentes terapéuticos que pueden administrarse por vía oral en la misma forma de dosificación, en una forma de dosificación oral separada (por ejemplo, secuencial o no secuencialmente) o mediante inyección conjunta o por separado (por ejemplo, secuencial o no secuencialmente).

Por consiguiente, en otra modalidad, la invención proporciona combinaciones que comprenden:

- a) un compuesto de la invención como se describe en la presente descripción; y
- b) uno o más compuestos que comprenden:

- i) otros compuestos de la presente invención,
- ii) otros medicamentos adaptados para el tratamiento de una afección grave para la cual la activación de S1P1 está médicamente indicada, por ejemplo, esclerosis múltiple, rechazo de trasplante o síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

Las combinaciones de la invención incluyen mezclas de compuestos de (a) y (b) en una formulación única y compuestos de (a) y (b) como formulaciones separadas. Algunas combinaciones de la invención se pueden empaquetar como formulaciones separadas en un estuche. En algunas modalidades, dos o más compuestos de (b) se formulan juntos mientras que un compuesto de la invención se formula por separado.

Las dosificaciones y formulaciones para los otros agentes que se emplearán, donde aplique, serán las establecidas en la última edición del *Physicians' Desk*

Reference.

Uso en tratamiento

El compuesto de la presente invención puede usarse en un método para activar o agonizar (es decir, para tener un efecto agónico, para actuar como agonista) un subtipo de receptor de esfingosina-1-fosfato, tal como S1P1. El método implica poner en contacto el receptor con una concentración adecuada de un compuesto inventivo para provocar la activación del receptor. El contacto puede tener lugar *in vitro*, por ejemplo, al llevar a cabo un ensayo para determinar la actividad de activación del receptor S1P de un compuesto inventivo que se somete a experimentación en relación con una presentación para la aprobación regulatoria. El método para activar un receptor S1P, tal como S1P1, también puede llevarse a cabo *in vivo*, es decir, dentro del cuerpo vivo de un mamífero, tal como un paciente humano o un animal de prueba. El compuesto inventivo puede suministrarse al organismo vivo a través de una de las rutas como se describió anteriormente, por ejemplo, oralmente, o se puede proporcionar localmente dentro de los tejidos del cuerpo, por ejemplo, mediante inyección de un tumor dentro del organismo. En presencia del compuesto inventivo, tiene lugar la activación del receptor y se puede estudiar el efecto del mismo.

Una modalidad de la presente divulgación proporciona un compuesto de fórmula 265 para usar en el tratamiento de una afección grave en un paciente para el cual la activación de un receptor S1P, tal como S1P1, está médicamente indicada, en donde el paciente recibe el compuesto inventivo en una dosificación, a una frecuencia y durante un tiempo para producir un efecto beneficioso en el paciente. El compuesto inventivo se puede administrar por cualquier medio adecuado, cuyos ejemplos están descritos anteriormente.

Procedimientos experimentales para estudiar la internalización inducida por agonista, la fosforilación del receptor y la poliubiquitinación del receptor en células que expresan de forma estable S1P₁-GFP

Materiales. S1P se obtuvo de Biomol. El agonista del receptor S1P, AFD-R, fue un regalo del Dr. Brickman (Novartis Pharma). Los anticuerpos anti-GFP (ab-1218 y ab-6556) provienen de Abcam, el anticuerpo anti-ubiquitina P4D1 de Santa Cruz, los geles de SDS-PAGE Tris-Glycine Novex al 4-12 % de Invitrogen, el ortofosfato P³² de Perkin-Elmer. El suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) y el FBS despojado de carbón provienen de Hyclone, y otros reactivos de cultivo provienen del TSRI Supply Center (suministrado por Invitrogen y Gibco BRL).

Cultivo celular. Las células HEK-293 que expresan de forma estable el receptor S1P₁ humano marcado con GFP (S1P₁-GFP) y las células 293-vector-GFP fueron un regalo del Dr. Timoteo Hla (Connecticut Health Science Center). Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado con alto contenido de glucosa que contenía GlutaMAX, y se suplementaron con FBS al 10 %, solución de penicilina/estreptomina al 1 % y se seleccionaron con 500 g/mL de G418 (Gibco BRL).

Estudios de imagen por microscopía para la internalización de S1P₁-GFP mediada por ligando.

Se usaron células S1P₁-GFP individuales cultivadas en cubreobjetos recubiertos con gelatina para estudiar la internalización de S1P₁-GFP inducida por ligando. Las células se incubaron durante la noche en medio de FBS despojado de carbón (cs-FBS) antes del inicio del experimento, y todas las incubaciones posteriores se realizaron en medio de cs-FBS que contenía 15 ug/mL de ciclohexamida. Las células se incubaron con agonistas (o control del vehículo durante los tiempos indicados y las reacciones se terminaron por eliminación del medio y lavado con PBS. En experimentos con el antagonista W146, se añadió el antagonista o vehículo a las células durante 30-45 minutos antes de la incubación del agonista. Las células se fijaron en paraformaldehído al 3,7 % durante 10 minutos y se montaron en cubreobjetos mediante el uso de medios de montaje GelMount. Las células se barrieron con un microscopio de barrido confocal de fluorescencia Olympus BX61. Para detectar GFP, la fluorescencia se excitó mediante el uso de un láser de argón a una longitud de onda de 488 nm, y la longitud de onda absorbida se detectó a 510-520 nm para GFP. Se obtuvieron microfotografías de ligando frente a vehículo mediante el uso del software Metamorph y se evaluaron las imágenes (en Photoshop) para determinar la aparición o no del patrón de internalización vesicular S1P₁-GFP, un patrón característico adoptado por la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G después de la estimulación del ligando.

Immunoprecipitación e inmunotransferencia para la poliubiquitinación S1P₁-GFP y S1P₁ estimulado por ligando

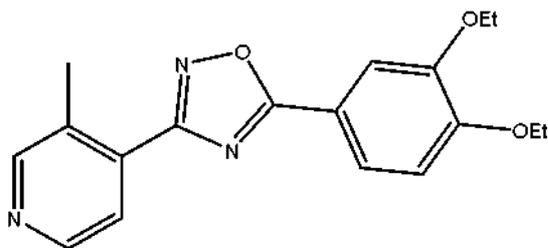
El efecto del reclutamiento estimulado por agonistas de cadenas de poli-ubiquitina a S1P₁-GFP se analizó mediante experimentos de inmunoprecipitación-inmunotransferencia con anticuerpos anti-GFP. Las células se sembraron en placas de 35 mm y se cultivaron hasta ~95 % de confluencia mediante el uso de medio de crecimiento regular. El medio de crecimiento se reemplazó por medio cs-FBS y las células se incubaron durante la noche. Los fármacos o vehículo (ambos en medio cs-FBS) se incubaron durante los tiempos indicados. Al final de la incubación, las monocapas se lavaron dos veces en PBS helado y se obtuvieron los lisados por incubación en tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Nonidet P-40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 0,5 %, SDS al 0,1 %) más inhibidores de proteasas (tabletas completas, Roche) y NaVO₄ 1 mM, NaF 1 mM y B-glicerol-fosfato 0,5 M. Los lisados celulares se aclararon por centrifugación (10 000 x g, 15 minutos) y la concentración de proteínas de los sobrenadantes de lisados se determinó por el método BCA (Pierce). Se incubaron cantidades iguales de lisados (0,5-1 mg) durante la noche a 4 °C con un anticuerpo monoclonal GFP (1 ug de anticuerpo por 400 ug de proteína), seguido de incubación con perlas de proteína A sepharose (2 h, 4 °C). Las perlas se recuperaron por centrifugación (10 000 x g, 1 minuto) y se lavaron: 3 x tampón RIPA:PBS (1:1) sin inhibidores de proteasa y dos veces en PBS. Las perlas se suspendieron en tampón Laemli 2X que contenía 2-mercaptoetanol, se hirvieron durante 10 minutos y las proteínas en las perlas se separaron por SDS-PAGE en Novex, geles de Tris-Glicina al 4-12 %. Posteriormente, los geles se transfirieron a membranas de PVDF y se sondearon durante la noche (4 °C) con un anticuerpo policlonal GFP (1:10 000) para detectar la expresión de S1P₁-GFP o P4D1 (1:200-1:800) para detectar el complejo poliubiquitinado S1P₁-GFP. Los anticuerpos marcados con peroxidasa de rábano picante se visualizaron por quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences).

Fosforilación de S1P₁-GFP estimuladas por agonistas en células HEK293.

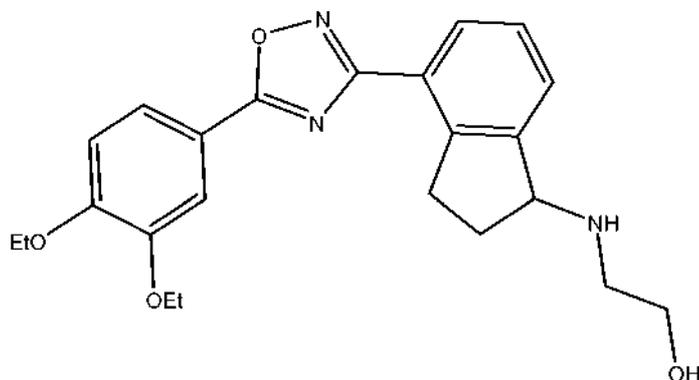
Las células que expresaban de manera estable el S1P₁ humano marcado con GFP se marcaron metabólicamente con ortofosfato P³² (80 µCi/mL, Perkin Elmer) durante 2 h y posteriormente se incubaron con agonistas a las concentraciones indicadas durante los tiempos indicados a 37 °C. Las incubaciones se terminaron por eliminación de agonista y lavado con PBS, y el receptor se inmunoprecipitó con un anticuerpo GFP a partir de cantidades iguales de proteína de los lisados celulares. El receptor inmunoprecipitado se separó por SDS-PAGE, y la incorporación de P³² sobre el receptor estimulado por agonista se evaluó por autorradiografía (-80 °C, 24 h de exposición).

Internalización, ubiquitinación y fosforilación de S1P₁-GFP

Compuesto de referencia 32:



Compuesto de referencia 236:

5
10
1520
25
30

Durante el curso de los estudios de optimización de plomo, los compuestos SR-917, el compuesto 32 y el compuesto 236 se evaluaron en profundidad en varios estudios biológicos. El SR-917 es un agonista conocido del receptor S1P1, indexado en el NIH Molecular Libraries Small Molecule Repository MLMSR, la ID del compuesto es 976135. Está disponible comercialmente en ChemBridge Screening Library.

La estimulación agonista del receptor S1P1 está modulada por degradación del receptor. La estimulación del ligando induce la fosforilación, internalización, poliubiquitinación y degradación del receptor (González-Cabrera, Hla y otros 2007). Al igual que AFD-R y S1P, la estimulación con el compuesto sintético identificado por el tamizaje de alto rendimiento, SR-917, da como resultado la internalización de S1P1-GFP, la fosforilación de proteínas y la poliubiquitinación; véase figura 1.

El compuesto 32 induce de manera robusta la internalización y la poliubiquitinación con 5178 y estos efectos están bloqueados por el antagonista de S1P1, W146R; véase figura 2.

El compuesto 236, como otros compuestos de la serie, induce la poliubiquitinación de S1P1; véase figura 3.

35

Se observó que S1P y el agonista específico de S1P1, SEW2897 inducen linfopenia (Wei, Rosen y otros 2005). SR-917 y el compuesto 32, suministrados por sonda, no indujeron linfopenia en ratones. El compuesto 236, a 10 mgpk por sonda, indujo linfopenia; véase figura 4. El compuesto 236 es soluble en agua a 0,5 mg/mL y el suministro iv e ip inducen linfopenia (Sanna, Leaf).

Farmacocinética

40
45

De los estudios iniciales de eficacia en ratón (figura 5), los niveles plasmáticos del compuesto 236 a las 5 horas fueron: Media/DE 395/87,6. La estabilidad en los microsomas hepáticos para el compuesto 236 era dependiente de la especie. En microsomas humanos, el compuesto era muy estable y moderadamente estable con ratas. Todos eran dependientes de NADPH. En presencia de 1,8 mg/mL de microsomas hepáticos, las vidas medias (minutos) son estables en humanos, Ratón 50, Rata 16.

50

Los aminoácidos esenciales polares de S1P1 para la activación mediada por S1P no se requieren para la activación del receptor S1P1 por el compuesto 236. S1P requiere varios aminoácidos polares (R120, E121 y R292) que recubren el bolsillo de unión del ligando para la activación completa (Jo, Sanna y otros 2005). Las cadenas laterales polares de S1P1 de los residuos R120, E121 y R29 forman puentes salinos con el fosfato de S1P1 y el S1P solo puede activar mínimamente los mutantes R120A, E121A y R292A. Por el contrario, los receptores S1P1 de tipo salvaje y S1P1 mutantes R120A, E121A y R292A se activan indistintamente por el compuesto 236 (figura 6).

Ejemplos

55

Los siguientes compuestos se sintetizaron y evaluaron en bioensayos como se describe en la presente descripción.

Procedimientos sintéticos

60
65

Disolventes para extracción: grado ACS. Disolventes para la reacción: grado reactivo. Reactivos: a menos que se indique lo contrario, la más alta calidad disponible de Alfa Aesar, Fisher y Aldrich. TLC: placas de aluminio de gel de sílice 60 F₂₅₄, (Whatman, tipo Al Sil G/UV, capa de 250 µm); visualización por absorción UV. La cromatografía ultrarrápida se realizó en gel de sílice 60 (0,40-0,63 mm, 230-440 mesh, EM Science). RMN: ¹H: valores de δ en ppm (TMS como estándar interno); ¹³C: valores de δ en ppm (TMS como estándar interno). Las reacciones se monitorearon por LC/MS.

Procedimiento general para reducir aldehído:

A una suspensión agitada de aldehído (1,0 equiv, 0,4 M) y gel de sílice (catalítico) en etanol, a 0 °C, se añadió NaBH₄ (1/3 equiv). La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. El disolvente se eliminó bajo presión reducida y el producto se purificó por CC en hexano/EtOAc (7:3).

5

Procedimiento general para sintetizar amidoximas:

A una suspensión agitada de hidrocloreto de hidroxilamina (1,1 equiv) y Na₂CO₃ (1,1 equiv) en etanol se añadió, en una porción, el benzonitrilo correspondiente (1 equiv). La mezcla se calentó a reflujo durante 6 h seguido de la adición de NH₂OH.HCl (1,1 equiv) y Na₂CO₃ (1,1 equiv), la reacción se calentó a reflujo durante 6 h adicionales. La suspensión se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El sólido se lavó con etanol y la fase orgánica se concentró bajo presión reducida. La amidoxima bruta se recristalizó en EtOAc/Hexanos y se usó sin purificación adicional.

10

Procedimiento general para sintetizar oxadiazoles:

15

A una solución agitada de ácido 3,4-dietoxibenzoico (1 equiv, 0,2 M) en DMF se le añadió secuencialmente HOBt (1,3 equiv) y EDCI (1,3 equiv) a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 20 minutos seguido de la adición, en una sola porción, de la amidoxima correspondiente (1,3 equiv, de la etapa anterior). La reacción se agitó durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente y luego se calentó a 90-95 °C durante 8-14 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó mediante el uso de una solución saturada de NaCl y se extrajo con EtOAc (3X). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró bajo presión reducida. El producto se purificó por CC mediante el uso de CH₂Cl₂/MeOH (9:1) para ofrecer los diariloxadiazoles en rendimientos moderados.

20

Procedimiento general para sintetizar aminas.

25

A una solución agitada de alcohol bencílico (1 equiv) y piridina (1,1 equiv) en CH₂Cl₂, a 0 °C, se añadió SOCl₂ gota a gota (1,1 equiv). La reacción se calentó a temperatura ambiente, se agitó durante 1 h adicional y se concentró bajo presión reducida. A una solución agitada de cloruro bruto en CH₂Cl₂, a 0 °C, se le añadió gota a gota una solución de pirrolidina (3 equiv) en CH₂Cl₂. La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. La fase orgánica se lavó con agua y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. El crudo se concentró bajo presión reducida y se purificó por cromatografía en columna en DCM/MeOH para proporcionar derivados de pirrolidina con buenos rendimientos.

30

Reducción de derivados de indol.

35

A una solución agitada de núcleo de indol (1 equiv) en ácido acético a 13 °C se añadió lentamente cianoborohidruro de sodio (3 equiv). La reacción se agitó durante 2 h a 13 °C y se monitoreó por TLC. Después de completar la reacción, la mezcla se neutralizó con hidróxido de sodio al 50 % y el producto se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre Na₂CO₃ y se eliminó bajo presión reducida. Los núcleos de indolina se purificaron por CC mediante el uso de CH₂Cl₂/MeOH (9:1) para ofrecer un rendimiento cuantitativo.

40

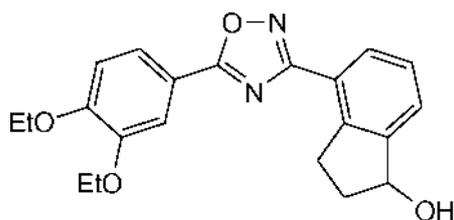
Procedimiento de aminación.

Una solución de alcohol (1 equiv), a 0 °C, se trató con SOCl₂ (1,1 equiv) y piridina (1,1 equiv) en CH₂Cl₂. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con NaHCO₃ (2X). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida. El crudo se disolvió en DMF y se trató con la amina correspondiente (2 equiv) y DIPEA (2,0 equiv). La reacción se agitó a 50 °C durante 48 h. La reacción se diluyó con H₂O y el producto se extrajo con EtOAc (3X). El producto se purificó por CC mediante el uso de CH₂Cl₂/MeOH (9:1) para ofrecer amino-diariloxadiazoles en rendimientos moderados.

45

Ejemplo de referencia 1

50



55

4-(5-(3,4-dietoxyfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ol (compuesto 215)

60

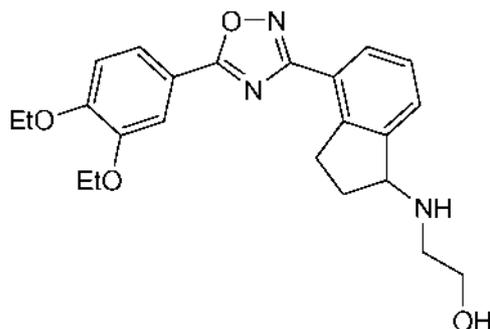
A una suspensión agitada de 1-oxo-2,3-dihidro-1H-indeno-4-carbonitrilo (5 g; 31,8 mmol) y gel de sílice (100 mg) en etanol (30 mL), a 0 °C, se añadió NaBH₄ (400 mg; 10,6 mmol). La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. El disolvente se eliminó bajo presión reducida y el producto se purificó por cromatografía en columna en hexano/EtOAc (5:5) para ofrecer 1-hidroxi-2,3-dihidro-1H-indeno-4-carbonitrilo como un sólido blanco con

65

un rendimiento del 80 % (4,04 g, 25,4 mmol). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7,62 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H); 7,54 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H); 7,33 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H); 5,28 (t, $J = 6,3$ Hz, 1H); 3,28-3,18 (m, 1H); 3,02-2,92 (m, 1H); 2,63-2,52 (m, 1H); 2,06-1,99 (m, 1H).

5 A una solución agitada de 1-hidroxi-2,3-dihidro-1H-indeno-4-carbonitrilo (3 g; 18,86 mmol) en etanol (100 mL) se añadieron con precaución durante un periodo de 16 h bajo condiciones de reflujo hidrocloreto de hidroxilamina (6,55 g; 94,3 mmol) y carbonato de potasio (13,03 g; 94,3 mmol) en porciones iguales. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y el sólido se filtró. El disolvente orgánico se concentró bajo presión reducida y el crudo se recristalizó a partir de etanol para rendir 2,5 g (69 %) de amidoxima.

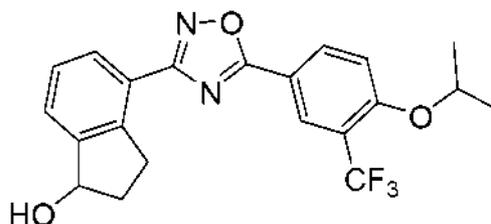
10 En un vial de microondas, una solución agitada de ácido 3,4-dietoxibenzoico (200 mg; 0,95 mmol) en DMF se trató con HOBt (168 mg; 1,24 mmol) y EDCI (237 mg; 1,24 mmol) a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 20 minutos seguido de la adición, en una sola porción, de amidoxima (238 mg; 1,24 mmol). La reacción se agitó durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente y luego se calentó a 130 °C durante 35 minutos en el iniciador. La reacción se diluyó mediante el uso de una solución saturada de NaCl y se extrajo con EtOAc (3X80 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró bajo presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna mediante el uso de CH_2Cl_2 :MeOH (9:1) para ofrecer el producto como un sólido blanco con un rendimiento del 69 % (208 mg). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 8,10 (d, $J = 7,6$; 1H); 7,78 (dd, $J_1 = 1,6$ Hz, $J_2 = 8$ Hz, 1H); 7,67 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H); 7,56 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H); 7,39 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H); 6,97 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 5,29 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H); 4,19 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H); 4,18 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H); 3,51-4,43 (m, 1H); 3,22-3,14 (m, 1H); 2,59-2,51 (m, 1H); 2,04-1,97 (m, 1H); 1,5 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H); 1,49 (t, $J = 7,2$; 3H); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 175,2; 168,9; 152,8; 148,9; 146,6; 143,3; 128,9; 127,4; 127,0; 123,8; 122,2; 116,7; 112,7; 112,4; 76,2; 64,9; 64,8; 35,7; 31,5; 14,9; 14,8. MS (EI) m/z 367 (M^+), HRMS (EI) para $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$ (M^+): calculado 367,1652, encontrado 367,1653.



2-(4-(5-(3,4-dietoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)etanol (compuesto 236)

40 A una solución agitada del compuesto 215 (400 mg, 1,09 mmol) en CH_2Cl_2 se añadieron, a 0 °C, piridina (89 μL , 1,1 mmol) y cloruro de tionilo (81 μL , 1,1 mmol), la reacción se agitó 1 h a temperatura ambiente y la mezcla se concentró bajo presión reducida. El crudo se diluyó en DMF (10 mL) y se añadieron carbonato de potasio (290 mg, 2,1 mmol) y etanolamina (128 μL , 2,1 mmol), la reacción se agitó durante la noche a 60 °C. La mezcla de reacción se vertió en agua (100 mL) y se extrajo con EtOAc (100 mL X3). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró bajo presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía en columna mediante el uso de CH_2Cl_2 :MeOH (9:1) para rendir 312 mg (rendimiento del 70 %) del producto como un sólido blanco. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 8,12 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H); 7,79 (dd, $J_1 = 2,0$ Hz $J_2 = 8,5$ Hz, 1H); 7,68 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H); 7,63 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H); 7,40-7,37 (m, 1H); 4,49-4,47 (m, 1H); 4,23-4,16 (m, 4H); 3,78-3,70 (m, 1H); 3,53-3,46 (m, 1H); 3,29-3,22 (m, 1H); 2,96-2,94 (m, 4H); 2,56-2,50 (m, 1H); 2,09-2,03 (m, 1H); 1,52-1,49 (m, 6H); RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 175,03; 168,66; 152,71; 148,87; 143,76; 128,71; 127,11; 123,89; 122,04; 116,67; 112,63; 112,49; 104,66; 64,84; 64,61; 62,70; 60,34; 47,98; 31,90; 29,69; 14,72; 14,64. MS (EI) m/z 410 (M^+), HRMS (EI) para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4$ (M^+): calculado 410,2074; encontrado 410,2077.

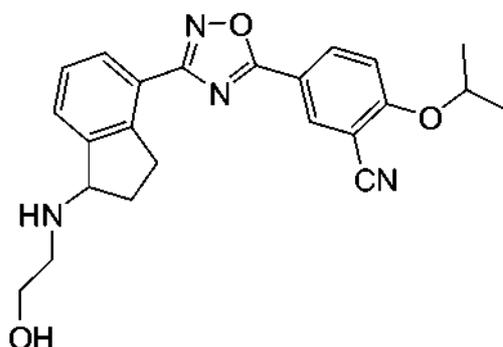
Ejemplo 1



65 4-(5-(4-isopropoxi-3-(trifluorometil)fenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ol (compuesto 261)

En un vial de microondas, una solución agitada de ácido 4-etoxi-3-(trifluorometil)benzoico (200 mg, 0,97 mmol) en DMF se trató con HOBt (172 mg, 1,26 mmol) y EDCI (242 mg, 1,26 mmol) a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 20 minutos seguido de la adición, en una sola porción, de *N*,1-dihidroxi-2,3-dihidro-1*H*-indeno-4-carboximidamida (243 mg, 1,26 mmol). La reacción se agitó durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente y luego se calentó a 130 °C durante 35 minutos en el iniciador. La reacción se diluyó mediante el uso de una solución saturada de NaCl y se extrajo con EtOAc (80 mL X3). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró bajo presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna mediante el uso de CH₂Cl₂:MeOH (9:1) para ofrecer el producto como un sólido amarillo pálido con un rendimiento del 63 % (229 mg).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃-CH₃OD): δ 8,36 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H); 8,29 (dd, *J*₁ = 2,4 Hz, *J*₂ = 9,0 Hz, 1H); 8,06 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H); 7,55 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H); 7,37 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H); 7,10 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H); 5,26 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H); 4,81-4,73 (m, 1H); 3,48-3,38 (m, 1H); 3,19-3,08 (m, 1H); 2,56-2,49 (m, 1H); 2,04-1,95 (m, 1H); 1,45 (d, *J* = 6,3 Hz, 6H); RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃-CH₃OD): δ 173,11; 168,95; 162,82; 146,70; 143,26; 134,15; 134,041; 128,27; 127,30; 127,18; 123,18; 116,85; 115,41; 113,66; 103,86; 72,85; 35,57; 31,42; 21,82. MS (EI) *m/z* 362 (M⁺), HRMS (EI) para C₂₁H₁₉N₃O₃ (M⁺): calculado 362,1499; encontrado 362,1494.



5-(3-(1-(2-hidroxiethylamino)-2,3-dihidro-1*H*-inden-4-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)-2-isopropoxibenzonitrilo (compuesto 265)

A una solución agitada del compuesto 261 (130 mg, 0,360 mmol) en CH₂Cl₂ se añadieron, a 0 °C, piridina (30 µL, 0,378 mmol) y cloruro de tionilo (27 µL, 0,378 mmol), la reacción se agitó 1 h a temperatura ambiente y se concentró bajo presión reducida. El crudo se diluyó en DMF (2 mL) y se añadieron DIPEA (328 µL, 1,889 mmol) y etanolamina (114 µL, 1,889 mmol) a 0 °C. La reacción se agitó durante la noche a 60 °C. La mezcla de reacción se vertió en agua (100 mL) y se extrajo con acetato de etilo (20 mL X3). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía en columna mediante el uso de CH₂Cl₂:MeOH (9:1) para producir el 23 % (34 mg) del producto como un sólido marrón pálido.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃-CH₃OD): δ 8,33 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H); 8,26 (dd, *J*₁ = 2,4 Hz, *J*₂ = 9,0 Hz, 1H); 7,99 (d, *J* = 7,5 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H); 7,47 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H); 7,33 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H); 7,07 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H); 4,74 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H); 4,27 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H); 3,62 (q, *J* = 6,0 Hz, 2H); 3,37-3,32 (m, 1H); 3,18-3,10 (m, 1H); 2,79 (t, 5,1 Hz, 2H); 2,48-2,37 (m, 1H); 1,92-1,85 (m, 1H); 1,40 (d, *J* = 6,0 Hz, 6H); RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃-CH₃OD): δ 172,73; 168,58; 162,49; 145,45; 143,33; 133,74; 133,71; 127,85; 126,69; 126,58; 122,81; 116,40; 115,00; 113,31; 103,33; 72,46; 62,30; 60,54; 32,15; 31,51; 21,35. MS (EI) *m/z* 405 (M⁺), HRMS (EI) para C₂₃H₂₄N₄O₃ (M⁺): calculado 405,1921; encontrado 405,1920.

El compuesto 265 se ha evaluado como se muestra a continuación.

Tabla 1: Datos biológicos

Número del compuesto	tPSA	ClogP	CE ₅₀ (S1P ₁ Ag) (nM)	CE ₅₀ (S1P ₃ Ag) (nM)
265	99,2	3,44	< 0,5	NA

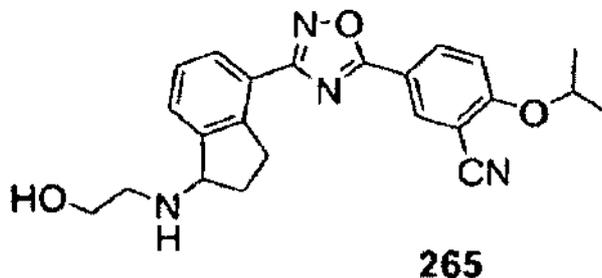
Mediante el uso de procedimientos sintéticos proporcionados en la presente descripción, está dentro de la habilidad ordinaria preparar cualquier compuesto de la invención. Mediante el uso del conocimiento de la persona con habilidad ordinaria combinada con las referencias y métodos citados anteriormente para la evaluación de la bioactividad inhibitoria de S1P1, la persona con habilidad ordinaria en la técnica puede evaluar el compuesto de la presente invención así preparado para su eficacia en la inhibición de S1P1, para inhibir S1P1 selectivamente en presencia de otros subtipos de receptores tales como S1P3, y para la eficacia en bioensayos basados en células, indicativos de inhibición de S1P1 *in vivo*. En consecuencia, los alcances completos de las reivindicaciones proporcionadas a continuación están habilitados por la divulgación en la presente descripción.

Referencias

1. Matloublan, M.; Lo, C. G.; Cinamon, G.; Lesneski, M. J.; Xu, Y.; Brinkmann, V.; Allende, M. L.; Proia, R. L.; Cyster, J. G. *Nature* 2004, 427, 355. (b) Allande, M. L.; Dreier, J. L.; Mandala, S.; Proia, R. L. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 15396.
- 5 2. Germana, S. M.; Liao, J.; Jo, E.; Alfonso, C.; Ahn, M.-Y.; Peterson, M. S.; Webb, B.; Lefebvre, S.; Chun, J.; Gray, N.; Rosen, H. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 13839.
3. (a) Budde, K.; Schmouder, R. L.; Nashan, B.; Brunkhorst, R.; Lucker, P. W.; Mayer, T.; Brookman, L.; Nedelman, J.; Skerjanec, A.; Bohler, T.; Neumayer, H.-H. *Am. J. Transplant.* 2003, 3, 846-854. (b) Budde, K.; Schmouder, R. L.; Brunkhorst, R.; Nashan, B.; Lucker, P. W.; Mayer, T.; Choudhury, S.; Skerjanec, A.; Kraus, G.; Neumayer, H. H. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002, 13, 1073-1083. (c) Kahan, B. D.; Karlix, J. L.; Ferguson, R. M.; Leichtman, A. B.; Mulgaonkar, S.; Gonwa, T. A.; Skerjanec, A.; Schmouder, R. L.; Chodoff, L. *Transplantation* 2003, 7, 1079-1084.
- 10 4. Yan L.; Huo P.; Hale J.; Mills S. G.; Hajdu R.; Keohane C. A.; Rosenbach M. J.; Milligan J. A.; Shei G.; Chrebet G.; Bergstrom J.; Card D.; Mandala S. *M. Bioorg Med Chem Lett* 2006, 16, 3684-3687.
- 15 5. Li Z.; Chen W.; Hale J.; Lynch C. L.; Mills S. G.; Hajdu R.; Keohane C. A.; Rosenbach M. J.; Milligan J. A.; Shei G.; Chrebet G.; Parent S. A.; Bergstrom J.; Card D.; Forrest M.; Quackenbush E. J.; Wickham L. A.; Vargas H.; Evans R. M.; Rosen H.; Mandala S. *J Med Chem* 2005, 48, 6169-6173.
6. Hale J. J.; Lynch C. L.; Neway W.; Mills S. G.; Hajdu R.; Keohane C. A.; Rosenbach M. J.; Milligan J. A.; Shei G.; Parent S. A.; Chrebet G.; Bergstrom J.; Card D.; Ferrer M.; Hodder P.; Strulovici B.; Rosen H.; Mandala S. *J Med Chem* 2004, 47, 6662-5.
- 20 7. Gonzalez-Cabrera, P. J., T. Hla, y otros (2007). "Mapping pathways downstream of sphingosine 1-phosphate subtype 1 by differential chemical perturbation and proteomics." *J Biol Chem* 282(10): 7254-64.
8. Jo, E., M. G. Sanna, y otros (2005). "S1P1-selective in vivo-active agonists from high-throughput screening: off-the-shelf chemical probes of receptor interactions, signaling, and fate." *Chem Biol* 12(6): 703-15.
- 25 9. Wei, S. H., H. Rosen, y otros (2005). "Sphingosine 1-phosphate type 1 receptor agonism inhibits transendothelial migration of medullary T cells to lymphatic sinuses." *Nat Immunol* 6(12): 1228-35

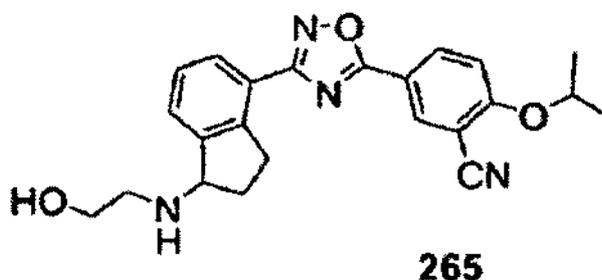
REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula 265:



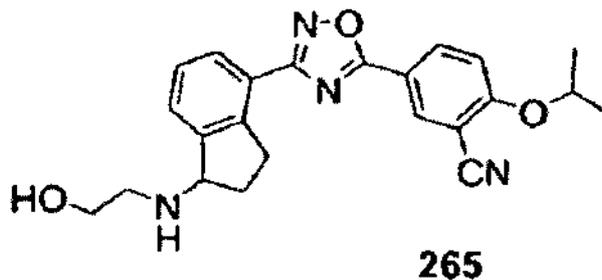
15 o una sal, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde la composición farmacéutica está en forma de una cápsula, tableta, aerosol, solución, suspensión o está formulada para aplicación tópica.

- 20 2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno o una afección grave en donde la activación o inhibición de un receptor de esfingosina-1-fosfato subtipo 1 está médicamente indicado, seleccionado del grupo que consiste de esclerosis múltiple, rechazo de trasplante y síndrome de dificultad respiratoria del adulto.
- 25 3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el trastorno o afección grave es esclerosis múltiple.
4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde el compuesto o sal, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a una dosificación de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 5000 mg.
- 30 5. Uso de un compuesto de fórmula 265:



45 o una sal, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno o una afección grave en donde la activación o inhibición de un receptor de esfingosina-1-fosfato subtipo 1 está médicamente indicado, seleccionado del grupo que consiste de esclerosis múltiple, rechazo de trasplante y síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

- 50 6. El uso de la reivindicación 5, en donde el trastorno o afección grave es esclerosis múltiple.
7. Una forma de dosificación unitaria que comprende un compuesto de fórmula 265:



65 o una sal, estereoisómero, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la forma de dosificación unitaria comprende de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 1000 mg de dicho

compuesto junto con un portador farmacéuticamente aceptable por dosificación unitaria.

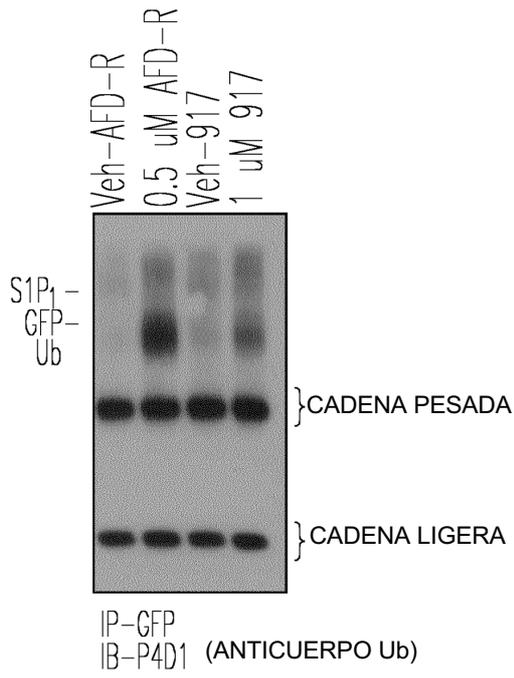


Figura 1A

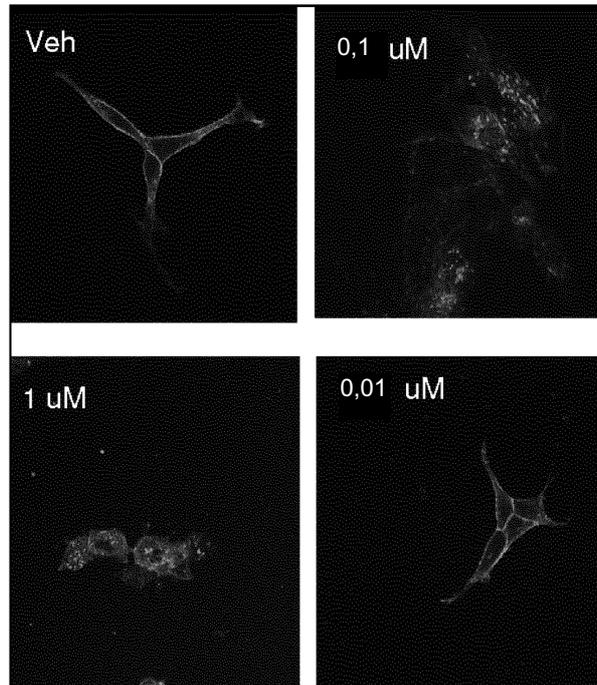


Figura 1B

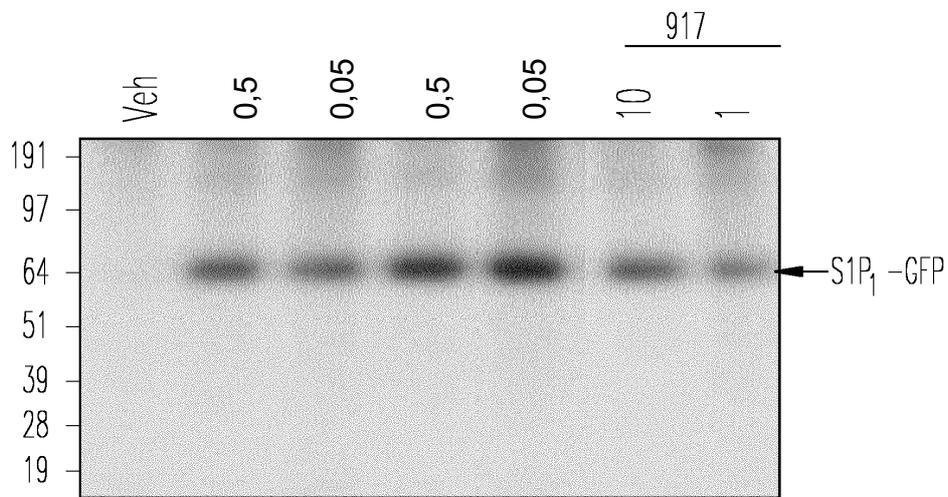


Figura 1C

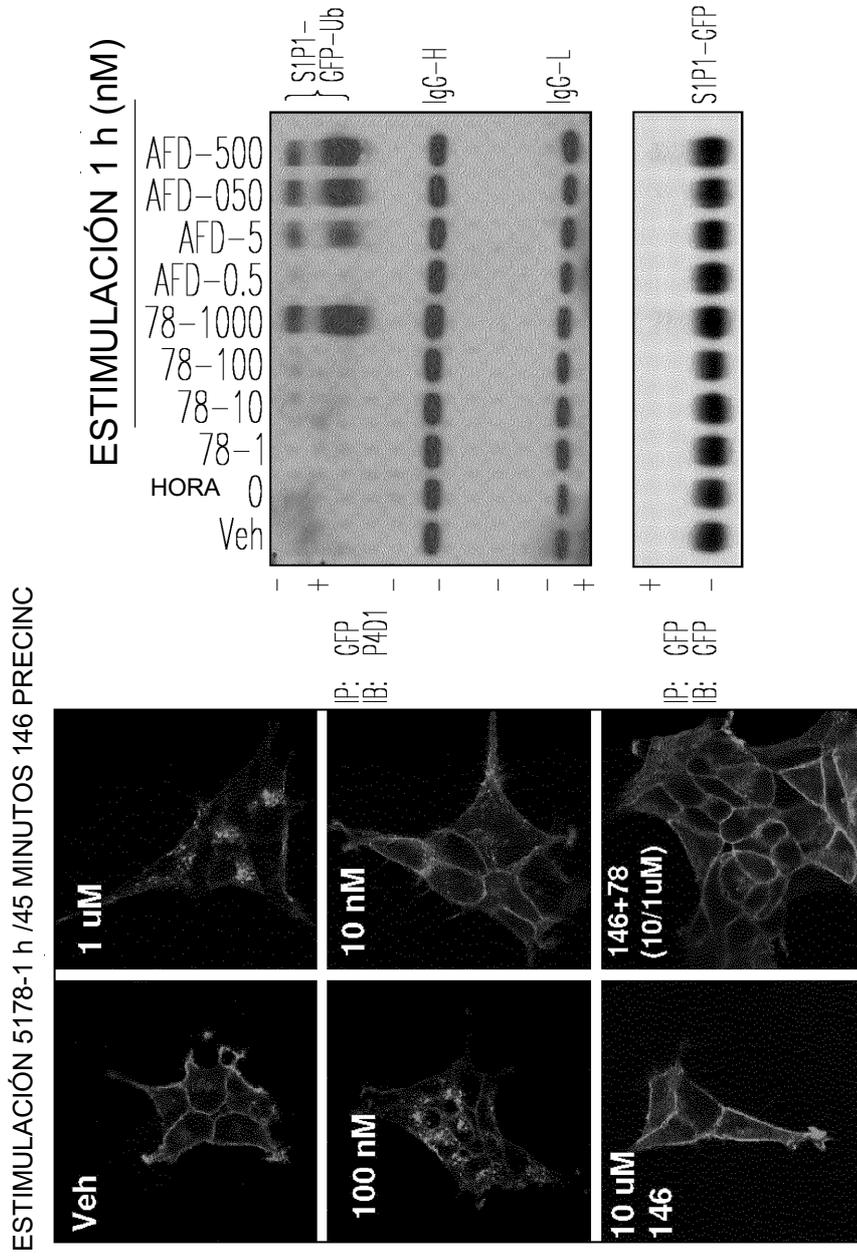


Figura 2

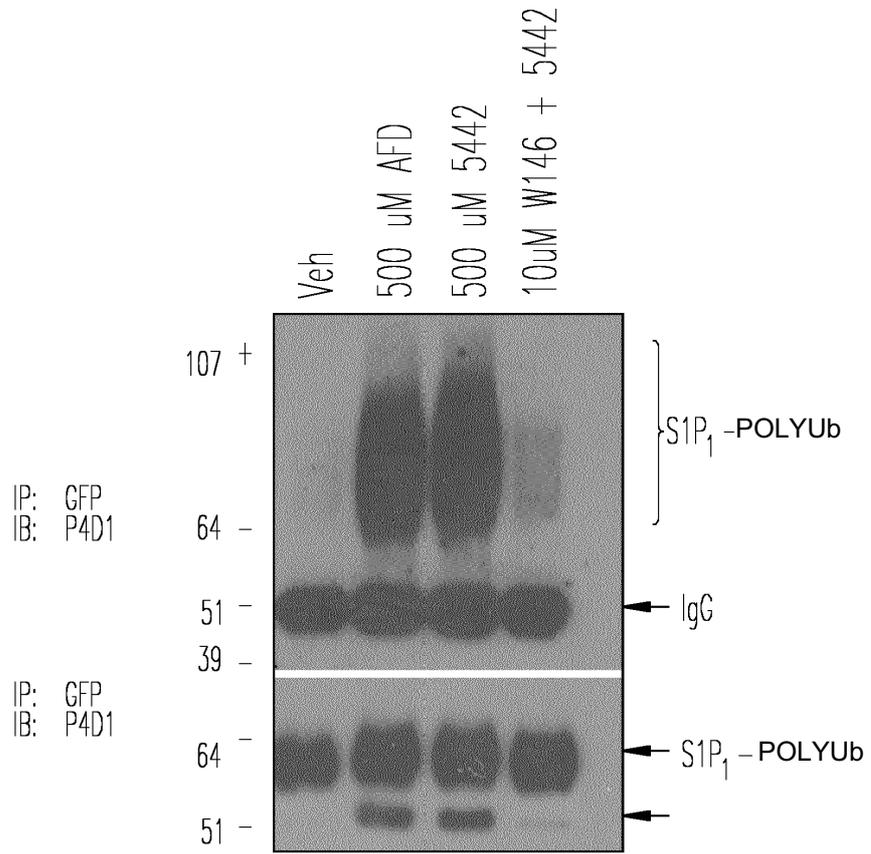


Figura 3

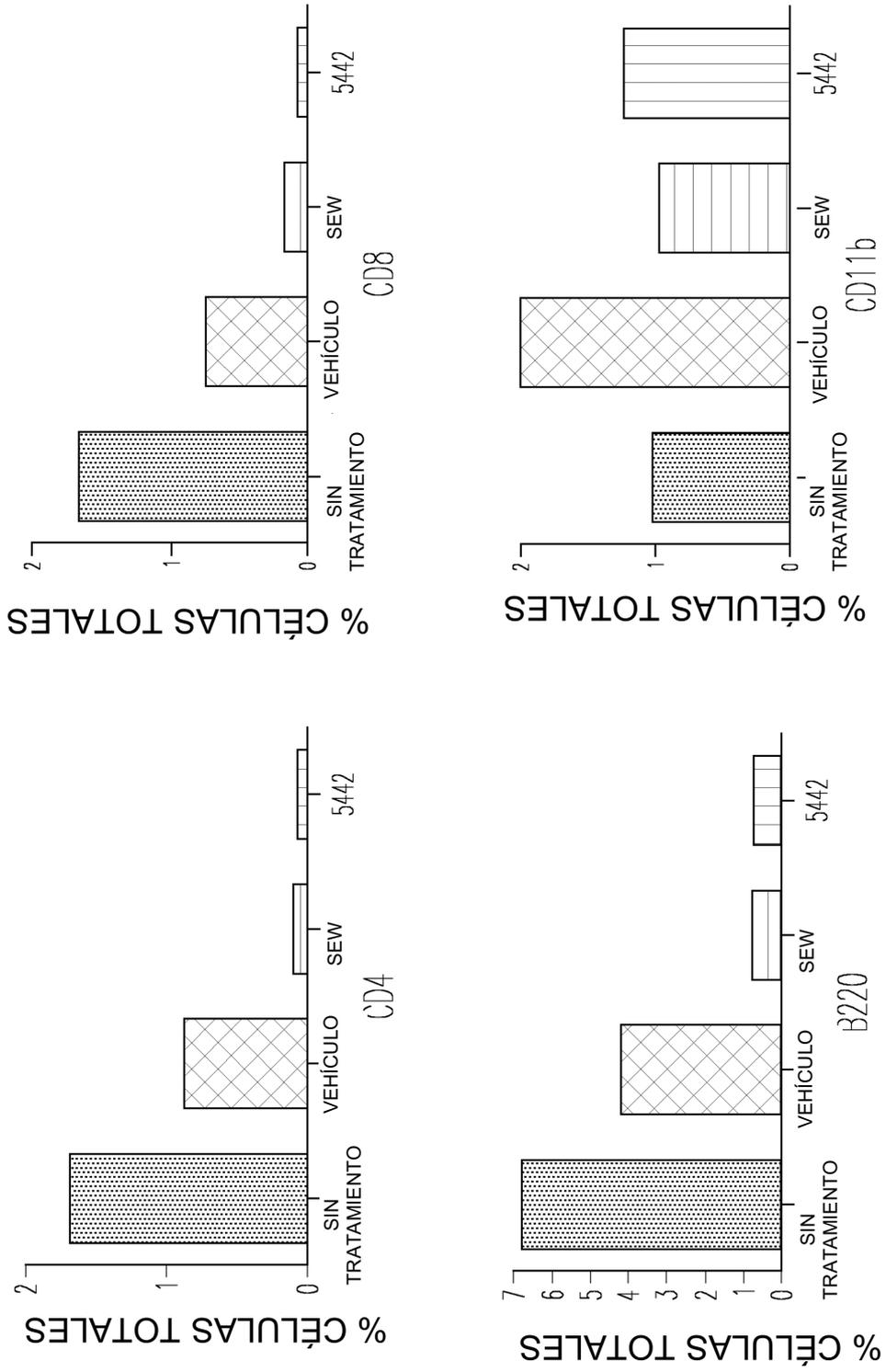


Figura 4A

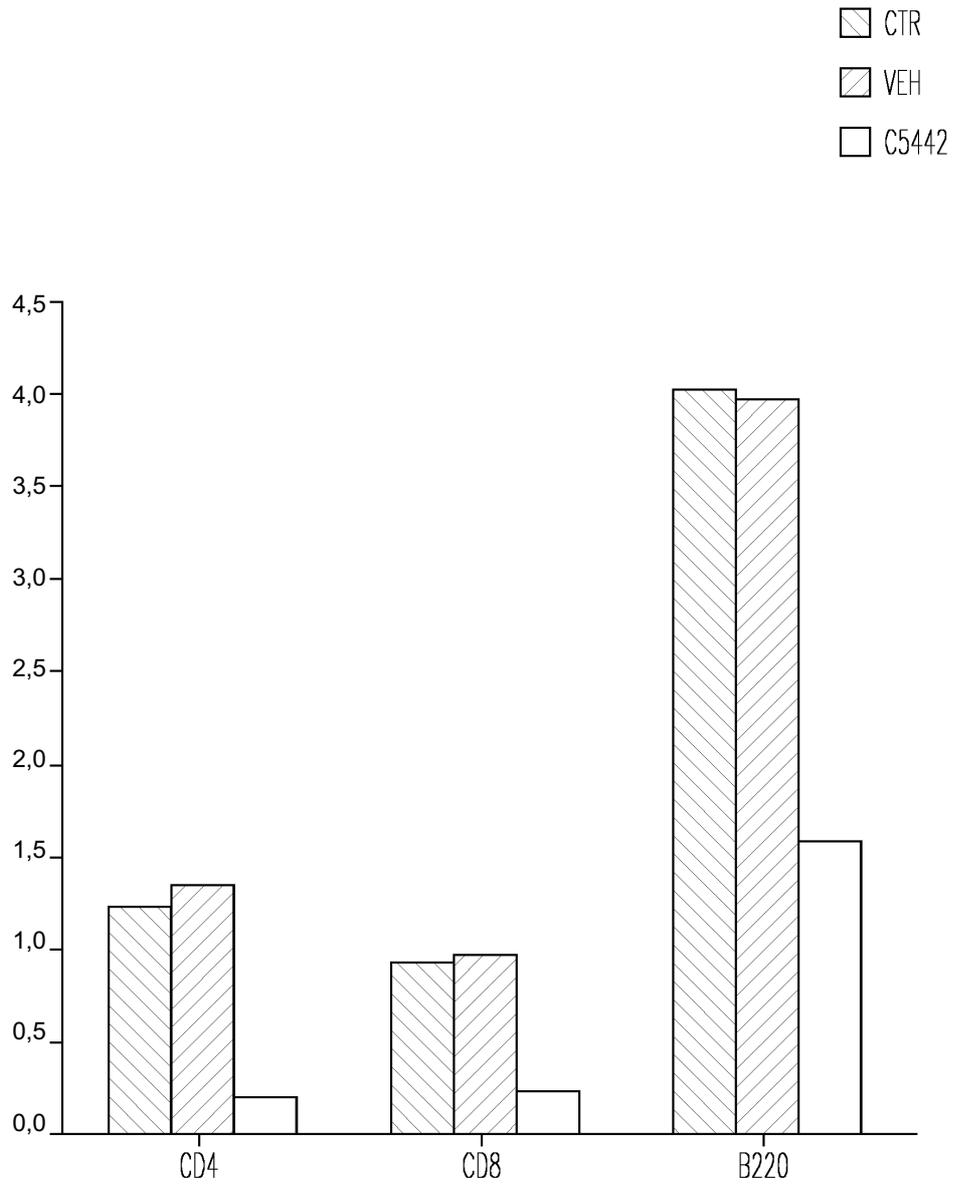


Figura 4B

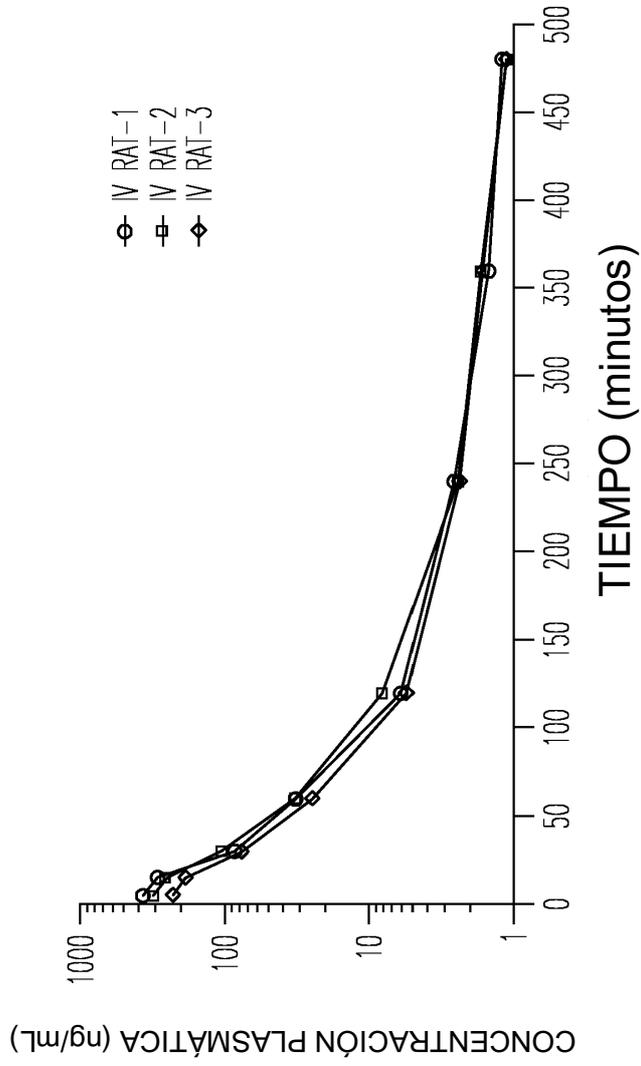


Figura 5

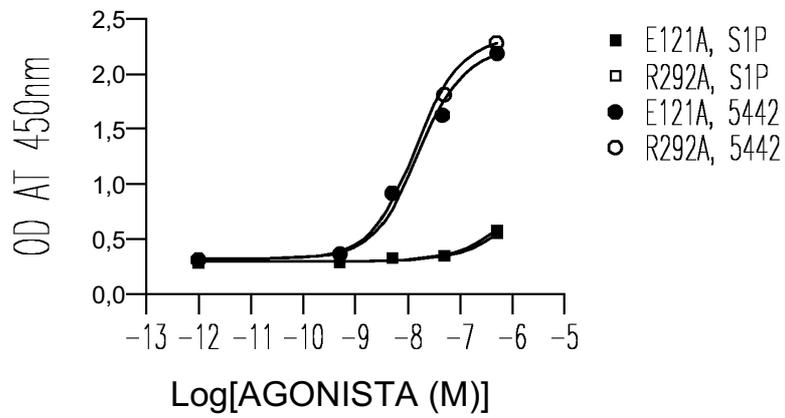


Figura 6A

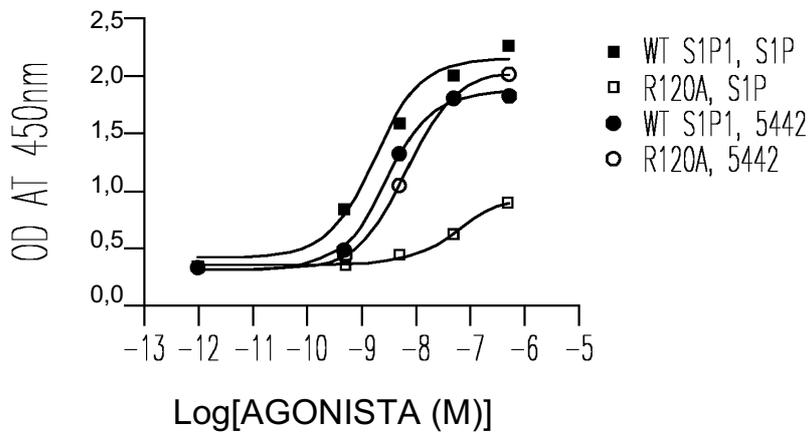


Figura 6B