

AS: 04.493



REPUBLICA DE COLOMBIA

SIC SUPERINTENDENCIA
DE INDUSTRIA
Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES



01 2379

DE
DE
ON

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Medicamento: 0102379 EXTENDIDO

Fecha (A.D.): 00-01-13 16:20:46

Trámite: C.E. PATENTES D. 1 9261540/ 11 0000626.2

Dependencia: C.E. 61/1511 DE LA UNAS U. 00010000

Folios: 42

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

AstraZeneca AB ✓

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

Suecia ✓

Departamento o Estado

Ciudad

Sodertalje

Dirección

S-151 85 sodertalje

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

RAMIRO CASTRO DUQUE ✓

Dirección

Cra 7 No. 16-56 Piso 9

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

Alan Wellington Fauli, Jason Kettle ✓

Dirección y Domicilio

Macclesfield, Cheshire, Gran Bretaña (Respectivamente) ✓

Identificación

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención (COMPUESTOS QUIMICOS)

Derivados de indole y su
uso como Antagonistas de MCP-1

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒ XNO ☐

(33) País UK

(32) Fecha 00-01-13 ✓

(31) No. Solicitud 0000626.2

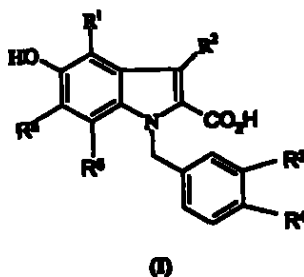
DE ACUERDO CON EL ARTICULO 4C LITERAL 3 DEL CONVENIO DE PARIS

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

A 61 K 31/405

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

Suministrar un compuesto de la Fórmula (I):



donde:

R¹ es hidrógeno, halo o metoxi;

R² es hidrógeno, halo, metil, etil o metoxi;

R³ es un grupo halo o un grupo trifluorometil;

R⁴ es un grupo halo o un grupo trifluorometil;

R⁵ es hidrógeno o halo;

R⁶ es hidrógeno o halo.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica

☐

Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la S.I.C

☐

Recibo de la tasa respectiva \$608.000 (Recibo No.77,743)

☒

Si se reivindica prioridad, el certificado respectivo (copia legalizada)

☐

Traducción oficial

☐

Capítulo descriptivo

☒

Dibujos, planos necesarios

☐

Capítulo reivindicatorio

☒

Tarjeta archivo propietarios según formato

☒

Tarjeta archivo temático según formato

☐

Extracto para resumen o para publicación según formato

☐

Arte final 12 x 12 cms

☐

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA DEL APODERADO

Enero 15, 2001
CPB/hsr.

CC. 170.322 de Btã TP.No. 1003 del C.S.J.



34

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

Superintendencia de Industria y Comercio
Sede: Bogotá, D.C. - Calle 100 No. 100-10
Fecha (Acto) : 2011-01-19
Trámite : 1.22 18 de 191 - 1.2225 - 1.2225
Procedimiento: Acto Administrativo de Liquidación

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 77,743
FECHA : DICIEMBRE 19 DE 2000

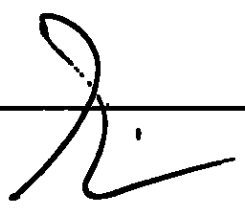
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	Nº. PASO	Vr. PASO
RAMIRO CASTRO	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00110-6	2693449	2,752,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01 01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
		TOTAL :	\$ 608,000.00

SOM: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
e-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

Folio 4 torza proprietatis
~~traditio~~
G₂

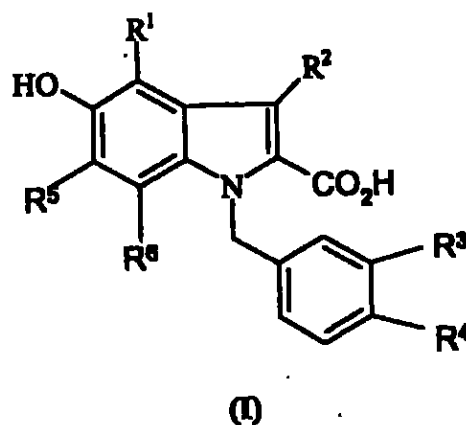
La presente invención se relaciona con compuestos anti inflamatorios que actúan vía antagonismo del receptor CCR2, (también conocido como el receptor MCP-1), llevando entre otros a la inhibición de Monocyte Quimioatrayente Protein-1 (MCP-1). Estos compuestos contienen una fracción indole. La invención se relaciona adicionalmente con composiciones farmacéuticas que los contienen, procesos para su preparación, intermediarios útiles en su preparación y su utilización como agentes terapéuticos.

El MCP-1 es un miembro de la familia de quimioquinas de proteínas pro-inflamatorias que median la quimiotaxis y activación de leucocitos. El MCP-1 es una quimioquina C-C la cual es una de las más potentes y selectivas células T y quimioatrayentes monocitos y agentes de activación conocidos. El MCP-1 ha sido implicado en la patofisiología de un gran número de enfermedades inflamatorias incluyendo artritis reumatoide, nefritis glomerular, fibrosis de pulmón, restenosis (Solicitud de Patente Internacional WO 94/09128), alveolitis (Jones y otros, 1992, J Immunol, 149, 2147) y asma. Otras áreas de enfermedad donde se considera que el MCP-1 juega una parte en su patología son aterosclerosis (por ejemplo Koch y otros, 1992, J Clin. Invest., 90, 772 -779), psoriasis (Deleuran y otros, 1996, J Dermatological Science, 13,. 228-236), reacciones de hipersensibilidad del tipo retrasado de la piel, enfermedad de baso inflamatorio (Grimm y otros, 1996, J Leukocyte Biol, 59,. 804-812), esclerosis múltiple y trauma cerebral (Berman y otros, 1996, J Immunol, 156,. 3017-3023). Un inhibidor MCP-1 puede también ser útil para tratar ataques cardíacos, heridas de reperfusión, isquemia, infarto del miocardio y rechazo de trasplantes.

El MCP-1 actúa a través del receptor CCR2. Los MCP-2 y MCP-3 pueden también actuar, por lo menos en parte, a través de este receptor. Consecuentemente en esta especificación, cuando se hace referencia a "inhibición o antagonismo de MCP-1" o "efectos mediados de MCP-1" esto incluye inhibición o antagonismo de MCP-2 y/o efectos mediados de MCP-3 cuando MCP-2 y/o MCP-3 actúan a través del receptor CCR2.

Los solicitantes han encontrado una clase de compuestos que contienen una fracción indole que tiene útil actividad inhibitoria contra MCP-1. La Solicitud de Patente Internacional, Publicación No. WO 99/07351 divulga una clase de indoles con actividad inhibitoria de MCP-1. Esta solicitud se basa en el descubrimiento sorprendente de que particulares indoles sustituidos 5-hidroxi son inhibidores MCP-1 que poseen inesperadas y benéficas propiedades con respecto a la potencia y/o niveles de sangre y/o biodisponibilidad y/o solubilidad.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un compuesto de la fórmula (I):



donde:

- R¹ es hidrógeno, halo o metoxi;
- R² es hidrógeno, halo, metil, etil o metoxi;
- R³ es un grupo halo o un grupo trifluorometil;

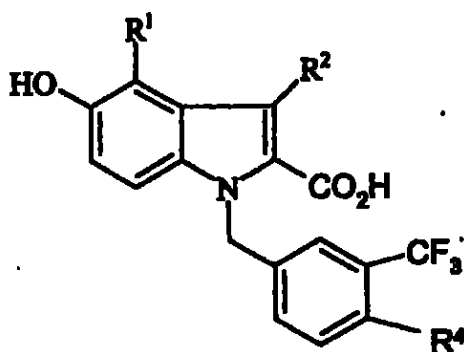
7
86

Similares combinaciones de R^3 y R^4 pueden aplicarse donde por lo menos uno de R^3 y R^4 es diferente a hidrógeno, pero en este caso, R^3 y R^4 son adecuadamente ambos halo tal como flúor, cloro, bromo e iodo, preferiblemente flúor, cloro o bromo, y más preferiblemente aún flúor o cloro. Particulares ejemplos son casos donde R^3 y R^4 son ambos cloro, o R^3 y R^4 son ambos flúor. Una alternativa adicional es una donde uno de R^3 o R^4 es cloro y el otro es flúor.

Adecuadamente R^5 es hidrógeno, flúor, cloro o bromo, y preferiblemente R^5 es hidrógeno. Un valor adicionalmente preferido para R^5 es por ejemplo, flúor.

Adecuadamente R^6 es hidrógeno, flúor, cloro o bromo. Preferiblemente R^6 es hidrógeno o flúor, y más preferiblemente aún hidrógeno.

En un aspecto preferido de la invención se proporciona un compuesto de la fórmula (IA):



(IA)

o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de ella, donde R^1 , R^2 y R^4 son tal como se definió arriba. Preferiblemente R^1 y R^2 son hidrógeno. Preferiblemente R^4 es cloro flúor.

En un adicional aspecto preferido de la invención se proporciona un compuesto de la fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de ella donde R¹, R² y R⁴ son tal como se definió arriba, R³ es trifluorometil, R⁵ es halo y R⁶ es hidrógeno. Preferiblemente R¹ y R² son hidrógeno. Preferiblemente R⁴ es cloro o flúor, especialmente cloro. Preferiblemente R⁵ es fluoro.

Compuestos preferidos de la invención incluyen cualquiera de uno de los compuestos preparados en los Ejemplos, los cuales se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

Ejemplo	R1	R2	R3	R4	R5	R6
1	H	H	CF ₃	Cl	H	H
2	H	H	F	CF ₃	H	H
3	H	H	Cl	CF ₃	H	H
4	H	H	Br	Cl	H	H
5	H	H	F	Br	H	H
6	H	H	Br	F	H	H
7	F	H	CF ₃	F	H	H
8	F	H	CF ₃	Cl	H	H
9	F	H	CF ₃	F	F	H
10	Cl	H	Cl	Cl	Cl	H
11	H	Br	CF ₃	F	H	H
12	H	Br	CF ₃	Cl	H	H
13	H	Br	Cl	CF ₃	H	H
14	H	Cl	F	CF ₃	H	H
15	H	I	F	CF ₃	H	H
16	H	CH ₃ O	CF ₃	Cl	H	H
17	H	H	CF ₃	F	Cl	H
18	H	H	CF ₃	Cl	Cl	H
19	H	H	CF ₃	Cl	H	H
20	H	H	CF ₃	Cl	Br	H
21	H	H	Cl	Cl	Br	H
22	H	H	CF ₃	Cl	F	H

x 9
10

23	H	H	Cl	Cl	F	H
24	H	H	Cl	Cl	Cl	H
25	Cl	H	CF ₃	Cl	H	H
26	Cl	H	CF ₃	Cl	Cl	H

La invención se relaciona adicionalmente con todas las formas tautoméricas de los compuestos de la fórmula (I).

También debe entenderse que algunos compuestos de la fórmula (I) pueden existir en formas solvatadas así como formas no solvatadas tales como, por ejemplo, formas hidratadas. Debe entenderse que la invención comprende todas estas formas solvatadas.

Los compuestos de la fórmula (I) son inhibidores de monocyte quimioatrayente protein-1. Adicionalmente, parecen inhibir quimiotaxis inducida de RANTES. RANTES (Regulada ante Activación, Normal T-célula Expresada y Secretada) es otra quimioquina de la misma familia de MCP-1, con un perfil biológico similar, pero que actúa a través del receptor CCR1. De acuerdo con lo anterior una ventaja adicional asociada con la presente invención es que, mediante la inhibición de actividad tanto MCP-1 como RANTES, se proporciona compuestos con propiedades particularmente útiles. Como resultado, estos compuestos pueden utilizarse para tratar enfermedades mediadas por estos agentes, en particular enfermedad inflamatoria.

Adecuadas sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la fórmula (I) incluyen sales base tales como una sal de metal alcalino por ejemplo sodio, una sal de metal alcalinotérreo por ejemplo calcio o magnesio, una sal de amina orgánica por ejemplo trietilamina, morfolina, N-metilpiperidina, N-etilpiperidina, procaina, dibencilamina, N,N-dibenciletilamina o aminoácidos por ejemplo lisina. En otro aspecto,

✓
X
10

donde el compuesto es suficientemente básico, sales adecuadas incluyen sales de adición ácida tal como metanosulfonato, fumarato, hidrocloruro, hidrobromuro, citrato, maleato y sales formadas con ácido fosfórico y sulfúrico. Puede haber más de un catión o anión dependiendo del número de funciones cargadas y la valencia de los cationes o aniones. Una sal farmacéuticamente aceptable preferida es una sal de sodio.

Varias formas de prodrogas son conocidas en el arte. Para ejemplos de dichos derivados de prodrogas, ver:

- a) Diseño de Prodrogas, editado por H. Bundgaard, (Elsevier, 1985) y Métodos en Enzimología, Vol. 42 p. 309-396, editado por K. Widder, y otros (Academic Press, 1985);
- b) Texto de Diseño y Desarrollo de Drogas, editado por Krogsgaard-Larsen y H. Bundgaard, Capítulo 5 "Diseño y Aplicación de Prodrogas", by H. Bundgaard, p. 113-191 (1991);
- c) H. Bundgaard, Revistas de Suministro de Drogas Avanzadas, 8, 1-38 (1992);
- d) H. Bundgaard, y otros, Diario de Ciencias Farmacéuticas, 77, 285 (1988); y
- e) N. Kakeya, y otros, Boletín de Química Farmacéutica, 32, 692 (1984).

Ejemplos de dichas prodrogas son ésteres penetrables en vivo de un compuesto de la invención. Un éster penetrable en vivo de un compuesto de la invención que contiene un grupo carboxi es, por ejemplo, un éster farmacéuticamente aceptable el cual es penetrado en el cuerpo humano o animal para producir un ácido padre. Adecuados ésteres aceptables farmacéuticamente para carboxi incluyen ésteres C_{1-6} alquil, por ejemplo metil o etil; ésteres C_{1-6} alcoximetil, por ejemplo ésteres metoximetil; C_{1-6}

11

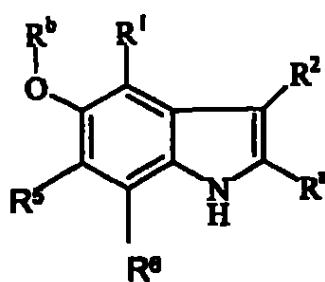
alcanoiloximetil, por ejemplo pivaloiloximetil; ésteres ftalidil; ésteres C_{3-6} cicloalcoxycarboniloxi C_{1-6} alquil, por ejemplo 1-ciclohexilcarboniloxietil; ésteres 1,3-dioxolan-2-ilmetil, por ejemplo 5-metil-1,3-dioxolan-2-ylmetil; ésteres C_{1-6} alcoxycarboniloxietil, por ejemplo 1-metoxycarboniloxietil; ésteres aminocarbonilmetil y mono- o di-N-(C_{1-6} alquil) sus versiones, por ejemplo ésteres N,N-dimetilaminocarbonilmetil y ésteres N-etilaminocarbonilmetil; y puede formarse en cualquier grupo carboxi en los compuestos de esta invención. Un éster penetrable en vivo de un compuesto de la invención que contiene un grupo hidroxil es, por ejemplo, un éster farmacéuticamente aceptable el cual es penetrado en el cuerpo humano o animal para producir el grupo padre hidroxil. Adecuados ésteres farmacéuticamente aceptables para hidroxil incluyen ésteres C_{1-6} alcanoil, por ejemplo ésteres acetil; y ésteres benzoil donde el grupo fenil puede sustituirse con aminometil o N-sustituido mono- o di- C_{1-6} alquil aminometil, por ejemplo ésteres 4-aminometilbenzoil y ésteres 4-N,N-dimetilaminometilbenzoil.

Adicionales ejemplos de dichas prodrogas son amidas penetrables en vivo de un compuesto de la invención. Ejemplos de dichas amidas penetrables en vivo incluyen una N- C_{1-6} alquilamida y una N,N-di-(C_{1-6} alquil)amida tal como N-metil, N-etil, N-propil, N,N-dimetil, N-etil-N-metil o N,N-dietilamida.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un proceso para preparar un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él cuyo proceso comprende:

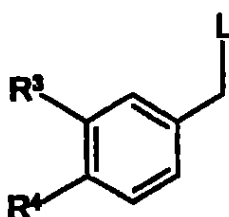
a) reaccionar compuestos de la fórmula (II):

12
 2



(II)

donde R^3 , R^2 , R^5 y R^6 son tal como se definió en relación con la fórmula (I), R^a es carboxi o una forma protegida de él, y R^b es hidrógeno o un adecuado grupo de protección hidroxí, con un compuesto de fórmula (III):



(III)

donde R^3 y R^4 son tal como se definió en relación con la fórmula (I) y L es un grupo desplazable; y posteriormente si es necesario:

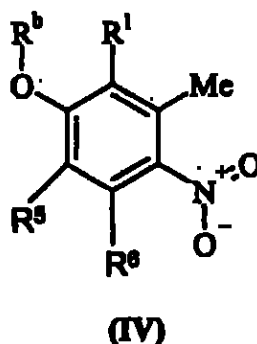
- i) convertir un compuesto de la fórmula (I) en otro compuesto de la fórmula (I);
- ii) retirar cualesquiera grupos de protección; o
- iii) formar una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él.

Adecuados valores para L son por ejemplo, un grupo halógeno o sulfonilo, por ejemplo un grupo cloro, bromo, metanosulfonilo o tolueno-4-sulfonilo.

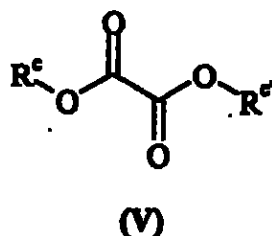
Los compuestos de la fórmula (II) y (III) se reaccionan adecuadamente conjuntamente en un solvente orgánico inerte tal como N,N-dimetilformamida, diclorometano o acetonitrilo en presencia de una base tal como hidróxido de sodio, hidruro de sodio, o carbonato de potasio. Adecuadamente la reacción se efectúa en presencia de un catalizador de transferencia de fase tal como tetra-n-butilamonio sulfato de hidrógeno. Los tiempos de reacción pueden variar dentro del rango de 1 a 6 horas preferiblemente durante 1 a 3 horas.

Moderadas temperaturas por ejemplo de 15 a 30°C, preferiblemente 20 a 25°C se emplean.

Los compuestos de la fórmula (II) pueden ser comercialmente disponibles, o pueden elaborarse mediante modificación utilizando procesos conocidos de compuestos comercialmente disponibles de la fórmula (II). En particular, pueden prepararse reaccionando un compuesto de la fórmula (IV):



donde R^1 , R^5 , R^6 y R^b son tal como se definió arriba con un compuesto de la fórmula (V)



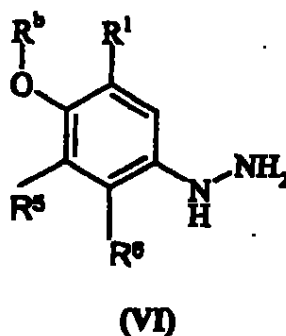
14

donde R^c y R^e se seleccionan independientemente a partir de C_{1-4} alquil.

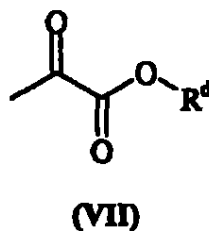
Los compuestos de la fórmula (IV) y (V) se reaccionan adecuadamente conjuntamente bajo condiciones de reacción Reissert tal como en un solvente inerte (tal como tetrahidrofurano), en presencia de una base (tal como etóxido de potasio), a un rango de temperatura de 15 a 30°C preferiblemente 20 a 25°C, durante 10 a 20 horas preferiblemente 15 a 17 horas. El compuesto resultante se aísla y disuelve en un alcohol tal como etanol y un ácido orgánico (tal como ácido acético) y un catalizador de metal de transición (tal como 0% Pd/C) y se agrega ciclohexeno. La mezcla puede entonces calentarse a una temperatura de 60 a 120°C preferiblemente a 70 a 90°C durante 15 a 25 horas preferiblemente 16 a 20 horas para dar un compuesto de la fórmula (II) donde R^a es $-CO_2R$.

R^c y R^e son adecuadamente C_{1-4} alquil, preferiblemente metil o etil.

Alternativamente, los compuestos de la fórmula (II) pueden prepararse reaccionando un compuesto de la fórmula (VI):



donde R^1 , R^5 , R^6 y R^b son tal como se definió arriba, con un compuesto de la fórmula (VII):



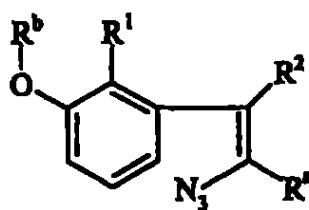
15
~~10~~

donde R^d es C_{1-4} alquil.

Adecuadamente R^d es C_{1-4} alquil, preferiblemente metil o etil.

Los compuestos de la fórmula (VI) y (VII) se reaccionan adecuadamente conjuntamente bajo condiciones de Fischer tal como con un ácido orgánico (tal como ácido acético), en un alcohol (tal como etanol), a una temperatura de 60 a 90°C, preferiblemente 75 a 85°C, durante 1 a 5 horas, preferiblemente 1 a 3 horas. El compuesto resultante se mezcla con un ácido fuerte (tal como ácido polifosfórico) y se calienta a 90 a 150°C preferiblemente 100 a 120°C, durante 0,5 a 4 horas, preferiblemente 0,5 a 2 horas para dar un compuesto de la fórmula (II) donde R^2 es hidrógeno. Entonces, si se desea, R^2 puede convertirse opcionalmente en otro valor de R^2 como se definió en la fórmula (I) utilizando técnicas conocidas en la literatura.

En una alternativa preferida, los compuestos de la fórmula (II) se obtienen mediante ciclización de un compuesto de la fórmula (VIII)

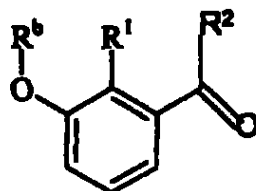


(VIII)

donde R^1 , R^a , R^b y R^2 son tal como se definió arriba.

La ciclización puede efectuarse sometiendo a reflujo el compuesto en un solvente orgánico tal como xileno. Los compuestos de la fórmula (VIII) se preparan adecuadamente reaccionando un compuesto de la fórmula (IX)

16
~~17~~



(IX)

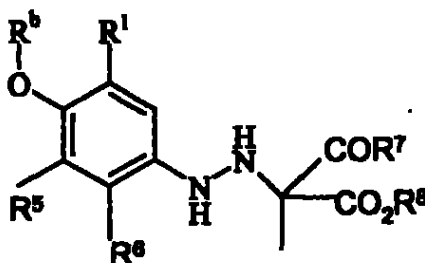
donde R^1 , R^2 y R^b son tal como se definió arriba, con un compuesto de fórmula (X)



(X)

donde R^a es tal como se definió arriba. La reacción se efectúa adecuadamente en un solvente orgánico tal como un alcohol, en particular metanol, en presencia de una base tal como alcóxido de metal alcalino, en particular metóxido de sodio. Moderadas temperaturas de desde -30 a 20°C se emplean adecuadamente.

En aún una adicional modificación, los compuestos de la fórmula (II) se preparan mediante ciclización de un compuesto de la fórmula (XI)



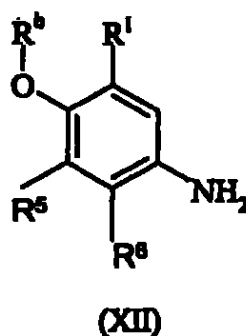
(XI)

donde R^1 y R^b son como se definió arriba, R^7 es alquil, tal como metil, y R^8 es un grupo de protección carboxi tal como alquil, en particular metil.

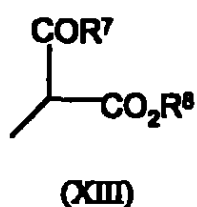
17
✓

La ciclización se efectúa adecuadamente bajo condiciones de Japp Klingemann, calentando una solución del compuesto en un solvente orgánico tal como tolueno y un ácido adecuado, tal como ácido sulfónico p-tolueno.

Los compuestos de la fórmula (XI) se preparan adecuadamente reaccionando un compuesto de la fórmula (XII)



donde R¹, R^b, R⁵ y R⁶ son como se definió arriba, con un compuesto de la fórmula (XIII)



donde R⁷ y R⁸ son como se definieron en relación con la fórmula (XI). El compuesto de la fórmula (XII) se disuelve adecuadamente en un ácido diluido tal como 1,5N HCl en presencia de un nitrito tal como nitrito de sodio a temperaturas moderadamente bajas de desde -30 a 0°C, preferiblemente -51C.

Esta solución se mezcla entonces con una solución de un compuesto de la fórmula (XIII) en un solvente orgánico tal como etanol, en presencia

de una solución de una base tal como un hidróxido de metal alcalino, por ejemplo una solución acuosa de hidróxido de sodio.

Los compuestos de la fórmula (III), (IV), (V), (VI), (VII), (IX), (X) y (XII) son conocidos o están comercialmente disponibles o son preparados mediante procesos conocidos en el arte mediante manipulación estándar de materiales comercialmente disponibles o conocidos.

Se apreciará también que en algunas de las reacciones mencionadas aquí puede ser necesario/deseable proteger cualesquier grupos sensibles en los compuestos. Las instancias donde es necesaria o deseable la protección y adecuados métodos para protección son conocidos por aquellos expertos en el arte. Consecuentemente, si los reactivos incluyen grupos tales como carboxi o hidroxi puede ser deseable proteger el grupo en algunas de las reacciones aquí mencionadas.

Un adecuado grupo de protección para un grupo hidroxi es, por ejemplo, un grupo acilo, por ejemplo un grupo alcanoil tal como acetil, un grupo aroil, por ejemplo benzoil, o un grupo arilmetil, por ejemplo bencil. Las condiciones de desprotección para los grupos de protección de arriba variarán necesariamente con la escogencia del grupo de protección. Así, por ejemplo, un grupo acilo tal como un grupo alcanoil o aroil puede retirarse, por ejemplo, mediante hidrólisis con una base adecuada tal como un hidróxido de metal alcalino, por ejemplo hidróxido de litio o sodio.

Alternativamente un grupo arilmetil tal como un grupo bencil puede retirarse, por ejemplo, mediante hidrogenación sobre un catalizador tal como paladio sobre carbono.

19
20

de una solución de una base tal como un hidróxido de metal alcalino, por ejemplo una solución acuosa de hidróxido de sodio.

Los compuestos de la fórmula (III), (IV), (V), (VI), (VII), (IX), (X) y (XII) son conocidos o están comercialmente disponibles o son preparados mediante procesos conocidos en el arte mediante manipulación estándar de materiales comercialmente disponibles o conocidos.

Se apreciará también que en algunas de las reacciones mencionadas aquí puede ser necesario/deseable proteger cualesquier grupos sensibles en los compuestos. Las instancias donde es necesaria o deseable la protección y adecuados métodos para protección son conocidos por aquellos expertos en el arte. Consecuentemente, si los reactivos incluyen grupos tales como carboxi o hidroxil puede ser deseable proteger el grupo en algunas de las reacciones aquí mencionadas.

Un adecuado grupo de protección para un grupo hidroxil es, por ejemplo, un grupo acilo, por ejemplo un grupo alcanoil tal como acetil, un grupo aroil, por ejemplo benzoil, o un grupo arilmetil, por ejemplo bencil. Las condiciones de desprotección para los grupos de protección de arriba variarán necesariamente con la escogencia del grupo de protección. Así, por ejemplo, un grupo acilo tal como un grupo alcanoil o aroil puede retirarse, por ejemplo, mediante hidrólisis con una base adecuada tal como un hidróxido de metal alcalino, por ejemplo hidróxido de litio o sodio.

Alternativamente un grupo arilmetil tal como un grupo bencil puede retirarse, por ejemplo, mediante hidrogenación sobre un catalizador tal como paladio sobre carbono.

Las composiciones de la invención pueden estar en una forma adecuada para uso oral (por ejemplo como tabletas, comprimidos, cápsulas duras o blandas, suspensiones acuosas o aceitosas, emulsiones, polvos dispersables o gránulos, jarabes o elíxires), para uso tópico (por ejemplo como cremas, ungüentos, geles, o soluciones o suspensiones acuosas o aceitosas), para administración por inhalación (por ejemplo como un polvo finamente dividido o un aerosol líquido), para administración por inhalación (por ejemplo como un polvo finamente dividido) o para administración parenteral (por ejemplo como una solución estéril acuosa o aceitosa para dosificación intravenosa, subcutánea, intramuscular o dosificación intramuscular o como un supositorio para dosificación rectal).

Las composiciones de la invención pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales utilizando excipientes farmacéuticos convencionales, bien conocidos en el arte. Consecuentemente, las composiciones pretendidas para uso oral pueden contener, por ejemplo, uno o más agentes colorantes, edulcorantes, saborizantes y/o preservativos.

Adecuados excipientes farmacéuticamente aceptables para una formulación en tabletas incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes tales como lactosa, carbonato de sodio, fosfato de calcio o carbonato de calcio, agentes de granulación y desintegración tales como almidón de maíz o ácido algínico; agentes de enlace tales como almidón, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco; agentes preservativos tales como etil o propil p-hidroxibenzoato, y anti oxidantes, tales como ácido ascórbico. Las formulaciones en tableta pueden ser no revestidas o revestidas ya sea para modificar su desintegración y la

21
✓

subsecuente absorción del ingrediente activo dentro del tracto gastrointestinal, o para mejorar su estabilidad y/o apariencia, en cualquier caso, utilizando agentes de revestimiento convencionales y procedimientos bien conocidos en el arte.

Las composiciones para uso oral pueden estar en forma de cápsulas de gelatina dura donde el ingrediente activo se mezcla con un diluyente inerte sólido, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio, o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda donde el ingrediente activo se mezcla con agua o un aceite tal como aceite de maní, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen generalmente el ingrediente activo en una forma finamente en polvo conjuntamente con uno o más agentes de suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia; agentes de dispersión o humectantes tales como lecitina o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos (por ejemplo estearato de polioxietileno), o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de sorbitol polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de sorbitol polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo

22
23

monooleato de sorbitan polietileno. Las suspensiones acuosas pueden también contener uno o más preservativos (tales como etil o propil p-hidroxibenzoato, anti oxidantes (tales como ácido ascórbico), agentes colorantes, agentes saborizantes, y/o agentes edulcorantes (tales como sacarosa, sacarina o aspartame).

Las suspensiones aceitosas pueden formularse suspendiendo el ingrediente activo en un aceite vegetal (tal como aceite de arracacha, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco) o en un aceite mineral (tal como parafina líquida). Las suspensiones aceitosas pueden también contener un agente espesante tal como cera de abejas, parafina dura o alcohol cetil. Los agentes edulcorantes tales como aquellos establecidos arriba, y los agentes saborizantes pueden agregarse para proporcionar una preparación oral al paladar. Estas composiciones pueden preservarse mediante la adición de un anti oxidante tal como ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua contienen generalmente el ingrediente activo conjuntamente con un agente de dispersión o humectante, un agente de dispersión y uno o más preservativos. Adecuados agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión se ejemplifican mediante aquellos ya mencionados arriba. Adicionales excipientes tales como agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes pueden estar también presentes.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden también estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase aceitosa puede ser un aceite vegetal, tal como aceite de oliva o aceite de arracacha, o un aceite mineral, tal como por ejemplo parafina líquida o una mezcla de

cualquiera de éstos. Adecuados agentes emulsificantes pueden ser, por ejemplo, gomas que se presentan naturalmente tales como goma acacia o goma tragacanto; fosfátidos que se presentan naturalmente tales como frijol de soya, lecitina, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol (por ejemplo monooleato de sorbitan) y productos de condensación de los dichos ésteres parciales con óxido de etileno tal como monooleato de sorbitan de polioxietileno. Las emulsiones pueden también contener agentes edulcorantes, saborizantes y preservativos.

Los jarabes y elixires pueden formularse con agentes edulcorantes tales como glicerol, propilenglicol, sorbitol, aspartame o sacarosa, y pueden también contener un agente desmulcificante, preservativo, saborizante y/o colorante. Las composiciones farmacéuticas pueden también estar en forma de una suspensión estéril inyectable acuosa o aceitosa, la cual puede formularse de acuerdo con los procedimientos conocidos utilizando uno o más de los apropiados agentes de dispersión humectantes y agentes de suspensión, los cuales se han mencionado arriba. Una preparación estéril inyectable puede también ser una solución o suspensión estéril inyectable en un diluyente o solvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo una solución en 1,3-butanodiol.

Formulaciones en supositorio pueden prepararse mezclando el ingrediente activo con un adecuado excipiente no irritante el cual es sólido a temperaturas ordinarias pero líquido a la temperatura rectal y se fundirá consecuentemente en el recto para liberar la droga. Adecuados excipientes incluyen, por ejemplo, mantequilla de maní y polietilenglicoles.

Formulaciones tópicas, tales como cremas, ungüentos, geles y soluciones o suspensiones acuosas o aceitosas, pueden obtenerse generalmente formulando un ingrediente activo con un vehículo o diluyente convencional, tópicamente aceptable, utilizando procedimiento convencional bien conocido en el arte.

Las composiciones para administración por insuflación pueden estar en forma de un polvo finamente dividido que contiene partículas de un diámetro promedio de, por ejemplo, $30\ \mu$ o mucho menos, el polvo mismo que comprende ya sea ingrediente activo solo o diluido con uno o más portadores fisiológicamente aceptables tales como lactosa. El polvo para insuflación se retiene entonces convenientemente en una cápsula que contiene, por ejemplo, 1 a 50 mg de ingrediente activo para uso con un dispositivo turbo inhalador, tal como se utiliza para insuflación del agente conocido cromoglicato de sodio.

Las composiciones para administración por inhalación pueden estar en forma de un aerosol presurizado convencional colocado para dispensar el ingrediente activo ya sea como un aerosol que contiene pequeñas gotas líquidas o sólidas finamente divididas. Los propulsores de aerosol convencionales tales como hidrocarburos volátiles fluorizados o hidrocarburos pueden utilizarse y el dispositivo en aerosol se coloca convenientemente para suministrar una cantidad medida de ingrediente activo.

Para adicional información sobre la Formulación el lector debe referirse al Capítulo 25.2 en el Volumen 5 de Química Medicinal Comprehensive (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990.

22/ 25
X/6

La cantidad de ingrediente activo que se combina con uno o más excipientes para producir una única forma de dosificación variará necesariamente dependiendo del huésped tratado y la ruta particular de administración. Por ejemplo, una formulación pretendida para administración oral a humanos contendrá generalmente, por ejemplo, desde 0,5 mg a 2 g de agente activo compuesto con una cantidad apropiada y conveniente de excipientes que pueden variar desde alrededor de 5 hasta alrededor de 98 por ciento en peso de la composición total. Las formas unitarias de dosificación contendrán generalmente alrededor de 1 mg hasta alrededor de 500 mg de un ingrediente activo. Para adicional información sobre las Rutas de Administración y Regímenes de Dosificación el lector debe referirse al Capítulo 25.3 en el Volumen 5 de Química Medicinal Comprehensiva (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990.

El tamaño de la dosis para propósitos terapéuticos o profilácticos de un compuesto de la fórmula I variarán naturalmente de acuerdo con la naturaleza y severidad de las condiciones, la edad y el sexo del animal o paciente y la ruta de administración, de acuerdo con principios bien conocidos de medicina. Como se mencionó arriba, los compuestos de la fórmula I son útiles en el tratamiento de enfermedades o condiciones médicas que se deben solas o en parte a los efectos de MCP-1 y/o RANTES, por ejemplo, artritis reumatoide.

Utilizando un compuesto de la fórmula I con propósitos terapéuticos o profilácticos se administrará generalmente en forma tal que una dosis diaria en el rango, por ejemplo, de 0,5 mg a 75 mg por kg de peso corporal se recibe, dada si se requiere en dosis divididas. En general menores dosis se administrarán cuando se emplea una ruta parenteral.

26
K

Consecuentemente, por ejemplo, para administración intravenosa, una dosis en el rango, por ejemplo, de 0,5 mg a 30 mg por kg de peso corporal se utilizará generalmente. Similarmente, para administración por inhalación, una dosis en el rango de, por ejemplo, 0,5 mg a 25 mg por kg de peso corporal se utilizará. La administración oral se prefiere sin embargo.

De acuerdo con un adicional aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de ella, como se define aquí anteriormente para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. Convenientemente, la invención proporciona un método de tratar enfermedades inflamatorias administrando un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga o una composición farmacéutica de ella, como se describe arriba.

Una adicional característica de la presente invención es un compuesto de la fórmula (I) y sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él, para uso como un medicamento.

Convenientemente éste es un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él, para uso como un medicamento para antagonizar un efecto mediado de MCP-1 (y/o un efecto mediado de RANTES en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.

Consecuentemente de acuerdo con un adicional aspecto de la invención se proporciona el uso de un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él, en la fabricación de un

medicamento para uso en antagonizar un efecto mediado de MCP-1 (y/o un efecto mediado de RANTES) en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.

De acuerdo con una adicional característica de la invención se proporciona un método de antagonizar un efecto mediado de MCP-1 en un animal de sangre caliente, tal como un ser humano, en necesidad de dicho tratamiento el cual comprende administrar a dicho animal una cantidad efectiva de un compuesto de la fórmula (1) o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él, como se define aquí anteriormente.

Prueba Biológica.

Los siguientes métodos de prueba biológica, datos y Ejemplos sirven para ilustrar la presente invención.

Abreviaturas:

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, USA.
BCA	ácido bicinchrónico, (utilizado, con sulfato de cobre, para probar proteína)
BSA	Albúmina de Suero Bovino
DMEM	Medio Dulbecco modificado Eagle
EGTA	Etilenobis(oxietilenonitrilo) ácido tetracético
FCS	Suero de oveja fetal
HEPES	(N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfónico])
HBSS	Solución de Sal Balanceada de Hank
hMCP-1	Monocyte Quimioatrayente Protein-1 Humana
PBS	Salina de fosfato amortiguada
PCR	Reacción en cadena de polimerasa

28
✓

AMPLITAQ®, disponible en Perkin-Elmer Cetus, se utiliza como la fuente de polimerasa ADN termoestable.

El amortiguador de enlace es 50 mM HEPES, 1 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 0,5% de suero fetal de oveja, ajustado a pH 7,2 con 1 M NaOH.

Aminoácidos no esenciales (100X concentrado) es: L-Alanine, 890 mg/l; L-Asparagine, 1 320 mg/l; L-ácido aspártico, 1 330 mg/l; L-ácido glutámico, 1 470 mg/l; Glicina, 750 mg/l; L-Proline, 1 150 mg/l y; L-Serine, 1 050 mg/l.

Suplemento de Hipoxantine y Thimidine (50x concentrado) es: hipoxanthine, 680 mg/l y; thimidine, 194 mg/l.

Penicillin-Streptomycin es: Penicilina G (sal de sodio); 5 000 unidades/ml; Sulfato de estreptomicina, 5 000 $\mu\text{g/ml}$.

Células de Línea de células monocítica humana THP-1 están disponibles en ATCC, número de acceso ATCC TEB-202.

Solución de Sal Balanceada Hank (HBSS) se obtuvo de Gibco; ver Proc. Soc. Exp. Biol Med, 1949, 71, 196.

El medio de cultivo de células sintético, RPMI 1640 se obtuvo de Gibco; contiene sales inorgánicas [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/l; KCl 400 mg/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 Mg/l; NaCl 6000mg/l; NaHCO_3 2000 mg/l & Na_2HPO_4 (anhyd) 800 mg/l], D-Glucose 2000 mg/l, glutatona reducida 1 mg/l, aminoácidos y vitaminas.

FURA-2/AM es 1-[2-(5-carboxioxazol-2-il)-6-aminobenzofuran-5-oxi]-2-(2'-amino-5'-metilfenoxi)-etano-N,N,N',N'-ácido tetracético penta acetoximetil éster y se obtuvo de Molecular Probes, Eugene, Oregon, Estados Unidos.

El Amortiguador de Sedimentación de Sangre contiene 8,5g/l NaCl y 10g/l hidroxietil celulosa.

El Amortiguador de Lisis es 0, 15 M NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 1mM EDTA

29

Amortiguador de Enlace Total de Células es 50 mM HEPES, 1 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 0,5% BSA, 0,01 % NaN_3 , ajustado a pH 7,2 con 1M NaOH.

El amortiguador de lavado es 50mM HEPES. 1MM CaCl_2 , 5mM MgCl_2 , 0,5% inactivado por calor FCS, 0.5MNaCl ajustado a pH 7,2 con 1M NAOH.

Los procedimientos generales de biología molecular puede seguirse a partir de cualquiera de los métodos descritos en "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Segunda Edición, Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

i) Clonación y expresión de receptor HMCP- I

El receptor MCP- 1 B (CCR2B) CDNA se clonó mediante PCR de TBP-1 célula RNA utilizando adecuados precursores oligonucleótidos basados en las secuencias publicadas de receptor MCP-I (Charo y otros, 1994, Proc. NatL Acad. Sci. Estados Unidos, 91, 2752). Los productos PCR resultantes se clonaron en vector PCR-IITM (InVitrogen, San Diego, CA.). Error libre CCR2B cADN se subclonó como un fragmento Hind III-Not I en el vector de expresión eucariótico pCDNA3 (InVitrogen) para generar pCDNA3/CC-CKR2A y pCDNA3/CCR2B respectivamente.

pCDNA3/CCR2B DNA lineada se transfectó en células CHO-KI mediante precipitación de fosfato de calcio (Wigler y otros, 1979, Cell, 16, 777). Las células transfectadas se seleccionaron mediante la adición de Sulfato de geneticina (G418, Gibco BR-L) a 1 mg/ml, 24 horas después de que las células han sido transfectadas. La preparación de RNA y manchado Nortefio se llevó a cabo como se describe previamente

20
45

(Needham y otros, 1995, Prot. Express. Purific., 6, 134). CHO-K1 clone 7 (CHO-CCR2B) se identificó como el mayor expresor receptor MCP-1 B.

ii) Preparación de fragmentos de membrana

Células CHO-CCR2B crecieron en DMEM suplementado con 10% de suero fetal de oveja, 2mM glutamina, 1x Aminoácidos No Esenciales, 1x Hipoxantine y Tymidine

Suplemento y Penicillin-Streptomycin (a 50 µg de estreptomicina/ml, Gibco BRL) Fragmentos de Membrana se prepararon utilizando métodos de células de lisis/centrifugación diferencial como se describe previamente (Siciliano y otros, 1990, J Biol Chem., 265, 19658). La concentración de proteínas se estimó mediante ensayo de proteína BCA (Pierce, Rockford, Illinois) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

iii) Ensayo

¹²⁵I MCP-1 se preparó utilizando la conjugación de Bolton y Hunter (Bolton y otros, 1973, Biochem. J, 133, 529; Amersham International plc]. Los ensayos de enlace de equilibrio se llevaron a cabo utilizando el método de Ernst y otros, 1994, J Immunol, 152, 3541. Brevemente, cantidades variables de ¹²⁵I-etiquetado MCP- 1 se agregaron a 7 µg de membranas purificadas de células CHO-CCR2B en 100 µl de Amortiguador de Enlace. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente las mezclas de la reacción de enlace se filtraron y lavaron 5 veces a través de un lavador de placa (Brandel MLR-96T Cell Harvester) utilizando Amortiguador de Enlace frío con hielo. Matrices de filtro (Brandel GF/B) se remojaron previamente durante 60 minutos en 0,3% de

31

polietilenimina antes del uso. Después de la filtración los filtros individuales se separaron en tubos de 3,5 ml (Sarstedt No. 55.484) y unidos. ^{125}I -etiquetado MCP-1 se determinó (LKB 1277 Gammamaster). Se realizaron estudios de competición en frío como arriba utilizando 100 pM ^{125}I -etiquetado MCP-1 en presencia de variables concentraciones de MCP-1 no etiquetado. Enlace no específico se determinó mediante la inclusión de un exceso molar de 200 pliegues de MCP-1 no etiquetado en la reacción.

Los estudios de enlace de ligando con fragmentos de membrana preparados a partir de células CHO-CCR2B mostraron que el receptor CCR2B estaba presente a una concentración de 0,2 p moles/mg de proteína de membrana y unión MCP-1 selectivamente y con alta afinidad ($\text{IC}_{50} = 110 \text{ pM}$, $K_d = 120 \text{ pM}$). La unión a estas membranas era completamente reversible y alcanzó el equilibrio después de 45 minutos a temperatura ambiente, y hubo una relación lineal entre el enlace MCP-1 y la concentración de membranas de células CHO-CCR2B cuando se utiliza MCP-1 a concentraciones entre 100 pM y 500 pM.

Los compuestos de prueba disueltos en DMSO (5 μl) se probaron en competición con 100 pM etiquetado MCP-1 en un rango de concentración (0,01-50 μM) en duplicado utilizando curvas de respuesta de dosis de ocho puntos y concentraciones IC_{50} se calcularon.

Los compuestos probados de la presente invención tuvieron valores IC_{50} de 50 μM o menos en el ensayo de enlace de receptor hMCP-1 descrito aquí.

b) Flujo de MCP-1 mediado de calcio en células THP-1

La línea de células monocítica humana THP-1 creció en un medio de cultivo de células sintético RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal de oveja, 6mM glutarnine y Penicillin-Streptomycin (a 50 µg estreptomicina/ml, Gibco BRL). Las células THP-1 se lavaron en HBSS (lacking Ca^{2+} y Mg^{2+}) + 1 mg/ml BSA y resuspendieron en el mismo amortiguador a una densidad de 3×10^6 células/ml. Las células se cargaron entonces con 1 mM FURA-2/AM durante 30 minutos a 37°C, se lavaron dos veces en RBSS, y resuspendieron a 3×10^6 células/ml. La suspensión de células TBP-1 (0,9 ml) se agregó a una cubeta de 5 ml desechable que contiene una barra agitadora magnética y 2,1 ml de HBSS calentado previamente (37°C) que contiene 1 mg/ml BSA, 1 MM MgCl_2 y 2 mM CaCl_2 . La cubeta se colocó en un espectofotómetro de fluorescencia (Perkin Elmer, Norwalk, CT) y se incubó previamente durante 4 minutos a 37°C con agitación. La fluorescencia se registró durante 70 segundos y las células se estimularon mediante adición de HMCP- 1 a la cubeta después de 10 segundos. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se midió mediante excitación a 340 nm y 380 nm alternativamente y subsecuente medición de la intensidad de la emisión de fluorescencia a 510 nm. La relación de las intensidades de la luz fluorescente emitida después de la excitación a 340 nm y 380 nm, (R), se calculó y distribuyó para dar y estimar el citoplásmico $[\text{Ca}^{2+}]$ de acuerdo con la ecuación:-

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \left(\frac{Sf2/Sb2}{Sf2/Sb2} \right)$$

donde el K_d para complejo FURA-2 Ca^{2+} a 37°C se tomó como 224nm.

$R_{\max}$, es la máxima relación de fluorescencia determinada después de la adición de 10mM Ionomycin, $R_{\min}$ es la relación mínima determinada por la subsecuente adición de una solución libre de Ca^{2+} que contiene 5 mM EGTA, y Sf2/Sb2 es la relación de los valores de fluorescencia a 380 nm de excitación determinada a $R_{\min}$ y $R_{\max}$, respectivamente.

donde el K_d para complejo FURA-2Ca²⁺ a 37°C se tomó como 224nm.

R_{max} es la máxima relación de fluorescencia determinada después de la adición de 10mM Ionomycin, R_{min} es la relación mínima determinada por la subsecuente adición de una solución libre de Ca²⁺ que contiene 5 mM EGTA, y Sf2/Sb2 es la relación de los valores de fluorescencia a 380 nm de excitación determinada a R_{min} y R_{max} , respectivamente.

La estimulación de células THP-1 con hMCP-1 induce una rápida, elevación transiente en [Ca²⁺]_i en una manera específica y dependiente de la dosis. Las curvas de respuesta de dosis indicaron un EC₅₀ aproximado de 2 nm. Los compuestos de prueba disueltos en DMSO (10μl) se probaron para inhibición de liberación de calcio agregándolas a la suspensión de células 10 segundos antes de la adición de ligando y midiendo la reducción en la elevación transiente en [Ca²⁺]_i. Los compuestos de prueba también se probaron en cuanto a falta de actividad agonista mediante adición en lugar de hMCP-1.

c) quimiotaxis mediada hMCP-1 y RANTES.

Los ensayos in vitro de quimiotaxis se llevaron a cabo utilizando línea RHP-1 de células monocíticas humanas. La migración de células a través de membranas de policarbonato se midió enumerando aquellas que pasan a través ya sea directamente por conteo Coulter o indirectamente mediante el uso de un ensayo de viabilidad colorimétrico midiendo la penetración de una sal de tetrazolo mediante la cadena respiratoria mitocondrial (Scudiero D.A. y otros 1988, Cáncer Res., 48, 4827-4833).

Los quimioatrayentes se introdujeron dentro de una placa de 96 orificios microtitulada que forma el orificio inferior de una cámara de quimiotaxis ajustada con una membrana de filtro de estructura de adhesivo

de policarbonato libre de PVP de 5 μm de tamaño de poros (serie NeuroProbe MB, Cabin John, MD 20818, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El quimioatrayente se diluyó como fue apropiado en un medio de cultivo sintético de células, RPMI 1640 (Gibco) o suplementado con 2 mM glutamina y 0.5% BSA, o alternativamente con HBSS con Ca^{2+} y Mg^{2+} sin Fenol Rojo (Gibco) más 0,1% BSA. Cada dilución se desgasificó bajo vacío durante 30 minutos y se colocó (400 μl) en los orificios más inferiores de la cámara y THP-1 células (5×10^5 en 100 μl RPMI 1640 + 0,5%BSA) se incubaron en cada orificio de la cámara superior. Para la inhibición de la quimiotaxis el quimioatrayente se mantuvo a una concentración constante submáxima determinada previamente (1 nM MCP-1) y se agregó al orificio inferior conjuntamente con los compuestos de prueba disueltos en DMSO (concentración final de DMSO < 0.05% v/v) a concentraciones variables. La cámara se incubó durante 2 h a 37°C bajo 5 % CO_2 . El medio se retiró de los orificios superiores los cuales se lavaron entonces con 200 μl de salina fisiológica antes de abrir la cámara, enjuagando en seco la superficie de la membrana y centrifugando la placa de 96 orificios a 600 g durante 5 minutos para cosechar las células. El sobrenadante (150 μl) se aspiró y 10 μl de reactivo de proliferación de células, WST-1, {4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-fenil disulfonato} más un reactivo de acoplamiento de electrones (Boehringer Mannheim, Cat.no. 1644 807) se agregó nuevamente a los orificios. La placa se incubó a 37°C durante 3 h y la absorbancia del producto soluble formazan se leyó sobre un lector de placa de microtítulo a 450 nm. Los datos se entraron en una hoja de amplitud, se corrigieron para cualquier migración al azar en ausencia de quimioatrayente y los valores promedio de absorbancia, error estándar de la media, y pruebas de significación se calcularon. hMCP-1 indujo la

35
27
X
?

concentración dependiente de migración de células con una respuesta bifásica característica, máxima 0,5 a 1,0 nm.

En una forma alternativa del anterior ensayo, las células atraídas de fluorescencia pueden utilizarse con el fin de ayudar en la detección de punto final. En este caso, las células THP-1 células utilizadas son atraídas en fluorescencia mediante incubación in presencia de 5mM de calceína AM (Glycine, N,N'-[[3',6'-bis(acetyloxy)-3-oxospiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthene]-2',7'-diyl]bis(metileno)] bis[N-[2-[(acetiloxi)metoxi]-2-oxoetil]]-bis[(acetiloxi)metil] éster; Sondas Moleculares) durante 45 minutos en la oscuridad. Las células se cosechan mediante centrifugación y se resuspenden en HBSS (sin fenol Rojo) con Ca^{2+} , Mg^{2+} y 0.1% BSA. 50 μl (2×10^5 células) de la suspensión de células se colocan sobre el filtro encima de cada orificio y, como arriba, la unidad se incuba a 37°C durante 2 horas bajo 5% CO_2 . Al final de la incubación, las células se lavan fuera de la cara superior del filtro con salina amortiguada de fosfato, el filtro se retira de la placa y el número de células atraídas ya sea al lado inferior del filtro o el orificios inferior estimado leyendo la fluorescencia a 485 nm de excitación, 538 nm de emisión de longitudes de onda (f_{max} , Dispositivos Moleculares). Los datos se entraron en una hoja de amplitud, se corrigieron para cualquier migración al azar en ausencia de quimioatrayente y los valores promedios de fluorescencia, error estándar de la media, porcentaje de inhibición e IC_{50} de los compuestos bajo prueba y pruebas de significación se pueden calcular. Adicionalmente a quimiotaxis inducida por MCP-1, esta forma alternativa del ensayo se utilizó también para medir la inhibición de quimiotaxis inducida por RANTES (2nM).

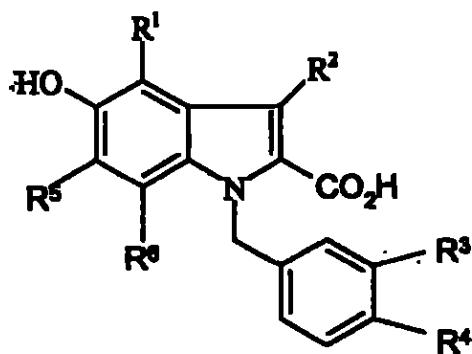
Se folia nuevamente a partir
de esta hoja por estar esta
numerada como folio 43

Ag

27
36
27

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula (I):



(I)

donde:

R¹ es hidrógeno, halo o metoxi;

R² es hidrógeno, halo, metil, etil o metoxi;

R³ es un grupo halo o un grupo trifluorometil;

R⁴ es un grupo halo o un grupo trifluorometil;

R⁵ es hidrógeno o halo;

R⁶ es hidrógeno o halo;

teniendo en cuenta que cuando R⁵ y R⁶ son ambos hidrógeno, y uno de R³ o R⁴ es cloro o flúor, entonces el otro no es cloro o flúor, o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde en la fórmula (1):

R¹ es hidrógeno, fluoro o cloro;

R² es hidrógeno, cloro, bromo, iodo o metoxi;

R³ es flúor, cloro, bromo, iodo;

R⁴ es trifluorometil;

R⁵ y R⁶ son hidrógeno.

37/28

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde en la fórmula (I):

R^1 es hidrógeno, fluoro o cloro;

R^2 es hidrógeno, cloro, bromo, iodo o metoxi;

R^3 es trifluorometil;

R^4 es flúor, cloro, bromo o iodo;

R^5 y R^6 are hidrógeno.

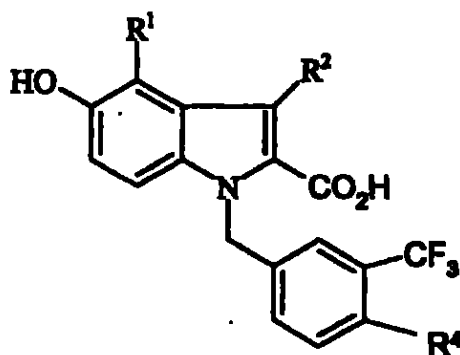
4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde en la fórmula (I):

R^1 es hidrógeno, fluoro o cloro;

R^2 es hidrógeno, cloro, bromo, iodo o metoxi;

R^3 y R^4 son ambos halo, especialmente flúor, cloro o bromo, o uno de R^3 y R^4 es cloro y el otro de R^3 y R^4 es fluoro; uno o ambos de R^5 y R^6 es halo.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 el cual es un compuesto de la fórmula (IA):



(IA)

38
39
40

donde R^1 , R^2 y R^4 son como se definió en la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 el cual es cualquiera de los siguientes:

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-fluoro-4-trifluorometilbencil)-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-cloro-4-trifluorometilbencil)-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-bromo-4-clorobencil)-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-fluoro-4-bromobencil)-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-bromo-4-fluorobencil)-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-trifluorometil-4-fluorobencil)-4-fluoro-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-4-fluoro-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-trifluorometil-4-fluorobencil)-4,6-difluoro-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

N-(3, 4-clorobencil)-4,6-dicloro-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-trifluorometil-4-fluorobencil)-3-bromo-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-3-bromo-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-cloro-4-trifluorometilbencil)-3-bromo-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-fluoro-4-trifluorometilbencil)-3-cloro-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

39 40
27

N-(3-fluoro-4-trifluorometilbencil)-3-iodo-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-trifluorometil-clorobencil)-3-metoxi-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-trifluorometil-4-fluorobencil)-5-hidroxi-6-cloroindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-hidroxi-6-cloroindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-hidroxi-7-fluoroindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-hidroxi-6-bromoindole-2-ácido carboxílico;

NN-(3,4-diclorobencil)-5-hidroxi-6-bromoindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-hidroxi-6-fluoroindole-2-ácido carboxílico;

N-(3,4-diclorobencil)-5-hidroxi-6-fluoroindole-2-ácido carboxílico;

N-(3,4-diclorobencil)-5-hidroxi-6-cloroindole-2-ácido carboxílico;

N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-4-cloro-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

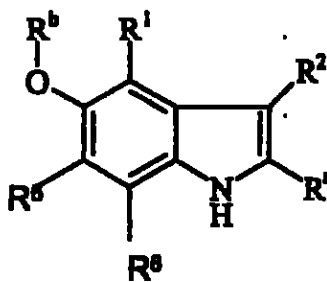
N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-4,6-dicloro-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico;

NN-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-acetoxyindole-2-ácido carboxílico (prodroga de N-(3-trifluorometil-4-clorobencil)-5-hidroxiindole-2-ácido carboxílico).

7. Un proceso para preparar un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él, cuyo proceso comprende:

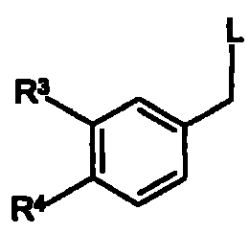
(a) reaccionar un compuesto de la fórmula (II):

40 AT
~~10~~



(II)

donde R¹, R², R⁵ y R⁶ son tal como se definió en la reivindicación 1, R³ es carboxi o una forma protegida de él, y kb es hidrógeno o un adecuado grupo de protección hidroxí, con a compuesto de la fórmula (III):



(III)

donde R³ y R⁴ son tal como se definió en la reivindicación 1 y L es un grupo desplazable;

y opcionalmente posteriormente:

- (b) (i) convertir un compuesto resultante de la fórmula (I) en otro compuesto de la fórmula (I);
- (ii) retirar cualesquiera grupos de protección; o
- (iii) formar una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él.

41 42
X

8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él, para utilización en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él, para uso como medicamento.

10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 9, que es para uso como un medicamento para antagonizar un efecto mediado de MCP-1 en un animal de sangre caliente.

11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de ella, en asociación con un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

12. El uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él, en la fabricación de un medicamento para uso en antagonizar un efecto mediado de MCP-1 en un animal de sangre caliente.

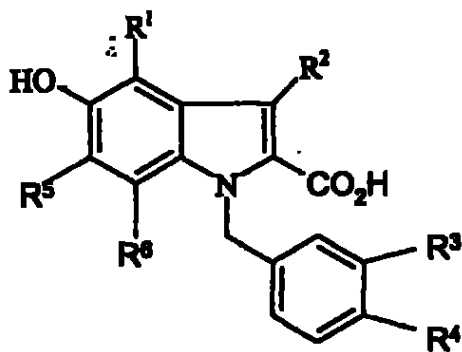
13. Un método de tratar enfermedades inflamatorias que comprende administrar a un huésped en necesidad de dicho tratamiento un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11.

42-13
X

14. Un método de antagonizar un efecto mediado por MCP-1 en un animal de sangre caliente en necesidad de dicho tratamiento que comprende administrar a dicho animal una cantidad efectiva de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11.

EXTRACTO

Un compuesto de la fórmula (I):



(I)

donde:

R¹ es hidrógeno, halo o metoxi;

R² es hidrógeno, halo, metil, etil o metoxi;

R³ es un grupo halo o un grupo trifluorometil;

R⁴ es un grupo halo o un grupo trifluorometil;

R⁵ es hidrógeno o halo;

R⁶ es hidrógeno o halo;

teniendo en cuenta que cuando R⁵ y R⁶ son ambos hidrógeno, y uno de R³ o R⁴ es cloro o flúor, entonces el otro no es cloro o flúor, o una sal farmacéuticamente aceptable o prodroga de él.

Estos compuestos tienen útil actividad para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, específicamente en antagonizar un efecto mediado de MCP-1 en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.

143
AA'
↓
doble
?

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION []

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- Descripción de la invención
- Dibujos de ser estos pertinentes
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas

MODELO DE UTILIDAD []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- Comprobante de pago de las tasas establecidas

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- Representación gráfica del esquema de trazado
- Comprobante de pago de las tasas establecidas

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha

Superintendencia de Industria y Comercio
Calle 14 No. 27-40 Piso 5 y 10
Bogotá D.C. - Colombia
Teléfono: 334 12 21-23-4
Fax: 334 31 25 e-mail: info@dic.gov.co

Carrera 19 No. 27-40 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-23-4
Fax: 334 31 25 e-mail: info@dic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia



45 #b

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

2020
Bogotá, D.C.

Doctor
RAMIRO CASTRO DUQUE
Apoderado

REFERENCIA:	Radicación No.	01-2379
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	1180
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe modificar el título, debido a que debe definir en forma breve y precisa el objeto de la invención y estar acorde con la descripción y las reivindicaciones.
- Debe allegar el poder otorgado al abogado que aparece en la solicitud como apoderado, con el lleno de los requisitos exigidos en el Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.
- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 26-k, Dec 486/2000).
- Debe indicarse el lugar de constitución de la sociedad solicitante (Art. 27-c, D 486/00).
- El interesado debe informar la dirección del solicitante, debido a que en el petitorio no aparece la misma. (Art. 27-b, D 486/00).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

19 APR. 2001

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10

202027/202022

Conmutador: 382 0840

Fax: 382 2695

E-mail: Info@sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia