

115. 241

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



PCT



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INV

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-003796- -00000-0000

Fecha: 2011-01-14 17:07:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Ira. 11 PATENTEIYII Eje: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 89

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No.

11-3796

54. TITULO

DERIVADOS DE 5-(4-METANOSULFONIL-FENIL)-TIAZOL PARA EL
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS AGUDAS Y CRÓNICAS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

FAES FARMA, S.A.

DOMICILIO

VIZCAYA, ESPAÑA

74. APODERADO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. BOGOTÁ, D.C.

16-01-2011

(FORMA P 10)

Oficina de Comunicaciones

AS: 115.541

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-003796-00000-0000

Fecha: 2011-01-14 17:07:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 89

ción

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE

Nombre: FAES FARMA, S.A.

Dirección: Máximo Aguirre, 14 E-48940

Lamiako (Leioa) – Vizcaya, España.

Nacionalidad o Domicilio: España

Lugar de Constitución: España

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro

Cual
Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Calle 70A #4 – 41, Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200

Fax: 742-2200

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro

Cual
Número

80.410.337 TP 57492

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de radicación (del poder). _____

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Víctor RUBIO ROYO, Antonio DE LA HERA MARTÍNEZ, Melchor ÁLVAREZ DE MON SOTO, Ana MUÑOZ MUÑOZ.

Dirección: Faes Farma, S.A. Máximo Aguirre, 14 E-48940 Lamiako (Leioa) – Vizcaya, España (respectivamente).

Nacionalidad o Domicilio: España (respectivamente).

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/EP2009/057324

Fecha

15.06.2009

Publicación Internacional No

WO 2009/153226 A1

Fecha

23.12.2009

6 Título (54): DERIVADOS DE 5-(4-METANOSULFONIL-FENIL)-TIAZOL PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS AGUDAS Y CRÓNICAS

7 Clasificación Internacional (51):

8 Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

EP

16.06.2008

08380177.9

US

16.06.2008

12/139,661

9 Comprobante de pago No. 10-100.275; 10-100.363; 10-100.336; 10-91.386; 10-105.818; 10-110.774; 10-110.775; 11-2.259; 10-100.316; 10-100.317

Fecha 14-01-2011

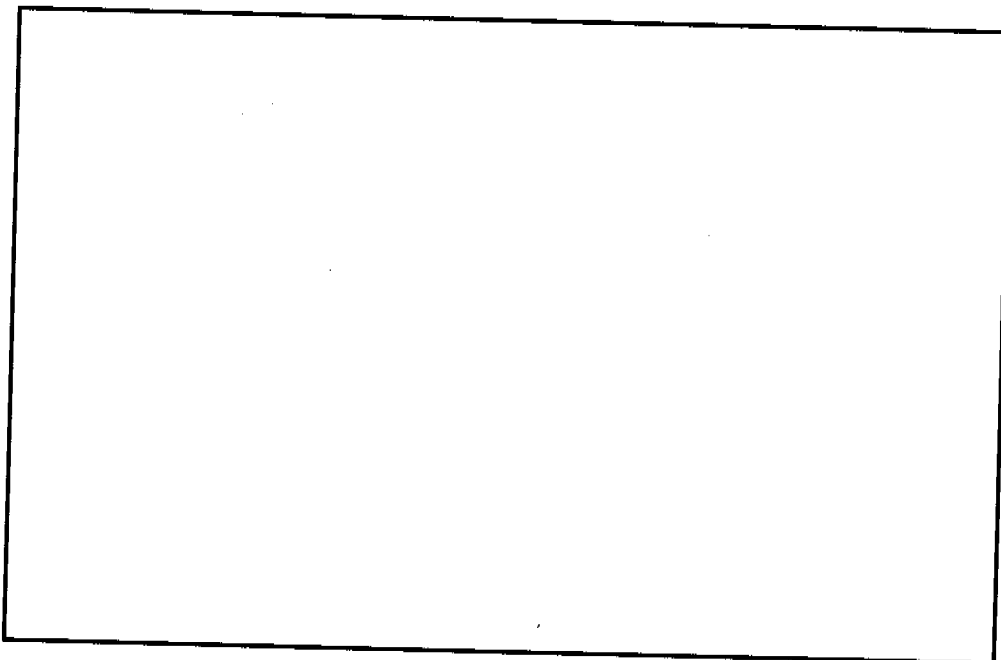
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 571.000
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no estén inscritas en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☐ Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada.**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. **Fotocopia autenticada.**
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional, bajo el Art. 34.
- ☒ Otros: - Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de Reivindicaciones adicionales \$ 216.000 (8*\$27.000).

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUÁN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA:

[Firma manuscrita]
C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

115591 7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 002259

Bogotá D.C., 12 de 2011 - 16:41:47

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

***** Soporte del Pago *****

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	382749426	11/01/2011	1.138.400.00

***** Conceptos Pagados *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	7.000.00	7.000.00
				\$7.000.00

SON: **SIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-003796- -00000-0000

Fecha: 2011-01-14 17:07:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASLACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 89

115541 4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 100,316
FECHA : NOVIEMBRE 25 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-003796- -00000-0000

Fecha: 2011-01-14 17:07:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eje: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 89

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	328790496	25/11/2010	58,308,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
99		OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	5,000.00
		TOTAL :	\$ 5,000.00

SDN: CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

115541 ✓

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 100,317
FECHA : NOVIEMBRE 25 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-003796- -00000-0000

Fecha: 2011-01-14 17:07:41 Dep. 2020 DIR.NULVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 89

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	328790486	25/11/2010	58,309,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
99		OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	5,000.00
		TOTAL :	\$ 5,000.00

SON: CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

6
115541

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 10 - 110775
		Bogotá D.C., Diciembre 27 de 2010 - 11:08:31

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
TRANSFERENCI	BANCO DE BOGOTA	062754387	411735295	27/12/2010	22.229.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1.000.00	1.000.00
				\$1.000.00

SON: **MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-003796- -00000-0000

Fecha: 2011-01-14 17:07:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 89

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Diciembre 27 de 2010 - 11:08:35

115541 9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 10 - 110774

Bogotá D.C., Diciembre 27 de 2010 - 11:08:31

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

***** Soporte del Pago *****

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
TRANSFERENCI	BANCO DE BOGOTA	062754387	411735295	27/12/2010	22.229.000.00

***** Conceptos Pagados *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1.000.00	1.000.00
				<u>\$1.000.00</u>

SON: **MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-003796- -00000-0000

Fecha: 2011-01-14 17:07:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
1ra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 89

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Diciembre 27 de 2010 - 11:08:35

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 105,818
FECHA : DICIEMBRE 13 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-003796- -00000-0000

Fecha: 2011-01-14 17:07:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 89

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	382749393	10/12/2010	23,061,400.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	6,000.00
		TOTAL :	\$ 6,000.00

SON: SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

115541 9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 100,275
FECHA : NOVIEMBRE 25 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-003796- -00000-0000

Fecha: 2011-01-14 17:07:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 89

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRISARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	329790486	25/11/2010	58,309,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

115541 10

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 100,363
FECHA : NOVIEMBRE 25 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-003796- -00000-0000

Fecha: 2011-01-14 17:07:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 89

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754397	328790496	25/11/2010	58,309,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	130,000.00
		TOTAL :	\$ 130,000.00

SON: CIENTO TREINTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

115541 11

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 100,336
FECHA : NOVIEMBRE 25 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-003796- -00000-0000

Fecha: 2011-01-14 17:07:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 89

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	329790486	25/11/2010	58,308,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	52,000.00
		TOTAL :	\$ 52,000.00

SON: CINCUENTA Y OOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VISENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

115541 12

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 91,386
FECHA : OCTUBRE 27 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-003796- -00000-0000

Fecha: 2011-01-14 17:07:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 89

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	382749496	27/10/2010	38,161,200.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMI	26,000.00
		TOTAL :	\$ 26,000.00

SON: VEINTISEIS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

17

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
23 December 2009 (23.12.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/153226 A1

- (51) International Patent Classification:
C07D 277/24 (2006.01) A61K 31/425 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/EP2009/057324
- (22) International Filing Date:
15 June 2009 (15.06.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
08380177.9 16 June 2008 (16.06.2008) EP
12/139,661 16 June 2008 (16.06.2008) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **FAES FARMA, S.A.** [ES/ES]; Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako (Leioa) - Vizcaya (ES).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **RUBIO ROYO, Victor** [ES/ES]; Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14,

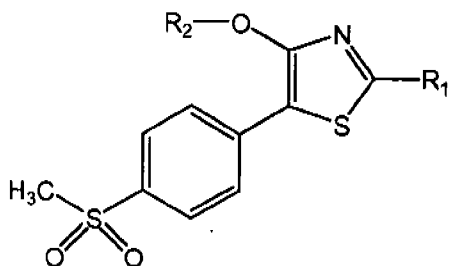
E-48940 Lamiako (Leioa) - Vizcaya (ES). **DE LA HERA MARTÍNEZ, Antonio** [ES/ES]; Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako (Leioa) - Vizcaya (ES). **ÁLVAREZ DE MON SOTO, Melchor** [ES/ES]; Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako (Leioa) - Vizcaya (ES). **MUÑOZ MUÑOZ, Ana** [ES/ES]; Faes Farma, S.A., Máximo Aguirre, 14, E-48940 Lamiako (Leioa) - Vizcaya (ES).

(74) Agent: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L., Avenida de Burgos, 16 D, Edificio Euromor, E-28036 Madrid (ES).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,

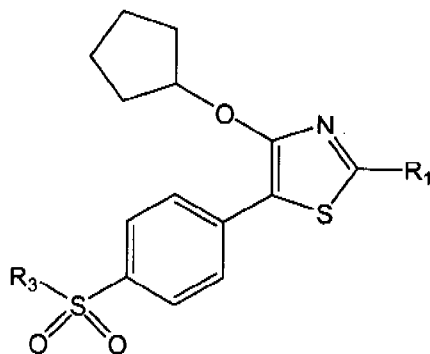
[Continued on next page]

(54) Title: 5-(4-METHANESULFONYL-PHENYL)-THIAZOLE DERIVATIVES FOR THE TREATMENT OF ACUTE AND CHRONIC INFLAMMATORY DISEASES



(I)

(57) Abstract: The invention relates to the use of a compound of formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt, prodrug and/or solvate thereof, in the preparation of a medicament for the treatment of an acute or chronic inflammatory disease, by inhibiting the production of at least one pro-inflammatory cytokine selected from TNF-alpha and IFN-gamma, or by immunomodulating the IL-8 chemokine and/or the IL-10 regulatory cytokine. The invention also relates to novel compounds of formula (I') or a pharmaceutically acceptable salt, prodrug and/or solvate thereof, as well as a pharmaceutical composition comprising said compound.



(I')

WO 2009/153226 A1

14

WO 2009/153226 A1



SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(84) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad
Intelectual
Oficina Internacional



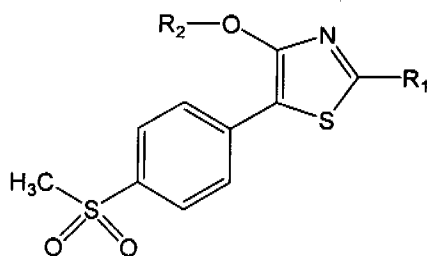
(43) Fecha de Publicación Internacional
23 de Diciembre de 2009 (23.12.2009)

PCT

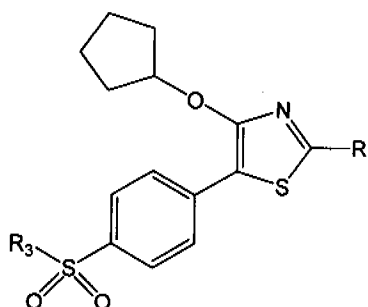
(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/153226 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07D 277/24 (2006.01) A61K 31/425 (2006.01)
- (21) Numero de Solicitud Internacional:
PCT/EP2009/05732
- (22) Fecha de Presentación Internacional:
15 de Junio de 2009 (15.06.2009)
- (25) Lenguaje de entrega: Inglés
- (26) Lenguaje de Publicación: Inglés
- (30) Datos de Prioridad:
08380177.9 16 de Junio de 2008 (16.06.2008) EP
12/139,661 16 de Junio de 2008 (16.06.2008) EU
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados menos los Estados Unidos): **FAES FARMA, S.A.** [ES/ES]; Máximo Aguirre, 14 E-48940 Lamiako (Leioa) - Vizcaya (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (solo para los Estados Unidos): **RUBIO ROYO, Victor** [ES/ES]; Faes Farma, S.A. Máximo Aguirre, 14 E-48940 Lamiako (Leioa) - Vizcaya (ES). **DE LA HERA MARTÍNEZ, Antonio** [ES/ES]; Faes Farma, S.A. Máximo Aguirre, 14 E-48940 Lamiako (Leioa) - Vizcaya (ES). **ÁLVAREZ DE MON SOTO, Melchor** [ES/ES]; Faes Farma, S.A. Máximo Aguirre, 14 E-48940 Lamiako (Leioa) - Vizcaya (ES). **MUÑOZ MUÑOZ, Ana** [ES/ES]; Faes Farma, S.A. Máximo Aguirre, 14 E-48940 Lamiako (Leioa) - Vizcaya (ES).
- (74) Agente: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L. Avenida de Burgos, 16 D Edificio Euromor E-28036 Madrid (ES).
- (81) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicado:
- Con el reporte internacional de búsqueda (Art. 21(3))

(54) Título: DERIVADOS DE 5-(4-METANOSULFONIL-FENIL)-TIAZOL PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS AGUDAS Y CRÓNICAS



(I)



(I')

(57) Resumen: La invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria aguda o crónica, mediante la inhibición de la producción de al menos una citocina pro-inflamatoria seleccionada de TNF-alfa e IFN-gamma, o mediante la inmunomodulación de la quimiocina IL-8 y/o la citocina reguladora IL-10. La invención también se refiere a compuestos novedosos de fórmula (I') o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, así como a una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto.

**DERIVADOS DE 5-(4-METANOSULFONILFENIL)TIAZOL PARA EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES INFLAMATORIAS AGUDAS Y CRÓNICAS**

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de compuestos derivados de 5-(4-metanosulfonilfenil)tiazol en la preparación de un medicamento para el tratamiento de estados o enfermedades inflamatorios agudos y crónicos, tales como artritis reumatoide.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La inmunología es el estudio científico de la diferenciación entre propio y no propio. El fallo de la tolerancia a lo propio está en el origen de enfermedades autoinmunitarias. Además, otros estados tales como trasplante, aterosclerosis, patologías inflamatorias agudas y crónicas septicémicas y no septicémicas y muchas otras enfermedades, hasta ahora no consideradas como autoinmunitarias, muestran mecanismos patogénicos mediados por células inmunitarias. La activación de respuestas efectoras inflamatorias inmunitarias se considera por la mayor parte de los autores como que se basa en dos señales:

- La señal 1 implica la activación del receptor del antígeno clonal (complejo receptor de células T TCR-CD3), que reconoce el antígeno cognado incluido en las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). En las células B, los antígenos unidos a membrana o solubles extracelulares entrecruzan al complejo receptor clonal de inmunoglobulina y CD79 (Ig/CD79) para liberar la señal 1 al linaje de linfocitos que secretan anticuerpos.
- Una segunda señal, además de la señal 1 que libera antígenos, se requiere para evitar la tolerancia mediante anergia o delección clonal. La señal 2 se libera mediante coestimuladores tales como CD86 expresados sobre la superficie de células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales, tales como monocitos humanos y su progenie de linaje de diferenciación.

En respuestas inflamatorias inmunitarias innatas, se promueven señales de peligro mediante mitógenos o antígenos microbianos y automodificados que activan los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Las rutas de señalización de PRR, tales como TLR4 (el receptor para el lipopolisacárido o LPS de bacterias de pared gram negativas) liberan la expresión de altos niveles de moléculas de superficie coestimuladoras (es decir, CD80 o CD86). A su vez, los ligandos coestimuladores CD80 – CD86 entrecruzan a CD28 sobre la superficie de las células T auxiliares. La combinación de la señal 1 (es decir, entrecruzamiento de anticuerpos anti-CD3) más la señal 2 (es decir, entrecruzamiento de CD28 mediante anticuerpos específicos) imita de manera experimental las condiciones naturales de una respuesta inmunitaria efectora inflamatoria

eficaz. De manera destacable, los fármacos supresores inmunitarios aprobados tienen algunos problemas para inhibir la activación de cascadas de citocinas proinflamatorias en condiciones de altos niveles de coestimulación. Lo último se produce en enfermedades autoinmunitarias y muchos otros estados inflamatorios agudos y crónicos graves.

Las CPA no son sólo cruciales para que el sistema inmunitario adquirido decida la clase de respuesta inmunitaria puesto que influyen profundamente en si hay una respuesta efectora (es decir, cooperación de células T, Th, citotoxicidad celular, Th, producción de anticuerpos, células B) o una respuesta tolerante (mediante anergia o apoptosis) mediada por el clon expuesto. Las CPA también pueden liberar por sí mismas respuestas inmunitarias inmediatas efectoras. Un ejemplo bien documentado es la producción y liberación de grandes cantidades de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) por los monocitos en pacientes con cáncer. En estos pacientes, TNF-alfa promueve un aumento de la respuesta y activación del endotelio vesicular, acompañado de la secreción de interleucina 8 (IL-8) y otras citocinas proinflamatorias así como actividades procoagulantes. En total, TNF-alfa promueve trombosis e isquemia con necrosis cancerosa, lo que condujo a la definición original como caquectina o TNF-alfa. Sin embargo, TNF-alfa es una citocina pleiotrópica implicada en muchos otros estados patológicos. Existen pruebas desde hace tiempo de que, en los monocitos, LPS puede activar la secreción de cantidades masivas de TNF-alfa que contribuye considerablemente al desarrollo del choque septicémico. Más recientemente, la producción y secreción de altas cantidades de manera inadecuada de TNF-alfa se considera como una diana terapéutica en enfermedades inflamatorias autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide, espondiloartropatías, enfermedad de Crohn, uveítis y psoriasis. Por tanto, el uso de anti-TNF-alfa actualmente se ha considerado de manera amplia como una estrategia del estado de la técnica para tratar aquellas enfermedades en las que la reducción de niveles disponibles de TNF-alfa bioactivo podría contribuir a mejorar el estado del paciente.

A este respecto, el número de enfermedades que podrían beneficiarse del tratamiento con antagonistas de TNF-alfa está creciendo rápidamente e incluye aterosclerosis, síndrome metabólico, encefalitis, hepatitis vírica, glomerulonefritis, respuesta inflamatoria inadecuada frente a tumores y choque septicémico entre otras.

Además de la producida por algunas células somáticas, existen dos fuentes principales de producción de TNF-alfa, monocitos y linfocitos T. En el curso de una respuesta inmunitaria adquirida, la exposición de CPA a señales de peligro en escenarios instructivos proinflamatorios, activa la secreción de IL-12 p70 (un heterodímero de p35 y p40), siendo la última una molécula coestimuladora que polariza el perfil de secreción de citocinas de las células Th activadas hacia el tipo Th-1. Las células Th1 muestran un perfil de citocinas característico en el que la secreción de interferón gamma (IFN-gamma) es una huella *auténtica*. Estas células secretan también altas cantidades de TNF-alfa.

El IFN-gamma producido por Th1 promueve muchos efectos que pueden ser relevantes en el entendimiento de enfermedades inflamatorias. Por un lado, activa adicionalmente los monocitos y aumenta el nivel de secreción de TNF-alfa mediante un estímulo dado. Por otro lado, promueve una ruta de señalización hacia abajo más fuerte de receptores TNF-alfa. En total, IFN-gamma además de sus propios efectos directos tales como actividad antiviral, aumenta la expresión en CHM-II y contribuye a inflamación y lesiones aumentando los efectos todavía fuertes de TNF-alfa.

La cascada proinflamatoria iniciada por la producción de TNF-alfa en monocitos o IFN-gamma y TNF-alfa en células Th1, se amplifica a través de otras rutas de citocinas proinflamatorias tales como IL-8. IL-8, a pesar de su nombre original, se describió como una quimiocina producida por macrófagos y otros tipos de células tales como células epiteliales, y también se sintetiza por células endoteliales, y por consiguiente también se denomina CXCL8. Aunque los granulocitos neutrófilos son las células diana principales de IL-8, existe una gama relativamente amplia de células (células endoteliales, macrófagos, mastocitos, queratinocitos) que también responden a esta quimiocina. La función primaria de IL-8 es la inducción de la quimiotaxia en sus células diana (por ejemplo, granulocitos neutrófilos). En los neutrófilos, las series de respuestas fisiológicas celulares requeridas para la migración y su función diana, fagocitosis, también se inducen como aumento de Ca2+ intracelular, exocitosis (por ejemplo, liberación de histamina), explosión respiratoria. La IL-8 puede secretarse por cualquier célula con TLR que esté implicado en la respuesta inmunitaria innata. La función primaria de IL-8 es reclutar neutrófilos para que fagociten el antígeno que activa a los TLR de patrones de antígeno. Mediante el transporte de células diana de IL-8 al endotelio y a otros tejidos diana, IL-8 está implicada por tanto en la amplificación y ejecución de muchos de los papeles patogénicos de TNF-alfa, además de su papel en la defensa del organismo.

La migración y el retorno de leucocitos no sólo están regulados por quimiocinas y sus receptores, sino también por varias moléculas de adhesión. Entre ellas, la selectina CD62L se reconoce como una diana terapéutica para evitar la migración de leucocitos a los ganglios linfáticos y por tanto se evalúa como un parámetro para clasificar los efectos *in vitro* de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (FAINE).

Muchas moléculas inmunosupresoras y anti-TNF-alfa afectan a los mecanismos de defensa inmunitaria normales porque promueven efectos citotóxicos en las células inmunitarias o inhiben el mecanismo proliferativo que subyace bajo la expansión clonal que precede a las respuestas inmunitarias efectoras satisfactorias.

Dada la importancia del TNF-alfa secretado en el espacio extracelular (o bien formas solubles secretadas o bien insertadas en la membrana citoplasmática), se han presentado muchos esfuerzos para diseñar agentes terapéuticos que bloqueen la interacción de TNF-alfa extracelular con receptor I de TNF y/o receptor II de TNF. Los enfoques más relevantes han sido el uso del receptor de TNF señuelo soluble que captura

TNF-alfa y gracias al tiempo de disociación largo evita la interacción del ligando proinflamatorio con los receptores celulares.

Una segunda estrategia ha sido producir anticuerpos anti-TNF-alfa humano humanizados o bien de manera convencional o bien creados como moléculas de una única cadena bisespecífica que tiene como diana también otras moléculas relevantes en una enfermedad dada (es decir, anti-VEGF/anti-TNF-alfa en artritis reumatoide). Aunque las moléculas descritas anteriormente son antagonistas de TNF-alfa, restringen su mecanismo de acción al bloqueo de TNF-alfa secretado extracelular.

Una lista global y no exhaustiva de dianas que conducen a la producción y secreción de TNF-alfa podría ser: a) moléculas que conducen la expresión transcripcional de TNF-alfa; b) moléculas que conducen el transporte de ARN de TNF-alfa desde el núcleo hacia el citoplasma y el corte y empalme del ARN; c) moléculas que dirigen la traducción de TNF-alfa; d) moléculas que regulan la estabilidad del ARNm de TNF-alfa; e) moléculas que dirigen las vesículas de Golgi hacia la membrana en la que se ancla la forma superficial pro-TNF-alfa; f) moléculas tales como enzima de conversión del TNF-alfa (TACE) implicada en el desprendimiento secretor de TNF-alfa y g) moléculas que regulan la internalización de la forma superficial de pro-TNF-alfa y su señalización. Todas éstas se refieren a dianas celulares de la producción y secreción de TNF-alfa.

A pesar de los diferentes enfoques para diseñar agentes terapéuticos que bloqueen la producción de TNF-alfa, sería sumamente deseable encontrar nuevos fármacos que bloqueen de manera selectiva no sólo la producción de TNF-alfa sino también la producción de otras citocinas proinflamatorias claves, como IFN-gamma.

SUMARIO DE LA INVENCION

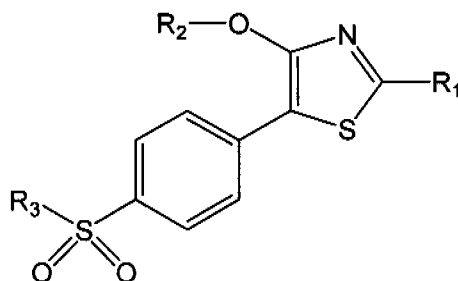
Los autores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que los compuestos de fórmula (I) han mostrado varios efectos inmunomoduladores sumamente interesantes, potencialmente útiles para el control de los mecanismos patogénicos de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas y por tanto, con posibles aplicaciones clínicas. En particular, los compuestos usados en la invención han podido inhibir la producción de TNF-alfa por las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes que padecen una enfermedad inflamatoria crónica, tal como artritis reumatoide, así como inhibir la secreción de IFN-gamma por aquellas células tras la estimulación de las células T. Adicionalmente, los compuestos de fórmula (I) han podido modular los perfiles de respuesta biológica de secreción de quimiocinas (es decir IL-8) y citocinas reguladoras (es decir IL-10), y lo hacen de un modo diferencial en caso de salud y de enfermedad. Todos estos efectos inmunomoduladores de compuestos de fórmula (I) no estaban asociados a ningún efecto tóxico sobre células mononucleares de sangre periférica, además, la respuesta de activación y proliferativa tras estímulos mitogénicos no se modificó por estos compuestos.

La combinación, en sólo una molécula pequeña, de efectos inhibidores sobre varias citocinas proinflamatorias como TNF-alfa e IFN-gamma, y el potencial para modular quimiocina IL-8 y/o citocina reguladora IL-10, puesto que todas estas son de crucial importancia en la patofisiología de trastornos autoinmunitarios específicos de órgano y sistémicos, trasplantes, enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, algunas enfermedades degenerativas y metabólicas y aterosclerosis, permite que los compuestos de fórmula (I) pertenezcan a una nueva categoría de inmunomoduladores para seleccionar como diana la cascada de quimiocinas y citocinas proinflamatorias/reguladoras a diversos niveles de reprogramación de manera potencial de relevancia clínica y terapéutica.

De manera destacable, las células inmunitarias son sésiles y entran en los órganos para inspeccionar los tejidos corporales que se infiltran en los estados inflamados en los que éstas se concentran en las lesiones distribuidas según la actividad de enfermedad, órganos diana y extensión del daño. Puesto que se espera que los compuestos usados en la invención modulen algún aspecto del proceso patofisiológico, entonces pueden usarse estudios de obtención de imágenes para caracterizar el número de receptores, la eficacia de unión, la ocupación de receptores y la concentración de la sonda de medicamento. Dadas las propiedades de retorno de los leucocitos, la detección de la diana terapéutica reúne la información sobre la ubicación de las células diana y los sitios de lesión.

Por tanto, los compuestos de fórmula (I) también muestran un posible uso como biomarcadores de obtención de imágenes en el desarrollo farmacológico, ensayos clínicos y medicina individualizada, que permite proporcionar información no sólo sobre la farmacocinética, distribución y dosificación sino también datos relevantes sobre los patrones de respuesta individualizados en ensayos preclínicos y clínicos. Los últimos pueden conducir a la definición de biomarcadores sustitutos, individualizados, fiables, validados de criterios de valoración clínicos que se administran a un paciente que necesita tal pronóstico y evaluación individualizada de la cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una composición farmacéutica del mismo optimizado para la tecnología de obtención de imágenes biológicas distinta que conocen los expertos en la técnica.

Según un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I):



(I)

en la que:

R_1 se selecciona de hidrógeno, alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heterociclilo sustituido o no sustituido;

R_2 se selecciona de hidrógeno, alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, y $N(R'R'')$ en el que R' y R'' son independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_6 ; y

R_3 es un radical alquilo C_1-C_6 ,

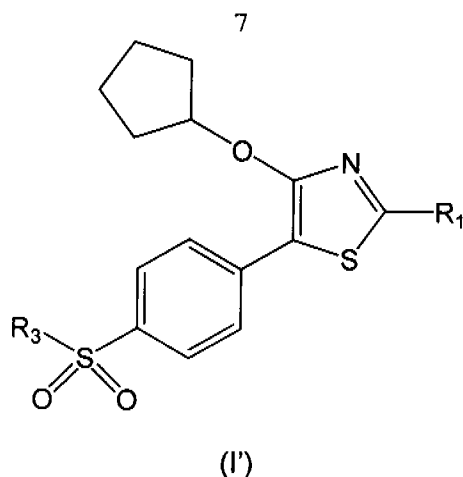
o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria aguda o crónica, mediante la inhibición de la producción de al menos una citocina proinflamatoria seleccionada de TNF-alfa e IFN-gamma, o mediante la inmunomodulación de la quimiocina IL-8 y/o la citocina reguladora IL-10.

En un aspecto particular de la invención, la enfermedad inflamatoria aguda o crónica se selecciona de oligoartritis y poliartritis seropositivas o seronegativas, agudas y crónicas, espondiloartropatías, glomerulonefritis, colagenopatías, nefritis tubulointersticial, síndrome metabólico, aterosclerosis, osteoartritis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad pulmonar intersticial, esclerosis múltiple, enfermedades desmielinizantes, meningitis, encefalitis, meningoencefalitis, radiculopatías inflamatorias y neuropatías periféricas, enfermedad inflamatoria del intestino, cirrosis, hepatitis, insuficiencia cardíaca, enfermedad isquémica, insuficiencia renal, cistitis inflamatoria, hiperplasia prostática benigna, prostatitis, miocarditis, pericarditis, uveítis, dermatitis atópica, eccema, urticaria, psoriasis, rosácea, rinitis alérgica, septicemia, choque septicémico, insuficiencia multiorgánica, enfermedades autoinmunitarias sistémicas tales como lupus eritematoso sistémico, vasculitis, dermatomiositis, amiloidosis o sarcoidosis, enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano tales como miastenia grave, tiroiditis o insulinitis, trasplante de órganos, inflamación inducida por tumor e infecciosa, degeneración celular dependiente de TNF-alfa, necrosis, apoptosis, enfermedad de injerto contra huésped, caquexia y crecimiento celular patológico paracrino y autocrino.

Estas indicaciones terapéuticas son la consecuencia de al menos una respuesta inmunitaria anómala, una desregulación inmunitaria, una alteración inmunitaria, una inmunopatogénesis, una inmunoterapia, una inmunosupresión o una respuesta biológica inmunomoduladora.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I'):

22



en la que:

R₁ se selecciona de hidrógeno, alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heterociclilo sustituido o no sustituido; y

R₃ es un radical alquilo C₁-C₆,

o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I') tal como se definió anteriormente, o una sal, un profármaco o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un transportador, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I') tal como se definió anteriormente, para su uso como medicamento.

Finalmente, otro aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente como un biomarcador de obtención de imágenes en tecnologías de obtención de imágenes y de obtención de imágenes farmacológicas, para encontrar lesiones inmunológicas, células diana y moléculas diana.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Diferentes características fluorescentes de micropartículas seleccionadas para el desarrollo de matrices de perlas para citometría (CBA, *Cytometric Bead Array*).

Figura 2: Influencia sobre la producción de TNF-alfa en PBMC estimuladas con LPS de voluntarios sanos (n=10) por el compuesto 12. Las columnas representan la mediana y el error estándar de los cultivos por duplicado realizados en cada muestra en las diferentes condiciones experimentales. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) de los datos correspondientes con respecto al vehículo para cada condición experimental.

Figura 3: Influencia sobre la producción de TNF-alfa en PBMC estimuladas con LPS o TCR/CD3+CD28 de voluntarios sanos (n=13) por el compuesto 12. Las columnas

representan la media y el error estándar de los cultivos por duplicado realizados en las muestras en las diferentes condiciones experimentales. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de los datos correspondientes con respecto al vehículo para cada una de las diferentes condiciones experimentales.

Figura 4: Influencia sobre la producción de TNF-alfa en PBMC de pacientes con artritis reumatoide ($n=7$) por el compuesto 12. Las columnas representan la media y el error estándar de los cultivos por duplicado realizados en cada muestra en las diferentes condiciones experimentales. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de los datos correspondientes con respecto al vehículo para cada condición experimental diferente.

Figura 5: Influencia sobre la producción de IFN-gamma en PBMC de voluntarios sanos ($n=13$) por el compuesto 12. Las columnas representan la media y el error estándar de los cultivos por duplicado realizados en cada muestra en las diferentes condiciones experimentales. El asterisco representa las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de los datos correspondientes con respecto al vehículo para la condición experimental indicada.

Figura 6: Influencia sobre la producción de IFN-gamma en PBMC de pacientes con artritis reumatoide ($n=8$) por el compuesto 12. Las columnas representan la media y el error estándar de los cultivos por duplicado realizados en cada muestra en las diferentes condiciones experimentales. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de los datos correspondientes con respecto al vehículo para cada una de las diferentes condiciones experimentales.

Figura 7: Influencia sobre la producción de IL-8 en PBMC de voluntarios sanos ($n=13$) por el compuesto 12. Las columnas representan la media y el error estándar de los cultivos por duplicado realizados en cada muestra en las diferentes condiciones experimentales. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de los datos correspondientes con respecto al vehículo para cada condición experimental.

Figura 8: Influencia sobre la producción de IL-8 en PBMC de pacientes con artritis reumatoide ($n=8$) por el compuesto 12. Las columnas representan la media y el error estándar de los cultivos por duplicado en cada muestra en las diferentes condiciones experimentales. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de los datos correspondientes con respecto al vehículo para cada condición experimental.

Figura 9: Influencia sobre la producción de IL-10 en PBMC de voluntarios sanos ($n=13$) por el compuesto 12. Las columnas representan la media y el error estándar de los cultivos por duplicado realizados en cada muestra en las diferentes condiciones experimentales. No se encontraron diferencias estadísticas.

Figura 10: Influencia sobre la producción de IL-10 en PBMC de pacientes con artritis reumatoide (n=8) por el compuesto 12. Las columnas representan la media y el error estándar de los cultivos por duplicado realizados en cada muestra en las diferentes condiciones experimentales. El asterisco representa las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de los datos correspondientes con respecto al vehículo.

Figura 11: Efecto del compuesto 12 (a) y vehículo (b) sobre la respuesta proliferativa de PBMC de voluntarios sanos (n=8) en presencia y en ausencia de estimulación con o bien PHA, PHA más IL-2, o bien una combinación de anticuerpos monoclonales anti-CD3 (T3) y anti-CD28.

Figura 12: Efecto del compuesto 12 sobre el desprendimiento de CD62L en linfocitos (a) y monocitos (b) de PBMC de voluntarios sanos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En el contexto de la presente invención, los siguientes términos tienen el significado detallado a continuación:

La expresión "alquilo C₁₋₆" se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que consiste en átomos de carbono y de hidrógeno, que no contiene ninguna insaturación, que tiene de uno a seis átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, etc. Los radicales alquilo C₁₋₆ pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes tales como cicloalquilo, arilo, heterocicilo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, ciano, amino, nitro o alquiltio.

El término "cicloalquilo" se refiere a un radical de anillo de 3 a 8 miembros estable que está saturado o parcialmente saturado, y que consiste únicamente en átomos de carbono y de hidrógeno, tales como ciclohexilo o ciclopentilo. A menos que se indique lo contrario de manera específica en la memoria descriptiva, el término "cicloalquilo" pretende incluir radicales cicloalquilo que están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, radical alquilo C₁₋₆, halógeno, hidroxilo, -N(R₃)(R₄), en el que R₃ y R₄ se seleccionan independientemente de hidrógeno y radical alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado.

El término "arilo" se refiere a un radical de anillo aromático de 5 a 8 miembros estable, y que consiste únicamente en átomos de carbono y de hidrógeno, tal como fenilo o ciclooctatetraeno. A menos que se indique lo contrario de manera específica en la memoria descriptiva, el término "arilo" pretende incluir radicales arilo que están opcionalmente sustituidos por al menos un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, radical alquilo C₁₋₆, halógeno, hidroxilo, -N(R₃)(R₄), en el que R₃ y R₄ se seleccionan independientemente de hidrógeno y radical alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado.

25

"Heterociclilo" se refiere a un radical de anillo de 3 a 8 miembros estable que consiste en átomos de carbono y desde uno hasta cinco heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. Para los fines de esta invención, el heterociclo puede ser aromático o estar parcial o completamente saturado. Los ejemplos de tales heterociclos incluyen, pero no se limitan a pirrolidina, piridina, tiofeno, furano, etc. A menos que se indique lo contrario de manera específica en la memoria descriptiva, el término "heterociclilo" pretende incluir radicales heterociclilo que están opcionalmente sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, radical alquilo C_{1-6} , halógeno, hidroxilo, $-N(R_3)(R_4)$, en el que R_3 y R_4 se seleccionan independientemente de hidrógeno y radical alquilo C_{1-6} lineal o ramificado.

El término "halógeno" se refiere a bromo, cloro, yodo o flúor.

La expresión "oligoartritis y poliartritis seropositivas o seronegativas, agudas y crónicas" se refiere a enfermedades con sinovitis que implica una o varias articulaciones diartrodiales, con factor reumatoide o bien positivo o bien negativo, incluyendo artritis reumatoide y síndrome de Sjögren tanto primario como secundario.

El término "espondiloartropatías" se refiere a enfermedades inflamatorias asociadas a HLA-B27 patogénicamente inmunitarias con la participación de articulaciones sacro-ilíacas y/o articulaciones periféricas y/o espinales, incluyendo también uveítis.

El término "glomerulonefritis" se refiere a lesiones inflamatorias del glomérulo renal.

El término "nefritis tubulointersticial" se refiere a enfermedades inflamatorias que implican túbulos e intersticio renal.

El término "colagenopatías" se refiere a enfermedades inflamatorias sistémicas con mecanismo inmunitario patogénico incluyendo lupus eritematoso sistémico (LES), dermatomiositis y esclerodermia.

La expresión "enfermedad inflamatoria del intestino" se refiere a enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal con mecanismo inmunitario patogénico, o bien con o bien sin características sistémicas, incluyendo la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

La expresión "enfermedad pulmonar obstructiva" se refiere a enfermedades bronquiales con disminución o bien reversible o bien irreversible del volumen de flujo espiratorio (VFE), incluyendo asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

El término "enfermedad pulmonar intersticial" se refiere a enfermedades inflamatorias que implican el intersticio del pulmón.

La expresión "enfermedades desmielinizantes" se refiere a enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central con un mecanismo patogénico inmunitario que

provoca la lisis de mielina, incluyendo esclerosis múltiple y neuritis óptica.

La expresión "meningitis, encefalitis y meningoencefalitis" se refiere a enfermedades inflamatorias de las meninges y/u otras estructuras del sistema nervioso central.

La expresión "radiculopatías inflamatorias y neuropatías periféricas" se refiere a enfermedades inflamatorias del sistema nervioso periférico.

La expresión "cistitis inflamatoria" se refiere a enfermedades inflamatorias de la vejiga.

La expresión "hiperplasia prostática benigna" se refiere a hiperplasia y/o hipertrofia no maligna de la próstata.

La expresión "dermatitis atópica, eccema y urticaria" se refiere a enfermedades alérgicas de la piel con mecanismo patogénico inmunitario con o sin participación de IgE.

El término "psoriasis" se refiere a una reacción eritematosa e hiperqueratósica de la piel con un mecanismo patogénico del sistema inmunitario.

El término "rosácea" se refiere a un estado inflamatorio común de la piel caracterizado por eritema (rubor y enrojecimiento) en la zona central de la cara y a lo largo de las mejillas, la nariz o la frente, además también puede afectar de manera menos común al cuello y pecho.

La expresión "rinitis alérgica" se refiere a enfermedades de la mucosa nasal inflamatoria intermitente (también denominada estacional) o persistente (también denominada perenne) de mecanismo patogénico de hipersensibilidad inmunitaria.

La expresión "septicemia, choque septicémico e insuficiencia multiorgánica" se refiere a enfermedades inflamatorias sistémicas mediadas por una respuesta inmunitaria anómala frente a agentes microbianos y otros factores etiológicos.

La expresión "sarcoidosis y amiloidosis" se refiere a enfermedades inmunológicas idiopáticas con participación sistémica y/u orgánica y etiología no bien definida en las que puede observarse una respuesta inmunitaria anómala.

La expresión "enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano" se refiere a una lesión mediada por el sistema inmunitario de órganos sin factores etiológicos definidos, incluyendo miastenia grave, tiroiditis, hipofisitis, adrenalitis y otras.

La expresión "transplante de órganos" se refiere a la prevención y al tratamiento de rechazo de células, tejidos y órganos transplantados.

La expresión "infección e inflamación inducida por tumor" se refiere a respuestas inmunitarias anómalas secundarias frente agentes microbianos o estímulos cancerosos.

La expresión "degeneración celular dependiente de TNF-alfa, apoptosis o necrosis" se refiere a degeneración o muerte tisular inducida por TNF-alfa.

La expresión "enfermedad de injerto contra huésped" se refiere a respuestas inmunitarias inflamatorias inducidas por células de injerto.

El término "caquexia" se refiere a malnutrición o anorexia sistémica y pérdida de peso inducida por enfermedades neoplásicas o inflamatorias.

El término "aterosclerosis" se refiere a cualquier endurecimiento de las arterias secundario a ateroma o acumulación en las paredes arteriales que están constituidas por células inflamatorias (principalmente células de macrófago) y residuos celulares, que contienen lípidos.

La expresión "enfermedades isquémicas" se refiere a una lesión de órganos secundaria a flujo sanguíneo y/u oxigenación tisular reducidos incluyendo isquemia cardíaca y cerebrovascular.

La expresión "crecimiento celular patológico paracrino y autocrino" se refiere a enfermedades malignas o benignas con el uso celular de TNF-alfa como una citocina que regula el factor de regulación y proliferación para las células.

A menos que se indique lo contrario, los compuestos usados en la invención pretenden incluir compuestos que sólo difieren en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, compuestos que tienen las presentes estructuras excepto por la sustitución de un hidrógeno por deuterio o tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido con ^{13}C o ^{14}C o un nitrógeno enriquecido con ^{15}N están dentro del alcance de esta invención.

La expresión "sales, solvatos o profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo" se refiere a sales, solvatos o profármacos que, cuando se administran al receptor, pueden proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto tal como el descrito en el presente documento. No obstante, se observará que las sales farmacéuticamente no aceptables también están dentro del alcance de la invención porque pueden ser útiles para preparar sales farmacéuticamente aceptables. Las sales, los profármacos y los derivados pueden prepararse por medio de métodos conocidos en el estado de la técnica. "Farmacéuticamente aceptable" preferiblemente se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen normalmente una reacción alérgica o una reacción desfavorable similar, tal como trastornos gástricos, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano o animal. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que está aprobado por la agencia reguladora de un gobierno estatal o federal o está incluido en la farmacopea estadounidense u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos previamente en el presente documento se sintetizan a partir del compuesto descrito previamente que contiene una unidad básica o ácida por medio de métodos químicos

convencionales. Tales sales se preparan generalmente, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas ácidas o básicas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido adecuados en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de ambos. Se prefieren generalmente medios no acuosos, tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácido minerales tales como clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato, por ejemplo, y sales de adición de ácido orgánicas tales como acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato, por ejemplo. Los ejemplos de sales de adición alcalinas incluyen sales inorgánicas tales como sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, por ejemplo, y sales alcalinas orgánicas tales como etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquilenetanolamina, glucamina y sales de aminoácidos básicos por ejemplo.

El término "profármaco" se define en el presente documento como un compuesto químico que se ha sometido a una derivación química tal como una sustitución o adición de un grupo químico adicional con el fin de cambiar (para uso farmacéutico) algunas de sus propiedades físicas y químicas, tales como la solubilidad o biodisponibilidad, por ejemplo un éster o un éter derivado de un compuesto activo dando un compuesto activo *per se* tras la administración a un sujeto. Los expertos en la técnica conocen ejemplos de métodos bien conocidos para producir un profármaco a partir de un compuesto activo dado y pueden encontrarse en Krogsgaard-Larsen *et al.*, Textbook of Drug Design and Discovery, Taylor & Francis (abril 2002), por ejemplo. Según esta invención, el término "solvato" se entiende que significa cualquier forma de un compuesto de la invención que tiene otra molécula (lo más probablemente un disolvente polar) unida a él a través de enlace no covalente. Los ejemplos de solvatos incluyen hidratos y alcoholatos, por ejemplo metanolato.

Profármacos particularmente preferidos son aquéllos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de esta invención cuando tales compuestos se administran a un paciente (permitiendo que un compuesto administrado oralmente se absorba más rápidamente en la sangre, por ejemplo) o aquéllos que aumentan la distribución del compuesto original en un compartimento biológico (el cerebro o el sistema linfático, por ejemplo) con respecto a las especies originales.

Los compuestos usados en la invención pueden estar en forma cristalina, es decir como polimorfos, o bien como compuestos libres o bien como solvatos (hidratos, por ejemplo) y se entiende que ambas formas están dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación se conocen generalmente en la técnica. Solvatos adecuados son solvatos aceptables farmacéuticamente. En una modalidad particular, el solvato es un hidrato.

Las sales, solvatos y profármacos pueden prepararse por medio de métodos

conocidos en el estado de la técnica. Se observará que las sales, solvatos o profármacos farmacéuticamente no aceptables también están incluidas dentro del alcance de la invención porque pueden ser útiles en la preparación de sales, solvatos o profármacos farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de fórmula (I) o sus sales o solvatos están preferiblemente en forma farmacéuticamente aceptable o en forma sustancialmente pura. Una forma farmacéuticamente aceptable se entiende, entre otras cosas, como que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable, excluyendo aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y excipientes y sin incluir ningún material que se considere tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el fármaco son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superior al 70% y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una modalidad preferida, es superior al 95% del compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

Los compuestos usados en la invención representados por la fórmula (I) descrita anteriormente pueden incluir enantiómeros dependiendo de la presencia de centros quirales o isómeros dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E). Los isómeros, enantiómeros, diastereoisómeros individuales y mezclas de los mismos están dentro del alcance de la presente invención.

En una modalidad particular, para su uso en tecnologías de obtención de imágenes y de obtención de imágenes farmacológicas, o su desplazamiento como biomarcadores en el desarrollo farmacológico, ensayos clínicos y medicina individualizada, el compuesto de fórmula (I) puede marcarse con indicadores o etiquetas fluorescentes o luminiscentes, introduciéndose los marcadores mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica.

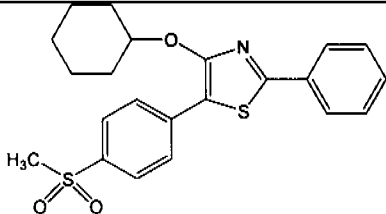
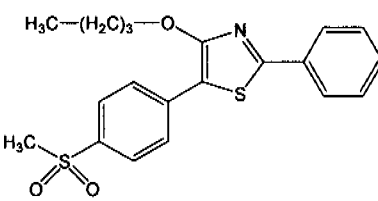
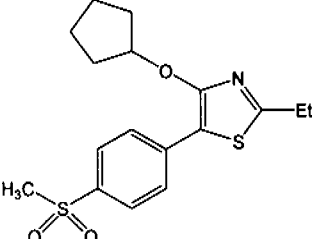
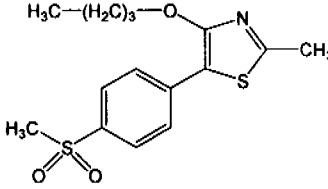
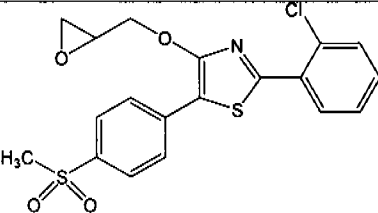
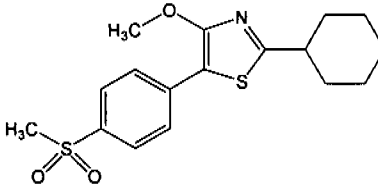
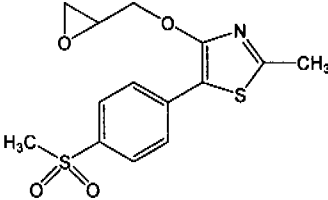
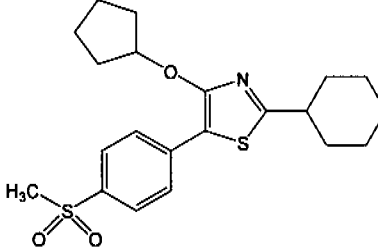
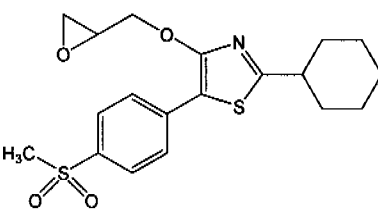
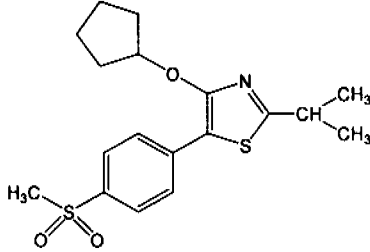
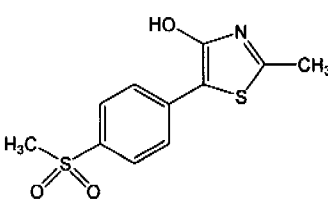
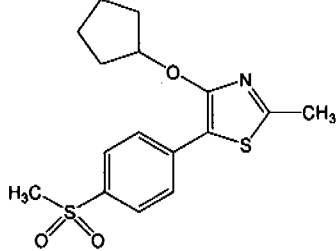
En una modalidad particular de la invención, R_1 es un alquilo C_1 - C_6 sustituido o no sustituido. Preferiblemente R_1 es metilo.

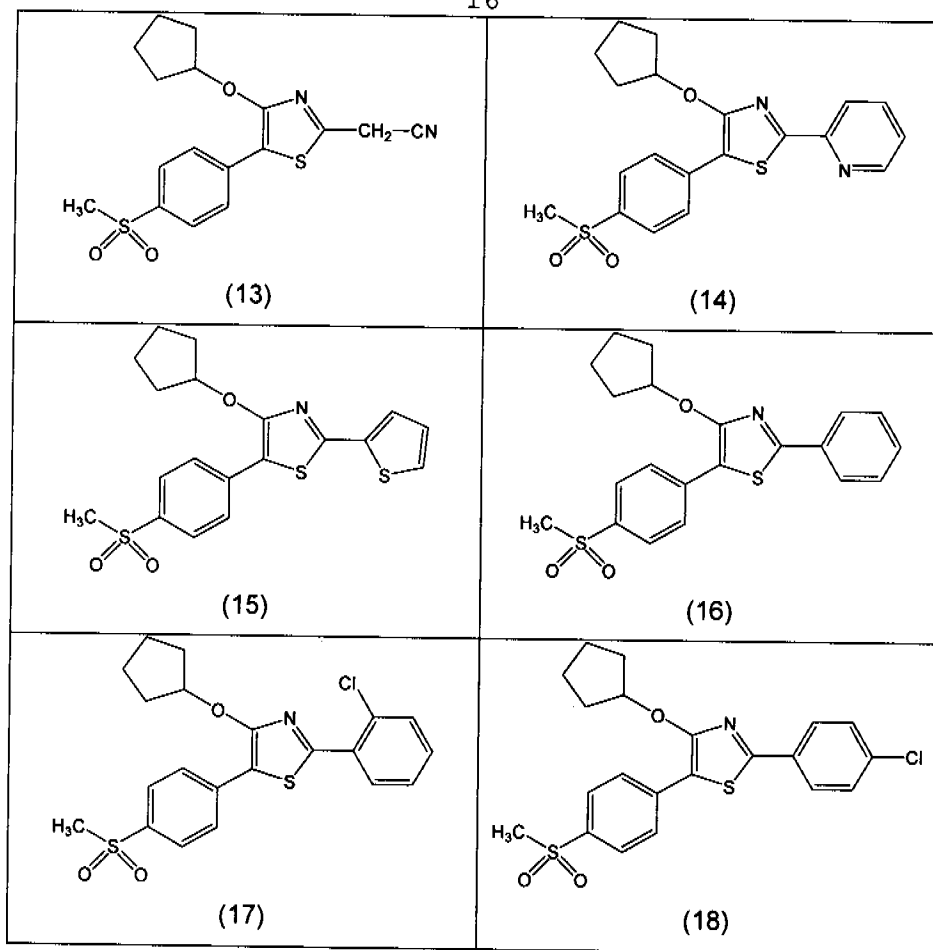
En otra modalidad particular, R_2 es hidrógeno, alquilo C_1 - C_6 sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido. Preferiblemente, R_2 es un cicloalquilo sustituido o no sustituido. Más preferiblemente, R_2 es ciclopentilo.

En todavía otra modalidad particular, R_3 es metilo.

En todavía otra modalidad más particular, el compuesto de fórmula (I) usado en la presente invención se selecciona de los siguientes compuestos:

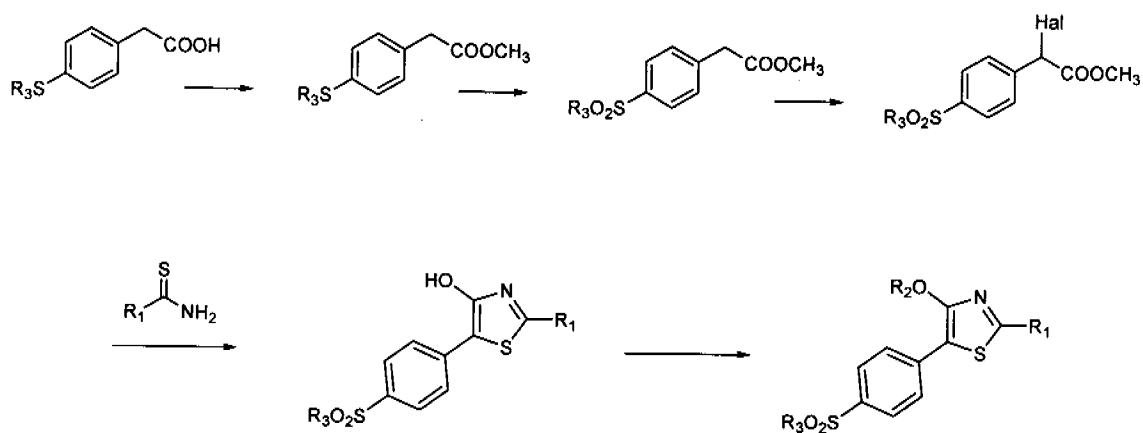
20

 (1)	 (2)
 (3)	 (4)
 (5)	 (6)
 (7)	 (8)
 (9)	 (10)
 (11)	 (12)



o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los compuestos de fórmula (I) usados en la presente invención pueden obtenerse mediante procedimientos sintéticos disponibles. Por ejemplo, pueden prepararse mediante un procedimiento que se resume en el siguiente esquema:



Este procedimiento comprende en primer lugar una reacción de esterificación del compuesto ácido 4- R_3 -tiofenilacético para dar el derivado de éster metílico. Dicha reacción puede llevarse a cabo usando un agente de metilación, tal como MeI, en presencia de una sal, tal como NaHCO₃, o usando MeOH como agente de metilación en presencia de un medio ácido.

En la siguiente etapa, el derivado de éster metílico, opcionalmente sin ninguna

purificación, se oxida en el átomo de azufre usando un agente oxidante, por ejemplo, oxona, obteniendo de ese modo el compuesto de sulfona a partir del grupo tioéter.

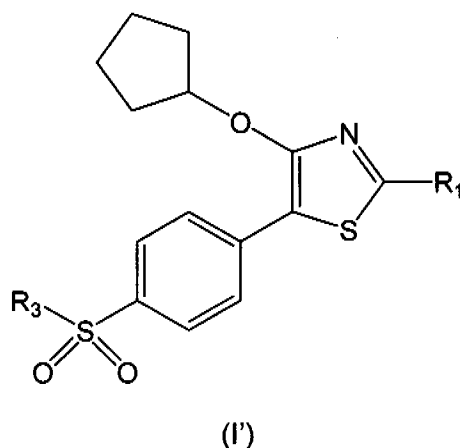
La halogenación posterior con un agente tal como NBS, conduce a la formación del haluro en la posición α del grupo éster. La cicloadición de este compuesto con diferentes tioamidas con calor da 5-(4- R_3 -sulfonilfenil)tiazol-4-ol sustituido en R_1 con un alto grado de pureza.

Las tioamidas usadas para la cicloadición se obtienen a partir de las amidas correspondientes al reactivo de Lawesson tal como se describen en *J. Med. Chem* (34) 2158-2165, 1991 y *J. Org. Chem.* (65), 13, 3973, 2000. Dichas tioamidas incluyen compuestos en los que R_1 se selecciona de hidrógeno, alquilo C_1 - C_6 sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heterociclilo sustituido o no sustituido tal como se definió anteriormente.

La introducción del radical R_2 a través del grupo hidroxilo puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido por el experto para dar el compuesto de fórmula (I) usado en la presente invención. En una modalidad particular, el grupo hidroxilo se hace reaccionar con un haluro de fórmula R_2 -Hal, preferiblemente R_2 -Br, para proporcionar el compuesto de fórmula (I).

Todos los reactivos usados en las reacciones mencionadas están comercialmente disponibles.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I'):



en la que:

R_1 se selecciona de hidrógeno, alquilo C_1 - C_6 sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heterociclilo sustituido o no sustituido; y

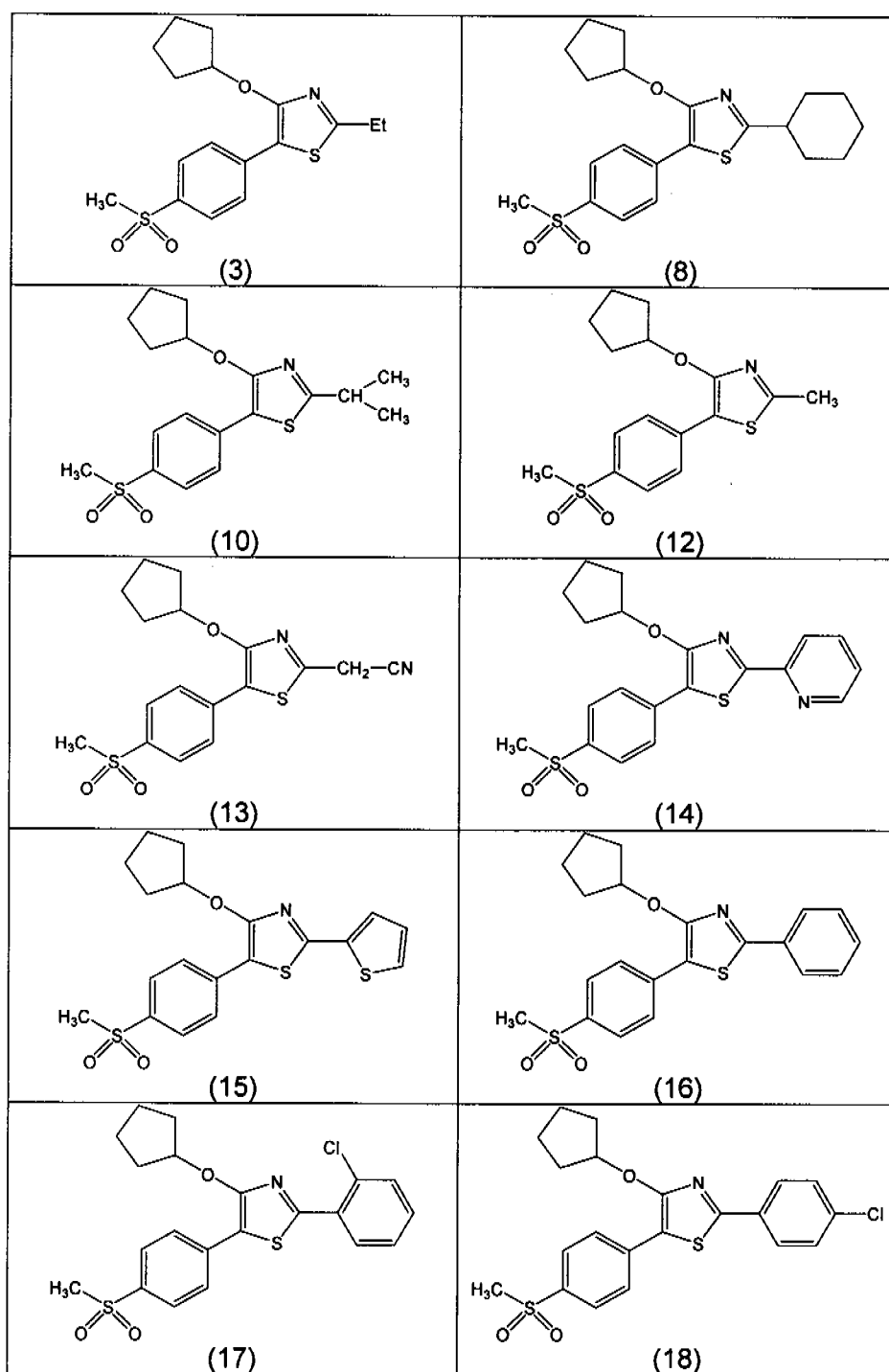
R_3 es un radical alquilo C_1 - C_6 ,

o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una modalidad particular, R_1 es un alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido. Preferiblemente, R_1 es metilo.

En otra modalidad particular, R_3 es metilo.

En otra modalidad particular, el compuesto de fórmula (I') de la invención se selecciona de los siguientes:



o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto novedoso de fórmula (I') de la presente invención, o sales,

solvatos o profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo y al menos un transportador, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable, para la administración a un paciente.

En una modalidad particular, para su administración en la prevención y/o tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas o crónicas, los compuestos de fórmula (I), sus sales, profármacos y/o solvatos farmacéuticamente aceptables se formularán en una composición farmacéutica adecuada, en la cantidad terapéuticamente eficaz, junto con uno o más transportadores, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

El término "transportador, adyuvante y/o vehículo" se refiere a entidades moleculares o sustancias con las que se administra el principio activo. Tales transportadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como aguas y aceites, incluyendo aquéllos del petróleo o con origen sintético, vegetal o animal, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, excipientes, disgregantes, agentes humectantes o diluyentes. Transportadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante cualquier método de administración adecuado, por ejemplo, administración oral, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, etc.), rectal, etc., normalmente por vía oral debido a la naturaleza crónica de la enfermedad que va a tratarse.

En una modalidad particular, dichas composiciones farmacéuticas pueden estar en forma farmacéutica de administración oral, o bien en forma sólida o bien líquida. Los ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración oral incluyen comprimidos, cápsulas, gránulos, disoluciones, suspensiones, etc., y pueden contener excipientes convencionales tales como aglutinantes, diluyentes, disgregantes, agentes lubricantes, agentes humectantes, etc., y pueden prepararse mediante métodos convencionales. Las composiciones farmacéuticas también pueden adaptarse para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, disoluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles en la forma de dosificación adecuada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán según la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las diferentes formas farmacéuticas para administrar fármacos y de su preparación puede encontrarse en "*Tratado de Farmacia Galénica*", por C. Faulí i Trillo, 10ª edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

Para su aplicación en el tratamiento, el compuesto de fórmula (I) se encontrará preferiblemente en una forma farmacéutica sustancialmente pura o farmacéuticamente

aceptable, es decir el compuesto de fórmula (I) tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo excipientes farmacéuticamente aceptables y no incluye material que se considere tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para un compuesto de fórmula (I) son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, más preferiblemente superior al 90%. En una modalidad preferida, son superiores al 95%.

La cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (I) que va a administrarse dependerá generalmente, entre otros factores, del individuo que va a tratarse, de la gravedad de la enfermedad que padece dicho individuo, del método de administración elegido, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención sólo deben considerarse como pautas para el experto en la técnica y éste debe ajustar las dosis según las variables mencionadas anteriormente. No obstante, un compuesto de fórmula (I) puede administrarse una o más veces al día, por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 veces al día, en una cantidad diaria total típica comprendida entre 0,1 y 1000 mg/kg de masa corporal/día, preferiblemente 10 mg/kg de masa corporal/día.

El compuesto de fórmula (I), sus sales, profármacos y/o solvatos farmacéuticamente aceptables, así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden usarse junto con otros fármacos adicionales útiles para tratar enfermedades inflamatorias agudas y crónicas. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o alternativamente, pueden proporcionarse en forma de una composición separada para su administración simultánea o no simultánea con la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal, un profármaco o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Dentro del alcance de la presente invención, la expresión "enfermedad inflamatoria aguda y crónica" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno o estado que resulta de la activación y participación patogénica de células inflamatorias/inmunitarias y la cascada de citocina inflamatoria en la condición en la que la estimulación conjunta anómala es un mecanismo patogénico. Las células predominantes implicadas son células inflamatorias/inmunitarias tales como monocitos, macrófagos, CPA, células T, B y asesinas (*Natural Killer*, NK), células plasmáticas, granulocitos y mastocitos, o combinaciones de las subpoblaciones celulares anteriores implicadas en las enfermedades propuestas para el tratamiento.

El término "citocina" se refiere a una proteína secretada que afecta las funciones de otras células, particularmente si está relacionada con la modulación de interacciones entre células del sistema inmunitario o células implicadas en la respuesta inflamatoria. Dichas citocinas son TNF-alfa (factor de necrosis tumoral- α), IFN-gamma (interferón- γ), la quimiocina IL-8 (interleucina-8) y la citocina reguladora IL-10 (interleucina-10). La producción de IL-10 se induce por los altos niveles de TNF-alfa y promueve un

retrocontrol negativo tras la producción de TNF-alfa, tras el bloqueo de la transcripción de citocina proinflamatoria.

En un aspecto particular de la invención, la enfermedad inflamatoria aguda o crónica se selecciona de oligoartritis y poliartritis seropositivas o seronegativas, agudas y crónicas, espondiloartropatías, glomerulonefritis, colagenopatías, nefritis tubulointersticial, síndrome metabólico, aterosclerosis, osteoartritis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad pulmonar intersticial, esclerosis múltiple, enfermedades desmielinizantes, meningitis, encefalitis, meningoencefalitis, radiculopatías inflamatorias y neuropatías periféricas, enfermedad inflamatoria del intestino, cirrosis, hepatitis, insuficiencia cardíaca, enfermedad isquémica, insuficiencia renal, cistitis inflamatoria, hiperplasia prostática benigna, prostatitis, miocarditis, pericarditis, uveítis, dermatitis atópica, eccema, urticaria, psoriasis, rosácea, rinitis alérgica, septicemia, choque septicémico, insuficiencia multiorgánica, enfermedades autoinmunitarias sistémicas tal como lupus eritematoso sistémico, vasculitis, dermatomiositis, amiloidosis o sarcoidosis, enfermedades autoinmunitarias específicas del órgano tal como miastenia grave, tiroiditis o insulinitis, trasplante de órganos, enfermedad infecciosa e inducida por tumor, degeneración celular dependiente de TNF-alfa, necrosis, apoptosis, enfermedad de injerto contra huésped, caquexia y crecimiento celular patológico paracrino y autocrino.

En una modalidad preferida, la enfermedad inflamatoria aguda o crónica es poliartritis crónica seropositiva o seronegativa, más preferiblemente es artritis reumatoide.

Otro aspecto de la presente invención es un método para tratar una enfermedad inflamatoria aguda o crónica, que comprende administrar a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente o una composición farmacéutica del mismo.

El término "tratamiento" o "tratar" en el contexto de esta memoria descriptiva significa la administración de un compuesto con una formulación según la invención para prevenir, aliviar o eliminar la enfermedad o uno o más síntomas asociados a dicha enfermedad. "Tratamiento" también incluye prevenir, aliviar o eliminar las secuelas fisiológicas de la enfermedad.

El término "aliviar" en el contexto de esta invención se entiende que significa cualquier mejora de la situación del paciente tratado tanto subjetivamente (las sensaciones de o sobre el paciente) y objetivamente (parámetros medidos).

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente como un biomarcador de obtención de imágenes en tecnologías de obtención de imágenes y de obtención de imágenes farmacológicas, para encontrar lesiones inmunológicas, células diana y moléculas diana.

La tecnología de obtención de imágenes farmacológicas extiende el alcance de biomarcadores obtenidos mediante la combinación rápidamente creciente de tecnologías

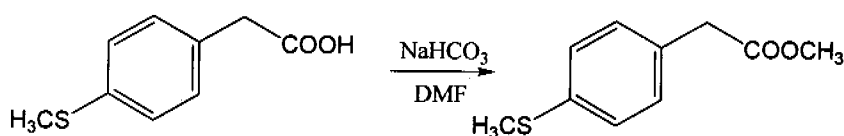
de obtención imágenes *in vivo* preclínicas (seguimiento molecular, celular, de órgano y animal completo y estudio de prueba de concepto y mecanismos, evaluación de la eficacia, etc.) y clínicas (médica humana) adecuadas, a aquellos datos de información valiosa generados por los compuestos descritos en el presente documento y usados como medicamentos.

La presente invención se explica adicionalmente a continuación por medio de ejemplos. Esta explicación no debe ser interpretada de ninguna manera como limitación del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

Ejemplos

Síntesis

Ejemplo 1. Síntesis de éster metílico del ácido (4-metiltiofenil)acético

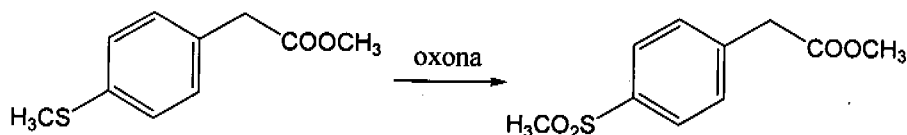


Se disolvieron 1,82 g (10 mmol) del ácido 4-metiltiofenilacético en 30 ml de DMF y se añaden entonces 1,34 g (16 mmol) de NaHCO_3 ; se agita la mezcla de agitación durante 15 min. aproximadamente. A continuación, se añaden 1,9 ml de ICH_3 manteniendo la agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Una vez ha transcurrido este tiempo, se vierte la mezcla en agua/hielo. Como no se produce precipitación se añade éter y se extrae. Se lava la fase orgánica con agua y tras secar sobre sulfato de sodio anhidro, se concentra la fase orgánica en un evaporador rotatorio dando 1,92 g (9,7 mmol, rendimiento del 97%) de aceite incoloro cuyos datos espectroscópicos confirman la estructura esperada. Este producto se usará en la siguiente etapa del procedimiento de síntesis sin purificación ya que proporciona una única mancha en CCF (eluyendo con diclorometano/metanol 9/1).

^1H RMN (CDCl_3): 7,2 (s, 4H) 3,7 (s, 3H) 3,5 (s, 2H) 2,4 (s, 3H CH_3S)

^{13}C RMN (CDCl_3): 171,5 136,9 130,4 129,4 126,4 51,6 40,2 15,5

Ejemplo 2. Síntesis de éster metílico del ácido (4-metilsulfonilfenil)acético



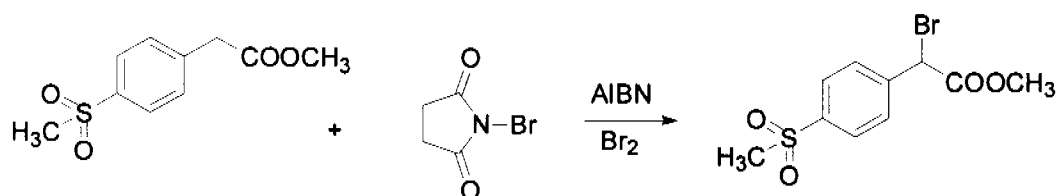
Se añadió gota a gota una disolución de oxona 30,7 g (50 mmol) en 80 ml de agua a una disolución de 3,4 g (17,3 mmol) del compuesto obtenido en el ejemplo 1 en 100 ml de metanol manteniendo la reacción en un baño de agua/hielo. Una vez se ha añadido,

continúa la agitación durante 5 h, dejando que la temperatura alcance el nivel ambiental. Entonces, se concentra parte del disolvente a presión reducida y se filtra el sólido precipitado lavando con agua repetidamente. Tras secar, este sólido pesa 3 g. Se extraen las aguas del filtrado con diclorometano, se lava la fase orgánica con agua, se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se concentra en un evaporador rotatorio obteniendo 1 g más del producto que lo esperado, dando 4 g (17 mmol, rendimiento del 100%). Este sólido funde con descomposición a 57°C y su pureza es del 99% mediante HPLC. Los datos espectroscópicos confirman la estructura esperada:

^1H RMN (CDCl_3): 7,9 (d, 2H), 7,5 (d, 2H), 3,7 (s, s 3+2H), 3,1 (s, 3H)

^{13}C RMN (CDCl_3): 170,80 140,13 139 130,33 127,63 52,31 44,49 40,82

Ejemplo 3. Síntesis de éster metílico del ácido bromo-(4-metilsulfonilfenil)acético



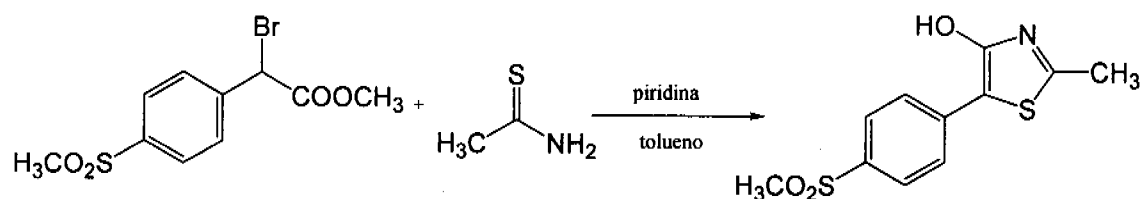
Se disolvieron 20 g (87,62 mmol) del éster en 300 ml de tetracloruro de carbono; se añadieron en porciones 19 g (105 mmol) de *N*-bromosuccinimida, 2 g (12,18 mmol) de azobisisobutironitrilo y 0,1 ml de bromo. Se calentó la mezcla de reacción a 80°C durante 3 horas y entonces se enfrió, se separó por filtración y se lavó con diclorometano. Se lavó el filtrado con agua y después con salmuera. Se secó la disolución sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a vacío dando 28 g de un aceite, que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida usando heptano/acetato de etilo (1/1) como eluyente. La concentración de las fracciones más puras dio 19,63 g (72,94% de rendimiento) del compuesto derivado de bromo.

pf: 81,8 – 83,3°C

^1H RMN (CDCl_3), δ : 7,9 (d, 2 H), 7,75 (d, 2H), 5,4 (s, 1H), 3,8 (s, 3H), 3,1 (s, 3H).

^{13}C RMN (CDCl_3), δ : 168,0 (C); 141,6 (C); 141,1 (C); 129,8 (CH); 127,8 (CH); 53,7 (CH); 44,7 (CH_3) y 44,2 (CH_3) ppm.

Ejemplo 4. Síntesis de 2-metil-5-(4-metilsulfonilfenil)tiazol-4-ol



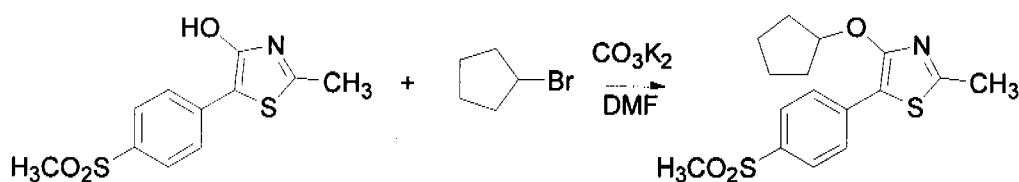
Se disolvieron 16,7 g (54,3 mmol) del éster obtenido en el ejemplo 3 en 400 ml de

tolueno, se añadieron entonces 19 ml de piridina y 4,08 g (54,34 mmol) de la tioamida. Se calentó la mezcla de reacción a 80°C (temperatura del baño) con agitación durante 2 h. A continuación, se dejó enfriar la mezcla y se filtró el sólido precipitado, se lavó con agua (2 x 50 ml) y después con éter (2 x 30 ml). Se secó el producto a vacío dando 7 g (26 mmol, rendimiento del 47,86%) de un sólido color crema que funde a 216-226°C. Los datos espectroscópicos confirman la estructura del producto esperado.

^1H RMN ($d^6\text{DMSO}$) δ : 11,8 (s, 1H) 7,8 (m, 4H) 3,1 (s, 3H) 2,6 (s, 3H) ppm

^{13}C RMN ($d^6\text{DMSO}$): 162,9 (C); 159,4 (C); 146,2 (C); 143,0 (C); 128,0 (CH); 126,1 (CH); 104,4 (C); 44,2 (CH_3); 19,9 (CH_3) ppm.

Ejemplo 5. Síntesis de 4-ciclopentiloxi-5-(4-metilsulfonilfenil)-2-metiltiazol.



Se disolvieron 7,0 g (26 mmol) del hidroxitiazol obtenido en el ejemplo 4 y 8,8 g (63,67 mmol) de carbonato de potasio en 200 ml de DMF. Se añadieron gota a gota 14 ml (130 mmol) de bromuro de ciclopentilo. Se calentó la mezcla de reacción a 80°C durante 3 horas y después de enfrió, se vertió sobre una mezcla de hielo/agua y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con agua (3 X 100 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró dando 12 g de un material bruto que cristalizó de heptano/éter (1/1). La purificación del producto mediante cromatografía ultrarrápida usando heptano/acetato de etilo (2/1) como eluyente dio 6,7 g (19,85 mmol, 76,39% de rendimiento) del compuesto 12.

pf: 124,6 – 125,2°C

^1H RMN (CDCl_3), δ : 7,9 (dd, 4H), 5,4, (m, 1H), 3,0, (s, 3H), 2,6, (s, 3H), 1,7-2,0 (m, 8H) ppm

^{13}C RMN (CDCl_3), δ : 162,6 (C); 159,5 (C); 138,3 (C); 137,1 (C); 128,1 (CH); 126,8 (CH); 109,1 (C); 83,7 (CH); 45,0 (CH_3); 33,5 (CH_2); 24,1 (CH_2); 20,4 (CH_3) ppm.

Ensayos biológicos

Material y métodos

1. Sujetos

Se realizó el estudio en sangre periférica heparinizada obtenida mediante punción venosa de voluntarios sanos y de pacientes con artritis reumatoide.

Los voluntarios sanos eran donantes de sangre bajo control rutinario dentro de la

práctica hospitalaria.

Los pacientes con artritis reumatoide incluidos en este estudio cumplían con los criterios de diagnóstico del Colegio Americano de Reumatología y mostraban una enfermedad clínicamente activa en el momento de la visita de inclusión habiéndose tratado durante al menos 6 meses con 20 mg/semana de metrotexato oral. El grado de actividad de enfermedad se definió tal como sigue: a) DAS28 $\geq$ 3,2 y/o b) 6 o más articulaciones hinchadas y 6 o más articulaciones con dolor. Como criterios de exclusión se consideraron los siguientes: a) padecer enfermedades infecciosas activas en la visita de inclusión; b) padecer enfermedades oncológicas antes de la inclusión; 3) padecer otra enfermedad autoinmunitaria específica de órgano o sistémica que no había entrado en remisión completa al menos un año antes de la visita de inclusión; d) padecer un estado hepático, cardíaco o renal grave no relacionado con los cambios a aquellos niveles inducidos por la artritis reumatoide como enfermedad principal; e) padecer un deterioro grave del estado general debido a un estado no relacionado con la enfermedad principal; f) haber recibido tratamiento con corticosteroides, inmunosupresores, fármacos citoestáticos y otros cualquiera con actividad conocida sobre el sistema inmunitario durante el año anterior a la visita de inclusión con la excepción de las dosis indicadas de metrotexato; 7) estar embarazada o en el posparto en la visita de inclusión.

El estudio se aprobó por el Comité de Investigación de la Universidad de Alcalá, Madrid, España.

2. Materiales

- Placas de cultivo tisular, de 96 pocillos, de fondo plano con tapa de baja evaporación, 353073 Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, 07417-1886, NJ, EE.UU.).
- Placas no estériles, de 96 pocillos, con fondo en V (Greiner, Soria Greiner, Madrid, España).
- Pipetas Pasteur desechables (Brand, Alemania).
- Pipetas Pipetman P de 20, 200, 1000 y 5000 l de volumen ajustable (Gilson, Francia).
- Multipipetas Eppendorf 4780 (Hamburgo, Alemania).
- Puntas estériles Eppendorf (Hamburgo, Alemania).
- Puntas estériles de propileno virgen (Daslab, Madrid, España).
- Tubos de plástico estériles de 5 y 10 ml (Daslab, Madrid, España).
- Tubos de centrifuga estériles de 15 y 50 ml (BD Falcon, Franklin Lakes, EE.UU.).
- Tubos de poliestireno para citómetro de 5 ml (BD Falcon, Franklin Lakes, EE.UU.).

- Tubos de extracción de sangre con heparina de 10 ml (Venojet, Terumo Europe, Bélgica)
- Tubos de extracción de plasma de 10 ml (BD Vacutainer, Plymouth, RU)
- Cargador de pipetas, Pipetboy plus (Flow Lab., Alemania).
- Filtros estériles de 22 m Millex-GS (Millipore, Molsheim, Francia).
- Cubreobjetos de cristal (Hirschman, Alemania).
- Cámara de recuento Neubauer (Saaringia, Alemania).
- Cámara de flujo laminar vertical Herasafe HS12 (Heraeus, Alemania).
- Estufa para cultivos celulares con regulación de CO₂ Heracell 150 (Heraeus, Alemania).
- Centrífuga refrigerada de Beckman. Multifuge 3SR (Heraeus, Alemania).
- Congelador a -70°C (Selecta, Tarrasa, España).
- Microscopio Olympus CHS-2 (Olympus, Tokio, Japón).
- Citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View EE.UU.), con software y analizador BD Cellquest Pro v. 5.5.1.
- Bioanalizador de matrices BD FACS.
- Lector de inmunoanálisis enzimático (Titertek Multiscan Plus, Flow laboratories).
- Contador de radioactividad beta de Beckman

3. Reactivos usados en la separación e identificación de subconjuntos celulares

- Solución salina de cloruro simple (SSF) Apiroserum (Ibys, Madrid, España).
- Lymphoprep (Ficoll-Hypaque, Nyegaard Co, Oslo, Noruega).
- Azul de tripano (Flucke AG., Buchs SG., Alemania).
- PBS FACS FLOW (Becton Dickinson).
- Tampón HEPES (Reactivos de Sigma y Panreac)
- Metil-³H timidina (³[H]-T). Actividad específica de 60 Ci/mmol (American Radiochemicals, ITISA, Madrid, España).
- Anticuerpos monoclonales usados en los estudios de citometría de flujo e inmunofluorescencia: Tabla 1

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales usados en el estudio:

CD*	Ac Mo	Subconjunto celular	Subclase	Fluorocromo
62L	SK11	Leucocitos. L-Selectina	IgG2a	Ficoeritrina (PE)

* Definido en el "7th Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens".

4. Reactivos usados en los cultivos celulares

- Medio completo preparado de RPMI-1640 (Cambrex BioSciences B4800 Verviers, Bélgica) complementado con el 1% de L-glutamina 200 mM y Hepes 25 mM (Flow Lab., Irvine, California, EE.UU.).
- Suero bovino fetal (FCS) (Gibco, Grand Island, NY, EE.UU.).
- Medio de cultivo: se usó medio completo añadiendo el 10% de FCS. Se eliminó el complemento de todo el suero calentando hasta 57°C durante 45 minutos.
- Fitohemaglutinina M (PHA) (Sigma nº de referencia L-8902, nº de lote 115K4132, Sigma, Madrid, España).
- LPS (*E. coli* 0111: cepa B4, InvivoGene, San Diego CA92121, EE.UU.).
- Mezcla de antibióticos. Una mezcla de ampicilina sódica 10 mg/ml (Britapen, Beecham A., Toledo, España), gentamicina sulfato 1,6 mg/ml (Tamadit Lab., Dr. Esteve SA., Madrid, España) y anfotericina B 0,5 g/ml (Fungizona, Squibb, Esplugues, Barcelona, España) se añadió al medio de cultivo.
- Anticuerpo monoclonal anti-CD3 (Orthoclone OKT3, Orthopharmaceutical Corporation, Raritan, NJ, EE.UU.).
- Anticuerpo monoclonal anti-CD28 (Clon 15E8, Menarini, Madrid, España).

5. Obtención de muestras biológicas

a) Sangre venosa: se obtuvieron células mononucleares de sangre venosa tal como se recogió mediante punción venosa antecubital. Se extrajeron cincuenta ml de sangre y se almacenaron en tubos de heparina litio (Venojet), se diluyeron adicionalmente con solución salina 1/1 (vol/vol) realizándose todo en condiciones estériles.

b) Recogida de subconjuntos de células humanas. Para aislar PBMC, se separaron los componentes sanguíneos restantes mediante un gradiente de densidad sobre Ficoll. Este método se basa en las diferencias de la densidad de células sanguíneas. En un tubo de centrifuga de 50 ml que contenía la sangre diluida y heparinizada se colocaron

cuidadosamente 15 ml de Ficoll-Hipaque (densidad de 1,077 g/ml). Tras 45 minutos de centrifugación (400 xg), se obtuvieron tres estratos (eritrocitos, Ficoll y plasma), separados por dos interfaces: las PBMC están contenidas en la ubicada entre el plasma diluido y el Ficoll. Puede recogerse aspirando con una pipeta Pasteur. Las células así obtenidas se resuspenden en SSF y se centrifugan (300 xg durante 10 minutos); se descarta el sobrenadante (proceso de lavado) y se resuspende el sedimento celular en medio RPMI 1640 con el 10% de PBS.

6. Estudio de viabilidad y recuento

En todas las suspensiones celulares se determinaron la concentración celular y viabilidades con una dilución al 0,1% de azul de tripano y recuento a microscopio en la cámara Neubauer. Se estableció el porcentaje de células vivas mediante la capacidad de exclusión por tinción. El experimento continuó sólo cuando la viabilidad celular era superior al 95%.

7. Cuantificación de citocinas séricas mediante ELISA

Con el fin de cuantificar la concentración de citocinas séricas, se almacenó la sangre extraída en tubos tanto con como sin anticoagulante (recogida mediante punción venosa antecubital y catéter arterial, respectivamente). Se dejó coagular la sangre a temperatura ambiente en el laboratorio, separando adicionalmente el suero mediante centrifugación (600 xg durante 20 minutos). Se recogieron los sobrenadantes, se filtraron, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -70°C. Se realizaron ensayos de concentración para diferentes citocinas usando los kits comerciales descritos en la tabla 2.

Tabla 2.- Kits ELISA comerciales usados en este estudio

Citocina	Sensibilidad de cuantificación en sobrenadantes (pg/ml)	PM en (KDa)	Compañía
TNF-alfa	3,83 pg/ml	17	Bender

Se descongelaron los sobrenadantes hasta la temperatura ambiente y se colocaron frente a la respectiva anti-citocina fijándolos en el fondo de la placa e incubándolos durante un tiempo variable. Posteriormente, se llevaron a cabo lavados y se añadieron las sustancias recomendadas por la compañía correspondiente con el fin de permitir una reacción colorimétrica, de manera proporcional a la cantidad de citocina presente en el sobrenadante. Se evaluaron los resultados con el lector de inmunoanálisis enzimático Multititer Plus (Tiertek Multiscan Plus, Flow Laboratories). Se compararon estos resultados con una curva patrón obtenida a partir de concentraciones conocidas de

cada citocina tal como se proporciona por la compañía.

Se realizó el análisis de las curvas patrón y la interpolación posterior con el software Delta Soft II versión 4.1 (Biometallics, Inc.) en un ordenador Apple Macintosh. Se convirtieron las concentraciones de citocina en moles con el fin de calcular las razones moleculares de cada caso y el número de moléculas solubles.

8. Ensayos de inmunofenotipo

Se usaron técnicas de inmunofluorescencia directas de un color con anticuerpos monoclonales marcados con ficoeritrina (PE). La PE es una sustancia fluorescente que puede excitarse con un láser de 488 nm, que emite a 570 nm y puede detectarse y distinguirse fácilmente mediante un citómetro de flujo. Usando los anticuerpos descritos en la tabla 1 se realizó un marcaje directo:

Marcaje de PBMC: el proceso consistía en un marcaje usando placas de fondo en V de 96 pocillos. En cada pocillo se ubican 5×10^4 células y después se centrifugan a 400 xg durante 5 minutos. Tras el lavado se resuspenden las células y se añaden 5 μ l del anticuerpo monoclonal correspondiente. Se resuspenden de nuevo las células y se incuban la placa en la oscuridad, durante 20 minutos, a 4°C. Posteriormente, se añaden 150 μ l de PBS y se realizan dos lavados. Finalmente, se resuspende en 150 μ l de PBS y se recoge en un tubo para citómetro, añadiendo PBS hasta un volumen final de 0,3 ml.

Para el recuento se usó un citómetro de flujo FACSCalibur equipado con láser de argón sintonizado a 488 nm con el fin de inducir fluorescencia de ficoeritrina. El equipo, aparte de los canales de fluorescencia, también proporcionaba información acerca del tamaño (FSC) y de la complejidad celular (SSC).

Como controles negativos, se usaron las células de estudio sin marcaje y otras irrelevantes marcadas con anticuerpos monoclonales de isotipos iguales que los usados en el estudio (IgG1-FITC, PE y TC, IgG2a FITC, PE, TC).

9. Cultivos celulares y estudios funcionales

Condiciones generales del cultivo: se realizaron todos los cultivos celulares en condiciones estériles dentro de una cámara de flujo laminar vertical, usando o bien materiales estériles desechables o bien esterilizados con aparatos esterilizadores o con óxido de etileno. Se mantuvieron los cultivos en una estufa a 37°C bajo CO₂ al 5% y una humedad relativa del 95%.

10. Estudio de proliferación con ³[H]-timidina

Los linfocitos expuestos a una estimulación con mitógenos experimentan un proceso de diferenciación celular y blastogénesis. El método usado para cuantificar la

proliferación celular era el ensayo de la incorporación de $^3\text{[H]}$ -timidina al ADN sintetizado de novo y se detectó la emisión de radiación beta a partir de los extractos secos de cultivos celulares (a los que se les añadió la base tritiada) antes de su finalización y recogida. En los diferentes experimentos realizados para estudiar la proliferación, se incubaron las preparaciones celulares purificadas en placas de fondo plano de 96 micropocillos a concentraciones de 5×10^4 células/pocillo (volumen final de 200 μl), en presencia de diferentes concentraciones de diversos mitógenos con repeticiones por triplicado y a lo largo de 4 días de cultivo.

La respuesta a estímulos específicos dependió de la densidad y del tipo celular estudiado, así como del tiempo de cultivo y de la concentración del agente mitogénico.

De veinte a veinticuatro horas antes de finalizar el cultivo celular se añadió a cada pocillo 1 microCi de $^3\text{[H]}$ -timidina; se recogieron los cultivos mediante aspiración a través de un filtro de vidrio usando un recolector de cultivo específico.

La síntesis de ADN se expresó en cuentas por minuto (c.p.m.). Se realizó cada ensayo por triplicado, rechazando aquellos datos con una variabilidad superior al 10% en la media del triplicado ya que podrían indicar un error técnico o una contaminación del cultivo. Se realizaron los cultivos con una cantidad constante de células por pocillo así como con un volumen constante de 200 μl . Se sometieron a prueba en primer lugar todos los mitógenos y citocinas llevando a cabo curvas de dosis-respuesta y tiempo-respuesta.

11. Ensayos para la determinación analítica mediante citometría de flujo multiparamétrica cuantitativa (matrices de perlas para citometría o CBA BD™)

Se siguió el protocolo para CBA según las instrucciones del fabricante. La elección de micropartículas se realizó según el resumen de la figura 1. Aquéllas que mostraron un riesgo pequeño de solapamiento espectral se seleccionaron finalmente.

El número de catálogo y lote de cada reactivo usado para este desarrollo experimental se muestra en las tablas 3 y 4. La obtención de muestras se realizó con el sistema de bioanalizador de matrices BD FACS (FACSArray, Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.) y los análisis de los resultados se completaron con el software FCAP Array (Becton Dickinson) en un ordenador personal.

Brevemente, el protocolo experimental consistía en un prelavado de placas con tampón de lavado. Tras la decantación, se resuspendió la mezcla de micropartículas de captura en el vórtex. Se añadieron patrones y muestras en la dilución adecuada. Tras la incubación con agitación permanente durante 1 h, se añadió el reactivo de detección de PE y se incubó de nuevo durante 2 h a temperatura ambiente. Tras un lavado se realizó la obtención en el citómetro de flujo.

Tabla 3. –Kit para el sistema Multiplex Flex Set de proteínas solubles humanas de CBA.

Reactivo	Nº catálogo	Lote	
<u>Kit de tampón maestro, 500 pruebas</u>	558265	95098	
Diluyente de ensayo	51-90003992	86192	
Diluyente de perlas de captura	51-90003804	90262	
Diluyente de reactivo de detección	51-90003993	95811	
Tampón de lavado	51-90003798	85964	
Perlas de montaje de instrumento A1	51-90003855	87987	
Perlas de montaje de instrumento A9	51-90003858	95933	
Perlas de montaje de instrumento F1	51-90003851	89231	
Perlas de montaje de instrumento F9	51-90003854	94229	
Perlas de montaje de instrumento F1 de PE	51-9005038	94498	
Detector de control positivo de PE	51-9005065	92154	
<u>Kits para Flex Set de CBA</u>			Sensibilidad
IL-8 (A9)	558277	85109	1,2 pg/ml
IL-10 (B7)	558274	97196	0,13 pg/ml
TNF- α (D9)	558273	85106	0,7 pg/ml
IFN- γ (E7)	558269	81562	1,8 pg/ml

Tabla 4. –Lotes de reactivos incluidos en el diseño del kit para Flex Set de CBA.

Reactivo	Patrón	Micropartículas de captura	Reactivo fluorescente (PE)
IL-8 (A9)	84854	87670	77948
IL-10 (B7)	70333	96280	95934
TNF- α (D9)	65908	87667	77294
IFN- γ (E7)	80390	87664	77136

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de las pruebas experimentales se presentaron como las medias y errores estándar y estimados de la media, según el tipo de distribución.

Para el análisis estadístico, se analizó en primer lugar la naturaleza de las distribuciones usando el contraste de normalidad Shapiro-Whilk. Se usó el contraste no paramétrico de Mann-Whitney U para establecer comparaciones. En todos los casos, se valoraron los niveles de significación inferiores al 5% ($p < 0,05$).

Se realizó el análisis estadístico con el software SPSS 11.0 (SPSS Inc. Headquarters, 233 S. Wacker Drive, 11ª planta. Chicago, Illinois 60606)

Resultados de los estudios sobre los efectos inmunomoduladores del compuesto 12.

Efectos inmunomoduladores del compuesto 12 sobre la producción de TNF-alfa, IFN-gamma y otras citocinas por las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en voluntarios sanos y pacientes con artritis reumatoide.

Ejemplo 6. Efectos del compuesto 12 sobre la producción de TNF-alfa

Se investigaron en primer lugar los efectos del compuesto 12 sobre la producción de TNF-alfa por PBMC de voluntarios sanos en presencia o en ausencia de LPS. Se cultivaron PBMC (5×10^4 células/pocillo, 200 μ l) de 10 voluntarios sanos en paralelo por duplicado en placas de cultivo tisular, de 96 pocillos, de fondo plano con tapa de baja evaporación (353072 Falcon, Becton Dickinson labware, Franklin Lakes, EE.UU., 07417-1886 NJ) en medio completo (RPMI-1640 con glutamina Cat BE-12-70F, Cambrex Biosciences, B4880 Verviers, Bélgica), complementado con suero bovino fetal (origen de EE.UU., Gibco ref. 26140-079) y una concentración de disolvente de 10^{-6} M solo o complementado con 10^{-6} M o 10^{-7} M del compuesto 12, en presencia y en ausencia de LPS (10 microg/ml; LPS de *E. coli* cepa 0111:B4 InvivoGene, San Diego CA92121 EE.UU.) durante 24 horas. Se congeló el sobrenadante de los cultivos a -20°C y se cuantificó la concentración de TNF-alfa con ELISA específica de especie (ensayo de inmunoabsorción asociado a enzima para la detección cuantitativa de factor de necrosis tumoral alfa: ELISA para TNF-alfa humano BM S223/4TEUCE, Bender Med System Inc, Burlinghane CA 94010).

La figura 2 muestra que la presencia del compuesto 12 en el cultivo, a concentraciones de 10^{-6} M y 10^{-7} M redujo de manera estadísticamente significativa la concentración de TNF-alfa tal como se cuantificó en el sobrenadante del cultivo de PBMC estimuladas con LPS ($p<0,05$). Además, el compuesto 12, a 10^{-6} M también disminuyó la producción espontánea de TNF-alfa por PBMC.

Tabla 5. –Producción de TNF-alfa en voluntarios sanos. Los resultados se indican como la mediana $\pm$ los valores de error estándar de la citocina secretada. Los resultados estadísticamente significativos se indican en **negrita**, con sus correspondientes valores p (datos con respecto al vehículo para cada condición experimental) incluidos entre paréntesis.

n=10	Producción de TNF-alfa en PBMC de voluntarios sanos (pg/ml)		
	vehículo	10^{-6} M	10^{-7} M
medio	1118,00 $\pm$ 800,00	551,60$\pm$324,17 (0,009)	1121,00 $\pm$ 100,48 (0,114)
LPS (10 μ g/ml)	3084,63 $\pm$ 450,00	1064,91$\pm$52,82 (0,005)	1938,00$\pm$487,74 (0,028)

Los efectos inmunomoduladores del compuesto 12 se caracterizaron además sobre la producción de un panel de citocinas por PBMC o bien tras la estimulación de monocitos con cualquier LPS o bien la activación de linfocitos con una combinación de anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28. Se realizó este estudio en presencia o ausencia de dosis valoradas del compuesto 12 en cultivos de PBMC obtenidas de voluntarios sanos y pacientes con artritis reumatoide.

Se cultivaron por duplicado PBMC (5×10^4 células/pocillo) de 13 voluntarios sanos en 200 l de medio completo complementado con la mayor concentración de disolvente (10^{-6} M), o 10^{-6} M y 10^{-7} M del compuesto 12 y en presencia y en ausencia de LPS (10 g/ml) durante 24 horas. Se congeló el sobrenadante de los cultivos a -20°C y se llevó a cabo la cuantificación mediante un bioanalizador de matrices BD FACS (BD Biosciences nº de catálogo 340128, San Diego CA 92121) usando reactivos específicos para el ensayo simultáneo de la concentración de citocinas indicada (CBA Flex Multiplex Set (matriz de perlas para citometría BD™, CBA: IL-8, IL-10, TNF-alfa e IFN-gamma Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, San Diego CA 92121).

La presencia del compuesto 12 en el cultivo, a concentraciones de 10^{-6} M y 10^{-7} M redujo la producción de TNF-alfa por las PBMC de voluntarios sanos estimuladas con LPS de manera estadísticamente significativa ($p<0,05$) (figura 3). Por lo contrario, el compuesto 12 no modificó ni la secreción de TNF-alfa por las PBMC estimuladas con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 ni la espontánea (tal como se observa en ausencia de estímulos exógenos).

Tabla 6. –Producción de TNF-alfa en voluntarios sanos. Los resultados se indican como la media $\pm$ los valores de error estándar de la citocina secretada. Los resultados estadísticamente significativos se indican en **negrita**, con sus correspondientes valores p (datos con respecto al vehículo para cada condición experimental) incluidos entre paréntesis.

n=13	Producción de TNF-alfa en PBMC de voluntarios sanos (pg/ml)			
	vehículo	10^{-6} M	10^{-7} M	10^{-8} M
medio	163,84 $\pm$ 30,00	148,31 $\pm$ 50,00 (0,422)	197,81 $\pm$ 40,00 (0,249)	168,49 $\pm$ 16,00 (0,65)
LPS (10 g/ml)	923,93 $\pm$ 160,00	602,12$\pm$100,00 (0,002)	746,84$\pm$125,00 (0,046)	738,81$\pm$100,00 (0,055)
anti-CD3 (12,5 ng/ml) + anti-CD28 (1/3 $\times$ 10 ⁵)	435,81 $\pm$ 60,00	334,21 $\pm$ 63,00 (0,116)	404,11 $\pm$ 97,00 (0,753)	355,62 $\pm$ 65,00 (0,422)

En otro experimento, se cultivaron por duplicado PBMC (5×10^4 células por pocillo) de 7 pacientes con artritis reumatoide en 200 l de medio completo complementado con el mayor disolvente (10^{-6} M), y 10^{-6} M, 10^{-7} M y 10^{-8} M del compuesto 12 y en presencia y

ausencia de o bien LPS (10 g/ml) o bien anti-CD3 (12,5 ng/ml) (Orthoclone OKT3, Ortho Pharmaceutical Corporation, Raritan NJ, EE.UU.) + anti-CD28 (1/3x10⁵) (Clon 15E8, Menarini, Madrid, España), durante 24 horas. Se congelaron los sobrenadantes de los cultivos a -20°C y se cuantificó la concentración de TNF-alfa mediante un bioanalizador de matrices BD FACS usando un Flex Set de CBA (Becton Dickinson), específico para determinar la concentración de esa citocina, siguiendo las instrucciones del fabricante.

En PBMC estimuladas con LPS de pacientes con artritis reumatoide, la producción de TNF-alfa se inhibió significativamente por el compuesto 12 a una concentración de 10⁻⁶ M (p<0,05) (figura 4). La presencia del compuesto 12 en el cultivo ni inhibió la producción de TNF-alfa espontánea ni la obtenida tras la estimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 en PBMC de pacientes con artritis reumatoide.

Tabla 7. -Producción de TNF-alfa en pacientes con artritis reumatoide. Los resultados se indican como la media ± los valores de error estándar de la citocina secretada. Los resultados estadísticamente significativos se indican en negrita, con sus correspondientes valores p (datos con respecto al vehículo para cada condición experimental) incluidos entre paréntesis.

n=7	Producción de TNF-alfa en PBMC de pacientes con artritis reumatoide (pg/ml)			
	vehículo	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M
medio	100,64±40,00	177,32±95,00 (0,735)	191,33±80,00 (0,735)	131,95±85,00 (0,735)
LPS (10 g/ml)	700,39±180,00	383,75±75,00 (0,05)	626,57±150,00 (0,237)	683,40±120,00 (0,499)
anti-CD3 (12,5 ng/ml) + anti-CD28 (1/3x10 ⁵)	648,72±90,00	532,07±80,00 (0,31)	568,47±97,00 (0,612)	695,81±79,00 (0,398)

Ejemplo 7. Efectos del compuesto 12 sobre la producción de IFN-gamma.

Se cultivaron por duplicado PBMC (5 x 10⁴ células por pocillo) de 13 voluntarios sanos en 200 l de medio completo complementado con la mayor concentración de disolvente (10⁻⁶ M), y con 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M y 10⁻⁸ M del compuesto 12 en presencia o ausencia de o bien LPS (10 g/ml) o bien anti-CD3 (12,5 ng/ml) + anti-CD28 (1/3x10⁵), durante 24 horas. Se congelaron los sobrenadantes de los cultivos a -20°C y se cuantificó la concentración de IFN-gamma mediante un bioanalizador de matrices BD FACS usando un Flex Set de CBA (Becton Dickinson), específico para determinar la concentración de IFN-gamma, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El compuesto 12, a una concentración de 10⁻⁶ M inhibió significativamente la

producción de IFN-gamma por PBMC de voluntarios sanos o bien estimuladas con LPS o bien estimuladas con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 ($p<0,05$) (figura 5).

Tabla 8. –Producción de IFN-gamma en voluntarios sanos. Los resultados se indican como la media $\pm$ los valores de error estándar de la citocina secretada. Los resultados estadísticamente significativos se indican en negrita, con sus correspondientes valores p (datos con respecto al vehículo para cada condición experimental) incluidos entre paréntesis.

n=13	Producción de IFN-gamma en PBMC de voluntarios sanos (pg/ml)			
	vehículo	10^{-6} M	10^{-7} M	10^{-8} M
medio	283,78 $\pm$ 90,00	189,72 $\pm$ 40,00 (0,279)	296,28 $\pm$ 90,00 (0,807)	279,16 $\pm$ 60,00 (0,807)
LPS (10 g/ml)	860,42 $\pm$ 105,00	649,61$\pm$120,00 (0,011)	919,53 $\pm$ 130,00 (0,552)	1049,85 $\pm$ 230,00 (0,382)
anti-CD3 (12,5 ng/ml) + anti-CD28 ($1/3 \times 10^5$)	11802,22 $\pm$ 1300,00	7927,17$\pm$1003,00 (0,019)	11552,08 $\pm$ 1600,00 (0,917)	10254,66 $\pm$ 1500,00 (0,196)

El compuesto 12 no modificó la secreción espontánea de IFN-gamma por PBMC de voluntarios sanos.

Se cultivaron por duplicado PBMC (5×10^4 células/pocillo) de 8 pacientes con artritis reumatoide en 200 l de medio completo complementado con la mayor concentración de disolvente (10^{-6} M), y 10^{-6} M, 10^{-7} M y 10^{-8} M del compuesto 12, en presencia y ausencia o bien de LPS (10 g/ml) o bien anti-CD3 (12,5 ng/ml) + anti-CD28 ($1/3 \times 10^5$), durante 24 horas. Se congelaron los sobrenadantes de los cultivos a -20°C y se evaluó la concentración de IFN-gamma mediante un bioanalizador de matrices BD FACS usando un Flex Set de CBA, específico para determinar la concentración de IFN-gamma, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La presencia del compuesto 12, a concentraciones de 10^{-6} M, 10^{-7} M y 10^{-8} M, redujo significativamente la producción de IFN-gamma por PBMC de pacientes con artritis reumatoide cuando se indujeron mediante la estimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 ($p<0,05$) (figura 6). El compuesto 12 no modificó ni la secreción de IFN-gamma espontánea ni la inducida por LPS por las PBMC de voluntarios sanos.

Tabla 9. –Producción de IFN-gamma en pacientes con artritis reumatoide. Los resultados se indican como la media $\pm$ los valores de error estándar de la citocina secretada. Los resultados estadísticamente significativos se indican en negrita, con sus correspondientes valores p (datos con respecto al vehículo para cada condición experimental) incluidos entre paréntesis.

51

n=8	Producción de IFN-gamma en PBMC de pacientes con artritis reumatoide (pg/ml)			
	vehículo	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M
medio	145,49±28,00	193,68±45,00 (0,779)	203,72±50,00 (0,208)	235,10±60,00 (0,674)
LPS (10 g/ml)	461,14±85,00	205,26±46,00 (0,484)	146,50±33,00 (0,208)	248,73±35,00 (0,889)
anti-CD3 (12,5 ng/ml) + anti-CD28(1/3x10 ⁵)	8406,18±1000,00	5115,27±600,00 (0,05)	6411,71±700,00 (0,05)	7122,07±950 (0,017)

Ejemplo 8. Efectos del compuesto 12 sobre la producción de interleucina 8 (IL-8).

Se investigó adicionalmente el efecto del compuesto 12 sobre la producción de IL-8 por las PBMC de voluntarios sanos, tanto en presencia como en ausencia de estímulos de LPS y anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28. Se cultivaron por duplicado PBMC (5 x 10⁴ células/pocillo) de 13 voluntarios sanos en 200 l de medio completo complementado con la mayor concentración de disolvente (10⁻⁶ M), y con 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M y 10⁻⁸ M del compuesto 12, en presencia y ausencia de o bien LPS (10 g/ml) o bien anti-CD3 (12,5 ng/ml) + anti-CD28 (1/3x10⁵), durante 24 horas. Se congelaron los sobrenadantes de los cultivos a -20°C y se cuantificó la concentración de IL-8 mediante un bioanalizador de matrices BD FACS usando un CBA Flex Set, específico para determinar la concentración de IL-8, siguiendo las instrucciones del fabricante.

A concentraciones de 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M y 10⁻⁸, el compuesto 12 inhibía significativamente la producción espontánea de IL-8 (p< 0,05) (figura 7). Se observó una inhibición significativa de la producción de IL-8 inducida por los anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 con el compuesto 12 a concentraciones de 10⁻⁷ y 10⁻⁸ M. No obstante, no se observó ningún efecto sobre la producción de IL-8 con la estimulación con LPS de las PBMC.

Tabla 10. -Producción de IL-8 por PBMC de voluntarios sanos. Los resultados se indican como la media ± los valores de error estándar de la citocina secretada. Los resultados estadísticamente significativos están indicados en **negrita**, con sus correspondientes valores p (datos con respecto al vehículo para cada condición experimental) incluidos entre paréntesis.

n=13	Producción de IL-8 por las PMBC de voluntarios sanos (pg/ml)			
	vehículo	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M
medio	72814,17±10647,1 6	45634,31±6311,13 (0,016)	53732,66±7952,75 (0,006)	57773,60±6667,57 (0,087)
LPS (10 g/ml)	173877,36±8474,4 9	168467,15±9656,9 6 (0,807)	162075,59±10258,4 1 (0,249)	169609,11±9060,9 0 (0,861)

52

anti-CD3 (12,5 ng/ml) + anti- CD28(1/3x10 ⁵)	107008,56±8351,2 1	99779,72±20000 (0,311)	97968,61±10220,21 (0,055)	92989,29±8463,47 (0,028)
---	-----------------------	---------------------------	--	---

También se estudió el efecto sobre la producción de IL-8 por las PBMC de pacientes con artritis reumatoide. Se cultivaron por duplicado PBMC (5 x 10⁴ células por pocillo) de 8 pacientes con artritis reumatoide en 200 l de medio completo complementado con la mayor concentración de disolvente (10⁻⁶ M), y 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M y 10⁻⁸ M del compuesto 12, en presencia y en ausencia de o bien LPS (10 g/ml) o bien anti-CD3 (12,5 ng/ml) + anti-CD28 (1/3x10⁵), durante 24 horas. Se congelaron los sobrenadantes de los cultivos a -20°C y se cuantificó la concentración de IL-8 mediante un bioanalizador de matrices BD FACS usando un CBA Flex Set, específico para determinar la concentración de IL-8, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La presencia del compuesto 12 en el cultivo, a concentraciones de 10⁻⁶ M y 10⁻⁸ M, modulaba significativamente la producción de IL-8 inducida por LPS en PBMC de pacientes con artritis reumatoide mientras que no modificaba ni la producción espontánea de IL-8 ni la inducida por la combinación de anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 (figura 8). En total, los resultados indican que la modulación de IL-8 por el compuesto 12 podría mostrar de manera interesante patrones de modulación distintos en estados distintos de salud y enfermedades definidas.

Tabla 11. -Producción de IL-8 por PBMC en pacientes con artritis reumatoide. Los resultados se indican como la media ± los valores de error estándar de la citocina secretada. Los resultados estadísticamente significativos están indicados en negrita, con sus correspondientes valores p (datos con respecto al vehículo para cada condición experimental) incluidos entre paréntesis.

n=8	Producción de IL-8 en las PMBC de pacientes con artritis reumatoide (pg/ml)			
	vehículo	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M
medio	57877,64±11143,52	98012,08±8395,97 (0,208)	96498,50±10784,62 (0,161)	93977,67±9247,38 (0,123)
LPS (10 g/ml)	150759,65±22966,06	185536,78±22000,00 (0,012)	174156,23±13385,66 (0,208)	184541,37±21500,00 (0,012)
anti-CD3(12,5 ng/ml) + anti- CD28(1/3x10 ⁵)	118017,97±21116,00	124576,09±14605,02 (0,263)	109607,00±18310,15 (0,889)	121587,88±16117,25 (0,575)

Ejemplo 9. Efectos del compuesto 12 sobre la producción de interleucina 10 (IL-10).

Se investigaron los efectos del compuesto 12 sobre la producción de IL-10 por las PBMC de voluntarios sanos y pacientes con artritis reumatoide en presencia y ausencia de estimulación con LPS y con la combinación de anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28. Se cultivaron por duplicado PBMC (5×10^4 células por pocillo) de 13 voluntarios sanos en 200 I de medio completo complementado con la mayor concentración de disolvente (10^{-6} M), y con 10^{-6} M, 10^{-7} M y 10^{-8} M del compuesto 12, en presencia y ausencia de o bien LPS (10 g/ml) o bien anti-CD3 ($12,5 \text{ ng/ml}$), + anti-CD28 ($1/3 \times 10^5$), durante 24 horas.

Por otro lado, se cultivaron por duplicado PBMC (5×10^4 células por pocillo) de 8 pacientes con artritis reumatoide en 200 I de medio completo complementado con la mayor concentración de disolvente (10^{-6} M), y 10^{-6} M, 10^{-7} M y 10^{-8} M del compuesto 12 en presencia y ausencia de o bien LPS (10 g/ml) o bien anti-CD3 ($12,5 \text{ ng/ml}$), + anti-CD28 ($1/3 \times 10^5$), durante 24 horas. Se congelaron los sobrenadantes de los cultivos a -20°C y se sometió a ensayo la concentración de IL-10 mediante un bioanalizador de matrices BD FACS usando un CBA Flex Set, específico para determinar la concentración de IL-10, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El compuesto 12 no mostró ningún efecto sobre la producción de IL-10 por las PBMC de voluntarios sanos en presencia y en ausencia de ambos estímulos estudiados (figura 9). Sin embargo, la presencia del compuesto 12 en el cultivo, a una concentración de 10^{-8} , modulaba por aumento significativamente la producción de IL-10 tras la estimulación de PBMC de pacientes con artritis reumatoide con LPS ($p < 0,05$). El compuesto 12 no indujo ningún efecto significativo ni sobre la producción espontánea de IL-10 ni tras la estimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 por las PBMC de pacientes con artritis reumatoide (figura 10).

Tabla 12. -Producción de IL-10 en voluntarios sanos. Los resultados se indican como la media $\pm$ los valores de error estándar de la citocina secretada. Los correspondientes valores p (datos con respecto al vehículo para cada condición experimental) incluidos entre paréntesis.

n=13	Producción de IL-10 por las PMBC de voluntarios sanos (pg/ml)			
	vehículo	10^{-6} M	10^{-7} M	10^{-8} M
medio	$490,46 \pm 87,16$	$559,06 \pm 112,20$ (0,753)	$609,10 \pm 108,74$ (0,701)	$578,66 \pm 106,20$ (0,861)
LPS (10 g/ml)	$2342,20 \pm 384,02$	$2420,68 \pm 455,50$ (0,507)	$2392,99 \pm 427,86$ (0,507)	$2389,63 \pm 366,01$ (0,701)
anti-CD3 ($12,5 \text{ ng/ml}$) + anti-CD28($1/3 \times 10^5$)	$1042,64 \pm 162,36$	$1239,47 \pm 251,24$ (0,507)	$1132,69 \pm 213,32$ (0,382)	$1122,51 \pm 211,03$ (0,507)

Tabla 13. -Producción de IL-10 en pacientes con artritis. Los resultados se indican como la media $\pm$ los valores de error estándar de la citocina secretada. Los resultados estadísticamente significativos están indicados en **negrita**, con sus correspondientes valores p (datos con respecto al vehículo para condición experimental) incluidos entre paréntesis.

n=8	Producción de IL-10 en las PMBC de pacientes con artritis reumatoide (pg/ml)			
	vehículo	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M
medio	452,69 $\pm$ 107,47	682,50 $\pm$ 113,65 (0,674)	798,92 $\pm$ 144,46 (0,401)	468,14 $\pm$ 65,80 (0,263)
LPS (10 g/ml)	2388,64 $\pm$ 300,00	2787,12 $\pm$ 416,91 (0,069)	2597,85 $\pm$ 513,19 (0,327)	3000,00 $\pm$ 400,00 (0,025)
anti-CD3(12,5 ng/ml) + anti-CD28(1/3x10 ⁵)	836,39 $\pm$ 189,09	976,96 $\pm$ 187,99 (0,484)	805,41 $\pm$ 141,23 (1,000)	872,06 $\pm$ 150,87 (0,674)

Otros efectos del compuesto 12 sobre células del sistema inmunitario.

Ejemplo 10. Efecto del compuesto 12 sobre la respuesta proliferativa de las PBMC.

Se investigó el efecto del compuesto 12 sobre la respuesta proliferativa de las PBMC de voluntarios sanos (n=8) en presencia y en ausencia de estimulación con fitohemaglutinina (PHA) 10 g/ml; PHA 2 g/ml más complemento de IL-2 exógena (25 UI/ml), y una combinación de anticuerpos monoclonales anti-CD3 (12,5 ng/ml) y anti-CD28 (1:320,000).

Se cultivó PBMC durante 4 días (50.000 células por pocillo) a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5% (incubador celular HERA Cell 150, Thermoscientific, Thermoelectron, 63505 Lagenselbold, GE) en medio de cultivo completo. Las condiciones de estimulación de cultivo eran la ausencia o presencia de fitohemaglutinina (PHA Sigma nº de ref. L-8902, Madrid, España), 10 g/ml; PHA 2 g/ml con complemento de IL-2 exógena (25 UI/ml, IL-2 humana recombinante, Macrolin, Chiron Ibérica, nº de lote SA753228/4, Madrid, España) y anticuerpos monoclonales anti-CD3 (12,5 ng/ml) + anti-CD28 (1:320,000). Se añadió metil-³H-timidina (American Radiochemical metil-³H-timidina 60 Ci/mmol, ITISA, Madrid, España) durante las últimas 8 horas de cultivo. Se recogieron las células en membranas de fibra de vidrio y se incluyeron en medio de centelleo (1450-441 Meltilex A, de Wallac Oy, nº de ref. 1450-441). Se cuantificó el ADN radioactivo incorporado usando

un contador de partículas beta Wallac Oy. Como control de la viabilidad de los cultivos, se observaron éstos al microscopio (Zeiss Axiovert 40CFL, Karl Zeiss Microimagen GmbH, Göttingen, Alemania) en cuanto a la densidad y morfología de los cultivos celulares en presencia de medio, sin ninguna otra señal, con el fin de detectar y cuantificar las acciones directas mitogénicas posibles de las moléculas del estudio sobre las PBMC, y se evaluó la viabilidad celular tras la incubación.

La presencia del compuesto 12 en el cultivo no modificó significativamente la respuesta proliferativa de las PBMC de voluntarios sanos en ausencia y en presencia de los diversos estímulos mitogénicos estudiados (figuras 11a y 11b).

Ejemplo 11. Efecto del compuesto 12 sobre el desprendimiento de CD62L por las PBMC

Se investigó el efecto del compuesto 12 sobre el desprendimiento de CD62L en linfocitos y monocitos de PBMC de voluntarios sanos.

En presencia del compuesto 12 a una concentración de 10^{-6} M, el desprendimiento de CD62L (CD62L-ficoeritrina (PE), clon BD SK11 nº de cat. 341012, BD Biosciences) aumenta significativamente ($p < 0,05$). Notablemente, esta disminución en la intensidad de fluorescencia media geométrica (MFI, *mean fluorescence intensity*) del marcaje de CD62L-PE detectado tras el desprendimiento de CD62L se produjo selectivamente en los linfocitos pero no se observaron diferencias significativas en los monocitos (figuras 12a y 12b).

Tabla 14. -Intensidad de fluorescencia media de la expresión de CD62L superficial en linfocitos. Los valores p corresponden a los datos con respecto al vehículo para cada condición experimental.

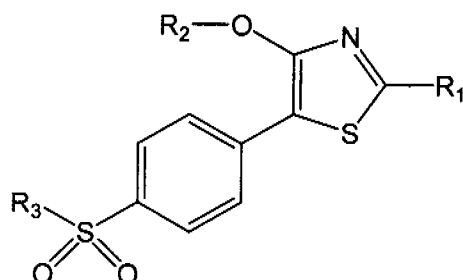
n=10	Linfocitos (media $\pm$ error estándar)/ significación estadística		
	vehículo	10^{-6} M	10^{-7} M
MFI (p)	112,68 $\pm$ 13,57	90,01 $\pm$ 8,93 (0,47)	116,90 $\pm$ 11,02 (0,333)

Tabla 15. -Intensidad de fluorescencia media de la expresión de CD62L superficial en monocitos. Los valores p corresponden a los datos con respecto al vehículo para cada condición experimental.

n=10	Monocitos (media $\pm$ error estándar)/ significación estadística		
	vehículo	10^{-6} M	10^{-7} M
MFI (p)	65,34 $\pm$ 8,06	63,90 $\pm$ 8,52 (0,721)	72,30 $\pm$ 10,21 (0,878)

REIVINDICACIONES

1. El uso del compuesto de fórmula (I):



(I)

en la que:

R₁ se selecciona de alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heterociclilo sustituido o no sustituido;

R₂ se selecciona de hidrogeno, alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido; y N(R'R'') donde R' y R'' son independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆; y

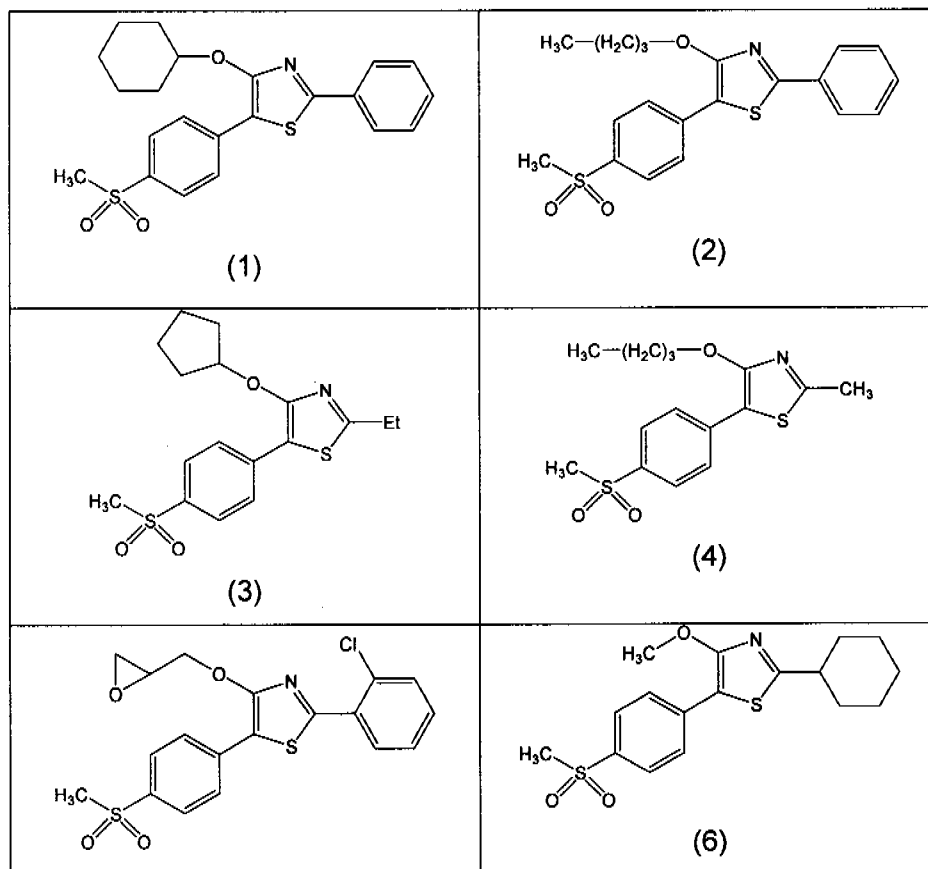
R₃ es un radical alquilo C₁₋₆,

o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria aguda o crónica, mediante la inhibición de la producción de al menos una citocina pro-inflamatoria seleccionada de TNF-alfa e IFN-gamma, o mediante la inmunomodulación de la quimiocina IL-8 y/o la citocina reguladora IL-10.

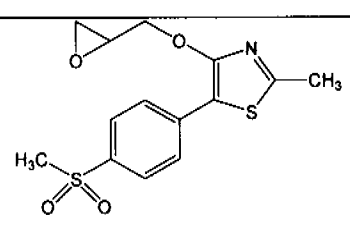
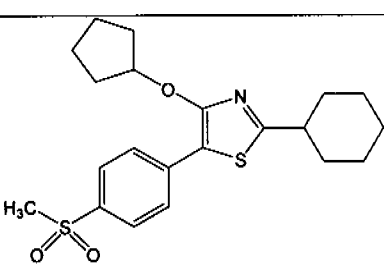
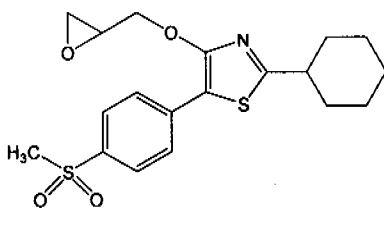
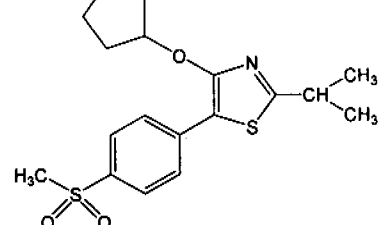
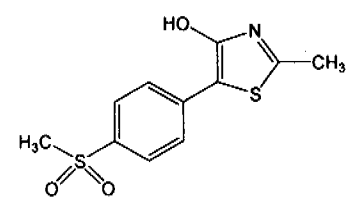
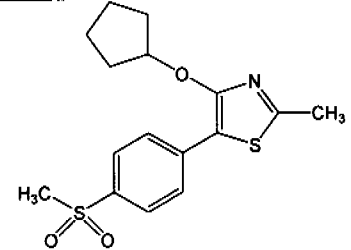
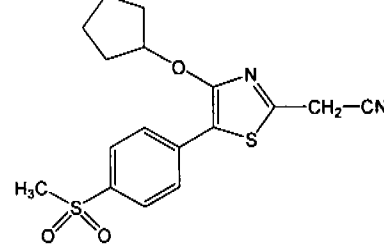
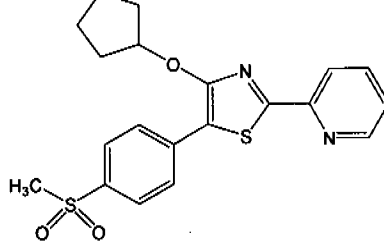
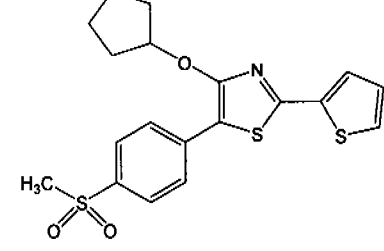
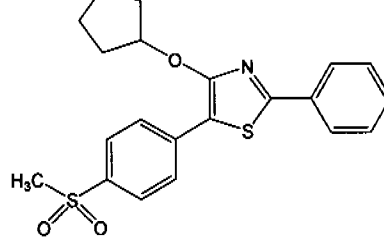
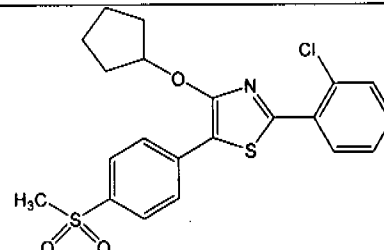
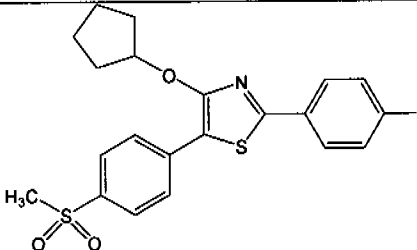
2. El uso según las reivindicación 1, en el que la enfermedad inflamatoria aguda o crónica se selecciona de oligoartritis y poliartritis seropositivas o seronegativas, agudas y crónicas, espondiloartropatías, glomerulonefritis, collagenopatías, nefritis tubulointersticial, síndrome metabólico, aterosclerosis, osteoartritis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad pulmonar intersticial, esclerosis múltiple, enfermedades desmielinizantes, meningitis, encefalitis, meningoencefalitis, radiculopatías inflamatorias y neuropatías periféricas, enfermedad inflamatoria del intestino, cirrosis, hepatitis, insuficiencia cardíaca, enfermedad isquémica, insuficiencia renal, cistitis inflamatoria, hiperplasia prostática benigna, prostatitis, miocarditis, pericarditis, uveítis, dermatitis atópica, eccema, urticaria, psoriasis, rosácea, rinitis alérgica, septicemia, choque septicémico, insuficiencia multiorgánica, enfermedades autoinmunitarias sistémicas tales como lupus eritematoso sistémico, vasculitis, dermatomiositis, amiloidosis o sarcoidosis, enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano tales como miastenia grave, tiroiditis o insulinitis, transplante de órganos, inflamación infecciosa e inducida por tumor, degeneración celular dependiente de

TNF-alfa, necrosis, apoptosis, enfermedad de injerto contra huésped, caquexia y crecimiento celular patológico paracrina y autocrino.

3. El uso según la reivindicación 2, en el que la enfermedad inflamatoria crónica es poliartritis crónica seropositiva o seronegativa.
4. El uso según la reivindicación 3, en el que la poliartritis crónica es artritis reumatoide.
5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que R_1 es un alquilo C_1 - C_6 sustituido o no sustituido.
6. El uso según la reivindicación 5, en el que en R_1 es metilo.
7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R_2 es un cicloalquilo sustituido o no sustituido.
8. El uso según la reivindicación 5, en el que en R_2 es ciclopentilo.
9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que R_3 es metilo.
10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho compuesto de fórmula (I) se selecciona de los siguientes compuestos:

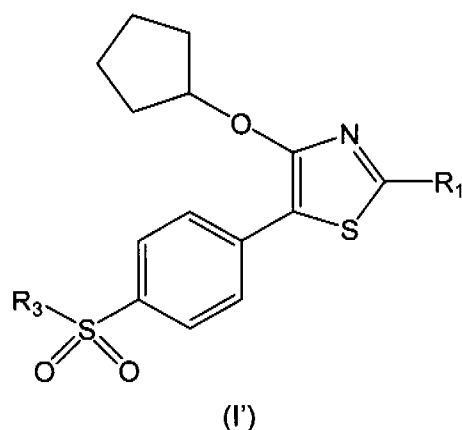


58

(5)  (7)	 (8)
 (9)	 (10)
 (11)	 (12)
 (13)	 (14)
 (15)	 (16)
 (17)	 (18)

o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

11. Un compuesto de la fórmula (I') que es:



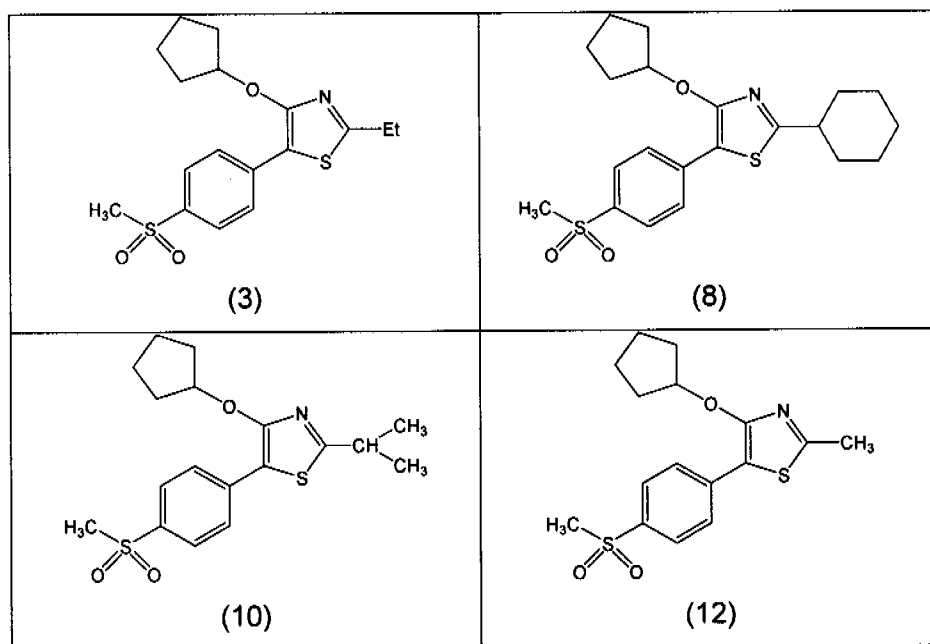
en la que:

R_1 se selecciona de alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heterociclilo sustituido o no sustituido;

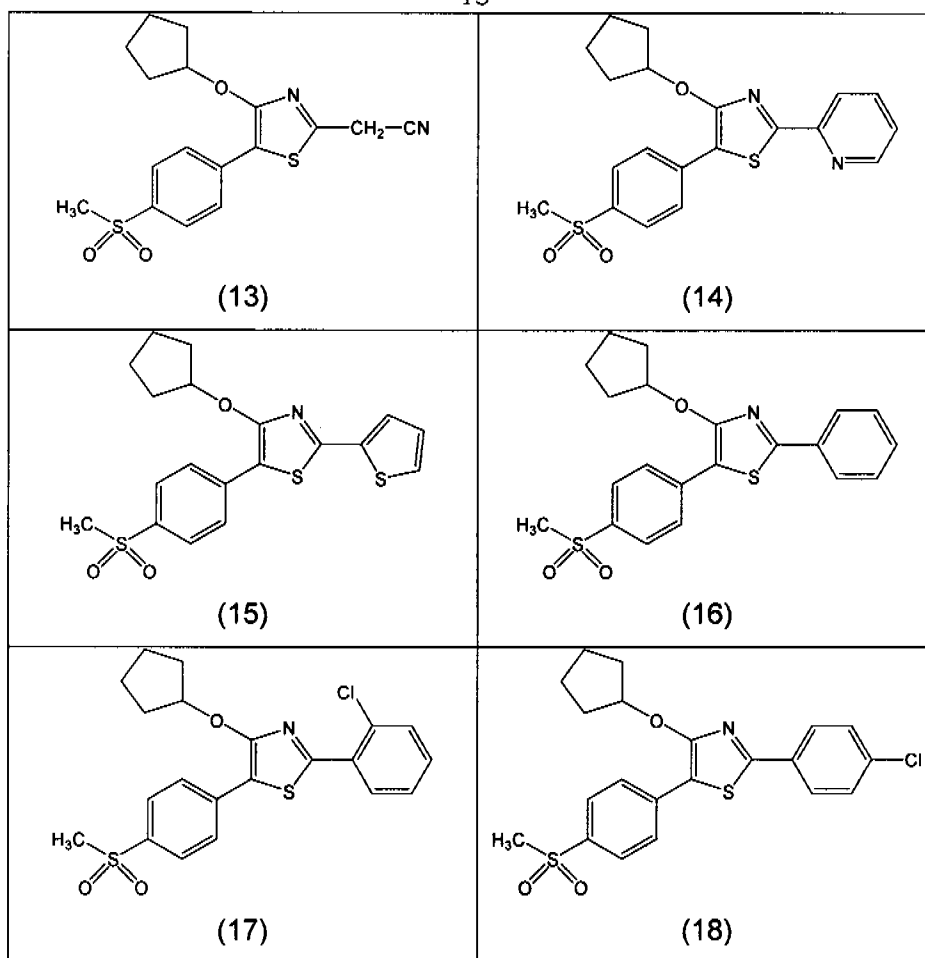
R_3 es un radical alquilo C_1-C_6 ;

o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

12. Un compuesto según la reivindicación 11, en el que R_1 es un alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido.
13. Un compuesto según la reivindicación 12, en el que en R_1 es metilo.
14. Un compuesto según la reivindicación 11, que se selecciona de lo siguiente:



60

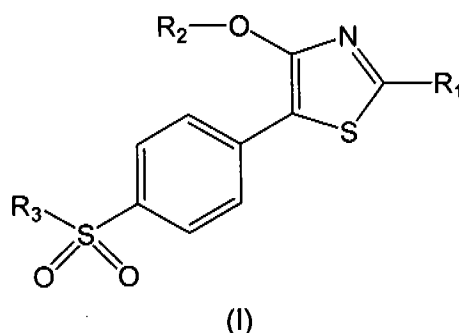


o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

15. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I') como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, o una sal, un profármaco o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un transportador, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.
16. Un compuesto de fórmula (I') como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, para su uso como un medicamento.
17. El uso del compuesto de fórmula (I) como se define en la reivindicación 1, como un biomarcador de obtención de imágenes en tecnologías de obtención de imágenes y de obtención de imágenes farmacológicas, para encontrar lesiones inmunológicas, células diana y moléculas diana.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un compuesto de fórmula (I):



en la que:

R_1 se selecciona de alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heterociclilo sustituido o no sustituido;

R_2 se selecciona de alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido y cicloalquilo sustituido o no sustituido; y

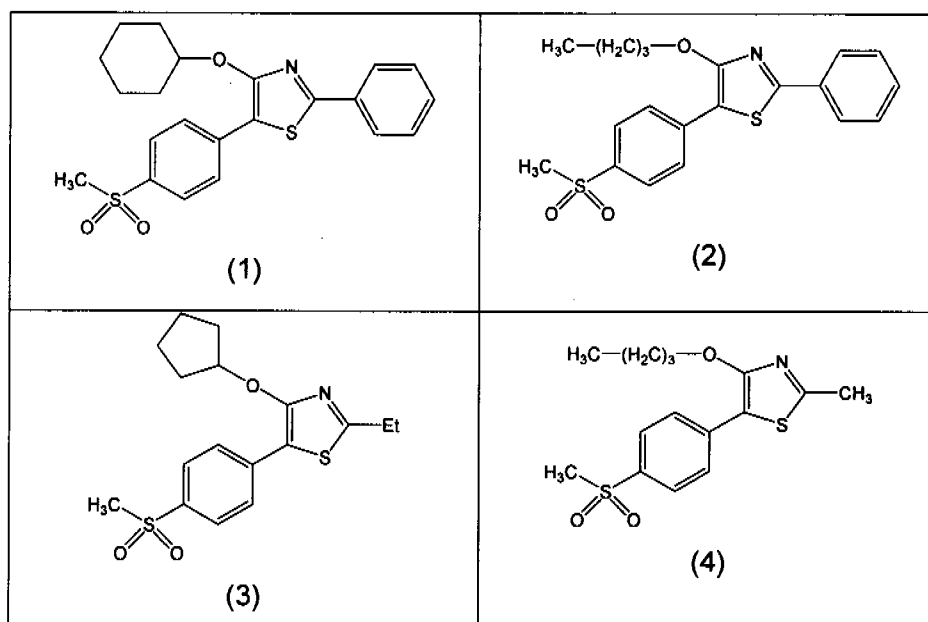
R_3 es un radical alquilo C_{1-6} ,

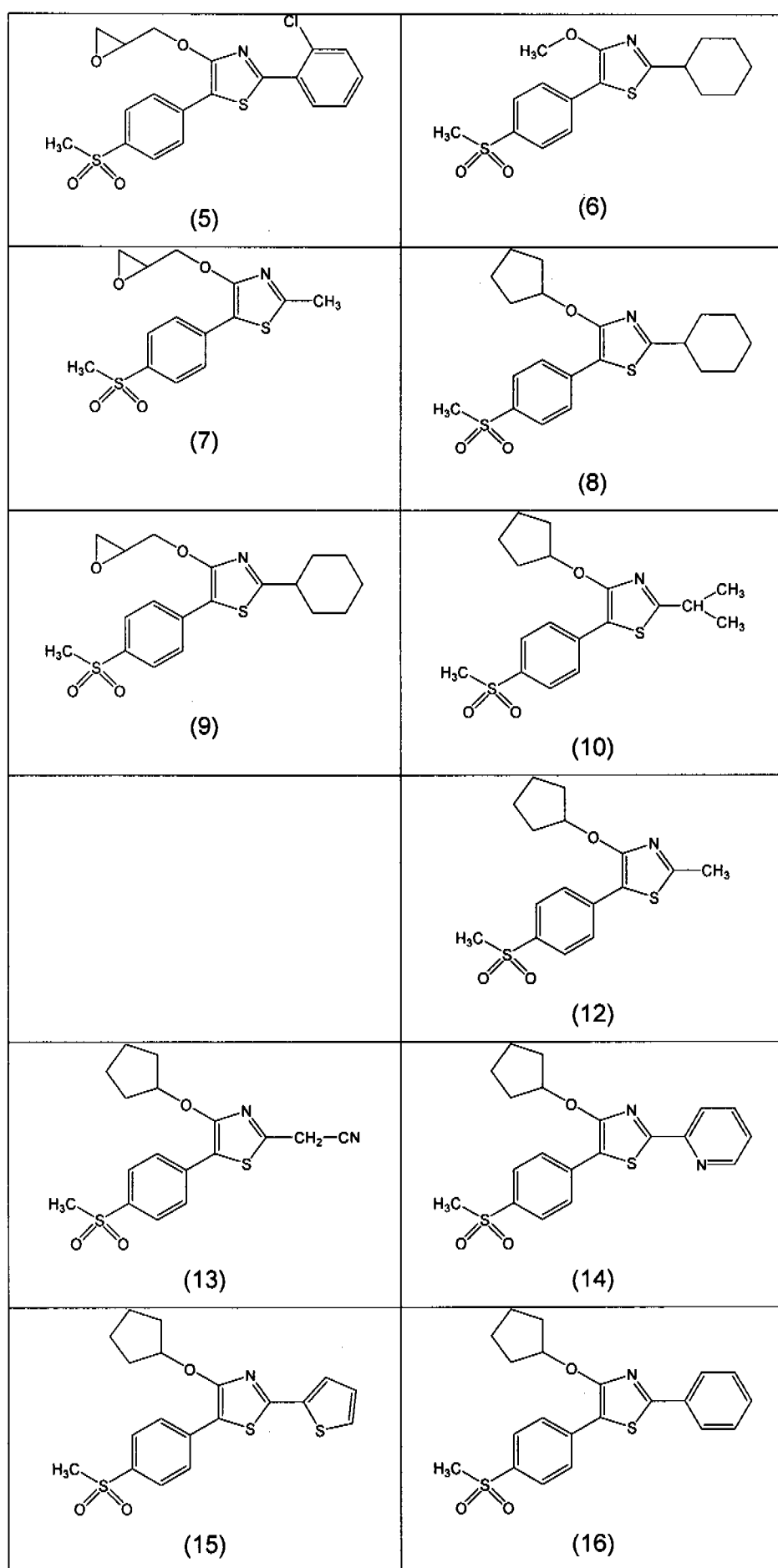
o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria aguda o crónica.

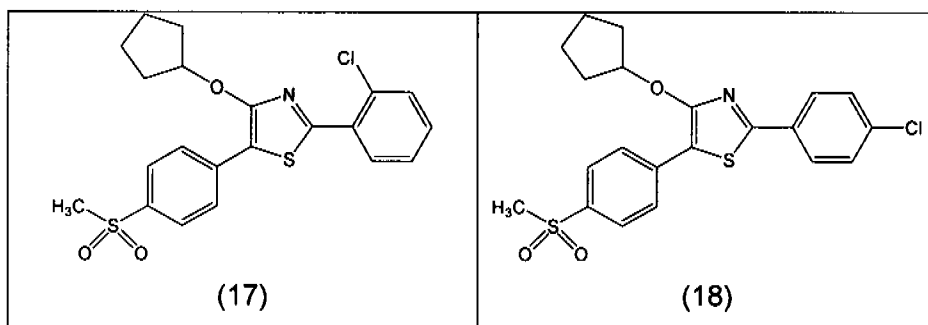
2. El uso según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto actúa mediante la inhibición de la producción de al menos una citocina pro-inflamatoria seleccionada de TNF-alfa e IFN-gamma, o mediante la inmunomodulación de la quimiocina IL-8 y/o la citocina reguladora IL-10.
3. El uso según las reivindicaciones 1 o 2, en el que la enfermedad inflamatoria aguda o crónica se selecciona de oligoartritis y poliartritis seropositivas o seronegativas, agudas y crónicas, espondiloartropatías, glomerulonefritis, collagenopatías, nefritis tubulointersticial, síndrome metabólico, aterosclerosis, osteoartritis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad pulmonar intersticial, esclerosis múltiple, enfermedades desmielinizantes, meningitis, encefalitis, meningoencefalitis, radiculopatías inflamatorias y neuropatías periféricas, enfermedad inflamatoria del intestino, cirrosis, hepatitis, insuficiencia cardíaca, enfermedad isquémica, insuficiencia renal, cistitis inflamatoria, hiperplasia prostática benigna, prostatitis, miocarditis, pericarditis, uveítis, dermatitis atópica, eccema, urticaria, psoriasis, rosácea, rinitis alérgica, septicemia, choque septicémico, insuficiencia multiorgánica, enfermedades autoinmunitarias sistémicas tales como lupus eritematoso sistémico, vasculitis, dermatomiositis, amiloidosis o sarcoidosis, enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano tales como miastenia grave, tiroiditis o insulinitis, transplante de órganos, inflamación infecciosa e inducida por tumor, degeneración celular

dependiente de TNF-alfa, necrosis, apoptosis, enfermedad de injerto contra huésped, caquexia y crecimiento celular patológico paracrino y autocrino.

4. El uso según la reivindicación 3, en el que la enfermedad inflamatoria crónica es poliartritis crónica seropositiva o seronegativa.
5. El uso según la reivindicación 4, en el que la poliartritis crónica es artritis reumatoide.
6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que R_1 es un alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido.
7. El uso según la reivindicación 6, en el que en R_1 es metilo.
8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que R_2 es un cicloalquilo sustituido o no sustituido.
9. El uso según la reivindicación 8, en el que en R_2 es ciclopentilo.
10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que R_3 es metilo.
11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho compuesto de fórmula (I) se selecciona de los siguientes compuestos:

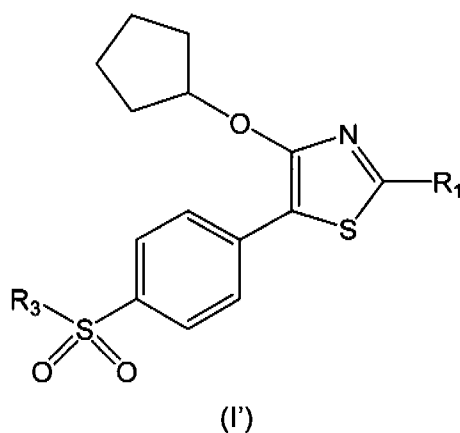






o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

12. Un compuesto de fórmula (I') que es:



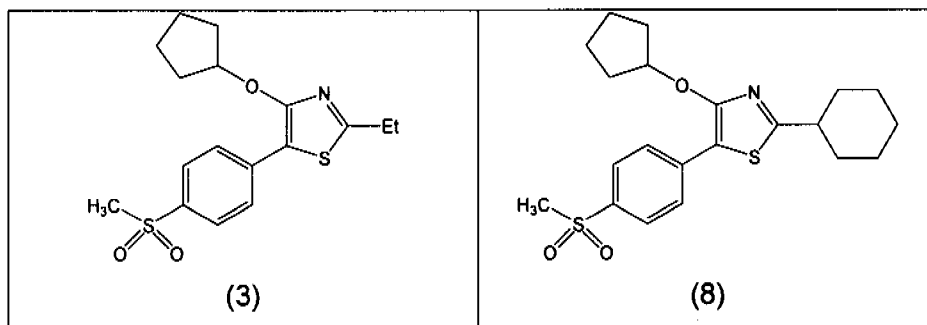
en la que:

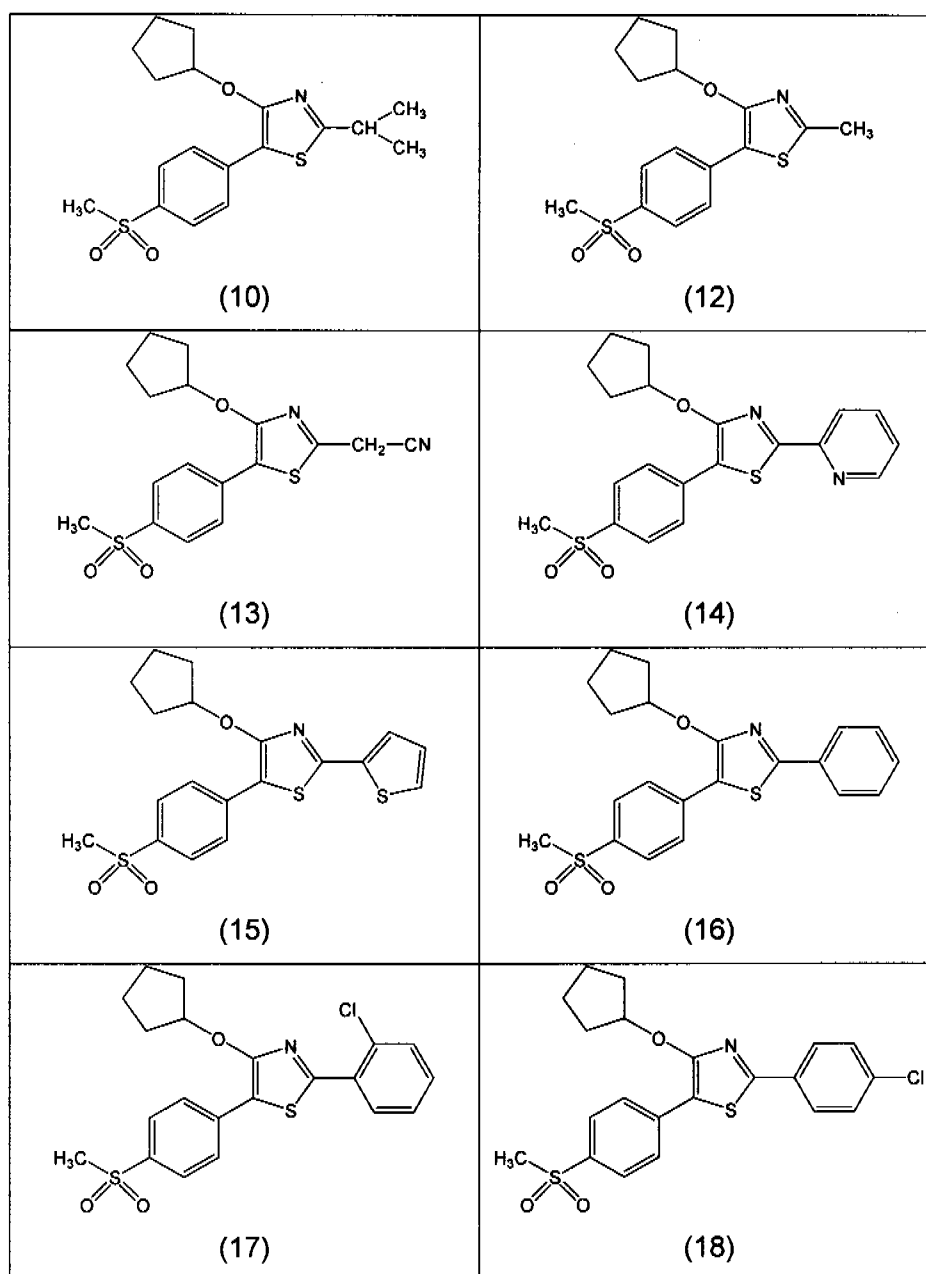
R_1 se selecciona de alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heterociclilo sustituido o no sustituido;

R_3 es un radical alquilo C_1-C_6 ;

o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

13. Un compuesto según la reivindicación 12, en el que R_1 es un alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido,.
14. Un compuesto según la reivindicación 13, en el que R_1 es metilo.
15. Un compuesto según la reivindicación 12, que se selecciona de lo siguiente:





o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

16. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I') como se define en cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, o una sal, un profármaco o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un transportador, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.
17. Un compuesto de fórmula (I') como se define en cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, para su uso como un medicamento.
18. El uso del compuesto de fórmula (I) como se define en la reivindicación 1, como un biomarcador de obtención de imágenes en tecnologías de obtención de imágenes y de obtención de imágenes farmacológicas, para encontrar lesiones inmunológicas, células diana y moléculas diana.

Figura 1

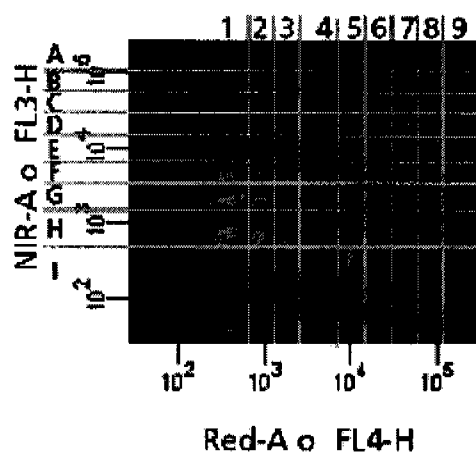
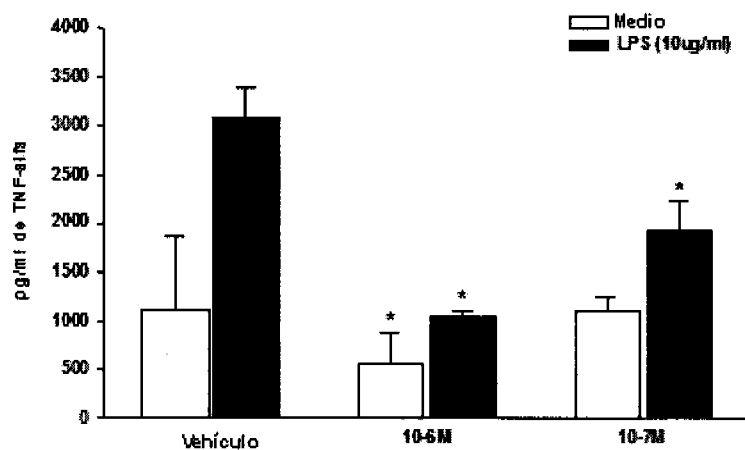


Figura 2



* Valores significativos ($p < 0.05$) con respecto al vehículo

Figura 3

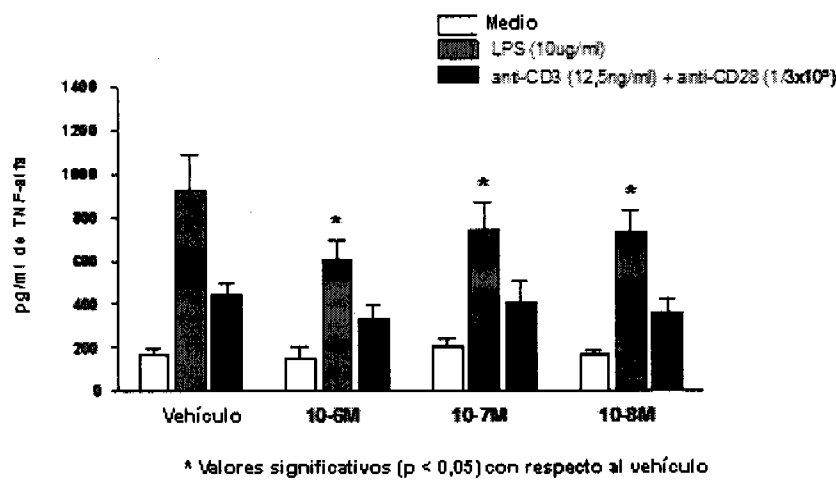


Figura 4

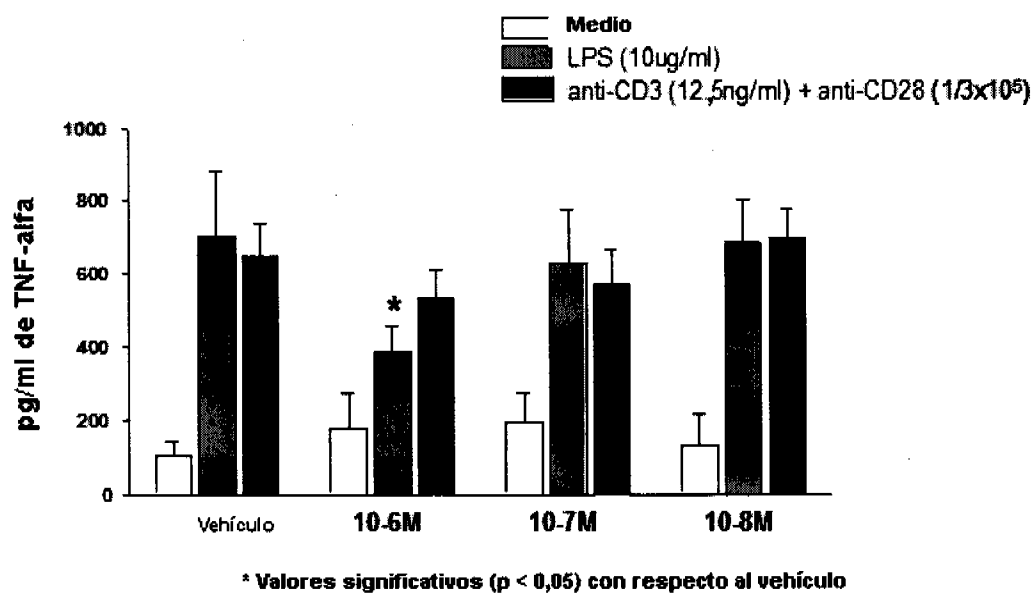


Figura 5

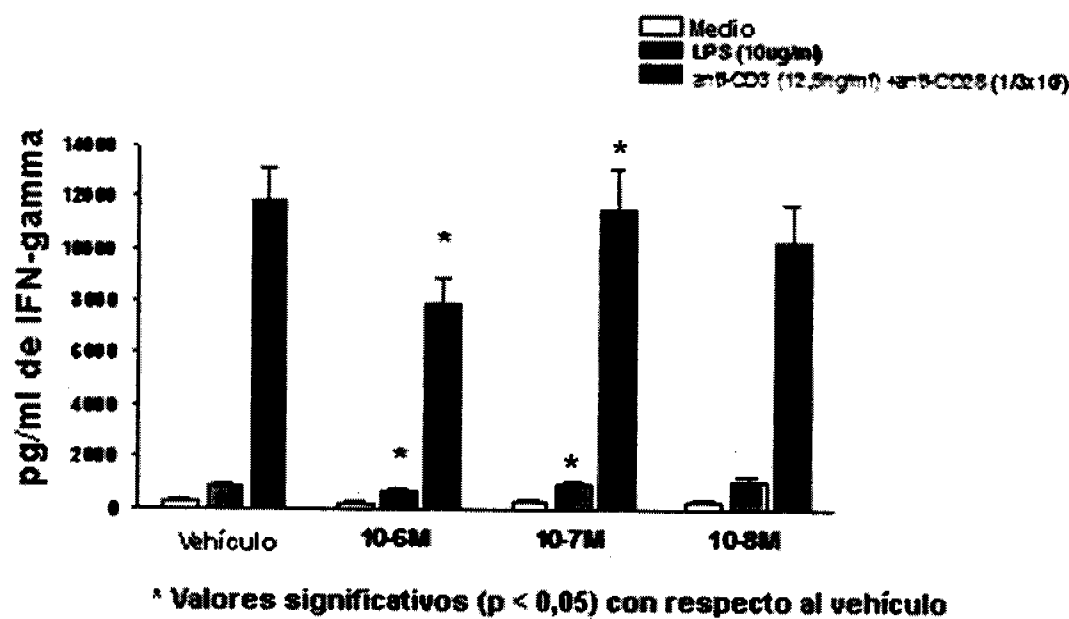


Figura 6

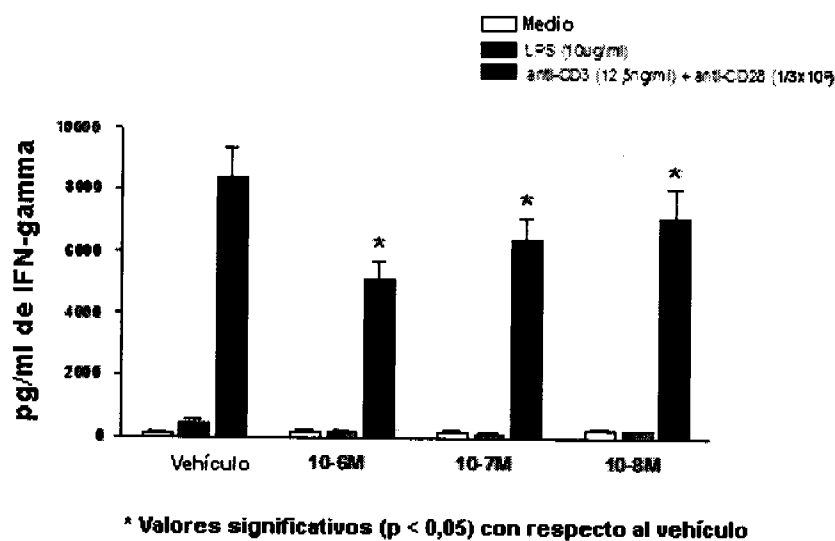
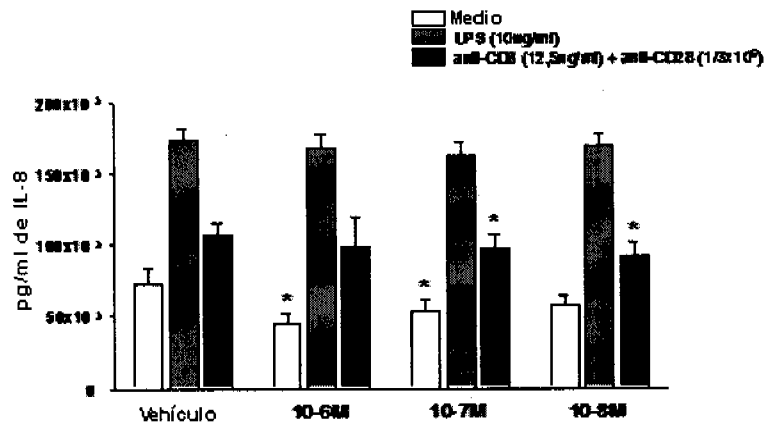


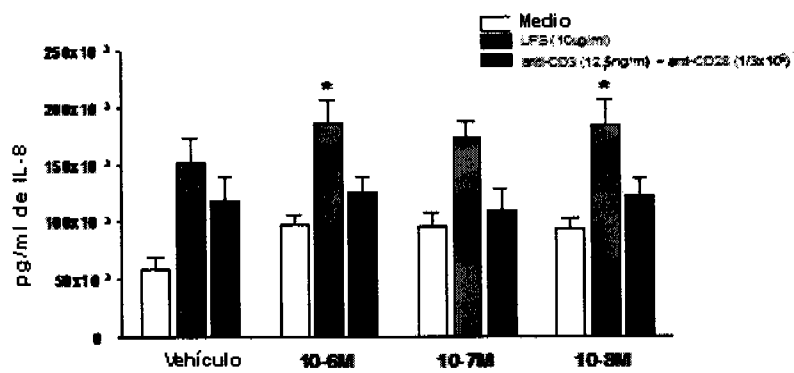
Figura 7

69



* Valores significativos (p < 0,05) con respecto al vehículo

Figura 8



* Valores significativos (p < 0,05) con respecto al vehículo

Figura 9

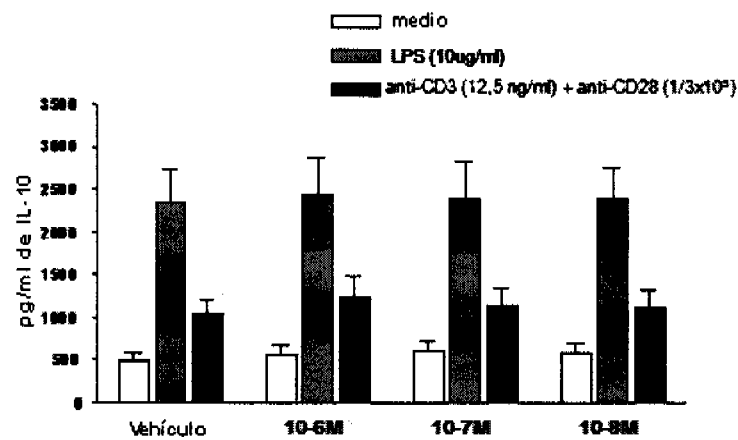


Figura 10

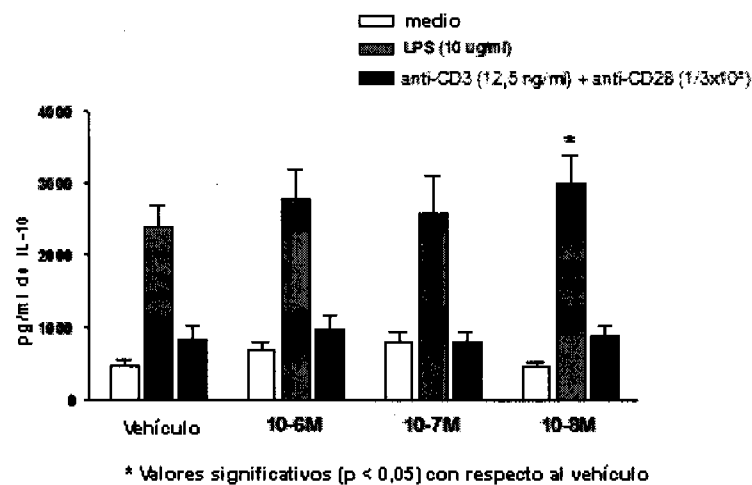
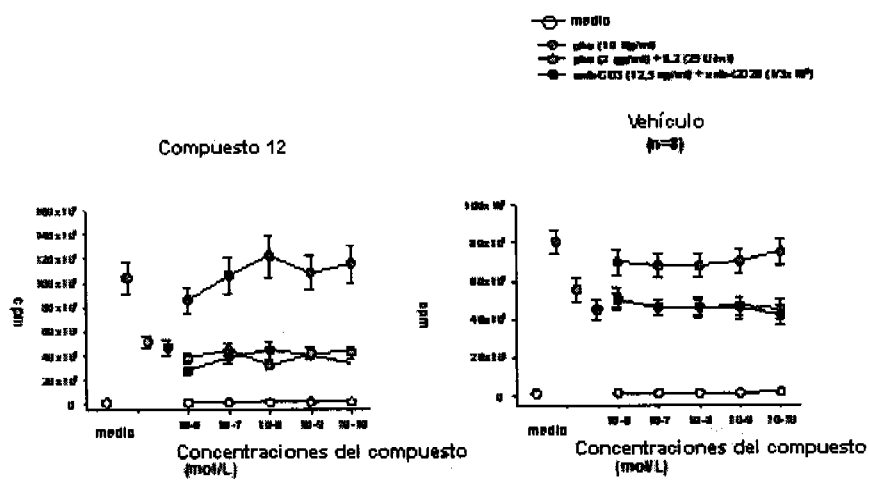


Figura 11

(a)

(b)

5

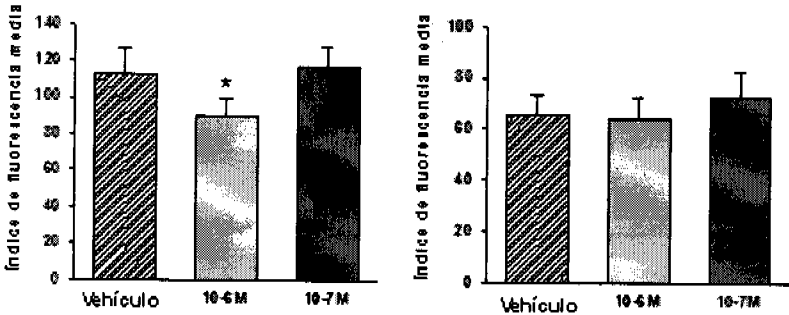


72

Figura 12

(a) (b)

5



* Valores significativos ($p < 0,05$) con respecto al vehículo

10

93

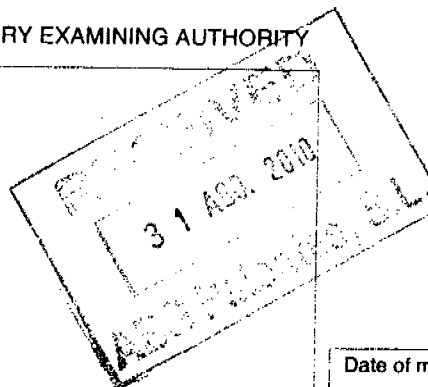
JA

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

Arias Sanz, Juan
ABG Patentes, S.L
Avenida de Burgos, 16D
Edificio Euromor
28036 Madrid
ESPAGNE



PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

27.08.2010

Applicant's or agent's file reference
P3789PC00

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/EP2009/057324

International filing date (day/month/year)
15.06.2009

Priority date (day/month/year)
16.06.2008

Applicant
FAES FARMA, S.A.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Hutterer, Georg

Tel. +49 89 2399-8066



94

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
 (Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)
 (PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P3789PC00	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/EP2009/057324	International filing date (day/month/year) 15.06.2009	Priority date (day/month/year) 16.06.2008	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C07D277/24			
Applicant FAES FARMA, S.A.			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of <u>6</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 2009-12-09		Date of completion of this report 27.08.2010	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Bareyt, Sébastien Telephone No. +49 89 2399-5828 	

75

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/EP2009/057324

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1-46 as originally filed

Claims, Numbers

1-18 filed with the letter of

09-12-2009

Drawings, Sheets

1/7-7/7 as originally filed

- ☐ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.
3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
 4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).
 6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) have been received and taken into account in drawing up this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2009/057324

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-18</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-18</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-18</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2009/057324

Reference is made to the following documents:

- D1 : Synthesis, 1976, 261-2.
- D2 : J. Med. Chem., 1991, 34(7), 2158-65.
- D3 : WO 01 27094
- D4 : Bioorg. Med. Chem. Lett., 1996, 6(1), 87-92.
- D5 : US 2005 026902

Re Item V

1 Amendments (Article 34(2)(b) PCT)

New claim 1, filed with the letter dated 09-12-2009, is based on original claim 1 (for formula I), on page 1, line 5-9 and page 23, lines 27-30 (for the use). Original claims 1-17 have been made dependant on new claim 1 and renumbered accordingly as new claims 2-18. The meaning of R^2 has been limited to optionally substituted C_1-C_6 alkyl or cycloalkyl. As this corresponds only to the reduction of a list of possibilities, no singling out has been identified. As a consequence, compound 11 has been deleted in claim 11. No subject-matter which extends beyond the content of the application as filed has been introduced.

2 Novelty (Article 33(2) PCT)

D1 (cmps 3, tab. 1) and D2 (cmp 7, fig. 1) disclose compounds which differ from those of the present formula (I) in that (a) the sulfonyl moiety is missing or replaced by a chloro-, nitro- or acetyl- one and (b) R^2 is hydrogen (now excluded from the scope of the claims). Compound 7 of D2 shows a Cox-2 inhibiting activity (see tab. V).

D3 discloses triglyceride inhibitors which differ from the compounds of the present formula (I') in that the oxygen atom linking the two 5-membered rings is missing.

D4 (cmp 3, tab. 1, page 90) and D5 (B111, B112, B114 and B118 pages 26-27) disclose cox-inhibitors which differ from the compounds of the present formulae (I) and (I') in that the OR_2 moiety is replaced by a substituted phenyl. The document D4 also describes the use of the said compounds (claims 35, 123, 135) for the treatment (at least) of hepatitis and meningitis.

Novelty is therefore acknowledged for the subject matter of the present application.

3 Inventive step (Article 33(3) PCT)

It is notorious that Cox-2 and pro-inflammatory cytokines are inter-related in the inflammatory response. Cox-2 inhibitors are generally used to treat chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis.

7A

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2009/057324

D5 which is considered to represent the most relevant state of the art, discloses cox-2-inhibitors useful for the treatment (at least) of hepatitis and meningitis which differ from the compounds of the present formulae (I) and (I') in that the OR₂ moiety is replaced by a substituted phenyl.

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as providing alternative treatment of some diseases such as rheumatoid arthritis, hepatitis or meningitis.

No indication of any Cox-2 inhibiting activity have been provided in the prior art (D1-D5) for compounds of formula (I) wherein R₂ is not H and of formula (I'). Moreover, in view of the reduced meaning for R₂, the breadth of the claims is now considered to represent a reasonable generalisation of the disclosed examples. The subject-matter presently claimed is therefore considered to involve an inventive step.

Re Item VIII

Claims 1, 11, 12, 15 and 16 encompass a large number of compounds which are defined only by reference to a desired functional activity (compound being a "Prodrug"). This functional term does not give a specific technical guidance for the selection of the suitable derivatives, without proven general knowledge, to show which derivatives are suitable "prodrugs" in the particular case of the current problem and thus could be seen as a mere invitation to the skilled person to perform a research program in order to find the suitable variants.

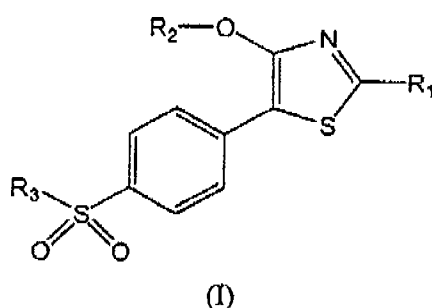
The description does not provide support and disclosure within the meaning of Article 6 PCT and, in addition, does not appear to be sufficiently disclosed under Art. 5 PCT for any of such compounds having the desired function and there is no general common knowledge of this kind available to the skilled person. In such a situation, the invention cannot be carried out over the whole claimed area without imposing an undue burden, even when simple in vivo or in vitro tests are available to determine whether or not a particular compound is covered by the claims.

79

47

CLAIMS

1. Use of a compound of formula (I):



wherein:

R₁ is selected from substituted or unsubstituted C₁-C₆ alkyl, substituted or unsubstituted cycloalkyl, substituted or unsubstituted aryl and substituted or unsubstituted heterocyclyl;

R₂ is selected from substituted or unsubstituted C₁-C₆ alkyl and substituted or unsubstituted cycloalkyl; and

R₃ is a C₁₋₆ alkyl radical,
or a pharmaceutically acceptable salt, prodrug and/or solvate thereof, in the preparation of a medicament for the treatment of an acute or chronic inflammatory disease.

2. The use according to claim 1, wherein the medicament for the treatment of an acute or chronic inflammatory disease acts by inhibiting the production of at least one pro-inflammatory cytokine selected from TNF-alpha and IFN-gamma, or by immunomodulating the IL-8 chemokine and/or the IL-10 regulatory cytokine.

3. The use according to claims 1 or 2, wherein the acute or chronic inflammatory disease is selected from acute and chronic seropositive or seronegative oligoarthritis and polyarthritis, spondiloarthropathies, glomerulonephritis, collagenopathies, tubulo-interstitial nephritis, metabolic syndrome, atherosclerosis, osteoarthritis, asthma, chronic obstructive pulmonary disease, interstitial lung disease, multiple sclerosis, demyelinating diseases, meningitis, encephalitis, meningoencephalitis, inflammatory radiculopathies and peripheral neuropathies, inflammatory bowel

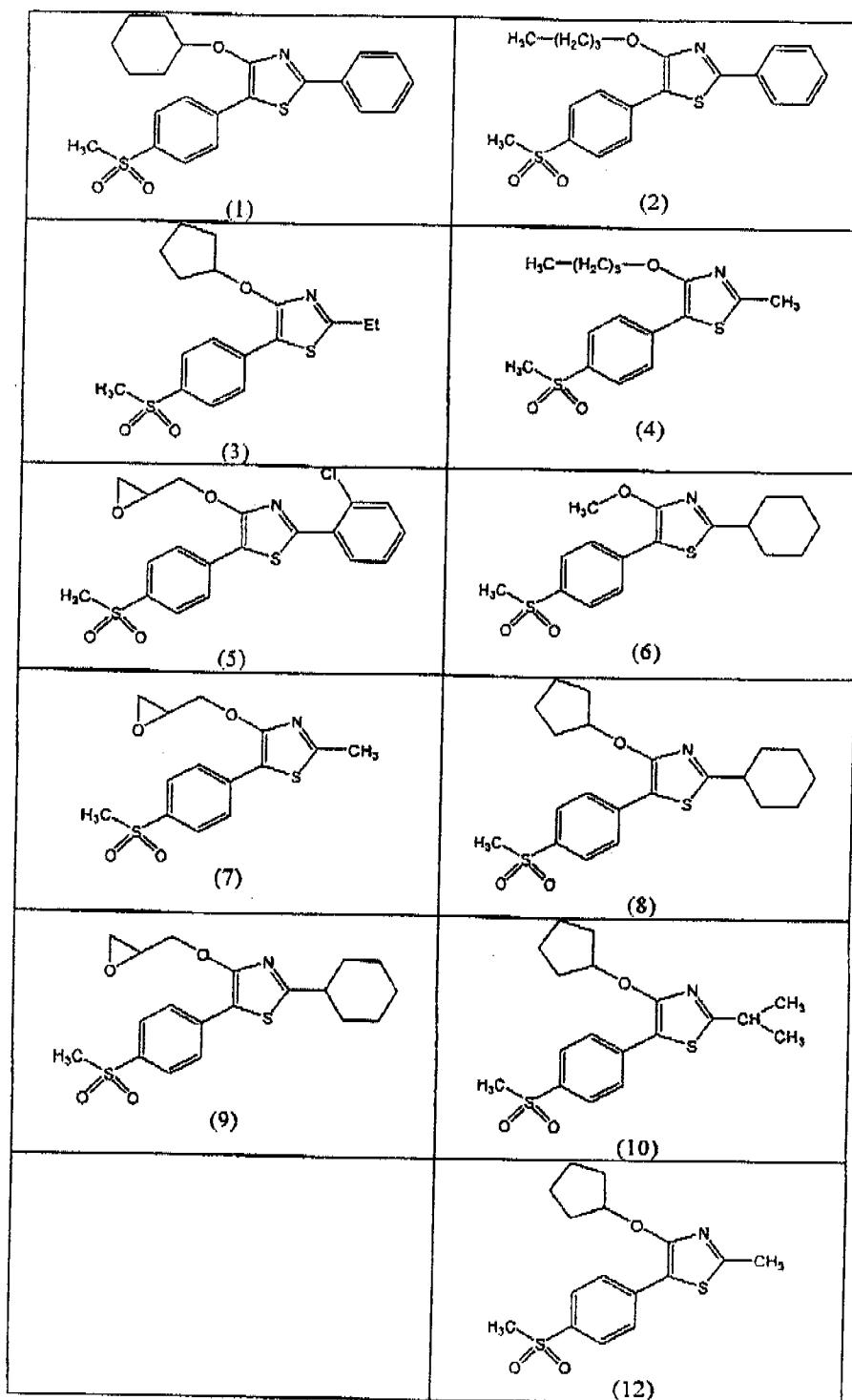
80

48

- 5 disease, cirrhosis, hepatitis, heart failure, ischemic disease, renal failure, inflammatory cystitis, benign prostatic hyperplasia, prostatitis, myocarditis, pericarditis, uveitis, atopic dermatitis, eczema, urticaria, psoriasis, rosacea, allergic rhinitis, sepsis, septic shock, multiorgan failure, systemic autoimmune diseases
- 10 such as systemic lupus erythematosus, vasculitis, dermatomyositis, amyloidosis or sarcoidosis, organ specific autoimmune diseases such as myasthenia gravis, thyroiditis or insulinitis, organ transplantation, infectious and tumor induced inflammation, TNF-alpha dependent cellular degeneration, necrosis, apoptosis, graft versus host disease, cachexia and autocrine and paracrine pathological cell growth.
- 15 4. The use according to claim 3 wherein the chronic inflammatory disease is seropositive or seronegative chronic polyarthritis.
5. The use according to claim 4 wherein the chronic polyarthritis is rheumatoid arthritis.
- 20 6. The use according to any of claims 1 to 5, wherein R_1 is a substituted or unsubstituted C_1-C_6 alkyl.
7. The use according to claim 6 wherein R_1 is methyl.
8. The use according to any of claims 1 to 7, wherein R_2 is a substituted or unsubstituted cycloalkyl.
- 25 9. The use according to claim 8, wherein R_2 is cyclopentyl.
10. The use according to any of claims 1 to 9 wherein R_3 is methyl.
- 30 11. The use according to any of claims 1 to 5 wherein the compound of formula (I) is selected from the following compounds:

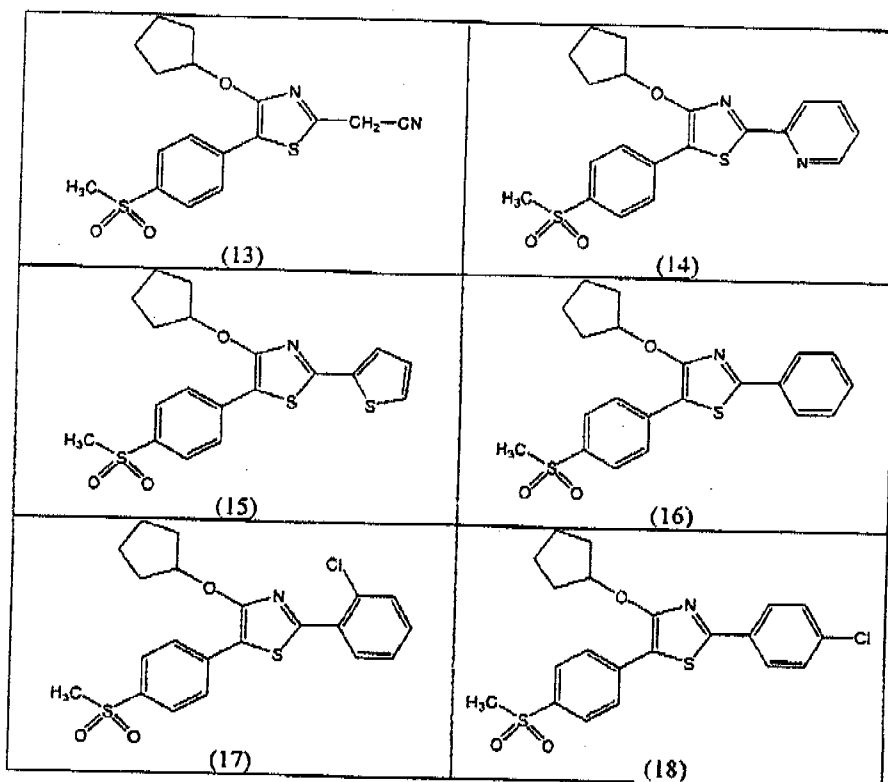
81

49



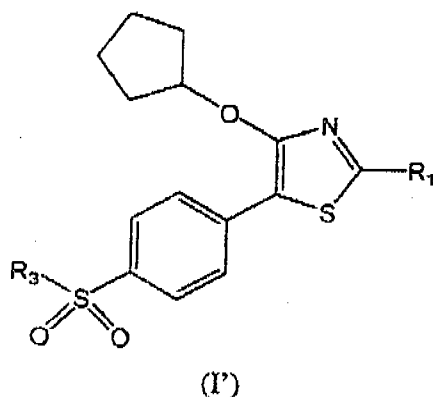
82

50



or a pharmaceutically acceptable salt, prodrug and/or solvate thereof.

12. A compound of formula (I') which is:



5

wherein:

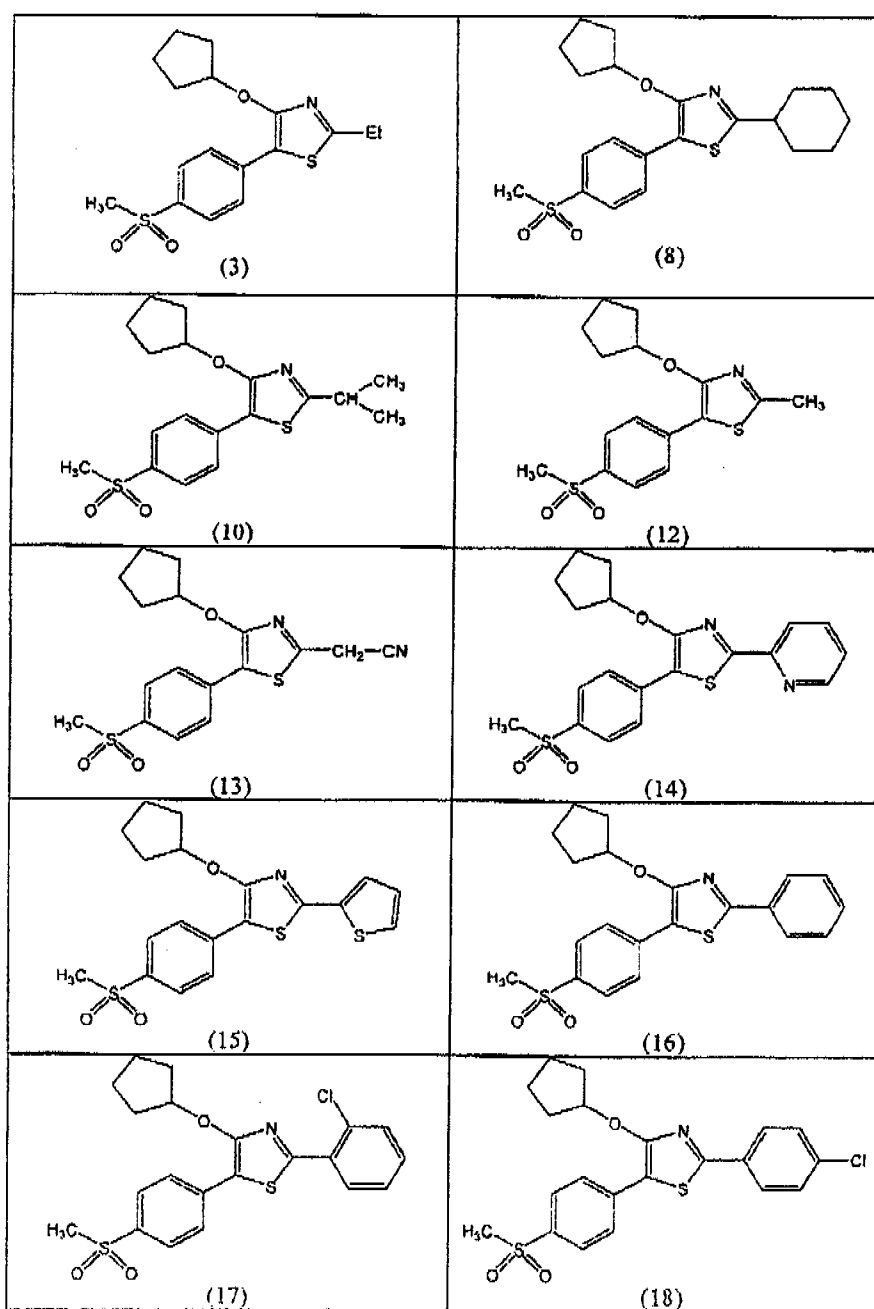
- 10 R_1 is selected from substituted or unsubstituted C_1 - C_6 alkyl, substituted or unsubstituted cycloalkyl, substituted or unsubstituted aryl and substituted or unsubstituted heterocyclil;
- R_3 is a C_1 - C_6 alkyl radical;
- or a pharmaceutically acceptable salt, prodrug and/or solvate thereof.

83

13. The compound according to claim 12 wherein R_1 is a substituted or unsubstituted C_1 - C_6 alkyl.

5 14. The compound according to claim 13 wherein R_1 is methyl.

15. The compound according to claim 12 which is selected from the following:



84

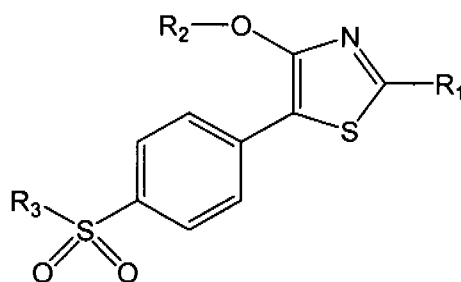
or a pharmaceutically acceptable salt, prodrug and/or solvate thereof.

- 5 16. A pharmaceutical composition comprising a compound of formula (I') as defined in any of claims 12 to 15, or a pharmaceutically acceptable salt, prodrug or solvate thereof, and at least one pharmaceutically acceptable carrier, adjuvant and/or vehicle.
- 10 17. A compound of formula (I') as defined in any of claims 12 to 15, for its use as a medicament.
18. Use of a compound of formula (I) as defined in claim 1, as an imaging biomarker in imaging and pharmaco-imaging technologies, for finding immunological lesions, target cells and target molecules.

85

REIVINDICACIONES

1. El uso de un compuesto de fórmula (I):



(I)

en la que:

R₁ se selecciona de alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heterociclilo sustituido o no sustituido;

R₂ se selecciona de alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido y cicloalquilo sustituido o no sustituido; y

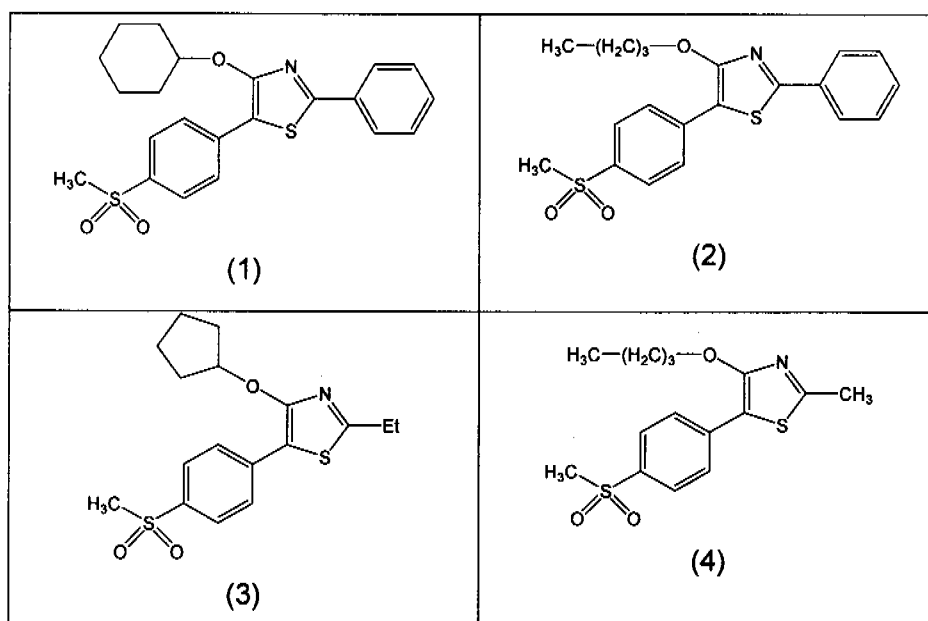
R₃ es un radical alquilo C₁₋₆,

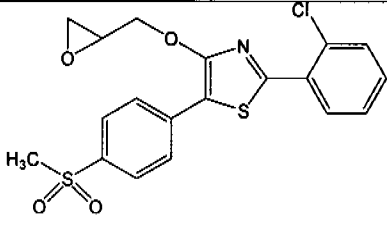
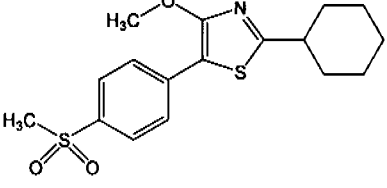
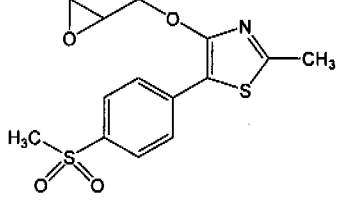
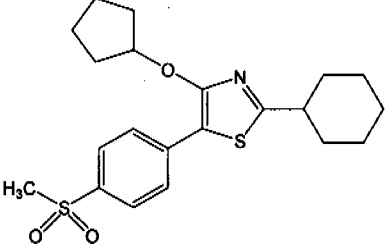
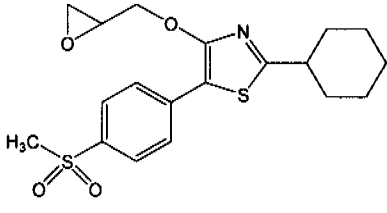
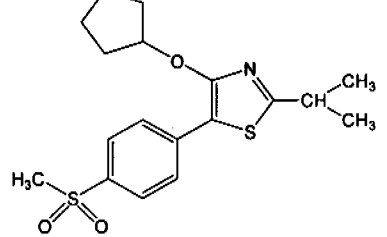
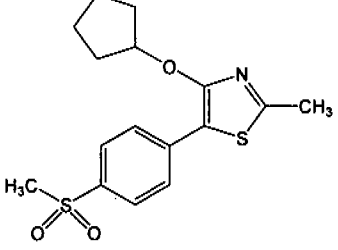
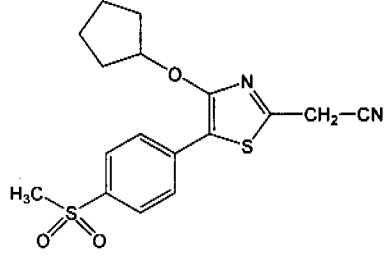
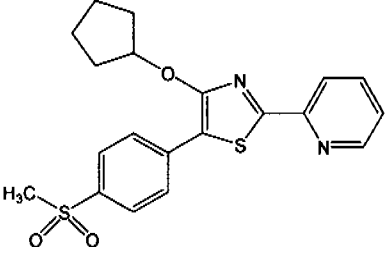
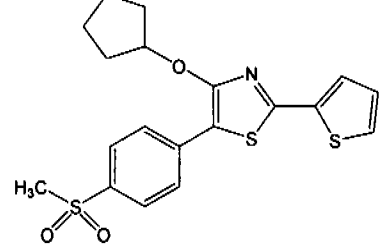
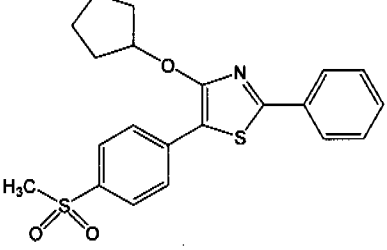
o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria aguda o crónica.

2. El uso según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto actúa mediante la inhibición de la producción de al menos una citocina pro-inflamatoria seleccionada de TNF-alfa e IFN-gamma, o mediante la inmunomodulación de la quimiocina IL-8 y/o la citocina reguladora IL-10.
3. El uso según las reivindicaciones 1 o 2, en el que la enfermedad inflamatoria aguda o crónica se selecciona de oligoartritis y poliartritis seropositivas o seronegativas, agudas y crónicas, espondiloartropatías, glomerulonefritis, collagenopatías, nefritis tubulointersticial, síndrome metabólico, aterosclerosis, osteoartritis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad pulmonar intersticial, esclerosis múltiple, enfermedades desmielinizantes, meningitis, encefalitis, meningoencefalitis, radiculopatías inflamatorias y neuropatías periféricas, enfermedad inflamatoria del intestino, cirrosis, hepatitis, insuficiencia cardíaca, enfermedad isquémica, insuficiencia renal, cistitis inflamatoria, hiperplasia prostática benigna, prostatitis, miocarditis, pericarditis, uveítis, dermatitis atópica, eccema, urticaria, psoriasis, rosácea, rinitis alérgica, septicemia, choque septicémico, insuficiencia multiorgánica, enfermedades autoinmunitarias sistémicas tales como lupus eritematoso sistémico, vasculitis, dermatomiositis, amiloidosis o sarcoidosis, enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano tales como miastenia grave, tiroiditis o insulinitis, trasplante de órganos, inflamación infecciosa e inducida por tumor, degeneración celular

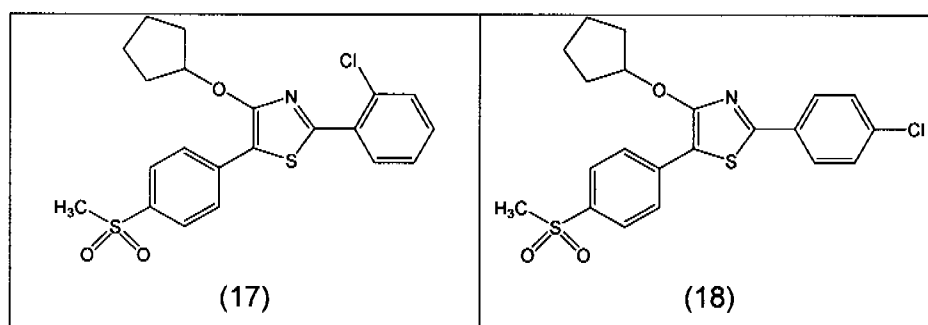
dependiente de TNF-alfa, necrosis, apoptosis, enfermedad de injerto contra huésped, caquexia y crecimiento celular patológico paracrino y autocrino.

4. El uso según la reivindicación 3, en el que la enfermedad inflamatoria crónica es poliartritis crónica seropositiva o seronegativa.
5. El uso según la reivindicación 4, en el que la poliartritis crónica es artritis reumatoide.
6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que R_1 es un alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido.
7. El uso según la reivindicación 6, en el que en R_1 es metilo.
8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que R_2 es un cicloalquilo sustituido o no sustituido.
9. El uso según la reivindicación 8, en el que en R_2 es ciclopentilo.
10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que R_3 es metilo.
11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho compuesto de fórmula (I) se selecciona de los siguientes compuestos:



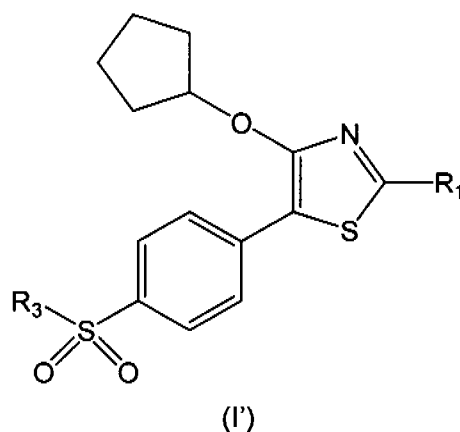
 (5)	 (6)
 (7)	 (8)
 (9)	 (10)
	 (12)
 (13)	 (14)
 (15)	 (16)

88



o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

12. Un compuesto de fórmula (I') que es:



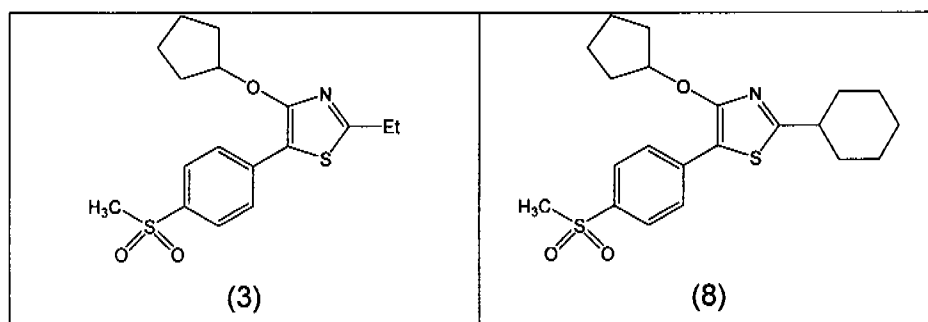
en la que:

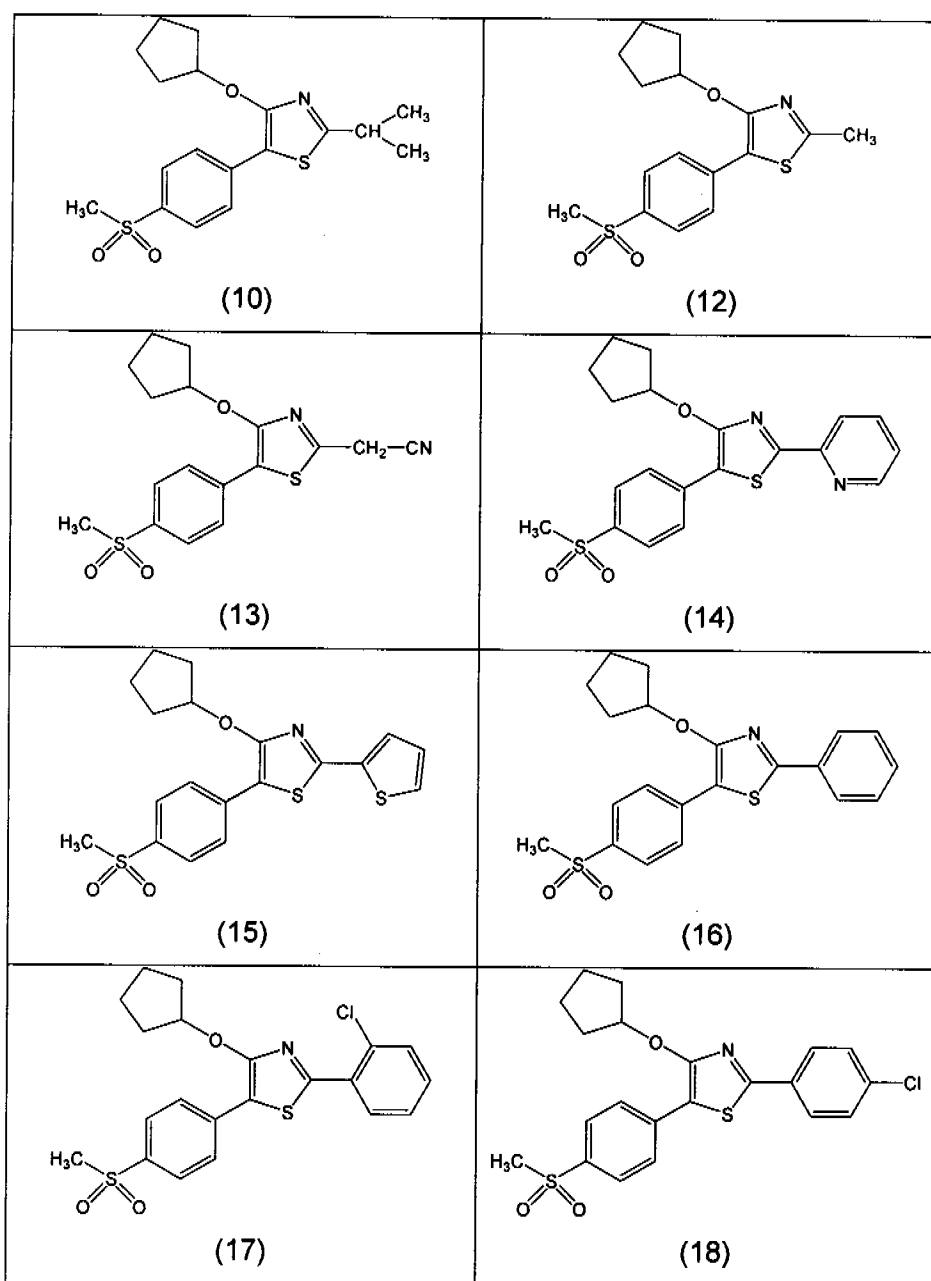
R_1 se selecciona de alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heterociclilo sustituido o no sustituido;

R_3 es un radical alquilo C_1-C_6 ;

o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

13. Un compuesto según la reivindicación 12, en el que R_1 es un alquilo C_1-C_6 sustituido o no sustituido,.
14. Un compuesto según la reivindicación 13, en el que R_1 es metilo.
15. Un compuesto según la reivindicación 12, que se selecciona de lo siguiente:

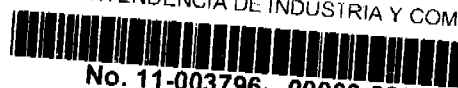




o una sal, un profármaco y/o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

16. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I') como se define en cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, o una sal, un profármaco o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un transportador, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.
17. Un compuesto de fórmula (I') como se define en cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, para su uso como un medicamento.
18. El uso del compuesto de fórmula (I) como se define en la reivindicación 1, como un biomarcador de obtención de imágenes en tecnologías de obtención de imágenes y de obtención de imágenes farmacológicas, para encontrar lesiones inmunológicas, células diana y moléculas diana.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-003796-00000-0000

Fecha: 2011-01-14 17:07:41

Tra. 11 PATENTE I/II

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR

Eve: 379 FASE NACIONAL II

Folios: 89

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIALISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONESPATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

Indicación que se solicita 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 (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐Incompleta ☐PATENTE DE INVENCION PCT ☒MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art. 33 Decisión 486/00, Circular Única

Indicación que se solicita una PCT

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒Incompleta ☐DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

Indicación que se solicita 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 ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

Indicación que se solicita un esquema de trazado

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica de un esquema de trazado

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
FAES FARMA, S.A.

REFERENCIA	Radicación No.	11 003796
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/057324
	Fecha inicio fase nacional	16/01/2011
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	<u>03951</u>

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Con respecto al resumen y de conformidad con lo dispuesto en el artículo 31 D. 486 en el cual se establece que el resumen consiste en una síntesis de la divulgación técnica contenida en la solicitud de patente, debe adecuar el resumen a los dispuesto en dicha norma, teniendo en cuenta que el extracto permitirá precisar el objeto de la invención, sus elementos característicos y el campo de aplicación.
Anexo al presente requerimiento se sugieren los lineamientos principales para la presentación adecuada del resumen.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos 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.



Continuación radicado No: 11 003796

92

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 04 MAR 2011
adpa11

ANEXO INFORMATIVO

Presentación

El resumen debe ser claro y tan conciso como lo permita la descripción. No debe exceder de 250 palabras, debiendo contener preferentemente de 50 a 150 palabras y puede incluir fórmulas químicas y matemáticas, cuadros o figuras, en tamaño 12x12.

Contenido

El resumen debe tratar esencialmente de lo que es nuevo y aporta la invención al estado de la técnica al que pertenece. De esta manera, si la naturaleza de la invención es la modificación de un aparato, o la presentación de un procedimiento, producto o compuesto, el resumen debe enfocarse hacia la descripción técnica de la modificación.

En el caso de que el documento de patente reivindique un producto, particularmente un compuesto o componente y también contenga un procedimiento o método de preparación, éste también debe ser incluido en el resumen.

En lo que concierne a los compuestos o composiciones químicas, el resumen debe contener la naturaleza química del compuesto o de la composición, así como el campo de aplicación. El resumen debe indicar la fórmula química que mejor caracterice la invención.

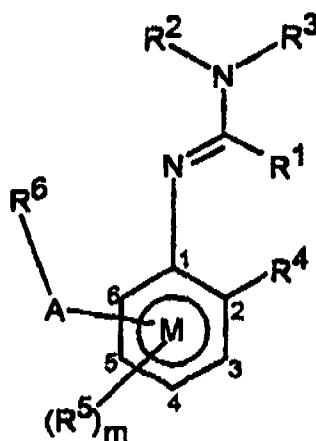
En lo que respecta a los procedimientos, el resumen debe explicar el tipo de reacción, los reactivos y las condiciones para llevar a cabo el procedimiento.

El resumen no debe contener declaraciones relativas a las ventajas asociadas a la invención.

Ejemplo:

Objeto de la Invención: Derivados de fenilamidina de fórmula (I) con aplicación como antifúngicos.

Características de la Invención: Compuestos fungicidas de fórmula (I) y sales donde: R1 es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, carbocíclico o heterocíclico cada uno de los cuales se encuentra sustituido; R2 y R3 son iguales o diferentes y se eligen entre: ciano, acilo, -ORa o -OSRa donde Ra es alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclilo o heterociclilo, o bien, R2 y R3 forman conjuntamente con el átomo al cual se unen un anillo que puede sustituirse por R4 que es alquilo, alquenilo, alquinilo, carbocíclico o heterociclilo y que pueden sustituirse por hidroxilo, mercapto, azido, nitro, halógeno, ciano, acilo. R5 es igual a la definición contemplada para R4, R6 es un anillo carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido y A es un grupo enlazante o AR6 y AR5 forman un anillo fusionado con el anillo de benceno M.

Figura característica:

Campo de aplicación: Producción de agentes antifúngicos con aplicación farmacéutica