

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 002 189**

51 Int. Cl.:

C07D 213/79	(2006.01)	C07C 323/56	(2006.01)
C07D 235/18	(2006.01)	C07C 233/47	(2006.01)
C07D 257/04	(2006.01)	C07C 233/81	(2006.01)
C07C 235/64	(2006.01)	A61K 31/196	(2006.01)
C07C 66/00	(2006.01)	A61P 3/00	(2006.01)
C07C 229/38	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)
C07C 233/51	(2006.01)	A61P 37/00	(2006.01)
C07C 275/42	(2006.01)		
C07C 309/51	(2006.01)		
C07C 317/46	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2021** **PCT/EP2021/055791**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2021** **WO21180655**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2021** **E 21709062 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2024** **EP 4118069**

54 Título: **Derivados de para-hidroquinona como inhibidores de VEGF, TNF y/o IL para el tratamiento de enfermedades neuroinflamatorias**

30 Prioridad:

11.03.2020 EP 20162558

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2025

73 Titular/es:

OM PHARMA SA (100.00%)
22 rue du Bois du Lan
1217 Meyrin, CH

72 Inventor/es:

BAUER, JACQUES y
MARTIN, OLIVIER

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 3 002 189 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de para-hidroquinona como inhibidores de VEGF, TNF y/o IL para el tratamiento de enfermedades neuroinflamatorias

Campo de la invención

Generalmente, esta invención se refiere a nuevos derivados de hidroquinona, a su preparación y al uso de estos compuestos en métodos para tratar trastornos mediante la administración de tales compuestos a un animal de sangre caliente que lo necesite. La presente invención también se refiere a compuestos que son útiles en la prevención y/o el tratamiento de trastornos autoinmunes, inmunológicos, reumatológicos, vasculares, trastornos oftalmológicos, trastornos fibróticos, trastornos metabólicos y gastrointestinales, enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas, neoplasias y trastornos asociados al cáncer, enfermedades relacionadas con hormonas y trastornos inmunológicos resultantes de enfermedades infecciosas virales y bacterianas, y complicaciones de las mismas.

Antecedentes de la invención

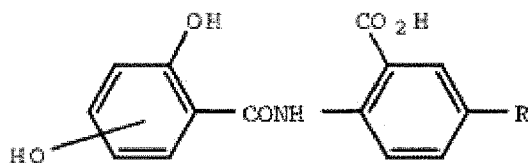
Algunos derivados a base de hidroquinona como, por ejemplo, derivados del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico y específicamente dobesilato de calcio, etamsilato y persilato son conocidos en la técnica como agentes activos para el tratamiento de la disfunción sexual masculina y otros trastornos vasculares de origen endotelial, tanto solos como en combinación con otros agentes. Por ejemplo, la patente US-6.147.112 describe un método para el uso de derivados del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico, preferiblemente dobesilato de calcio, etamsilato y persilato. El dobesilato de calcio o el sulfonato de calcio de hidroquinona, con el nombre químico de sal de calcio del ácido 2,5-dihidroxibencenosulfónico, se vende como Dexium (Delalande) y Doxium (Carrion), y un proceso para su preparación se describe en la patente US-3.509.207.

Existen muchos fármacos que contienen grupos fenol o catecol que sufren un metabolismo prematuro en el grupo hidroxilo durante la absorción después de la administración oral. Los esfuerzos anteriores para proteger los grupos hidroxilo generalmente no han tenido éxito ya que los grupos protectores empleados son demasiado lábiles ($O=COR$ o $O=CR$) o demasiado estables (CH_3). Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar nuevos derivados de hidroquinonas, sus sales farmacéuticamente aceptables y formulaciones. Estos nuevos derivados de hidroquinonas tienen propiedades antifibróticas, antiinflamatorias y antiangiogénicas particularmente potentes.

La publicación internacional WO2018160618A1 describe ciertas hidroquinonas sustituidas, 1,4-quinonas, catecoles, 1,2-quinonas, antraquinonas, y antrahidroquinonas para su uso como mediadores redox en tecnologías emergentes, tales como en celdas de combustible mediadas o baterías de flujo de mediadores orgánicos.

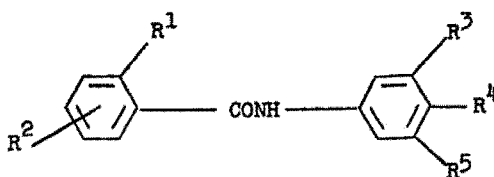
Richter y col, en Synthesis, 1976, 1976(3), 192-194 describen bis-N-arilcarbamatos y 2,5-dihidroxi-3,6-bis[N-arilcarboxamido]-1,4-benzoquinonas y su preparación a partir de 2,5-dihidroxi-1,4-benzoquinona e isocianatos de arilo.

La publicación japonesa JP 51026839A describe que las benzanilidas I ($R = H, OH$) poseen actividades antituberculosas, analgésicas, antiinflamatorias, y excretoras de ácido úrico:



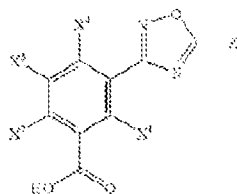
Benzanilidas I

La patente concedida estadounidense US 3.973.038 también describe compuestos de benzoilánilina que tienen la fórmula general:



en donde ($R_1 = OH, aciloxi$; $R_2 = H, OH, alquilo inferior, halo, aciloxi$; $R_3 = Cl, Br, alquilo inferior$; $R_4 = OH, NH_2, alquilo inferior, aciloxi$; $R_5 = H, halo, CO_2H, alquilo inferior, aciloxi$) que tiene propiedades de inhibición de enzimas *in vivo*, en particular, la histamina desacetilasa y la xantina oxidasa.

La solicitud de patente US-2008/139632A1 describe un método para modular la terminación prematura de la traducción o la descomposición sin sentido del ARNm en una célula con una cantidad efectiva de compuestos hidroxilados del ácido 1,2,4-oxadiazol benzoico de la fórmula:

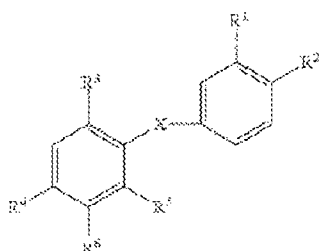


en donde (2 es arilo, heteroarilo, cicloalquilo, alquilo, alquienilo, heterociclo, arilalquilo, o ariloxialquilo sustituido o no sustituido; y X1, X2, X3 y X4 son independientemente H u OH, y al menos uno de X1, X2, X3 o X4 es OH)

La solicitud de patente US-2013/172333A1 describe compuestos inhibidores de hsp90, que incluyen compuestos de ácido 2,4,5-triazol benzoico hidroxilado.

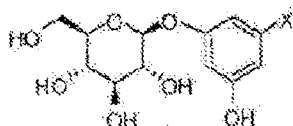
La publicación internacional WO2010/142766A1 describe derivados de pirimidina como inhibidores de zap-70 para el tratamiento o profilaxis de trastornos inmunológicos, inflamatorios, autoinmunes, alérgicos, y enfermedades mediadas inmunológicamente.

La solicitud de patente US-2013/121919A1 describe métodos para tratar trastornos neurodegenerativos, afecciones asociadas con depósitos acumulados de péptido beta amiloide, niveles de proteína Tau, y/o acumulaciones de alfa-sinucleína, así como cáncer en un sujeto mediante la administración de un compuesto activador de HAT de la fórmula:



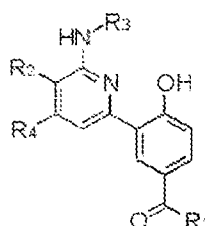
en donde (R1 es H, o CF3; R2 es H, Cl, o CN; R3 es H, O-metilo, O-etilo, S-etilo, O-ciclopentilo, OCH2CH2N(CH3)2, o CH2CH2CH2N(CH3)2; R4 es H; C(=O)NH-fenil, en donde el fenilo está sustituido con uno o más halos o CF3; R5 es H, alquilo C1-CS, OH, OCH3, O-etilo, OCH2CH2N(CH3)2, CH2CH2CH2N(CH3)2, SCH2CH2N(CH3)2, o OCH2C(=O)O-alquilo; R6 es H, O-metilo, O-etilo, OCH2CH2N(CH3)2; y X es CONH, SONH, SO2NH, NHC(=O)NH, o NHCO, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de los mismos.

La solicitud de patente china 109687915A1 describe compuestos glucósidos de bencenodiol halogenados de la fórmula:



donde X indica F, Cl o I.

La solicitud de patente coreana 20060033817 A describe derivados de 3-(2-amino-6-piridinil)-4-hidroxifenilcetona de la fórmula:



donde A) R1 es aromático, heteroaromático, u aromático o heteroaromático opcionalmente sustituido; B) R2 se selecciona del grupo que consiste en I) ciano; II) un sustituyente de la fórmula $-C(=O)-X1-X2$, en donde X1 es enlace directo, oxígeno o amino opcionalmente sustituido; X2 es hidrógeno, pirrolidina, piperidina, piperazina, morfolina, alquilamina inferior, hidroxí, alquilo inferior opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo se selecciona del grupo que consiste en; y III) un sustituyente de la fórmula $-(CH(-X3))_n NX4X5$, en donde X3 es hidrógeno, halógeno, y alquilo inferior opcionalmente sustituido seleccionado del grupo que consiste en X4 y X5 son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo inferior opcionalmente sustituido, sulfona opcionalmente sustituida, y carbamato de alquilo, n es un número entero de 1 a 5; C) R3 y R4 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en los siguientes sustituyentes, I) hidrógeno; y II) alquilo saturado o insaturado de cadena lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido.

Sin embargo, ninguno de los documentos de la técnica anterior describe la nueva clase de compuestos derivados de hidroquinona de la presente invención, que son particularmente útiles para la prevención y/o el tratamiento de una variedad de enfermedades que incluyen trastornos autoinmunes, inmunológicos, reumatológicos, vasculares, trastornos oftalmológicos, trastornos fibróticos, trastornos metabólicos y gastrointestinales, enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas, neoplasias y trastornos asociados al cáncer, enfermedades relacionadas con hormonas y trastornos inmunológicos resultantes de enfermedades infecciosas virales y bacterianas, y complicaciones de las mismas.

La invención también se refiere al tratamiento, la prevención, y la reducción de trastornos metabólicos, tales como la diabetes y la obesidad. A medida que los niveles de glucosa en sangre aumentan posprandialmente, la insulina se secreta y estimula a las células de los tejidos periféricos (músculos esqueléticos y grasa) para que absorban activamente la glucosa de la sangre como fuente de energía. La pérdida de homeostasis de la glucosa como resultado de una secreción o acción defectuosa de la insulina típicamente produce trastornos metabólicos tal como la diabetes, que pueden desencadenarse simultáneamente o exacerbarse aún más por la obesidad. Debido a que estas afecciones suelen ser mortales, se requieren estrategias para restablecer la eliminación adecuada de la glucosa del torrente sanguíneo. Los trastornos metabólicos, en particular los trastornos reguladores de la glucosa y los lípidos, son cada vez más prevalentes a medida que las poblaciones de los países industrializados envejecen y los estilos de vida sedentarios se vuelven más comunes. Tales trastornos con frecuencia están interrelacionados y frecuentemente son predictores o resultados unos de otros.

Por ejemplo, la diabetes es causada por una combinación de resistencia a la insulina y secreción defectuosa de insulina por parte de las células β pancreáticas. Las personas con resistencia a la insulina suelen tener obesidad abdominal, dislipidemia, hipertensión, intolerancia a la glucosa y un estado protrombótico (síndrome metabólico). En consecuencia, las personas obesas en su conjunto corren un mayor riesgo de adquirir resistencia a la insulina. Por lo tanto, la ruptura de una vía metabólica puede desencadenar innumerables trastornos, tales como hiperlipidemia, obesidad, diabetes, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, síndrome metabólico e hipertensión, que a su vez pueden desencadenar una mayor disfunción metabólica, lo que desencadena problemas sistémicos y pone a las personas en riesgo de sufrir complicaciones adicionales y una morbilidad prematura. Los niveles de glucosa y lípidos están regulados en parte por el hígado, que desempeña un papel en la síntesis, el almacenamiento, la secreción, la transformación y la descomposición de la glucosa, las proteínas y los lípidos. Una enfermedad o una lesión traumática pueden reducir en gran medida la capacidad del hígado de llevar a cabo estas actividades normales. Por lo tanto, la mayoría de las manifestaciones clínicas de la disfunción hepática provienen del daño celular y del deterioro de las capacidades hepáticas normales. La disfunción hepática puede ser el resultado de afecciones genéticas, trastornos inflamatorios, toxinas tales como drogas y alcohol, trastornos inmunológicos, trastornos vasculares o afecciones metabólicas. Independientemente de la causa, el daño hepático puede tener un efecto sistémico sobre la función de los procesos metabólicos y la regulación de los niveles de glucosa en sangre y lípidos séricos, lo que agrava los estados patológicos crónicos y aumenta el riesgo de nuevas enfermedades y morbilidad. Tanto los niveles elevados como los reducidos de glucosa en sangre desencadenan respuestas hormonales diseñadas para restaurar la homeostasis de la glucosa. Los niveles bajos de glucosa en sangre desencadenan la liberación de glucagón de las células α del páncreas. Los niveles altos de glucosa en sangre desencadenan la liberación de insulina de las células β del páncreas. La corticotropina y las hormonas del crecimiento liberadas por la hipófisis actúan para aumentar la glucosa en sangre al inhibir la absorción por los tejidos extrahepáticos. Los glucocorticoides también actúan para aumentar los niveles de glucosa en sangre al inhibir la absorción de glucosa. El cortisol, el principal glucocorticoide liberado por la corteza suprarrenal, se secreta en respuesta al aumento de la corticotropina circulante. La hormona medular suprarrenal, la epinefrina, estimula la producción de glucosa al activar la glucogenólisis en respuesta a estímulos estresantes. Los trastornos metabólicos que afectan al metabolismo de la glucosa y los lípidos, tales como la hiperlipidemia, la obesidad, la diabetes, la resistencia a la insulina, la hiperglucemia, la intolerancia a la glucosa, el síndrome metabólico y la hipertensión tienen consecuencias para la salud a largo plazo que conducen a enfermedades crónicas, que incluyen enfermedades cardiovasculares y morbilidad prematura. Tales trastornos metabólicos y cardiovasculares pueden estar interrelacionados, agravarse, o desencadenarse entre sí y generar mecanismos de retroalimentación que son difíciles de interrumpir. Los tratamientos farmacéuticos actuales para los trastornos metabólicos y cardiovasculares incluyen combinaciones de fármacos hipolipemiantes, fármacos hipoglucémicos, agentes antihipertensivos, dieta, y ejercicio. Sin embargo, los regímenes terapéuticos complicados pueden causar problemas de polifarmacia con aumento de efectos secundarios, interacciones entre medicamentos, falta de cumplimiento y aumento de errores de medicación. Por lo tanto, existe una necesidad imperiosa e insatisfecha en la técnica de identificar nuevos compuestos, formulaciones, y métodos para tratar de forma segura y efectiva los trastornos metabólicos y cardiovasculares y las afecciones asociadas con los trastornos metabólicos.

Ejemplos de afecciones metabólicas incluyen, pero no se limitan a, dolor, cicatrización de heridas, fiebre, afecciones neuroinflamatorias y neurodegenerativas, inflamación, producción de calor, homeotermia, degradación de

triglicéridos, glucólisis, ciclo de Krebs, fermentación, fotosíntesis, tasa metabólica, estrés biótico y abiótico, secreciones, estrés oxidativo, estrés, crecimiento neoplásico, afecciones de la piel, afecciones cardiovasculares, afecciones neuroinflamatorias y neurodegenerativas, trastornos mentales y del comportamiento. Tales procesos o condiciones pueden ocurrir en una célula, un grupo de células, o un organismo completo.

Los avances recientes en la medicina molecular han llevado a ciertas mejoras en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades neoplásicas. A pesar de este éxito parcial, estas patologías siguen siendo un desafío considerable. Para ciertos tipos de cáncer, la terapia actual en algunos casos fracasa por varias razones. Por un lado, es la resistencia inherente de las células tumorales, su capacidad de mutación constante y evasión de la terapia; por otro lado, también es la heterogeneidad del entorno tumoral. Se demostró que los tumores del mismo tipo difieren mucho en los sujetos individuales desde el punto de vista de su perfil genómico, lo que indica la necesidad de la llamada terapia "personal". Un problema aún mayor es la heterogeneidad de las mutaciones en el mismo tumor, como se ha demostrado recientemente en los tumores renales, y esta situación también puede esperarse en otros tipos de tumores. Por esta razón, es necesario buscar nuevos enfoques y puntos de intervención invariables comunes para todas o la mayoría de las células malignas del tumor y que afecten preferiblemente a las funciones esenciales de las células cancerosas. Parece que ese punto de intervención podría estar a nivel metabólico, digamos, por ejemplo, en las mitocondrias, *es decir*, orgánulos que son fundamentales para la generación de la energía necesaria para todos los procesos fisiológicos y fisiopatológicos de las células. Aunque las células tumorales utilizan, en gran parte, la denominada glucólisis aeróbica para la generación de energía, la respiración mitocondrial (*es decir*, el consumo de oxígeno vinculado a la formación de ATP) es inherente a la mayoría de los tipos de tumores (si no a todos). Por lo tanto, existe una necesidad imperiosa e insatisfecha en la técnica de identificar nuevos compuestos, formulaciones, y métodos para tratar tales trastornos neoplásicos de forma segura y efectiva.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona nuevos derivados de hidroquinona, un nuevo proceso de preparación, y nuevos intermedios clave. La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de tales derivados de hidroquinona y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona además el uso de estos compuestos en métodos para tratar y/o prevenir la patobiología angiogénica (vascular), inflamatoria y/o fibrótica ya que tienen efectos antifibróticos, antiinflamatorios y antiangiogénicos. Por lo tanto, la presente invención proporciona finalmente el uso de estos compuestos en métodos para tratar y/o prevenir una enfermedad o trastorno, incluidos los trastornos inmunológicos/reumatológicos/vasculares, los trastornos oftalmológicos, los trastornos fibróticos, los trastornos metabólicos y gastrointestinales, las neoplasias y los trastornos asociados al cáncer, que comprenden administrar a un sujeto que necesita una dosis terapéuticamente efectiva de los compuestos y/o composiciones farmacéuticas de la presente invención tal como se describió anteriormente. En particular, la presente invención proporciona un método para tratar y/o prevenir una enfermedad o trastorno autoinmunitario, inmunológico, reumatológico, vascular, oftalmológico, fibrótico, metabólico y gastrointestinal, enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas, neoplasias y trastornos asociados al cáncer, enfermedades relacionadas con hormonas y trastornos inmunológicos resultantes de enfermedades infecciosas virales y bacterianas y complicaciones de las mismas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: (A) Imágenes de inmunofluorescencia confocal de la permeabilidad vascular evaluadas mediante la filtración del tinte azul Evans en montajes completos de la retina en un ratón representativo de cada grupo experimental. Las flechas indican la ubicación de la extravasación. Barras de escala, 30 μ m. (B) Cuantificación de filtración vascular mediante la evaluación del número de extravasaciones por campo (0,44 mm²). El efecto de las gotas oftálmicas Ic-007a fue significativo al reducir la filtración vascular al mismo nivel que se produce en el grupo de control no diabético. *p < 0,01 en comparación con los otros grupos.

Figura 2: (A) La puntuación de Schmidt es la evaluación de la eficacia de los compuestos basado en los cuatro criterios de evaluación histopatológica que describen la lesión pancreática basado en las siguientes puntuaciones (el número entre paréntesis) para los cuatro parámetros. (a) Edema intersticial con puntuaciones (0) Ninguna (1) Interlobulillar (2) Lóbulo afectado (3) Células acinares aisladas en forma de islas. (b) Infiltración inflamatoria = infiltración de leucocitos con puntuaciones (0) Ninguna, (1) < 20 %, (2) 20 %-50 %, (3) > 50 %. (c) Necrosis parenquimatosa = Necrosis de células acinares con puntuaciones (0) Ninguna, (1) < 5 %, (2) 5 %-20 %, (3) > 20 %. (d) Hemorragia con puntuaciones (0) Ninguna, (1) 1-2 puntos, (2) 3-5 puntos, (3) > 5 puntos. La puntuación más alta de Schmidt = 10 es inducida por caeruleína + tratamiento con vehículo y la puntuación más baja = 0 es animales no inducidos. La puntuación de Schmidt es el total de las puntuaciones de a+b+c+d y **** significa una diferencia estadísticamente significativa con el grupo inducido con caeruleína como se muestra en la figura 2. Todos los productos muestran una puntuación de Schmidts mejorada en comparación con los animales de control con ceruleína.

Figuras 3A-D: Las figuras 3A-B representan una lista de enfermedades con las principales citocinas implicadas en enfermedades seleccionadas (Akdís M. y col., J Allergy Clin Immunol 2016);138:984-1010) y la figura 3C representa parte de los resultados de la búsqueda con citocinas y genes clasificados por puntuaciones y que probablemente estén involucrados en la enfermedad seleccionada como ejemplo "retinopatía diabética" después de la búsqueda

en <https://www.targetvalidation.org/>. En la figura 3D, la búsqueda se realizó utilizando VEGFA como citocina para encontrar una lista de enfermedades en las que se menciona el VEGFA. Solo una parte de las enfermedades en las que está implicado el VEGFA están representadas en la figura 3D. ref: Open Targets Platform: new developments and updates two years on. Denise Carvalho y col. (Nucleic Acids Research, volumen 47, número D1, 08 de enero de 2019, D1056-D1065, <https://doi.org/10.1093/nar/gky1133>).

Figuras 4 (A-D): representan una tabla que enumera las condiciones y los rendimientos de los compuestos de tipo Ia tal como se describen en los ejemplos 1.1 a 1.4. El rendimiento global se calculó a partir del ácido 2,5-dihidroxitereftálico como material de partida.

Figura 5 (A-C): representa una tabla que enumera las condiciones y los rendimientos de los compuestos de tipo IIa-IIc tal como se describen en los ejemplos 1.5 a 1.7.

Figura 6: representa una tabla que enumera las condiciones y los rendimientos de los compuestos de tipo IIIa e IIb tal como se describen en los ejemplos 1.8 y 1.9.

Figura 7: representa una tabla que enumera las condiciones y los rendimientos de los compuestos de tipo IIIc como se describe en el ejemplo 1.10.

Figura 8: es una tabla que enumera los procedimientos de desprotección descritos en el ejemplo 1.12 en relación con los compuestos de tipo V.

Figura 9: muestra los niveles de glucosa en sangre sin ayunas (promedio $\pm$ stdev de todos los animales) en el modelo de diabetes inducida por STZ en todos los animales de cada grupo muestreados después del día 0 antes de la dosificación, y después de 7 y 14 días de dosificación diaria por vía intravenosa o por vía oral.

Figura 10: muestra la aceleración de la cicatrización de heridas en el modelo de diabetes inducida por STZ en 3 animales por grupo muestreados después de 7 días de dosificación diaria por vía intravenosa o por vía intravenosa.

Figura 11: La figura 11A muestra imágenes representativas de la fibrosis pulmonar el día 21 de tratamiento; (A1) no inducido (saludable); A2, bleomicina inducida con tratamiento con vehículo; A3, bleomicina inducida con tratamiento de 100 mg/kg de pirfenidona; A4, bleomicina inducida con tratamiento con IVC-059a. La figura 11B muestra la puntuación de Ashcroft de pacientes sanos inducidos por bleomicina sin tratamiento frente a pirfenidona frente a IVC-059a.

Descripción detallada de la invención

En la presente memoria se describen nuevos compuestos útiles para el tratamiento de sujetos que padecen una enfermedad, trastorno, o disfunción. Los ejemplos de tales enfermedades, trastornos, o disfunciones incluyen, sin limitación, trastornos autoinmunes, metabólicos, inflamatorios, degenerativos y neoplásicos, en particular patologías inflamatorias, enfermedades angiogénicas y/o trastornos fibróticos tales como retinopatía diabética, nefropatía diabética, espondilitis anquilosante, pancreatitis crónica, fibrosis hepática, fibrosis renal, así como enfermedades metabólicas causadas por disfunciones del páncreas.

En lo sucesivo, a menos que se especifique lo contrario, el conjunto de enfermedades, trastornos, o disfunciones que pueden tratarse utilizando los nuevos compuestos descritos en la presente memoria se denominan colectivamente “afecciones médicas”. El término “sujeto”, tal como se utiliza en la presente memoria, comprende todos y cada uno de los organismos e incluye el término “paciente”. Un sujeto que se tratará según los métodos descritos en la presente memoria puede ser aquel al que un médico le haya diagnosticado que padece una afección médica. El diagnóstico se puede realizar por cualquier medio adecuado. Un experto en la técnica entenderá que un sujeto que se tratará según la presente descripción puede haber sido sometido a pruebas estándar para diagnosticar las afecciones médicas. Como sabe el experto en la técnica, las características clínicas de las afecciones médicas del tipo descrito en la presente memoria varían según los mecanismos patológicos.

En la presente memoria, “tratar” se refiere a la utilización de los compuestos descritos con fines terapéuticos. El tratamiento terapéutico se puede administrar, por ejemplo, a un sujeto que padece la afección médica para mejorar o estabilizar la afección del sujeto. Por lo tanto, en las reivindicaciones y realizaciones descritas en la presente memoria, el tratamiento se refiere a un sujeto sometido, con fines terapéuticos, a las metodologías descritas en la presente memoria.

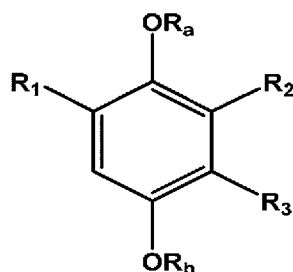
Los profármacos, tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren a cualquier estrategia profarmacológica amplia. Por ejemplo, las estrategias profarmacológicas fueron reconocidas formalmente por Adrian Albert en 1958 (Albert, A. Chemical aspects of selective toxicity. Nature, 1958, 182, 421-422), pero comenzó a principios del siglo anterior, como lo ejemplifican la metenamina, la fenacetina y el prontosil. Los profármacos generalmente son moléculas con poca o ninguna actividad farmacológica, pero que tienen una labilidad estructural incorporada ya sea por casualidad o por diseño, que permite la bioconversión in vivo en el fármaco activo. La conversión puede ocurrir a través de un proceso químico o enzimático o una combinación de ambos. Las moléculas activas frecuentemente se asocian con propiedades fisicoquímicas indeseables que crean desafíos considerables para su administración a

la diana biológica apropiada. Los profármacos pueden mejorar la inestabilidad metabólica, que típicamente se atribuye al metabolismo hepático. De manera similar, el metabolismo intestinal no deseado de los fármacos puede superarse mediante estrategias profarmacológicas selectivas. Esta inestabilidad puede reducir en gran medida la cantidad total de un fármaco que llega a la circulación sistémica y a su objetivo. Los profármacos se pueden utilizar para proteger los fármacos activos de este efecto de primer paso enmascarando un grupo funcional metabólicamente lábil pero farmacológicamente esencial, tal como un fenol, para evitar un metabolismo rápido.

Los profármacos obtenidos mediante modificaciones estructurales del fármaco están diseñados para influir en las propiedades fisicoquímicas inherentes de una molécula para permitir su suministro. Estos desarrollos no siempre se integran en el diseño de nuevas moléculas en la fase de descubrimiento. Frecuentemente, la optimización analógica es el camino preferido a seguir. La implementación de una estrategia profarmacológica temprana puede resultar en un desarrollo clínico más rápido y, en última instancia, en la comercialización de un medicamento.

Se pueden aplicar muchas estrategias de profármacos para influir en la lipofilia de un fármaco original. La lipofilia de los fármacos se ha mejorado enmascarando sus funcionalidades polares e ionizadas mediante promociones de hidrocarburos de cadena corta. Los grupos hidroxilo, carboxilo, fosfato o amina hidrófilos y otros grupos cargados negativa o positivamente se han convertido satisfactoriamente en ésteres alquílicos o arílicos más lipófilos o derivados de N-acilo, que se hidrolizan rápidamente de nuevo en el cuerpo hasta convertirse en los fármacos originales mediante esterasas o peptidasas ubicuas.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un compuesto de la fórmula (1):



Fórmula (I)

en donde:

R_a, R_b = H, acilo C₁₋₄, arilaquilo C₁₋₄, arilo C₆₋₁₀CO, HOOC(CH₂)_nCO, alquilo C₁₋₇NHCO, fosfono, fosfonooximetil, aciloximetilo C₁₋₆, aciloxi C₁₋₆-1-etil, alcocarboniloximetilo C₁₋₆, o alcocarboniloxi C₁₋₆-1-etil;

R₁ = COOR₄, (CH₂)_nCOOR₄, SO₃H, (CH₂)_nSO₃H, o CONH-R₁₀;

uno de R₂ o R₃ es H y el otro es R₅;

R₄ = H, alquilo C₁₋₄, arilaquilo C₁₋₄, morfolino-alquilo C₁₋₆, pirrolidino-alquilo C₁₋₆, N-metilpiperazino-alquilo C₁₋₆, aciloximetilo C₁₋₆, aciloxi C₁₋₆-1-etil, alcocarboniloximetilo C₁₋₆, alcocarboniloxi C₁₋₆-1-etil, o (oxodioxolil)metil; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

R₅ = R₆, R₇ o R₈;

R₆ = CONH-R₉, CONHCOR₉, CONH(CH₂)_n-R₉, o CONHCH(COOR₄)(CH₂)_kR₉, heteroarilo-R₉ en donde k = 0-4;

R₇ = benzoheteroarilo sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de: COOR₄, (CH₂)_nCOOR₄, SO₃H, (CH₂)_nSO₃H, OR₄, azoles [heterociclos que contienen N de 5 miembros], o flúor;

R₈ = (CH₂)_mX(CH₂)_pR₉;

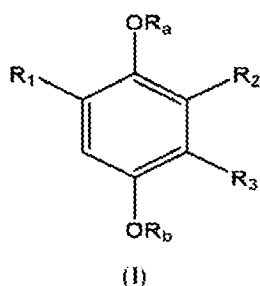
X = O, S, SO₂, NH, NAc, o N(CH₂)_qR₉;

R₉ = arilo o heteroarilo sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de COOR₄, (CH₂)_nCOOR₄, (CH₂)_nSO₃H, OR₄, SO₃H, azoles [heterociclos que contienen N de 5 miembros], flúor, C=O, NHCO-R₁₀;

R₁₀ = arilo, o heteroarilo, sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de COOR₄, (CH₂)_nCOOR₄, (CH₂)_nSO₃H, OR₄, SO₃H, azoles [heterociclos que contienen N de 5 miembros], flúor;

en donde el arilo de R_9 y R_{10} es un grupo aromático que contiene de 6 a 14 átomos, seleccionado entre los grupos fenilo, naftilo, bifenilo; y el heteroarilo R_9 y R_{10} es un grupo aromático que contiene de 1 a 14 átomos de carbono y uno o más nitrógeno; y n, m, p y q son independientemente 1-4.

La presente invención proporciona además un compuesto de la fórmula (I):



en donde:

$R_a, R_b = H$, acilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , arilo $C_6-C_{10}CO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, alquinilo C_1-C_7NHCO , fosfono, fosfonooximetil, aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6-1 -etil, alcoxicarboniloximetilo C_1-C_6 , o alcoxicarboniloxi C_1-C_6-1 -etil;

$R_1 = COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, SO_3H , $(CH_2)_nSO_3H$, o $CONH-R_{10}$;

uno de R_2 o R_3 es H y el otro es R_5 ;

$R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_1-C_6 , pirrolidino-alquilo C_1-C_6 , N-metilpiperazino-alquilo C_1-C_6 , aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6-1 -etil, alcoxicarboniloximetilo C_1-C_6 , alcoxicarboniloxi C_1-C_6-1 -etil, o (oxidioxolil)metil; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

$R_5 = R_6$, o R_7 ,

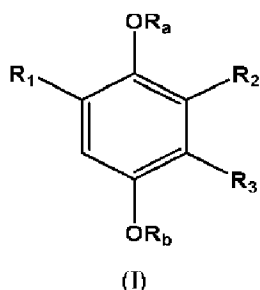
$R_6 = CONH-R_9$, $CONHCOR_9$, $CONH(CH_2)_n-R_9$, o $CONHCH(COOR_4)(CH_2)_kR_9$; en donde $k = 0-4$;

$R_7 =$ benzoheteroarilo sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de: $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, SO_3H , $(CH_2)_nSO_3H$, OR_4 , heterociclos de 5 miembros que contienen N, o flúor;

$R_9 =$ arilo, heteroarilo sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, $(CH_2)_nSO_3H$, OR_4 , SO_3H , heterociclos que contienen N de 5 miembros, flúor, $C=O$, $NHCO-R_{10}$;

$R_{10} =$ arilo, heteroarilo, sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, $(CH_2)_nSO_3H$, OR_4 , SO_3H , heterociclos que contienen N de 5 miembros, o flúor; en donde el arilo de R_9 y R_{10} es un grupo aromático que contiene de 6 a 14 átomos, seleccionado entre fenilo, naftilo, bifenilo; y el heteroarilo de R_9 y R_{10} es un grupo aromático que contiene de 1 a 14 átomos de carbono y uno o más nitrógeno; y n es independientemente 1-4.

La presente invención también proporciona un compuesto de la fórmula (I):



en donde:

$R_a, R_b = H$, acilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , arilo $C_6-C_{10}CO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, alquinilo C_1-C_7NHCO , fosfono, fosfonooximetil, aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6-1 -etil, alcoxicarboniloximetilo C_1-C_6 , o alcoxicarboniloxi C_1-C_6-1 -etil;

$R_1 = COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, SO_3H , $(CH_2)_nSO_3H$, o $CONH-R_{10}$;

uno de R2 o R3 es H y el otro es R5;

R4 = H, alquilo C1-4, arilaquilo C1-4, morfolino-alquilo C1-C6, pirrolidino-alquilo C1-C6, N-metilpiperazino-alquilo C1-C6, aciloximetilo C1-C6, aciloxi C1-C6-1-etil, alcoxicarboniloximetilo C1-C6, alcoxicarboniloxi C1-C6-1-etil, o (oxodioxolil)metil; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

R5 = R8

R8 = (CH2)mX(CH2)pR9;

X = O, S, SO2, NH, NAc, o N(CH2)qR9;

R9 = arilo, heteroarilo sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de COOR4, (CH2)nCOOR4, (CH2)nSO3H, OR4, SO3H, heterociclos que contienen N de 5 miembros, flúor, C=O, NHCO-R10;

R10 = arilo, heteroarilo, sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de COOR4, (CH2)nCOOR4, (CH2)nSO3H, OR4, SO3H, heterociclos que contienen N de 5 miembros, flúor;

en donde el arilo de R9 y R10 es un grupo aromático que contiene de 6 a 14 átomos, seleccionado entre los grupos fenilo, naftilo, bifenilo; en donde el heteroarilo R9 y R10 es un grupo aromático que contiene de 1 a 14 átomos de carbono y uno o más nitrógeno; y n, m, p y q son independientemente 1-4.

La expresión “alquilo” se refiere a un grupo hidrocarburo saturado, de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 12 átomos de carbono, especialmente de 1 a 6 átomos de carbono (p. ej., 1, 2, 3 o 4), por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo o terc-butilo. Además, el término “alquilo” se refiere a grupos en los que uno o más átomos de hidrógeno han sido reemplazados por un átomo de halógeno (preferiblemente F o Cl) tal como, por ejemplo, un grupo 2,2,2-tricloroetilo o trifluorometilo.

La expresión “acilo” se refiere a los grupos (alquil)-C(O)-, (aril)-C(O)-, (heteroaril)-C(O)-, (heteroalquil)-C(O)-, y (heterocicloalquil)-C(O)-, en donde el grupo está unido a la estructura original a través de la funcionalidad carbonilo. En algunas realizaciones, es un radical acilo C1-C4 que se refiere al número total de átomos de cadena o anillo de la porción alquilo, arilo, heteroarilo o heterocicloalquilo del grupo aciloxi más el carbono carbonilo del acilo, *es decir*, otros tres anillos o átomos de cadena más carbonilo.

La expresión “arilo” se refiere a un grupo aromático que contiene uno o más anillos que contienen de 6 a 14 átomos de carbono en el anillo, preferiblemente de 6 a 10 (especialmente 6) átomos de carbono en el anillo.

La expresión “aralquilo” o “arilalquilo C1-4” se refiere a grupos que contienen tanto grupos arilo como alquilo, alqueno, alquino y/o cicloalquilo según las definiciones anteriores, pero no se limitan a bencilo, 2-feniletíl, 3-fenilpropil, y 2-naft-2-iletíl. Un grupo aralquilo contiene preferiblemente uno o dos sistemas de anillos aromáticos (1 o 2 anillos) que contienen de 6 a 10 átomos de carbono y uno o dos grupos alquilo, alqueno y/o alquino que contienen de 1 o 2 a 6 átomos de carbono y/o un grupo cicloalquilo que contiene 5 o 6 átomos de carbono de anillo.

La expresión “heteroarilo” se refiere a un grupo aromático que contiene uno o más anillos que contienen de 5 a 14 átomos de anillo, preferiblemente de 5 a 10 (especialmente 5 o 6 o 9 o 10) átomos de anillo, y contiene uno o más (preferiblemente 1, 2, 3 o 4) átomos de anillo de oxígeno, nitrógeno, fósforo o azufre (preferiblemente O, S o N). Ejemplos son grupos piridilo (*p. ej.*, 4-piridilo), imidazolilo (*p. ej.*, 2-imidazolilo, fenilpirrolilo (*p. ej.*, 3-fenilpirrolil), tiazolilo, isotiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, indolilo, indazolilo, tetrazolilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, oxazolilo, isoxazolilo, triazolilo, tetrazolilo, isoxazolilo, indazolilo, indolilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, piridazinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, purinilo, carbazolilo, acridinilo, pirimidilo, 2,3-bifuril, pirazolil (p. ej., 3-pirazolilo) e isoquinolinilo.

La expresión “benzoheteroarilo” o “benzoheteroaromático” se refiere a anillos bicíclicos que comprenden un anillo de fenilo fusionado con un anillo heteroaromático monocíclico. Los ejemplos de benzoheteroarilo incluyen bencisoxazolilo, benzoxazolilo, bencisotiazolilo, benzotiazolilo, bencimidazolilo, benzofurilo, benzotienilo (incluyendo óxido y dióxido de S), quinolilo, isoquinolilo, indazolilo, indolilo, y similares.

El término “azol” se refiere a un grupo heteroarilo de cinco miembros que tiene un átomo de nitrógeno de anillo y entre 0 y 3 heteroátomos de anillo adicionales seleccionados entre N, O o S. El imidazol, el oxazol, el tiazol y el tetrazol son grupos azólicos representativos.

La expresión “cicloalquilo” se refiere a un grupo cíclico saturado o parcialmente insaturado (por ejemplo, un grupo cicloalqueno) que contiene uno o más anillos (preferiblemente 1 o 2) y contiene de 3 a 14 átomos de carbono de anillo, preferiblemente de 3 a 10 (especialmente 3, 4, 5, 6 o 7) átomos de carbono de anillo. Los ejemplos específicos de grupos cicloalquilo son un grupo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo.

La expresión “opcionalmente sustituidos” se refiere a grupos en los que al menos uno, u opcionalmente dos, tres o más átomos de hidrógeno pueden haber sido reemplazados por átomos de flúor, cloro, bromo, yodo, o por grupos OH, =O, SH, =S, NH₂, NOH, N₃ o NO₂. Esta expresión se refiere además a grupos que pueden ser sustituidos mediante al menos uno, dos, tres o más grupos alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, heteroalquilo, cicloalquilo C₃-C₁₈, heterocicloalquilo C₂-C₁₇, alquilcicloalquilo C₄-C₂₀, heteroalquilcicloalquilo C₂-C₁₉, arilo C₆-C₁₈, heteroarilo C₁-C₁₇, aralquilo C₇-C₂₀ o heteroaralquilo C₂-C₁₉. Esta expresión se refiere además especialmente a grupos que pueden ser sustituidos mediante uno, dos, tres o más grupos alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, heteroalquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₂-C₉, alquilcicloalquilo C₇-C₁₂, heteroalquilcicloalquilo C₂-C₁₁, arilo C₆-C₁₀, heteroarilo C₁-C₉, aralquilo C₇-C₁₂, o heteroaralquilo C₂-C₁₁.

Según una realización preferida, todos los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alquilcicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, aralquilo y heteroaralquilo descritos en la presente memoria pueden sustituirse opcionalmente.

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto derivado de hidroquinona de la fórmula (1), en donde:

(A)

R_a, R_b = H, acilo C₁₋₄, arilaquilo C₁₋₄, arilo C₆-C₁₀CO, HOOC(CH₂)_nCO, alquinilo C₁-C₇NHCO, fosfono, fosfonooximetil, aciloximetilo C₁-C₆, aciloxi C₁-C₆-1-etil, alcoxicarboniloximetilo C₁-C₆, o alcoxicarboniloxi C₁-C₆-1-etil,

R₁ = COOR₄, R₄ = H, alquilo C₁₋₄, arilaquilo C₁₋₄, morfolino-alquilo C₁-C₆, pirrolidino-alquilo C₁-C₆, N-metilpiperazino-alquilo C₁-C₆, aciloximetilo C₁-C₆, aciloxi C₁-C₆-1-etil, alcoxicarbonilmetilo C₁-C₆, alcoxicarboniloxi C₁-C₆-1-etil, o (oxodioxoly)metil; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

R₂ = H; R₃ = R₅; y

R₅ = R₆ = CONH-R₉;

o

(B)

R_a, R_b = H, acilo C₁₋₄, arilaquilo C₁₋₄, arilo C₆-C₁₀CO, HOOC(CH₂)_nCO, alquinilo C₁-C₇NHCO, fosfono, fosfonooximetil, aciloximetilo C₁-C₆, aciloxi C₁-C₆-1-etil, alcoxicarboniloximetilo C₁-C₆, o alcoxicarboniloxi C₁-C₆-1-etil,

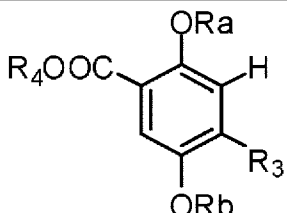
R₁ = COOR₄, R₄ = H, alquilo C₁₋₄, arilaquilo C₁₋₄, morfolino-alquilo C₁-C₆, pirrolidino-alquilo C₁-C₆, N-metilpiperazino-alquilo C₁-C₆, aciloximetilo C₁-C₆, aciloxi C₁-C₆-1-etil, alcoxicarbonilmetilo C₁-C₆, alcoxicarboniloxi C₁-C₆-1-etil, o (oxodioxoly)metil; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

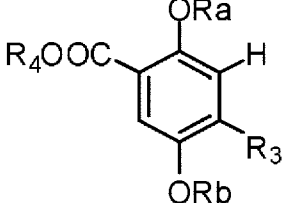
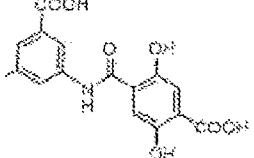
R₃ = H; R₂ = R₅; y

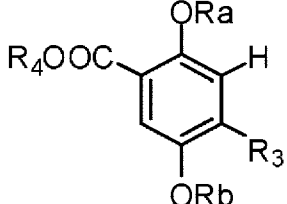
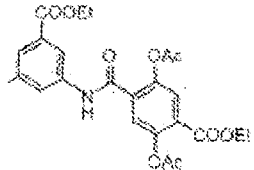
R₅ = R₆ = CONH-R₉.

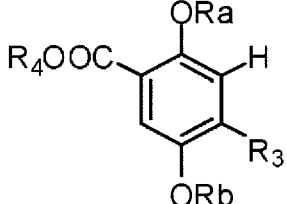
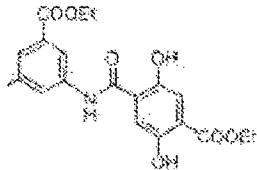
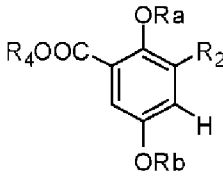
En una primera realización, la presente invención incluye, por lo tanto, compuestos según la tabla 1:

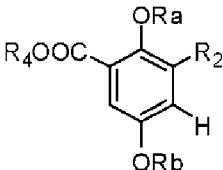
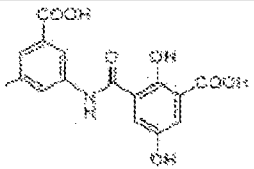
Tabla 1

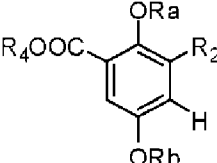
A.	 R3 = R5 = CONHR9				
Compuesto n. ^c	Nombres químicos de los compuestos	Ra	Rb	R4	R9
Ia-001a	ácido 4-(2-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	2-carboxifenil
Ia-001a-Tz	ácido 4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenil-aminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	2-(1H-tetrazol-5-il)fenil

A.	 $R_3 = R_5 = \text{CONHR}_9$				
Compuesto n.º	Nombres químicos de los compuestos	Ra	Rb	R4	R9
la-001c	ácido 2,5-dihidroxi-4-(2-sulfofenilaminocarbonil)benzoico	H	H	H	2-sulfofenil
la-002a	ácido 4-(3-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	3-carboxifenil
la-002a-Tz	ácido 4-(3-(1H-tetrazol-5-il)fenil-aminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	3-(1H-tetrazol-5-il)fenil
la-002c	ácido 2,5-dihidroxi-4-(3-sulfofenilaminocarbonil)benzoico	H	H	H	3-sulfofenil
la-003a	ácido 4-(4-carboxifenil-aminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-carboxifenil
la-003a-Tz	ácido 4-(4-(1H-tetrazol-5-il)fenil-aminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-(1H-tetrazol-5-il)fenil
la-003c	ácido 2,5-dihidroxi-4-(4-sulfofenilaminocarbonil)benzoico	H	H	H	4-sulfofenil
la-004a	ácido 4-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	3-carboxi-4-hidroxifenil
la-005a	ácido 4-(4-carboxi-3-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-carboxi-3-hidroxifenil
la-006a	ácido 4-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-carboxi-2,5-dihidroxifenil
la-006a	ácido 4-(2-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	2-carboxi-4-hidroxifenil
lb-010a	ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-4-carboxibenzoilamino)benzoico	H	H	H	
la-011a	ácido 3-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico;	H	H	H	2,3-dicarboxifenil
la-012a	ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)tereftálico	H	H	H	2,5-dicarboxifenil
la-013a	Compuesto 36: ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isofotálico	H	H	H	2,6-dicarboxifenil
la-014a	Compuesto 38: ácido 4-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico	H	H	H	3,4-dicarboxifenil
la-015a	ácido 5-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isofotálico	H	H	H	3,5-dicarboxifenil
la-016a	ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	H	H	H	3-carboxipiridin-2-il
la-017a	ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico	H	H	H	4-carboxipiridin-2-il
la-018a	ácido 6-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	H	H	H	5-carboxipiridin-2-il
la-019a	ácido 6-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picotínico	H	H	H	6-carboxipiridin-2-il

A.	 R3 = R5 = CONHR9				
Compuesto n.º	Nombres químicos de los compuestos	Ra	Rb	R4	R9
Ia-020a	ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)-5-fluoronicotínico	H	H	H	3-carboxi-5-fluoropiridin-2-il
Ia-021a	ácido 6-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)piridina-2,5-dicarboxílico	H	H	H	3,6-dicarboxipiridin-2-il
Ia-022a	ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)piridina-3,5-dicarboxílico	H	H	H	3,5-dicarboxipiridin-2-il
Ia-023a	ácido 3-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico	H	H	H	4-carboxipiridin-3-il
Ia-024a	ácido 5-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	H	H	H	5-carboxipiridin-3-il
Ia-025a	ácido 5-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	H	H	H	6-carboxipiridin-3-il
Ia-026a	ácido 3-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	H	H	H	2-carboxipiridin-3-il
Ia-027a	ácido 5-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)-2-fluoroisonicotínico	H	H	H	4-carboxi-6-fluoropiridin-3-il
Ia-028a	ácido 4-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	H	H	H	3-carboxipiridin-4-il
Ia-029a	ácido 4-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	H	H	H	2-carboxipiridin-3-il
Ia-032a	ácido 4-(4-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-(carboximetil)fenil
Ia-033a	ácido 4-(3-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	3-(carboximetil)fenil
Ia-033a-HyP	ácido 2,5-dihidroxi-4-(3-(1-hidroxi-1H-pirazol-4-il)fenilaminocarbonil)benzoico	H	H	H	3-(1-hidroxi-1H-pirazol-4-il)fenil
Ia-034a	ácido 4-(2-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	2-(carboximetil)fenil
Ia-001a-E2-A2	4-(2-(etoxicarbonil)fenilaminocarbonil)-2,5-diacetoxibenzoato de etilo	Ac	Ac	Et	2-(etoxicarbonil)fenil
Ia-001a-E2	4-(2-(etoxicarbonil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoato de etilo	H	H	Et	2-(etoxicarbonil)fenil
Ia-001a-Tz-E1-A2	4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-diacetoxibenzoato de etilo	Ac	Ac	Et	2-(1H-tetrazol-5-il)fenil
Ia-001a-Tz-E1	4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoato de etilo	H	H	Et	2-(1H-tetrazol-5-il)fenil
Ia-004a-E2	2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3-(metoxicarbonil)fenilaminocarbonil)benzoato de etilo	H	H	Et	4-hidroxi-3-(metoxicarbonil)fenil
Ib-010a-E3-A4	3,5-bis(2,5-diacetoxi-4-etoxicarbonilbenzoilamino)benzoato de etilo	Ac	Ac	Et	

A.	 R3 = R5 = CONHR9				
Compuesto n.º	Nombres químicos de los compuestos	Ra	Rb	R4	R9
Ib-010a-E3	3,5-bis(2,5-dihidroxi-4-etoxicarbonilbenzoilamino)benzoato de etilo	H	H	Et	
Ia-023a-E2	3-(4-(etoxicarbonil-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotinato de etilo	H	H	Et	4-etoxicarbonilpiridin-3-il
Ia-056a-E2	Compuesto 390: 4-(4-etoxicarbonil-2,5-dihidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoato de etilo	H	H	Et	4-etoxicarbonil-2,5-dihidroxifenil
B.	 R2 = R5 = CONHR9				
Ila-001a	ácido 3-(2-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	2-carboxifenil
Ila-001a-Tz	ácido 3-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	2-(1H-tetrazol-5-il)fenil
Ila-001c	ácido 2,5-dihidroxi-3-(2-sulfofenilaminocarbonil)benzoico	H	H	H	2-sulfofenil
Ila-002a	ácido 3-(3-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	3-carboxifenil
Ila-002a-Tz	ácido 3-(3-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	3-(1H-tetrazol-5-il)fenil
Ila-002c	ácido 2,5-dihidroxi-3-(3-sulfofenilaminocarbonil)benzoico	H	H	H	3-sulfofenil
Ila-003a	ácido 3-(4-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-carboxifenil
Ila-003a-Tz	ácido 3-(4-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-(1H-tetrazol-5-il)fenil
Ila-003c	ácido 2,5-dihidroxi-3-(4-sulfofenilaminocarbonil)benzoico	H	H	H	4-sulfofenil
Ila-004a	ácido 3-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	3-carboxi-4-hidroxifenil
Ila-005a	ácido 3-(4-carboxi-3-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-carboxi-3-hidroxifenil
Ila-006a	ácido 3-(2-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	2-carboxi-4-hidroxifenil

B.					 $R_2 = R_5 = \text{CONHR}_9$
IIb-010a	ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-3-carboxibenzoilamino)benzoico	H	H	H	
IIa-011a	ácido 3-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico	H	H	H	2,3-dicarboxifenil
IIa-012a	ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)tereftálico	H	H	H	2,5-dicarboxifenil
IIa-013a	ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico	H	H	H	2,6-dicarboxifenil
IIa-014a	ácido 4-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico	H	H	H	3,4-dicarboxifenil
IIa-015a	ácido 5-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico	H	H	H	ácido 3,5-dicarboxílico
IIa-016a	ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	H	H	H	3-carboxipiridin-2-il
IIa-017a	ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico	H	H	H	4-carboxipiridin-2-il
IIa-018a	ácido 6-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	H	H	H	5-carboxipiridin-2-il
IIa-019a	ácido 6-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	H	H	H	6-carboxipiridin-2-il
IIa-020a	ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)-5-fluoronicotínico	H	H	H	3-carboxi-5-fluoropiridin-2-il
IIa-021a	ácido 6-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)piridina-2,5-dicarboxílico	H	H	H	3,6-dicarboxipiridin-2-il
IIa-022a	ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)piridina-3,5-dicarboxílico	H	H	H	3,5-dicarboxipiridin-2-il
IIa-023a	ácido 3-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico	H	H	H	4-carboxipiridin-3-il
IIa-024a	ácido 5-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	H	H	H	5-carboxipiridin-3-il
IIa-025a	ácido 5-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	H	H	H	6-carboxipiridin-3-il
IIa-026a	ácido 3-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	H	H	H	2-carboxipiridin-3-il
IIa-027a	ácido 5-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)-2-fluoroisonicotínico	H	H	H	4-carboxi-6-fluoropiridin-3-il
IIa-028a	ácido 4-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	H	H	H	3-carboxipiridin-4-il
IIa-029a	Compuesto 172: ácido 4-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;	H	H	H	2-carboxipiridin-3-il
IIa-032a	ácido 3-(4-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	4-(carboximetil)fenil
IIa-033a	ácido 3-(3-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	3-(carboximetil)fenil
IIa-033a-Hyp	ácido 2,5-dihidroxi-3-(3-(1-hidroxi-1H-pirazol-4-il)fenilaminocarbonil)benzoico	H	H	H	3-(1-hidroxi-1H-pirazol-4-il)fenil
IIa-034a	ácido 3-(2-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	H	H	H	2-(carboximetil)fenil

B.	 R2 = R5 = CONHR9				
IIa-001aTz-E1	3-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil-2,5-dihidroxibenzoato de etilo	H	H	Et	2-(1H-tetrazol-5-il)fenil
IIa-034a-E2	3-(2-(etoxicarbonilmetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoato de etilo	H	H	Et	2-(2-etoxicarbonilmetil)fenil

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto de la fórmula (1), en donde:

(A)

$R_a, R_b = H$;

$R_1 = SO_3H$;

$R_2 = H$; $R_3 = R_5$; y

$R_5 = R_6 = CONH-R_9$;

o

(B)

$R_a, R_b = H$;

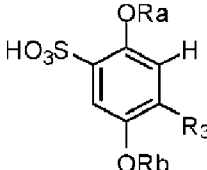
$R_1 = SO_3H$;

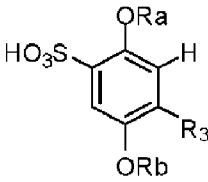
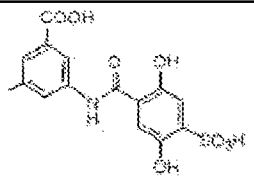
$R_3 = H$; $R_2 = R_5$; y

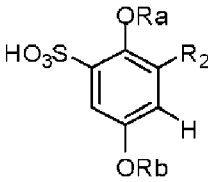
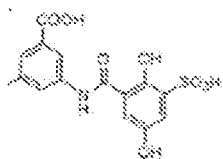
$R_5 = R_6 = CONH-R_9$.

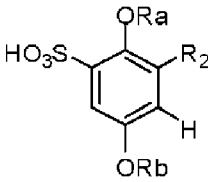
En una segunda realización, la presente invención incluye compuestos según la tabla 2:

Tabla 2

A.	 R3 = R5 = CONHR9			
Compuesto n.º	Nombres químicos de los compuestos	Ra	Rb	R9
Ia-001b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)benzoico	H	H	2-carboxifenil
Ia-001d	ácido 2,5-dihidroxi-4-(2-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico	H	H	2-sulfofenil
Ia-002b	ácido 3-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)benzoico	H	H	3-carboxifenil
Ia-002d	ácido 2,5-dihidroxi-4-(3-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico	H	H	3-sulfofenil
Ia-003b	ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)benzoico	H	H	4-carboxifenil
Ia-003d	ácido 2,5-dihidroxi-4-(4-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico	H	H	4-sulfofenil
Ia-004b	ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)-2-hidroxibenzoico	H	H	3-carboxi-4-hidroxifenil

A.	 $R_3 = R_5 = \text{CONHR}_9$			
Compuesto n.º	Nombres químicos de los compuestos	Ra	Rb	R9
la-005b	ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)-2-hidroxibenzoico	H	H	4-carboxi-3-hidroxifenil
la-006b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)-5-hidroxibenzoico	H	H	2-carboxi-4-hidroxifenil
lb-010b	ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)benzoico	H	H	
la-011b	ácido 3-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)ftálico	H	H	2,3-dicarboxifenil
la-012b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)tereftálico	H	H	2,5-dicarboxifenil
la-013b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)isofotálico	H	H	2,6-dicarboxifenil
la-014b	ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)ftálico	H	H	3,4-dicarboxifenil
la-015b	ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)isofotálico	H	H	3,5-dicarboxifenil
la-016b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)nicotínico	H	H	3-carboxipiridin-2-il
la-017b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)isonicotínico	H	H	4-carboxipiridin-2-il
la-018b	ácido 6-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)nicotínico	H	H	5-carboxipiridin-2-il
la-019b	ácido 6-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)picolínico	H	H	6-carboxipiridin-2-il
la-020b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)-5-fluoronicotínico	H	H	3-carboxi-5-fluoropiridin-2-il
la-021b	ácido 6-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)piridina-2,5-dicarboxílico	H	H	3,6-dicarboxipiridin-2-il
la-022b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)piridina-3,5-dicarboxílico	H	H	3,5-dicarboxipiridin-2-il
la-023b	ácido 3-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)isonicotínico	H	H	4-carboxipiridin-3-il
la-024b	ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)nicotínico	H	H	5-carboxipiridin-3-il
la-025b	ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)picolínico	H	H	6-carboxipiridin-3-il
la-026a	ácido 3-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)picolínico	H	H	2-carboxipiridin-3-il
la-027b	ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)-2-fluoroisonicotínico	H	H	4-carboxi-6-fluoropiridin-3-il
la-028b	ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)nicotínico	H	H	3-carboxipiridin-4-il
la-029b	ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)picolínico	H	H	2-carboxipiridin-3-il
la-032b	ácido (4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)fenil)acético	H	H	4-(carboximetil)fenil
la-033b	ácido (3-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)fenil)acético	H	H	3-(carboximetil)fenil
la-034b	ácido (2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)fenil)acético	H	H	2-(carboximetil)fenil

B.	 $R_2 = R_5 = CONHR^9$			
IIa-001b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)benzoico	H	H	2-carboxifenil
IIa-001d	ácido 2,5-dihidroxi-3-(2-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico	H	H	2-sulfofenil
IIa-002b	ácido 3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)benzoico	H	H	3-carboxifenil
IIa-002d	ácido 2,5-dihidroxi-3-(3-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico	H	H	3-sulfofenil
IIa-003b	ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)benzoico	H	H	4-carboxifenil
IIa-003d	ácido 2,5-dihidroxi-3-(4-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico	H	H	4-sulfofenil
IIa-004b	ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-2-hidroxibenzoico	H	H	3-carboxi-4-hidroxifenil
IIa-005b	ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-2-hidroxibenzoico;	H	H	4-carboxi-3-hidroxifenil
IIa-006b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-5-hidroxibenzoico	H	H	2-carboxi-4-hidroxifenil
IIb-010b	ácido 3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)benzoico	H	H	
IIa-011b	ácido 3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)ftálico;	H	H	2,3-dicarboxifenil
IIa-012b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)tereftálico	H	H	2,5-dicarboxifenil
IIa-013b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)isofotálico	H	H	2,6-dicarboxifenil
IIa-014b	ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)ftálico	H	H	3,4-dicarboxifenil
IIa-015b	ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)isofotálico	H	H	3,5-dicarboxifenil
IIa-016b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)nicotínico	H	H	3-carboxipiridin-2-il
IIa-017b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)isonicotínico	H	H	4-carboxipiridin-2-il
IIa-018b	ácido 6-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)nicotínico	H	H	5-carboxipiridin-2-il
IIa-019b	ácido 6-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)picolínico	H	H	6-carboxipiridin-2-il
IIa-020b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-5-fluoronicotínico	H	H	3-carboxi-5-fluoropiridin-2-il
IIa-021b	ácido 6-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)piridina-2,5-dicarboxílico;	H	H	3,6-dicarboxipiridin-2-il
IIa-022b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)piridina-3,5-dicarboxílico	H	H	3,5-dicarboxipiridin-2-il
IIa-023b	ácido 3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)isonicotínico	H	H	4-carboxipiridin-3-il
IIa-024b	ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)nicotínico	H	H	5-carboxipiridin-3-il
IIa-025b	ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)picolínico	H	H	6-carboxipiridin-3-il
IIa-026b	ácido 3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)picolínico	H	H	2-carboxipiridin-3-il
IIa-027b	ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-2-fluoroisonicotínico	H	H	4-carboxi-6-fluoropiridin-3-il
IIa-028b	ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)nicotínico	H	H	3-carboxipiridin-4-il

B.	 $R_2 = R_5 = \text{CONHR}_9$			
IIa-029b	Compuesto 173: ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)picolínico	H	H	2-carboxipiridin-3-il
IIa-032b	ácido (4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)fenil)acético	H	H	4-(carboximetil)fenil
IIa-033b	ácido (3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)fenil)acético	H	H	3-(carboximetil)fenil
IIa-034b	ácido (2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)fenil)acético	H	H	2-(carboximetil)fenil

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto derivado de hidroquinona de la fórmula (1), en donde:

(A)

$R_a, R_b = H$;

$R_1 = (\text{CH}_2)_n\text{COOR}_4$; $R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_{1-6} , pirrolidino-alquilo C_{1-6} , N-metilpiperazino-alquilo C_{1-6} , aciloximetilo C_{1-6} , aciloxi C_{1-6-1} -etil, alcóxicarboniloximetilo C_{1-6} , alcóxicarboniloxi C_{1-6-1} -etil, o (oxodioxolil)metil; *o*-metoxifenilo (éster de guayacol);

$R_2 = H$; $R_3 = R_5$; y

$R_5 = R_6 = \text{CONH-R}_9$;

O

(B)

$R_a, R_b = H$;

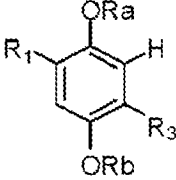
$R_1 = (\text{CH}_2)_n\text{COOR}_4$; $R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_{1-6} , pirrolidino-alquilo C_{1-6} , N-metilpiperazino-alquilo C_{1-6} , aciloximetilo C_{1-6} , aciloxi C_{1-6-1} -etil, alcóxicarboniloximetilo C_{1-6} , alcóxicarboniloxi C_{1-6-1} -etil, o (oxodioxolil)metil; *o*-metoxifenilo (éster de guayacol);

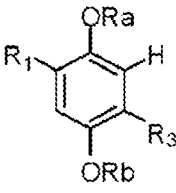
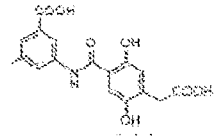
$R_3 = H$; $R_2 = R_5$; y

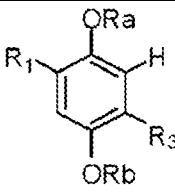
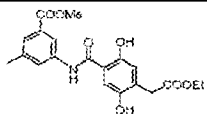
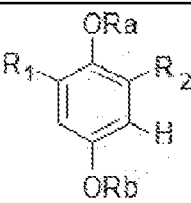
$R_5 = R_6 = \text{CONH-R}_9$.

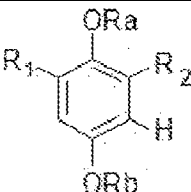
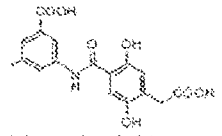
En una tercera realización, la presente invención incluye compuestos según la tabla 3:

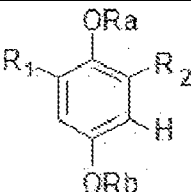
Tabla 3

A.	 $R_3 = R_5 = R_6 = \text{CONH-R}_9$				
Compuesto n.º	Nombres químicos de los compuestos	R1	Ra	Rb	R9
IIIa-001a	ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico	CH ₂ COOH	H	H	2-carboxifenil
IIIa-001a-Tz	ácido (2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	CH ₂ COOH	H	H	2-(1H-tetrazol-5-il)fenil
IIIa-001c	ácido (2,5-dihidroxi-4-(2-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético	CH ₂ COOH	H	H	2-sulfofenil

A.	 $R_3 \approx R_5 \approx R_6 \approx \text{CONH-R}_9$
Compuesto n.º	Nombres químicos de los compuestos R1 Ra Rb R9
IIIa-002a	ácido 3-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico; CH ₂ COOH H H 3-carboxifenil
IIIa-002c	ácido (2,5-dihidroxi-4-(3-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético; CH ₂ COOH H H 3-sulfofenil
IIIa-003a	ácido 4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico; CH ₂ COOH H H 4-carboxifenil
IIIa-003c	ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-(4-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético; CH ₂ COOH H H 4-sulfofenil
IIIa-004a	Compuesto 216: ácido 5-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico CH ₂ COOH H H 3-carboxi-4-hidroxifenil
IIIa-005a	ácido 4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico CH ₂ COOH H H 4-carboxi-3-hidroxifenil
IIIa-006a	ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-5-hidroxibenzoico CH ₂ COOH H H 2-carboxi-4-hidroxifenil
IIIb-010a	ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-4-carboximetilbenzoilamino)benzoico CH ₂ COOH H H 
IIIa-011a	ácido 3-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico CH ₂ COOH H H 2,3-dicarboxifenil
IIIa-012a	ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)tereftálico CH ₂ COOH H H 2,5-dicarboxifenil
IIIa-013a	ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isofotálico CH ₂ COOH H H 2,6-dicarboxifenil
IIIa-014a	ácido 4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico CH ₂ COOH H H 3,4-dicarboxifenil
IIIa-015a	ácido 5-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isofotálico CH ₂ COOH H H 3,5-dicarboxifenil
IIIa-016a	ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico CH ₂ COOH H H 3-carboxipiridin-2-il
IIIa-017a	ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico CH ₂ COOH H H 4-carboxipiridin-2-il
IIIa-018a	ácido 6-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico CH ₂ COOH H H 5-carboxipiridin-2-il
IIIa-019a	ácido 6-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico CH ₂ COOH H H 6-carboxipiridin-2-il
IIIa-020a	ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-5-fluoronicotínico CH ₂ COOH H H 3-carboxi-5-fluoropiridin-2-il
IIIa-021a	ácido 6-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)piridina-2,5-dicarboxílico CH ₂ COOH H H 3,6-dicarboxipiridin-2-il
IIIa-022a	ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)piridina-3,5-dicarboxílico CH ₂ COOH H H 3,5-dicarboxipiridin-2-il
IIIa-023a	ácido 3-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico; CH ₂ COOH H H 4-carboxipiridin-3-il

A.	 R3 = R5 = R6 = CONH-R9				
Compuesto n.º	Nombres químicos de los compuestos	R1	Ra	Rb	R9
IIIa-024a	ácido 5-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	CH2COOH	H	H	5-carboxipiridin-3-il
IIIa-025a	ácido 5-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	CH2COOH	H	H	6-carboxipiridin-3-il
IIIa-026a	ácido 3-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	CH2COOH	H	H	2-carboxipiridin-3-il
IIIa-027a	ácido 5-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-fluoroisonicotínico	CH2COOH	H	H	4-carboxi-6-fluoropiridin-3-il
IIIa-028a	ácido 4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;	CH2COOH	H	H	3-carboxipiridin-4-il
IIIa-029a	ácido 4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;	CH2COOH	H	H	2-carboxipiridin-3-il
IIIa-032a	ácido (4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético	CH2COOH	H	H	4-(carboximetil)fenil
IIIa-033a	ácido (3-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético	CH2COOH	H	H	3-(carboximetil)fenil
IIIa-034a	ácido (2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético	CH2COOH	H	H	2-(carboximetil)fenil
IIIa-001a-E2	2-(4-(etoxicarbonilmetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoato de metilo	CH2COOEt	H	H	2-(metoxycarbonil)fenil
IIIa-001aTz-E1	Compuesto 383: (4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acetato de etilo;	CH2COOEt	H	H	2-(1H-tetrazol-5-il)fenil
IIIa-015a-E3	5-(4-(etoxicarbonilmetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isofталato de dietilo	CH2COOEt	H	H	3,5-dietoxycarbonilfenil
IIIb-010a-E3	3,5-bis(4-(etoxicarbonilmetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoato de metilo	CH2COOEt	H	H	
B.	 R2 = R5 = R6 = CONHR9				
IVa-001a	ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico	CH2COOH	H	H	2-carboxifenil
IVa-001c	ácido (2,5-dihidroxi-3-(2-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético	CH2COOH	H	H	2-sulfofenil
IVa-002a	ácido 3-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico	CH2COOH	H	H	3-carboxifenil
IVa-002c	ácido (2,5-dihidroxi-3-(3-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético	CH2COOH	H	H	3-sulfofenil

B.	 R2 = R5 = R6 = CONHR9				
IVa-003a	ácido 4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico	CH2COOH	H	H	4-carboxifenil
IVa-003c	ácido (2,5-dihidroxi-3-(4-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético	CH2COOH	H	H	4-sulfofenil
IVa-004a	ácido 5-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico	CH2COOH	H	H	3-carboxi-4-hidroxifenil
IVa-005a	ácido 4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico	CH2COOH	H	H	4-carboxi-3-hidroxifenil
IVa-006a	Compuesto 295: ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-5-hidroxibenzoico;	CH2COOH	H	H	2-carboxi-4-hidroxifenil
IVb-010a	ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-3-carboximetilbenzoilamino)benzoico	CH2COOH	H	H	
IVa-011a	ácido 3-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico	CH2COOH	H	H	2,3-dicarboxifenil
IVa-012a	ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)tereftálico	CH2COOH	H	H	2,5-dicarboxifenil
IVa-013a	ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isofotálico	CH2COOH	H	H	2,6-dicarboxifenil
IVa-014a	ácido 4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico	CH2COOH	H	H	3,4-dicarboxifenil
IVa-015a	ácido 5-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isofotálico	CH2COOH	H	H	3,5-dicarboxifenil
IVa-016a	ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	CH2COOH	H	H	3-carboxipiridin-2-il
IVa-017a	ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico	CH2COOH	H	H	4-carboxipiridin-2-il
IVa-018a	ácido 6-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	CH2COOH	H	H	5-carboxipiridin-2-il
IVa-019a	ácido 6-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	CH2COOH	H	H	6-carboxipiridin-2-il
IVa-020a	ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-5-fluoronicotínico	CH2COOH	H	H	3-carboxi-5-fluoropiridin-2-il
IVa-021a	ácido 6-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)piridina-2,5-dicarboxílico	CH2COOH	H	H	3,6-dicarboxipiridin-2-il
IVa-022a	ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)piridina-3,5-dicarboxílico	CH2COOH	H	H	3,5-dicarboxipiridin-2-il
IVa-023a	ácido 3-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico	CH2COOH	H	H	4-carboxipiridin-3-il
IVa-024a	ácido 5-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	CH2COOH	H	H	5-carboxipiridin-3-il
IVa-025a	ácido 5-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	CH2COOH	H	H	6-carboxipiridin-3-il
IVa-026a	ácido 3-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	CH2COOH	H	H	2-carboxipiridin-3-il

B.	 $R_2 = R_5 = R_6 = \text{CONHR}_9$				
IVa-027a	ácido 5-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-fluoroisonicotínico	CH ₂ COOH	H	H	4-carboxi-6-fluoropiridin-3-il
IVa-028a	ácido 4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico	CH ₂ COOH	H	H	3-carboxipiridin-4-il
IVa-029a	ácido 4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico	CH ₂ COOH	H	H	2-carboxipiridin-3-il
IVa-032a	ácido (4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético	CH ₂ COOH	H	H	4-(carboximetil)fenil
IVa-033a	ácido (3-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético	CH ₂ COOH	H	H	3-(carboximetil)fenil
IVa-034a	ácido (2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético	CH ₂ COOH	H	H	2-(carboximetil)fenil

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto derivado de hidroquinona de la fórmula (1), en donde:

(A)

$R_a, R_b = \text{H}$, acilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , arilo $\text{C}_6\text{-C}_{10}\text{CO}$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{CO}$, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_7\text{NHCO}$, fosfono, fosfonooximetil, aciloximetilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, aciloxi $\text{C}_1\text{-C}_6\text{-1-etil}$, alcoxicarboniloximetilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, o alcoxicarboniloxi $\text{C}_1\text{-C}_6\text{-1-etil}$;

$R_1 = \text{CONH-R}_{10}$; $R_4 = \text{H}$, alquilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, pirrolidino-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, N-metilpiperazino-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, aciloximetilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, aciloxi $\text{C}_1\text{-C}_6\text{-1-etil}$, alcoxicarboniloximetilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, alcoxicarboniloxi $\text{C}_1\text{-C}_6\text{-1-etil}$, o (oxodioxolil)metil; *o*-metoxifenilo (éster de guayacol);

$R_2 = \text{H}$; $R_3 = R_5$; y

$R_5 = R_6 = \text{CONH-R}_9$;

O

(B)

$R_a, R_b = \text{H}$, acilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , arilo $\text{C}_6\text{-C}_{10}\text{CO}$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{CO}$, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_7\text{NHCO}$, fosfono, fosfonooximetil, aciloximetilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, aciloxi $\text{C}_1\text{-C}_6\text{-1-etil}$, alcoxicarboniloximetilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, o alcoxicarboniloxi $\text{C}_1\text{-C}_6\text{-1-etil}$;

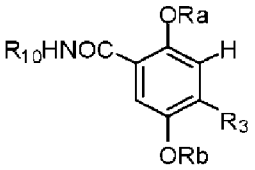
$R_1 = \text{CONH-R}_{10}$; $R_4 = \text{H}$, alquilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, pirrolidino-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, N-metilpiperazino-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, aciloximetilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, aciloxi $\text{C}_1\text{-C}_6\text{-1-etil}$, alcoxicarboniloximetilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, alcoxicarboniloxi $\text{C}_1\text{-C}_6\text{-1-etil}$, o (oxodioxolil)metil; *o*-metoxifenilo (éster de guayacol);

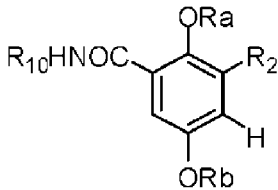
$R_3 = \text{H}$; $R_2 = R_5$; y

$R_5 = R_6 = \text{CONH-R}_9$

En una cuarta realización, la presente invención incluye compuestos según la tabla 4:

Tabla 4

A.	 $R_3 = R_5 = R_6 = \text{CONH-R}_9$				
Compuesto n.º	Nombres químicos de los compuestos	Ra	Rb	R10	R9
lc-001a- Tz/1-004a	ácido 5-(4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico	H	H	3-carboxi-4-hidroxifenil	2-(1H-tetrazol-5-il)fenil
lc-001a- Tz(2)	N ₁ ,N ₄ -bis(2-(1H-tetrazol-5-il)fenil)-2,5-dihidroxitereftalamida	H	H	2-(1H-tetrazol-5-il)fenil	2-(1H-tetrazol-5-il)fenil
lc-007a	ácido 5-(4-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico;	H	H	3-carboxi-4-hidroxifenil	3-carboxi-4-hidroxifenil
lc-007b	ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3-sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-2-hidroxibencenosulfónico	H	H	4-hidroxi-3-sulfonilfenil	4-hidroxi-3-sulfonilfenil
lc-008a	ácido 4-(4-(4-carboxi-3-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico	H	H	4-carboxi-3-hidroxifenil	4-carboxi-3-hidroxifenil
lc-008b	ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-(3-hidroxi-4-sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-2-hidroxibencenosulfónico	H	H	3-hidroxi-4-sulfonilfenil	3-hidroxi-4-sulfonilfenil
lc-009a	ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-2-carboxifenilaminocarbonil)benzamido)-5-hidroxibenzoico	H	H	2-carboxi-4-hidroxifenil	2-carboxi-4-hidroxifenil
lc-009b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-2-sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-5-hidroxibencenosulfónico	H	H	4-hidroxi-2-sulfofenil	4-hidroxi-2-sulfofenil
lb-001a- Tz/1-004a- E1	5-(4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoato de metilo;	H	H	4-hidroxi-3-(metoxicarbonil)fenil-	2-(1H-tetrazol-5-il)fenil
lc-007a- E2-A4	5-(2,5-diacetoxi-4-(4-acetoxi-3-(metoxicarbonil)fenilaminocarbonil)benzamido)-2-acetoxibenzoato de metilo;	Ac	Ac	4-acetoxi-3-(metoxicarbonil)fenil	4-acetoxi-3-(metoxicarbonil)fenil
lc-007a-E2	5-(2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3-(metoxicarbonil)fenilaminocarbonil)benzamido)-2-hidroxibenzoato de metilo;	H	H	4-hidroxi-3-(metoxicarbonil)fenil	4-hidroxi-3-(metoxicarbonil)fenil
lc-007a- pive2	5-[[4-[3-[1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etoxicarbonil]-4-hidroxi-fenil]carbamoil]-2,5-dihidroxibenzoil]amino]-2-hidroxibenzoato de 5-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etil	H	H	3-[1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etoxicarbonil]-4-hidroxifenil	3-[1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etoxicarbonil]-4-hidroxifenil
lc-009a-E2	:2-(2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-2-(metoxicarbonil)fenilaminocarbonil)benzamido)-5-hidroxibenzoato de metilo	H	H	4-hidroxi-2-(metoxicarbonil)fenil	4-hidroxi-2-(metoxicarbonil)fenil

B.	 R2 = R5 = R6 = CONH-R9				
Ilc-007a	ácido 5-(3-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico	H	H	3-carboxi-4-hidroxifenil	3-carboxi-4-hidroxifenil
Ilc-007b	ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-(4-hidroxi-3-sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-2-hidroxibencenosulfónico	H	H	4-hidroxi-3-sulfofenil	4-hidroxi-3-sulfofenil
Ilc-008a	ácido 4-(3-(3-hidroxi-4-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico	H	H	3-hidroxi-4-carboxifenil	3-hidroxi-4-carboxifenil
Ilc-008b	ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-(3-hidroxi-4-sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-2-hidroxibencenosulfónico	H	H	3-hidroxi-4-sulfofenil	3-hidroxi-4-sulfofenil
Ilc-009a	ácido 2-(3-(2-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-5-hidroxibenzoico	H	H	2-carboxi-4-hidroxifenil	2-carboxi-4-hidroxifenil
Ilc-009b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-(4-hidroxi-2-sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-5-hidroxibencenosulfónico	H	H	4-hidroxi-2-sulfofenil	4-hidroxi-2-sulfofenil

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto derivado de hidroquinona de la fórmula (I), en donde:

(A)

R_a, R_b = H;

R₁ = COOR₄; (CH₂)_nCOOR₄; R₄ = H, alquilo C₁₋₄, arilaquilo C₁₋₄, morfolino-alquilo C₁₋₆, pirrolidino-alquilo C₁₋₆, N-metilpiperazino-alquilo C₁₋₆, aciloximetilo C₁₋₆, aciloxi C₁₋₆-1-etil, alcocixarboniloximetilo C₁₋₆, alcocixarboniloxi C₁₋₆-1-etil, o (oxodioxolil)metil; *o*-metoxifenilo (éster de guayacol);

R₂ = H; R₃ = R₅; y

R₅ = R₆ = CONHCOR₉;

O

(B)

R_a, R_b = H;

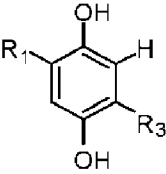
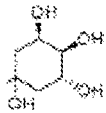
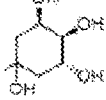
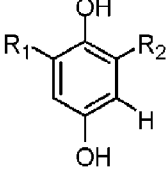
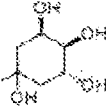
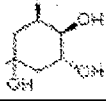
R₁ = COOR₄; (CH₂)_nCOOR₄; R₄ = H, alquilo C₁₋₄, arilaquilo C₁₋₄, morfolino-alquilo C₁₋₆, pirrolidino-alquilo C₁₋₆, N-metilpiperazino-alquilo C₁₋₆, aciloximetilo C₁₋₆, aciloxi C₁₋₆-1-etil, alcocixarboniloximetilo C₁₋₆, alcocixarboniloxi C₁₋₆-1-etil, o (oxodioxolil)metil; *o*-metoxifenilo (éster de guayacol);

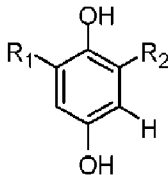
R₃ = H; R₂ = R₅; y

R₅ = R₆ = CONHCOR₉.

En una quinta realización, la presente invención incluye compuestos según la tabla 5:

Tabla 5

A.	 $R_3 = R_5 = R_6 = \text{CONHCOR}_9$		
Compuesto n.º	Nombres químicos de los compuestos	R1	R9
Ia-040a	N-(1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexilcarbonil)4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	
Ia-041a	N-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	2,5-dihidroxi-4-carboxifenil
Ia-042a	N-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	2,5-dihidroxi-3-carboxifenil
Ia-043a	N-(3,4-dihidroxibenzoil)4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	3,4-dihidroxifenil
Ia-044a	N-(3,5-dihidroxibenzoil)4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	3,5-dihidroxifenil
IIIa-040a	N-(1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexilcarbonil)3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	CH2COOH	
IIIa-041a	N-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	CH2COOH	2,5-dihidroxi-4-carboxifenil
IIIa-042a	N-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	CH2COOH	2,5-dihidroxi-3-carboxifenil
IIIa-043a	N-(3,4-dihidroxibenzoil)3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	CH2COOH	3,4-dihidroxifenil
IIIa-044a	N-(3,5-dihidroxibenzoil)3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida	CH2COOH	3,5-dihidroxifenil
B.	 $R_2 = R_5 = R_6 = \text{CONHCOR}_9$		
IIa-040a	N-(1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexilcarbonil)4-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	
IIa-041a	N-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)4-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	2,5-dihidroxi-4-carboxifenil
IIa-042a	N-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)4-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	2,5-dihidroxi-3-carboxifenil
IIa-043a	N-(3,4-dihidroxibenzoil)4-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	3,4-dihidroxifenil
IIa-044a	N-(3,5-dihidroxibenzoil)4-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	COOH	3,5-dihidroxifenil
IVa-040a	N-(1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexilcarbonil)3-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	CH2COOH	
IVa-041a	N-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)3-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	CH2COOH	2,5-dihidroxi-4-carboxifenil
IVa-042a	N-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)3-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	CH2COOH	2,5-dihidroxi-3-carboxifenil

B.	 R2 = R5 = R6 = CONHCOR9		
IVa-043a	N-(3,4-dihidroxibenzoil)3-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	CH2COOH	3,4-dihidroxifenil
IVa-044a	N-(3,5-dihidroxibenzoil)3-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida	CH2COOH	3,5-dihidroxifenil

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto derivado de hidroquinona de la fórmula (1), en donde

(A)

$R_a, R_b = H$;

$R_1 = \text{COOR}_4$; $(\text{CH}_2)_n\text{COOR}_4$; $R_4 = H$, alquilo C₁₋₄, arilaquilo C₁₋₄, morfolino-alquilo C_{1-C6}, pirrolidino-alquilo C_{1-C6}, N-metilpiperazino-alquilo C_{1-C6}, aciloximetilo C_{1-C6}, aciloxi C_{1-C6-1-etil}, alcóxicarboniloximetilo C_{1-C6}, alcóxicarboniloxi C_{1-C6-1-etil}, o (oxodioxolil)metil; *o*-metoxifenilo (éster de guayacol);

$R_2 = H$; $R_3 = R_5$; y

$R_5 = R_6 = \text{CONH}(\text{CH}_2)_n\text{-R}_9$;

O

(B)

$R_a, R_b = H$;

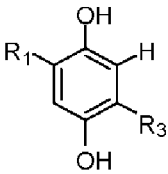
$R_1 = \text{COOR}_4$; $(\text{CH}_2)_n\text{COOR}_4$; $R_4 = H$, alquilo C₁₋₄, arilaquilo C₁₋₄, morfolino-alquilo C_{1-C6}, pirrolidino-alquilo C_{1-C6}, N-metilpiperazino-alquilo C_{1-C6}, aciloximetilo C_{1-C6}, aciloxi C_{1-C6-1-etil}, alcóxicarboniloximetilo C_{1-C6}, alcóxicarboniloxi C_{1-C6-1-etil}, o (oxodioxolil)metil; *o*-metoxifenilo (éster de guayacol);

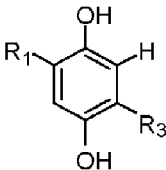
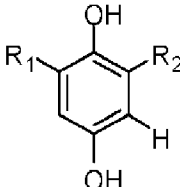
$R_3 = H$; $R_2 = R_5$; y

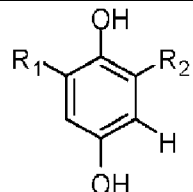
$R_5 = R_6 = \text{CONH}(\text{CH}_2)_n\text{-R}_9$.

En una sexta realización, la presente invención incluye compuestos según la tabla 6:

Tabla 6

A.	 R3 = R5 = R6 = CONH(CH2)_n-R₉			
Compuesto n.º	Nombres químicos de los compuestos	R1	n	R9
Ia-035a	ácido 4-(3,4-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;	COOH	1	3,4-dihidroxifenil
Ia-035a-2	ácido 4-(2-(3,4-dihidroxifenil)etilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;	COOH	2	3,4-dihidroxifenil
Ia-037a	ácido 4-(3,5-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;	COOH	1	3,5-dihidroxifenil
Ia-038a	ácido 4-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;	COOH	1	4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil

A.	 R3 = R5 = R6 = CONH(CH2)<i>n</i>-R9			
Compuesto n.º	Nombres químicos de los compuestos	R1	n	R9
Ia-039a	ácido 2,5-dihidroxi-4-((3,4,5-trihidroxíciclohexil)metilaminocarbonil)benzoico	COOH	1	3,4,5-trihidroxíciclohexil)
Ia-053a	ácido 4-(2-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	1	2-carboxifenil
Ia-054a	ácido 4-(3-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	1	3-carboxifenil
Ia-055a	ácido 4-(4-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	1	4-carboxifenil
IIIa-035a	ácido 3-(3,4-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	CH2COOH	1	3,4-dihidroxifenil
IIIa-037a	ácido 3-(2-(3,4-dihidroxifenil)etilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	CH2COOH	1	3,5-dihidroxifenil
IIIa-038a	ácido 3-(3,5-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	CH2COOH	1	4-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)
IIIa-039a	ácido 3-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	CH2COOH	1	3,4,5-trihidroxíciclohexil)
IIIa-053a	ácido 2,5-dihidroxi-3-((3,4,5-trihidroxíciclohexil)metilaminocarbonil)benzoico	CH2COOH	1	2-carboxifenil
IIIa-054a	ácido 3-(2-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	CH2COOH	1	3-carboxifenil
IIIa-055a	ácido 3-(3-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	CH2COOH	1	4-carboxifenil
B.	 R2 = R5 = R6 = CONH(CH2)<i>m</i>-R9			
IIa-035a	ácido 3-(4-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	1	3,4-dihidroxifenil
IIa-035a-2	ácido (4-(3,4-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	COOH	2	3,4-dihidroxifenil
IIa-037a	ácido (4-(3,5-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	COOH	1	3,5-dihidroxifenil
IIa-038a	ácido (4-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	COOH	1	4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)
IIa-039a	Compuesto 191: ácido (2,5-dihidroxi-4-((3,4,5-trihidroxíciclohexil)metilaminocarbonil)fenil)acético	COOH	1	3,4,5-trihidroxíciclohexil
IIa-053a	ácido (4-(2-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	COOH	1	2-carboxifenil
IIa-054a	ácido (4-(3-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	COOH	1	3-carboxifenil
IIa-055a	ácido (4-(4-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	COOH	1	4-carboxifenil

B.	 R2 = R5 = R6 = CONH(CH2)n-R9			
IVa-035a	ácido (3-(3,4-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	CH2COOH	1	3,4-dihidroxifenil
IVa-037a	ácido (3-(3,5-dihidroxifenilinetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	CH2COOH	1	3,5-dihidroxifenil
IVa-038a	ácido (3-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	CH2COOH	1	4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)
IVa-039a	ácido (2,5-dihidroxi-3-((3,4,5-trihidroxiciclohexil)metilcarbonilamino)fenil)acético	CH2COOH	1	3,4,5-trihidroxiciclohexil
IVa-053a	ácido (3-(2-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	CH2COOH	1	2-carboxifenil
IVa-054a	ácido (3-(3-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	CH2COOH	1	3-carboxifenil
IVa-055a	ácido (3-(4-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	CH2COOH	1	4-carboxifenil

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto derivado de hidroquinona de la fórmula (1), en donde:

$R_a, R_b = H$;

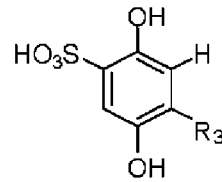
$R_1 = \text{SO}_3\text{H}$;

$R_2 = H$; $R_3 = R_6$; y

$R_5 = R_6 = \text{CONH}(\text{CH}_2)_n\text{-R}_9$.

Según una séptima realización, la presente invención incluye compuestos según la tabla 7 siguiente:

Tabla 7

 $R_3 = R_5 = \text{CONH}(\text{CH}_2)_n\text{-R}_9$			
Compuesto n.º	Nombres químicos de los compuestos	n	R ₉
la-053b	ácido 2-((2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)metil)benzoico	1	2-carboxifenil
la-054b	ácido 3-((2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)metil)benzoico	1	3-carboxifenil
la-055b	ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)metil)benzoico	1	4-carboxifenil

Preferiblemente, la presente invención se refiere a un compuesto derivado de hidroquinona de la fórmula (1) en donde:

(A)

$R_a, R_b = H$;

$R_1 = \text{COOR}_4$; $(\text{CH}_2)_n\text{COOR}_4$; $R_4 = H$, alquilo C₁₋₄, arilaquilo C₁₋₄, morfolino-alquilo C_{1-C6}, pirrolidino-alquilo C_{1-C6}, N-metilpiperazino-alquilo C_{1-C6}, aciloximetilo C_{1-C6}, aciloxi C_{1-C6}-1-etil, alcoxicarboniloximetilo C_{1-C6}, alcoxicarbonilo C_{1-C6}-1-etil, o (oxodioxolil)metil; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

$R_2 = H$; $R_3 = R_5$; y

$R_5 = R_6 = \text{CONHCH}(\text{COOR}_4)(\text{CH}_2)_k\text{R}_9$;

O

(B)

$R_a, R_b = H$;

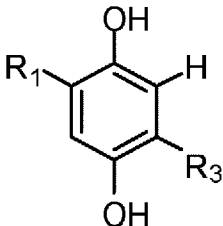
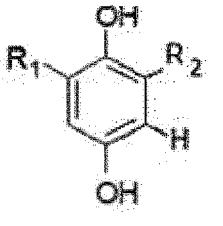
$R_1 = \text{COOR}_4$; $(\text{CH}_2)_n\text{COOR}_4$; $R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_{1-6} , pirrolidino-alquilo C_{1-6} , N-metilpiperazino-alquilo C_{1-6} , aciloximetilo C_{1-6} , aciloxi C_{1-6} -1-etil, alcóxicarboniloximetilo C_{1-6} , alcóxicarboniloxi C_{1-6} -1-etil, o (oxodioxolil)metil; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

$R_3 = H$; $R_2 = R_5$; y

$R_5 = R_6 = \text{CONHCH}(\text{COOR}_4)(\text{CH}_2)_k\text{R}_9$

Según una octava realización, la presente invención incluye compuestos según la tabla 8 siguiente:

Tabla 8

A.	 $R_3 = R_5 = R_6 = \text{CONHCH}(\text{COOR}_4)(\text{CH}_2)_k\text{R}_9$				
Compuesto n.º	Nombres químicos de los compuestos	R1	R4	k	R9
Ia-035a-3	ácido 4-(1-carboxi-2-(3,4-dihidroxifenil)etilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	1	3,4-dihidroxifenil
Ia-036a	ácido 4-(carboxi(3,4-dihidroxifenil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	0	3,4-dihidroxifenil
IIa-036a	ácido 3-(1-carboxi-2-(3,4-dihidroxifenil)etilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	CH ₂ COOH	H	0	3,4-dihidroxifenil
B.	 $R_2 = R_5 = R_6 = \text{CONHCH}(\text{COOR}_4)(\text{CH}_2)_k\text{R}_9$				
IIa-035a-3	ácido 3-(carboxi(3,4-dihidroxifenil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	1	3,4-dihidroxifenil
IIa-036a	ácido (4-(carboxi(3,4-dihidroxifenil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	COOH	H	0	3,4-dihidroxifenil
IVa-036a	ácido (3-(carboxi(3,4-dihidroxifenil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético	CH ₂ COOH	H	0	3,4-dihidroxifenil

En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto derivado de hidroquinona de la fórmula (1), en donde

(A)

$R_a, R_b = H$;

$R_1 = COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; SO_3H , $(CH_2)_nSO_3H$, o $CONH-R_{10}$;

$R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_1-C_6 , pirrolidino-alquilo C_1-C_6 , N-metilpiperazino-alquilo C_1-C_6 , aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6-1 -etil, alcoxicarboniloximetilo C_1-C_6 , alcoxicarboniloxi C_1-C_6-1 -etil, o (oxodioxolil)metil; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

$R_2 = H$; $R_3 = R_5$; y

$R_5 = R_6 = \text{heteroaril-}R_9$,

O

(B)

$R_a, R_b = H$;

$R_1 = COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; SO_3H , $(CH_2)_nSO_3H$, o $CONH-R_{10}$;

$R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_1-C_6 , pirrolidino-alquilo C_1-C_6 , N-metilpiperazino-alquilo C_1-C_6 , aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6-1 -etil, alcoxicarboniloximetilo C_1-C_6 , alcoxicarboniloxi C_1-C_6-1 -etil, o (oxodioxolil)metil; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

$R_3 = H$; $R_2 = R_5$; y

$R_5 = R_6 = \text{heteroaril-}R_9$

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto derivado de hidroquinona de la fórmula (1), en donde:

(A)

$R_a, R_b = H$;

$R_1 = COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; SO_3H , $(CH_2)_nSO_3H$, $CONH-R_{10}$;

$R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_1-C_6 , pirrolidino-alquilo C_1-C_6 , N-metilpiperazino-alquilo C_1-C_6 , aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6-1 -etil, alcoxicarboniloximetilo C_1-C_6 , alcoxicarboniloxi C_1-C_6-1 -etil, o (oxodioxolil)metil; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

$R_2 = H$; $R_3 = R_5$; y

$R_5 = R_7 = \text{benzoheteroarilo sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de: } COOR_4, (CH_2)_nCOOR_4, SO_3H, (CH_2)_nSO_3H, OR_4, \text{ azoles [heterociclos que contienen N de 5 miembros], o flúor;}$

O

(B)

$R_a, R_b = H$;

$R_1 = COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; SO_3H , $(CH_2)_nSO_3H$, o $CONH-R_{10}$;

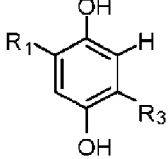
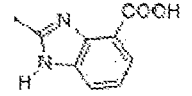
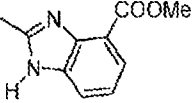
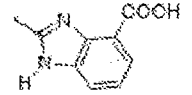
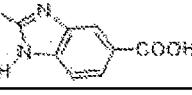
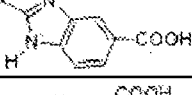
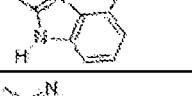
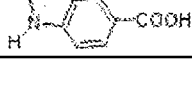
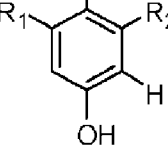
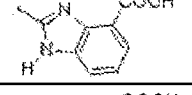
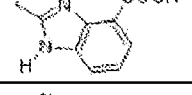
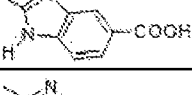
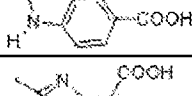
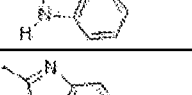
$R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_1-C_6 , pirrolidino-alquilo C_1-C_6 , N-metilpiperazino-alquilo C_1-C_6 , aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6-1 -etil, alcoxicarboniloximetilo C_1-C_6 , alcoxicarboniloxi C_1-C_6-1 -etil, o (oxodioxolil)metil; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

$R_3 = H$; $R_2 = R_5$; y

$R_5 = R_7 = \text{benzoheteroarilo sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de: } COOR_4, (CH_2)_nCOOR_4, SO_3H, (CH_2)_nSO_3H, OR_4, \text{ azoles [heterociclos que contienen N de 5 miembros], o flúor.}$

Según una novena realización, la presente invención incluye compuestos según la tabla 9 siguiente:

Tabla 9:

A.	 $R_3 = R_5 = R_7$
Compuesto n.º	Nombres químicos de los compuestos R1 R3
Id-030a	ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico COOH 
Id-030a-E2	2-(4-etoxicarbonil-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxilato de metilo COOEt 
Id-030b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico SO₃H 
Id-031a	ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico COOH 
Id-031b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico SO₃H 
IIId-030a	ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico CH₂COOH 
IIId-031a	ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico CH₂COOH 
B.	 $R_2 = R_5 = R_7$
IIId-030a	ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico COOH 
IIId-030b	ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico SO₃H 
IIId-031a	ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico COOH 
IIId-030a	ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico SO₃H 
IVd-030a	ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico CH₂COOH 
IVd-031a	ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico CH₂COOH 

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto derivado de hidroquinona de la fórmula (I), en donde:

(A)

$R_a, R_b = H$, acilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , arilo $C_6-C_{10}CO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, alquilo C_1-C_7NHCO , fosfona, fosfonooximetil, aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6-1 -etil, alcoxicarboniloximetilo C_1-C_6 , o alcoxicarboniloxi C_1-C_6-1 -etil;

$R_1 = COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; SO_3H , $(CH_2)_nSO_3H$, o $CONH-R_{10}$;

$R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_1-C_6 , pirrolidino-alquilo C_1-C_6 , N-metilpiperazino-alquilo C_1-C_6 , aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6-1 -etil, alcoxicarboniloximetilo C_1-C_6 , alcoxicarboniloxi C_1-C_6-1 -etil, o (oxodioxolil)metil; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

$R_2 = H$; $R_3 = R_5$; y

$R_5 = R_8 = (CH_2)_mX(CH_2)_pR_9$;

en donde $X = O, S, SO_2, NH, NAc$, o $N(CH_2)_qR_9$;

O

(B)

$R_a, R_b = H$, acilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , arilo $C_6-C_{10}CO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, alquilo C_1-C_7NHCO , fosfona, fosfonooximetil, aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6-1 -etil, alcoxicarboniloximetilo C_1-C_6 , o alcoxicarboniloxi C_1-C_6-1 -etil;

$R_1 = COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; SO_3H , $(CH_2)_nSO_3H$, o $CONH-R_{10}$;

$R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilaquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_1-C_6 , pirrolidino-alquilo C_1-C_6 , N-metilpiperazino-alquilo C_1-C_6 , aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6-1 -etil, alcoxicarboniloximetilo C_1-C_6 , alcoxicarboniloxi C_1-C_6-1 -etil, o (oxodioxolil)metil; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

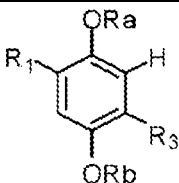
$R_3 = H$; $R_2 = R_5$; y

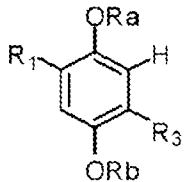
$R_5 = R_8 = (CH_2)_mX(CH_2)_pR_9$;

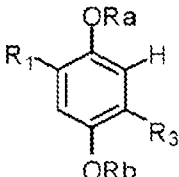
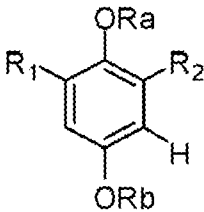
en donde $X = O, S, SO_2, NH, NAc$, o $N(CH_2)_qR_9$.

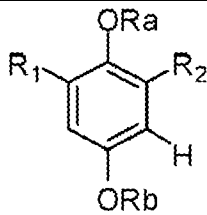
Según una décima realización, la presente invención incluye compuestos según la tabla 10 siguiente:

Tabla 10:

A.	 $R_3 = (CH_2)_mX(CH_2)_pR_9$							
n. °	Nombres químicos de los compuestos	R1	Ra	Rb	m	X	p	R9
IIIc-056a	Bis(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina	COOH	H	H	1	NH	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IIIc-056b	ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetilamino)metil)-2,5-dihidroxibenzoico	SO3H	H	H	1	NH	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IIIc-056c	Compuesto 267: ácido 4-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetilamino)metil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	NH	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofeni

A.	 $R_3 = (CH_2)_mX(CH_2)_pR_9$							
n. °	Nombres químicos de los compuestos	R1	Ra	Rb	m	X	p	R9
IIIc-056d	Bis(2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetil)amina	SO3H	H	H	1	NH	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenil
IIIc-057a	N,N-bis(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida	COOH	H	H	1	NH(COCH3)	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IIIc-057b	N-(2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetil) N-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida	SO3H	H	H	1	NH(COCH3)	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IIIc-057c	N-(2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetil) N-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida	COOH	H	H	1	NH(COCH3)	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenil
IIIc-057d	N,N-bis(2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetil)acetamida	SO3H	H	H	1	NH(COCH3)	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenil
IIIc-058a	ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-carboxifenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	S	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IIIc-058b	ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico	SO3H	H	H	1	S	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IIIc-058c	ácido 4-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	S	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenil
IIIc-058d	ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibencenosulfónico;	SO3H	H	H	1	S	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenil
IIIc-059a	ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-carboxifenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico;	COOH	H	H	1	SO2	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IIIc-059b	ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico;	SO3H	H	H	1	SO2	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IIIc-059c	ácido 4-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	SO2	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenil
IIIc-059d	ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibencenosulfónico	SO3H	H	H	1	SO2	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenil
IIIc-060a	ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-carboxifenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	O	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IIIc-060b	ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico;	SO3H	H	H	1	O	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IIIc-060c	ácido 4-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	O	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenil
IIIc-060d	ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibencenosulfónico	SO3H	H	H	1	O	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenil

A.	 $R3 = (CH_2)_mX(CH_2)_pR_9$							
n. °	Nombres químicos de los compuestos	R1	Ra	Rb	m	X	p	R9
IIIc-061a	Tris (4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina	COOH	H	H	1	$N(CH_2)_qR_9$ q = 1: R9 = 4-carboxi-2,5-dihidroxifenil	1	4-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IIIc-061a-E3	Tris (4-etoxicarbonil-2,5-dihidroxifenilmetil)amina	COOEt	H	H		$(CH_2)_qR_9$ q = 1: R9 = 4-etoxicarboxi-2,5-dihidroxifenil	1	4-etoxicarbonil-2,5-dihidroxifenil
B.	 $R2 = (CH_2)_qX(CH_2)_pR_9$							
IVc-056a	Bis(3-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina	COOH	H	H	1	NH	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IVc-056b	ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetilamino)metil)-2,5-dihidroxibenzoico	SO3H	H	H	1	NH	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IVc-056c	ácido 3-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetilamino)metil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	NH	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenil
IVc-056d	Bis(2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetil)amina	SO3H	H	H	1	NH	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenil
IVc-057a	N,N-bis(3-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida	COOH	H	H	1	NH(COCH3)	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IVc-057b	N-(2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetil) N-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida	SO3H	H	H	1	NH(COCH3)	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IVc-057c	N-(2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetil) N-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida	COOH	H	H	1	NH(COCH3)	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenil
IVc-057d	N,N-bis(2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetil)acetamida	SO3H	H	H	1	NH(COCH3)	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenil
IVc-058a	ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-carboxifenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	S	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IVc-058b	ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico	SO3H	H	H	1	S	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IVc-058c	ácido 3-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	S	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenil

B.	 $R_2 = (CH_2)_mX(CH_2)_nR_9$							
IVc-058d	ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibencenosulfónico	SO3H	H	H	1	S	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenil
IVc-059a	ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-carboxifenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	SO2	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IVc-059b	ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico	SO3H	H	H	1	SO2	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IVc-059c	ácido 3-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	SO2	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenil
IVc-059d	ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibencenosulfónico	SO3H	H	H	1	SO2	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenil
IVc-060a	ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-carboxifenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	O	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IVc-060b	ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico	SO3H	H	H	1	O	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IVc-060c	ácido 3-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico	COOH	H	H	1	O	1	2,5-dihidroxi-3-sulfofenil
IVc-060d	ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibencenosulfónico	SO3H	H	H	1	O	1	2,5-dihidroxi-4-sulfofenil
IVc-061a	Tris (3-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina	COOH	H	H	1	$N(CH_2)_qR_9$ q = 1: R9 = 3-carboxi-2,5-dihidroxifenil	1	3-carboxi-2,5-dihidroxifenil
IVc-059a-E2-A4	3-((2,5-diacetoxi-3-metoxicarbonilfenil)metilsulfonilmetil)-2,5-diacetoxibenzoato de metilo	COOMe	Ac	Ac	1	SO2	1	2,5-diacetoxi-3-(metoxicarbonil)fenil
IVc-059a-E2	3-((2,5-dihidroxi-3-metoxicarbonilfenil)metilsulfonilmetil)-2,5-hidroxibenzoato de metilo	COOMe	H	H	1	SO2	1	2,5-dihidroxi-3-(metoxicarbonil)fenil
IVc-059a-mpe2	3-((2,5-dihidroxi-3-(2-morfolinoetoxicarbonil)fenil)metilsulfonilmetil)-2,5-hidroxibenzoato de 2-morfolinoetilo	COOR R=2-morfolinoetil	H	H	1	SO2	1	2,5-dihidroxi-3-(2-morfolinoetoxicarbonil)fenil
IVc-061a-E3	Tris (3-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina	COOEt	H	H	1	$N(CH_2)_qR_9$ q = 1: R9 = 3-etoxicarbonil-2,5-dihidroxifenil	1	3-etoxicarbonil-2,5-dihidroxifenil

La presente invención también se refiere a un proceso para la preparación del compuesto derivado de hidroquinona de la fórmula (I), que comprende:

Paso (a): Acoplamiento del ácido carboxílico derivado de la hidroquinona, protegido en las funciones fenólicas, con una anilina que porta diversos grupos funcionales, mediante el correspondiente cloruro de acilo o utilizando un agente de acoplamiento de amida tal como el TCFH en presencia de NMI;

Paso (b): La desprotección de las funciones del éster típicamente mediante una reacción de saponificación; y

Paso (c): Desprotección de las funciones fenólicas típicamente mediante hidrogenación catalítica.

O, alternativamente,

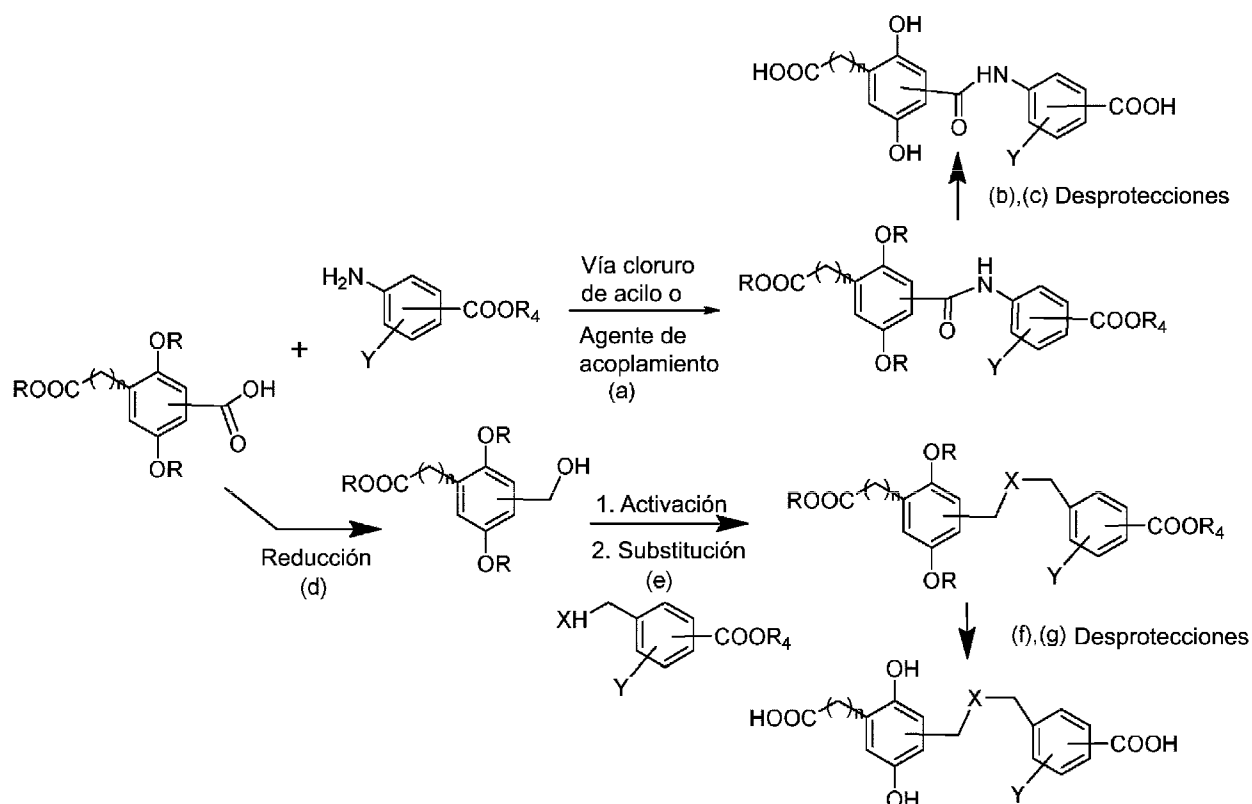
Paso (d): Reducción del ácido carboxílico derivado de la hidroquinona, protegido en las funciones fenólicas, para producir un alcohol bencílico

(e) Activación de la función del alcohol bencílico y sustitución por un nucleófilo bencílico (alcohol, tiol, amina primaria o secundaria) portando diversos grupos funcionales;

(f) La desprotección de las funciones del éster típicamente mediante una reacción de saponificación; y

(g) Desprotección de las funciones fenólicas típicamente mediante hidrogenación catalítica.

El proceso se representa esquemáticamente a continuación:



Los compuestos derivados de hidroquinona de la presente invención pueden estar presentes como formas ópticamente activas (estereoisómeros), isómeros E/Z, enantiómeros, racematos, diastereoisómeros de los mismos, e hidratos y solvatos de los mismos. Los solvatos de los compuestos se deben a la atracción mutua entre las moléculas del compuesto y el solvente inerte utilizado. Solvatos, p. ej., monohidrato, dihidratos o alcoholatos.

Los derivados de hidroquinona de la presente invención también pueden estar presentes como sales farmacéuticamente aceptables, en donde los derivados de hidroquinona originales se modifican mediante la preparación de sales ácidas o básicas de los mismos.

Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otras, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos, tales como aminas; y sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos, tales como ácidos carboxílicos y

similares. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden incluir sales no tóxicas convencionales o sales de amonio cuaternario que son adecuadas para todas las vías de administración de los compuestos, por ejemplo, a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, dichas sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos, tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pámico, maleico, hidroxileico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanilo, 2-acetoxi-benzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetionico, trifluoroacético y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables se describen para cationes y aniones "Pharmaceutical salts: A summary on doses of salt formers from the Orange Book. Saal C, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013, 49, 614-623. A modo de ejemplos de cationes, podemos citar aluminio, arginina, benzatina, calcio, cloroprocaína, colina, dietanolamina, dietilamina, etanolamina, etilendiamina, lisina, magnesio, histidina, litio, meglumina, potasio, procaína, sodio, trietilamina, zinc. a modo de ejemplos de aniones, se pueden citar acetato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, besilato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, decanoato, edetato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolato, hexanoato, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, octanoato, oleato, pamoato, pantotenato, fosfato, poligalacturonato, propionato, salicilato, estearato, acetato, succinato, sulfato, tartrato, teocato, tosilato. Alternativamente, los iones zwitteriones se pueden utilizar como sales tales como los aminoácidos libres arginina o lisina como contraiones catiónicos y glutamato o aspartato como contraiones aniónicos. Péptidos cortos (2 a 20 aminoácidos) como unidades repetidas de arginina o lisina y sus combinaciones con otros aminoácidos neutros. Estos péptidos catiónicos que penetran en células (CPP, en inglés) pueden utilizarse como potenciadores de la penetración del fármaco en las células.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos útiles en la presente invención pueden sintetizarse, por ejemplo, a partir del compuesto original que contiene un resto básico o ácido mediante procedimientos químicos convencionales. En general, dichas sales se pueden preparar haciendo reaccionar el ácido libre o las formas básicas de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos; En general, se prefieren los medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo. En Remington's Pharmaceutical Sciences, 17.^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, pág. 1418, se presentan listas de sales adecuadas.

Las dosificaciones según la invención y tal como se describe en la presente memoria en las diversas realizaciones pueden variar dependiendo del estado, la edad y la especie del sujeto, y los expertos en la técnica pueden determinarlas fácilmente. Las dosificaciones diarias totales empleadas tanto en medicina veterinaria como humana estarán adecuadamente en el rango 0,01-2000 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 0,1-1000 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 1-100 mg/kg de peso corporal, y estas pueden administrarse como dosis únicas o divididas, y además, el límite superior también puede superarse cuando se considere que está indicado. Tal dosificación puede ajustarse a los requisitos individuales en cada caso, incluidos los compuestos específicos que se administran, la vía de administración, la afección que se trata y el paciente que se trata. Sin embargo, los compuestos también se pueden administrar como preparaciones de depósito (implantes, formulaciones de liberación lenta, etc.) semanalmente, mensualmente o incluso en intervalos más largos. En tales casos, la dosificación puede ser mucho mayor que la diaria y puede adaptarse a la forma de administración, al peso corporal, y a la indicación concreta. La dosificación apropiada se puede determinar realizando pruebas con modelos convencionales, preferiblemente en modelos animales. En general, en el caso de la administración oral o parenteral a seres humanos adultos que pesen aproximadamente 70 kg, debería ser apropiada una dosificación diaria de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 10,000 mg, preferiblemente de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1000 mg, aunque el límite superior puede superarse cuando esté indicado. Debe entenderse que las dosificaciones terapéuticamente efectivas anteriores no necesitan ser el resultado de una única administración y usualmente son el resultado de la administración de una pluralidad de dosis unitarias. Esas dosis unitarias pueden, a su vez, comprender porciones de una dosis diaria o semanal y, por lo tanto, la dosis terapéuticamente efectiva se determina durante el período de tratamiento (contacto). Por ejemplo, para la administración oral, la dosis diaria puede ser aproximadamente 0,04 a aproximadamente 1,0 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,20 mg/kg/día, más preferiblemente aún aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,15 mg/kg/día, y con la máxima preferencia aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal. En general, la cantidad de sustancia activa administrada puede variar en un rango relativamente amplio para lograr, y preferiblemente mantener, la concentración plasmática deseada. Las formas de dosificación unitaria del ingrediente activo pueden contener de aproximadamente 0,1 miligramos a aproximadamente 15 miligramos del mismo. Una forma de dosificación unitaria preferida contiene aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 miligramo de agente y se puede administrar de 2 a 5 veces al día. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que también se contemplan otras vías alternativas, como la infusión continua a una velocidad diseñada para mantener la concentración plasmática descrita anteriormente. La duración de un tratamiento particular también puede variar, dependiendo de la gravedad de la enfermedad, de si el tratamiento está destinado a una manifestación aguda o con fines profilácticos, y consideraciones similares. La administración típica dura un período de tiempo de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 días, siendo habitual un ciclo de 7 días.

Los cursos (ciclos) de administración también se pueden repetir en intervalos mensuales, o se pueden administrar dosis unitarias parenterales en intervalos semanales. Las dosis unitarias orales se pueden administrar en intervalos de uno a varios días para proporcionar la dosis terapéuticamente efectiva determinada. La dosificación apropiada

de los compuestos de la invención dependerá del tipo de enfermedad que se tratará, de la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el agente se administra con fines preventivos o terapéuticos, del historial médico del paciente y de la respuesta a los compuestos, y de los criterios del médico responsable. La determinación de la dosis o vía de administración apropiada está claramente dentro de las capacidades de un médico actual. Los experimentos con animales proporcionan una guía fiable para la determinación de las dosis efectivas para la terapia humana. El escalado entre especies de las dosis efectivas se puede llevar a cabo siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics", en *Toxicokinetics and New Drug Development*, editores Yacobi y col., Pergamon Press, Nueva York, 1989, págs. 42-96.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende (i) una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto derivado de hidroquinona de la fórmula (1) o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, y (ii) un excipiente o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes farmacéuticos según la presente invención pueden seleccionarse del grupo que consiste en excipientes convencionales, tales como, pero sin limitarse a, solubilizantes, aglutinantes, rellenos, desintegrantes, lubricantes, modificadores del pH, potenciadores de la permeación, modificadores de la liberación, conservantes, agentes de recubrimiento, portadores, agentes enmascaradores del sabor y combinaciones de los mismos.

La composición farmacéutica de los compuestos de la presente invención con uno o más componentes farmacéuticos puede formularse con dichos excipientes como medicamentos líquidos, medicamentos sólidos o semisólidos, y/o medicamentos gaseosos.

Cuando están presentes en formulaciones sólidas, estas pueden incluir, sin ninguna limitación, gránulos, pélets, comprimidos, cápsulas, polvos, películas, pastillas para chupar, comprimidos triturables, comprimidos solubles, comprimidos disgregables, comprimidos dispersables, comprimidos recubiertos con película, y formatos de liberación controlada, sostenida, extendida o modificada de cualquiera de los formatos sólidos mencionados anteriormente. Tales formulaciones también pueden estar en las formas de liberación inmediata, liberación retardada, o liberación modificada. Además, las composiciones de liberación inmediata pueden ser preparaciones convencionales, dispersables, masticables, que se disuelven en la boca, o de fusión instantánea, y composiciones de liberación modificada que pueden comprender sustancias hidrófilas o hidrófobas, o combinaciones de sustancias controladoras de la velocidad de liberación hidrófilas e hidrófobas para formar una matriz o un depósito o una combinación de sistemas de matriz y depósito.

Las composiciones se pueden preparar utilizando una o más técnicas tales como mezcla directa, granulación en seco, granulación en húmedo, homogeneización, molienda, micronización, extrusión y esferonización. Las composiciones pueden presentarse sin recubrimiento, recubiertas con película, recubiertas con azúcar, con recubrimiento en polvo, con recubrimiento entérico, y con recubrimiento de liberación modificada. Cuando están presentes en formulaciones líquidas, estas pueden incluir, sin ninguna limitación, cualquier forma líquida tal como soluciones, suspensiones, nanosuspensiones, dispersiones, coloides, emulsiones, lociones, cremas, pomadas, tinturas, y composiciones liofilizadas. Cuando están presentes en formulaciones gaseosas, estas pueden incluir, sin ninguna limitación, polvo molido o mezcla, polvo o mezcla micronizados, nanosuspensiones, aerosoles, rociadores, gotas, nieblas, soluciones, o suspensiones nebulizadas, y/o vapores atomizados.

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden comprender además cualquier aditivo tal como vehículos, agentes aglutinantes, perfumes, agentes aromatizantes, edulcorantes, colorantes, antisépticos, antioxidantes, agentes estabilizantes y surfactantes, si se desea.

Las composiciones y compuestos farmacéuticos según la presente invención pueden formularse para su administración por vías enterales, tales como las vías orales; vías parenterales mediante inyecciones tales como inyecciones intravenosas, subcutáneas, intraoculares, intramusculares, o intraperitoneales; vías tópicas, tales como las vías oculares, las vías mucosas y transmucosas, incluidas las vías sublingual/bucal; así como las vías pulmonar, nasal, intranasal, intrabronquial, intrapulmonar. Las vías de administración ocular incluyen la administración ocular tópica, la administración intraocular, intravítrea, o retrobulbar.

Las formulaciones preferidas de los compuestos según la presente invención comprenden formulaciones orales líquidas, formulaciones oculares y formulaciones intravenosas e intraperitoneales.

Las formulaciones orales líquidas son soluciones y los formatos de suspensión para la administración oral de fármacos son comunes, convenientes y se consideran seguros. Se pueden utilizar para suministrar cantidades relativamente grandes de fármacos y se utilizan con frecuencia en la población pediátrica y en las personas que tienen dificultades para tragar comprimidos o cápsulas. La introducción a través del tracto gastrointestinal proporciona una rápida disolución y absorción del fármaco; sin embargo, se debe considerar la tolerabilidad y la interacción con otros materiales del tracto. Las propiedades del ingrediente farmacéutico activo (API, en inglés) pueden prestarse para formularse en soluciones orales simples de base acuosa; sin embargo, cuando los API son poco solubles, las formulaciones deben diseñarse alrededor de la molécula para mejorar la solubilidad y la biodisponibilidad. La introducción de surfactantes, solventes, reguladores, y aceites aumenta la solubilidad y reduce la precipitación y/o la degradación en la interacción con los fluidos gástricos. Cuando se requieren suspensiones, el tamaño de las partículas frecuentemente se reduce y se controla para mejorar la solubilidad del fármaco, la

permeación y, en última instancia, la absorción del fármaco. A medida que avanza el desarrollo de la formulación, se introducen conservantes y sabores para permitir la conformidad del paciente y la adecuación a la vida útil.

Las formulaciones oculares son formulaciones oftálmicas que se suministran directamente al ojo y con frecuencia son líquidas en formatos de solución o suspensión. La administración ocular evita el metabolismo en el tracto gastrointestinal y puede utilizarse para fármacos que se absorben mal cuando se administran por vía oral. Los colirios son estériles e isotónicos con un pH nominal de 4-8 para evitar la irritación ocular. Los excipientes, incluidos los agentes solubilizantes, los agentes quelantes, los polímeros, los surfactantes, los potenciadores de la permeación y las ciclodextrinas se añaden a la formulación para mejorar la estabilidad, modificar la viscosidad, o aumentar la solubilidad, la permeabilidad, y la biodisponibilidad de los fármacos poco solubles.

Las formulaciones intravenosas permiten una rápida absorción después del suministro parenteral del fármaco de la dosis completa que llega al sistema del paciente para una respuesta inmediata. Este modo de introducción evita el metabolismo en el tracto gastrointestinal y puede utilizarse para fármacos que se absorben mal cuando se administran por vía oral. Típicamente, las inyecciones son soluciones estériles e isotónicas a base de agua y están diseñadas para no inducir dolor durante la administración. Para los fármacos poco solubles, las formulaciones se modifican con cosolventes orgánicos, surfactantes, y reguladores para aumentar la solubilidad, siendo también aceptables las formulaciones en nanosuspensión. Para aquellas moléculas que son inestables en solución, las formulaciones se pueden liofilizar para su dilución en el punto de uso.

La presente invención también proporciona kits que comprenden una composición que comprende una dosis terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de la presente invención o las formulaciones de los mismo, así como un dispositivo de suministro para la administración de dicha composición o formulación y que comprende además un prospecto que incorpora instrucciones manuales de uso.

Para preparar las presentes composiciones farmacéuticas, el ingrediente activo según la invención se puede mezclar con un portador, adyuvante y/o excipiente farmacéuticamente aceptable según las técnicas de composición farmacéutica convencionales. Los portadores farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en las presentes composiciones abarcan cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar, tales como una solución salina regulada con fosfato, agua, y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y varios tipos de agentes humectantes. Las composiciones pueden contener adicionalmente excipientes farmacéuticos sólidos tales como almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo y similares. Los excipientes líquidos y semisólidos pueden seleccionarse entre glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, agua, etanol, y diversos aceites, que incluye los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, p. ej., aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, etc. Los portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables, incluyen agua, solución salina, dextrosa acuosa y glicoles. Para ejemplos de portadores, estabilizadores y adyuvantes, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, editado por E. W. Martin (Mack Publishing Company, 18.^a ed., 1990).

Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservantes. Los ejemplos de solventes farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse en la presente composición se pueden encontrar en libros de referencia tales como Handbook of Pharmaceutical Excipients (novena edición, Pharmaceutical Press, Londres y American Pharmacists Association, Washington, 2020), Aulton's Pharmaceutics, The Design and Manufacture of Medicines. (Quinta edición, editores: Kevin Taylor and Michael Aulton, Elsevier, 2017), "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6.^a ed." (varios editores, 1989-1998, Marcel Dekker) y en "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems" (ANSEL y col., 1994 et 2011, WILLIAMS & WILKINS). Los ejemplos no limitativos de solventes farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse en la presente composición incluyen, pero no se limitan a, propilenglicol (también conocido como 1,2-dihidroxiopropano, 2-hidroxiopropanol, metilenglicol, metilglicol o propano 1, 2-diol), etanol, metanol, propanol, isopropanol, butanol, glicerol, polietilenglicol (PEG), glicol, Cremophor EL o cualquier forma de aceite de ricino polietoxilado, dipropilenglicol, dimetilisosorbida, carbonato de propileno, N-metilpirrolidona, glicofurol, tetraetilenglicol, ésteres de ácidos grasos de propilenglicol, y mezclas de los mismos.

Los compuestos según la invención han demostrado efectos antifibróticos, antiinflamatorios, y antiangiogénicos. Varias enfermedades se enumeran en la presente memoria a continuación que involucran no solo a uno sino a dos o incluso a los tres objetivos. Categorías de enfermedades que muestran una patobiología angiogénica (vascular), inflamatoria y/o fibrótica predominante.

Por lo tanto, la presente invención proporciona el uso de estos compuestos en métodos para tratar y/o prevenir una enfermedad o trastorno autoinmune, inmunológico, reumatológico, trastornos vasculares, trastornos oftalmológicos, trastornos fibróticos, trastornos metabólicos y gastrointestinales, enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas, neoplasias y trastornos asociados al cáncer, hormonas enfermedades relacionadas y trastornos inmunológicos que resultan de enfermedades infecciosas virales y bacterianas y complicaciones de las mismas, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una dosis terapéuticamente efectiva de los compuestos y/o composiciones farmacéuticas de la presente invención como se ha descrito anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención son particularmente adecuadas para un sujeto que es un sujeto animal humano o no humano.

Los compuestos según la invención pueden atacar enfermedades basados en sus perfiles de citocinas individuales, tal como se describe en BIODATA proporcionado para varios compuestos (véanse las figuras 3A-D). El siguiente sitio web Open Targets Platform (URL: <https://www.targetvalidation.org/>, Denise Carvalho y col., Nucleic Acids Research, volumen 47, número D1, 8 de enero de 2019, D1056-D1065, <https://doi.org/10.1093/nar/gky1133>) ofrece una imagen completa basada en la información bibliográfica actual y se puede buscar por enfermedad o citocina.

Dos ejemplos típicos: (a) búsqueda de retinopatía diabética por enfermedad específica conduce a las siguientes citocinas descritas con una alta correlación con la enfermedad (figura 3C). Las tres citoquinas principales son, como ejemplo, para la búsqueda de retinopatía diabética, indicar puntuación de VEGFA = 1 (factor de crecimiento endotelial vascular A), puntuación de HFE = 1 (regulador homeostático del hierro) y puntuación de TNF = 0,86 (factor de necrosis tumoral) y (b) buscar VEGFA: provoca enfermedades del sistema nervioso, enfermedades vasculares, enfermedades oculares, retinopatía y varias otras enfermedades que se muestran en la figura 3D.

Para ilustrar la potencia de los compuestos sobre un pequeño grupo de citocinas inflamatorias, se evaluaron los efectos de los compuestos en la sangre entera humana (ejemplo 3.6) y sus valores de IC₅₀ sobre la inhibición de la inflamación inducida por el LPS (tabla 11 en pm).

Tabla 11:

Compuesto	GM-CSF	IFN γ	IL-1b	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-17A	IL-17F	IL-18	IL-21	IL-33	TGFbeta	TNF α	TNF β
la-001a	100	30,5	34,4	94,3	100	100	1,24	5,63	100	1,5	26,4	0,1	14,7	100	100	19,3	100	0,02	13,20
la-001a-Tz	100	100	100	7,99	100	100	0,75	8,63	26,1	32,4	32,1	0,11	46,5	100	100	23,6	100	0,63	53,00
la-001a-Tz/004a	3,4	0,61	100	4,91	100	100	3,04	8,48	19,5	12,2	1,5	0,02	2,4	46,6	0,3	1,67	100	0,002	3,02
lc-001a-Tz2	100	1,38	100	9,45	100	100	0,52	9,13	100	29,1	0,12	0,31	0,15	33,9	32	0,23	100	0,1	0,41
la-001c	100	0,44	100	12,8	100	100	0,95	46,9	1,9	0,44	86,1	0,09	89,7	100	100	100	100	0,05	29,70
la-003a-Tz	100	2,95	100	43	100	100	1,41	3,62	6,94	1,26	89,6	0,07	83,9	100	1,49	72,2	100	0,18	55,00
lc-007a	100	1,44	100	100	100	100	0,09	27,1	12,5	0,49	30,1	0,04	22,9	100	1,9	18,4	100	0,27	6,52
lb-010a	100	2,22	33,3	2,74	100	100	1,02	11,58	100	0,27	100	0,42	100	100	67,8	31,3	100	0,31	49,30
lb-010a-E3	100	2,79	100	36,2	100	100	0,24	26,8	100	0,84	33	0,52	34,2	100	100	20	100	0,98	38,20
la-015a	2,76	100	100	7,08	100	100	0,77	1,47	5,27	0,12	0,15	0,05	0,15	100	57,2	0,24	100	0,17	0,30
llc-007a	26	0,11	100	12,8	100	100	0,05	2,14	17,9	3,37	0,25	0,01	0,26	100	9,41	0,18	100	0,03	0,29
llc-009a	100	0,54	100	19,6	100	100	0,27	18,9	11,31	100	0,13	0,001	0,13	2,95	8,01	0,29	100	0,11	6,94
lla-053a	100	1,04	100	1,67	100	100	2,2	1,41	100	0,27	29,9	100	28,8	100	100	12,1	100	0,02	91,50
lla-001aTz	100	18,9	100	100	100	100	1,98	3,01	7,78	0,48	0,15	0,17	0,16	27,7	3	0,14	100	0,31	0,23
llla-013a	27,8	0,15	100	57,1	100	100	3,55	11,9	37,3	0,5	0,37	0,15	0,41	100	1,63	1,11	100	0,51	0,89
lllc-057a	100	0,9	16,2	24,2	100	100	0,19	11,1	100	0,73	4,73	1,32	5,06	100	1,56	2,93	100	0,15	1,58
lllc-061a	31,2	2,48	100	100	100	100	0,18	8,85	17,9	37,2	0,31	0,04	0,32	32,4	6,38	0,31	100	0,03	0,81
IVc-058a	100	10,6	27,5	3,82	100	100	0,21	31,1	16,4	4,23	55,9	0,1	86,8	100	3,2	33,9	100	0,18	59,30
IVc-059a	100	4,34	38,6	21,2	100	100	0,11	0,4	1,31	42	100	0,16	100	100	1,87	27,5	100	0,16	0,33
IVc-059a-E2-A4	1,83	3,5	14,1	10,4	100	100	0,99	2,9	16,8	51,4	18,7	0,02	25,8	100	100	23,2	100	0,3	19,40

Los trastornos inmunológicos/reumatológicos/vasculares pueden incluir, por ejemplo, peritonitis, enfermedad de Kawasaki (KD), arteritis de Takayasu (TA), poliangeítis microscópica (MP), arteritis de células gigantes (GCA), síndrome antifosfolípido (APS), enfermedad de Behcet (BD), granulomatosis con poliangeítis (GPA) o granulomatosis de Wegener (WG), granulomatosis eosinofílica con poliangeítis, síndrome de Churg-Strauss (EGPA), y rosácea (RO).

Los trastornos reumatológicos en particular afectan a las articulaciones, tendones, ligamentos y huesos con dolor, pérdida de movimiento, e inflamación. Estos incluyen muchos tipos de artritis, tales como osteoartritis (OA), artritis reumatoide (AR), lupus, espondiloartropatías: espondilitis anquilosante (EA) y artritis psoriásica (PsA), síndrome de Sjogren, gota, esclerodermia, artritis infecciosa, artritis idiopática juvenil, polimialgia reumática.

La peritonitis es una inflamación del peritoneo que usualmente se debe a una infección bacteriana o fúngica. Existen dos tipos de peritonitis. El primer tipo es la peritonitis espontánea que puede desarrollarse como una complicación de

una enfermedad hepática, tal como cirrosis, o de una enfermedad renal. La peritonitis secundaria puede ser el resultado de una perforación del abdomen, o como complicación de otras afecciones médicas. Si no se trata, la peritonitis puede provocar una infección grave y potencialmente mortal.

La enfermedad de Kawasaki causa inflamación en las paredes de las arterias medianas de todo el cuerpo. Afecta principalmente a los niños. La inflamación tiende a afectar a las arterias coronarias, que suministran sangre al músculo cardíaco. La enfermedad de Kawasaki a veces se denomina síndrome de los ganglios linfáticos mucocutáneos porque también afecta a los ganglios linfáticos que se inflaman durante una infección, a la piel, y a las membranas mucosas del interior de la boca, la nariz y la garganta.

La arteritis de Takayasu es un tipo poco frecuente de vasculitis, un grupo de trastornos que causan inflamación de los vasos sanguíneos. En la arteritis de Takayasu, la inflamación daña la aorta y sus ramas principales. La enfermedad puede provocar un estrechamiento o bloqueo de las arterias, o un aneurisma. La arteritis de Takayasu también puede provocar dolor en los brazos o en el pecho, hipertensión arterial y, eventualmente, insuficiencia cardíaca o accidente cerebrovascular. Se necesitan medicamentos para controlar la inflamación de las arterias y prevenir complicaciones.

La granulomatosis con poliangiitis es un trastorno poco frecuente que causa inflamación de los vasos sanguíneos de la nariz, los senos paranasales, la garganta, los pulmones y los riñones. Anteriormente denominada granulomatosis de Wegener, esta afección forma parte de un grupo de trastornos de los vasos sanguíneos denominados vasculitis. Disminuye el flujo sanguíneo a algunos órganos. Los tejidos afectados pueden desarrollar áreas de inflamación llamadas granulomas, que pueden afectar el funcionamiento de estos órganos. Sin tratamiento, la afección puede ser mortal.

La arteritis de células gigantes es una inflamación del revestimiento de las arterias. La mayoría de las veces, afecta las arterias de la cabeza, especialmente en las sienas. Por esta razón, la arteritis de células gigantes a veces se denomina arteritis temporal. La arteritis de células gigantes con frecuencia causa dolores de cabeza, sensibilidad en el cuero cabelludo, dolor en la mandíbula y problemas de visión. Si no se trata, puede provocar ceguera.

El síndrome antifosfolípido ocurre cuando el sistema inmunitario crea por error anticuerpos que hacen que la sangre sea mucho más propensa a coagularse. Esto puede causar coágulos sanguíneos peligrosos en las piernas, los riñones, los pulmones y el cerebro. En las mujeres embarazadas, el síndrome antifosfolípido también puede provocar un aborto espontáneo y muerte fetal. No existe cura para el síndrome antifosfolípido. Solo los medicamentos disponibles pueden reducir el riesgo de coágulos sanguíneos. La enfermedad de Behcet, también llamada síndrome de Behcet, es un trastorno poco frecuente que causa inflamación de los vasos sanguíneos. La enfermedad puede provocar numerosos signos y síntomas que, al principio, pueden parecer no estar relacionados. Pueden incluir llagas en la boca, inflamación de los ojos, erupciones y lesiones cutáneas, y llagas genitales. El tratamiento actual puede ayudar a reducir los síntomas de la enfermedad de Behcet y a prevenir complicaciones graves, tal como la ceguera. El síndrome de Churg-Strauss es un trastorno caracterizado por la inflamación de los vasos sanguíneos. Esta inflamación puede restringir el flujo sanguíneo a los órganos y tejidos y, a veces, dañarlos permanentemente. Esta afección también se conoce como granulomatosis eosinofílica con poliangiitis (EGPA). El asma es el signo más común del síndrome de Churg-Strauss. El trastorno también puede causar otros problemas, tales como fiebre del heno, sarpullido, hemorragia gastrointestinal, y dolor y entumecimiento en las manos y los pies. El síndrome de Churg-Strauss no tiene cura. Los medicamentos actuales incluyen esteroides y otros fármacos inmunosupresores potentes para ayudar a controlar los síntomas.

La rosácea es una afección cutánea común que causa enrojecimiento y vasos sanguíneos visibles en la cara. También puede producir protuberancias pequeñas, rojas, y llenas de pus. Estos signos y síntomas pueden reaparecer durante semanas o meses y luego desaparecer por un tiempo. La rosácea se puede confundir con acné, otros problemas de la piel o rubicundez natural. La rosácea no tiene cura, pero el tratamiento puede controlar y reducir los signos y síntomas. La osteoartritis es la forma más común de artritis, y afecta a millones de personas en todo el mundo. Se produce cuando el cartílago protector se desgasta con el tiempo. Si bien la osteoartritis puede dañar cualquier articulación, el trastorno afecta con mayor frecuencia a las articulaciones de las manos, las rodillas, las caderas y la columna vertebral. Los síntomas de la osteoartritis usualmente se pueden controlar, aunque el daño a las articulaciones no se puede revertir.

El lupus es una enfermedad autoinmunitaria. Hace que el sistema inmunitario produzca proteínas llamadas autoanticuerpos que atacan los propios tejidos y órganos, incluidos los riñones. La nefritis lúpica es una complicación frecuente en las personas que tienen lupus eritematoso sistémico (conocido comúnmente como lupus). La nefritis lúpica se produce cuando los autoanticuerpos del lupus afectan las estructuras de los riñones. Esto causa inflamación de los riñones y puede provocar sangre en la orina, proteínas en la orina, hipertensión arterial, insuficiencia renal o incluso insuficiencia renal.

La esclerodermia es un grupo de enfermedades raras que implican el endurecimiento y endurecimiento de la piel y los tejidos conectivos. Existen muchos tipos diferentes de esclerodermia. En algunas personas, la esclerodermia afecta solo a la piel. Sin embargo, en muchas personas, la esclerodermia también daña estructuras más allá de la piel, tales como los vasos sanguíneos, los órganos internos y el tracto digestivo (esclerodermia sistémica). No existe cura para la esclerodermia. El síndrome de Sjogren es un trastorno del sistema inmunitario que se identifica por sus dos síntomas más comunes: sequedad de ojos y sequedad de boca. La afección frecuentemente acompaña a otros trastornos del sistema inmunitario, tales como la artritis reumatoide y el lupus. En el síndrome de Sjogren, las membranas mucosas y las glándulas secretoras de humedad de los ojos y la boca usualmente se ven afectadas primero, lo que provoca una disminución de las lágrimas y la saliva. La

artritis infecciosa o séptica es una infección dolorosa en una articulación que puede provenir de gérmenes que viajan por el torrente sanguíneo desde otra parte del cuerpo. La artritis séptica también puede ocurrir cuando una lesión penetrante, tal como la mordedura de un animal o un traumatismo, envía los gérmenes directamente a la articulación. Las personas que tienen articulaciones artificiales también corren el riesgo de sufrir artritis séptica. Las rodillas son las más afectadas, pero la artritis séptica también puede afectar las caderas, los hombros y otras articulaciones. La infección puede dañar rápida y gravemente el cartílago y el hueso de la articulación, por lo que el tratamiento inmediato es crucial.

La artritis idiopática juvenil, anteriormente conocida como artritis reumatoide juvenil, es el tipo más común de artritis en niños menores de 16 años. La artritis idiopática juvenil puede causar dolor, hinchazón y rigidez persistentes en las articulaciones. Algunos niños pueden tener síntomas solo durante unos pocos meses, mientras que otros tienen síntomas durante muchos años. Algunos tipos de artritis idiopática juvenil pueden causar complicaciones graves, tales como problemas de crecimiento, daño articular, e inflamación ocular.

La polimialgia reumática es un trastorno inflamatorio que causa dolor y rigidez muscular, especialmente en los hombros y las caderas. Usualmente, los signos y síntomas de la polimialgia reumática comienzan rápidamente y son peores por la mañana. La mayoría de las personas que desarrollan polimialgia reumática tienen más de 65 años. Esta afección está relacionada con otra afección inflamatoria llamada arteritis de células gigantes.

Los trastornos oftalmológicos pueden incluir, por ejemplo, y sin ninguna limitación, degeneración macular asociada a la edad (DMAE o DMAE, formas seca y húmeda), pterigión (PTE), retinopatía diabética (DR), edema macular diabético (EMD), enfermedad de Stargardt (SD), vitreorretinopatía proliferativa (PVR), síndrome del ojo seco (DYS), endoftalmítis, coriorretinopatía serosa central (CSC), retinitis pigmentosa (RP), glaucoma y complicaciones asociadas al glaucoma, y uveítis (UVE).

La degeneración macular húmeda es un trastorno ocular crónico que causa visión borrosa o un punto ciego en el campo visual. Generalmente, es causada por vasos sanguíneos anormales que filtran líquido o sangre hacia la mácula. La mácula se encuentra en la parte de la retina responsable de la visión central. La degeneración macular húmeda es uno de los dos tipos de degeneración macular asociada con la edad. El tipo húmedo siempre comienza como el tipo seco. La degeneración macular seca es más frecuente y menos grave. También causa visión central borrosa o reducida debido al adelgazamiento de la mácula. La degeneración macular seca puede desarrollarse primero en uno o ambos ojos y luego afectar a ambos ojos. Típicamente, la pérdida de visión es central, pero se conserva en la visión periférica.

La retinopatía diabética es una complicación de la diabetes que afecta a los ojos. Es causada por el daño a los vasos sanguíneos de la retina. Al principio, la retinopatía diabética puede no causar síntomas o solo problemas de visión leves. Con el tiempo, puede causar ceguera. La afección se puede presentar en cualquier persona que tenga diabetes tipo 1 o tipo 2. La DME es una complicación ocular grave que se produce cuando los microaneurismas sobresalen de las paredes de los vasos, filtrando o supurando líquido y sangre hacia la retina, provocando de este modo un edema en la mácula. La enfermedad de Stargardt es una enfermedad ocular que causa pérdida de la visión en niños y adultos jóvenes. Es una enfermedad hereditaria y, por lo tanto, se transmite de padres a hijos. La enfermedad de Stargardt es una forma de degeneración macular y frecuentemente se denomina degeneración macular juvenil.

La PVR es una enfermedad que se desarrolla como una complicación del desprendimiento de retina regmatógeno. La PVR ocurre en aproximadamente el 8-10 % de los pacientes que se someten a una cirugía primaria de desprendimiento de retina e impide la reparación quirúrgica exitosa del desprendimiento de retina regmatógeno. La PVR se puede tratar con cirugía para volver a colocar la retina desprendida, pero el resultado visual de la cirugía es muy deficiente.

La enfermedad del ojo seco es una afección común que ocurre cuando las lágrimas no pueden proporcionar una lubricación adecuada a los ojos. Las lágrimas pueden ser inadecuadas e inestables por muchas razones. Por ejemplo, los ojos secos pueden ocurrir si no produce suficientes lágrimas o si produce lágrimas de mala calidad. Esta inestabilidad de las lágrimas provoca inflamación y daño de la superficie del ojo.

La endoftalmítis es una inflamación del interior del ojo que puede producirse después de una inyección ocular o una cirugía. Los signos típicamente son: visión borrosa u otros cambios en la visión, dolor ocular, enrojecimiento del ojo, sensibilidad del ojo a la luz, o lagrimeo.

La retinitis pigmentaria (RP) es un grupo de trastornos genéticos poco frecuentes que implican una descomposición y la pérdida de células de la retina, que es el tejido sensible a la luz que recubre la parte posterior del ojo. Los síntomas comunes incluyen dificultad para ver de noche y pérdida de la visión lateral (periférica).

El glaucoma es un grupo de afecciones oculares que dañan el nervio óptico, cuya salud es vital para una buena visión. Este daño frecuentemente es causado por una presión ocular anormalmente alta. El glaucoma es una de las principales causas de ceguera en personas mayores de 60 años. Puede ocurrir a cualquier edad, pero es más común en los adultos mayores. Muchas formas de glaucoma no presentan señales de advertencia. El efecto es tan gradual sin cambios en la visión hasta que la afección se encuentra en una etapa avanzada.

La uveítis es una forma de inflamación ocular. Afecta a la capa media de tejido de la pared ocular o de la úvea. Las señales de advertencia de la uveítis frecuentemente aparecen de repente y empeoran rápidamente. Incluyen enrojecimiento de los ojos, dolor, y visión borrosa. Las posibles causas de la uveítis son una infección, una lesión, o una enfermedad autoinmune o inflamatoria. La uveítis puede ser grave y provocar una pérdida permanente de la visión.

Los compuestos y las composiciones farmacéuticas según la presente invención también pueden utilizarse en un método para tratar y/o prevenir enfermedades neurodegenerativas de la retina seleccionada del grupo que consiste en retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad, glaucoma, y retinitis pigmentaria. Las enfermedades neurodegenerativas de la retina se refieren a afecciones de la retina caracterizadas por una pérdida neuronal progresiva. La retinopatía diabética, la degeneración macular asociada a la edad, el glaucoma y la retinitis pigmentaria se consideran enfermedades de la retina en las que la neurodegeneración desempeña un papel esencial.

Según esta realización preferida, los compuestos según la presente invención pueden combinarse con otros agentes activos para mejorar la eficacia terapéutica de la afección que se tratará y, en particular, con el inhibidor de dipeptidil peptidasa-4 (DPP4) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento ocular tópico y/o en la prevención de una enfermedad neurodegenerativa de la retina. El inhibidor de DPP4 se puede seleccionar del grupo que consiste en sitagliptina, saxagliptina, vildagliptina, linagliptina, anagliptina, teneligliptina, alogliptina, trelagliptina, gemigliptina, omarigliptina, sus sales farmacéuticamente aceptables, y mezclas de las mismas.

Los compuestos según la presente invención también pueden combinarse ventajosamente con el tratamiento anti-VEGF para reducir el número de inyecciones intraoculares de anticuerpos anti-VEGF que necesitan los pacientes. La administración a los pacientes que tienen enfermedades neurodegenerativas de la retina, tal como, por ejemplo, la retinopatía diabética o la degeneración macular asociada a la edad, ralentiza la progresión de estas enfermedades y reduce la farmacoterapia anti-VEGF que los pacientes necesitan.

Los trastornos fibróticos pueden incluir, por ejemplo y sin ninguna limitación, fibrosis quística, fibrosis retroperitoneal, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar y enfisema combinados (CPFE), fibrosis angiocéntrica eosinofílica, fibrosis intestinal, fibrosis ovárica, fibrosis sistémica nefroténica, fibrosis submucosa oral (OSMF) y fibrosis hepática.

La fibrosis quística (FQ) es un trastorno hereditario que causa daños graves en los pulmones, el aparato digestivo, y otros órganos del cuerpo. Afecta a las células que producen moco, sudor y jugos digestivos. En lugar de actuar como lubricantes, las secreciones obstruyen los tubos, pasajes y conductos, especialmente en los pulmones y el páncreas.

La fibrosis pulmonar es una enfermedad pulmonar que se produce cuando el tejido pulmonar se daña y deja cicatrices. Este tejido engrosado y rígido dificulta que los pulmones funcionen correctamente. La cicatrización asociada con la fibrosis pulmonar puede deberse a una multitud de factores. El daño pulmonar causado por la fibrosis pulmonar no se puede reparar, pero los medicamentos y las terapias a veces pueden ayudar a aliviar los síntomas y mejorar la calidad de vida.

El enfisema es una afección pulmonar que causa dificultad para respirar. Los alvéolos están dañados y, con el tiempo, las paredes internas de los alvéolos se debilitan y se rompen, creando espacios de aire más grandes en lugar de muchos pequeños. Esto reduce la superficie de los pulmones y, a su vez, la cantidad de oxígeno que llega al torrente sanguíneo. Los alvéolos dañados no funcionan correctamente, lo que hace que el aire viejo quede atrapado y no deje espacio para que entre aire fresco y rico en oxígeno.

Los trastornos metabólicos y gastrointestinales pueden incluir, por ejemplo y sin ninguna limitación, complicaciones inducidas por la diabetes: nefropatía diabética (DN), retinopatía diabética (DR), miocardiopatía diabética (DCDM), o úlcera del pie diabético (DFU). Las enfermedades hepáticas pueden incluir la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), la hepatitis esteática no alcohólica (NASH), la colangitis biliar primaria (CBP), la fibrosis o cirrosis hepática (HF), la enfermedad inflamatoria intestinal (EII): colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, fibrosis intestinal. Además de la nefropatía diabética, otras enfermedades renales pueden incluir la enfermedad renal poliquística (PKD), la enfermedad renal crónica (ERC), la fibrosis sistémica nefrótica (NSF), y la pancreatitis (aguda y crónica).

La nefropatía diabética es una complicación grave relacionada con los riñones de la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2. También se denomina enfermedad renal diabética. Aproximadamente el 25 % de las personas con diabetes eventualmente desarrollan una enfermedad renal. La nefropatía diabética afecta la capacidad de los riñones para realizar su trabajo habitual de eliminar los productos de desecho y el exceso de líquido del cuerpo. Durante muchos años, la afección daña lentamente el delicado sistema de filtrado de los riñones, y puede progresar hasta convertirse en insuficiencia renal, también llamada enfermedad renal terminal. La insuficiencia renal es una afección que pone en peligro la vida.

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, en inglés) es un término general para un rango de afecciones hepáticas que afectan a las personas que beben poco o nada de alcohol. Como su nombre lo indica, la característica principal de la NAFLD es el exceso de grasa almacenada en las células del hígado. La forma más común de enfermedad hepática crónica. Algunas personas con NAFLD pueden desarrollar esteatohepatitis no alcohólica (NASH), una forma agresiva de enfermedad del hígado graso, que se caracteriza por la inflamación del hígado y que puede progresar a formación de cicatrices avanzadas (cirrosis) e insuficiencia hepática. Este daño es similar al daño causado por el consumo excesivo de alcohol.

La colangitis biliar primaria es una enfermedad autoinmunitaria crónica en la que los conductos biliares del hígado se destruyen lentamente. Cuando se dañan las vías biliares, la bilis puede acumularse en el hígado y, a veces, provocar una cirrosis irreversible. Una combinación de factores genéticos y ambientales desencadena la enfermedad.

La IBD describe los trastornos que implican una inflamación crónica del tracto digestivo. Los tipos de IBD incluyen la colitis ulcerosa, que involucra úlceras a lo largo del revestimiento superficial del colon y el recto, así como la enfermedad de Crohn, que se caracteriza por la inflamación del revestimiento del tracto digestivo, que frecuentemente puede afectar a las capas más profundas del tracto digestivo. Tanto la colitis ulcerosa como la enfermedad de Crohn usualmente se caracterizan por diarrea, hemorragia rectal, dolor abdominal, fatiga, pérdida de peso y, a veces, provocan complicaciones potencialmente mortales.

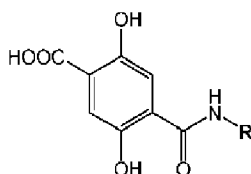
Las neoplasias y los trastornos asociados al cáncer pueden incluir, por ejemplo y sin ninguna limitación, el cáncer de páncreas: principalmente fibrótico, carcinoma de células renales, fibrosis inducida por radiación, mielofibrosis primaria, desmoplasia, fibrosarcoma, carcinoma hepatocelular, retinoblastoma, linfoma intraocular, y melanoma (desmoplásico, conjuntival, uveal).

La invención también se refiere al tratamiento, la prevención, y la reducción de infecciones virales mediante la unión a los sitios de unión al sulfato de heparano de las proteínas del virus. Los compuestos según la invención interactúan con la región de unión al sulfato de heparano de los factores de crecimiento (FGF, VEGF y otros factores de crecimiento) y los receptores de los factores de crecimiento (FGFR, VEGFR y otros). Se sabe que muchos virus interactúan con células de mamíferos utilizando su afinidad por los restos de sulfato de heparano unidos a las membranas celulares. Los virus que portan en sus proteínas de superficie dominios de unión al sulfato de heparano (HS, en inglés) utilizan esta afinidad por el HS como una de las principales puertas de entrada para acercarse e infectar las células y unirse al sulfato de heparano adherido a las células. Cuando se unen al HS, los virus pueden infectar las células mediante diversos mecanismos de invasión específicos de cada virus. La fuerte interacción de los compuestos según la invención con el dominio de unión al heparano de las proteínas y específicamente de las proteínas virales previene la infección viral de las células sanguíneas, las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos y los órganos, así como las células epiteliales de superficie presentes en la boca, la mucosa nasal, y los pulmones y también en el tracto gastrointestinal. Se conocen varias especies de virus con una alta afinidad por los sulfatos de heparano, tal como, entre otros, el virus sincitial respiratorio, el metapneumovirus humano, la influenza (H1N1 y similares), el rinovirus humano (HRV), el virus del rinosincitial (RV), el virus del chikungunya, los coronavirus tales como CoV, SARS-CoV, MERS-CoV, COVID-19 (SARS-CoV-2) y sus variantes. El HS es un cofactor necesario para la infección por SARS-CoV-2. El HS interactúa con el dominio de unión al receptor de la glicoproteína de la espícula del SARS-CoV-2, adyacente a la ACE2, desplazando la estructura de la espícula a una conformación abierta para facilitar la unión a la ACE2. Las enfermedades infecciosas virales y bacterianas también pueden incluir el choque séptico, la inflamación del ojo, tal como la endoftalmitis debida a una cirugía o una infección.

Ejemplos

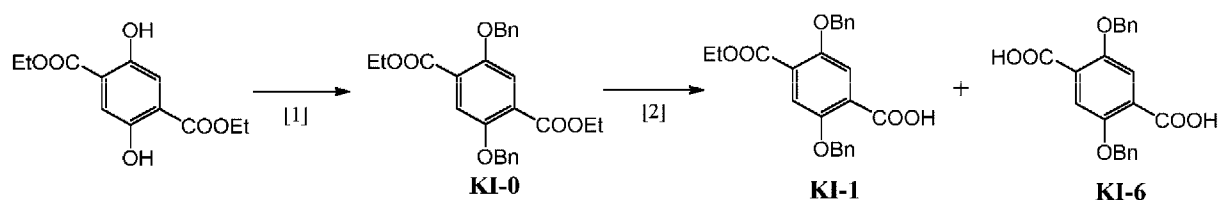
Ejemplo 1: Síntesis de los compuestos e intermedios

Ejemplo 1.1: Moléculas de tipo Ia: Monoamidas, 25 ejemplos



Síntesis de precursores

Esquema 1. Intermedios sintéticos KI-1 y KI-6



Procedimientos:

Síntesis de KI-1 y KI-6 (pasos [1], [2])

2,5-bis(benciloxi)tereftalato de dietilo (KI-0) (paso [1]). Se añadió una malla de carbonato de potasio 325 (326,1 g, 2,4 mol) en porciones a una solución agitada de 2,5-dihidroxitereftalato de dietilo (200,0 g, 0,79 mol) en DMF (800,0 ml) a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se añadió bromuro de bencilo (280,0 ml, 2,4 mol) al matraz de reacción gota a gota durante 30 minutos, y la mezcla resultante se calentó a 100 °C durante 2 horas, lo que dio como resultado la formación de un precipitado espeso de color crema. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se trató con una solución de cloruro de amonio acuoso saturado (2 l). La suspensión resultante se agitó durante 30 minutos, después se filtró. El material sólido se lavó con una solución de cloruro de amonio acuoso saturado (2 x 200 ml). El sólido se suspendió luego en etanol (400 ml), se filtró y se secó en el horno de vacío para dar el producto deseado en forma de un sólido blanco (341,0 g, 0,785 mol, 99,8 %)

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t_R = 1,36 min, no se observó ionización, área del pico > 95 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,51-7,44 (m, 6H), 7,44-7,36 (m, 4H), 7,36-7,28 (m, 2H), 5,17 (s, 4H), 4,29 (q, J = 7,1 Hz, 4H), 1,26 (t, J = 7,1 Hz, 6H).

Ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoico (KI-1) y ácido 2,5-bis(benciloxi)tereftálico (KI-6) (paso [2])

Se añadió rápidamente una solución de hidróxido de potasio (14,2 g, 0,25 mol) en agua (200,0 ml) a una solución de 2,5-bis(benciloxi)tereftalato de dietilo (100 g, 0,23 mol) en 1,4-dioxano (1 l), y la mezcla resultante se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El solvente se retiró *al vacío*, dando como resultado la formación de una suspensión blanca. El producto crudo se suspendió en EtOH (500 ml) y se filtró y el sólido recogido se secó en un horno de vacío para proporcionar 2,5-bis(benciloxi)tereftalato de dietilo puro (23,0 g, 0,053 mol, 23 %)

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t_R = 1,36 min, no se observó ionización, área del pico 98 %

El filtrado etanólico se concentró para dar un aceite. Se añadió acetato de etilo (500 ml) para formar un precipitado que se filtró y se lavó con acetato de etilo (200 ml) para proporcionar ácido 2,5-bis(benciloxi)tereftálico (**KI-6**) en forma de un sólido blanco (18,9 g, 0,042 mol, 18 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t_R = 1,22 min, m/z 377,1 [M-H] $^-$, área del pico 95 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,52-7,45 (m, 4H), 7,41-7,33 (m, 4H), 7,33-7,26 (m, 4H), 5,13 (s, 4H).

El filtrado se lavó con una solución saturada de carbonato de sodio acuoso (200 ml), 1 M ácido clorhídrico acuoso (500 ml) y salmuera (500 ml), después se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró hasta sequedad para dar el ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoico (**HI-1**) en forma de un sólido blanco (53 g, 0,130 mol, 57,0 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t_R = 1,22 min, m/z 405,3 [M-H] $^-$, área del pico 96 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,52-7,27 (m, 13H), 5,17 (s, 4H), 4,28 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 1,26 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

Protocolo a gran escala para la síntesis de KI-1

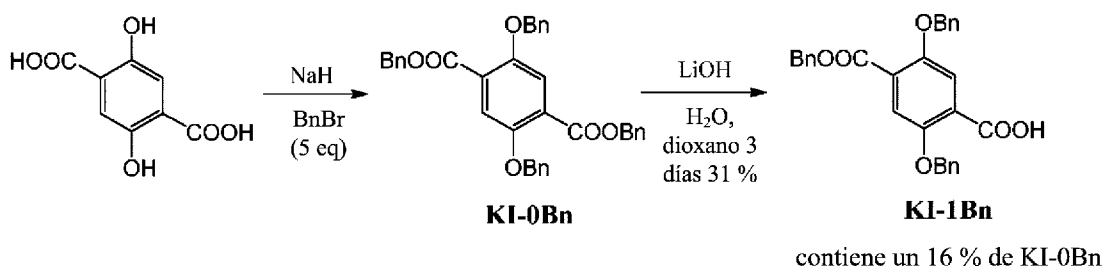
Un recipiente con camisa de 10 l se cargó con 2,5-bis(benciloxi)tereftalato de dietilo (500,00 g, 1,15 mol), 1,4-dioxano (2,5 l), hidróxido de potasio (71,00 g, 1,26 mol) y agua (500 ml). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El análisis LCMS mostró que la reacción se había completado a la mitad, mostrando también el subproducto (diácido) y el material de partida (diéster) en la relación de (diéster:monoácido:diácido = 28:58:14). (diácido: 4,44 ta, monoácido: 5,08 ta, diéster: 5,68 ta). En esta etapa, el solvente se retiró al vacío. El producto crudo se introdujo en una mezcla 2:1 de etanol:agua (3 l), en un recipiente con camisa de 10 l, se agitó durante una noche y se filtró para dar:

Sólido: (diéster: monoácido: diácido = 86:12:2, 110,00 g, sólido incoloro)

Filtrados: (diéster: monoácido: diácido 3:63:34)

Los filtrados se concentraron al vacío para proporcionar un aceite. Este aceite se suspendió en acetato de etilo (2,5 l), se agitó durante una noche en un recipiente con camisa de 10 l y se filtró para dar un sólido blanco (150,00 g). Sólido: (diéster: monoácido: diácido = traza: 40:60).

Los filtrados se recogieron, se lavaron con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (100 ml), una solución de 1N ácido clorhídrico (200 ml) y salmuera (200 ml), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se filtraron. El solvente se retiró a presión reducida para proporcionar el producto deseado, el ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoico (**HI-1**), en forma de un sólido blanco, que se secó en el horno de vacío a 50 °C durante 48 horas (225,00 g, rendimiento del 49 %) (los rendimientos varían entre 49-65 %).

Esquema 2: Intermedio sintético KI-1Bn

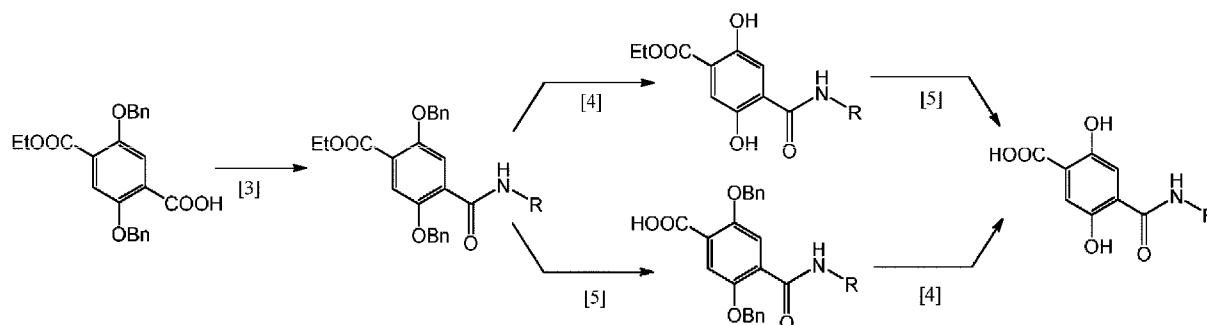
Procedimiento:

Síntesis de KI-1Bn:

Ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(benciloxicarbonil)benzoico (KI-1Bn). A una solución de ácido 2,5-dihidroxitereftálico (1,97 g, 10 mmol) en DMF (20 ml) a 0 °C se añadió hidruro de sodio (2,0 g, 50 mmol) con agitación, luego bromuro de bencilo (5,95 ml, 50 mmol, 5 eq) gota a gota durante 5 minutos, y la mezcla resultante se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se calentó luego a 60 °C durante 18 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se trató cuidadosamente con MeOH (5 ml). La mezcla se concentró a presión reducida, y el material residual se evaporó conjuntamente con heptano (3 veces). El residuo se recogió en DCM (30 ml), la fase orgánica se lavó con 1M HCl (25 ml), la capa acuosa separada se extrajo con DCM (3 x 30 ml) y las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄) y se concentraron. El sólido crudo se recrystalizó en EtOH (~30 ml) para proporcionar **KI-0Bn** puro (2,286 g, 41 %). Se añadió una muestra de KI-0Bn (282 mg, 0,5 mmol) a una mezcla de 1,4-dioxano (10 ml) e hidrato de hidróxido de litio (22 mg, 0,52 mmol), y la mezcla se calentó hasta 80 °C durante 3 días. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente, se recogió en AcOEt (30 ml) y la solución se lavó con 1M HCl (2 ml). La fase orgánica se secó y se concentró, y el residuo se sometió a cromatografía en columna para proporcionar el monoéster **KI-1Bn** contaminado con aproximadamente el 16 % del diéster **KI-0Bn**.

KI-0Bn: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,51 (s, 2H), 7,36-7,30 (m, 20H), 5,34 (s, 4H), 5,11 (s, 4H). **KI-1Bn:** ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 7,86 (s, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,41-7,30 (m, 20H), 5,36 (s, 2H), 5,26 (s, 2H), 5,16 (s, 2H).

Síntesis de monoamidas

Esquema 3. Síntesis de monoamidas Ia

Procedimiento general A para el acoplamiento de amida [3A]

➤ Acoplamiento mediante cloruro de acilo, de KI-1 o KI-6

Reacción modelo (Ia-013a)

2-(2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoilamino)isofталato de dimetilo. El ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoico (**KI-1**, 1,1 g, 2,8 mmol) se disolvió en cloruro de tionilo (6 ml), y la mezcla resultante se agitó durante 5 minutos. Se añadieron unas gotas de DMF, y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. El exceso de cloruro de tionilo se retiró *al vacío* y el residuo se destiló conjuntamente con tolueno (3 x 20 ml) para proporcionar el cloruro de acilo. Se añadió rápidamente una solución de cloruro de acilo en DCM (10 ml) a una solución de amina (2-aminoisofталato de dimetilo, 210 mg, 3,1 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (0,53 ml, 3,045 mmol) en DCM (10 ml) a temperatura ambiente y la reacción se agitó durante 18 horas. La reacción se diluyó con DCM (70 ml) y se lavó con 1M ácido clorhídrico acuoso (100 ml), agua (100 ml), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró

para dar el producto crudo, que se purificó mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo (0 a 25 %) en isohexano hasta obtener el producto deseado en forma de un sólido blanco (1,24 g, 2,075 mmol, 75 %). UPLC-MS (método ácido, 2 min): $t_r = 1,37$ min; $m/z = 598,2$ [M+H]⁺, área del pico > 95 %

- 5 ¹H NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ 11,60 (s, 1H), 8,02 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,69 (s, 1H), 7,59 - 7,23 (m, 12H), 5,49 (s, 2H), 5,19 (s, 2H), 4,28 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,71 (s, 6H), 1,26 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

Procedimiento general B para el acoplamiento de amida [3B]

- 10 ➤ Acoplamiento utilizando un agente de condensación, de **KI-1** o **KI-6**

Reacción modelo (Ia-001a)

- 15 **2-(2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoilamino)benzoato de metilo.** Se añadió 1-metilimidazol (13,0 ml, 163 mmol) a una mezcla de ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoico (**KI-1**, 12,95 g, 32 mmol) y antranilato de metilo (5,729 g, 38 mmol, 1,190 eq) en MeCN (150 ml) a temperatura ambiente. Se añadió hexafluorofosfato de cloro-*N,N,N',N'*-tetrametilformamidinio (TCFH) (10,728 g, 0,038 mol) en porciones durante 30 minutos, y la mezcla resultante se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se trató con 1 M ácido clorhídrico acuoso (700 ml). La suspensión resultante se agitó durante 10 minutos, después se filtró. El material sólido se lavó con agua (2 x 200 ml). Después, el sólido se suspendió en etanol (200 ml), se filtró, se lavó con éter (100 ml) y se secó en el horno de vacío para dar el producto deseado en forma de un sólido blanco (14,7 g, 27 mmol, 86 %)

UPLC-MS (método ácido, 2 min): $t_r = 1,43$ min; $m/z = 540,2$ [M+H]⁺, área del pico > 99 %

- 25 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,87 (s, 1H), 8,65 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,98 (dd, $J = 8,0, 1,7$ Hz, 1H), 7,81 - 7,61 (m, 2H), 7,59 - 7,12 (m, 12H), 5,41 (s, 2H), 5,20 (s, 2H), 4,28 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,74 (s, 3H), 1,27 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).0

Procedimientos generales de desprotección [4], [5]

- 30 Saponificación

Reacción modelo (Ia-013a)

- 35 **Ácido 2-(2,5-bis(benciloxi)-4-carboxibenzoilamino)isofáltico** La solución de hidróxido de litio (42 mg, 1 mmol) en agua (4 ml) se añadió a la solución de 2-(2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoilamino)isofaltato de dimetilo (100 mg, 0,167 mmol) en THF (6 ml) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadió LiOH adicional (6 eq) en agua (4 ml) a la mezcla de reacción que se agitó durante 23 horas adicionales. Una vez completada, se añadió agua (50 ml) a la reacción y la mezcla se lavó con acetato de etilo (50 ml). La capa acuosa se acidificó con 1M ácido clorhídrico acuoso hasta pH = 2 y se extrajo con acetato de etilo (2 x 50 ml). Las capas orgánicas se recogieron, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron para dar el compuesto del título en forma de un sólido blanco (82 mg, 0,151 mmol, 91 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): $t_r = 1,02$ min; $m/z = 542,1$ [M+H]⁺, área del pico > 95 %

- 45 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,18 (s, 2H), 11,74 (s, 1H), 8,00 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,71 (s, 1H), 7,58 - 7,43 (m, 5H), 7,40 - 7,24 (m, 7H), 5,47 (s, 2H), 5,14 (s, 2H).

Desbencilación

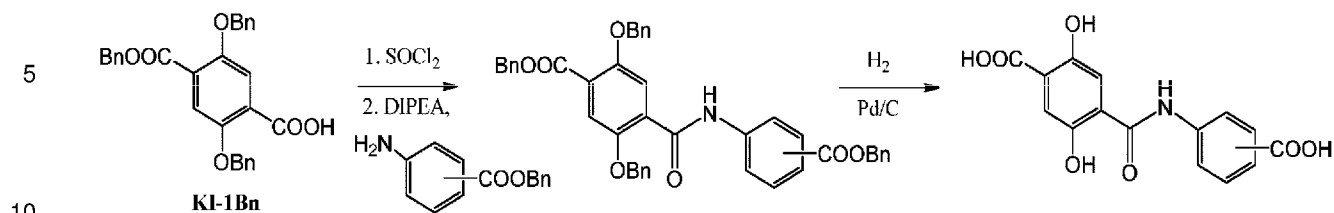
- 50 Reacción modelo (Ia-013a)

- 55 **Ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-carboxibenzoilamino)isofáltico (Ia-013a).** Se añadió Pd/C (94 mg, 10 %) a una solución de ácido 2-(2,5-bis(benciloxi)-4-carboxibenzoilamino)isofáltico (0,94 g, 1,74 mmol) en una mezcla 10:30 de EtOH y DCM. La mezcla se colocó bajo hidrógeno a presión atmosférica a temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. Una vez completada, la mezcla se filtró a través de Celite, que se lavó con DCM y MeOH. El filtrado y los lavados se combinaron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto deseado **Ia-013a** en forma de un sólido amarillo (644 mg, 1,69 mmol, 98 %).

UPLC-MS (método ácido, 4 min): $t_r = 0,91$ min; $m/z = 362,0$ [M+H]⁺, área del pico > 98 %

- 60 ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 13,11 (s, 2H), 11,70 (s, 1H), 11,13 (s, 1H), 7,97 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,47 (s, 1H), 7,41 (s, 1H), 7,38 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H)

65

Esquema 4a. Síntesis de monoamidas Ia a partir de KI-1Bn

Procedimiento general a partir de KI-1Bn

➤ Acoplamiento *mediante* cloruro de acilo

Reacción modelo: síntesis de Ia-032a

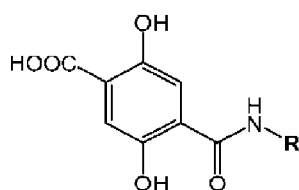
4-(2,5-bis(benciloxi)-4-(benciloxicarbonil)benzoilamino)fenilacetato de bencilo. A una solución de **KI-1Bn** (233 mg, 84 % de pureza) en DCM (10 ml) se añadió SOCl_2 (1,8 ml, 60 eq) y la mezcla se calentó a 50 °C durante 3 horas. Los solventes se evaporaron y el residuo se evaporó conjuntamente con tolueno (3 x 10 ml) para dar el cloruro de acilo crudo (237 mg, 99 %). Este material se disolvió en DCM (3 ml) y se añadió diisopropiletilamina (0,08 ml, 1,15 eq), seguida de una solución de 4-aminofenilacetato de bencilo (92 mg, 0,95 eq) en DCM (3 ml). El volumen de reacción final fue de 10 ml. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla se diluyó con DCM (15 ml), se lavó con cloruro de amonio acuoso saturado (12 ml). La fase acuosa separada se extrajo con DCM (2 x 2 ml), las fases orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO_4), y se concentraron. El producto crudo se sometió a cromatografía en columna (Pet. Et./DCM 1: 1 luego gradiente hasta el 100 % de DCM) para dar una primera fracción de KI-0Bn puro, y una segunda fracción que contiene el producto puro deseado (237 mg, 86 %, corregida para la pureza de KI-1Bn).

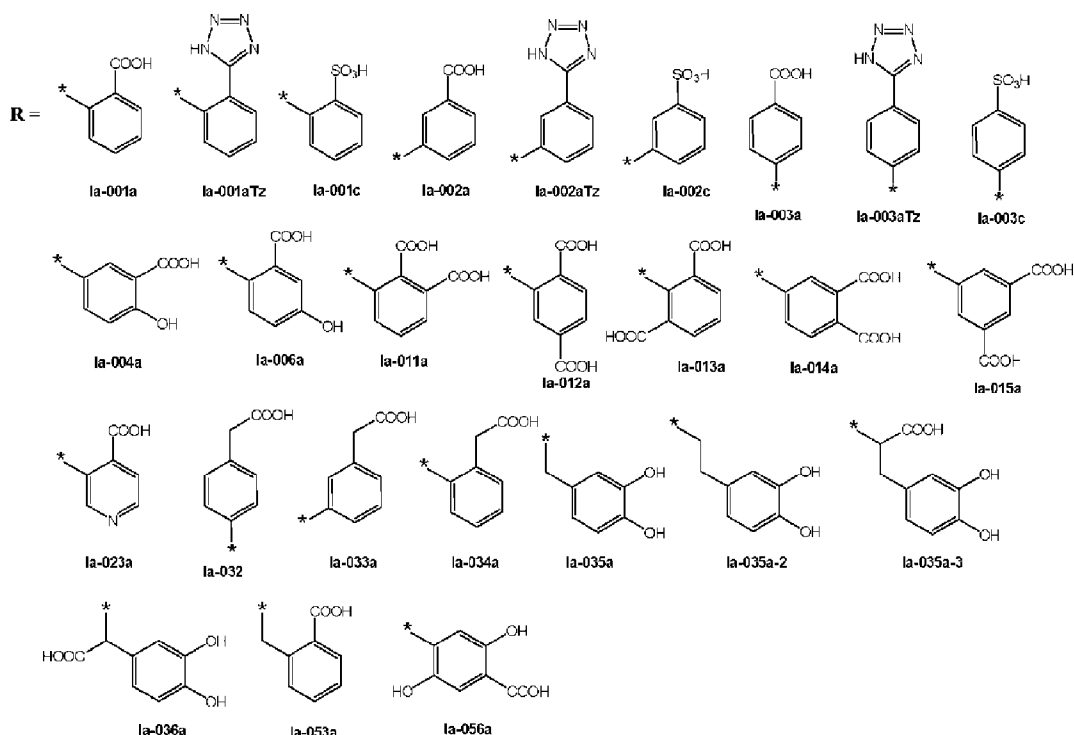
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 10,10 (s, 1H), 8,08 (s, 1H), 7,65 (s, 1H), 7,53-7,30 (m, 20H), 7,22-7,13 (br AB, 4H), 5,39, 5,22, 5,21, 5,12 (4s, 4x 2H), 3,61 (s, 2H).

Ácido 4-(4-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxi benzoico (Ia-032a). A una solución del precursor preparada anteriormente (225 mg, 0,33 mmol) en DCM (20 ml) se añadió Pd al 5 % sobre carbón vegetal (72 mg), seguido de EtOH (20 ml). El matraz se enjuagó con Ar (3x), después se llenó con hidrógeno (presión atmosférica) y la mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El catalizador se retiró por filtración sobre un filtro miliporoso, el filtrado se evaporó, y el residuo se secó para proporcionar el producto **Ia-032a** en forma de un sólido amarillo claro (107 mg, 99 %).

^1H NMR (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12,28 (br, 1H), 10,92 (s, 1H), 10,44 (s, 1H), 7,65 (br d, 2H), 7,41 (s, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,25 (br d, 2H), 3,55 (s, 2H).

Por ejemplo:





Para condiciones y rendimientos: Véanse las figuras 4A-D

1) Ácido 4-(2-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-001a** UPLC-MS (método ácido, 2 min): $t_a = 0,95$ minutos, $m/z = 316$ [M-H]⁻, área del pico > 97 % ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,22 (s, 1H), 10,85 (s, 1H), 8,65 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 8,01 (dd, $J = 8,0, 1,7$ Hz, 1H), 7,71 - 7,56 (m, 1H), 7,41 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H), 7,22 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H). HRMS: [M+H]⁺, calculada para C₁₅H₁₂NO₇: 318,06083, encontrada: 318,06080.

Biodatos: **Ia-001a**: IC₅₀ de FGF-1 [μM] = 41; IC₅₀ de FGF-2 [μM] = 39; IC₅₀ de VEGF-A1 [μM] = 7,3;

IC₅₀ de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 2,25; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%]] = 48;

IC₅₀ de inhibición de PMN ROS [μM] = 0,355; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 44,3; Sangre entera: IC₅₀ de GM-CSF [μM] = >100; IC₅₀ de IFNγ [μM] = 30,5; IC₅₀ de IL-1β [μM] = 34,4; IC₅₀ de IL-2 [μM] = 94,3; IC₅₀ de IL-4 [μM] = >100; IC₅₀ de IL-5 [μM] = >100; IC₅₀ de IL-6 [μM] = 1,24; IC₅₀ de IL-9 [μM] = 5,63; IC₅₀ de IL-10 [μM] = >100; IC₅₀ de IL-12p70 [μM] = 1,5; IC₅₀ de IL-13 [μM] = 26,4; IC₅₀ de IL-17A [μM] = 0,1; IC₅₀ de IL-17F [μM] = 14,7; IC₅₀ de IL-18 [μM] = >100; IC₅₀ de IL-21 [μM] = >100; IC₅₀ de IL-33 [μM] = 19,3; IC₅₀ de TGFβ [μM] = >100; IC₅₀ de TNF α [μM] = 0,02; IC₅₀ de TNFβ [μM] = 13,2

Éster de dietilo:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): $t_a = 1,39$ mins, $m/z = 372,2$ [M-H]⁻, área del pico > 98 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,96 (s, 1H), 11,05 (s, 1H), 9,87 (s, 1H), 8,57 (dd, $J = 8,5, 1,2$ Hz, 1H), 7,99 (dd, $J = 7,9, 1,7$ Hz, 1H), 7,65 (ddd, $J = 8,7, 7,3, 1,7$ Hz, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,25 (td, $J = 7,6, 1,2$ Hz, 1H), 4,35 (m, 4H), 1,33 (m, 6H).

HRMS: [M+H]⁺, calculada para C₁₉H₂₀NO₇: 374,12342, encontrada: 374,12354

Biodatos: **Ia-001a-E2**: IC₅₀ de FGF-1 [μM] = 9,2; IC₅₀ de FGF-2 [μM] = 200; IC₅₀ de VEGF-A1 [μM] = 123; IC₅₀ de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 1,25; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%]] = 51,47; IC₅₀ de inhibición de PMN ROS [μM] = 2,58; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 50,5

2) Ácido 4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto **Ia-001aTz**:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): $t_a = 1,17$ min; $m/z = 342,0$ [M+H]⁺, área del pico > 96 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,60 (s, 1H), 10,90 (s, 2H), 8,47 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,93 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,61 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,50 - 7,32 (m, 3H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculada para $C_{15}H_{12}N_5O_5$: 342,08329, encontrada: 342,08318

Biodatos: **la-001a-Tz**: IC50 de FGF-1 $[\mu M]$ = 6,2; IC50 de FGF-2 $[\mu M]$ = 20; IC50 de VEGF-A1 $[\mu M]$ = 17; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR $[\mu M]$ = 0,23; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 54,33; IC50 de inhibición de PMN ROS $[\mu M]$ = 1,54; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 69,75; Sangre entera: IC50 de GM-CSF $[\mu M]$ = >100; IC50 de IFN γ $[\mu M]$ = >100; IC50 de IL-1 β $[\mu M]$ = >100; IC50 de IL-2 $[\mu M]$ = 7,99; IC50 de IL-4 $[\mu M]$ = >100; IC50 de IL-5 $[\mu M]$ = >100; IC50 de IL-6 $[\mu M]$ = 0,75; IC50 de IL-9 $[\mu M]$ = 8,63; IC50 de IL-10 $[\mu M]$ = 26,1; IC50 de IL-12p70 $[\mu M]$ = 32,4; IC50 de IL-13 $[\mu M]$ = 32,1; IC50 de IL-17A $[\mu M]$ = 0,11; IC50 de IL-17F $[\mu M]$ = 46,5; IC50 de IL-18 $[\mu M]$ = >100; IC50 de IL-21 $[\mu M]$ = >100; IC50 de IL-33 $[\mu M]$ = 23,6; IC50 de TGF β $[\mu M]$ = >100; IC50 de TNF α $[\mu M]$ = 0,63; IC50 de TNF β $[\mu M]$ = 53

Éster de etilo:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t_R = 1,08 mins, m/z = 370,1 $[M+H]^+$, área del pico > 97 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,48 (s, 1H), 9,88 (s, 1H), 8,46 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,89 (dd, J = 7,8, 1,6 Hz, 1H), 7,62 (ddd, J = 8,6, 7,4, 1,6 Hz, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,42 - 7,34 (m, 2H), 4,37 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 1,34 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculada para $C_{17}H_{16}N_5O_5$: 370,11460, encontrada: 370,11458

Biodatos: **la-001a-Tz-EI**: IC50 de FGF-1 $[\mu M]$ = 200; IC50 de FGF-2 $[\mu M]$ = 200; IC50 de VEGF-A1 $[\mu M]$ = 200; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR $[\mu M]$ = 3,8; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 75,97; IC50 de inhibición de PMN ROS $[\mu M]$ = N.D.; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 98,88

Diacetato de éster etílico:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t_R = 1,57 mins, m/z = 454,1 $[M+H]^+$, área del pico > 97 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,23 (s, 1H), 8,23 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,96 (dd, J = 7,9, 1,7 Hz, 1H), 7,84 (s, 1H), 7,73 (s, 1H), 7,64 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 7,43 (td, J = 7,6, 1,2 Hz, 1H), 4,32 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 2,34 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 1,32 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculada para $C_{21}H_{20}N_5O_7$: 454,13572, encontrada: 454,13542

Biodatos: **la-001a-Tz-E1-A2**: IC50 de FGF-1 $[\mu M]$ = 60; IC50 de FGF-2 $[\mu M]$ = 200; IC50 de VEGF-A1 $[\mu M]$ = 200; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR $[\mu M]$ = ND; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 49,85; IC50 de inhibición de PMN ROS $[\mu M]$ = N.D.; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 98,2

3) Ácido 2,5-dihidroxi-4-(2-sulfofenilaminocarbonil)benzoico, compuesto la-001c:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t_R = 0,73 min; m/z = 352,0 $[M-H]^-$, área del pico > 99 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,54 (s, 1H), 10,99 (s, 1H), 8,34 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,74 (dd, J = 7,7, 1,7 Hz, 1H), 7,42 - 7,28 (m, 3H), 7,12 (td, J = 7,5, 1,2 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculada para $C_{14}H_{12}NO_8S$: 354,02781, encontrada: 354,02754.

Biodatos: **la-001c**: IC50 de FGF-1 $[\mu M]$ = 21; IC50 de FGF-2 $[\mu M]$ = 13; IC50 de VEGF-A1 $[\mu M]$ = 100; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR $[\mu M]$ = 3,31; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 40,36; IC50 de inhibición de PMN ROS $[\mu M]$ = 2,4; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 31,33; Sangre entera: IC50 de GM-CSF $[\mu M]$ = >100; IC50 de IFN γ $[\mu M]$ = 0,44; IC50 de IL-1 β $[\mu M]$ = >100; IC50 de IL-2 $[\mu M]$ = 12,8; IC50 de IL-4 $[\mu M]$ = >100; IC50 de IL-5 $[\mu M]$ = >100; IC50 de IL-6 $[\mu M]$ = 0,95; IC50 de IL-9 $[\mu M]$ = 46,9; IC50 de IL-10 $[\mu M]$ = 1,9; IC50 de IL-12p70 $[\mu M]$ = 0,44; IC50 de IL-13 $[\mu M]$ = 86,1; IC50 de IL-17A $[\mu M]$ = 0,09; IC50 de IL-17F $[\mu M]$ = 89,7; IC50 de IL-18 $[\mu M]$ = >100; IC50 de IL-21 $[\mu M]$ = >100; IC50 de IL-33 $[\mu M]$ = >100; IC50 de TGF β $[\mu M]$ = >100; IC50 de TNF α $[\mu M]$ = 0,05; IC50 de TNF β $[\mu M]$ = 29,7

4) Ácido 4-(3-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto la-002a:

^1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6) δ ~13 (v br, 1H), 10,82 (br s, 1H), 10,60 (br s, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,92 (d, 1H), 7,71 (d, 1H), 7,49 (t, 1H), 7,39 (s, 2H)

Biodatos: **la-002a**: IC50 de FGF-1 $[\mu M]$ = 20; IC50 de FGF-2 $[\mu M]$ = 59; IC50 de VEGF-A1 $[\mu M]$ = 71; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR $[\mu M]$ = 5,7; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 42,1; IC50 de inhibición de PMN ROS $[\mu M]$ = 0,312; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 27,92

5) Ácido 4-(3-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto la-002aTz:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): $t_a = 1,13$ min; $m/z = 342,0$ [M+H]⁺, área del pico > 99 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,81 (s, 1H), 10,67 (s, 1H), 8,54 (s, 1H), 7,91 - 7,84 (m, 1H), 7,79 (dt, J = 7,8, 1,4 Hz, 1H), 7,60 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 7,41 (d, J = 2,2 Hz, 2H).

HRMS: [M+H]⁺, calculada para C₁₅H₁₂N₅O₅: 342,08329, encontrada: 342,08317

Biodatos: **la-002a-Tz**: IC50 de FGF-1 [μM] = 10; IC50 de FGF-2 [μM] = 53; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 57; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 66,61; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = 1,86; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 38,5

6) **Ácido 2,5-dihidroxi-4-(3-sulfofenilaminocarbonil)benzoico**, compuesto **la-002c**:

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,04 (s, 1H), 10,53 (s, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,69 (d, 1H), 7,43 (s, 2H) y 7,40-7,28 (m, 2H)

Biodatos: **la-002c**: IC50 de FGF-1 [μM] = 14; IC50 de FGF-2 [μM] = 150; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 150; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 38,9; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = 0,405; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 1,87

7) **Ácido 4-(4-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico**, compuesto **la-003a**:

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,8 (br, 1H), 10,73 (s, 1H), 10,68 (s, 1H), 7,94 (d de AB, 2H), 7,84 (d de AB, 2H), 7,39 (s, 1H), 7,34 (s, 1H)

HRMS (AX033)

Biodatos: **la-003a**: IC50 de FGF-1 [μM] = 12; IC50 de FGF-2 [μM] = 34; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 150; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = ND; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 44,4; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = 0,414; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 39,1

8) **Ácido 4-(4-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico**, compuesto **la-003aTz**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): $t_a = 0,79$ min; $m/z = 342,0$ [M+H]⁺, área del pico > 97 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,77 (s, 1H), 10,70 (s, 1H), 8,04 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,96 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,41 (s, 1H), 7,37 (s, 1H).

HRMS: [M+H]⁺, calculada para C₁₅H₁₂N₅O₅: 342,08329, encontrada: 342,08326

Biodatos: **la-003a-Tz**: IC50 de FGF-1 [μM] = 6,7; IC50 de FGF-2 [μM] = 45; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 13; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 6,4; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 62,21; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = 2,49; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 30,33; Sangre entera: IC50 de GM-CSF [μM] = >100; IC50 de IFNγ [μM] = 2,95; IC50 de IL-1β [μM] = >100; IC50 de IL-2 [μM] = 43; IC50 de IL-4 [μM] = >100; IC50 de IL-5 [μM] = >100; IC50 de IL-6 [μM] = 1,41; IC50 de IL-9 [μM] = 3,62; IC50 de IL-10 [μM] = 6,94; IC50 de IL-12p70 [μM] = 1,26; IC50 de IL-13 [μM] = 89,6; IC50 de IL-17A [μM] = 0,07; IC50 de IL-17F [μM] = 83,9; IC50 de IL-18 [μM] = >100; IC50 de IL-21 [μM] = 1,49; IC50 de IL-33 [μM] = 72,2; IC50 de TGFβ [μM] = >100; IC50 de TNF α [μM] = 0,18; IC50 de TNF β [μM] = 55.

9) **Ácido 2,5-dihidroxi-4-(4-sulfofenilaminocarbonil)benzoico**, compuesto **la-003c**:

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,90 (s, 1H), 10,51 (s, 1H), 7,66 (d de AB, 2H), 7,58 (d de AB, 2H), 7,40 (s, 1H), 7,39 (s, 1H)

Biodatos: **la-003c**: IC50 de FGF-1 [μM] = 35; IC50 de FGF-2 [μM] = 150; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 150; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 0,4; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = N.D.; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = -; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = N.D.

10) **Ácido 4-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico**, compuesto **la-004a**:

UPLC-MS (método ácido, 6,5 min): $t_a = 1,40$ min; $m/z = 332,0$ [M-H]⁻, área del pico > 96 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,94 (s, 1H), 10,37 (s, 1H), 8,20 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 7,74 (dd, J = 8,9, 2,8 Hz, 1H), 7,39 (s, 1H), 7,34 (s, 1H), 6,93 (d, J = 8,9 Hz, 1H).

HRMS: [M+H]⁺, calculada para C₁₅H₁₂NO₈: 334,05574, encontrada: 334,05572

Biodatos: **la-004a**: IC50 de FGF-1 [μM] = 32; IC50 de FGF-2 [μM] = 15; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 28; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 7,7; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 64,61; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = 0; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 28,38

5 Éster etilmetílico:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t_a = 1,16 mins, m/z = 376,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, área del pico > 95 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,90 (s, 1H), 10,50 (s, 1H), 10,36 (s, 1H), 9,91 (s, 1H), 8,26 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 7,76 (dd, J = 8,9, 2,8 Hz, 1H), 7,43 (s, 1H), 7,36 (s, 1H), 7,01 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 4,37 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,91 (s, 3H), 1,34 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{NO}_8$: 376,10269, encontrada: 376,10259

15 Biodatos: **la-004a-E2**: IC50 de FGF-1 [μM] = 35; IC50 de FGF-2 [μM] = 36; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 200; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 6,1; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 85,34; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = N.D.; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 97,65

20 11) Ácido 4-(2-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto la-006a:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t_a = 0,81 min; m/z = 334,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, área del pico > 96 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,33 (s, 1H), 11,86 (s, 1H), 10,90 (s, 1H), 9,66 (s, 1H), 8,39 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 7,40 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 7,03 (dd, J = 9,0, 3,0 Hz, 1H).

25 HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{NO}_8$: 334,05574, encontrada: 334,05562.

30 Biodatos: **la-006a**: IC50 de FGF-1 [μM] = 89; IC50 de FGF-2 [μM] = 224; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 100; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 11,8; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 60,56; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = 1,2; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 25,33

35 12) Ácido 3-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico, compuesto la-011a:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t_a = 0,69 min; m/z = 360,1 $[\text{M}-\text{H}]^-$, área del pico > 89 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,46 (s, 2H), 11,37 (s, 1H), 10,97 (s, 1H), 8,33 (dd, J = 8,2, 1,3 Hz, 1H), 7,63 (dd, J = 7,7, 1,3 Hz, 1H), 7,57 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 7,52 (s, 1H), 7,44 (s, 1H).

40 HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{NO}_9$: 362,05065, encontrada: 362,05036

Biodatos: **la-011a**: IC50 de FGF-1 [μM] = 35; IC50 de FGF-2 [μM] = 110; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 200; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 57,71; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = N.D.; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 42,32

45 13) Ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)tereftálico, compuesto la-012a:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t_a = 1,12 min; m/z = 362,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, área del pico > 96 %

50 ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,41 (brs, 2H), 12,29 (s, 1H), 10,94 (s, 1H), 9,26 (d, J = 1,7 Hz, 1H), 8,09 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,73 (dd, J = 8,2, 1,7 Hz, 1H), 7,42 (s, 2H).

HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{NO}_9$: 362,05065, encontrada: 362,05046.

55 Biodatos: **la-012a**: IC50 de FGF-1 [μM] = 38; IC50 de FGF-2 [μM] = 36; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 30; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 59,52; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = 1,85; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 28,5

60 14) Ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico, compuesto la-013a:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t_a = 0,91 min; m/z = 362,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, área del pico > 98 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,11 (s, 2H), 11,70 (s, 1H), 11,13 (s, 1H), 7,97 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,47 (s, 1H), 7,41 (s, 1H), 7,38 (t, J = 7,7 Hz, 1H)

65 HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{NO}_9$: 362,05065, encontrada: 362,05041

Biodatos: **la-013a**: IC50 de FGF-1 [μM] = 29; IC50 de FGF-2 [μM] = 18; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 17; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%]] = 38,52; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = 2,38; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 27,67

15) **Ácido 4-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico**, compuesto **la-014a**:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t_a = 0,98 min; m/z = 362,1 [M+H]⁺, área del pico > 94 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,76 (s, 1H), 10,70 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,94 - 7,84 (m, 2H), 7,38 (s, 1H), 7,30 (s, 1H).

HRMS: [M+H]⁺, calculada para C₁₆H₁₂NO₉: 362,05065, encontrada: 362,05047

Biodatos: **la-014a**: IC50 de FGF-1 [μM] = 20; IC50 de FGF-2 [μM] = 20; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 88; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%]] = 61,3; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = 1; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 9,667

16) **Ácido 5-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico**, compuesto **la-015a**:

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,74 (s, 1H), 8,56 (estrecho d, 2H), 8,22 (estrecho, 1H), 7,41 (s, 1H) y 7,37 (s, 1H)

Biodatos: **la-015a**: IC50 de FGF-1 [μM] = 20; IC50 de FGF-2 [μM] = 9,3; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 19; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 0,15; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%]] = 43,8; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = 0,387; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 17,38; Sangre entera: IC50 de GM-CSF [μM] = 2,76; IC50 de IFN γ [μM] = >100; IC50 de IL-1 β [μM] = >100; IC50 de IL-2 [μM] = 7,08; IC50 de IL-4 [μM] = >100; IC50 de IL-5 [μM] = >100; IC50 de IL-6 [μM] = 0,77; IC50 de IL-9 [μM] = 1,47; IC50 de IL-10 [μM] = 5,27; IC50 de IL-12p70 [μM] = 0,12; IC50 de IL-13 [μM] = 0,15; IC50 de IL-17A [μM] = 0,05; IC50 de IL-17F [μM] = 0,15; IC50 de IL-18 [μM] = >100; IC50 de IL-21 [μM] = 57,2; IC50 de IL-33 [μM] = 0,24; IC50 de TGF β [μM] = >100; IC50 de TNF α [μM] = 0,17; IC50 de TNF β [μM] = 0,3.

17) **Ácido 3-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico**, compuesto **la-023a**:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t_a = 0,63 min; m/z = 319,1 [M+H]⁺, área del pico > 93 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,17 (s, 1H), 11,03 (s, 1H), 9,78 (s, 1H), 8,46 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 7,82 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,43 (s, 1H).

HRMS: [M+H]⁺, calculada para C₁₄H₁₁N₂O₇: 319,05608, encontrada: 319,05610

Biodatos: **la-023a**: IC50 de FGF-1 [μM] = N.D.; IC50 de FGF-2 [μM] = 63; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 143; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%]] = 61,95; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = 0; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 13,37

Éster de dietilo:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t_a = 1,87 mins, m/z = 375,1 [M+H]⁺, área del pico > 98 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,79 (s, 1H), 11,23 (s, 1H), 9,87 (s, 1H), 9,68 (s, 1H), 8,50 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 7,81 (dd, J = 5,1, 0,7 Hz, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,41 (s, 1H), 4,46 - 4,27 (m, 4H), 1,41 - 1,25 (m, 6H).

HRMS: [M+H]⁺, calculada para C₁₈H₁₉N₂O₇: 375,11867, encontrada: 375,11867

Biodatos: **la-023a-E2**: IC50 de FGF-1 [μM] = N.D.; IC50 de FGF-2 [μM] = 76; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 141; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 6,6; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%]] = 69,47; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = 0; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 34

18) **Ácido 4-(4-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico**, compuesto **la-032a**:

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12,28 (br, 1H), 10,92 (s, 1H), 10,44 (s, 1H), 7,65 (br d, 2H), 7,41 (s, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,25 (br d, 2H), 3,55 (s, 2H).

Biodatos: **la-032a**: IC50 de FGF-1 [μM] = N.D.; IC50 de FGF-2 [μM] = 91; IC50 de VEGF-A1 [μM] = N.D.; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%]] = N.D.; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = -; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = N.D.

19) **Ácido 4-(3-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico**, compuesto **la-033a**:

UPLC-MS (método ácido, 6,5 min): t_a = 1,71 min; m/z = 332,1 [M+H]⁺, área del pico > 99 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,89 (s, 1H), 10,46 (s, 1H), 7,65 (s, 1H), 7,59 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,03 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 3,57 (s, 2H).

5 HRMS: [M+H]⁺, calculada para C₁₆H₁₄NO₇: 332,07647, encontrada: 332,07644

Biodatos: **la-033a**: IC50 de FGF-1 [μM] = 60; IC50 de FGF-2 [μM] = 165; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 281; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 57,73; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = 1,32; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 38

10 20) **Ácido 4-(2-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico**, compuesto **la-034a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): *t*_a = 0,82 min; *m/z* = 332,1 [M+H]⁺, área del pico > 98 %

15 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,78 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,31 (d, *J* = 3,0 Hz, 2H), 7,28 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,15 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 3,63 (s, 2H).

HRMS: [M+H]⁺, calculada para C₁₆H₁₄NO₇: 332,07648, encontrada: 332,07641

20 Biodatos: **la-034a**: IC50 de FGF-1 [μM] = 79; IC50 de FGF-2 [μM] = 14; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 102; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 100; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 49,07; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = 2,28; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 15

25 21) **Ácido 4-(3,4-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico**, compuesto **la-035a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): *t*_a = 1,02 min; *m/z* = 320,1 [M+H]⁺, área del pico > 91 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,56 (s, 1H), 9,21 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H), 8,91 (s, 1H), 8,79 (s, 1H), 7,46 (s, 1H), 7,28 (s, 1H), 6,72 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 6,67 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,57 (dd, *J* = 8,0, 2,1 Hz, 1H), 4,32 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H).

30 HRMS: [M+H]⁺, calculada para C₁₅H₁₄NO₇: 320,07648, encontrada: 320,07650

Biodatos: **la-035a**: IC50 de FGF-1 [μM] = 20; IC50 de FGF-2 [μM] = 71; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 200; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 36; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 75,13; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = 0,41; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 27

35 22) **Ácido 4-(2-(3,4-dihidroxifenil)etilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico**, compuesto **la-035a-2**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): *t*_a = 0,77 min; *m/z* = 332,0 [M-H]⁻, área del pico > 99 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,50 (s, 1H), 8,85 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H), 8,76 (s, 1H), 8,66 (s, 1H), 7,41 (s, 1H), 7,28 (s, 1H), 6,67 - 6,60 (m, 2H), 6,48 (dd, *J* = 8,0, 2,1 Hz, 1H), 3,44 (q, *J* = 6,8 Hz, 2H), 2,67 (dd, *J* = 8,6, 6,0 Hz, 2H). δ 11,56 (s, 1H), 9,21 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H), 8,91 (s, 1H), 8,79 (s, 1H), 7,46 (s, 1H), 7,28 (s, 1H), 6,72 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 6,67 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,57 (dd, *J* = 8,0, 2,1 Hz, 1H), 4,32 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H).

45 HRMS: [M+H]⁺, calculada para C₁₆H₁₆NO₇: 334,09213, encontrada: 334,09242

Biodatos: **la-035a-2**: IC50 de FGF-1 [μM] = 10; IC50 de FGF-2 [μM] = 65; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 109; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 10; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 58,81; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = 1,1; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 21,5

50 23) **Ácido 4-(1-carboxi-2-(3,4-dihidroxifenil)etilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico**, compuesto **la-035a-3**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): *t*_a = 0,70 min; *m/z* = 376,0 [M-H]⁻, área del pico > 99 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,90 (s, 1H), 11,11 (s, 1H), 8,98 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 8,73 (d, *J* = 13,1 Hz, 2H), 7,45 (s, 1H), 7,31 (s, 1H), 6,61 (dd, *J* = 5,1, 2,9 Hz, 2H), 6,47 (dd, *J* = 8,1, 2,1 Hz, 1H), 3,01 (dd, *J* = 13,9, 4,9 Hz, 1H), 2,96 - 2,84 (m, 1H).

HRMS: [M+H]⁺, calculada para C₁₇H₁₆NO₉: 378,08196, encontrada: 378,08195

Biodatos: **la-035a-3**: IC50 de FGF-1 [μM] = 34; IC50 de FGF-2 [μM] = 207; IC50 de VEGF-A1 [μM] = 198; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 10; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 79,62; IC50 de inhibición de PMN ROS [μM] = 0,66; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 22

65 24) **Ácido 4-(carboxi(3,4-dihidroxifenil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico**, compuesto **la-036a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): $t_a = 0,62$ min; $m/z = 362,1$ $[M-H]^-$, área del pico > 92 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,00 (s, 1H), 9,32 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H), 9,05 (s, 1H), 8,97 (s, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,34 (s, 1H), 6,81 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 6,75 - 6,64 (m, 2H), 5,29 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculada para $C_{16}H_{14}NO_9$: 364,06630, encontrada: 364,06615

Biodatos: **la-036a**: FGF-1 IC50 $[\mu M] = N.D.$; IC50 de FGF-2 $[\mu M] = 37$; IC50 de VEGF-A1 $[\mu M] = 123$; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR $[\mu M] = 1,6$; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM %] = 87,17; IC50 de inhibición de PMN ROS $[\mu M] = N.D.$; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 30,77

25) **Ácido 4-(2-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico**, compuesto **la-053a**:

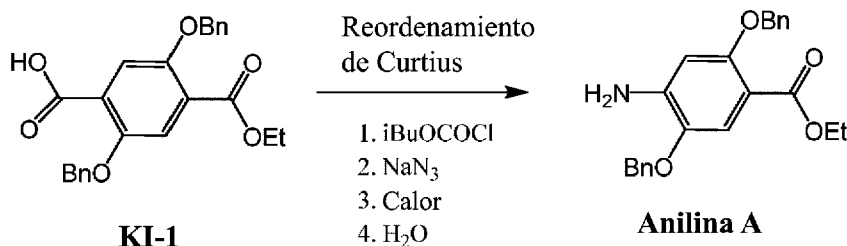
UPLC-MS (método ácido, 4 min): $t_a = 1,08$ min; $m/z = 332,0$ $[M+H]^+$, área del pico > 97 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,09 (s, 1H), 11,19 (s, 1H), 9,34 - 9,27 (m, 1H), 7,91 (dd, $J = 7,8, 1,4$ Hz, 1H), 7,55 (dd, $J = 7,5, 1,5$ Hz, 1H), 7,46 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,39 (td, $J = 7,5, 1,4$ Hz, 1H), 7,32 (s, 1H), 4,82 (d, $J = 5,9$ Hz, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculada para $C_{16}H_{14}NO_7$: 332,07648, encontrada: 332,07622

Biodatos: **la-053a**: IC50 de FGF-1 $[\mu M] = 150$; IC50 de FGF-2 $[\mu M] = 124$; IC50 de VEGF-A1 $[\mu M] = 210$; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR $[\mu M] = 100$; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM %] = 52,92; IC50 de inhibición de PMN ROS $[\mu M] = 2,5$; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 18,67

Esquema 4b. Síntesis de 4-amino-2,5-dibenciloxibenzoato de etilo (anilina A)



Protocolo: síntesis de anilina A

4-amino-2,5-dibenciloxibenzoato de etilo (anilina A). A una solución enfriada (baño de hielo) de **ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoico (KI-1)** (2,0 g, 4,9 mmol) y Et_3N (1,6 ml, 11,3 mmol) en THF (25 ml) en atmósfera inerte (N_2), se añadió lentamente DPPA (1,1 ml, 5,2 mmol). La mezcla se calentó lentamente hasta temperatura ambiente y se agitó a esta temperatura durante 3 horas. Después, se añadió agua (8 ml) y la mezcla de reacción se calentó hasta 70 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se vertió en una solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio (250 ml) y se agitó durante 5 minutos antes de extraerla con EtOAc (3 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron a presión reducida para dar un aceite incoloro. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (isohexano/EtOAc 1:0 y luego en gradiente hasta EtOAc al 30 %) para producir el compuesto del título, **Anilina A** (1,0 g, 53 %) en forma de un sólido blanquecino.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): $t_a = 1,26$ min; $m/z = 378,2$ $[M-H]^+$, área del pico 94 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,54 - 7,46 (m, 4H), 7,44 - 7,36 (m, 4H), 7,35 - 7,25 (m, 3H), 6,46 (s, 1H), 5,65 (s, NH_2), 5,06 (s, 2H), 5,02 (s, 2H), 4,16 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,22 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

26) **Ácido 4-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico**, compuesto **la-056a**:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): $t_a = 0,90$ min; $m/z = 348,0$ $[M-H]^-$, área del pico 97 %

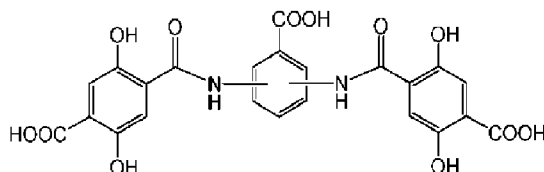
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,28 (brs, 1H), 11,26 (s, 1H), 9,97 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,48 (s, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,26 (s, 1H).

Éster de dietilo:

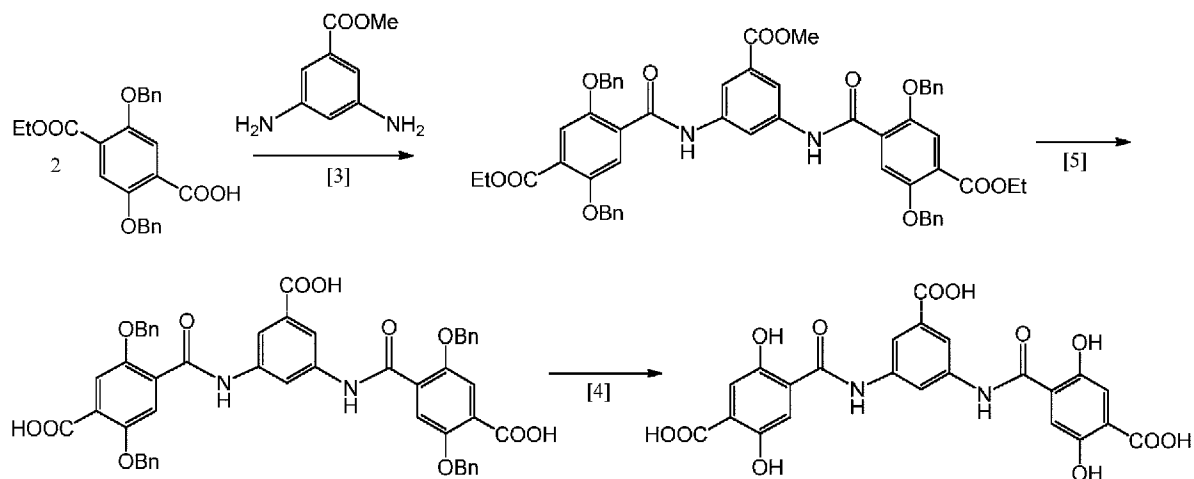
UPLC-MS (método ácido, 4 min): $t_a = 1,86$ min; $m/z = 404,2$ $[M-H]^-$, área del pico 92 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,48 (brs, 1H), 11,32 (brs, 1H), 10,28 (s, 1H), 10,07 (brs, 1H), 9,88 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,39 (s, 1H), 7,28 (s, 1H), 4,46 - 4,27 (m, 4H), 1,46 - 1,12 (m, 6H).

Ejemplo 1,2 - Moléculas de tipo Ib: Diamidas a partir de diaminas, 1 ejemplo

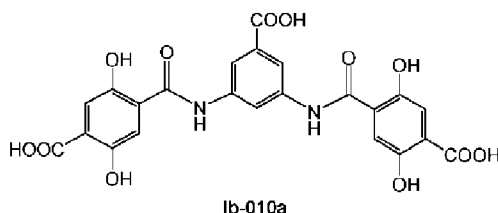


Esquema 5. Síntesis de diamidas de tipo Ib



Procedimientos sintéticos: véanse los procedimientos generales, pasos [3], [4], [5]

Ejemplo:



Para condiciones y rendimientos: Véanse las figuras 4A-D

27) **Ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-4-carboxibenzoilamino)benzoico**, compuesto **Ib-010a**:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): $t_R = 0,98$ min; $m/z = 511,0$ $[M-H]^-$, área del pico > 93 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,81 (s, 2H), 10,65 (s, 2H), 8,38 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 8,12 (d, $J = 2,0$ Hz, 2H), 7,39 (d, $J = 2,3$ Hz, 4H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculada para $C_{23}H_{17}N_2O_{12}$: 513,07760, encontrada: 513,07736,

Biodatos: **Ib-010a**: IC₅₀ de FGF-1 [μ M] = 14; IC₅₀ de FGF-2 [μ M] = 3,8; IC₅₀ de VEGF-A1 [μ M] = 15; IC₅₀ de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μ M] = 1,6; PMN ROS [inhibición a 0,3 μ M] [%] = 71,84; IC₅₀ de inhibición de PMN ROS [μ M] = 1,06; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 1,5; Sangre entera: IC₅₀ de GM-CSF [μ M] = >100; IC₅₀ de IFN γ [μ M] = 2,22; IC₅₀ de IL-1 β [μ M] = 33,3; IC₅₀ de IL-2 [μ M] = 2,74; IC₅₀ de IL-4 [μ M] = >100; IC₅₀ de IL-5 [μ M] = >100; IC₅₀ de IL-6 [μ M] = 1,02; IC₅₀ de IL-9 [μ M] = 11,58; IC₅₀ de IL-10 [μ M] = >100; IC₅₀ de IL-12p70 [μ M] = 0,27; IC₅₀ de IL-13 [μ M] = >100; IC₅₀ de IL-17A [μ M] = 0,42; IC₅₀ de IL-17F [μ M] = >100; IC₅₀ de IL-18 [μ M] = >100; IC₅₀ de IL-21 [μ M] = 67,8; IC₅₀ de IL-33 [μ M] = 31,3; IC₅₀ de TGF β [μ M] = >100; IC₅₀ de TNF α [μ M] = 0,31; IC₅₀ de TNF β [μ M] = 49,3

Éster de trietilo:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): $t_R = 1,29$ mins, $m/z = 597,1$ $[M+H]^+$, área del pico > 96 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,80 (s, 2H), 10,68 (s, 2H), 9,95 (s, 2H), 8,40 (t, *J* = 2,0 Hz, 1H), 8,15 (d, *J* = 2,0 Hz, 2H), 7,42 (s, 2H), 7,39 (s, 2H), 4,42 - 4,33 (m, 6H), 1,38 - 1,33 (m, 9H). HRMS: [M+H]⁺, calculada para C₂₉H₂₉N₂O₁₂: 597,17150, encontrada: 597,17131

Biodatos: **Ib-010a-E3**: IC₅₀ de FGF-1 [μM] = 26; IC₅₀ de FGF-2 [μM] = 226; IC₅₀ de VEGF-A1 [μM] = 200; IC₅₀ de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 0,09; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 36,41; IC₅₀ de inhibición de PMN ROS [μM] = 6,52; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 79,5; Sangre entera: IC₅₀ de GM-CSF [μM] = >100; IC₅₀ fino [μM] = 2,79; IC₅₀ de IL-1β [μM] = >100; IC₅₀ de IL-2 [μM] = 36,2; IC₅₀ de IL-4 [μM] = >100; IC₅₀ de IL-5 [μM] = >100; IC₅₀ de IL-6 [μM] = 0,24; IC₅₀ de IL-9 [μM] = 26,8; IC₅₀ de IL-10 [μM] = >100; IC₅₀ de IL-12p70 [μM] = 0,84; IC₅₀ de IL-13 [μM] = 33; IC₅₀ de IL-17A [μM] = 0,52; IC₅₀ de IL-17F [μM] = 34,2; IC₅₀ de IL-18 [μM] = >100; IC₅₀ de IL-21 [μM] = >100; IC₅₀ de IL-33 [μM] = 20; IC₅₀ de TGFβ [μM] = >100; IC₅₀ de TNF α [μM] = 0,98; IC₅₀ de TNF β [μM] = 38,2.

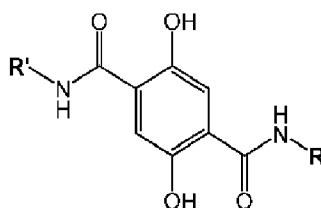
Tetraacetato de éster trietilico:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): ta = 1,19 mins, *m/z* = 782,1 [M+NH₄]⁺, área del pico 91 %

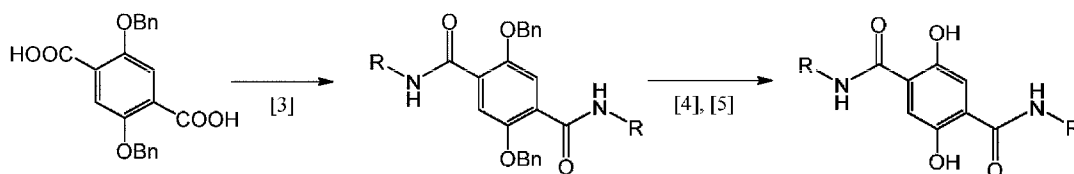
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,84 (s, 2H), 8,40 (m, 1H), 8,08 (d, *J* = 2,0 Hz, 2H), 7,80 (s, 2H), 7,63 (s, 2H), 4,45 - 4,22 (m, 6H), 2,32 (s, 6H), 2,23 (s, 6H), 1,38 - 1,27 (m, 9H).

Biodatos: **Ib-010a-E3-A4**: IC₅₀ de FGF-1 [μM] = 200; IC₅₀ de FGF-2 [μM] = 200; IC₅₀ de VEGF-A1 [μM] = 200; IC₅₀ de inhibición de la fosforilación de VEGFR [μM] = 0,54; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM [%] = 54,86; IC₅₀ de inhibición de PMN ROS [μM] = 1,49; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 96

Ejemplo 1.3. - Moléculas de tipo Ic: Diamidas a partir de diácidos, 4 ejemplos

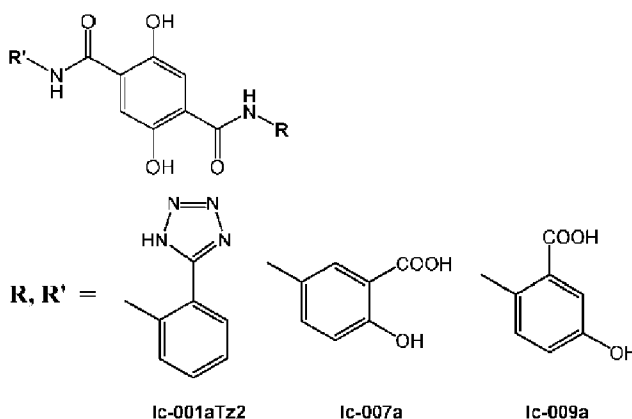


Esquema 6. Síntesis de amidas de tipo Ic con R = R'



Procedimientos: véase los procedimientos generales de **KI-6** [3], [4], [5]

Ejemplos:



Para condiciones y rendimientos: Véanse las figuras 4A-D

28) **N₁,N₄-Bis(2-(1H-tetrazol-5-il)fenil)-2,5-dihidroxitereftalamida**, compuesto Ic-001aTz2:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): $t_R = 0,97$ min; $m/z = 485,1$ $[M+H]^+$, área del pico > 97 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,53 (s, 1H), 10,98 (s, 1H), 8,49 (dd, $J = 8,4, 1,2$ Hz, 1H), 7,90 (dd, $J = 7,8, 1,6$ Hz, 1H), 7,62 (ddd, $J = 8,7, 7,4, 1,6$ Hz, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,37 (td, $J = 7,6, 1,2$ Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculada para $C_{22}H_{17}N_{10}O_4$: 485,14287, encontrada: 485,17274

Biodatos: **Ic-001aTz2**: IC50 de FGF-1 $[\mu M] = 200$; IC50 de FGF-2 $[\mu M] = 70$; IC50 de VEGF-A1 $[\mu M] = 45$; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR $[\mu M] = 2,2$; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM %] = 60,64; IC50 de inhibición de PMN ROS $[\mu M] = N.D.$; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 97,15; Sangre entera: IC50 de GM-CSF $[\mu M] = >100$; IC50 de IFN γ $[\mu M] = 1,38$; IC50 de IL-1 β $[\mu M] = >100$; IC50 de IL-2 $[\mu M] = 9,45$; IC50 de IL-4 $[\mu M] = >100$; IC50 de IL-5 $[\mu M] = >100$; IC50 de IL-6 $[\mu M] = 0,52$; IC50 de IL-9 $[\mu M] = 9,13$; IC50 de IL-10 $[\mu M] = >100$; IC50 de IL-12p70 $[\mu M] = 29,1$; IC50 de IL-13 $[\mu M] = 0,12$; IC50 de IL-17A $[\mu M] = 0,31$; IC50 de IL-17F $[\mu M] = 0,15$; IC50 de IL-18 $[\mu M] = 33,9$; IC50 de IL-21 $[\mu M] = 32$; IC50 de IL-33 $[\mu M] = 0,23$; IC50 de TGF β $[\mu M] = >100$; IC50 de TNF α $[\mu M] = 0,1$; IC50 de TNF β $[\mu M] = 0,41$.

29) **Ácido 5-(4-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico**, compuesto **Ic-007a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): $t_R = 0,80$ min; $m/z = 469,1$ $[M+H]^+$, área del pico > 91 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,08 (s, 2H), 7,65 (s, 2H), 7,59 (s, 2H), 7,30 - 6,89 (m, 5H), 6,79 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 172,1, 165,2, 158,3, 150,1, 130,2, 129,2 (CH), 122,8, 122,6 (CH), 117,7 (CH), 117,3 (CH), 113,3.

HRMS: $[M+H]^+$, calculada para $C_{22}H_{17}N_2O_{10}$: 469,08777, encontrada: 469,08739

Biodatos: **Ic-007a**: IC50 de FGF-1 $[\mu M] = 13$; IC50 de FGF-2 $[\mu M] = 5,4$; IC50 de VEGF-A1 $[\mu M] = 3,2$; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR $[\mu M] = 0,09$; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM %] = 57,99; IC50 de inhibición de PMN ROS $[\mu M] = 2,7$; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 57,5; Sangre entera: IC50 de GM-CSF $[\mu M] = >100$; IC50 de IFN γ $[\mu M] = 1,44$; IC50 de IL-1 β $[\mu M] = >100$; IC50 de IL-2 $[\mu M] = >100$; IC50 de IL-4 $[\mu M] = >100$; IC50 de IL-5 $[\mu M] = >100$; IC50 de IL-6 $[\mu M] = 0,09$; IC50 de IL-9 $[\mu M] = 27,1$; IC50 de IL-10 $[\mu M] = 12,5$; IC50 de IL-12p70 $[\mu M] = 0,49$; IC50 de IL-13 $[\mu M] = 30,1$; IC50 de IL-17A $[\mu M] = 0,04$; IC50 de IL-17F $[\mu M] = 22,9$; IC50 de IL-18 $[\mu M] = >100$; IC50 de IL-21 $[\mu M] = 1,9$; IC50 de IL-33 $[\mu M] = 18,4$; IC50 de TGF β $[\mu M] = >100$; IC50 de TNF α $[\mu M] = 0,27$; IC50 de TNF β $[\mu M] = 6,52$

Éster de dimetilo:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): $t_R = 1,13$ mins, $m/z = 497,0$ $[M+H]^+$, área del pico > 95 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,08 (s, 2H), 10,48 (s, 2H), 10,38 (s, 2H), 8,27 (d, $J = 2,8$ Hz, 2H), 7,89 - 7,74 (m, 2H), 7,56 (s, 2H), 7,03 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 3,93 (s, 6H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculada para $C_{24}H_{21}N_2O_{10}$: 497,11907, encontrada: 497,11874.

Biodatos: **Ic-007a-E2**: IC50 de FGF-1 $[\mu M] = 23$; IC50 de FGF-2 $[\mu M] = 49$; IC50 de VEGF-A1 $[\mu M] = 200$; IC50 de inhibición de la fosforilación de VEGFR $[\mu M] = 0,25$; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM %] = 21,33; IC50 de inhibición de PMN ROS $[\mu M] = 7,9$; Inhibición de la adhesión de neutrófilos [%] = 2

Síntesis alternativa a gran escala de Ic-007a

a) **Éster de metilo del ácido 5-(4-(3-metoxycarbonil-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dibenciloxibenzamido)-2-hidroxibenzoico**

Un matraz con brida de 5 se cargó con ácido 2,5-bis(benciloxi)tereftálico (KI-6, 141,00 g, 0,373 mol), cloruro de benciltrietilamonio (850 mg, 3,73 mmol, 0,01 eq) y cloroformo (2,5 l). Luego se equipó con una entrada de nitrógeno, un termómetro, un embudo de goteo que igualaba la presión, una salida para una botella Dreschel vacía y un burbujeador de hidróxido de sodio. La solución agitada se calentó hasta 55 °C, y se añadió cloruro de tionilo (59 ml, 0,802 mol, 2,15 eq) gota a gota durante un período de 40 minutos. La solución se mantuvo a 55 °C durante 6 horas, después se dejó enfriar hasta temperatura ambiente durante una noche. Se sonicó una alícuota en etanol durante 5 minutos y, a continuación, se analizó mediante análisis LCMS, que mostró solo éster dietílico. La mezcla se transfirió a dos matraces de fondo redondo y los volátiles se eliminaron *al vacío*; el cloruro de ácido se azeotropó con tolueno (800 ml en cada matraz). Se cargó un recipiente con camisa de 10 litros con 5-amino-2-hidroxibenzoato de metilo (137,00 g, 0,819 mol, 2,2 eq) y diclorometano (2,5 l, 18 vol); la solución se enfrió hasta 15 °C. El cloruro de ácido se absorbió en diclorometano (2,5 l, 18 vol.) y se añadió a la reacción agitada. La reacción forma inmediatamente grandes cantidades de sólido y la agitación se hace difícil; también la reacción es exotérmica hasta

30 °C. Sin embargo, con una agitación prolongada, la mezcla se convierte en una suspensión fina de color rosa/púrpura. La mezcla se agitó a 25 °C durante 72 horas. La suspensión se filtró, se lavó con diclorometano (2 l, 14 vol) y el sólido resultante se secó en un horno de vacío para dar 240,00 g de producto (rendimiento del 94 %).

5 b) **Ácido 5-(4-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico, Ic-007a**

Saponificación: Se cargó un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 5 l con **éster metílico del ácido 5-(4-(3-metoxicarbonil-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dibenciloxibenzamido)-2-hidroxibenzoico** recién molido (150,00 g, 0,22 mol) e isopropanol (1,5 l, 10 vol). La mezcla se calentó hasta 50 °C y se añadieron hidróxido de tetrabutilamonio (444 ml, 0,67 mol, 3 eq) y agua (1,1 l, 7 vol). Después de 1 hora quedaron algunos sólidos, por lo que se añadieron 60 ml adicionales de solución de hidróxido de tetrabutilamonio junto con agua (120 ml), la mezcla se agitó a 50 °C durante 6 horas, luego se dejó enfriar hasta temperatura ambiente durante una noche. Se añadió hidróxido de tetrabutilamonio adicional (80 ml) y la mezcla se agitó además a 60 °C durante 1 hora hasta que no quedó ningún sólido. *Hidrogenólisis:* La reacción se desgasificó (3 ciclos con N₂), después se añadió el catalizador (30,00 g, Pd al 10 % sobre C) en forma de suspensión en agua (100 ml). La reacción se desgasificó además (3 ciclos con N₂, 2 con H₂) y se puso bajo H₂ (presión de globo) a 50 °C durante la noche. La reacción se recargó con hidrógeno y se mantuvo a 50 °C durante 4 horas adicionales, después de las cuales el análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se desgasificó (3 ciclos con N₂), se filtró a través de una almohadilla de celite y se lavó con agua caliente/isopropanol (1 l, 1:1, 60 °C). El volumen se redujo a ~ 1,2 l en vacío. La mezcla se transfirió a un matraz con brida de 5 l con agua (~ 3 l). El matraz se equipó con un agitador de varillas (tipo ancla grande) y se acidificó con ácido clorhídrico (35 %). Durante la adición se formó un precipitado pesado. La mezcla se calentó a 55 °C durante 6 horas, después se dejó enfriar hasta temperatura ambiente durante 72 horas. La mezcla se filtró y el sólido se suspendió en 1M HCl acuoso (3 l) y se calentó hasta 50 °C durante 3 horas, antes de dejar enfriar hasta temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se filtró, se lavó con 1M HCl acuoso (2 l), agua (1,5 l) y acetona (1 l). El sólido se secó en el horno de vacío para dar 100,00 g de producto aún contaminado con ~5 % en moles de sal de tetrabutilamonio (RMN). Este sólido se agitó en 1M ácido clorhídrico acuoso (3 l) a 70 °C durante 8 horas, después se dejó enfriar hasta temperatura ambiente durante una noche. El sólido se filtró, se lavó con agua y se secó en el horno de vacío. La cantidad de tetrabutilamonio se redujo a ~ 0,62 % en moles. (85,90 g, rendimiento del 82 %) (polvo marrón).

30) **Ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-2-carboxifenilaminocarbonil)benzamido)-5-hidroxibenzoico, compuesto Ic-009a:**

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,85 min; m/z = 469,0 [M+H]⁺, área del pico > 98 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,31 (s, 2H), 11,93 (s, 2H), 10,85 (s, 2H), 9,64 (s, 2H), 8,41 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,55 (s, 2H), 7,39 (d, J = 3,0 Hz, 2H), 7,03 (dd, J = 9,0, 3,0 Hz, 2H).

HRMS: calc. para C₂₂H₁₇N₂O₁₀: 469,08777, encontrado: 469,08755

Biodatos: **Ic-009a**: IC₅₀ [μM] de FGF-1 = 32; IC₅₀ [μM] FGF-2 = 202; IC₅₀ [μM] VEGF-A1 = 208; IC₅₀ [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = ND; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 72,85; IC₅₀ de inhibición de ROS de PMN [μM] = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 72,21

Éster dimetilico:

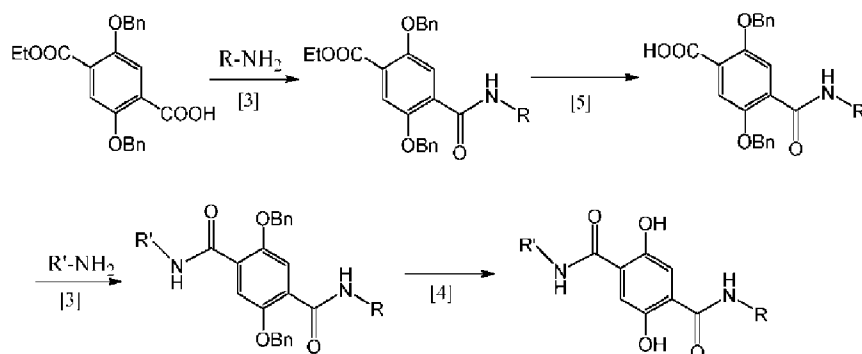
UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,03 minutos, m/z = 497,1 [M+H]⁺, área del pico > 92 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11,69 (s, 2H), 11,01 (s, 2H), 9,75 (s, 2H), 8,36 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,62 (s, 2H), 7,37 (d, J = 3,0 Hz, 2H), 7,07 (dd, J = 9,0, 3,0 Hz, 2H), 3,87 (s, 6H).

HRMS: calc. para C₂₄H₂₁N₂O₁₀: 497,11907, encontrado: 497,11913

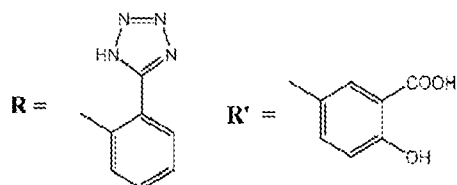
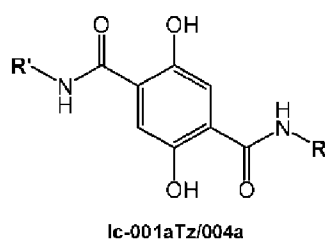
Biodatos: **Ic-009a-E2**: IC₅₀ [μM] de FGF-1 = 23; IC₅₀ [μM] de FGF-2 = 30; IC₅₀ [μM] de VEGF-A1 = 200; IC₅₀ [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 0,02; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 24,12; IC₅₀ [μM] de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 41,05

Esquema 7. Síntesis de amidas de tipo Ic con R ≠ R'



Procedimientos sintéticos: Ver el procedimiento general del **KI-1**.

Ejemplo:



Para condiciones y rendimientos: Ver las figuras 4A-D.

31) **ácido 5-(4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxi-benzamido)-2-hidroxi-benzoico, compuesto Ic-001aTz/004a:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 1,40 min; m/z = 477,2 $[M-H]^-$, área del pico > 99 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,92 (s, 1H), 10,42 (s, 1H), 8,47 (dd, J = 8,4, 1,2 Hz, 1H), 8,25 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 7,98 - 7,88 (m, 1H), 7,76 (dd, J = 8,9, 2,8 Hz, 1H), 7,63 - 7,56 (m, 2H), 7,51 (s, 1H), 7,37 (td, J = 7,6, 1,2 Hz, 1H), 6,97 (d, J = 8,9 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calc. para $C_{22}H_{17}N_6O_7$: 477,11532, encontrado: 477,11475

Biodatos: **Ic-001a-Tz/004a**: IC50 $[\mu M]$ de FGF-1 = 19; IC50 $[\mu M]$ de FGF-2 = 87; IC50 $[\mu M]$ de VEGF-A1 = 25; IC50 $[\mu M]$ de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 2,6; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM %] = 82,83; IC50 $[\mu M]$ de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 96,99; Sangre entera: IC50 $[\mu M]$ de GM-CSF = 3,4; IC50 $[\mu M]$ de IFN γ = 0,61; IC50 $[\mu M]$ de IL-1 β = >100; IC50 $[\mu M]$ de IL-2 = 4,91; IC50 $[\mu M]$ de IL-4 = >100; IC50 $[\mu M]$ de IL-5 = >100; IC50 $[\mu M]$ de IL-6 = 3,04; IC50 $[\mu M]$ de IL-9 = 8,48; IC50 $[\mu M]$ de IL-10 = 19,5; IC50 $[\mu M]$ de IL-12p70 = 12,2; IC50 $[\mu M]$ de IL-13 = 1,5; IC50 $[\mu M]$ de IL-17A = 0,02; IC50 $[\mu M]$ de IL-17F = 2,4; IC50 $[\mu M]$ de IL-18 = 46,6; IC50 $[\mu M]$ de IL-21 = 0,3; IC50 $[\mu M]$ de IL-33 = 1,67; IC50 $[\mu M]$ de TGF β = >100; IC50 $[\mu M]$ de TNF α = 0,002; IC50 $[\mu M]$ de TNF β = 3,02

Éster metílico:

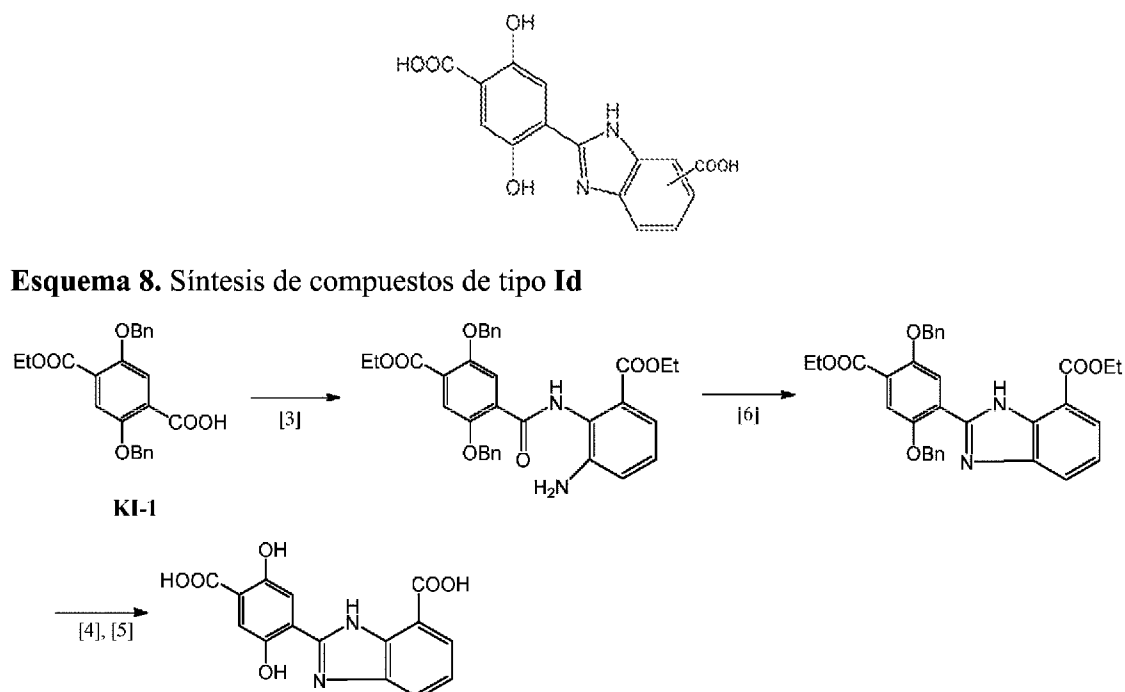
UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,06 minutos, m/z = 491,1 $[M+H]^+$, área del pico > 89 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,55 (s, 1H), 10,90 (s, 1H), 10,45 (s, 1H), 10,37 (s, 1H), 8,47 (dd, J = 8,4, 1,2 Hz, 1H), 8,30 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 7,91 (dd, J = 7,8, 1,6 Hz, 1H), 7,76 (dd, J = 8,9, 2,7 Hz, 1H), 7,63 (ddd, J = 8,7, 7,4, 1,6 Hz, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,38 (td, J = 7,6, 1,2 Hz, 1H), 7,02 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 3,93 (s, 4H).

HRMS: $[M+H]^+$, calc. para $C_{23}H_{19}N_6O_7$: 491,13097, encontrado: 491,13071

Biodatos: **lc-001a-Tz/004a-E1**: IC50 [μM] de FGF-1 = 104; IC50 [μM] de FGF-2 = 200; IC50 [μM] de VEGF-A1 = 35; IC50 [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 0,1; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 73,97; IC50 [μM] de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 97,56

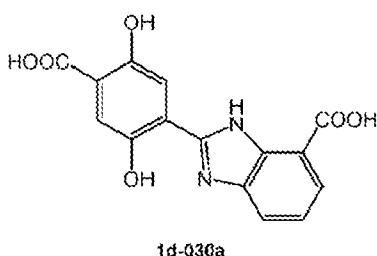
5 Ejemplo 1.4. Moléculas de tipo Id: Enlazadas al bencimidazol, 1 ejemplo



Procedimiento sintético: ver el procedimiento general de KI-1 [3], [4], [5]

Paso de ciclación: ver las figuras 4A-D

Ejemplo:



32) **Ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico, compuesto Id-030a:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 0,99 min; m/z = 313,1 [M-H], área del pico > 97 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,10 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 8,05 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,80 (s, 1H), 7,68 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,62 (s, 1H)

Biodatos: inestables en DMSO

Éster metílico de etilo:

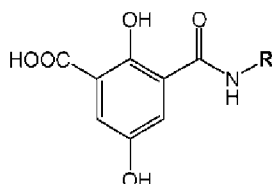
UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 2,09 minutos, m/z = 357,1 [M+H] $^+$, área del pico > 89 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 +D $_2$ O 10 %) δ 7,97 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,90 - 7,83 (m, 2H), 7,44 - 7,36 (m, 2H), 4,35 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,94 (s, 3H), 1,33 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

HRMS: [M+H] $^+$, calc. para C $_{18}$ H $_{17}$ N $_2$ O $_6$: 357,10811, encontrado: 357,10827

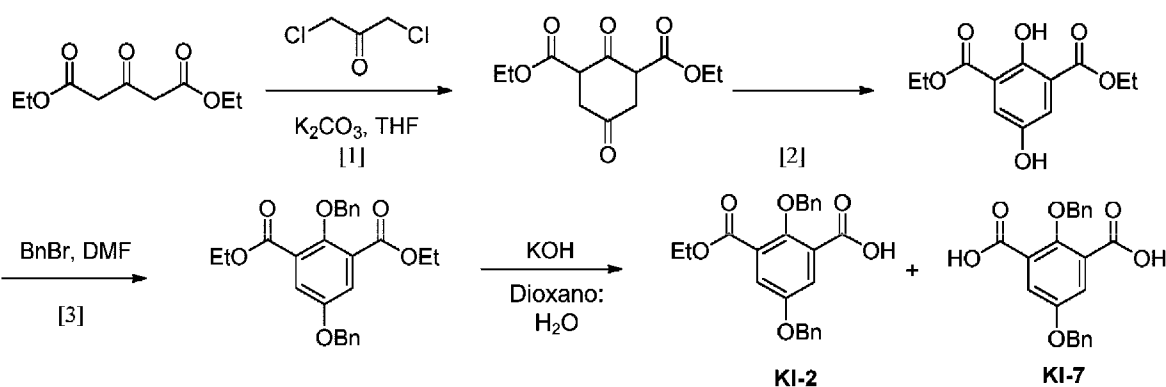
Biodatos: **Id-030a-E2**: IC50 [μ M] FGF-1 = 115; IC50 [μ M] de FGF-2 = 200; IC50 [μ M] de VEGF-A1 = 200; IC50 [μ M] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 0,33; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μ M] [%] = 0; IC50 [μ M] de inhibición de ROS de PMN = 0; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 43

5 Ejemplo 1.5: Moléculas de tipo IIa: Monoamidas, 16 ejemplos



15 Síntesis de precursores I

Esquema 9a. Síntesis de los intermedios KI-2 y KI-7



35 Procedimientos:

Síntesis de KI-2 y KI-7

2,6-di(etoxicarbonil)ciclohexano-1,4-diona [Paso 1] [Ref: Rodríguez y col. Synth. Comm. 28 (1998) 2259-69]: Se añadió 1,3-dicloroacetona (12,5 g, 0,1 mol) en THF (500 ml) gota a gota, durante un período de 30 minutos, a una suspensión de 1,3-acetonodicarboxilato de dietilo (18 ml, 0,1 mol) y una malla 325 de carbonato de potasio (21,5 g, 0,15 mol) en THF (1 l) a temperatura de reflujo. Después de 2 h, la reacción se completó y la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y después se filtró con Celite®; el residuo sólido se lavó con THF (200 ml), el disolvente se retiró a continuación a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (hexanos/EtOAc del 0 al 20 %) para dar el compuesto del título (9,3 g, rendimiento del 37 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,01 min; m/z = 257,1 [M+H]⁺, área del pico > 74 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) Mezcla compleja de enol e isómeros cis/trans δ 12,10 (s), 4,23 (q, J = 7,1 Hz), 4,11 (m), 3,85 - 3,77 (m), 3,70 (s), 3,10 - 2,89 (m), 2,89 - 2,80 (m), 2,62 - 2,58 (m), 1,25 (t, J = 7,1 Hz), 1,22 - 1,15 (m, 9H).

2,5-dihidroxiisofthalato de dietilo [Paso 2]: [Protocolo tomado de Zhong et al.: Chem Eur. J. 25 (2019) 8177-8169]: A una solución agitada de 2,6-di(etoxicarbonil)-ciclohexano-1,4-diona (5,0 g, 20 mmol) en AcOH (17 ml) a temperatura ambiente se añadió NBS (3,5 g, 20 mmol) en porciones durante 30 min. Después de 20 minutos adicionales, la reacción se interrumpió mediante la adición de agua (100 ml). El producto deseado se separó como un sólido. Después de la filtración y el secado, el compuesto del título se aisló como un sólido blanco (4,6 g, rendimiento del 93 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,00 min; m/z = 253,1 [M-H], área del pico > 90 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,85 (s, 1H), 9,57 (s, 1H), 7,39 (s, 2H), 4,32 (q, J = 7,1 Hz, 4H), 1,31 (t, J = 7,1 Hz, 6H).

2,5-bis(benciloxi)isofthalato de dietilo [Paso 3]: A una suspensión de 2,5-dihidroxiisofthalato de dietilo (19,0 g, 75 mmol) y una malla 325 de carbonato de potasio (82,6 g, 598 mmol) en DMF (83 ml) se añadió gota a gota bromuro de bencilo (43,0 ml, 362 mmol) durante 10 min. La mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante 2 h. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, el disolvente se retiró a presión reducida. Después se añadió agua (500 ml) al residuo. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 250 ml), las capas orgánicas recogidas se lavaron con salmuera (300 ml), se secaron sobre

Na₂SO₄, se filtraron y después se concentraron a presión reducida. El material bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (hexanos/EtOAc del 0 al 15 %) para dar el compuesto del título (29,4 g, rendimiento del 90 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,38 min; m/z = 435,2 [M+H]⁺, área del pico > 90 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,50 (s, 2H), 7,49 - 7,45 (m, 2H), 7,44 - 7,37 (m, 5H), 7,37 - 7,29 (m, 3H), 5,17 (s, 2H), 4,95 (s, 2H), 4,26 (q, J = 7,1 Hz, 4H), 1,22 (t, J = 7,1 Hz, 6H).

ácido **2,5-bis(benciloxi)-3-(etoxicarbonil)benzoico (KI-2)** [Paso 4]: Se añadió rápidamente una solución de hidróxido de potasio (4,4 g, 79 mmol) en agua (66 ml) a una solución de 2,5-bis(benciloxi)isofalato de dietilo (31,3 g, 72 mmol) en 1,4-dioxano (430 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. El 1,4-dioxano se retiró a presión reducida, después se añadió una solución acuosa saturada de Na₂CO₃ (1 l), la capa acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 500 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se retiró al vacío. El residuo se purificó mediante filtración sobre una almohadilla de sílice utilizando hexanos/EtOAc (1/1) y después EtOAc (AcOH al 1 % v/v) como eluyente para producir dos fracciones diferentes:

El material de inicio: 2,5bis(benciloxi)isofalato de dietilo (20,4 g, rendimiento del 65 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,38 min; m/z = 435,2 [M+H]⁺, área del pico > 78 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,50 (s, 2H), 7,49 - 7,45 (m, 2H), 7,44 - 7,37 (m, 5H), 7,37 - 7,29 (m, 3H), 5,17 (s, 2H), 4,95 (s, 2H), 4,26 (q, J = 7,1 Hz, 4H), 1,22 (t, J = 7,1 Hz, 6H).

El producto deseado, el ácido 2,5-bis(benciloxi)-3-(etoxicarbonil)benzoico como un sólido blanco esponjoso, (KI-2) (3,5 g, rendimiento del 12 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,22 min; m/z = 405,1 [M-H], área del pico > 90 %

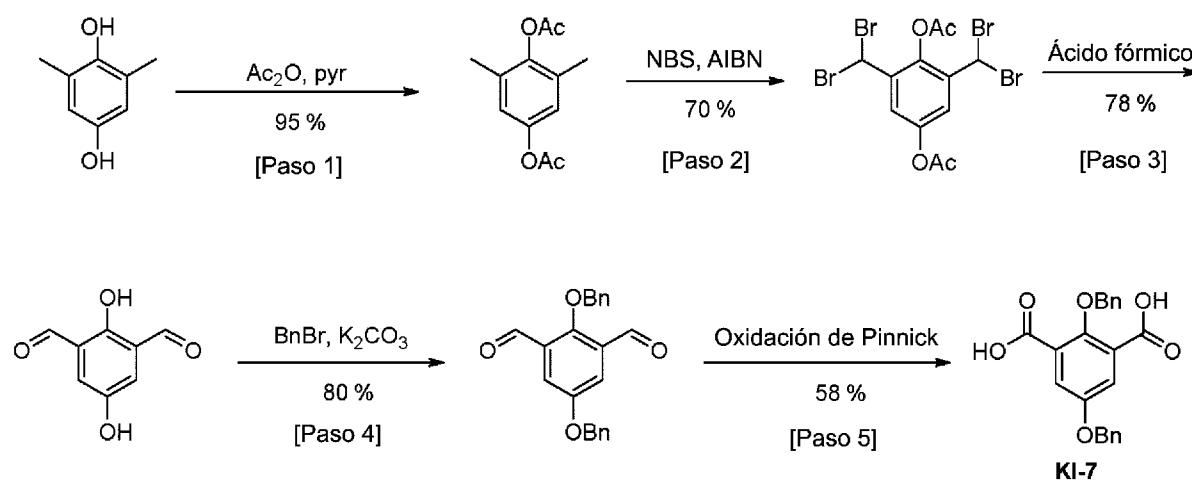
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,30 (s, 1H), 7,48 (t, J = 3,0 Hz, 2H), 7,46 - 7,42 (m, 5H), 7,39 (m, 3H), 7,37 - 7,31 (m, 2H), 5,17 (s, 2H), 4,96 (s, 2H), 4,25 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 1,22 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

La solución acuosa saturada original de Na₂CO₃ se acidificó después a pH~7 utilizando ácido clorhídrico concentrado. Después se extrajo con EtOAc (2 x 500 ml), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida para dar una mezcla de **KI-2** y **KI-7** (3,0 g, rendimiento del 11 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,00 min; m/z = 377,1 [M-H]⁻, área del pico 25 %, t.a. = 1,22 min; m/z = 405,1 [M-H]⁻, área del pico 56 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,23 (s, 2H), 7,52 - 7,29 (m, 12H), 5,17 (s, 2H), 4,97 (s, 2H).

Esquema 9b: Síntesis alternativa de KI-7



Diacetato de 2,6-dimetil-1,4-fenileno [Paso 1]: A una solución agitada de 2,6-dimetilhidroquinona (5,0 g, 36 mmol) en piridina (10 ml) se añadió rápidamente anhídrido acético (10 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. A continuación, el disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se disolvió con EtOAc (250 ml) y a continuación se lavó con una solución acuosa de ácido clorhídrico (1 M, 250 ml), una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (250 ml) y agua (250 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se retiró *al vacío*, para proporcionar el compuesto del título (7,4 g, 92 %) como un sólido blanco.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,07 min; m/z = 240,2 $[M+NH_4]^+$, área del pico > 90 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 6,88 (H_{Ar} , 2H), 2,37 - 2,30 (m, 3H), 2,27 - 2,21 (m, 3H), 2,12 - 2,02 (m, 6H).

Diacetato de 2,6-bis(dibromometil)-1,4-fenileno [Paso 2]: A una solución agitada de **diacetato de 2,6-dimetil-1,4-fenileno** (6,34 g, 29 mmol) en 1,2-dicloroetano (130 ml) se añadieron secuencialmente 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN) (0,93 g, 6 mmol) y N-bromosuccinimida (NBS) (25,39 g, 143 mmol). La solución se agitó a reflujo durante 24 h. Se añadieron más 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN) (0,93 g, 6 mmol) y N-bromosuccinimida (NBS) (5,08 g, 28,6 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a reflujo durante otras 24 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y el sólido residual se retiró mediante filtración y se lavó con DCM (250 ml). El filtrado se lavó con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio (250 ml), una solución acuosa de ácido clorhídrico (1 M, 250 ml) y salmuera (250 ml). La capa orgánica se secó después con sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (9,38 g, 61 %) como un aceite de color naranja.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,23 min; m/z = 553,1 $[M+NH_4]^+$, área del pico > 88 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,69 (s, 2H), 7,31 (s, 2H), 2,49 (s, 3H), 2,32 (s, 3H).

2,5-dihidroxiisofthalaldehído [Paso 3]: A una suspensión agitada de **diacetato de 2,6-bis(dibromometil)-1,4-fenileno** (3,89 g, 7,23 mmol) en ácido fórmico (50 ml) se añadió agua (5 ml). La mezcla se agitó a reflujo durante 18 h. La mezcla de reacción se vertió después lentamente en hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado (300 ml). El precipitado formado se aisló después mediante filtración para dar el compuesto del título (0,94 g, 78 %) como un sólido marrón.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,74 min; m/z = 165,0 $[M-H]$, área del pico > 98 %

2,5-bis(benciloxi)isofthalaldehído [Paso 4]: Se añadió una malla de carbonato potásico 325 (2,34 g, 17,0 mmol) a una solución agitada de **2,5-dihidroxiisofthalaldehído** (0,94 g, 5,7 mmol) en DMF (6 ml) a temperatura ambiente. A continuación, se añadió bromuro de bencilo (2,0 ml, 17,0 mmol) al matraz de reacción y la mezcla resultante se calentó a 100 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se trató con una solución de cloruro de amonio acuoso saturado (100 ml). La suspensión resultante se agitó durante 30 minutos y después se filtró. El material sólido se lavó con una solución de cloruro de amonio acuoso saturado (2 x 50 ml). Después, el sólido se trituró con etanol (5 ml), se secó por succión para dar el producto deseado como un sólido marrón (1,58 g, 68 %).

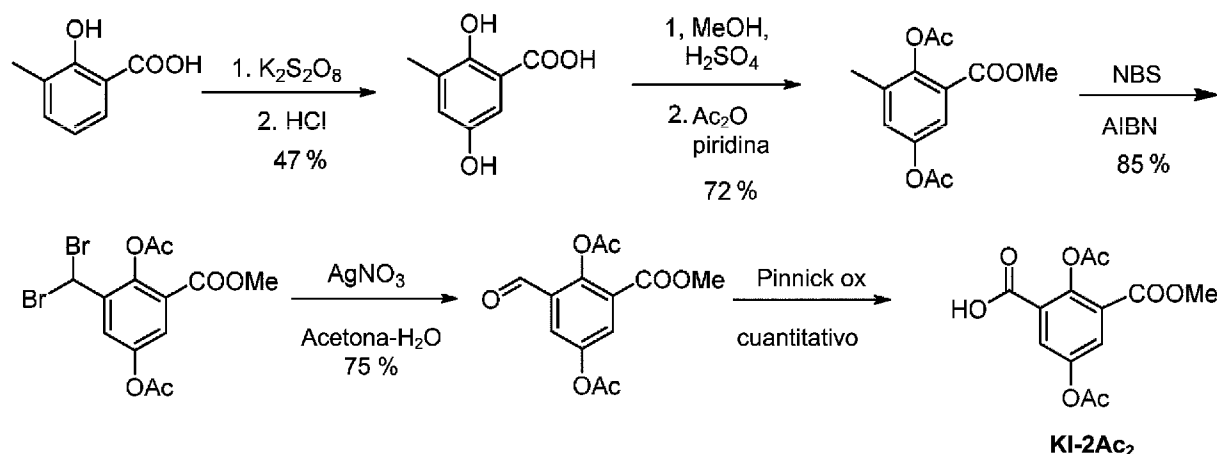
UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,28 min, no se observó ionización, área del pico 78 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,14 (s, 2H), 7,63 (s, 2H), 7,53 - 7,28 (m, 10H), 5,23 (s, 2H), 5,21 (s, 2H).

Ácido 2,5-bis(benciloxi)isofthalico (KI-7) [Paso 5]: Se disolvió **2,5-bis(benciloxi)isofthalaldehído** (1,58 g, 4,5 mmol) en una solución de 2-metil-2-butenol en THF (2,0 M, 25 ml). Después, se añadió una solución de clorito de sodio (5,1 g, 45,0 mmol) y dihidrogenofosfato de potasio (4,6 g, 33,8 mmol) en agua (25 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla de reacción se vertió después en una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (400 ml). La capa acuosa se lavó con EtOAc (3 x 100 ml) y a continuación se acidificó con ácido clorhídrico concentrado (pH=1). La capa acuosa se extrajo después con DCM (2 x 150 ml) y Et_2O (2 x 200 ml), la capa orgánica recogida se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se trituró después con *n*-pentano (3 x 50 ml) para dar el compuesto del título **KI-7** como un sólido blanco (0,98 g, 58 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,03 min, m/z = 379,1 $[M+H]^+$, área del pico > 96 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,23 (s, 2H), 7,57 - 7,28 (m, 12H), 5,17 (s, 2H), 4,97 (s, 2H).

Esquema 9c: Síntesis de KI-2Ac₂

2,5-diacetoxi-3-metilbenzoato de metilo. El ácido 3-metilsalicílico se oxidó con persulfato según lo descrito por Nudenberg y col. (J. Org. Chem. 1943, 8, 500-508). El ácido 3-metilsalicílico (15,0 g, 98,6 mmol) se disolvió en una solución de hidróxido de sodio (15,0 g, 375 mmol, 3,8 eq.) en agua (37,5 ml). La solución de color marrón claro se enfrió a 20 °C y se trató, mientras se agitaba, con porciones de 7,75 ml de hidróxido de sodio al 40 % y porciones de 33,8 ml de soluciones de persulfato de potasio al 10 %, comenzando con el hidróxido, a una velocidad tal que se mantuvo una temperatura de 30-35 °C y hasta que se añadieron diez porciones de cada una. Una vez completada la adición, la agitación continuó durante 1 h, la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 16-20 h y, a continuación, se añadió HCl en cono hasta que se puso azul a Congo. El ácido 3-metilsalicílico sin reaccionar se separó en este punto como un sólido y se retiró mediante filtración. El filtrado se extrajo con éter varias veces (5 x 50 ml) para recuperar el resto del ácido 3-metilsalicílico. La solución acuosa se trató después con HCl en cono (100 ml) y después se calentó a reflujo durante 2 h para descomponer el monosulfato intermedio. La solución caliente se dejó enfriar a t.a. y el sólido cristalino casi negro que precipitó se filtró, se lavó con agua, y se secó. La extracción del filtrado acuoso con éter dio un lote adicional de ácido **2,5-dihidroxi-3-metilbenzoico** como un sólido marrón (total: 7,71 g, 47 %). Mp 212-214 °C; RMN de ¹H (250 MHz, DMSO): δ 10,94 (br. s., 1H), 7,00 (dd, J = 3,0 y 0,75, ¹H_{ar}), 6,86 (dd, J = 3,0 y 0,75, ¹H_{ar}), 2,12 (s, 3H).

Esterificación. Se añadió cuidadosamente ácido sulfúrico concentrado (0,7 ml) a 0 °C y bajo nitrógeno a una solución de ácido 2,5-dihidroxi-3-metilbenzoico (2,05 g, 12,2 mmol) en MeOH (7 ml). La mezcla de reacción se agitó después durante 6 h a 100 °C. Después de enfriar a t.a., el disolvente se retiró a presión reducida. El producto bruto obtenido se disolvió en acetato de etilo (50 ml) y la solución se lavó con agua (20 ml), NaHCO₃ acuoso al 10 % (20 ml), acuoso al 5 %. HCl (20 ml), y salmuera (20 ml), y después se secó (MgSO₄). Después de filtrar, la capa orgánica se concentró al vacío para dar el residuo que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 9/1) para proporcionar **2,5-dihidroxi-3-metilbenzoato de metilo** como un sólido blanco (370 mg, 75 %). Mp 101-103 °C; RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃): δ 10,56 (d, J = 0,50 Hz, 1H), 7,12 (dd, J = 3,25 y 0,50 Hz, ¹H_{ar}), 6,90 (dt, J = 3,00 y 0,50 Hz, ¹H_{ar}), 4,45 (s, 3H), 2,24 (s, 3H); HRMS (ESI⁺): m/z calculado para C₉H₁₁O₄ [M+H]⁺: 183,0652; encontrado 183,0651.

Acetilación. Se añadió anhídrido acético (10 ml) en exceso a una solución de 2,5-dihidroxi-3-metilbenzoato de metilo (4,43 g, 24,3 mmol) en piridina (10 ml) bajo argón. Después de 12 h de agitación a t.a., la piridina y el anhídrido acético se eliminaron por coevaporación con tolueno (25 ml) a presión reducida. El producto bruto se disolvió entonces en acetato de etilo (15 ml) y la solución se lavó sucesivamente con HCl acuoso al 2 % (5 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (5 ml) y salmuera (5 ml). La fase orgánica se secó (MgSO₄) y el disolvente se evaporó a presión reducida. El aceite incoloro obtenido se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 8/2) para proporcionar el producto del título acetilado (**2,5-acetoxi-3-metilbenzoato**) como un sólido blanco (6,25 g, 97 %). Mp 69-71 °C; RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃): δ 7,58 (dd, J = 3,00 y 0,50 Hz, ¹H_{ar}), 7,18 (dd, J = 3,00 y 0,75 Hz, ¹H_{ar}), 3,85 (s, 3H), 2,37 (s, 3H), 2,30 (s, 3H), 2,22 (s, 3H); HRMS (ESI⁺): m/z calculado para C₁₃H₁₈NO₆ [M+NH₄]⁺: 284,1129; encontrado 284,1128.

2,5-diacetoxi-3-dibromometilbenzoato de metilo. Una solución de 2,5-acetoxi-3-metilbenzoato de metilo (2,15 g, 8,08 mmol), N-bromosuccinimida (2,87 mg, 16,2 mmol, 2,0 eq.) y azobisisobutironitrilo (AIBN, 27,0 mg, 0,162 mmol, 0,02 eq.) en tetracloruro de carbono (45 ml) se calentó a reflujo durante aproximadamente 12 h hasta que flotó un sólido blanco. en la superficie. Después de enfriar, la mezcla se filtró y el filtrado se concentró después a presión reducida. El aceite incoloro obtenido se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 9/1) para proporcionar el producto dibromado como un sólido blanco (3,29 g, 84 %). Mp 117-119 °C; RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃): δ 7,86 (d, J = 2,75 Hz, ¹H_{ar}), 7,78 (d, J = 2,75 Hz, ¹H_{ar}), 6,81 (s, 1H), 3,86 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 2,33 (s, 3H); HRMS (ESI⁺): m/z calculado para C₁₃H₁₂Br₂NaO₆ [M+Na]⁺: 444,8893; encontrado 444,8896.

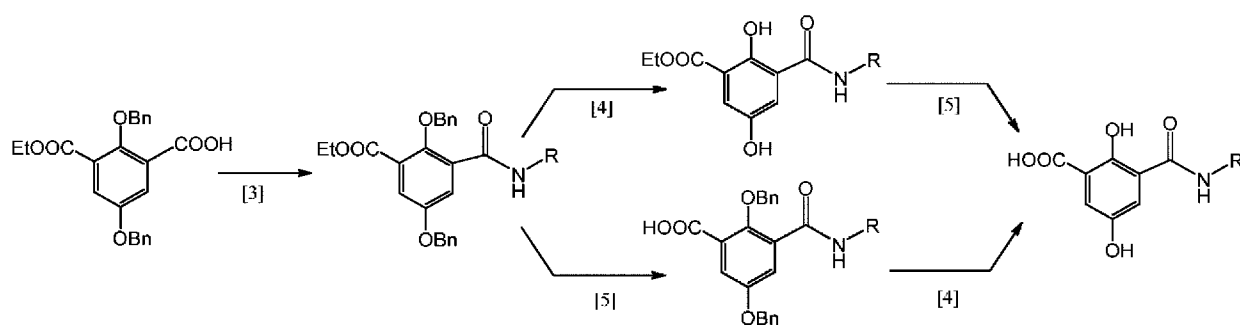
2,5-diacetoxi-3-formilbenzoato de metilo. Una solución de 2,5-diacetoxi-3-dibromometilbenzoato de metilo (2,30 g, 5,42 mmol) y nitrato de plata (2,29 g, 13,5 mmol, 2,5 eq.) en una mezcla de acetona - H₂O (4,7: 1, 40 ml) se agitó a t.a. y en la oscuridad durante 12 h. La mezcla se filtró después y el filtrado se extrajo con acetato de etilo (2 x 20 ml). Las fases

orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (5 ml), se secaron (MgSO_4) y se concentraron a presión reducida. El aceite incoloro obtenido de ese modo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 9/1) para proporcionar el aldehído como un sólido amarillo (1,14 g, 75 %). Mp 102-104 °C; RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 10,17 (s, 1H), 8,00 (d, $J = 3,00$ Hz, 1H), 7,82 (d, $J = 3,00$ Hz, 1H), 3,90 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 2,34 (s, 3H).

Éster monometílico del ácido 2,5-diacetoxiisofáltico (KI-2Ac₂). Se añadió gota a gota una solución de hidrogenofosfato de sodio (1,35 g, 9,81 mmol, 2,5 eq.) en agua (3,5 ml) a una solución de 2,5-diacetoxi-3-formilbenzoato de metilo (1,10 g, 3,93 mmol) en DMSO (14 ml). La mezcla se enfrió después a 0 °C y se añadió lentamente una solución de clorito de sodio (1,06 g, 9,34 mmol, 2,4 eq.) en agua (3,5 ml). Después de 72 h de agitación a t.a., la mezcla se enfrió rápidamente con NaHCO_3 acuoso saturado (10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 30 ml). La fase acuosa se acidificó después con HCl de 1 M a pH = 1 y se extrajo con acetato de etilo (2 x 30 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (5 ml), se secaron (MgSO_4) y se concentraron a presión reducida. El aceite naranja obtenido se utilizó en el siguiente paso sin purificación alguna.

Síntesis de monoamidas

Esquema 10. Síntesis de monoamidas IIa

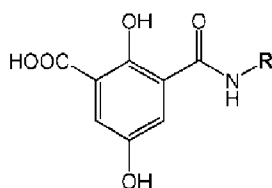


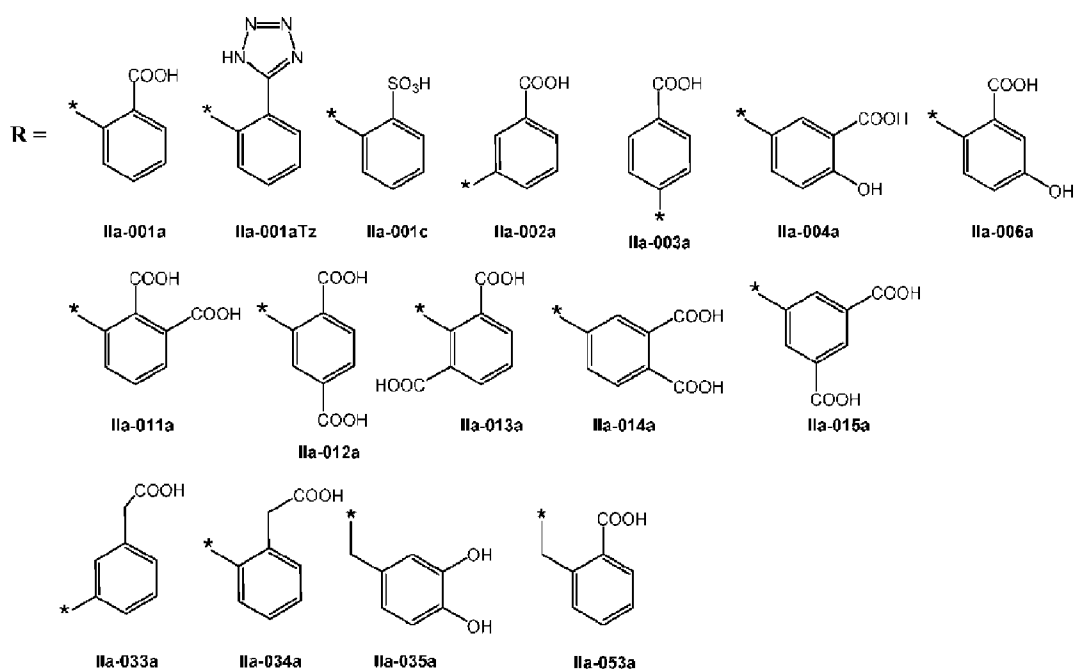
Protocolos: Síntesis de monoamidas

Procedimientos de acoplamiento y desprotección de amidas

Ver **Procedimientos generales** de los pasos [3], [4], [5] de KI-1 y KI-6, los mismos procedimientos de KI-2, KI-2Ac₂ y KI-7

Ejemplos





Para condiciones y rendimientos: Ver la tabla 2 (figuras 5A-C)

33) Ácido 3-(2-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto IIa-001a:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,86 min; m/z = 318,0 $[M+H]^+$, área del pico > 92 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,49 (s, 1H), 12,16 (s, 1H), 9,54 (s, 1H), 8,70 (dd, J = 8,5, 1,2 Hz, 1H), 7,99 (dd, J = 7,9, 1,7 Hz, 1H), 7,70 - 7,51 (m, 2H), 7,42 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 7,20 (td, J = 7,6, 1,2 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{15}H_{12}NO_7$: 318,06083, encontrado: 318,06082

Biodatos: **IIa-001a**: IC50 [μM] de FGF-1 = 8,6; IC50 [μM] de FGF-2 = 202; IC50 [μM] de VEGF-A1 = 150; IC50 [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 100; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 30,5; IC50 [μM] de inhibición de ROS de PMN = 0,408; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 36,24

34) Ácido 3-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto IIa-001aTz:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,71 min; m/z = 342,1 $[M+H]^+$, área del pico > 99 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,40 (s, 1H), 9,49 (s, 1H), 8,51 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,87 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,72 - 7,51 (m, 2H), 7,51 - 7,26 (m, 2H)

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{15}H_{12}N_5O_5$: 342,08329, encontrado: 342,08317

Biodatos: **IIa-001a-Tz**: IC50 [μM] de FGF-1 = N.D.; IC50 [μM] de FGF-2 = 9,8; IC50 [μM] de VEGF-A1 = 187; IC50 [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = ND; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 74,15; IC50 [μM] de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 24,18

Éster etílico

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 1,46 min; m/z = 370,1 $[M+H]^+$, área del pico > 92 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,51 (s, 1H), 11,37 (s, 1H), 9,63 (s, 1H), 8,47 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,92 (dd, J = 7,8, 1,6 Hz, 1H), 7,66 - 7,57 (m, 2H), 7,43 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 7,38 (td, J = 7,6, 1,2 Hz, 1H), 4,40 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 1,36 (t, J = 7,1 Hz, 3H),

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{17}H_{16}N_5O_5$: 370,11460, encontrado: 370,11444

Biodatos: **IIa-001aTz-E1**: IC50 [μM] de FGF-1 = 200; IC50 [μM] de FGF-2 = 42; IC50 [μM] de VEGF-A1 = 200; IC50 [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 100; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 68,86; IC50 [μM] de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 81,94

35) Ácido 2,5-dihidroxi-3-(2-sulfofenilaminocarbonil)benzoico, compuesto Ila-001c:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,63 min; m/z = 354,0 $[M+H]^+$, área del pico > 80 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,18 (s, 1H), 9,48 (s, 1H), 8,34 - 8,27 (m, 1H), 7,72 (dd, J = 7,7, 1,7 Hz, 1H), 7,52 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 7,41 - 7,31 (m, 2H), 7,08 (td, J = 7,5, 1,2 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{14}H_{12}NO_8S$: 354,02781, encontrado: 354,02781

Biodatos: **Ila-001c**: IC50 $[\mu M]$ de FGF-1 = N.D.; IC50 $[\mu M]$ de FGF-2 = 71; IC50 $[\mu M]$ de VEGF-A1 = 283; IC50 $[\mu M]$ de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = ND; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%] = 72,62; IC50 $[\mu M]$ de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 43,53

36) Ácido 3-(3-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto Ila-002a:

RMN de ^1H (250 MHz, CD_3OD): δ 8,37 (t, 1H), 7,93 (br d, 1H), 7,81 (br d, 1), 7,76 (d, 1H), 7,52 (d, 1H), 7,48 (t, 1H).

HRMS (ESI $^-$): $[M-H]^-$, calculado para $C_{15}H_{10}NO_7$: 316,0461, encontrado: 316,0463

Biodatos: **Ila-002a**: IC50 $[\mu M]$ de FGF-1 = 19; IC50 $[\mu M]$ de FGF-2 = 131; IC50 $[\mu M]$ de VEGF-A1 = 150; IC50 $[\mu M]$ de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = ND; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%] = 43,3; IC50 $[\mu M]$ de inhibición de ROS de PMN = 0,299; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 17,39

37) Amida del ácido 3-(4-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto Ila-003a:

RMN de ^1H (250 MHz, CD_3OD): δ 8,06 (BB' de AA'BB', 2H), 7,85 (AA' de AA'BB', 2H), 7,75 (d, 1H), 7,58 (d, 1H)

HRMS (ESI $^-$): calculado para $C_{15}H_{10}NO_7$ $[M-H]^-$: 316,0461; encontrado 316,0462

Biodatos: **Ila-003a**: IC50 $[\mu M]$ de FGF-1 = 22; IC50 $[\mu M]$ de FGF-2 = 13; IC50 $[\mu M]$ de VEGF-A1 = 150; IC50 $[\mu M]$ de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 2,5; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%] = 59,3; IC50 $[\mu M]$ de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 35,27

38) Ácido 3-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto Ila-004a:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,76 min; m/z = 334,0 $[M+H]^+$, área del pico > 99 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 14,02 (brs, 1H), 11,07 (brs, 1H), 10,32 (s, 1H), 9,47 (brs, 1H), 8,27 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 7,76 (dd, J = 8,9, 2,7 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 7,36 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 6,96 (d, J = 8,9 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{15}H_{12}NO_8$: 334,05574, encontrado: 334,05571

Biodatos: **Ila-004a**: IC50 $[\mu M]$ de FGF-1 = 47; IC50 $[\mu M]$ de FGF-2 = 33; IC50 $[\mu M]$ de VEGF-A1 = 200; IC50 $[\mu M]$ de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 100; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%] = 63,5; IC50 $[\mu M]$ de inhibición de ROS de PMN = 1,002; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 36

39) Ácido 3-(2-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico, compuesto Ila-006a:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,65 min; m/z = 334,0 $[M+H]^+$, área del pico > 99 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,36 (s, 1H), 11,83 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 9,47 (s, 1H), 8,47 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 7,64 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 7,41 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 7,03 (dd, J = 9,1, 3,0 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{15}H_{12}NO_8$: 334,05574, encontrado: 334,05548

Biodatos: **Ila-006a**: IC50 $[\mu M]$ de FGF-1 = N.D.; IC50 $[\mu M]$ de FGF-2 = 43; IC50 $[\mu M]$ de VEGF-A1 = 121; IC50 $[\mu M]$ de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 2,9; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%] = 84,29; IC50 $[\mu M]$ de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 20,29

40) Ácido 3-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico, compuesto Ila-011a:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,72 min; m/z = 360,1 $[M-H]$, área del pico > 77 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,83 (s, 1H), 9,55 (s, 1H), 8,43 (dd, J = 7,9, 1,5 Hz, 1H), 7,73 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 7,63 - 7,53 (m, 2H), 7,46 (d, J = 3,3 Hz, 1H),

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{12}NO_9$: 362,05066, encontrado: 362,05045;

Biodatos: **Ila-011a**: IC50 $[\mu M]$ de FGF-1 = 141; IC50 $[\mu M]$ de FGF-2 = 123; IC50 $[\mu M]$ de VEGF-A1 = 200; IC50 $[\mu M]$ de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 100; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 58,1; IC50 $[\mu M]$ de inhibición de ROS de PMN = 1,18; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 26

41) **Ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)tereftálico**, compuesto **Ila-012a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,73 min; m/z = 362,0 $[M+H]^+$, área del pico > 97 %

RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ : 13,81 (s, 1H), 13,34 (s, 1H), 12,23 (s, 1H), 9,50 (s, 1H), 9,30 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 8,06 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,71 (dd, J = 8,2, 1,7 Hz, 1H), 7,64 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 4,3 (d, J = 3,3 Hz, 1H),

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{12}NO_9$: 362,05066, encontrado: 362,05046,

Biodatos: **Ila-012a**: IC50 $[\mu M]$ de FGF-1 = 150; IC50 $[\mu M]$ de FGF-2 = 150; IC50 $[\mu M]$ de VEGF-A1 = 32; IC50 $[\mu M]$ de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 3,31; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 44,8; IC50 $[\mu M]$ de inhibición de ROS de PMN = 0,313; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 7,5

42) **Ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isoftálico**, compuesto **Ila-013a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,68 min; m/z = 362,0 $[M+H]^+$, área del pico > 96 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 13,12 (brs, 3H), 11,71 (s, 1H), 9,47 (s, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,66 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 7,44 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 7,35 (t, J = 7,8 Hz, 1H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{12}NO_9$: 362,05066, encontrado: 362,05047

Biodatos: **Ila-013a**: IC50 $[\mu M]$ de FGF-1 = 137; IC50 $[\mu M]$ de FGF-2 = 12; IC50 $[\mu M]$ de VEGF-A1 = 34; IC50 $[\mu M]$ de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 100; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 57,68; IC50 $[\mu M]$ de inhibición de ROS de PMN = 2,54; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 15,75

43) **Ácido 4-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico**, compuesto **Ila-014a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,63 min; m/z = 362,1 $[M+H]^+$, área del pico > 88 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10,80 (s, 1H), 9,45 (s, 1H), 8,01 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,86 (dd, J = 8,5, 2,2 Hz, 1H), 7,74 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,45 - 7,33 (m, 2H),

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{12}NO_9$: 362,05066, encontrado: 362,05048

Biodatos: **Ila-014a**: IC50 $[\mu M]$ de FGF-1 = 40; IC50 $[\mu M]$ de FGF-2 = 61; IC50 $[\mu M]$ de VEGF-A1 = 91; IC50 $[\mu M]$ de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 17,6; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 73,94; IC50 $[\mu M]$ de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 21,5

44) **Ácido 5-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido) isoftálico**, compuesto **Ila-015a**:

RMN de ^1H (250 MHz, CD_3OD): δ 8,60 (d, J = 1,5 Hz, 2H), 8,44 (t, J = 1,5 Hz, 1H), 7,75 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 7,56 (d, J = 3,2 Hz, 1)

HRMS (ESI+): m/z calculados para $C_{16}H_{12}NO_9$ $[M+H]^+$: 362,0507; encontrado 362,0505 [LM-163]

Biodatos: **Ila-015a**: IC50 $[\mu M]$ de FGF-1 = N.D.; IC50 $[\mu M]$ de FGF-2 = 125; IC50 $[\mu M]$ de VEGF-A1 = N.D.; IC50 $[\mu M]$ de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = ND; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = N.D.; IC50 $[\mu M]$ de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = N.D.

45) **Ácido (3-(3-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5dihidroxibenzoico**, compuesto **Ila-033a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,78 min; m/z = 330,1 $[M-H]^-$, área del pico > 98 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10,40 (s, 1H), 9,45 (s, 1H), 7,66 (t, J = 1,9 Hz, 1H), 7,63 - 7,57 (m, 1H), 7,45 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 7,38 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 7,29 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,05 - 6,95 (m, 1H), 3,56 (s, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{14}NO_7$: 332,07648, encontrado: 332,07644,

Biodatos: **Ila-033a**: IC50 [μM] de FGF-1 = 35; IC50 [μM] de FGF-2 = 32; IC50 [μM] de VEGF-A1 = 200; IC50 [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 4,9; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 50,64; IC50 [μM] de inhibición de ROS de PMN = 0,914; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 11,75

46) **Ácido 3-(2-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico**, compuesto **Ila-034a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,74 min; m/z = 332,0 [M+H]⁺, área del pico > 95 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,48 (s, 1H), 10,65 (s, 1H), 9,30 (s, 1H), 7,97 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,64 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 7,40 (d, *J* = 3,3 Hz, 1H), 7,33 - 7,26 (m, 2H), 7,13 (td, *J* = 7,5, 1,3 Hz, 1H), 3,70 (s, 2H).

HRMS: [M+H]⁺, calculado para C₁₆H₁₄NO₇: 332,07648, encontrado: 332,07653

Biodatos: **Ila-034a**: IC50 [μM] de FGF-1 = 22; IC50 [μM] de FGF-2 = 5,7; IC50 [μM] de VEGF-A1 = 86; IC50 [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 100; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 69,2; IC50 [μM] de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 26,58

Éster dietílico

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,12 min; m/z = 388,1 [M+H]⁺, área del pico > 99 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,81 (s, 1H), 9,58 (s, 1H), 7,77 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,65 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 7,42 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 7,36 - 7,31 (m, 2H), 7,20 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 4,39 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 4,05 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,77 (s, 2H), 1,36 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,13 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).

HRMS: [M+H]⁺, calculado para C₂₀H₂₂NO₇: 388,13907, encontrado: 388,13887

Biodatos: **Ila-034a-E2**: IC50 [μM] de FGF-1 = N.D.; IC50 [μM] de FGF-2 = 164; IC50 [μM] de VEGF-A1 = 200; IC50 [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = ND; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 68,73; IC50 [μM] de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 11,86

47) **Ácido 3-(3,4-dihidroifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico**, compuesto **Ila-035a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,69 min; m/z = 318,0 [M-H]⁻, área del pico > 99 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,38 (s, 1H), 8,84 (s, 1H), 8,75 (s, 1H), 7,55 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 7,34 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 6,74 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 6,67 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,58 (dd, *J* = 8,1, 2,1 Hz, 1H), 4,34 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H).

HRMS: [M+H]⁺, calculado para C₁₅H₁₄NO₇: 320,07647 encontrados: 320,07625.

Biodatos: **Ila-035a**: IC50 [μM] de FGF-1 = 16; IC50 [μM] de FGF-2 = 61; IC50 [μM] de VEGF-A1 = 45; IC50 [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 0,52; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 76,99; IC50 [μM] de inhibición de ROS de PMN = 1; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 36,67

48) **Ácido 3-(2-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico**, compuesto **Ila-053a**:

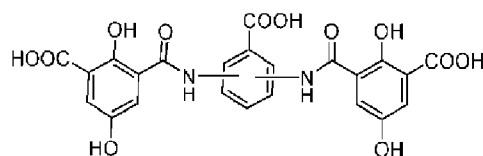
UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 1,08 min; m/z = 332,0 [M+H]⁺, área del pico > 97 %

RMN de ¹H (DMSO-*d*₆) δ: 13,13 (brs, 1H), 12,73 (brs, 1H), 9,40 (s, 1H), 9,05 (s, 1H), 7,91 (dd, *J* = 7,8, 1,4 Hz, 1H), 7,65 - 7,29 (m, 5H), 4,80 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H).

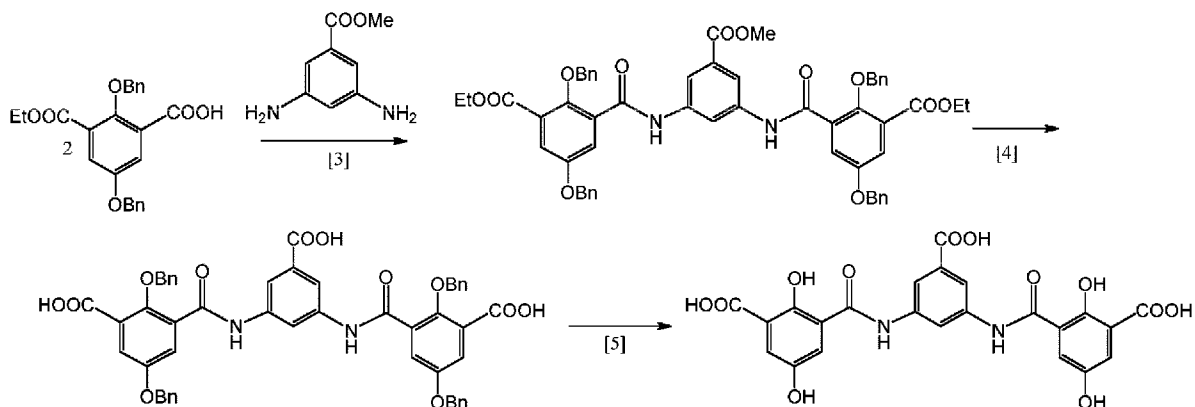
HRMS: [M+H]⁺, calculado para C₁₆H₁₄NO₇: 332,07648, encontrado: 332,07626

Biodatos: **Ila-053a**: IC50 [μM] de FGF-1 = 84; IC50 [μM] de FGF-2 = 18; IC50 [μM] de VEGF-A1 = 37; IC50 [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 0,27; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 63,13; IC50 [μM] de inhibición de ROS de PMN = 0,62; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 20; Sangre entera: IC50 [μM] de GM-CSF = > 100; IC50 [μM] de IFNγ = 1,04; IC50 [μM] de IL-1β = >100; IC50 [μM] de IL-2 = 1,67; IC50 [μM] de IL-4 = >100; IC50 [μM] de IL-5 = >100; IC50 [μM] de IL-6 = 2,2; IC50 [μM] de IL-9 = 1,41; IC50 [μM] de IL-10 = >100; IC50 [μM] de IL-12p70 = 0,27; IC50 [μM] de IL-13 = 29,9; IC50 [μM] de IL-17A = > 100; IC50 [μM] de IL-17F = 28,8; IC50 [μM] de IL-18 = >100; IC50 [μM] de IL-21 = >100; IC50 [μM] de IL-33 = 12,1; IC50 [μM] de TGFβ = >100; IC50 [μM] de TNF α = 0,02; IC50 [μM] de TNF β = 91,5.

Ejemplo 1.6. Moléculas de tipo IIb: Diamidas a partir de diaminas, 1 ejemplo

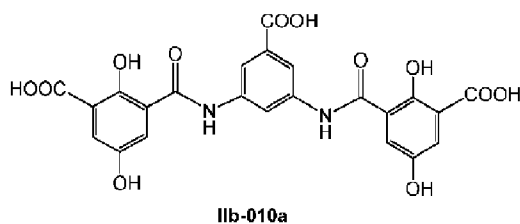


Esquema 11. Síntesis de diamidas de tipo IIb



Procedimiento: ver el procedimiento general de **KI-1** [3], [4], [5]

Por ejemplo:



Para condiciones y rendimientos: Ver la tabla 2 (figuras 5A-C)

49) **Ácido 3,5-bis (2,5-dihidroxi-3-carboxibenzoilamino)benzoico**, compuesto **IIb-010a**:

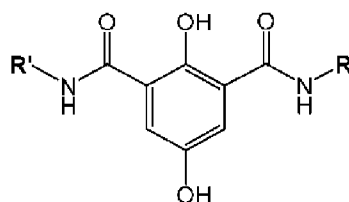
UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 0,98 min; m/z = 511,1 $[M-H]^-$; área del pico > 93 %

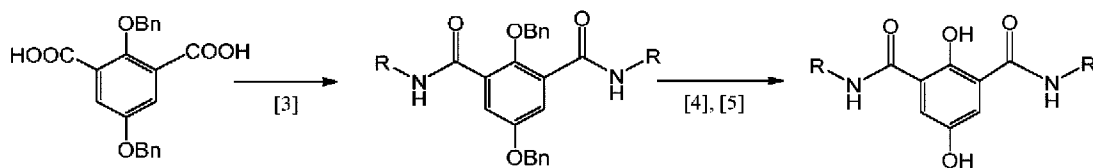
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,81 (s, 2H), 10,65 (s, 2H), 8,38 (m, 1H), 8,12 (d, J = 2,0 Hz, 2H), 7,39 (d, J = 2,3 Hz, 4H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{23}H_{17}N_2O_{12}$: 513,07760, encontrado: 513,07774

Biodatos: **IIb-010a**: IC₅₀ [μ M] de FGF-1 = 200; IC₅₀ [μ M] de FGF-2 = 102; IC₅₀ [μ M] de VEGF-A1 = 28; IC₅₀ [μ M] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = ND; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μ M [%]] = 81,87; IC₅₀ [μ M] de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 59,84

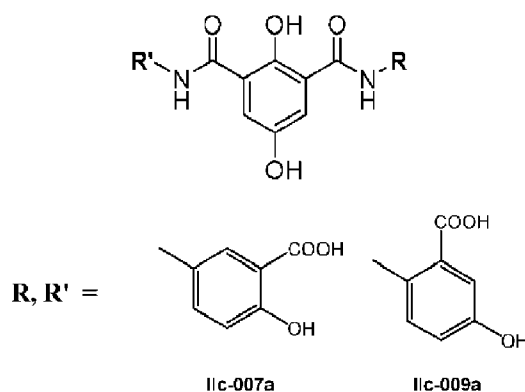
Ejemplo 1.7. Moléculas de tipo IIc: Diamidas a partir de diácidos, 2 ejemplos



Esquema 12. Síntesis de amidas de tipo IIc con R = R'

Procedimiento: ver el procedimiento general del **KI-6** [3], [4], [5]

Por ejemplo



Para condiciones y rendimientos: Ver la tabla 2 (figuras 5A-C)

50) **Ácido 5-(3-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico**, compuesto **IIc-007a**:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 1,20 min; m/z = 469,1 $[M+H]^+$, área del pico > 91 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,41 (s, 2H), 9,51 (s, 1H), 8,22 (d, J = 2,7 Hz, 2H), 7,79 (dd, J = 9,0, 2,7 Hz, 2H), 7,58 (s, 2H), 6,98 (d, J = 8,9 Hz, 2H),

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 172,1, 166,1, 158,3, 152,0, 149,4, 130,2, 129,5 (CH), 122,8 (CH), 120,3, 119,8 (CH), 117,7 (CH), 113,0.

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{22}H_{17}N_2O_{10}$: 469,08777, encontrado: 469,08803

Biodatos: **IIc-007a**: IC50 $[\mu M]$ de FGF-1 = 11; IC50 $[\mu M]$ de FGF-2 = 91; IC50 $[\mu M]$ de VEGF-A1 = 8,2; IC50 $[\mu M]$ de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 0,44; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 93,04; IC50 $[\mu M]$ de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 64,61; Sangre entera: IC50 $[\mu M]$ de GM-CSF = 26; IC50 $[\mu M]$ de IFN γ = 0,11; IC50 $[\mu M]$ de IL-1 β = >100; IC50 $[\mu M]$ de IL-2 = 12,8; IC50 $[\mu M]$ de IL-4 = >100; IC50 $[\mu M]$ de IL-5 = >100; IC50 $[\mu M]$ de IL-6 = 0,05; IC50 $[\mu M]$ de IL-9 = 2,14; IC50 $[\mu M]$ de IL-10 = 17,9; IC50 $[\mu M]$ de IL-12p70 = 3,37; IC50 $[\mu M]$ de IL-13 = 0,25; IC50 $[\mu M]$ de IL-17A = 0,01; IC50 $[\mu M]$ de IL-17F = 0,26; IC50 $[\mu M]$ de IL-18 = >100; IC50 $[\mu M]$ de IL-21 = 9,41; IC50 $[\mu M]$ de IL-33 = 0,18; IC50 $[\mu M]$ de TGF β = >100; IC50 $[\mu M]$ de TNF α = 0,03; IC50 $[\mu M]$ de TNF β = 0,29

Síntesis a gran escala alternativa del **IIc-007a**

Ácido 2,5-dibenciloxiisofáltico (KI-7)

En un recipiente con camisa de 5 l se cargó 2,5-dibenciloxiisofaltaldehído (esquema 9b) (300 g, 866 mmol), resorcinol (286 g, 2,60 mol), KH_2PO_4 (354 g, 2,60 mol), acetona (1,5 l) y agua (516 ml). La suspensión se agitó a 15-25 °C. Se cargó una solución de NaClO $_2$ al 80 % (294 g, 2,60 mol) en agua (1 l) a 15-30 °C durante 90 minutos (exotermia). Una vez completada la adición, la reacción se agitó a 15-25 °C durante 1 h. Se cargó una solución de H $_3$ PO $_4$ al 85 % (85 ml, 1,24 mol) en agua (1175 ml) [$\sim$ 1M] durante 10 minutos a $T < 30$ °C (exotermia) proporcionando un precipitado. El lote se enfrió a 0-5 °C y se filtró. Los sólidos se lavaron con agua (3 x 12 l) y se secaron en horno (50 °C) para proporcionar 325,6 g de diácido **KI-7**. HPLC: 98,9 %; RMN > 95 %. Rendimiento corregido (90,6 %).

Éster metílico del ácido 5-(3-(3-metoxicarbonil-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dibenciloxibenzamido)-2-hidroxibenzoico. En un recipiente con camisa de 2 litros se cargó el diácido **KI-7** (80 g, 211 mmol), HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) (176,8 g, 466 mmol) y THF (560 ml). El lote

se agitó a 15-25 °C y se cargó N-metilimidazol (50,6 ml, 635 mmol). Después de 30 minutos, se cargó 5-amino-2-hidroxibenzoato de metilo (77,8 g, 466 mmol) y la reacción se agitó a 25 °C durante una noche. Se cargó agua (1,2 l) y el lote se agitó a 20 °C durante 30 min. El lote se filtró, se lavó con agua (2 x 480 ml) y después con MeCN (320 ml). El sólido resultante (236 g) se cargó de nuevo en el recipiente junto con MeCN (800 ml). La suspensión se calentó a 50 °C durante 40 min y después se enfrió a 20 °C. El lote se filtró y se lavó con MeCN (320 ml). El análisis de RMN del sólido (156 g) indicó que no había TMU, HOBt, NMI ni HBTU. El material se secó a 50 °C durante una noche para proporcionar 125 g de diamida. HPLC: 98,2 %. RMN: > 97 %. Rendimiento: 88 %.

Ácido 5-(3-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dibenciloxibenzamido)-2-hidroxibenzoico. En un recipiente con camisa de 2 litros se cargó la diamida anterior (110 g, 163 mmol), THF (550 ml) y agua (1100 ml). El lote se agitó a 15-25 °C y se cargó con KOH al 85 % (32,2 g, 488 mmol) (exotermia menor). La solución se calentó a 50 °C durante 4 h, después se enfrió a 20 °C y se agitó durante una noche. 6 M ac. Después, se cargó AcOH (550 ml, 3,3 mol) durante 30 minutos a 15-25 °C. Una vez completada la adición, el lote se agitó durante 30 minutos y después se filtró. Los sólidos se lavaron con agua (3 x 550 ml) y después se secaron al horno a 50 °C. Esto proporcionó 102 g de diácido libre. HPLC: 98,9 % (0,3 % de monoamida, 0,19 % de monoácido). RMN: > 97 %. Rendimiento: 97 %.

Ácido 5-(3-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico Ilc-007a. En un recipiente con camisa de 2 litros bajo N₂ se cargó Pd/C al 10 % (10 g, 50 % húmedo, tipo 87 l) seguido del diácido anterior (100 g, 154 mmol), AcOH (5 ml, 88 mmol) y THF (1200 ml). El lote se agitó después se roció con H₂ y se calentó a 40 °C durante 2 h. El lote se roció con N₂ y después se filtró (GF/F). El recipiente se enjuagó con THF (300 ml) y el enjuague se utilizó para lavar el catalizador en el filtro. El filtrado se cargó en el recipiente y el volumen se ajustó a 2 l con THF (400 ml). La solución se calentó a 30 °C, se cargó SPM32 (10 g), y el lote se agitó a 30 °C durante una noche. El SPM32 se retiró por filtración y se lavó con THF (200 ml). El disolvente se retiró al vacío para proporcionar un sólido amarillo claro (110 g). El análisis de RMN indicó un 28 % de THF. El material se suspendió en EtOH (1 l) a 20 °C durante 2 h y después se filtró. Los sólidos se lavaron con EtOH (400 ml) y se secaron en horno a 60 °C durante la noche. La RMN indicó un 8,7 % de EtOH, sin THF. El material se secó adicionalmente a 80 °C durante 4 noches para proporcionar 66,5 g de **Ilc-007a** como un sólido blanquecino con un rendimiento del 92 %. HPLC: 99,5 % (0,31 % de monoamida). RMN: 4,6 % de EtOH, sin THF. Pd por ICP-OES: < 2 ppm.

Solvato Ilc-007a-THF: La concentración del filtrado de THF proporciona un sólido amarillo, conteniendo típicamente un 25-30 % de THF mediante RMN, que no pudo eliminarse mediante secado, lo que indica un solvato no estequiométrico. Una pequeña muestra del solvato de THF (1,45 g) se calentó a 50 °C en THF (10 ml) durante 1 hora, se enfrió a TA y se aisló, lavando con 3 ml de THF. Esto proporcionó 1,13 g de **Ilc-007a-THF**. RMN: 27 % THF. HPLC: 99,6 % (0,1 % de monoamida). El aislamiento del solvato de THF mediante filtración conduce a un aumento de la pureza y a una purga eficaz de la impureza principal (monoamida, **Ilc-004a**) del 0,7 % al 0,1 %. Rendimiento de recuperación: 78 %. La solubilidad del solvato de THF en THF se calculó como ~ 25 mg/ml a 20 °C.

Los ensayos de desolvatación se realizaron en el material en acetona, EtOH y EtOAc. Cada lote se calentó durante 1 hora a 50 °C en 20 volúmenes de disolvente, después se aisló a temperatura ambiente y se secó en horno (60 °C). Se eligió etanol como disolvente de desolvatación debido al bajo nivel de EtOH incorporado en el producto después del secado y a la excelente purga de THF del sistema. El paso de desolvatación se realizó en 12,1 g de producto (25 % de THF). Al material se le cargó EtOH (20 vols) y el lote se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se filtró una muestra y esto indicó una desolvatación exitosa a t.a. Rendimiento total: 8,67 g. HPLC: 99,4 %. RMN: > 97 % (0,8 % de EtOH). La XRPD indicó un alto grado de cristalinidad del producto aislado.

El producto **Ilc-007a** también forma solvatos de DMSO (DMSO:producto en una relación 3:2).

51) Ácido 2-(3-(2-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-5-hidroxibenzoico, compuesto Ilc-009a:

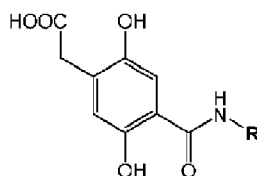
UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,79 min; *m/z* = 469,1 [M+H]⁺, área del pico > 95 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMF-d₇) δ 10,11 (s, 1H), 10,01 (s, 2H), 8,71 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H), 8,01 (s, 2H), 7,82 (d, *J* = 3,0 Hz, 2H), 7,46 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H).

HRMS: [M+H]⁺, calculado para C₂₂H₁₇N₂O₁₀: 469,08777, encontrado: 469,08714

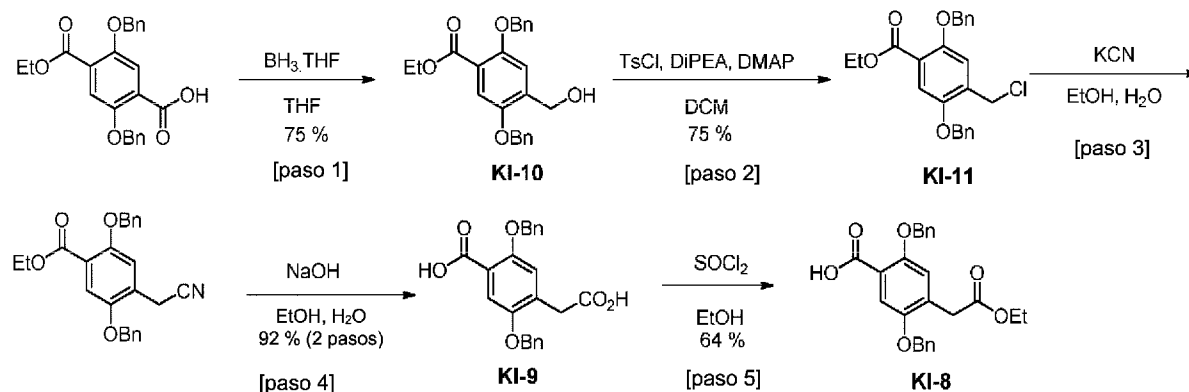
Biodatos: **Ilc-009a**: IC₅₀ [μM] de FGF-1 = 30; IC₅₀ [μM] de FGF-2 = N.D.; IC₅₀ [μM] de VEGF-A1 = 182; IC₅₀ [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 1,7; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM %] = 75,31; IC₅₀ [μM] de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 53,15; Sangre entera: IC₅₀ [μM] de GM-CSF = > 100; IC₅₀ [μM] de IFNγ = 0,54; IC₅₀ [μM] de IL-1β = >100; IC₅₀ [μM] de IL-2 = 19,6; IC₅₀ [μM] de IL-4 = >100; IC₅₀ [μM] de IL-5 = >100; IC₅₀ [μM] de IL-6 = 0,27; IC₅₀ [μM] de IL-9 = 18,9; IC₅₀ [μM] de IL-10 = 11,31; IC₅₀ [μM] de IL-12p70 = > 100; IC₅₀ [μM] de IL-13 = 0,13; IC₅₀ [μM] de IL-17A = 0,001; IC₅₀ [μM] de IL-17F = 0,13; IC₅₀ [μM] de IL-18 = 2,95; IC₅₀ [μM] de IL-21 = 8,01; IC₅₀ [μM] de IL-33 = 0,29; IC₅₀ [μM] de TGFβ = >100; IC₅₀ [μM] de TNF α = 0,11; IC₅₀ [μM] de TNF β = 6,94.

Ejemplo 1.8: Moléculas de tipo IIIa: Monoamidas, 4 ejemplos



Síntesis de precursores)

Esquema 13. Intermedios sintéticos: **KI-8** y **KI-9** a partir de **KI-1**



Protocolos sintéticos

Intermedios **KI-8** y **KI-9** (a modo de **KI-10** y **KI-11**)

2,5-bis (benciloxi)-4-(hidroximetil)benzoato de etilo (KI-10) [Paso 1]: A una solución enfriada a -20 °C de **KI-1** (62,3 g, 153 mmol) en THF (700 ml) bajo un flujo positivo de gas inerte (N₂) se añadió lentamente una solución preenfriada de BH₃.THF (615,0 ml, 615 mmol) (a -10 °C). La adición se hizo de tal modo que la temperatura interna de la reacción nunca superó los -15 °C. La reacción se calentó ligeramente, no dejándose que la temperatura interna superara los -7 °C. La mezcla se mantuvo a esta temperatura durante 2,5 h. La mezcla de reacción se vertió después en hielo/agua (8 l). Las mezclas blancas borrosas obtenidas se dejaron para agitarse a t.a. durante 2 h y la suspensión blanca residual se filtró a través de un embudo fritado (porosidad 3). El sólido blanco obtenido de ese modo se secó adicionalmente en un horno de vacío a 40 °C durante una noche, para proporcionar 2,5-bis(benciloxi)-4-(hidroximetil)benzoato de etilo (**KI-10**) (60,5 g, rendimiento del 97 %) como un sólido blanco.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,25 min; m/z = 391,2 [M-H]⁻, área del pico > 68 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,54 - 7,48 (m, 2H), 7,48 - 7,43 (m, 2H), 7,43 - 7,35 (m, 4H), 7,35 - 7,27 (m, 4H), 5,28 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 5,13 (s, 2H), 5,11 (s, 2H), 4,58 (d, J = 5,4 Hz, 2H), 4,25 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 1,26 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

Alternativamente, el intermedio **KI-10** puede obtenerse a partir del **KI-1** a modo de un anhídrido mixto (tratamiento del **KI-1** con cloroformiato de isobutilo en THF en presencia de trietilamina) seguido de la reducción del anhídrido mixto con borohidruro de sodio en THF (rendimiento del 85-90 %, a escala de 150 g).

2,5-bis(benciloxi)-4-(clorometil)benzoato de etilo (KI-11) [Paso 2]: Se añadió cloruro de tosilo (17,0 g, 70 mmol) lentamente a una solución enfriada (baño de hielo) de **KI-10** (25,0 g, 64 mmol), DIPEA (12,2 ml, 70 mmol) y DMAP (0,778 g, 6 mmol) en DCM (260 ml). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 30 h, tras lo cual la reacción se consideró completa. Se añadió DCM (100 ml) y la capa orgánica se separó, se lavó con hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado (4 x 50 ml), agua (2 x 50 ml) y salmuera (50 ml), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El producto bruto se sometió a cromatografía en columna (hexanos/EtOAc 0-20 %) para dar 2,5-bis(benciloxi)-4-(clorometil)benzoato de etilo (**KI-11**) (23,5 g, 75 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,39 min; m/z = sin iones, área del pico > 84 %.

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,54 - 7,44 (m, 4H), 7,43 - 7,36 (m, 6H), 7,36 - 7,28 (m, 2H), 5,18 (s, 2H), 5,13 (s, 2H), 4,76 (s, 2H), 4,26 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 1,25 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

Alternativamente, el intermedio **KI-11** puede obtenerse tratando el **KI-10** con cloruro de tionilo (1,14 equiv.) en diclorometano a -10 °C, evaporando después el disolvente y precipitando del heptano (rendimiento del 90 %, escala de 300 g)

2,5-bis(benciloxi)-4-(cianometil)benzoato de etilo [Paso 3]: Una suspensión de **KI-11** (7,5 g, 18,2 mmol) en una mezcla de EtOH (90 ml) y H₂O (45 ml) se trató con cianuro de potasio (1,8 g, 27,4 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 75 °C y se agitó a esta temperatura durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua (500 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 200 ml), las fases orgánicas combinadas se lavaron después con salmuera (200 ml), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron al vacío. El producto bruto se aisló como una mezcla de 2,5-bis(benciloxi)-4-(cianometil)benzoato de etilo y ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(cianometil)benzoico (7,1 g), el producto se utilizó en el siguiente paso sin purificación adicional.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,30 min; m/z = 402,2 [M+H]⁺, área del pico > 65 % y t.a. = 1,15 min; m/z = 374,1 [M+H]⁺, área del pico > 8 %.

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,56 - 7,27 (m, 12H), 5,19 (s, 2H), 5,14 (s, 2H), 4,26 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,95 (s, 2H), 1,25 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

Ácido **2,5-bis(benciloxi)-4-(carboximetil)benzoico (KI-9)** [Paso 4]: A una suspensión de 2,5-bis(benciloxi)-4-(cianometil)benzoato de etilo (7,1 g, 13,2 mmol) en EtOH (20 ml) se añadió una solución de hidróxido de sodio (8,5 g, 212,5 mmol) en agua (50 ml) y la mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 18 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua (100 ml) y la solución resultante se lavó con EtOAc (2 x 100 ml), la capa orgánica obtenida de ese modo se extrajo con agua (100 ml) y se recolectaron todas las capas acuosas. Después, la capa acuosa se acidificó a pH ~ 3 con una solución acuosa saturada de ácido cítrico, el precipitado formado se filtró y se secó a presión reducida. El sólido se secó adicionalmente en el horno de vacío a 40 °C durante la noche para dar el ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(carboximetil)benzoico (**KI-9**) (6,4 g, rendimiento del 92 %) como un sólido amarillento.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,07 min; m/z = 393,2 [M+H]⁺, área del pico > 74 %.

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,46 (s, 2H), 7,55 - 7,27 (m, 11H), 7,19 (s, 1H), 5,11 (s, 2H), 5,09 (s, 2H), 3,61 (s, 2H).

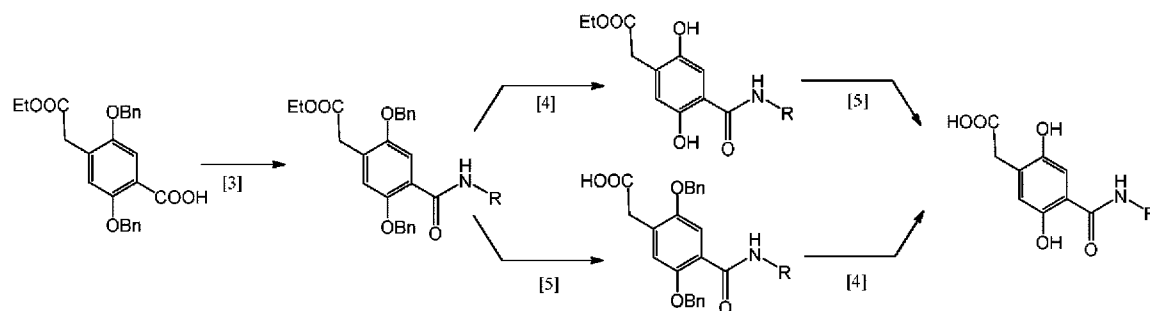
Ácido **2,5-bis(benciloxi)-4-(2-etoxycarbonilmetil)benzoico (KI-8)** [Paso 5]: El **KI-9** (5,5 g, 14,0 mmol) se suspendió en EtOH (30 ml) y la suspensión se trató con cloruro de tionilo (0,52 ml, 7,1 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. A continuación, la mezcla de reacción se vertió en una solución saturada de bicarbonato de sodio (1 l), dando lugar a una suspensión blanca. El sólido se aisló mediante filtración y se trituró adicionalmente con Et₂O (2 x 20 ml). El sólido se secó adicionalmente en el horno de vacío durante una noche para dar el ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(2-etoxycarbonilmetil)benzoico (**KI-8**) (4,2 g, 64 %) como un sólido blanco.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,23 min; m/z = 419,3 [M-H]⁻, área del pico > 79 %.

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,68 (brs, 1H), 7,58 - 7,27 (m, 11H), 7,19 (s, 1H), 5,11 (s, 2H), 5,08 (s, 2H), 4,01 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,66 (s, 2H), 1,11 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

Síntesis de monoamidas

Esquema 14. Síntesis de monoamidas IIIa

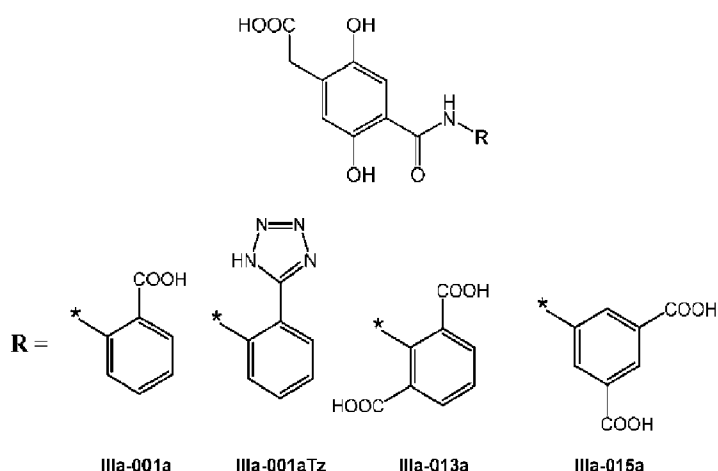


Protocolos sintéticos

Procedimientos de acoplamiento y desprotección de amidas:

Ver los procedimientos generales de los pasos [3], [4], [5] de **KI-1** y de **KI-6**

Ejemplos



Para condiciones y rendimientos: Ver la tabla 3 (figura 6)

52) **Ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxi-benzamido)benzoico**, compuesto **IIIa-001a**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,89 min; m/z = 332,1 $[M+H]^+$, área del pico > 98 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,38 (s, 1H), 12,17 (s, 1H), 10,67 (s, 1H), 9,23 (s, 1H), 8,64 (dd, J = 8,5, 1,2 Hz, 1H), 8,00 (dd, J = 7,9, 1,7 Hz, 1H), 7,62 (ddd, J = 8,7, 7,3, 1,7 Hz, 1H), 7,33 (s, 1H), 7,19 (td, J = 7,6, 1,2 Hz, 1H), 6,80 (s, 1H), 3,49 (s, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{14}NO_7$: 332,07648, encontrado: 332,07666

Biodatos: **IIIa-001a**: IC₅₀ [μ M] de FGF-1 = 62; IC₅₀ [μ M] de FGF-2 = 10; IC₅₀ [μ M] de VEGF-A1 = 32; IC₅₀ [μ M] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = ND; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μ M %] = 74,79; IC₅₀ [μ M] de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 30,4

Éster etílico metílico

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,14 min; m/z = 374,2 $[M+H]^+$, área del pico > 96 %.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,91 (s, 1H), 10,78 (s, 1H), 9,25 (s, 1H), 8,60 (dd, J = 8,5, 1,2 Hz, 1H), 7,97 (dd, J = 8,0, 1,7 Hz, 1H), 7,64 (ddd, J = 8,7, 7,3, 1,7 Hz, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,26 - 7,18 (m, 1H), 6,81 (s, 1H), 4,08 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,56 (s, 2H), 1,19 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{19}H_{20}NO_7$: 374,12342, encontrado: 374,12333

Biodatos: **IIIa-001a-E2**: IC₅₀ [μ M] de FGF-1 = 200; IC₅₀ [μ M] de FGF-2 = 33; IC₅₀ [μ M] de VEGF-A1 = 43; IC₅₀ [μ M] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = ND; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μ M %] = 69,66; IC₅₀ [μ M] de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 44,46

53) **Ácido (2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxi-fenil)acético**, compuesto **IIIa-001aTz**:

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,87 min; m/z = 356,1 $[M+H]^+$, área del pico > 95 %.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,22 (s, 1H), 11,43 (s, 1H), 10,74 (s, 1H), 9,21 (s, 1H), 8,46 (dd, J = 8,5, 1,2 Hz, 1H), 7,87 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,60 (td, J = 8,6, 7,9, 1,6 Hz, 1H), 7,39 - 7,30 (m, 2H), 6,80 (s, 1H), 3,48 (s, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{14}N_5O_5$: 356,09894, encontrado: 356,09889

Biodatos: **IIIa-001aTz**: IC₅₀ [μ M] de FGF-1 = 51; IC₅₀ [μ M] de FGF-2 = 14; IC₅₀ [μ M] de VEGF-A1 = 12; IC₅₀ [μ M] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 0,71; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μ M %] = 69,35; IC₅₀ [μ M] de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 39,74; Sangre entera: IC₅₀ [μ M] de GM-CSF = > 100; IC₅₀ [μ M] de IFN γ = 18,9; IC₅₀ [μ M] de IL-1 β = >100; IC₅₀ [μ M] de IL-2 = >100; IC₅₀ [μ M] de IL-4 = >100; IC₅₀ [μ M] de IL-5 = >100; IC₅₀ [μ M] de IL-6 = 1,98; IC₅₀ [μ M] de IL-9 = 3,01; IC₅₀ [μ M] de IL-10 = 7,78; IC₅₀ [μ M] de IL-12p70 = 0,48; IC₅₀ [μ M] de IL-13 = 0,15; IC₅₀ [μ M] de IL-17A = 0,17; IC₅₀ [μ M] de IL-17F = 0,16; IC₅₀ [μ M] de IL-18 = 27,7; IC₅₀ [μ M] de IL-21 = 3; IC₅₀ [μ M] de IL-33 = 0,14; IC₅₀ [μ M] de TGF β = >100; IC₅₀ [μ M] de TNF α = 0,31; IC₅₀ [μ M] de TNF β = 0,23.

Éster etílico:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 1,56 min; m/z = 384,2 $[M+H]^+$, área del pico > 95 %.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,34 (s, 1H), 10,73 (s, 1H), 9,25 (s, 1H), 8,45 (dd, J = 8,5, 1,2 Hz, 1H), 7,85 (dd, J = 7,8, 1,6 Hz, 1H), 7,61 (ddd, J = 8,7, 7,4, 1,6 Hz, 1H), 7,39 - 7,30 (m, 2H), 6,80 (s, 1H), 4,08 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,56 (s, 2H), 1,19 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{18}H_{18}N_5O_5$: 384,13024, encontrado: 384,12999

Biodatos: **IIIa-001aTz-E1**: IC50 $[\mu M]$ de FGF-1 = 200; IC50 $[\mu M]$ de FGF-2 = 200; IC50 $[\mu M]$ de VEGF-A1 = 200; IC50 $[\mu M]$ de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 0,32; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 70,03; IC50 $[\mu M]$ de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 91,76

54) **Ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isofáltico**, compuesto **IIIa-013a**:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 0,82 min; m/z = 3760 $[M+H]^+$, área del pico > 89 %.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,67 - 11,48 (m, 3H), 10,82 (s, 1H), 9,19 (s, 1H), 7,95 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,36 (s, 1H), 7,33 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 6,79 (s, 1H), 3,48 (s, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{17}H_{14}NO_9$: 376,06630, encontrado: 376,06638

Biodatos: **IIIa-013a**: IC50 $[\mu M]$ de FGF-1 = 17; IC50 $[\mu M]$ de FGF-2 = 31; IC50 $[\mu M]$ de VEGF-A1 = 43; IC50 $[\mu M]$ de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 1,3; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 76,55; IC50 $[\mu M]$ de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 30,667; Sangre entera: IC50 $[\mu M]$ de GM-CSF = 27,8; IC50 $[\mu M]$ de IFN γ = 0,15; IC50 $[\mu M]$ de IL-1 β = >100; IC50 $[\mu M]$ de IL-2 = 57,1; IC50 $[\mu M]$ de IL-4 = >100; IC50 $[\mu M]$ de IL-5 = >100; IC50 $[\mu M]$ de IL-6 = 3,55; IC50 $[\mu M]$ de IL-9 = 11,9; IC50 $[\mu M]$ de IL-10 = 37,3; IC50 $[\mu M]$ de IL-12p70 = 0,5; IC50 $[\mu M]$ de IL-13 = 0,37; IC50 $[\mu M]$ de IL-17A = 0,15; IC50 $[\mu M]$ de IL-17F = 0,41; IC50 $[\mu M]$ de IL-18 = >100; IC50 $[\mu M]$ de IL-21 = 1,63; IC50 $[\mu M]$ de IL-33 = 1,11; IC50 $[\mu M]$ de TGF β = >100; IC50 $[\mu M]$ de TNF α = 0,51; IC50 $[\mu M]$ de TNF β = 0,89.

55) **Ácido 5-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isofáltico**, compuesto **IIIa-015a**:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 0,93 min; m/z = 376,0 $[M+H]^+$, área del pico > 96 %.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 +10 % D_2O) δ 8,34 (s, 2H), 8,18 (s, 1H), 7,38 (s, 1H), 6,71 (s, 1H), 3,39 (s, 2H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{17}H_{14}NO_9$: 376,06630, encontrado: 376,06665

Biodatos: **IIIa-015a**: IC50 $[\mu M]$ de FGF-1 = 16; IC50 $[\mu M]$ de FGF-2 = 114; IC50 $[\mu M]$ de VEGF-A1 = 202; IC50 $[\mu M]$ de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 0,89; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 78,76; IC50 $[\mu M]$ de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 12,13

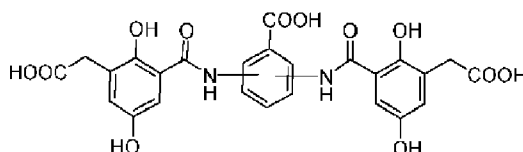
Éster dimetilico de etilo

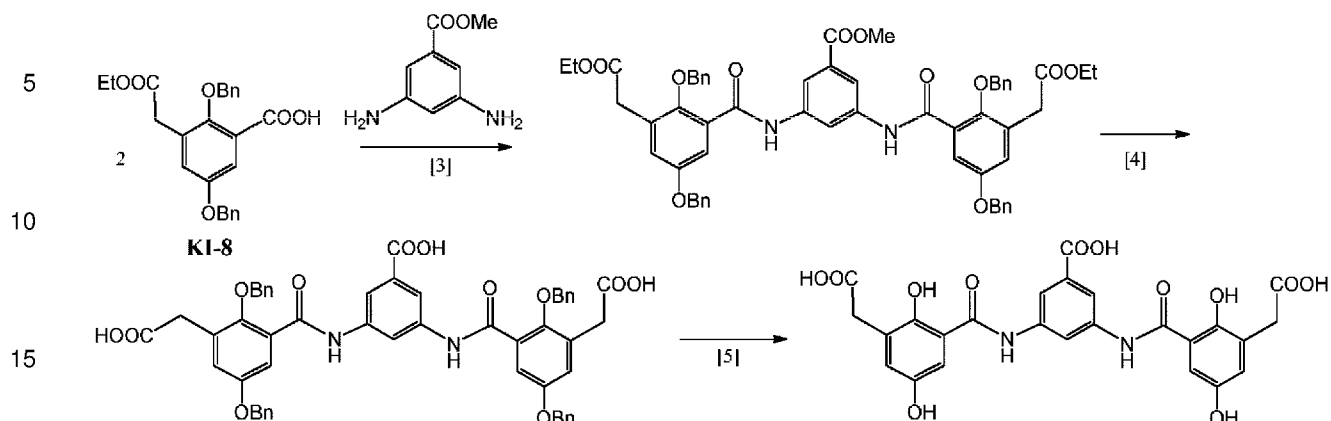
UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 1,69 min; m/z = 432,1 $[M+H]^+$, área del pico > 97 %.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,23 (s, 1H), 8,58 (s, 1H), 8,58 (s, 1H), 8,23 - 8,21 (m, 1H), 7,31 (s, 1H), 6,81 (s, 1H), 4,08 (q, J = 7,0 Hz, 2H), 3,91 (s, 6H), 3,58 (s, 2H), 1,19 (t, J = 7,1 Hz, 3H), HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{21}H_{22}NO_9$: 432,12891, encontrado: 432,02903

Biodatos: **IIIa-015a-E3**: IC50 $[\mu M]$ de FGF-1 = N.D.; IC50 $[\mu M]$ de FGF-2 = 191; IC50 $[\mu M]$ de VEGF-A1 = 87; IC50 $[\mu M]$ de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 7,2; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 91,37; IC50 $[\mu M]$ de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 61,22

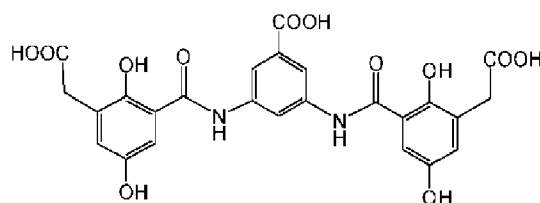
Ejemplo 1.9. Moléculas de tipo IIIb: Diamidas a partir de diaminas, 1 ejemplo



Esquema 15. Síntesis de diamidas de tipo IIIb

Procedimiento: ver el procedimiento general de los pasos [3], [4], [5] de **KI-1**

Por ejemplo:



Para condiciones y rendimientos: Ver la tabla 3 (figura 6)

56) **Ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-4-carboximetilbenzoilamino)benzoico**, compuesto **IIIb-010a**:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 1,08 min; m/z = 539,2,1 [M-H]⁻, área del pico 80 %.

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,85 (brs, 2H), 10,57 (brs, 2H), 9,20 (s, 2H), 8,26 (m, 1H), 8,09 (d, *J* = 2,0 Hz, 2H), 7,36 (s, 2H), 6,82 (s, 2H), 3,50 (s, 4H).

HRMS: [M+H]⁺, calculado para C₂₃H₁₇N₂O₁₂: 513,07760, encontrado: 513,07774

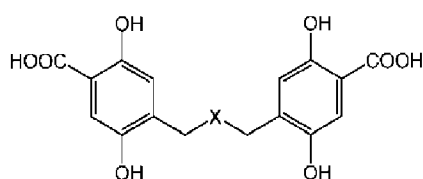
Éster trietilico

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 1,81 min; m/z = 623,3 [M-H]⁻, o área del pico 94 %.

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,87 (s, 2H), 10,65 (s, 2H), 9,23 (s, 2H), 8,31 - 8,28 (m, 1H), 8,10 (d, *J* = 2,0 Hz, 2H), 7,35 (s, 2H), 6,81 (s, 2H), 4,35 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 4,08 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H), 3,58 (s, 4H), 1,35 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,19 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H).

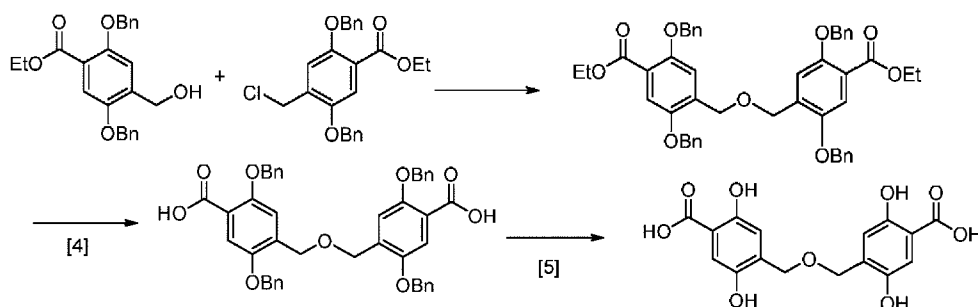
Biodatos: **IIIb-010a-E3**: IC₅₀ [μM] de FGF-1 = 200; IC₅₀ [μM] de FGF-2 = 200; IC₅₀ [μM] de VEGF-A1 = 200; IC₅₀ [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 0,65; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%] = N.D.; IC₅₀ de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 0

Ejemplo 1.10: Moléculas de tipo IIIc. Dímeros, 6 ejemplos



Esquemas y procedimientos sintéticos

Esquema 16: X=O



Procedimientos sintéticos

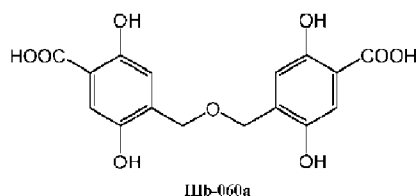
Formación de enlaces de éter a partir de **KI-10** y **KI-11**

2,5-dibenciloxi-4-[(2,5-dibenciloxi-4-etoxicarbonilfenil)metoximetil]benzoato de etilo [Paso 1]: A una solución de **HI-11** (340 mg, 0,83 mmol) y **KI-10** (250 mg, 0,64 mmol) en DMF (6 ml), enfriada en un baño de hielo, se añadió hidruro de sodio en porciones (76 mg, 1,9 mmol). Después de 1 h, la mezcla de reacción se vertió en una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (50 ml) y el material se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml), la fase orgánica se lavó adicionalmente con agua (2 x 50 ml) y salmuera (50 ml), se secó con sulfato de sodio y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (hexanos/EtOAc del 0 al 20 %) para dar el compuesto del título (161 mg, rendimiento del 33 %) como un sólido de color marrón.

Procedimientos de desprotección:

Ver los procedimientos generales [4], [5]

Por ejemplo



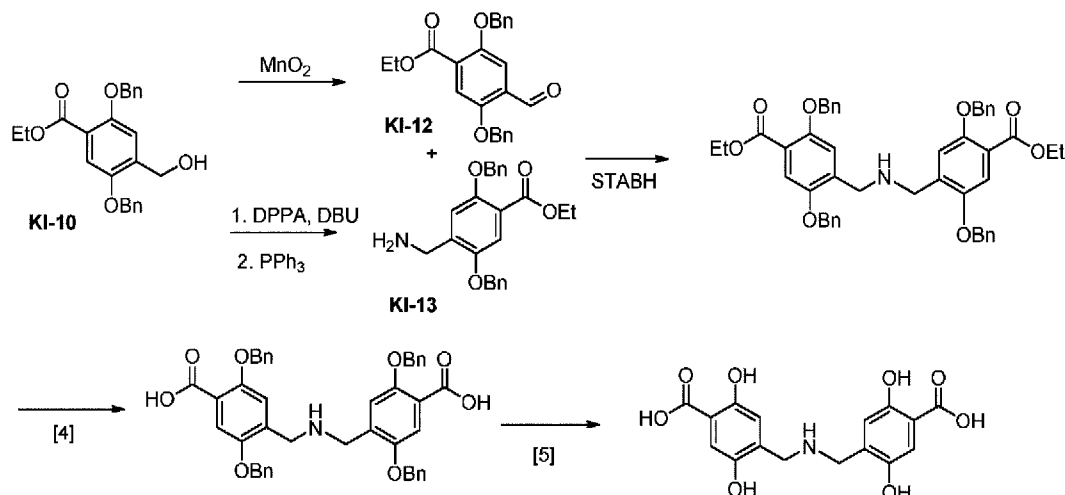
Para condiciones y rendimientos: Ver la tabla 4 (desprotecciones) (figura 7)

57) **Ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-carboxifenil)metoximetil)-2,5-dihidroxi benzoico**, compuesto **IIIc-060a**:

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 0,94 min; m/z = 349,1 $[M-H]^-$, área del pico > 90 %.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,20 (s, 2H), 6,92 (s, 2H), 4,56 (s, 4H),

Biodatos: **IIIc-060a**: IC₅₀ [μ M] de FGF-1 = 200; IC₅₀ [μ M] de FGF-2 = 51; IC₅₀ [μ M] de VEGF-A1 = 114; IC₅₀ [μ M] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 1,3; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μ M [%] = 86,84; IC₅₀ de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 41,38

Esquema 17: X = NH**Procedimientos sintéticos**

Formación de enlaces amínicos a partir de KI-12 y KI-13 a través de KI-10 y KI-11

2,5-bis(benciloxi)-4-formilbenzoato de etilo (KI-12): A una solución de KI-10 (3,4 g, 8,6 mmol) en diclorometano (50 ml) se añadió dióxido de manganeso (4,5 g, 51,9 mmol). La suspensión resultante se agitó a reflujo durante 4 h. La reacción se filtró a través de una capa de Celite® y el sólido se lavó con diclorometano (300 ml), el disolvente se retiró después a presión reducida para dar el compuesto del título (3,2 g, rendimiento del 94 %) como un sólido amarillento.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,33 min; m/z = sin iones, área del pico > 93 %

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10,39 (s, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,54 - 7,26 (m, 11H), 5,28 (s, 2H), 5,20 (s, 2H), 4,30 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 1,27 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

4-(azidometil)-2,5-bis(benciloxi)benzoato de etilo: A una suspensión de KI-10 (3,0 g, 7,6 mmol) y 1,8-diazabicyclo [5.4.0]undec-7-eno (DBU) (1,5 ml, 9,9 mmol) en tolueno (30 ml) se añadió difenilfosforil azida (DPPA, por sus siglas en inglés) (2 ml, 9,1 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. Se añadió una solución acuosa de cloruro de hidrógeno de 1 M (200 ml) y el producto se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml), las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 50 ml), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (hexanos/EtOAc del 0 al 20 %) para producir el compuesto del título (3,1 g, 98 %) como un aceite incoloro que se convirtió en un sólido blanco con el tiempo.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,37 min; m/z = 390,2, $[\text{M}+\text{H}-\text{N}_2]^+$, área del pico > 93 %

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,53 - 7,46 (m, 4H), 7,44 - 7,26 (m, 8H), 5,16 (s, 2H), 5,14 (s, 2H), 4,48 (s, 2H), 4,26 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 1,25 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

4-(aminometil)-2,5-bis(benciloxi)benzoato de etilo (KI-13): A una solución de 4-(azidometil)-2,5-bis(benciloxi)benzoato de etilo (2,8 g, 6,7 mmol) en THF (60 ml) y agua (6 ml) se añadió trifetilfosfina unida a polímero (4,7 g, carga de ~3 mmol/g) y la mezcla resultante se dejó agitar a temperatura ambiente durante 18 h. La resina se retiró mediante filtración y se lavó con agua (100 ml) y EtOAc (2 x 100 ml). Las fases se separaron y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con EtOAc (100 ml), las capas orgánicas recogidas se lavaron con salmuera (200 ml), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron para dar el compuesto del título (KI-13) (1,8 g, rendimiento del 70 %) como un sólido blanco.

UPLC-MS (método básico, 2 min): t.a. = 1,20 min; m/z = 392,2, $[\text{M}+\text{H}]^+$, área del pico > 93 %

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,60 - 7,22 (m, 12H), 5,14 (s, 2H), 5,10 (s, 2H), 4,24 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,75 (s, 2H), 1,25 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

2,5-dibenciloxi-4-[(2,5-dibenciloxi-4-etoxicarbonilfenil)metilaminometil]benzoato de etilo: El KI-12 (500 mg, 1,3 mmol) y el KI-13 (641 mg, 1,6 mmol) se disolvieron en DCM (35 ml), seguido de la adición de tamices moleculares activados (10 perlas). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. Después se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (654 mg, 3,1 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. Se añadió DCM (25 ml), la mezcla de reacción se decantó en un embudo de separación y se lavó con agua (50 ml), se secó con sulfato de sodio y se concentró

a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (hexanos/EtOAc del 0 al 50 %) para producir el compuesto del título (631 mg, rendimiento del 64 %) como un aceite incoloro que se solidificó con el tiempo.

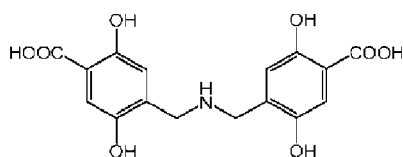
UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,37 min; m/z = 766,3, $[M+H]^+$, área del pico > 92 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,47 - 7,42 (m, 4H), 7,38 - 7,25 (m, 20H), 5,08 (s, 4H), 5,04 (s, 4H), 4,25 (q, J = 7,1 Hz, 4H), 3,76 (s, 4H), 1,25 (t, J = 7,1 Hz, 6H).

Procedimientos de desprotección: Ver los procedimientos generales [4], [5]

Para condiciones y rendimientos: Ver la figura 7.

Por ejemplo



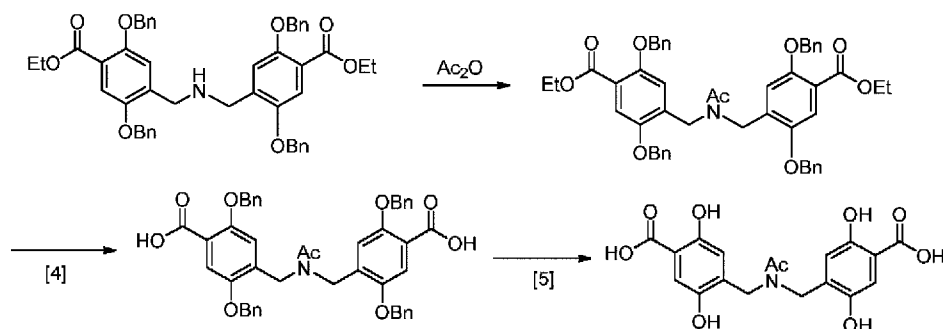
58) **bis(4-carboxy-2,5-dihydroxyfenilmetil)amina**, compuesto **IIIc-056a**:

OPUPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 0,57 min; m/z = 350,0 $[M+H]^+$, área del pico > 96 %.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,97 (s, 2H), 9,08 (s, 2H), 7,31 (s, 2H), 7,02 (s, 2H), 4,11 (s, 4H). HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{16}H_{16}NO_8$: 350,08704, encontrado: 350,08706

Biodatos: **IIIc-056a**: IC50 [μ M] de FGF-1 = 200; IC50 [μ M] de FGF-2 = 35; IC50 [μ M] de VEGF-A1 = 200; IC50 [μ M] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = ND; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μ M] = 90,07; IC50 de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 35

Esquema 18: X = NAc



Procedimientos sintéticos

N,N-bis-[2,5-dibenciloxi-4-etoxicarbonilfenilmetil]acetamida: A una solución de N,N-bis-[2,5-dibenciloxi-4-etoxicarbonilfenilmetil]amina (300 mg, 0,39 mmol) y piridina (0,2 ml, 2,4 mmol) en DCM (6 ml), en una atmósfera de nitrógeno, se añadió anhídrido acético (0,2 ml, 2,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (hexanos/EtOAc, del 0 al 50 %) para dar el compuesto del título (316 mg, rendimiento del 92 %) como un aceite incoloro.

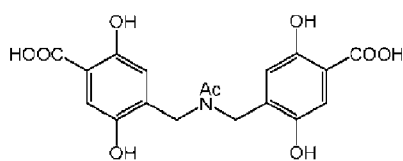
UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,44 min; m/z = 808,2 $[M+H]^+$, área del pico > 95 %.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,49 - 7,17 (m, 22H), 6,92 (s, 1H), 6,72 (s, 1H), 5,03 (s, 2H), 5,00 (s, 2H), 4,96 (s, 2H), 4,94 (s, 2H), 4,46 (s, 4H), 4,31 - 4,16 (m, 4H), 1,96 (s, 3H), 1,28 - 1,20 (m, 6H).

Procedimientos de desprotección:

Ver los procedimientos generales [4], [5]

Por ejemplo



Para condiciones y rendimientos: Ver la figura 7 (desprotecciones)

59) **N,N-bis(4-carboxi-2,5-dihidroxiifenilmetil)acetamida**, compuesto **IIIc-057a**:

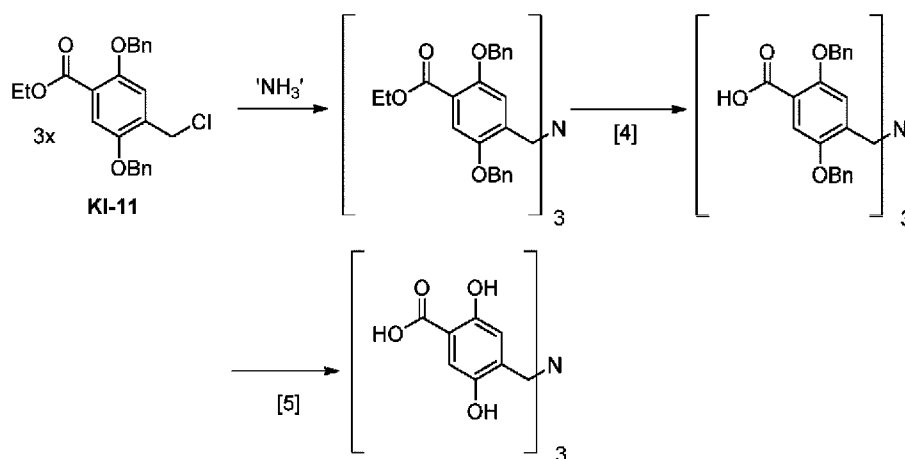
UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 0,84 min; m/z = 392,1 $[M+H]^+$, área del pico > 99 %.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,50 (s, 1H), 9,34 (s, 1H), 7,22 (s, 1H), 7,17 (s, 1H), 6,63 (s, 1H), 6,53 (s, 1H), 4,48 (s, 2H), 4,39 (s, 2H), 2,11 (s, 3H).

HRMS: $[M+H]^+$, calculado para $C_{18}H_{18}NO_9$: 392,09761, encontrado: 392,09766

Biodatos: **IIIc-057a**: IC50 $[\mu M]$ de FGF-1 = 87; IC50 $[\mu M]$ de FGF-2 = 77; IC50 $[\mu M]$ de VEGF-A1 = 38; IC50 $[\mu M]$ de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 0,2; PMN ROS [inhibición a 0,3 μM %] = 90,34; IC50 de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 40,04; Sangre entera: IC50 $[\mu M]$ de GM-CSF = > 100; IC50 $[\mu M]$ de IFN γ = 0,9; IC50 $[\mu M]$ de IL-1 β = 16,2; IC50 $[\mu M]$ de IL-2 = 24,2; IC50 $[\mu M]$ de IL-4 = >100; IC50 $[\mu M]$ de IL-5 = >100; IC50 $[\mu M]$ de IL-6 = 0,19; IC50 $[\mu M]$ de IL-9 = 11,1; IC50 $[\mu M]$ de IL-10 = >100; IC50 $[\mu M]$ de IL-12p70 = 0,73; IC50 $[\mu M]$ de IL-13 = 4,73; IC50 $[\mu M]$ de IL-17A = 1,32; IC50 $[\mu M]$ de IL-17F = 5,06; IC50 $[\mu M]$ de IL-18 = >100; IC50 $[\mu M]$ de IL-21 = 1,56; IC50 $[\mu M]$ de IL-33 = 2,93; IC50 $[\mu M]$ de TGF β = >100; IC50 $[\mu M]$ de TNF α = 0,15; IC50 $[\mu M]$ de TNF β = 1,58.

Esquema 19: X = $NCH_2C_6H_3(OH)_2COOH$



Procedimientos sintéticos

Formación de amina terciaria a partir de KI-11 y NH_3

50 **tris(4-etoxicarboni-2,5-dibenciloxifenilmetil)amina**: Un tubo sellado se cargó con **KI-11** (32,5 g, 79 mmol), yoduro de sodio (0,79 g, 5 mmol), una solución de amoníaco en MeOH (7 N) (38 ml, 264 mmol) y EtOAc (80 ml). Después, el tubo se cerró herméticamente y la mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 24 h. Después de 24 h, se consumió el material de partida (**KI-11**) y la mezcla de reacción contenía el producto deseado, pero también estructuras monoméricas y diméricas. Se añadió agua (100 ml) y la mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml), la capa orgánica recogida se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en EtOAc (165 ml) y se añadieron **KI-11** (2,5 g, 6 mmol), yoduro de sodio (0,79 g, 5 mmol), DIPEA (10 ml, 58 mmol) y la solución resultante se calentó a 60 °C. Después de 18 h, se añadió agua (100 ml) y la mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml), la capa orgánica recogida se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante recristalización utilizando EtOH/EtOAc 95/5 (20 ml) como disolvente para dar el compuesto del título (15,0 g, 50 %) como cristales blancos.

UPLC-MS (método básico, 2 min): t.a. = 1,71 min; m/z = 1140,3 $[M+H]^+$, área del pico > 99 %.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 6,56 - 6,49 (m, 12H), 6,48 - 6,38 (m, 24H), 4,22 (s, 6H), 4,04 (s, 6H), 3,42 (q, J = 7,1 Hz, 6H), 3,00 (s, 6H), 0,42 (t, J = 7,1 Hz, 9H).

Alternativamente, el producto puede purificarse mediante cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice: escala, hasta 270 g; Instrumento: Torrente *flash* combinado; cartucho: Columna RediSep, sílice, 3 k; tipo de carga: El bruto se disolvió en 1 litro de heptano: tolueno (1:1). Elución con acetato de etilo/heptano. Detección: UV - 240 nm

5 Procedimientos de desprotección: Ver los procedimientos generales [4], [5]

Para condiciones y rendimientos: Ver la figura 7 (desprotecciones)

Procedimientos de desprotección a gran escala, alternativos:

10

Saponificación. Se añadieron tris(4-etoxicarboni-2,5-dibenciloxifenilmetil)amina (95,00 g, 0,083 mol), hidróxido de sodio (40,00 g, 0,99 mol), agua (570 ml) y tetrahidrofurano (1,9 l) a un matraz de fondo redondo de 5 l. La mezcla de reacción se calentó, utilizando un bloque de temperatura, a 80 °C (la temperatura de reflujo fue de 65 °C) durante 48 h y después se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Los disolventes se retiraron después a vacío. El material bruto se recolectó y se diluyó adicionalmente con agua (2,85 l). En otro matraz de 10 l, una mezcla de ácido acético (180 ml) y agua (950 ml) se agitó a t.a. La mezcla del producto bruto en agua se añadió a la mezcla de ácido acético durante un período de 30 minutos mientras se agitaba con un agitador superior, y precipitó un sólido de color crema. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h adicional y el sólido se aisló tras la filtración; el pH del licor madre era 4,2. El sólido aislado se agitó con agua (1425 ml) durante 1 h y después se filtró. El pH del licor madre fue de 4,5. El sólido recuperado se agitó con más agua (1425 ml) durante 1 h y después se filtró; el pH del licor madre fue de 4,5 %. El sólido anterior se agitó con acetona (950 ml) durante 1 h y se filtró. El sólido de color crema se secó en el horno de vacío a 50 °C durante 48 h antes del análisis (82,00 g, rendimiento del 93 %) (los rendimientos varían entre el 90 y el 95 %).

15

20

25

Nota: El pH es un parámetro crítico durante los lavados para mantener el producto como ácido libre y eliminar el exceso de ácido acético del producto.

pH ideal: 4,2 a 4,5 (el contenido final de sodio varía entre 2 ppm y 20 ppm).

30

Hidrogenólisis y aislamiento. La tris(4-carboxi-2,5-dibenciloxifenilmetil)amina (58,00 g, 54,00 mmol, leq) y el tetrahidrofurano (1160 ml) se cargaron en un matraz de fondo redondo de 2 litros. La mezcla se desgasificó con nitrógeno, después se purgó con un ciclo de hidrógeno/vacío 4-5 veces. Se añadió paladio sobre carbono (JM 10 % 424 Pd/C, 70 g, 15 % de carga) a la mezcla de reacción y se agitó a 25 °C durante 5-6 h. La reacción se desgasificó después y el catalizador se retiró mediante filtración a través de una capa de celite, que se lavó con tetrahidrofurano (3 x 1160 ml). Finalmente, los filtrados se concentraron a presión reducida. El sólido bruto se recogió, se agitó con heptano (1160 ml) y se filtró para dar un sólido gris, que se secó en el horno de vacío a 50 °C durante la noche (32,50 g, > 100 % de rendimiento en bruto). El material bruto recogido se disolvió en etanol (325 ml) y se calentó a 60 °C (solución transparente). A continuación, se añadió agua lentamente (325 ml) a 60 °C (manteniendo la temperatura al menos a 50 °C durante la adición) durante un período de 15-20 min. En esta etapa se observó un líquido turbio. La mezcla de reacción turbia se agitó a temperatura de reflujo durante 30 min.

35

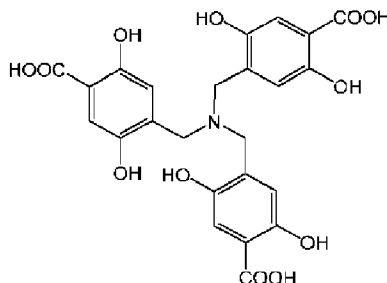
40

Después de este tiempo, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente durante otros 30 min. El sólido precipitado se aisló tras la filtración y se lavó con una mezcla 1:1 de etanol: agua (66 ml). El sólido se secó en el horno de vacío a 50 °C durante al menos 72 h antes del análisis, para proporcionar el producto deseado **IIIc-061a** (22,00 g, rendimiento del 76 %) (el rendimiento varía entre el 65 y el 75 %). LCMS: > 95 %, RMN: > 95 % de pureza.

45

50

55



Tris(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina, compuesto **IIIc-061a**:

60

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 0,74 min; m/z = 516,0 $[M+H]^+$, área del pico > 86 %.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,27 (s, 3H), 6,83 (s, 3H), 4,33 (s, 6H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 172,0, 154,3, 148,3, 134, 117,8 (CH), 114,9 (CH), 112,4, 53,6 (CH₂). HRMS: $[M+H]^+$, calculado para C₂₄H₂₂NO₁₂: 516,11365, encontrado: 516,11389

65

Biodatos: **IIIc-061a**: IC50 [μM] de FGF-1 = 9; IC50 [μM] de FGF-2 = 7,6; IC50 [μM] de VEGF-A1 = 21; IC50 [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 4,3; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 92,5; IC50 [μM] de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 58,69; Sangre entera: IC50 [μM] de GM-CSF = 31,2; IC50 [μM] de IFNγ = 2,48; IC50 [μM] de IL-1β = >100; IC50 [μM] de IL-2 = >100; IC50 [μM] de IL-4 = >100; IC50 [μM] de IL-5 = >100; IC50 [μM] de IL-6 = 0,18; IC50 [μM] de IL-9 = 8,85; IC50 [μM] de IL-10 = 17,9; IC50 [μM] de IL-12p70 = 37,2; IC50 [μM] de IL-13 = 0,31; IC50 [μM] de IL-17A = 0,04; IC50 [μM] de IL-17F = 0,32; IC50 [μM] de IL-18 = 32,4; IC50 [μM] de IL-21 = 6,38; IC50 [μM] de IL-33 = 0,31; IC50 [μM] de TGFβ = >100; IC50 [μM] de TNF α = 0,03; IC50 [μM] de TNF β = 0,81

Éster trietilico

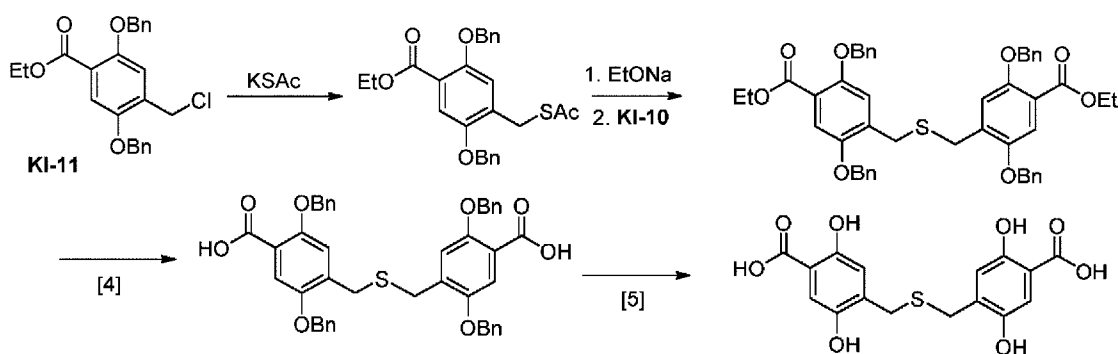
UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,05 min; m/z = 600,2 [M+H]⁺, área del pico > 82 %.

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,02 (s, 3H), 9,54 (s, 3H), 7,17 (s, 3H), 7,00 (s, 3H), 4,33 (q, J = 7,1 Hz, 6H), 3,59 (s, 6H), 1,31 (t, J = 7,1 Hz, 9H).

HRMS: [M+H]⁺, calculado para C₃₀H₃₄NO₁₂: 600,20755, encontrado: 600,20790

Biodatos: **IIIc-061a-E3**: IC50 [μM] de FGF-1 = 200; IC50 [μM] de FGF-2 = 200; IC50 [μM] de VEGF-A1 = 200; IC50 [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 0,34; ROS de PMN [inhibición a 0,3 % μM [%]] = N.D.; IC50 [μM] de inhibición de ROS de PMN = N.D.; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 10,4

Esquema 20: X = S



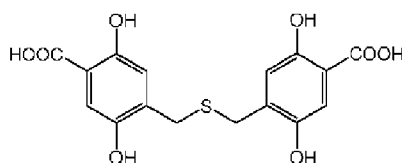
Procedimientos sintéticos

Formación del enlace tioéter a partir del KI-11

Ver el **esquema 21**. Las mismas condiciones para crear el enlace tioéter.

Procedimientos de desprotección: ver los procedimientos generales [4], [5]

Por ejemplo



Para condiciones y rendimientos: Ver la figura 7 (desprotecciones)

60) **Ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-carboxifenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxi-4-carboxibenzoico**, compuesto **IIIc-058a**:

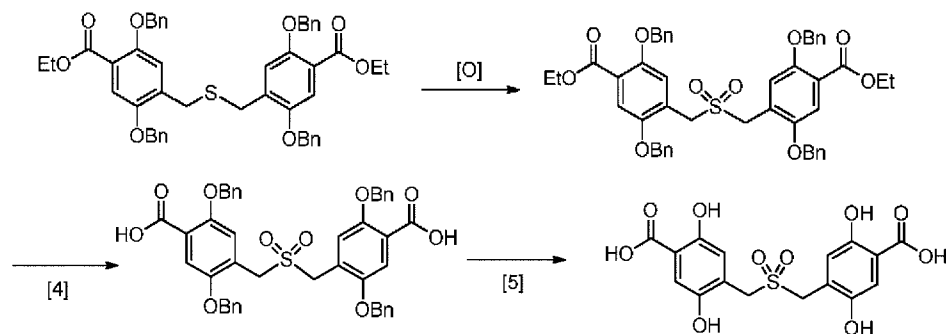
UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,84 min; m/z = 365,1 [M-H], área del pico > 79 %

RMN de ¹H (400 MHz, metanol-d₄) δ 7,25 (s, 2H), 6,83 (s, 2H), 3,69 (s, 4H).

HRMS: [M+H]⁺, calculado para C₁₆H₁₅O₈S: 367,04822, encontrado: 367,04768,

Biodatos: **IIIc-058a**: IC₅₀ [μM] de FGF-1 = 12; IC₅₀ [μM] de FGF-2 = 12; IC₅₀ [μM] de VEGF-A1 = 124; IC₅₀ [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 0,29; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%] = 61,22; IC₅₀ [μM] de inhibición de ROS de PMN = 1,17; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 23

Esquema 21: X = SO₂



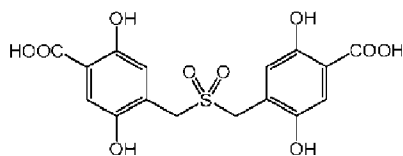
Procedimientos sintéticos

Oxidación del enlace tioéter

Ver la preparación del **IVc-059a**: mismas condiciones de oxidación.

Procedimientos de desprotección: ver los procedimientos generales [4], [5]

Por ejemplo



Para condiciones y rendimientos: Ver la figura 7 (desprotecciones)

61) **Ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-carboxifenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxi benzoico**, compuesto **IIIc-059a**:

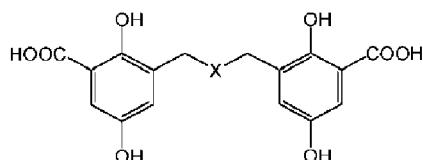
UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,72 min; m/z = 397,1 [M-H]⁻, área del pico > 97 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,94 (brs, 2H), 10,63 (brs, 2H), 9,71 (s, 2H), 7,27 (s, 2H), 6,91 (s, 2H), 4,44 (s, 4H).

HRMS: [M+H]⁺, calculado para C₁₆H₁₅O₁₀S: 399,03804, encontrado: 399,03768

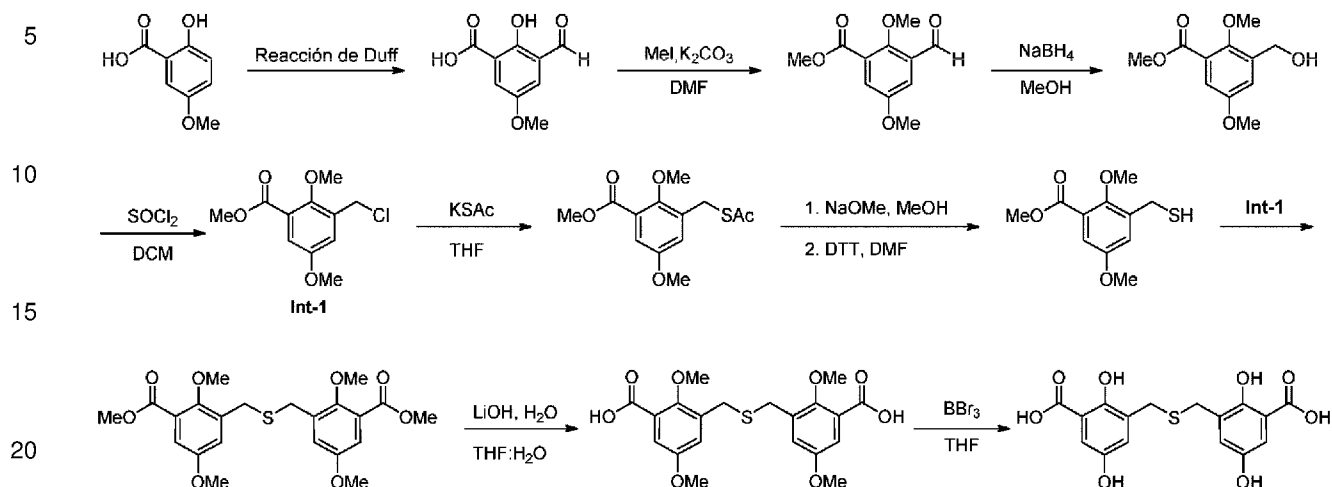
Biodatos: **IIIc-059a**: IC₅₀ [μM] de FGF-1 = 47; IC₅₀ [μM] de FGF-2 = 50; IC₅₀ [μM] de VEGF-A1 = 200; IC₅₀ [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 3,61; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%] = 66,39; IC₅₀ [μM] de inhibición de ROS de PMN = 1; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 14,67

Ejemplo 1.11: Compuestos de tipo IVc



Esquema 22: X=S

Síntesis mediante éter dimetílico



Procedimientos sintéticos

Síntesis a partir del ácido 5-O-metilgentísico

Ácido 3-formil-2-hidroxi-5-metoxibenzoico. Se añadió hexametilentetramina (40,019 g, 0,285 mol) a la mezcla de ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico (24,0 g, 0,143 mol) en ácido trifluoroacético (190,0 ml). La reacción se calentó a reflujo durante 18 h. Después de completarse, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió una solución de ácido clorhídrico de 2 M (700 ml) a la mezcla, que se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. El precipitado se filtró, se lavó con agua (500 ml) y se secó en el horno de vacío para dar ácido 3-formil-2-hidroxi-5-metoxibenzoico como un sólido de color amarillo pálido (21,30 g, 0,11 mol, 77,0 %)

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,69 min; m/z = 195,1 [M-H], área del pico > 98 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,36 (s, 1H), 7,62 (d, J = 3,4 Hz, 1H), 7,44 (d, J = 3,4 Hz, 1H), 3,78 (s, 3H).

3-formil-2,5-dimetoxibenzoato de metilo. Se añadió yoduro de metilo (6,7 ml, 0,107 mol) a una mezcla de ácido 3-formil-2-hidroxi-5-metoxibenzoico (10,0 g, 0,05 mol) y malla 325 de carbonato de potasio (28,18 g, 0,20 mol) en DMF (100,0 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se trató con agua fría (400 ml) dando como resultado la formación de un precipitado. La suspensión resultante se agitó durante 10 minutos, después se filtró y se secó en el horno de vacío para dar 3-formil-2,5-dimetoxibenzoato de metilo como un sólido amarillo (8,90 g, 0,04 mol, 78,0 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,95 min; m/z = 225,1 [M+H] $^+$, área del pico > 98 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,27 (s, 1H), 7,55 (d, J = 3,4 Hz, 1H), 7,41 (d, J = 3,4 Hz, 1H), 3,88 (s, 3H), 3,87 (s, 3H), 3,83 (s, 3H).

3-(hidroximetil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo. Se añadió borohidruro de sodio (16,198 g, 0,428 mol) lentamente a una solución de 3-formil-2,5-dimetoxibenzoato de metilo (48,0 g, 0,214 mol) en MeOH (900 ml) a 0 °C y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. El disolvente se retiró al vacío y el residuo se disolvió en DCM (200 ml) y después se lavó con agua (200 ml). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró, y se concentró hasta sequedad para dar 3-(hidroximetil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo como un sólido blanco (45,6 g, 0,20 mol, 95,0 %)

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,84 min; sin ionización, área del pico > 98 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,20 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 7,08 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 5,24 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 4,54 (d, J = 5,6 Hz, 2H), 3,83 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,68 (s, 3H).

3-(clorometil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo. Se añadió cloruro de tionilo (17,2 ml, 0,235 mol) gota a gota a una solución de 3-(hidroximetil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo (45,60 g, 0,20 mol) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante 18 h a temperatura ambiente. Una vez completada, la mezcla de reacción se lavó con una solución saturada de carbonato de sodio acuoso (3 x 500 ml) y salmuera (500 ml). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró hasta sequedad para dar 3-(clorometil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo como un sólido marrón (49,1 g, 0,18 mol, 90 %)

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,10 min; sin ionización, área del pico > 92 %

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,29 (d, $J = 3,2$ Hz, 1H), 7,22 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H), 4,74 (s, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,77 (s, 3H), 3,76 (s, 3H).

3-(acetiltiometil)-2,5/dimetoxibenzoato de metilo. Se añadió tioacetato de potasio (15,54 g, 0,136 mol) a la solución de 3-(clorometil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo (22,20 g, 0,091 mol) en THF (500,0 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a 75 °C durante 18 h. Después de completarse, el disolvente se retiró a presión reducida para dar un residuo oleoso rojo que se trató con una solución saturada de salmuera (500 ml) y después se extrajo con éter dietílico (2 x 250 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron hasta sequedad para producir 3-(acetiltiometil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo como un sólido marrón (25,50 g, 0,09 mol, 99 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,10 min; sin ionización, área del pico > 92 %

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,12 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H), 7,10 (d, $J = 3,2$ Hz, 1H), 4,10 (s, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 3,70 (s, 3H), 2,35 (s, 3H).

3-(mercaptometil)-2,5/dimetoxibenzoato de metilo. A una solución de 3-(acetiltiometil)-2,5/dimetoxibenzoato de metilo (25,5 g, 89,68 mmol) en metanol seco (800 ml) se añadió gota a gota a 0 °C, una solución de metanolato de sodio (5,81 g, 107,62 mmol) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos antes de enfriarse con la resina de intercambio iónico Dowex X8 (H^+) y se agitó durante 15 minutos. Después de la filtración, el disolvente se evaporó a presión reducida para dar el producto bruto como un aceite marrón (que contenía el producto deseado y el correspondiente compuesto disulfuro en una proporción de 2:1). El residuo se disolvió en DMF (400,0 ml) y se trató con ditiotreitól (DTT) (33,95 g, 0,26 mol) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a 75 °C durante 18 h. Después de completar la conversión de disulfuro en tiol, el disolvente se evaporó. El residuo resultante se disolvió en DCM (1 l), se lavó con salmuera (7 x 500 ml), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró hasta sequedad para producir 3-(mercaptometil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo homogéneo como un aceite marrón (21,40 g, 88,32 mmol, 99 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,05 min; $m/z = 243,1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, área del pico > 95 %

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,19 (d, $J = 3,2$ Hz, 1H), 7,09 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H), 3,83 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 3,71 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 2,93 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H).

3,3'-(tiobis(metileno))bis(2,5dimetoxibenzoato) de dimetilo. Se añadió trietilamina (19,0 ml, 136,61 mmol) a una solución de 3-(mercaptometil)-2,5/dimetoxibenzoato de metilo (21,40 g, 88,32 mmol) y 3-(clorometil)-2,5-dimetoxibenzoato de metilo (22,69 g, 92,74 mmol) en una atmósfera de nitrógeno. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. Después de completarse, el disolvente se retiró al vacío para dar un residuo oleoso marrón que se trató con agua (1 l), después se extrajo con éter dietílico (3 x 500 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera (5 x 250 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron hasta sequedad para producir el producto bruto como un aceite marrón, que se purificó mediante cromatografía en gel de sílice: la elución se realizó con un gradiente de acetato de etilo (del 0 al 20 %) en isohexano para producir 3,3'-(tiobis(metileno))bis(2,5-dimetoxibenzoato) de dimetilo como un sólido marrón (29,9 g, 66,37 mmol, 76 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,22 min; $m/z = 451,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, área del pico > 92 %

^1RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,12 - 7,08 (m, 4H), 3,83 (s, 6H), 3,76 (s, 4H), 3,73 (s, 6H), 3,67 (s, 6H).

ácido 3,3'-(tiobis(metileno))bis(2,5/dimetoxibenzoico). Se añadió una solución de hidróxido de litio monohidratado (1,0 g, 23,83 mmol) en agua (30,0 ml) a la solución de 3,3'-(tiobis(metileno))bis(2,5-dimetoxibenzoato) de dimetilo (2,0 g, 4,44 mmol) en THF (100,0 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. Una vez completada, se añadió agua (100 ml) a la reacción y la mezcla se lavó con acetato de etilo (100 ml). La capa acuosa se acidificó con ácido clorhídrico acuoso de 1 M hasta pH = 2 y se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml). Las capas orgánicas se recogieron, se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se concentraron para dar el ácido 3,3'-(tiobis(metileno))bis(2,5-dimetoxibenzoico) como un sólido marrón (1,91 g, 4,11 mmol, 93 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,93 min; $m/z = 421,1$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, área del pico > 95 %

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12,96 (s, 2H), 7,10 (d, $J = 3,3$ Hz, 2H), 7,08 (d, $J = 3,2$ Hz, 2H), 3,76 (s, 4H), 3,73 (s, 6H), 3,69 (s, 6H).

Ácido 3-[(2,5dihidroxi-3-carboxifenil)metiltiometil]-2,5/dihidroxibenzoico. A una solución del tioéter anterior (5,0 g, 0,01 mol) en DCM (200,0 ml) se añadió lentamente una solución de 1 M de tribromoborano en DCM (100,7 ml, 0,101 mol) a 0 °C y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 48 h. Después de este tiempo, el sólido se filtró, se lavó con DCM (500 ml) y después se suspendió en una solución de ácido clorhídrico de 1 M (50 ml). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 2 h. La suspensión marrón resultante se filtró y se secó para dar el producto bruto, que se purificó

mediante cromatografía en columna de fase inversa (25 g, MeCN:H₂O del 5 % al 95 % sobre 12 CV) para producir ácido 2,5/dihidroxi-3-[(2,5/dihidroxi-3-carboxifenil)metiltiometil]benzoico como un sólido blanco (1,1 g, 0,003 mol, 26 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,70 min; m/z = 365,1 [M-H]⁻, área del pico > 95 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,86 (s, 2H), 11,09 (s, 2H), 9,14 (s, 2H), 7,08 (d, *J* = 3,1 Hz, 2H), 7,02 (d, *J* = 3,1 Hz, 2H), 3,65 (s, 4H).

Ejemplo:

62) **Ácido 3-((2,5/dihidroxi-3-carboxifenil)metiltiometil)-2,5/dihidroxibenzoico, compuesto IVc-058a:**

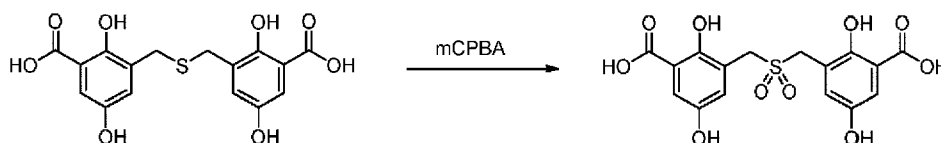
UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,70 min; m/z = 365,1 [M-H]⁻, área del pico > 95 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,86 (s, 2H), 11,09 (s, 2H), 9,14 (s, 2H), 7,08 (d, *J* = 3,1 Hz, 2H), 7,02 (d, *J* = 3,1 Hz, 2H), 3,65 (s, 4H).

HRMS: [M+H]⁺, calculado para C₁₆H₁₅O₈S: 367,04822, encontrado: 367,04734

Biodatos: **IVc-058a**: IC₅₀ [μM] de FGF-1 = 36; IC₅₀ [μM] de FGF-2 = 4,9; IC₅₀ [μM] de VEGF-A1 = 83; IC₅₀ [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 0,53; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%] = 77,04; IC₅₀ [μM] de inhibición de ROS de PMN = 0,29; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 43,5; Sangre entera: IC₅₀ [μM] de GM-CSF = > 100; IC₅₀ [μM] de IFNγ = 10,6; IC₅₀ [μM] de IL-1β = 27,5; IC₅₀ [μM] de IL-2 = 3,82; IC₅₀ [μM] de IL-4 = >100; IC₅₀ [μM] de IL-5 = >100; IC₅₀ [μM] de IL-6 = 0,21; IC₅₀ [μM] de IL-9 = 31,1; IC₅₀ [μM] de IL-10 = 16,4; IC₅₀ [μM] de IL-12p70 = 4,23; IC₅₀ [μM] de IL-13 = 55,9; IC₅₀ [μM] de IL-17A = 0,1; IC₅₀ [μM] de IL-17F = 86,8; IC₅₀ [μM] de IL-18 = >100; IC₅₀ [μM] de IL-21 = 3,2; IC₅₀ [μM] de IL-33 = 33,9; IC₅₀ [μM] de TGFβ = >100; IC₅₀ [μM] de TNF α = 0,18; IC₅₀ [μM] de TNF β = 59,3.

Esquema 23: X = SO₂



Síntesis a partir del compuesto IVc-058a

Ácido 3-((2,5/dihidroxi-3-carboxifenil)metilsulfonilmetil)-2,5/dihidroxibenzoico. A una solución de tioéter **IVc-058a** (4,25 g, 9,28 mmol) en DMF (20,0 ml) se añadió lentamente una solución de 3-clorobenceno-1-carboxiperoxiácido (grado de pureza de mCPBA ≤ 77 %, 5,80 g, 25,88 mmol) en DMF (20,0 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 18 h a temperatura ambiente. El producto bruto se sometió a purificación por HPLC (ver las condiciones generales) para dar un sólido blanco (3,20 g) que se trituró con HCl de 1 M (50 ml) para producir el producto deseado en forma de un sólido blanco (2,55 g, 6,40 mmol, 56 %)

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 0,68 min; m/z = 397,1 [M-H]⁻, área del pico > 95 %

63) **Ácido 3-((2,5/dihidroxi-3-carboxifenil)metilsulfonilmetil)-2,5/dihidroxibenzoico, compuesto IVc-059a:**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 0,68 min; m/z = 397,1 [M-H]⁻, área del pico > 95 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,24 (s, 1H), 9,32 (s, 1H), 7,21 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 7,09 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 4,44 (s, 2H).

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172,4, 153,4, 149,2, 117,4, 116,1 (CH), 113,3 (CH), 53,6 (CH₂). HRMS: [M+H]⁺, calculado para C₁₆H₁₅O₁₀S: 399,03804, encontrado: 399,03775

Biodatos: **IVc-059a**: IC₅₀ [μM] de FGF-1 = 6,7; IC₅₀ [μM] de FGF-2 = 2,7; IC₅₀ [μM] de VEGF-A1 = 12; IC₅₀ [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 4,8; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%] = 74; IC₅₀ [μM] de inhibición de ROS de PMN = 0,147; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 10; Sangre entera: IC₅₀ [μM] de GM-CSF = > 100; IC₅₀ [μM] de IFNγ = 4,34; IC₅₀ [μM] de IL-1β = 38,6; IC₅₀ [μM] de IL-2 = 21,2; IC₅₀ [μM] de IL-4 = >100; IC₅₀ [μM] de IL-5 = >100; IC₅₀ [μM] de IL-6 = 0,11; IC₅₀ [μM] de IL-9 = 0,4; IC₅₀ [μM] de IL-10 = 1,31; IC₅₀ [μM] de IL-12p70 = 42; IC₅₀ [μM] de IL-13 = >100; IC₅₀ [μM] de IL-17A = 0,16; IC₅₀ [μM] de IL-17F = > 100; IC₅₀ [μM] de IL-18 = >100; IC₅₀ [μM] de IL-21 = 1,87; IC₅₀ [μM] de IL-33 = 27,5; IC₅₀ [μM] de TGFβ = >100; IC₅₀ [μM] de TNF α = 0,16; IC₅₀ [μM] de TNF β = 0,33

Éster dimetilico

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,94 min; m/z = 427,1 [M+H]⁺, área del pico > 95 %

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,28 (s, 2H), 9,43 (s, 2H), 7,21 (d, J = 3,1 Hz, 2H), 7,13 (d, J = 3,1 Hz, 2H), 4,47 (s, 4H), 3,91 (s, 6H).

5 HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_{10}\text{S}$: 427,06934, encontrado: 427,06942

Biodatos: **IVc-059a-E2**: IC50 [μM] de FGF-1 = 78; IC50 [μM] de FGF-2 = 94; IC50 [μM] de VEGF-A1 = 200; IC50 [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = 2,7; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 45,67; IC50 [μM] de inhibición de ROS de PMN = 2,64; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 50,5

éster tetraacetato de dimetilo

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,05 min; m/z = 593,1 $[\text{M}-\text{H}]^-$, área del pico > 95 %

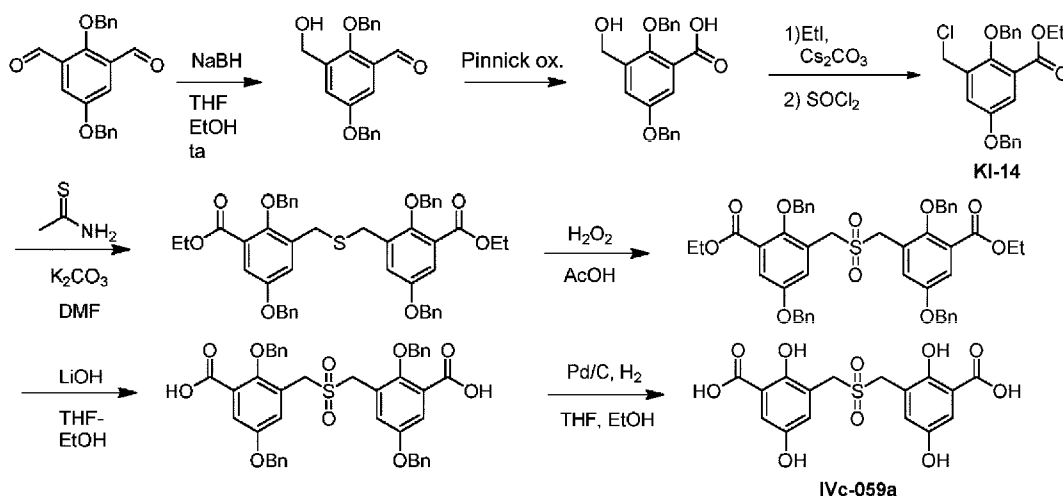
15 RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,75 (d, J = 2,8 Hz, 2H), 7,53 (d, J = 2,9 Hz, 2H), 4,65 (s, 4H), 3,81 (s, 6H), 2,31 (s, 6H), 2,23 (s, 6H).

HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{O}_{14}\text{S}$: 595,11160, encontrado: 595,11149

20 Biodatos: **IVc-059a-E2-A4**: IC50 [μM] de FGF-1 = 54; IC50 [μM] de FGF-2 = 200; IC50 [μM] de VEGF-A1 = 25; IC50 [μM] de VEGFR-Inhibición de la fosforilación = ND; ROS de PMN [inhibición a 0,3 μM [%]] = 29,17; IC50 [μM] de inhibición de ROS de PMN = 4,13; Inhibición de la adhesión de los neutrófilos [%] = 87,5; Sangre entera: IC50 [μM] de GM-CSF = 1,83; IC50 [μM] de IFN γ = 3,5; IC50 [μM] de IL-1 β = 14,1; IC50 [μM] de IL-2 = 10,4; IC50 [μM] de IL-4 = >100; IC50 [μM] de IL-5 = >100; IC50 [μM] de IL-6 = 0,99; IC50 [μM] de IL-9 = 2,9; IC50 [μM] de IL-10 = 16,8; IC50 [μM] de IL-12p70 = 51,4; IC50 [μM] de IL-13 = 18,7; IC50 [μM] de IL-17A = 0,02; IC50 [μM] de IL-17F = 25,8; IC50 [μM] de IL-18 = >100; IC50 [μM] de IL-21 = >100; IC50 [μM] de IL-33 = 23,2; IC50 [μM] de TGF β = >100; IC50 [μM] de TNF α = 0,3; IC50 [μM] de TNF β = 19,4

Síntesis alternativa y escalable de IVc-059a

Esquema 24: síntesis de IVc-059a a partir de 2,5-dibenciloxiftalaldehído



50 **2,5-bis(benciloxi)-3-(hidroximetil)benzaldehído** [Paso 1]: Se disolvió 2,5-bis(benciloxi)-isofthalaldehído (25,0 g, 72,1 mmol) (ver el esquema 9b) en THF (150 ml) y se añadió EtOH (15 ml). La solución de color marrón se mantuvo bajo un flujo positivo de nitrógeno y se agitó a t.a. durante 10 minutos, después se añadió NaBH $_4$ sólido (695 mg, 18,37 mmol) en porciones durante 20 minutos, no se permitió que la temperatura interna de la reacción superara los 25 °C (se utilizó un baño de agua). La mezcla de reacción se dejó agitar a t.a. durante 30 minutos después cada 15 minutos se añadió NaBH $_4$ adicional hasta completar la conversión del material de partida (total: 107 mg, en dos porciones). La mezcla de reacción se vertió después en agua (1,2 l) y se agitó durante 20 min. El precipitado marrón formado de este modo se aisló mediante filtración y el sólido obtenido se secó adicionalmente en el horno de vacío a 40 °C hasta obtener una masa constante para proporcionar el compuesto del título (22,9 g, rendimiento corregido del 76 %) como un aceite marrón. El perfil de RMN mostró un 83 % del producto deseado, un 15 % de diol sobrerreducido, un 2 % del material de partida, y el material se llevó a la siguiente paso sin purificación adicional.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,19 min, 86 %, m/z = 347,2 $[\text{M}-\text{H}]^-$

65 RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,11 (s, 1H), 7,52 - 7,28 (m, 11H), 7,19 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 5,34 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 5,15 (s, 2H), 4,99 (s, 2H), 4,60 (d, J = 5,6 Hz, 2H).

Ácido **2,5-bis(benciloxi)-3-(hidroximetil)benzoico** [Paso 2]: El 2,5-bis(benciloxi)-3-(hidroximetil)benzaldehído (44,3 g, 103 mmol, 81 % de pureza) y el KH_2PO_4 (25,9 g, 190 mmol) se disolvieron en acetona (440 ml) y agua (130 ml). Se añadió resorcinol (21,0 g, 191 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 10 min. Se añadió lentamente una solución de clorito de sodio (21,5 g, 191 mmol) en agua (60 ml) durante 30 minutos, sin permitir que la temperatura interna superara los 25 °C. La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 3 h y se añadió una solución acuosa de 2 M de H_3PO_4 (95 ml). La mezcla se agitó durante 20 minutos y se enfrió a 6 °C con un baño de hielo antes de filtrarse. El sólido se lavó adicionalmente con agua hasta que el pH del filtrado fue de ~6. El sólido obtenido se suspendió en agua (c.a. 300 ml) y se añadió una solución previamente enfriada (5-10 °C) de NaOH (17 g, 412 mmol) en agua (200 ml). La suspensión se agitó a t.a. durante 30 minutos antes de filtrarse en un embudo de sinterización. El sólido aislado se lavó adicionalmente con NaOH acuoso de 1 M (2 x 50 ml) y agua (50 ml). El licor alcalino se acidificó después utilizando una solución acuosa de HCl 6N previamente enfriada (5-10 °C) hasta un pH~1. La suspensión resultante se agitó magnéticamente durante 20 minutos antes de filtrarse, el sólido obtenido se secó adicionalmente en el horno de vacío a 40 °C hasta obtener una masa constante para producir el compuesto del título como un sólido de color beige claro (34,8 g, 88 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,06 min, 99 %, m/z = 363,2 [M-H]⁻.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 13,02 (s, 1H), 7,51 - 7,31 (m, 10H), 7,28 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 5,21 (s, 1H), 5,12 (s, 2H), 4,88 (s, 2H), 4,53 (s, 2H).

2,5-bis(benciloxi)-3-(hidroximetil)benzoato de etilo [Paso 3]: El ácido 2,5-bis(benciloxi)-3-(hidroximetil)benzoico (32,5 g, 89,3 mmol) y el Cs_2CO_3 (32,3 g, 99,2 mmol) se suspendieron en DMF (200 ml) y se añadió yoduro de etilo (9,0 ml, 112 mmol) a la mezcla de reacción. Después de agitar a t.a. durante 3 h, la mezcla de reacción se vertió en una solución acuosa saturada de NH_4Cl (1 l) y se añadió NaCl sólido (~30 g). Después de agitar durante 10 minutos, el material se extrajo con EtOAc (2 x 500 ml). La capa orgánica recogida se lavó con salmuera (2 x 500 ml), se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida para dar un residuo de aceite marrón (42,0 g, bruto, 89,3 mmol). El material bruto se llevó al siguiente paso sin purificación adicional.

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,24 min, 93 %, m/z = ionización débil.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,51 - 7,32 (m, 10H), 7,31 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 5,24 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 5,13 (s, 2H), 4,87 (s, 2H), 4,54 (d, J = 5,6 Hz, 2H), 4,26 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 1,24 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

2,5-bis(benciloxi)-3-(clorometil)benzoato de etilo (HI-14) [Paso 4]: El 2,5-bis(benciloxi)-3-(hidroximetil)benzoato de etilo (42 g de material bruto del paso anterior, 89,3 mmol) se disolvió en DCM (200 ml) en atmósfera inerte (N_2), después se añadió SOCl_2 (9,8 ml, 133,9 mmol) a 0 °C (baño de hielo) y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta t.a. Después de 2 h, los volátiles se eliminaron a presión reducida, seguida de una destilación azeotrópica utilizando tolueno (3 x 100 ml), lo que resultó en un aceite marrón semisólido (38,0 g, bruto, 89,3 mmol).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,40 min, 91 %, m/z = ionización débil.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,54 - 7,26 (m, 12H), 5,14 (s, 2H), 4,95 (s, 2H), 4,71 (s, 2H), 4,28 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 1,28 - 1,22 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

bis(2,5-dibenciloxi-3-etoxicarbonilfenilmetil)sulfuro [Paso 5]: A una solución de **KI-14** (38,0 g, material bruto, 89,3 mmol) en DMF (420 ml) se añadió tioacetamida (8,4 g, 111,8 mmol) seguido de la adición de K_2CO_3 - malla 325 (16,7 g, 120,8 mmol). La reacción se calentó a 45 °C durante 48 h. La reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, seguida de la adición de tioacetamida (2,5 g, 33,3 mmol) y K_2CO_3 - malla 325 (5,0 g, 36,1 mmol) y se agitó adicionalmente a 45 °C durante 18 h para completar la reacción. La mezcla de reacción se vertió en agua (4 l). La mezcla de reacción se agitó durante 20 minutos antes de la adición de EtOAc (2 l) seguido de NaCl sólido (~60 g). Las fases se separaron seguidas de una extracción adicional utilizando EtOAc (1,5 l). La capa orgánica recogida se lavó con salmuera (1,5 l), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida para dar el compuesto del título en bruto (39,8 g, 44,6 mmol) como un aceite marrón que se utilizó en el siguiente paso sin purificación.

UPLCMS (método ácido, 2 minutos): t.a. = 1,57 min, m/z = 800,5 [M+ NH_4]⁺, área del pico 77 %.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,46 - 7,17 (m, 24H), 5,05 (s, 4H), 4,83 (s, 4H), 4,23 (q, J = 7,1 Hz, 4H), 3,73 (s, 4H), 1,20 (t, J = 7,1 Hz, 6H).

bis(2,5-dibenciloxi-3-etoxicarbonilfenilmetil)sulfona [Paso 6]: A una solución de bis(2,5-dibenciloxi-3-etoxicarbonilfenilmetil)sulfuro (39,8 g en bruto, 44,6 mmol) en ácido acético (850 ml) se añadió lentamente una solución al 30 % en peso de peróxido de hidrógeno (50 ml, 490 mmol). La reacción se agitó a t.a. durante 18 h. La mezcla de reacción se vertió en hielo/agua (5 l) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido de la adición de EtOAc (2 l) y NaCl sólido (~40 g). Después de la separación de las fases, la capa acuosa se extrajo una vez más con EtOAc (1 l). La capa orgánica recogida se lavó con salmuera (1,5 l), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida para dar un sólido marrón. El sólido se suspendió en MTBE (250 ml) y se

agitó magnéticamente durante 30 minutos, seguido de filtración y trituración adicional con MTBE (150 ml) para producir el compuesto del título (23,56 g, 28,9 mmol, rendimiento del 64 % en 4 pasos).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,48 min; m/z = 832,5 [M+NH₄]⁺, área del pico 96 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,50 - 7,24 (m, 24H), 5,08 (s, 4H), 4,85 (s, 4H), 4,50 (s, 4H), 4,26 (q, J = 7,1 Hz, 4H), 1,25 - 1,17 (m, 6H).

bis(2,5-dibenciloxi-3-carboxifenilmetil)sulfona [Paso 7]: Se añadió una solución de hidróxido de litio (9,7 g, 233 mmol) en agua (100 ml) a una solución de bis(2,5-dibenciloxi-3-etoxycarbonilfenilmetil)sulfona (33,3 g, 38,8 mmol) en THF (350 ml) y la mezcla resultante se agitó a reflujo durante 18 h. Después de este tiempo, la mayor parte del THF se retiró a presión reducida dando lugar a una suspensión blanca. Después de la adición de agua (3 l) y una solución acuosa de hidróxido de sodio (1 M, 1 l), la mezcla permanece en suspensión. La suspensión se agitó a t.a. durante 18 h y la capa acuosa se acidificó a pH/1 mediante la adición de una solución acuosa de ácido clorhídrico de 6 M y el sólido resultante se recogió mediante filtración y se lavó con agua, hasta que las aguas fueron neutras. El sólido blanco obtenido de este modo se secó adicionalmente en el horno de vacío a 40 °C hasta obtener una masa constante para dar el compuesto del título como un sólido blanco (29,4 g, 38,7 mmol, 99 %).

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,39 min; m/z = 757,1 [M-H]⁻, área del pico 100 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,23 (s, 2H), 7,47 - 7,25 (m, 24H), 5,08 (s, 4H), 4,88 (s, 4H), 4,48 (s, 4H).

bis(2,5-dihidroxi-3-carboxifenilmetil)sulfona [Paso 8], **IVc-059a**: A una suspensión de bis(2,5-dibenciloxi-3-carboxifenilmetil)sulfona (10,08 g, 13,28 mmol) en EtOH (140 ml) y THF (140 ml) se añadió paladio sobre carbón vegetal (20 % en peso, 2 g) como una suspensión en agua (20 ml). Después de varios ciclos de vacío/hidrógeno, la mezcla se mantuvo en una atmósfera de H₂ a 25 °C y se agitó durante 20 h. Una vez completada, la mezcla se filtró a través de Celite® utilizando THF. El filtrado se concentró a presión reducida para dar un sólido blanquecino. El residuo se suspendió después en acetonitrilo (100 ml) y se calentó a reflujo con agitación magnética, la mezcla se enfrió después a -5 °C antes de filtrarse y lavarse adicionalmente con acetonitrilo frío. El producto se secó adicionalmente en el horno de vacío a 40 °C hasta obtener una masa constante para proporcionar el producto deseado como un sólido blanco (5,35 g, 12,78 mmol, 96 %).

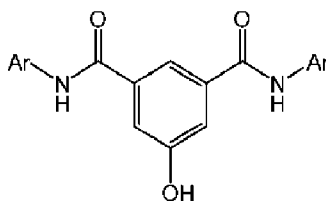
UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 0,67 min; m/z = 397,1 [M-H]⁻, área del pico 100 %

Datos de RMN: ver anteriormente.

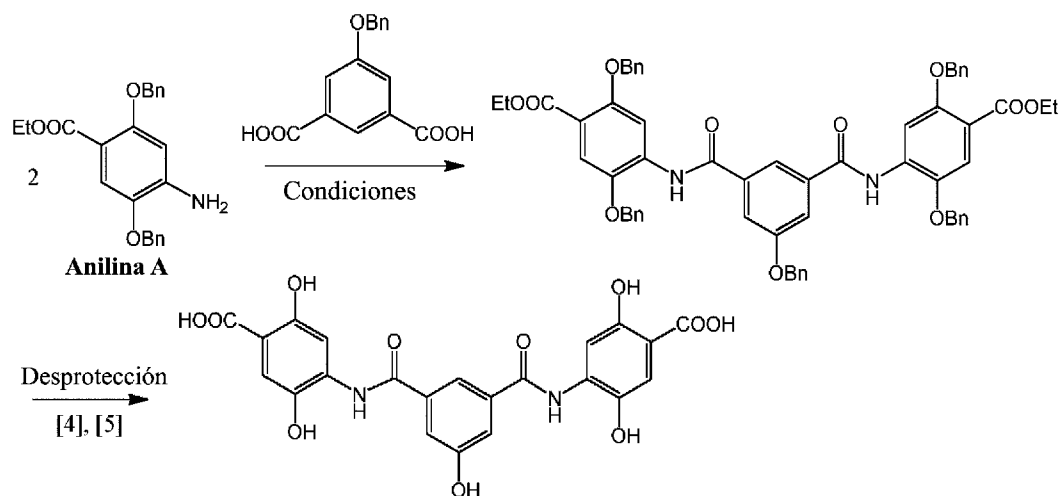
Ejemplo 1.12 - Moléculas de tipo V: Compuestos de referencia

Diamidas derivadas del ácido 5-hidroxiisotáltico

2 ejemplos



Esquemas y procedimientos sintéticos

Esquema 25: síntesis de V-001a

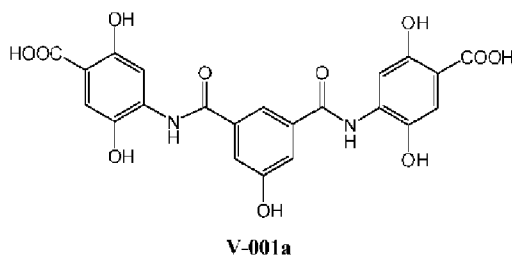
Formación de un enlace de amida

Ver el procedimiento general B para el acoplamiento de amida [3B] utilizando anilina A (2 moles) o 5-aminosalicilato de metilo

Procedimientos de desprotección: Ver los procedimientos generales [4], [5]

Para mayor detalle, ver la figura 8

Por ejemplo



64) **Ácido 5-hidroxiisoftálico-bis-N-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)amida (V-001a)**

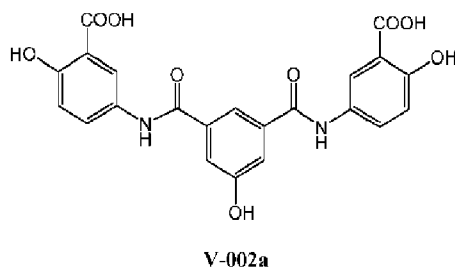
UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 0,72 min; m/z = 483,0 [M+H]⁺, área del pico > 95 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,28 (s, 1H), 9,83 (s, 2H), 9,48 (s, 2H), 7,92 (s, 1H), 7,68 (s, 2H), 7,52 (d, J = 1,5 Hz, 2H), 7,30 (s, 2H).

50 **Éster dietílico**

UPLC-MS (método ácido, 2 min): t.a. = 1,09 min; m/z = 539,2 [M-H]⁻, área del pico 94 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,23 (s, 2H), 9,92 (s, 2H), 9,49 (s, 2H), 7,91 (s, 1H), 7,73 (s, 2H), 7,51 (d, J = 1,5 Hz, 2H), 7,32 (s, 2H), 4,35 (q, J = 7,1 Hz, 4H), 1,34 (t, J = 7,1 Hz, 6H).

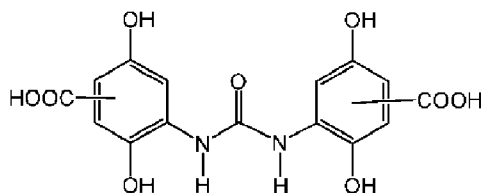


65) **bis-N-(3-carboxi-4-hidroxifenil)amida de ácido 5-hidroxiisoftálico (V-002a)**

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 1,00 min; m/z = 451,1 [M-H]⁻; área del pico 97 %

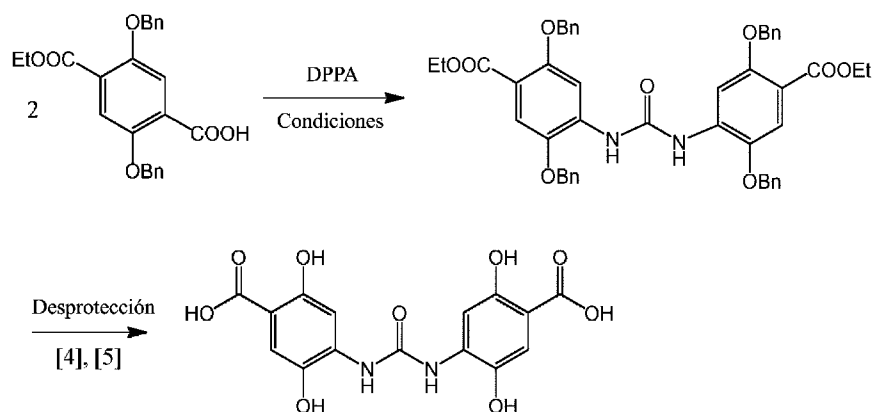
5 RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,31 (s, 2H), 10,11 (s, 1H), 8,28 (d, J = 2,7 Hz, 2H), 7,98 (m, 1H), 7,89 (dd, J = 9,0, 2,7 Hz, 2H), 7,50 (d, J = 1,5 Hz, 2H), 6,97 (d, J = 9,0 Hz, 2H).

1 ejemplo de unidades de ácido gentísico ligadas a urea



Esquema y procedimientos sintéticos

20 **Esquema 26: síntesis de V-003a**



Formación de enlaces de urea

Procedimiento a partir de KI-1:

N,N'-bis(2,5-dibenciloxi-4-etoxicarbonilfenil)urea. A una solución enfriada (baño de hielo) de ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoico (**HI-1**) (2,0 g, 4,9 mmol) y Et₃N (1,6 ml, 11,3 mmol) en THF (25 ml) en atmósfera inerte (N₂), se añadió lentamente DPPA (1,1 ml, 5,2 mmol). La mezcla se calentó lentamente hasta t.a. y se agitó a esta temperatura durante 3 h. Después se añadió tBuOH (8 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El perfil de reacción mostró una mayoría de producto de enlace de urea en lugar de la boc-anilina deseada. La mezcla se vertió en una solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio (250 ml) y se agitó durante 5 minutos antes de extraerla con EtOAc (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron a presión reducida para dar un aceite incoloro. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (isohexano/EtOAc 1:0 y después en gradiente hasta EtOAc al 30 %) para producir el compuesto del título (1,1 g, 56 %) como un sólido blanquecino.

UPLC-MS (método básico, 2 min): t.a. = 1,50 min; m/z = 781,2 [M+H]⁺; área del pico 85 %

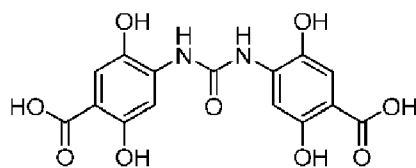
55 RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,49 (s, 2H), 8,18 (s, 2H), 7,58 - 7,45 (m, 8H), 7,43 - 7,35 (m, 8H), 7,35 - 7,28 (m, 6H), 5,27 (s, 4H), 5,11 (s, 4H), 4,22 (q, J = 7,1 Hz, 4H), 1,24 (t, J = 7,1 Hz, 6H).

Procedimientos de desprotección: Ver los procedimientos generales [4], [5]

Para mayor detalle, ver la figura 8

60 Por ejemplo

66) **N,N'-bis(2,5-dihidroxi-4-carboxifenil)urea (V-003a)**



V-003a

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 0,90 min; m/z = 363,1 [M-H]⁻, área del pico 93 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,36 (s, 2H), 10,86 (s, 2H), 9,64 (s, 2H), 9,48 (s, 2H), 7,77 (s, 2H), 7,17 (s, 2H).

Éster dietílico

UPLC-MS (método ácido, 4 min): t.a. = 1,79 min; m/z = 419,2 [M-H]⁻, área del pico 97 %

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,26 (s, 2H), 9,74 (s, 2H), 9,53 (s, 2H), 7,81 (s, 2H), 7,20 (s, 2H), 4,32 (q, J = 7,1 Hz, 4H), 1,33 (t, J = 7,1 Hz, 6H).

Ejemplo 1.13: Formación de sales

a) Sólidos.

Protocolo general: las sales se obtuvieron como sólidos añadiendo el número apropiado de equivalentes de base a las soluciones o suspensiones de los compuestos deseados en agua, sonicando hasta su completa disolución, ajustando cuando fue necesario el pH a valores entre 7,0 y 7,4 mediante la adición de HCl acuoso o exceso de base, y después liofilizando la solución. Alternativamente ciertas sales podrían obtenerse mediante disolución en DMSO seguida de precipitación con EtOH (**IIc-007a**). Los sólidos se generaron a partir de las siguientes bases: hidróxido de sodio, dietilamina (DEA), lisina (Lys), meglumina (Meg), trietanolamina (TEA).

Por ejemplo:

Las sales de sodio y dietilamonio (DEA) de **Ic-007a**, **IIc-007a**, **IIc-061a** como sólidos se obtuvieron según el protocolo general sin ajustar el pH.

- Solubilidades aproximadas en agua:

Ic-007a-DEA 2: < 10 mg/ml

Ic-007a-DEA3: > 20 mg/ml

IIc-007a-DFA1: > 10 mg/ml

IIc-007a-DEA2: > 20 mg/ml

IIc-061a-DEA3: > 25 mg/ml

- Estabilidad de los ácidos y sales libres como sólidos:

Los ácidos libres **Ic-007a**, **IIc-007a**, **IIc-061a** y las siguientes sales **Ic-007a**-DEA2, **IIc-007a**-DEA2, **IIc-061a**-DEA3 fueron estables como sólidos hasta 56 días a temperaturas de 4 °C, 20 °C y 40 °C; la sal **Ic-007a**-DEA3 se mantuvo estable a las mismas temperaturas hasta 36 días.

b) Soluciones

Protocolo general: las sales se obtuvieron como soluciones añadiendo el número apropiado de equivalentes de base a las soluciones o suspensiones de los compuestos deseados en agua, sonicando hasta su completa disolución, ajustando cuando fue necesario el pH a valores entre 7,0 y 7,4 mediante la adición de HCl acuoso o exceso de base. Se investigaron las siguientes bases: etilamina, trietilamina, etilendiamina, dietanolamina, trietanolamina, colina, meglumina, lisina y arginina.

Por ejemplo:

Sales de **Ic-007a**:

Las sales solubles se obtuvieron con meglumina, lisina y dietanolamina después de agitar la mezcla durante 2 segundos a 40 °C. Se obtuvo una forma sólida de la sal **lc-007a-Lys2** a partir del DMSO mediante precipitación con etanol.

La sal era estable como una solución en agua durante al menos 7 días a temperatura ambiente.

Sales del **lc-007a**:

Sal DEA1: a pequeña escala, la sal de monodietilamonio se obtuvo mediante el procedimiento general sin ajustar el pH. Solubilidad: 17,4 mg/ml frente a 1,8 mg/ml para el diácido parental

Proceso y caracterización a gran escala:

Al **lc-007a** (20 g, 42,7 mmol) se le cargó EtOH (200 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente para proporcionar una suspensión. Se cargó DEA (4,4 ml, 42,7 mmol) y la reacción se calentó a 50 °C durante 2 h. El lote se enfrió a temperatura ambiente y los sólidos se filtraron. La torta filtrada se lavó con EtOH (50 ml) y se secó en horno a 40 °C para proporcionar 21,5 g de sal mono-DEA como un sólido amarillo con un rendimiento del 98 %. RMN: 1,6 % de EtOH, 1,04 eq de DEA. HPLC: 99,6 %.

Los datos en estado sólido de la sal monoDEA del **lc-007a** mostraron un patrón cristalino claro en el análisis de XRPD. La traza TGA mostró una pérdida de menor cantidad de EtOH < 120 °C que indica que el EtOH puede secarse a 60-80 °C. Se observó después la pérdida de la DEA (teoría del 13,5 % en peso para 1: 1 sal) asociada con la endoterma de fusión en la DSC (pico a 273,8 °C), seguida de una fusión de la forma ácida libre. **Sal de DEA2, pH ajustado:** obtenida mediante el procedimiento general con ajuste del pH (se requieren 0,51 equivalentes adicionales de Et₂NH para alcanzar un pH = 7,25). La sal en solución presenta una degradación clara después de 21 días a 40 °C y una degradación extensa después de 24 h a 80 °C.

Sal de DEA2, pH no ajustado: obtenida mediante el procedimiento general sin ajuste de pH. pH de la solución = 5,87. La sal en solución no mostró degradación después de 21 días a 4 °C, 20 °C y 40 °C.

Sal de Lys2, pH no ajustado: obtenida mediante el procedimiento general con 2 equivalentes de L-lisina. pH de la solución = 5,74.

NOTA: por analogía con la bis(N-metil)amida del ácido 2-hidroxiisotáltico (pKa del fenol = 6,81), el grupo 2-OH del núcleo de bis-amida isotáltico del **lc-007a** es notablemente ácido y su ionización conduce a la degradación de la molécula. Este efecto no se observa para **lc-007a** (pKa esperado de las funciones fenólicas en el rango de 9,8 - 10,0). Por lo tanto, es importante no ajustar el pH de las soluciones de sales dicatiónicas de **lc-007a**.

Sales del **lc-061a**:

Sal de DEA3, pH ajustado: obtenida mediante el procedimiento general utilizando 3 equivalentes de Et₂NH con ajuste de pH (se requieren 0,8 equivalentes adicionales de HCl (0,5 M) para alcanzar un pH final = 7,22). La sal en solución no mostró degradación después de 21 días a 4 °C, 20 °C y una ligera degradación a 40 °C después de 33 días.

Sal meg3, pH ajustado: obtenida mediante el procedimiento general utilizando 3 equivalentes de meglumina con un ajuste de pH para alcanzar un pH final = 7,22 (HCl 0,5 M). La sal en solución no mostró degradación después de 21 días a 4 °C, 20 °C y 40 °C después de 14 días.

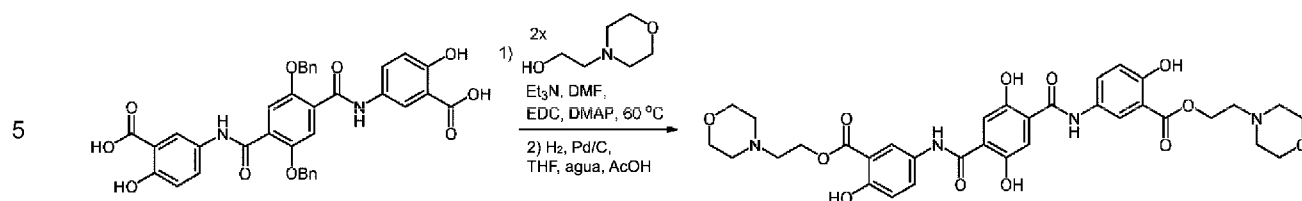
Sales de **lc-059a**,

Sal de DEA2, pH ajustado: obtenida mediante el procedimiento general con ajuste del pH (se requieren 0,32 equivalentes adicionales de Et₂NH para alcanzar un pH = 7,3 %). La sal en solución presenta estabilidad después de 26 días a 4 °C, 20 °C y 40 °C.

Ejemplo 1.14: Profármacos

Profármacos de **lc-007a**

1) 5-[[[2,5-dihidroxi-4-[[4-hidroxi-3-(2-morfolinoetoxicarbonil)fenil]carbamoil]benzoil]amino]-2-hidroxibenzoato de 2-morfolinoetilo (**lc-007a-mpe2**)

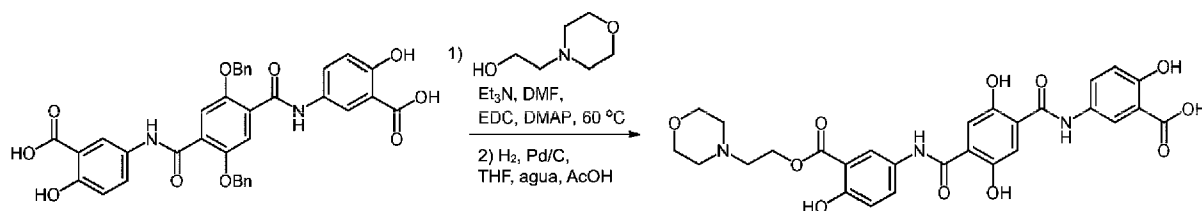


10 *Esterificación.* Una suspensión de ácido 5-[[2,5-dibenciloxy-4-[(3-carboxy-4-hydroxyfenil)carbamoyl]-benzoyl]amino]-2-hidroxibenzoico (130 mg, 0,2 mmol) en N,N-dimetilformamida (4 ml) se agitó a temperatura ambiente. Se añadieron N,N-dimetilpiridin-4-amina (49 mg, 0,4 mmol) y una solución de 2-morfolinoetanol (53 mg, 0,4 mmol) en N,N-dimetilformamida (0,5 ml). Se añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (115 mg, 0,6 mmol) y la mezcla de reacción se calentó en un reactor de microondas a 60 °C durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se filtró, el filtrado se diluyó con tetrahidrofurano y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con metanol al 0-40 % en diclorometano para dar el producto del título como un sólido blanco (80 mg, 45 %). LCMS (m/z) [M+H] 875,1.

20 *Hidrogenólisis:* Se preparó una solución del diéster obtenido anteriormente (80 mg, 0,092 mmol) en tetrahidrofurano (12 ml) y agua (4 ml) y se añadió paladio sobre carbono al 10 % (50 mg, pasta al 10 %). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 17 horas. El catalizador se retiró mediante filtración y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa en una columna C18 utilizando un gradiente del 10 al 97 % (acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1 %): (agua + ácido fórmico al 0,1 %). El residuo se trituró con éter dietílico y se secó al vacío para producir el producto del título **1c-007a-mpe2** como un sólido amarillo (22 mg, 35 %).

25 RMN de ¹H (d₆-DMSO ppm) δ 11,16-11,00 (br s, 1H), 10,46 (s, 1H), 10,45-10,15 (br s, 1H), 8,25 (d, J=2,7 Hz, 1H), 7,77 (dd, J=9,0, 2,7 Hz, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,01 (d, J=9,0 Hz, 1H), 4,46 (t, J=5,4 Hz, 2H), 3,62-3,56 (m, 4H), 2,77-2,69 (m, 2H), 2,56-2,50 (m, 4H, parcialmente oscurecido por el pico de DMSO). LCMS (m/z) [M+H] 695,0.

30 2) Ácido 5-[[2,5-dihidroxi-4-[[4-hidroxi-3-(2-morfolinoetoxycarbonyl)fenil]carbamoyl]benzoyl]amino]-2-hidroxibenzoico (1c-007a-mpe1)



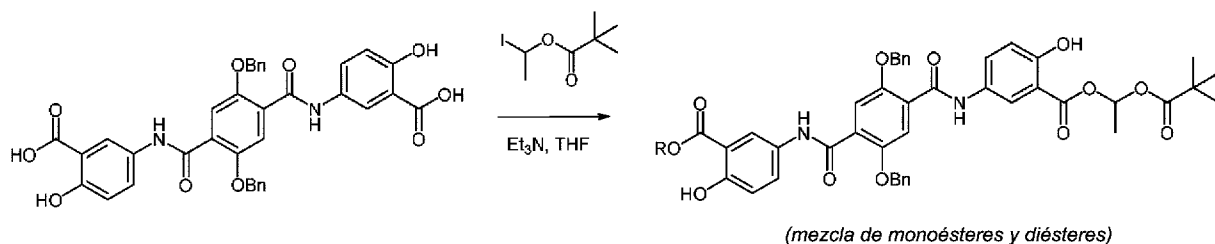
40 *Esterificación.* Una solución de ácido 5-[[2,5-dibenciloxy-4-[(3-carboxy-4-hydroxyfenil)-carbamoyl]benzoyl]amino]-2-hidroxibenzoico (324 mg, 0,5 mmol) y trietilamina (101 mg, 0,15 ml, 1 mmol) en N,N-dimetilformamida (7 ml) se agitó a temperatura ambiente. Se añadió una solución de 2-morfolinoetanol (66 mg, 0,5 mmol) en N,N-dimetilformamida (1 ml) y N,N-dimetilpiridin-4-amina (122 mg, 1 mmol). Se añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (115 mg, 0,6 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y después se calentó en un microondas a 60 °C durante 4 horas. La reacción se repitió en una escala similar y las mezclas de reacción se combinaron. El disolvente se evaporó y el residuo se trituró con éter dietílico para dar una mezcla del mono y el diéster (230 mg). LCMS (m/z) [M+H] 762,0 (monoéster).

50 *Hidrogenólisis.* La mezcla de mono y diéster (230 mg) obtenida anteriormente se disolvió en ácido acético (10 ml), tetrahidrofurano (15 ml) y agua (5 ml) y se añadió paladio sobre carbono al 10 % (150 mg, pasta al 10 %). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 16 horas. El catalizador se retiró mediante filtración y el disolvente se evaporó para dar una goma amarilla (140 mg). El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa en una columna C18 utilizando un gradiente del 10 al 70 % (acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1 %): (agua + ácido fórmico al 0,1 %). El residuo se trituró con éter dietílico y se secó al vacío para producir el monoéster del título **1c-007a-mpe1** como un sólido amarillo (11 mg).

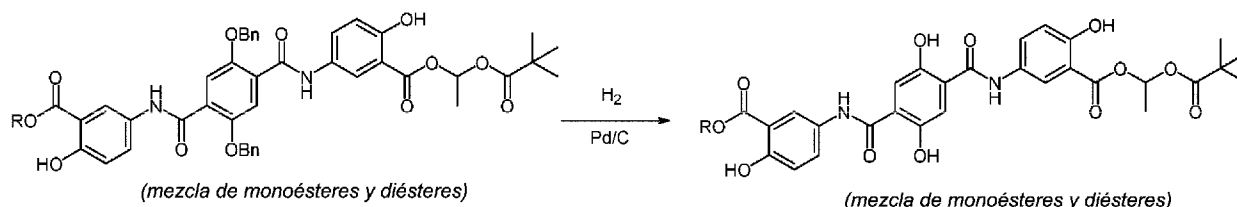
60 RMN de ¹H (d₆-DMSO ppm) δ 11,33-11,29 (br s, 1H), 11,13-10,08 (br s, 1H), 10,50-10,44 (br s, 2H), 10,36-10,30 (br s, 1H), 8,25 (d, J=2,4 Hz, 1H), 8,06-8,02 (m, 1H), 7,78 (dd, J=9,0, 2,4 Hz, 1H), 7,69-7,60 (m, 2H), 7,52 (s, 1H), 7,01 (d, J=9,0 Hz, 1H), 6,75 (d, J=8,7 Hz, 1H), 4,50-4,45 (m, 2H), 3,65-3,55 (m, 4H), 2,81-2,71 (m, 2H), 2,60-2,50 (m, 4H, parcialmente oscurecido por el pico de DMSO). LCMS (m/z) [M+H] 582,0.

65 3) 5-[[4-[3-[1-(2,2-dimetilpropanoiloxy)etoxycarbonyl]-4-hidroxi-3-(2-morfolinoetoxycarbonyl)fenil]carbamoyl]-2,5-dihidroxibenzoil]amino]-2-hidroxibenzoato de 1-(2,2-dimetilpropanoiloxy)etilo (1c-007a-pive2) y

4) Ácido 5-[[4-[3-[1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etoxicarbonil]-4-hidroxifenil]carbamoil]-2,5-dihidrobenzoil]amino]-2-hidrobenzoico (Ic-007a-pive1)



Esterificación. Una solución de ácido 5-[[2,5-dibenciloxi-4-[(3-carboxi-4-hidroxifenil)carbamoil]benzoil]amino]-2-hidrobenzoico (324 mg, 0,5 mmol) y trietilamina (152 mg, 0,21 mmol) en N,N-dimetilformamida (10 ml) se agitó a 0 °C y se añadió 2,2-dimetilpropanoato de 1-yodoetil (572 mg, 2 mmol). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La dimetilformamida se evaporó y el residuo se repartió entre diclorometano y metabisulfito de sodio acuoso. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se evaporó para dar una mezcla 1:1 del mono y el diéster (187 mg). La reacción se repitió y las mezclas 1:1 de ésteres se combinaron. LCMS (m/z) [M+H] 777,0 (monoéster) y 905,1 (diéster).



Hidrogenólisis

La mezcla de mono y diésteres (320 mg) obtenida anteriormente se disolvió en tetrahidrofurano (50 ml) y agua (5 ml) y se añadió paladio sobre carbono al 10 % (300 mg, pasta al 10 %). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 20 horas. El catalizador se retiró mediante filtración y el disolvente se evaporó. LCMS indicó que solo se había logrado una desprotección parcial. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (36 ml) y agua (6 ml) y se añadió paladio sobre carbono al 10 % (600 mg, pasta al 10 %). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 22 horas. El catalizador se retiró mediante filtración y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa en una columna C18 utilizando un gradiente del 40 al 97 % (acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1 %): (agua + ácido fórmico al 0,1 %). Los residuos se trituraron con éter dietílico y se secaron al vacío para producir los productos del título:

Diéster (Ic-007a-pive2): sólido amarillo (60 mg). RMN de ^1H (d_6 -DMSO ppm) δ 11,05 (s, 1H), 10,46 (s, 1H), 10,18 (s, 1H), 8,18 (br s, 1H), 7,83-7,77 (m, 1H), 7,52 (s, 1H), 7,05-6,96 (m, 2H), 1,58 (d, J=5,5 Hz, 3H), 1,17 (s, 9H). LCMS (m/z) [M+H] 724,9.

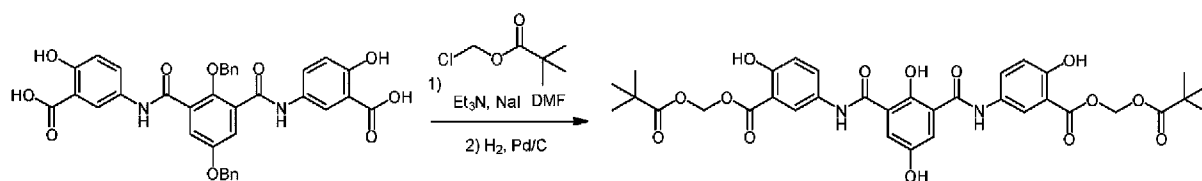
Biodatos: $T_{1/2}$ (plasma de ratón): 62,2 min (éster escindido; 65 % restante después de 1 hora); $T_{1/2}$ (plasma humano): > 180 minutos

Monoéster (Ic-007a-pive1): sólido amarillo (35 mg). RMN de ^1H (d_6 -DMSO ppm) δ 11,13 (s, 1H), 11,06 (s, 1H), 10,46 (s, 1H), 10,42 (s, 1H), 10,18 (s, 1H), 8,21-8,18 (m, 2H), 8,78-8,72 (m, 2H), 7,55 (s, 1H), 7,52 (s, 1H), 7,03-6,92 (m, 3H), 1,58 (d, J=5,5 Hz, 3H), 1,17 (s, 9H). LCMS (m/z) [M+H] 596,9.

Biodatos: $T_{1/2}$ (plasma de ratón): 44,6 min (éster escindido; 49 % restante después de 1 hora); $T_{1/2}$ (plasma humano): > 180 minutos

Profármacos del Ic-007a

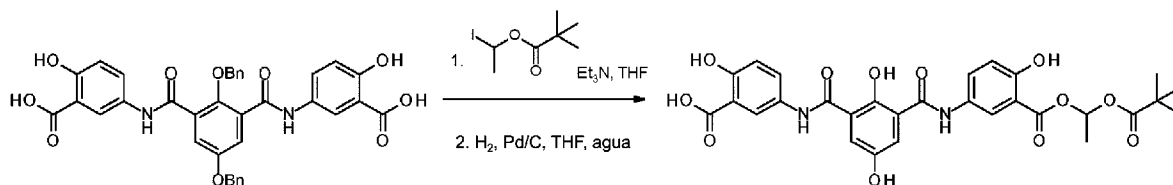
1) 5-[[3-[[3-(2,2-dimetilpropanoiloximetoxicarbonil)-4-hidroxifenil]carbamoil]-2,5-dihidrobenzoil]amino]-2-hidrobenzoato de 2,2-dimetilpropanoiloximetil (Ic-007a-pivm2)



Esterificación. Se preparó una solución de ácido 5-[[2,5-dibenzoyloxy-3-[(3-carboxy-4-hydroxyfenil)carbamoil]benzoil]amino]-2-hidroxibenzoico (280 mg, 0,432 mmol) en N,N-dimetilformamida y se añadió 2,2-dimetilpropanoato de clorometilo (137 µl, 0,95 mmol), seguido de trietilamina (167 µl), 1,2 mmol) y yoduro de sodio (143 mg, 0,95 mmol). La solución agitada se calentó a 50 °C durante 18 horas. Después la solución se enfrió y se repartió entre una solución saturada de cloruro de amonio y acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en una columna de sílice utilizando un gradiente del 100 % de *iso*-hexano al 50 % de acetato de etilo y al 50 % de *iso*-hexano para producir el diéster como una goma incolora (192 mg, 51 %). LCMS (m/z) [M+H] 876,9.

Hidrogenólisis: Se preparó una solución del diéster obtenida anteriormente (192 mg, 0,219 mmol) en tetrahidrofurano (4,5 ml) y se añadió a una suspensión agitada de paladio al 10 % sobre carbono (40 mg, 0,04 mmol) en agua (1,5 ml). La mezcla de reacción agitada se colocó en una atmósfera de hidrógeno durante 18 horas. La reacción se filtró para eliminar el catalizador y la solución se evaporó para dar un sólido de color crema (142 mg). El sólido se purificó mediante HPLC en una columna C18 utilizando un gradiente de acetonitrilo al 60 %, agua al 40 % a acetonitrilo al 100 % (ácido fórmico al 0,1 %) para dar el diéster del título **Ilc-007a-pivm2** como un sólido blanco (75 mg, 49 %). RMN de ¹H (DMSO-D₆ ppm) δ 13,03 (br s, 1H), 10,43 (br s, 2H), 10,16 (s, 2H), 9,52 (br s, 1H), 8,17 (d, J=2,7 Hz, 2H), 7,82 (dd, J=8,9 Hz, 2,7 Hz, 2H), 7,55 (s, 2H), 7,02 (d, J=8,9 Hz, 2H), 5,98 (s, 4H), 1,17 (s, 18H). LCMS (m/z) [M-H] 694,9.

2) Ácido 5-[[3-[3-[1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etoxicarbonil]-4-hidroxifenil]carbamoil]-2,5-dihidroxibenzoil]-amino]-2-hidroxibenzoico (Ilc-007a-pive1)

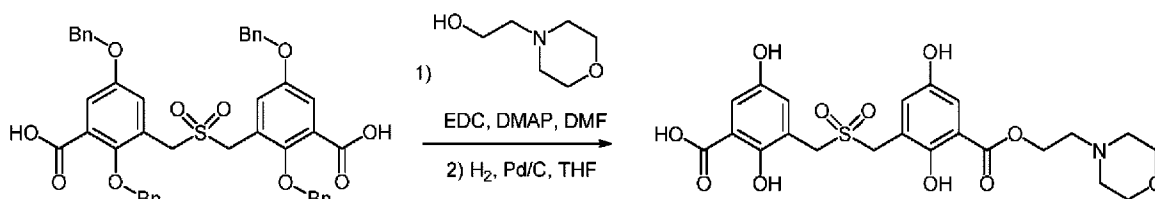


Esterificación. Una solución de ácido 5-[[2,5-dibenzoyloxy-3-[(3-carboxy-4-hidroxifenil)carbamoil]benzoil]amino]-2-hidroxibenzoico (324 mg, 0,5 mmol) y trietilamina (101 mg, 0,14 ml, 1,0 mmol) en N,N-dimetilformamida (10 ml) se agitó a 0 °C. Se añadió 2,2-dimetilpropanoato de 1-yodoetilo (154 mg, 0,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 21 horas. Se añadieron más trietilamina (0,14 ml, 1,0 mmol) y 2,2-dimetilpropanoato de 1-yodoetilo (154 mg, 0,6 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 1 hora. El disolvente se evaporó. El residuo se repartió entre diclorometano y una solución de metabisulfito de sodio. Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con salmuera y se secaron haciendo pasar la solución a través de una frita hidrófoba. El filtrado se evaporó para dar una mezcla de mono y diésteres. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con acetato de etilo al 5-100 % en isohexanos seguido de metanol al 10 % en diclorometano para dar el monoéster como un sólido amarillo (121 mg). LCMS (m/z) [M+H] 777.

Hidrogenólisis. Una solución del monoéster obtenido anteriormente (121 mg, 0,15 mmol) en tetrahidrofurano (16 ml) y agua (4 ml) que contenía paladio al 10 % sobre carbono (250 mg, pasta al 10 %) se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 18 horas. El catalizador se retiró mediante filtración y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa utilizando un gradiente del 40-97 % (acetonitrilo + 1 % de ácido fórmico):(agua + 0,1 % de ácido fórmico) para dar el monoéster **Ilc-007a-pive1** como un sólido amarillo (34 mg). RMN de ¹H (DMSO-D₆ ppm) δ 13,15 (br s, 1H), 10,47 (br s, 2H), 10,18 (s, 1H), 9,47 (br s, 1H), 8,21 (d, J=3 Hz 1H), 8,17 (d, J=3 Hz 1H), 7,82 (dd, J=9, 3 Hz 1H), 7,78 (dd, J=9, 3 Hz 1H), 7,59-7,55 (m, 2H), 7,03 (d, J=9 Hz 1H), 6,99 (q, J=5,4 Hz 1H), 7,96 (d, J=9 Hz 1H), 1,58 (d, J=5,4 Hz, 3H), 1,17 (s, 9H). LCMS (m/z) [M-H] 595,1.

Profármacos de IVc-059a

1) Ácido 2,5-dihidroxi-3-[[2,5-hidroxi-3-(2-morfolinoetoxicarbonil)fenil]metilsulfonyl-metil]benzoico (IVc-059a-mpe1)



Esterificación. Se preparó una solución de ácido 2,5-dibenciloxi-3-[(2,5-dibenciloxi-3-carboxifenil)metilsulfonilmetil]benzoico (300 mg, 0,40 mmol) y 2-morfolinoetanol (53 mg, 0,40 mmol) en N,N-dimetilformamida (93 ml) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, 93 mg, 0,48 mmol) y se añadieron N,N-dimetilpiridin-4-amina (10 mg, 0,08 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La solución resultante se evaporó hasta sequedad y el residuo se purificó mediante HPLC en una columna C18 utilizando un gradiente de acetonitrilo al 30 %, agua del 70 % a acetonitrilo al 100 % (ácido fórmico al 0,1 %) para producir el éster morfolinoetílico como una goma incolora (111 mg, 32 %). LCMS (m/z) [M+H] 872,1.

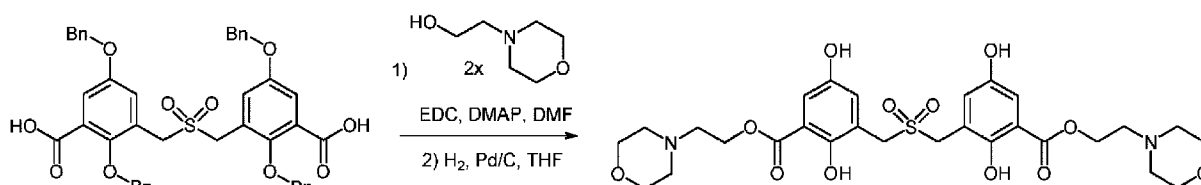
Hidrogenólisis. Se añadió una solución del monoéster anterior (111 mg, 0,127 mmol) en tetrahidrofurano (3 ml) a una suspensión agitada de paladio al 10 % sobre carbono (20 mg, 0,019 mmol) en agua (1 ml). La mezcla de reacción agitada se colocó en una atmósfera de hidrógeno durante 18 horas.

La reacción se filtró para eliminar el catalizador y la solución se evaporó para dar un sólido marrón. El sólido se purificó mediante HPLC en una columna C18 utilizando un gradiente de acetonitrilo al 10 %, agua del 90 % a acetonitrilo al 60 %, agua al 40 % (ácido fórmico al 0,1 %) para dar un sólido blanco (20,5 mg). El sólido se trituró con éter dietílico y se secó al vacío para producir el producto del título **IVc-059a-mpe1** como un sólido blanco (5 mg, 8 %).

RMN de ^1H (DMSO- d_6 ppm) δ 10,33 (br s, 1H), 9,30 (s, 1H), 8,92 (s, 1H), 7,08-7,15 (m, 3H), 6,91 (d, J=3,1 Hz, 1H), 4,40 (t, J=5,0 Hz, 2H), 4,36 (s, 2H), 3,65-3,72 (m, 4H), 3,05 (t, J=5,0 Hz, 2H), 2,78-2,87 (m, 4H). LCMS (m/z) [M+H] 511,9.

Datos biológicos: estables hasta 60 minutos en plasma de ratón

2) éster de 2-morfolinoetílico del ácido 2,5-dihidroxi-3-[[2,5-hidroxi-3-(2-morfolinoetoxicarbonil)fenil]metilsulfonilmetil]benzoico (IVc-059a-mpe2)



Se preparó una solución de ácido 2,5-dibenciloxi-3-[(2,5-dibenciloxi-3-carboxifenil)metilsulfonilmetil]benzoico (69 mg, 0,091 mmol) y 2-morfolinoetanol (25 mg, 0,19 mmol) en N,N-dimetilformamida (1 ml) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (42 mg, 0,48 mmol) y se añadieron N,N-dimetilpiridin-4-amina (5 mg, 0,04 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La solución resultante se evaporó hasta sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía en una columna de sílice utilizando metanol al 10 % y diclorometano al 90 % para producir el producto del título como una goma incolora (58 mg, 65 %). LCMS (m/z) [M+H] 985,0.

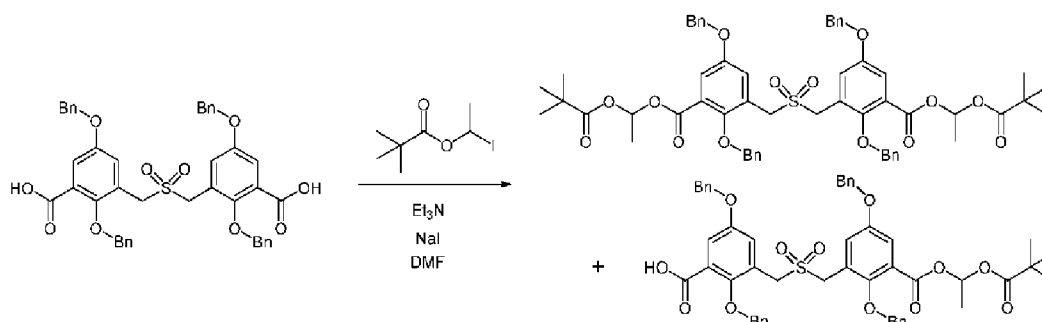
Se preparó una solución del diéster obtenido anteriormente (58 mg, 0,059 mmol) en tetrahidrofurano (1,5 ml) y se añadió a una suspensión agitada de paladio al 10 % sobre carbono (5 mg, 0,005 mmol) en agua (0,5 ml). La mezcla de reacción agitada se colocó en una atmósfera de hidrógeno durante 18 horas. La reacción se filtró para eliminar el catalizador y la solución se evaporó para dar un sólido marrón. El sólido se purificó mediante HPLC en una columna C18 utilizando un gradiente de acetonitrilo al 10 %, agua del 90 % a acetonitrilo al 60 %, agua al 40 % (ácido fórmico al 0,1 %) para dar un sólido blanco (13,7 mg).

El sólido se trituró con éter dietílico y se secó al vacío para producir el producto del título **IVc-059a-mpe2** como un sólido blanco (9,1 % mg, 25 %).

^1RMN de ^1H (CD_3OD ppm) δ 8,34 (brs, 2H), 7,32 (d, J=3,1 Hz, 2H), 7,16 (d, J=3,1 Hz, 2H), 4,52 (t, J=5,5 Hz, 4H), 4,45 (s, 4H), 3,68-3,73 (m, 8H), 2,83 (t, J=5,5 Hz, 4H), 2,58-2,65 (m, 8H). LCMS (m/z) [M+H] 625,0.

Biodatos: estables hasta 60 minutos en plasma de ratón; $T_{1/2}$ (plasma humano): > 180 minutos

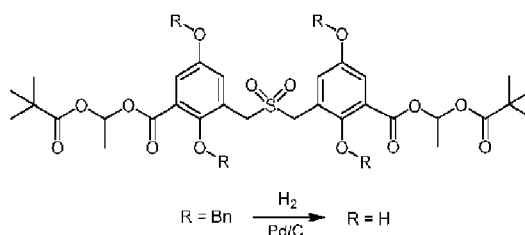
3) Éster de 1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etil del ácido 3-[[3-[1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etoxicarbonil]-2,5-dihidroxifenil]metil-sulfonilmetil]-2,5-dihidroxibenzoico (IVc-059a-pive2)



Esterificación. Se preparó una solución de ácido 2,5-dibenciloxi-3-[(2,5-dibenciloxi-3-carboxi-fenil)metil-sulfonilmetil]benzoico (200 mg, 0,263 mmol) en N,N-dimetilformamida anhidra (5 ml) y trietilamina (88 µl, 0,63 mmol), yoduro de sodio (8 mg, 0,053 mmol) y 1-yodoetil 2,2-dimetil-bruto Se añadió propanoato de metilo (aproximadamente 4,2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La solución resultante se evaporó hasta un volumen pequeño y el residuo se repartió entre diclorometano y una solución de tiosulfato de sodio. La capa orgánica se filtró a través de una frita hidrófoba y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en una columna de gel de sílice eluyendo con un gradiente de isohexano al 100 % hasta acetato de etilo/isohexano 50:50 para producir el diéster como una goma incolora (110 mg, 41 %). LCMS (m/z) [M+Na] 1037,0

El monoéster también se aisló de la misma columna como una goma incolora (90 mg, 40 %). LCMS (m/z) [M+Na] 909,6.

Hidrogenólisis:



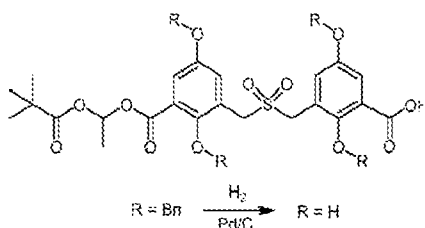
Se añadió una solución del diéster aislado anteriormente (110 mg, 0,108 mmol) en tetrahidrofurano (3 ml) a una suspensión agitada de paladio al 10 % sobre carbono (20 mg, 0,02 mmol) en agua (1 ml). La mezcla de reacción agitada se colocó en una atmósfera de hidrógeno durante 48 horas. La mezcla de reacción se filtró para eliminar el catalizador, la solución se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía en una columna de sílice eluyendo con un gradiente de 100 % de diclorometano a 10 % de metanol y 90 % de diclorometano para dar el producto del título **IVc-059a-pive2** como un sólido de color crema (55 mg, 78 %).

RMN de ^1H (CDCl_3 ppm) δ 10,55 (s, 2H), 7,24-7,28 (m, 2H), 7,14-7,18 (m, 2H), 7,05 (q, J=5,4 Hz, 2H), 6,18 (br s, 2H), 4,30-4,50 (m, 4H), 1,60 (d, J=5,4 Hz, 6H), 1,21 (s, 18H). LCMS (m/z) [M-H] 653,9.

Datos biológicos: se hidroliza rápidamente en plasma humano y de ratón

4) Ácido 3-[[3-[1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etoxicarbonil]-2,5-dihidroxifenil]metilsulfonil-metil]-2,5-dihidroxibenzoico (IVc-059a-pive1)

Hidrogenólisis:



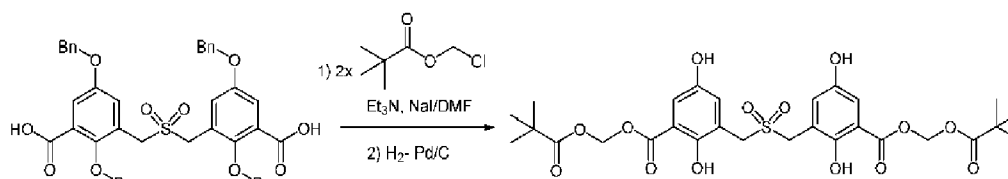
Se añadió una solución del monoéster aislado anteriormente (90 mg, 0,104 mmol) en tetrahidrofurano (3 ml) a una suspensión agitada de paladio al 10 % sobre carbono (20 mg, 0,02 mmol) en agua (1 ml). La mezcla de reacción

agitada se colocó en una atmósfera de hidrógeno durante 48 horas. La reacción se filtró para eliminar el catalizador, la solución se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía en una columna de sílice eluyendo con un gradiente del 100 % de diclorometano al 20 % de metanol y al 80 % de diclorometano para producir el producto del título **IVc-059a-pive1** como un sólido de color crema (22,5 mg, 43 %).

RMN de ^1H (CD_3OD ppm) δ 7,39 (d, $J=3,1$ Hz, 1H), 7,25 (d, $J=3,1$ Hz, 1H), 7,18 (d, $J=3,1$ Hz, 1H), 7,05 (q, $J=5,4$ Hz, 1H), 6,96 (d, $J=3,1$ Hz, 1H), 4,40-4,45 (m, 4H), 1,61 (d, $J=5,4$ Hz, 3H), 1,21 (s, 9H). LCMS (m/z) [$\text{M}-\text{H}$] 524,9.

Datos biológicos: se hidroliza rápidamente en el plasma de ratón

5) 2,5-dihidroxi-3-[[2,5-dihidroxi-3-(2,2-dimetil-propanoilo oximetoxicarbonil)fenil]metilsulfonilmetil]benzoato de 2,5-dimetilpropanoilo ximetil (IVc-059a-pivm2)



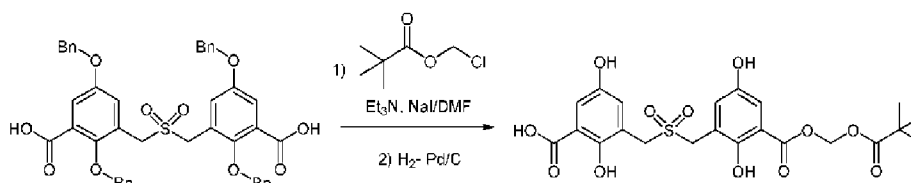
Esterificación. Se preparó una solución de ácido 2,5-dibenciloxi-3-[(2,5-dibenciloxi-3-carboxi-fenil)metilsulfonil-metil]benzoico (100 mg, 0,131 mmol) en N,N-dimetilformamida anhidra (1 ml) y se añadió 2,2-dimetilpropanoato de clorometilo (91 μl , 0,631 mmol) seguido de trietilamina (110 μl , 0,789 mmol) y yoduro de sodio (87 mg, 0,579 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 6,5 horas. La solución resultante se evaporó y el residuo se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en una columna de gel de sílice eluyendo con un gradiente de 100 % de isohexano a 50 % de acetato de etilo, 50 % de isohexano para producir el producto diéster como una goma incolora (85 mg, 66 %). LCMS (m/z) [$\text{M}+\text{Na}$] 1010,0.

Hidrogenólisis: Se añadió una solución del diéster obtenido anteriormente (85 mg, 0,086 mmol) en tetrahidrofurano (3 ml) a una suspensión agitada de paladio al 10 % sobre carbono (20 mg, 0,02 mmol) en agua (1 ml). La mezcla de reacción agitada se colocó en una atmósfera de hidrógeno durante 18 horas. La reacción se filtró para eliminar el catalizador, la solución se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía en una columna de gel de sílice eluyendo con un gradiente de 100 % de isohexano al 60 % de acetato de etilo y 40 % de isohexano para producir el diéster **IVc-059a-pivm2** como un sólido blanco (31 mg, 57 %).

RMN de ^1H (CDCl_3 ppm) δ 7,29 (d, $J=2,9$ Hz, 2H), 7,19 (d, $J=2,9$ Hz, 2H), 5,97 (s, 4H), 4,42 (s, 4H), 1,22 (s, 18H). LCMS (m/z) [$\text{M}-\text{H}$] 624,8.

Datos biológicos: se hidrolizó rápidamente en plasma de ratón, $T_{1/2} = 14,1$ min; $T_{1/2}$ (plasma humano): > 180 minutos

6) Ácido 2,5-dihidroxi-3-[[2,5-dihidroxi-3-(2,2-dimetilpropanoilo oximetoxicarbonil) fenil]metil-sulfonilmetil]benzoico (IVc-059a-pivm1)



Esterificación: Se preparó una solución de ácido 2,5-dibenciloxi-3-[(2,5-dibenciloxi-3-carboxifenil)metilsulfonil metil]benzoico (300 mg, 0,395 mmol) en N,N-dimetilformamida anhidra (3 ml) y se añadió 2,2-dimetilpropanoato de clorometilo (57 μl , 0,395 mmol) seguido de trietilamina (68 μl , 0,489 mmol) y yoduro de sodio (129 mg, 0,870 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas. La solución resultante se enfrió, después se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en una columna de sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 20 %, isohexano al 80 % de acetato de etilo y 20 % de isohexano para producir el producto monoéster como un sólido blanco (121 mg, 35 %). LCMS (m/z) [$\text{M}-\text{H}$] 871,0.

Hidrogenólisis: Se añadió una solución del monoéster obtenido anteriormente (121 mg, 0,138 mmol) en tetrahidrofurano (3 ml) a una suspensión agitada de paladio al 10 % sobre carbono (20 mg, 0,02 mmol) en agua (1 ml). La mezcla de reacción agitada se colocó en una atmósfera de hidrógeno durante 48 horas. La reacción se filtró para eliminar el catalizador, la solución se evaporó y el residuo se purificó mediante HPLC en una columna C18 eluyendo con un gradiente de 30 % de acetonitrilo, 70 % de agua a 100 % de acetonitrilo (0,1 % de ácido fórmico) para producir el monoéster **IVc-059a-pivm1** como un sólido blanco (30 mg, 42 %).

RMN de ^1H (CD_3OD ppm) δ 7,34 (d, $J=3,0$ Hz, 1H), 7,27 (d, $J=3,1$ Hz, 1H), 7,20 (d, $J=3,1$ Hz, 1H), 7,08 (d, $J=3,0$ Hz, 1H), 6,01 (s, 2H), 4,45 (s, 4H), 1,22 (s, 9H). LCMS (m/z) $[\text{M}-\text{H}]$ 510,9.

5 Datos biológicos: se hidrolizó rápidamente en plasma de ratón, $T_{1/2} = 6,7$ min; $T_{1/2}$ (plasma humano): > 180 minutos

Ejemplo 2: Métodos experimentales generales

Espectroscopía de RMN

10 Los espectros de RMN de ^1H se registraron a 400 MHz en un espectrómetro de RMN Bruker Advance III. Las muestras se prepararon en cloroformo deuterado (CDCl_3) o dimetilsulfóxido ($\text{DMSO}-d_6$) y los datos sin procesar se procesaron utilizando el software de RMN Mnova. Los espectros de masas de alta resolución se registraron con un espectrómetro de masas de ultra alta resolución ESI qTOF MaXis.

Análisis UPLC-MS

20 El análisis UPLC-MS se llevó a cabo en un sistema UPLC Waters Acquity que consistía en un gestor de muestras de Acquity I-Class FL, un gestor de disolventes binarios Acquity I-Class y un gestor de columnas UPLC Acquity I-Class. La detección UV se logró con un detector PDA UPLC Acquity I-Class (escaneo de 210 - 400 nm), mientras que la detección de masa se logró con un detector Acquity QDa (escaneo masivo de 100 a 1250 Da; modos positivo y negativo simultáneamente). Se utilizó una columna Waters Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 mm) para lograr la separación de los analitos.

25 Las muestras se prepararon disolviendo (con o sin sonicación) en 1 ml de una mezcla 1:1 (v/v) de MeCN en H_2O . Las soluciones resultantes se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0,45 μm antes de enviarse para su análisis. Todos los disolventes (incluido el ácido fórmico y la solución de amoníaco al 36 %) utilizados se utilizaron como el grado de HPLC.

30 Para este trabajo se utilizaron cuatro métodos analíticos diferentes, cuyos detalles se presentan a continuación. Ejecución *ácida* (2 min): Ácido fórmico al 0,1 % v/v en agua [eluyente A]; Ácido fórmico al 01 % v/v en MeCN [eluyente B]; Velocidad de flujo 0,8 ml/min; volumen de inyección de 2 μl y 1,5 minutos de tiempo de equilibrio entre muestras.

Tabla 14:

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0,00	95	5
0,25	95	5
1,25	5	95
1,55	5	95
1,65	95	5
2,00	95	5

45 *Ejecución ácida* (4 min): Ácido fórmico al 0,1 % de v/v en agua [eluyente A]; Ácido fórmico al 0,1 % de v/v en MeCN [eluyente B]; Velocidad de flujo 0,8 ml/min; Volumen de inyección de 2 μl y 1,5 minutos de tiempo de equilibrio entre muestras.

Tabla 15:

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0,00	95	5
0,25	95	5
2,75	5	95
3,25	5	95
3,35	95	5
4,00	95	5

65 *Ejecución ácida* (6,5 min): 10 mM de formiato de amonio + 0,1 % de v/v de ácido fórmico [eluyente A]; Ácido fórmico al 0,1 % de v/v en MeCN [eluyente B]; Velocidad de flujo 0,6 ml/min; Volumen de inyección 2 μl .

Tabla 16:

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0,00	95	5
0,50	95	5
4,00	5	95
4,50	5	95
4,52	95	5
6,50	95	5

Ejecución básica (2 min): amoniaco al 0,1 % en agua [eluyente A]; amoniaco al 0,1 % en MeCN [eluyente B]; Velocidad de flujo 0,8 ml/min; Volumen de inyección de 2 µl y 1,5 minutos de tiempo de equilibrio entre muestras.

Tabla 17:

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0,00	95	5
0,25	95	5
1,25	5	95
1,55	5	95
1,65	95	5
2,00	95	5

Ejecución básica (4 min): amoniaco al 0,1 % en agua [eluyente A]; amoniaco al 0,1 % en MeCN [eluyente B]; Velocidad de flujo 0,8 ml/min; Volumen de inyección de 2 µl y 1,5 minutos de tiempo de equilibrio entre muestras.

Tabla 18:

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)	(%)
0,00	95		5
0,25	95		5
2,75	5		95
3,25	5		95
3,35	95		5
4,00	95		5

Ejecución básica (6,5 min): 10 mM de bicarbonato de amoniaco + solución de amoniaco al 35 % al 0,1 % v/v [eluyente A]; Ácido fórmico al 0,1 % de v/v en MeCN [eluyente B]; Velocidad de flujo 0,6 ml/min; Volumen de inyección 2 µl.

Tabla 19:

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0,00	95	5
0,50	95	5
4,00	5	95
4,50	5	95
4,52	95	5
6,50	95	5

Purificación por HPLC preparativa

La HPLC preparativa se realizó utilizando el sistema de autopurificación Waters con una columna XBridge Prep C18 (19 x 150 mm). El sistema Waters consistía en una bomba de preparación binaria Waters 2545, un gestor de muestras Waters 2767, un organizador de columnas Waters SFO, un Waters 2998 DAD, una bomba de reposición Waters 515 y un espectrómetro de masas Acquity QDa

El sistema de purificación se controló mediante el software MassLynx (versión 4.2) con un módulo de inicio de sesión de acceso abierto.

Las fases móviles consistían en (A) formiato de amonio 10 mM (+ 0,1 % v/v de ácido fórmico) y (B) acetonitrilo (+ 0,1 % v/v de ácido fórmico).

Las muestras se prepararon disolviéndolas en agua al 10 % v/v en DMSO para dar una concentración de ~150 mg/ml. Se cargó un volumen de 320 ml de la muestra preparada en la columna y se purificó mediante elución en gradiente a temperatura ambiente con un caudal de 25 ml/min. Hay un equilibrio de 1,5 minutos entre las inyecciones.

Tabla 20: Gradiente:

Tiempo (min)	% (A)
0,0	95
0,5	95
14,5	0
17,4	0
17,5	95
18,0	95

Ejemplo 3: Métodos de detección *in vitro*

Ejemplo 3.1: Método de inhibición *in vitro* de células HUVEC FGF1, FGF2 y VEGF-A

El objetivo de este método *in vitro* es evaluar los efectos de los compuestos sobre FGF-2, FGF-1, o la germinación inducida por VEGF-A de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) en el ensayo de angiogénesis celular basado en esferoides.

Antes de añadir los factores de crecimiento a las células, se preincubaron con el compuesto. El sunitinib se probó como control (sin preincubación).

El control del sunitinib inhibió la brotación de HUVEC inducida por FGF-2, FGF-1 y VEGF-A, tal como se esperaba. Los valores de IC₅₀ determinados para los compuestos ensayados se expresan en microM [μM] y los valores para la inhibición del crecimiento (brotación) inducido por FGF-1, FGF2 y VEGF-A se enumeran después de cada compuesto en los ejemplos después de la caracterización química.

La prueba de germinación se realizó en los compuestos disueltos en DMSO para alcanzar soluciones madre concentradas 100 veces y se disolvieron en medios de cultivo. El sunitinib como compuesto de referencia fue proporcionado por ProQinase GmbH. Los factores de crecimiento se adquirieron en rhFGF-básico (FGF-2), Peprotech, Nueva Jersey, EE. UU., #100 -18C, número de lote 0415571; rhFGF-ácido (FGF-1), Peprotech, Nueva Jersey, EE. UU., #100 -17A, lote número 031207; hVEGF-A165 (ProQinase GmbH, Freiburg, Alemania; 05,02,2010) se utilizaron para estimular el crecimiento de las células HUVEC.

Sistema de prueba: Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) de donantes agrupados se almacenaron congeladas con un 70 % de mediana, un 20 % de FCS y un 10 % de DMSO a aproximadamente 1 x 10⁶ células/ampolla. Las células HUVEC, células endoteliales primarias de la vena umbilical humana (PromoCell, Heidelberg, Alemania), se utilizaron después de los pasos 3 a 4. La morfología de las células es adherente, similar a un empedrado que crece como monocapa y se cultivaron en medio basal y de crecimiento de células endoteliales (ECGM/ECBM, PromoCell). La subcultura se dividió 1:3; cada 3 a 5 días, se siembran a aproximadamente 1 x 10⁴ células/cm² y se incuban a 37 °C con un 5 % de CO₂ con un tiempo de duplicación de 24 a 48 horas

Dilución de los compuestos de ensayo: Se prepararon 100 veces más soluciones concentradas (con respecto a las concentraciones finales del ensayo) de cada compuesto de prueba con el disolvente apropiado (en DMSO o en agua). Estas soluciones compuestas 100x se diluyeron adicionalmente en crecimiento de células endoteliales y medio basal (ECBM) 1:7,5 % para obtener una solución concentrada de 13,33 veces. Posteriormente, 75 μl de la solución de 13,33

veces se mezclaron con 25 µl de estímulo concentrado 40 veces (resuelto en ECBM), dando como resultado una mezcla concentrada de estímulo/compuesto 10 veces. Esta mezcla (100 µl) se incubó durante 30 minutos a 37 °C y después se añadió a 900 µl de gel, que contenía los esferoides HUVEC (lo que resultó en la concentración final del ensayo).

Método de ensayo: los experimentos se prosiguieron modificando el protocolo publicado originalmente (Korff y Augustin: J Cell Sci 112: 3249-58, 1999). En resumen, los esferoides se prepararon como se describe (Korff y Augustin: J Cell Biol 143: 1341-52, 1998) pipeteando 400 HUVEC en una gota colgante sobre platos de plástico para permitir la agregación de esferoides durante la noche. A continuación, se sembraron 50 esferoides HUVEC en 0,9 ml de un gel de colágeno y se pipetearon en pocillos individuales de una placa de 24 pocillos para permitir la polimerización. Los compuestos de ensayo se preincubaron con los factores de crecimiento (concentración final de FGF-1, FGF-2 o VEGF-A de 25 ng/ml) en una solución concentrada 10 veces y posteriormente, se añadieron 100 µl de esta solución a la parte superior del gel polimerizado. Todos los compuestos se diluyeron primero en disolvente (DMSO o agua) como soluciones madre 100 veces (lo que significa que se prepararon 100 veces más soluciones madre de cada concentración final del ensayo en disolvente). Posteriormente, estas soluciones madre se diluyeron adicionalmente en el medio (lo que dio como resultado 13,33 veces las reservas de cada concentración de ensayo final) y se probaron las concentraciones finales: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 y $1,56 \times 10^{-6}$ M). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se fijaron añadiendo PFA al 4 % (Roth, Karlsruhe, Alemania).

Quantificación de la inhibición del factor de crecimiento: la intensidad de brotación de los esferoides HUVEC tratados con el factor de crecimiento y los inhibidores se cuantificó mediante un sistema de análisis de imágenes que determinó la longitud acumulada de brotes por esferoide (CSL). Se tomaron fotografías de esferoides individuales utilizando un microscopio invertido y el software de imágenes digitales NIS-Elements BR 3.0 (Nikon). Posteriormente, las imágenes de los esferoides se subieron a la página de inicio de la empresa Wimasys para su análisis de imágenes. La longitud acumulada de los brotes de cada esferoide se determinó utilizando la herramienta de análisis de imágenes WimSprout. La media de la longitud acumulada de los brotes de 10 esferoides seleccionados al azar se analizó como un punto de datos individual. Para la determinación de la IC50, los datos sin procesar se convirtieron en el porcentaje de brotación de HUVEC en relación con el control con disolvente (que contenía el estímulo), que se estableció en el 100 % y el control basal (sin estimulación), que se estableció en 0 %. Los valores de IC50 se determinaron utilizando el software GraphPad Prism 5 con una restricción de la parte inferior a 0 y de la parte superior a 100 utilizando un ajuste de curva de regresión no lineal con pendiente variable.

Resultados: Se evaluó la relación dosis-respuesta en la brotación de células endoteliales inducida por el factor de crecimiento para todos los compuestos. Los valores de IC50 se determinaron utilizando parámetros estándar basados en la señal del control del disolvente como restricción superior (100 % de brotación de HUVEC) y la señal del control basal como restricción inferior (0 %). Los valores de IC50 respectivos para cada compuesto en FGF1, FGF2 y VEGFA se resumieron bajo cada compuesto debajo de su caracterización química en el párrafo BIODATA.

Ejemplo 3.2: Adhesión in vitro de neutrófilos en condiciones estáticas, método

Los neutrófilos humanos obtenidos de la capa leucocitaria de donantes sanos se suspendieron a 3×10^6 /ml en un regulador de adhesión (PBS que contenía $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ de 1 mM y FCS al 10 %, pH 7,2). Los neutrófilos se preincubaron durante 30 minutos a 37 °C con 40 µM y 80 µM de los compuestos.

Los ensayos de adhesión se realizaron en portaobjetos de vidrio de 18 pocillos recubiertos durante 18 h a 4 °C con fibrinógeno humano (20 µg/pocillo en PBS libre de endotoxinas); Se añadieron 20 µl de suspensión celular a cada pocillo y se estimularon durante 1 minuto a 37 °C con 5 µl de concentración final de FMLP de 1 nM. Después del lavado, las células adherentes se fijaron en glutaraldehído al 1,5 % en PBS y se contaron mediante recuento asistido por ordenador. El análisis estadístico se realizó calculando la media y la desviación estándar (SD, por sus siglas en inglés); la significación se calculó mediante la prueba t no apareada. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism 6 (software GraphPad).

La inhibición respectiva de la adhesión de los neutrófilos expresada en [%] para cada compuesto se resumió bajo cada compuesto debajo de su caracterización química en el párrafo BIODATA.

Ejemplo 3.3: Ensayos in vitro sobre la inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en neutrófilos humanos

La NADPH oxidasa, localizada en la membrana plasmática y en membranas de gránulos específicos, produce aniones superóxido a partir de los cuales se producen otras ROS, como peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete, hipoclorito, y radicales hidroxilo activos. Las ROS se liberan en el medio circundante o en un orgánulo subcelular encerrado en una membrana. Un método rápido y sensible para medir la generación de estos metabolitos es la quimioluminiscencia (CL, por sus siglas en inglés). La técnica de CL amplificada con isoluminol es muy sensible y se utiliza ampliamente para estudiar las ráfagas respiratorias (principalmente la producción extracelular de ROS) inducidas en los neutrófilos.

Los neutrófilos humanos se aislaron de capas leucocitarias obtenidas de donantes sanos. Los neutrófilos aislados (3×10^6 /ml) se suspendieron en una solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) con calcio y magnesio. Los neutrófilos se preincubaron con los compuestos a diferentes concentraciones (0,1, 0,3, 1, 3 y 10 µM) durante 30 minutos a 37 °C. Las

placas de cultivo celular negras de 96 pocillos se recubrieron con fibrinógeno humano (0,25 mg/ml en PBS) y se incubaron durante una noche a 4 °C o 2 h a 37 °C. Después las placas se lavaron con PBS libre de endotoxinas. Los neutrófilos se incubaron (cebando) con TNF- α (20 ng/ml) durante 10 minutos a 37 °C. Después se añadieron 75 μ l de suspensión celular y 75 μ l (solución de isoluminol + HRP) a cada pocillo. La quimioluminiscencia se registró (cada 25 segundos durante 250 segundos) después de la activación del fMLP (1 μ M) utilizando un lector multietiqueta victor3 (Perkin Elmer, EE. UU.) Los valores de fondo, definidos como los valores quimioluminiscentes medios del isoluminol diluido en HBSS, se restaron de todas las lecturas (CPS, recuento por segundo). Los ensayos se realizaron por duplicado o triplicado.

Los resultados obtenidos del ensayo de CL amplificado con isoluminol revelaron que los compuestos redujeron considerablemente el nivel de ROS de un modo dependiente de la concentración en la PMN estimulada por fMLP + TNF- α .

La inhibición de ROS de PMN a 0,3 μ M expresada en [%] e IC50 [μ M] se resumió para cada compuesto debajo de su caracterización química en el párrafo BIODATA.

Ejemplo 3.4: Producción in vitro de citocinas inflamatorias de neutrófilos humanos y monocitos humanos, método

Se aislaron neutrófilos y monocitos de la capa leucocitaria de donantes sanos, en condiciones libres de endotoxinas. En resumen, las capas leucocitarias se estratificaron en un gradiente Ficoll-Paque PLUS y después se centrifugaron a 400 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se recogieron los neutrófilos y se sometieron a sedimentación con dextrano seguida de lisis hipotónica para eliminar los eritrocitos. En cambio, los monocitos se aislaron de las PBMC, después de la centrifugación en gradientes de Percoll. Los neutrófilos y monocitos humanos se suspendieron a 5x10⁶/ml y 2,5x10⁶/ml, respectivamente, en medio RPMI 1640 suplementado con un 10 % de FBS bajo en endotoxinas (< 0,5 EU/ml; de BioWhittaker-Lonza, Basilea, Suiza) y después se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos a 37 °C, con una atmósfera de CO₂ al 5 %, en presencia o ausencia de diferentes concentraciones (20-40 μ M) de los compuestos. Después de 1 h de tratamiento con fármacos, los monocitos se estimularon con 0,1 μ g/ml, mientras que los neutrófilos con 1 μ g/ml de LPS ultrapuro de la cepa 0111:B4 de E. coli (InvivoGen). Después de 6 h de estimulación con LPS, se recogieron neutrófilos y monocitos y se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos. Los sobrenadantes libres de células se congelaron inmediatamente a -80 °C.

Las concentraciones de citocinas en los sobrenadantes libres de células se midieron mediante kits de ELISA disponibles en el mercado, específicos para humanos: CXCL8, IL-6, TNF- α (Mabtech, Suecia). Los límites de detección de estos ELISA fueron: 4 pg/ml para CXCL8, 10 pg/ml para IL-6 y 4 pg/ml para TNF- α .

El análisis estadístico se realizó calculando la media y la desviación estándar (SD); la significación se calculó mediante la prueba t no apareada. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism 6 (software GraphPad).

Los valores de citocinas se expresaron en ng/ml para cada compuesto y se resumieron para cada compuesto debajo de su caracterización química en el párrafo BIODATA.

Ejemplo 3.5: Método de inhibición in vitro mediante compuestos del VEGF-165 inducido por la fosforilación del receptor del VEGF en las células endoteliales primarias de la vena umbilical humana (HUVEC)

Cultivo celular: Las células endoteliales primarias de la vena umbilical humana (HUVEC, por sus siglas en inglés) se cultivaron de forma rutinaria en matraces o placas prerrecubiertas con gelatina al 0,1 %, hasta el paso 6. El efecto de los compuestos solos a diferentes concentraciones (0, 1,25, 2,5, 5, 10 y 20 μ M) sobre la viabilidad celular se evaluó mediante el kit CCK-8 utilizando un lector de microplacas Tecan (Genios). Para medir el efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular inducida por el VEGF, las HUVEC (1 x 10⁴ células/pocillo) se trataron con VEGF (25 ng/ml) premezclado con diversas concentraciones de compuestos (0, 1,25, 2,5, 5, 10 y 20 μ M) en un medio de cultivo sin suero ni factores de crecimiento (medio de inanición) durante 24 y 48 h. Los compuestos en este rango de concentración no afectaron la viabilidad celular.

Los anticuerpos primarios de conejo para VEGFR-2, p-Tyr1175 se adquirieron de Cell Signaling Technology (Leiden, Países Bajos). El kit ELISA tipo sándwich Phospho-VEGFR-2 (Tyr1175) era de Cell Signaling Technology.

Las HUVEC se preincubaron con compuestos a 0, 0,16, 0,31, 0,63, 1,25, 2,5, 5, 10 y 20 μ M durante 60 minutos con tres pasos de lavado posteriores con medio caliente antes de la estimulación con VEGF165 (25 ng/ml) durante 2 minutos. El análisis mediante inmunotransferencia Western se realizó utilizando el anticuerpo antifosfo-VEGFR-2 y el VEGFR-2 total se utilizó como control de carga después de la extracción de la membrana.

Los resultados de inhibición de la fosforilación del VEGFR-2 se expresan como IC50 en microM [μ M] frente al control de HUVEC tratado con VEGF sin compuesto inhibidor.

Los valores de IC50 respectivos expresados en [μ M] para cada compuesto se resumen bajo cada compuesto debajo de su caracterización química en el párrafo BIODATA.

Ejemplo 3.6: Inhibición de la liberación de citocinas in vitro mediante compuestos después de la inducción del LPS en sangre entera humana

El objetivo de este método in vitro es evaluar los efectos de los compuestos sobre la liberación de un panel de citocinas de la sangre entera después de una reacción inflamatoria inducida por lipopolisacáridos (LPS). La sangre entera se incubó con los compuestos durante 1 h antes de la inducción de los LPS. Los niveles de citocinas en sangre se midieron mediante un panel multiplex basado en FACS.

Los valores de IC50 determinados para los compuestos ensayados expresados en microM [μM] y los valores para la inhibición de las citocinas se enumeraron para cada compuesto.

El efecto sobre la liberación de citocinas después de la inducción con LPS se realizó en los compuestos disueltos en DMSO o H₂O para alcanzar soluciones madre concentradas 10 veces y disueltas en medios de cultivo.

Sistema de prueba: Se extrajo sangre entera de un solo donante (en tubos recubiertos con heparina de litio; BD Vacutainer; 367886) y se diluyó 1:5 con RPMI 1640 (Thermo Fisher, 61870036). A los 30 minutos de la toma de muestras, la sangre se incubó con los compuestos durante 1 h antes de la estimulación con LPS (O111:B4 - Sigma L4391; 10 ng/ml de concentración final). La estimulación continuó en condiciones de cultivo celular estándar (37 °C con un 5 % de CO₂) durante una noche (18 h), después de lo cual las placas se centrifugaron y se retiró el sobrenadante y se congeló a -80 °C hasta su uso para los análisis.

Dilución de los compuestos de ensayo: Se prepararon 10 veces soluciones concentradas (con respecto a las concentraciones finales del ensayo) de cada compuesto de prueba con el disolvente apropiado (en DMSO o en agua). Estas soluciones compuestas 10 veces (10 μl) se añadieron después a 90 μl de sangre entera prediluida (sangre entera: RPMI1640, 1:5) dando como resultado la concentración final del ensayo.

Método de ensayo: La sangre entera diluida (80 μl) se preincubó con compuestos (10 μl) para obtener concentraciones finales de ensayo de 100, 30, 10, 3, 1, 0,3 % y 0,1 % x 10⁻⁶M. La sangre se incubó a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 1 h. El LPS se diluyó en medios de cultivo celular hasta una concentración de 110 ng/ml; Se añadieron 10 μl a la sangre completa para dar una concentración final de 10 ng/ml. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 h. Las placas se centrifugaron a 3000 RPM durante 5 minutos a 4 °C y el sobrenadante se retiró y se congeló a -80 °C hasta que se llevó a cabo el análisis FACS.

La liberación de citocinas se midió utilizando un sistema multiplex personalizado (ELISA Genie) según las instrucciones del fabricante. Las muestras preparadas se analizaron en un citómetro de flujo Attune NxT (Thermo Fisher).

Cuantificación de la inhibición de la liberación de citocinas: se realizaron estándares de concentración conocidos como parte del panel de citocinas para permitir la cuantificación de cada concentración de citocinas en cada muestra. Esto se llevó a cabo utilizando el software FCAP Array v3.0. Para la determinación de IC50, los datos sin procesar se convirtieron en porcentaje de concentración en relación con el control del disolvente, que se estableció en el 100 %. Los valores de IC50 se determinaron utilizando el software GraphPad Prism 8 con una restricción de la parte inferior a 0 y de la parte superior a 100 utilizando un ajuste de curva de regresión no lineal con pendiente variable.

Resultados: Se evaluó la relación dosis-respuesta con la liberación de citocinas después de la inducción de la respuesta inflamatoria por LPS en sangre entera para todos los compuestos. Los valores de IC50 se determinaron para cada compuesto para un panel de citocinas (GM-CSF, IFN-gamma, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-18, IL-21, IL-22, IL-33, TGF-beta, TNF-alpha, TNF-beta). Las IC50 de las citocinas respectivas expresadas en valores [μM] para cada compuesto se resumieron bajo cada compuesto debajo de su caracterización química en el párrafo BIODATA y también en la tabla 13.

Ejemplo 4: Formulaciones compuestas

Ejemplo 4.1: Formulaciones orales del compuesto Ic-007a

Se desarrollaron y revisaron cinco formulaciones para determinar su idoneidad. Se trataba tanto de suspensiones como de soluciones cuyos detalles se dan en la siguiente tabla.

Tabla 21: Detalles de la formulación para la suspensión y las soluciones del compuesto Ic-007a.

	Suspensión A	Solución D	Solución A	Solución B	Solución C
Componente	Cantidad (%)				
API	1 % p/v (10 mg/ml)	0,1 % p/v (1 mg/ml)	1 % p/v (10 mg/ml)	1 % p/v (10 mg/ml)	1 % p/v (10 mg/ml)
DMSO	5 % v/v	5 % v/v	5 % v/v	5 % v/v	5 % v/v
PEG 400	10 % v/v	10 % v/v	10 % v/v	10 % v/v	10 % v/v

	Suspensión A	Solución D	Solución A	Solución B	Solución C
Componente	Cantidad (%)				
Solutol HS15	10 % p/v	10 % p/v	10 % p/v	10 % p/v	10 % p/v
Hidróxido de sodio 1M	n/a	n/a	Hasta pH 6	Hasta pH 8	Hasta pH 9
Agua	al 100 %	al 100 %	al 100 %	al 100 %	al 100 %

Fabricación: Suspensión A y solución D:

Ejemplo de método para 100 ml (escala según corresponda para el volumen final requerido). La solución madre de disolvente se preparó midiendo 5 ml de DMSO en un recipiente limpio. Se pesó la cantidad correcta del compuesto lc-007a y se añadió gradualmente a la solución de DMSO mezclándolo en un agitador, vórtice o sonicador. El Solutol se fundió en un baño de agua a 60 °C en un recipiente limpio y seco. A medida que el Solutol se solidificó a temperatura ambiente, el Solutol fundido se mantuvo en un baño de agua a 60 °C durante la preparación de la formulación. Se añadieron 10 g (10 % p/v) de Solutol fundido a un recipiente marcado adecuado calentado (hasta un volumen final de 100 ml). Se añadieron 10 ml de PEG 400 al Solutol en el recipiente calentado de 100 ml. La solución madre de fármaco DMSO se añadió a la mezcla de Solutol y PEG400 y los contenidos se mezclaron instantáneamente, y se añadieron 35 ml de agua desionizada y se mezclaron en un baño a 40 °C agitando con vórtice intermitente para disolver las partículas grandes. La formulación se enfrió a temperatura ambiente y se completó hasta un volumen final de 100 ml con agua desionizada.

Fabricación de soluciones A, B y C:

Ejemplo de método para 100 ml (escala según corresponda para el volumen final requerido). La solución madre de disolvente se preparó midiendo 5 ml de DMSO en un recipiente limpio. Se pesó 1 g del compuesto lc-007a y se añadió gradualmente a la solución de DMSO mezclándolo en un agitador, vórtice o sonicador (cuando fue necesario). El Solutol se fundió en un baño de agua a 60 °C en un recipiente limpio y seco. A medida que el Solutol se solidifica a temperatura ambiente, el Solutol fundido se mantuvo en un baño de agua a 60 °C durante la preparación de la formulación. Se pesaron 10 g (10 % p/v) de Solutol fundido en un recipiente marcado adecuado calentado (hasta un volumen final de 100 ml). Se añadieron 10 ml de PEG 400 al Solutol en el recipiente calentado de 100 ml. La solución madre de fármaco de DMSO se añadió al recipiente marcado de la mezcla de Solutol y PEG 400 y se mezcló instantáneamente con el contenido. Se añadieron 35 ml de agua desionizada y se mezclaron con el contenido y se colocaron en un baño a 40 °C con agitación vorticial intermitente para disolver las partículas grandes. La formulación se enfrió a temperatura ambiente y se ajustó adicionalmente el pH de la formulación utilizando una solución de hidróxido de sodio de 1 M (NaOH) a pH 6, 7, 8 y 9. Las formulaciones iniciales se prepararon en una escala de 1 ml y tenían un pH inicial de 4,3. Se añadió un volumen de 3 µl de NaOH 1M para lograr un pH 6 (solución A), 22 µl para pH 8 (solución B) y 43 µl para pH 9 (solución C). Estas formulaciones se dosificaron inmediatamente después de la fabricación.

Se encontró que la formulación en suspensión de 10 mg/ml y la formulación en solución de 1 mg/ml eran físicamente estables durante dos semanas en condiciones ambientales.

Ejemplo 4.2: Formulaciones orales del compuesto la-001a-Tz

El compuesto la-001a-Tz se preparó como una solución oral de 10 mg/ml en las formulaciones con la composición del vehículo que se muestra en la siguiente tabla.

El vehículo era un medio portador o inerte usado como disolvente (o diluyente) en el que se formulaba y/o administraba el agente medicinalmente activo.

Tabla 22: Detalles de la formulación para la formulación oral de los compuestos la-001aTz.

Vehículo	Composición
A	40 % de PEG400, 10 % de Transcutol, 10 % de Solutol HS15, 40 % de agua tipo 1
B	40 % de PEG400, 10 % de Transcutol, 10 % de Solutol HS15, solución acuosa al 40 % que comprende HPMC 606 al 0,5 %
C	40 % de PEG400, 10 % de Transcutol, 10 % de Solutol HS15, solución acuosa al 40 % que comprende 0,5 % de Kollidon VA 64
D	40 % de PEG400, 10 % de Transcutol, 10 % de Cremophor RH40, 40 % de agua tipo 1
E	40 % de PEG400, 10 % de Transcutol, 10 % de vitamina E TPGS, 40 % de agua tipo 1
F	40 % de PEG400, 10 % de Transcutol, 5 % de Solutol HS15, 45 % de agua tipo 1

Vehículo	Composición
G	40 % de PEG400, 10 % de Transcutol, 5 % de Solutol HS15, 45 % de solución acuosa que comprende un 1 % de Kollidon VA 64

Método de fabricación

Para preparar una solución de 10 mg/g, se pesaron con precisión 10 mg del compuesto en un vial y se añadió 1 ml del vehículo directamente al API y se agitó con vórtex para dar una solución.

Preparación de vehículos

Formulación A: Se prepararon 10 g de vehículo pesando 4 g de PEG400 en un recipiente de vidrio limpio de 20 ml. Se añadió 1 g de Transcutol, y los componentes se mezclaron agitándolos. A esto, se añadió 1 g de Solutol HS15, seguido de 4 g de agua de tipo 1. La mezcla se dejó agitar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran.

Formulación B: Se prepararon 10 g de vehículo pesando 4 g de PEG400 en un recipiente de vidrio limpio de 20 ml. Se añadió 1 g de Transcutol, y los componentes se mezclaron agitándolos. A esto, se añadió 1 g de Solutol HS15. La solución acuosa de HPMC 606 al 0,5 % se preparó pesando 50 mg de HPMC 606 en un vial de vidrio limpio. A esto, se añadieron 9,95 g de agua de tipo 1. Los componentes se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente para garantizar una mezcla adecuada. A continuación, se añadieron 4 g de la solución acuosa que comprendía HPMC 606 al 0,5 % a la solución de PEG400, Transcutol y Solutol HS15. La mezcla se dejó agitar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran.

Formulación C: Se prepararon 10 g de vehículo pesando 4 g de PEG400 en un recipiente de vidrio limpio de 20 ml. Se añadió 1 g de Transcutol, y los componentes se mezclaron agitándolos. A esto, se añadió 1 g de Solutol HS15. La solución acuosa de Kollidon VA64 al 0,5 % se preparó pesando 50 mg de Kollidon VA64 en un vial de vidrio limpio. A esto, se añadieron 9,95 g de agua de tipo 1. Los componentes se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente para garantizar una mezcla adecuada. Después se añadieron 4 g de la solución acuosa que comprendía Kollidon VA64 a la solución de PEG400, Transcutol y Solutol HS15. La mezcla se dejó agitar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran. Formulación D: Se prepararon 10 g de vehículo pesando 4 g de PEG400 en un recipiente de vidrio limpio de 20 ml. Se añadió 1 g de Transcutol, y los componentes se mezclaron agitándolos. A esto, se añadió 1 g de Cremophor RH40, seguido de 4 g de agua de tipo 1. La mezcla se dejó agitar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran.

Formulación E: Se prepararon 10 g de vehículo pesando 4 g de PEG400 en un recipiente de vidrio limpio de 20 ml. Se añadió 1 g de Transcutol, y los componentes se mezclaron agitándolos. A esto, se añadió 1 g de vitamina E TPGS, seguido de 4 g de agua de tipo 1. La mezcla se dejó agitar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran.

Formulación F: Se prepararon 10 g de vehículo pesando 4 g de PEG400 en un recipiente de vidrio limpio de 20 ml. Se añadió 1 g de Transcutol, y los componentes se mezclaron agitándolos. A esto, se añadió 0,5 g de Solutol HS15, seguido de 4,5 g de agua de tipo 1. La mezcla se dejó agitar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran.

Formulación G: Se prepararon 10 g de vehículo pesando 4 g de PEG400 en un recipiente de vidrio limpio de 20 ml. Se añadió 1 g de Transcutol, y los componentes se mezclaron agitándolos. A esto, se añadió 0,5 g de Solutol HS15. La solución acuosa de Kollidon VA64 al 1 % se preparó pesando 100 mg de Kollidon VA64 en un vial de vidrio limpio. A esto, se añadieron 9,9 g de agua de tipo 1. Los componentes se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente para garantizar una mezcla adecuada. Después se añadieron 4,5 g de la solución acuosa que comprendía Kollidon VA64 a la solución de PEG400, Transcutol y Solutol HS15. La mezcla se dejó agitar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran.

Ejemplo 4.3. Formulaciones orales de los compuestos Ilc-007a, IVc-059a, Illic-061a

Los compuestos Ilc-007a, IVc-059a, Illic-061a se prepararon como formulaciones orales utilizando los componentes detallados en la siguiente tabla.

Tabla 23: Detalles de la formulación oral para la formulación oral de los compuestos Ilc-007a, IVc-059a, Illic-061^a

Componente	Cantidad (% en peso)	
	Formulación 1	Formulación 2
PEG 400	40,0	31,0

Componente	Cantidad (% en peso)	
	Formulación 1	Formulación 2
Transcutol HP	3,5	10,0
Meglumina	4,0	4,0
Cremophor RH 40	12,5	15,0
DMSO	5,0	5,0
Solución acuosa de SLS al 15 %	35,0	35,0

Preparación de una solución acuosa de SLS al 15 % a una escala de 50 ml:

Se pesaron con precisión 7,5 g de SLS en un matraz volumétrico de 50 ml. Se añadió agua al volumen de 50 ml y se agitó hasta lograr la solubilización completa.

Preparación de los vehículos de formulación:

Formulación 1: Se prepararon 100 g de vehículo pesando 40 g de PEG 400 (40,0 %) en un vaso de plástico. 3,5 g de Transcutol (3,5 %), 12,5 g de Cremophor RH40 (12,5 %), 4,0 g de meglumina (4,0 %), 5 g de DMSO (5,0 %) y 35 g de solución acuosa de SLS al 15 % (35,0 %, SLS final 5,25 %). La mezcla se dejó agitar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran.

Formulación 2: Se prepararon 100 g de vehículo pesando 40 g de PEG 400 (40,0 %) en un vaso de plástico. 10,0 g de Transcutol (10,0 %), 15,0 g de Cremophor RH40 (15,0 %), 4,0 g de meglumina (4,0 %), 5 g de DMSO (5,0 %) y 35 g de solución acuosa de SLS al 15 % (35,0 %, SLS final 5,25 %). La mezcla se dejó agitar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran.

El vehículo se añadió directamente a cada compuesto antes de agitar con vórtex y sonicar durante 10 minutos. Cuando fue necesario, el pH de la formulación se ajustó con hidróxido de sodio de 1 M o ácido clorhídrico de 1 M para alcanzar el intervalo de pH adecuado para la dosificación oral. Las soluciones Ilc-007a se prepararon en concentraciones de hasta 70 mg/ml inclusive. Las soluciones Ilc-061a se prepararon en concentraciones de hasta 40 mg/ml inclusive. Las soluciones de IVc-059a se prepararon en concentraciones de hasta 150 mg/ml inclusive.

Ejemplo 4.4: Formulaciones intravenosas (IV)

Los compuestos a-001a, la-001a-Tz, la-001a-Tz/004a, lc-007a, lb-010a, IVc-059a, Ilc-061a se prepararon como formulaciones intravenosas.

Los detalles de la formulación que figuran en la siguiente tabla 24 se utilizaron para la administración intravenosa en los diferentes modelos preclínicos *in vivo*. Las soluciones de cada compuesto se fabricaron ajustando el pH con una solución de hidróxido de sodio hasta que se obtuvo una solución.

Tabla 24: Composición de formulación intravenosa

Componente	Cantidad (%)
Sustancia farmacológica API	1 % p/v
DMSO	5 % v/v
PEG 400	10 % v/v
Solutol HS15	10 % p/v
Hidróxido de sodio 1M	q.s.
Solución salina al 0,9 %	hasta 100 %

Método de fabricación:

Ejemplo de método para 10 ml (escala según corresponda para el volumen final requerido). La solución madre de disolvente se preparó midiendo 0,5 ml de DMSO en un recipiente limpio. Se pesaron 100 mg de cada compuesto y se añadieron gradualmente a la solución de DMSO mezclándolo en un agitador, vórtice o sonicado (cuando fue necesario). El Solutol se fundió en un baño de agua a 60 °C en un recipiente limpio y seco. A medida que el Solutol se solidificó a temperatura ambiente, el Solutol fundido se mantuvo en un baño de agua a 60 °C durante la preparación de la formulación. Se pesó 1 g (10 % p/v) de Solutol fundido en un recipiente marcado adecuado calentado (hasta un volumen final de 10 ml). Se añadió

1 ml de PEG 400 al Solutol en el recipiente calentado de 10 ml. La solución madre de fármaco de DMSO se añadió al recipiente marcado de la mezcla de Solutol y PEG 400 y se mezcló instantáneamente con el contenido. Se añadió una solución* salina al 0,9 % para alcanzar el 85 % del volumen objetivo y se mezcló el contenido en un baño a 40 °C agitando con vórtex intermitente para disolver las partículas grandes. La formulación se enfrió a temperatura ambiente, se completó hasta el volumen objetivo final (10 ml) con solución* salina al 0,9 % y el pH de la formulación se ajustó utilizando una solución de 1 M de hidróxido de sodio (NaOH) a pH 7,4. Las formulaciones se filtraron utilizando un filtro de 0,2 µm en un vial estéril dentro de una campana biológica de clase II. Las formulaciones se utilizaron para la dosificación en animales.

* Para algunos compuestos, la solución salina al 0,9 % se sustituyó por una solución de PBS de pH 7,4.

Ejemplo 4.5: Formulaciones intravenosas (IV) e intraperitoneales (IP)

Los compuestos Ic-007a, Ilc-007a, IVc-059a, Illc-061a se prepararon como formulaciones para administración intravenosa e intraperitoneal. Las formulaciones contenían agua y dietilamina en equivalentes molares de cada compuesto correspondiente, tal como se detalla en la tabla 25. Estas formulaciones se utilizaron para administraciones intravenosas e IP en los diferentes modelos preclínicos *in vivo*.

Método de fabricación:

Ejemplo de método para 1 ml (escala apropiada para el volumen final requerido). Se pesaron con precisión 10 mg de cada compuesto en un vial limpio. Se añadió la cantidad correspondiente de dietilamina al vial. Después se añadió agua hasta alcanzar un volumen de 1 ml. El contenido se agitó con vórtex o se sonicó para formar una solución. Cuando fue necesario, el pH de la solución se alteró utilizando ácido clorhídrico de 1 M para llevarlo a un rango adecuado para la dosificación intravenosa o IP.

Tabla 25: Equivalentes molares de dietilamina necesarios para los compuestos en formulaciones IV e IP.

Compuesto	Ic-007a	Ilc-007a	Illc-061a	IVc-059a
Se requiere un equivalente molar de dietilamina	2,0	2,0	3,1	2,0
Se requiere dietilamina para preparar 1 ml de formulación intravenosa	44 µl	44 µl	62 µl	51,9 µl

Ejemplo 4.6: Formulaciones oculares

Se presentaron varios compuestos según la presente invención para el desarrollo de la formulación en un formato ocular. Los compuestos, su concentración final y su forma se muestran en la siguiente tabla 26.

Tabla 26: Formulaciones oculares

Compuestos	Concentración (% p/v)	Suspensión/solución
IVc-059a	5 mg/ml (0,5)	Solución
Ia-001a-Tz/004z	5 mg/ml (0,5)	Solución
Ia-001a-Tz	10 mg/ml (1,0)	Solución
Illc-061a	10 mg/ml (1,0)	Solución
Ia-001a	10 mg/ml (1,0)	Solución
Ic-007a	5 mg/ml (0,5)	Suspensión
Ib-010a	10 mg/ml (1,0)	Suspensión

Composición: La composición de la formulación se detalla en la siguiente tabla 27. La concentración de las API y su formato resultante variaron.

Tabla 27: Composición de la formulación ocular.

Componente	Cantidad (%)
Sustancia farmacológica API	Ver las tablas anteriores
Kolliphor EL	5 % p/v
Povidona	0,5 % p/v

Componente	Cantidad (%)
HPMC	0,5 % p/v
Polisorbato 80	0,1 % v/v
Regulador PBS de pH 7,4 (ajuste del pH con NaOH de 1M)	Al volumen

Método de fabricación:

Para aquellos compuestos que crearon soluciones, se siguió el siguiente método de fabricación:

Se pesaron un total de 50 mg de Kolliphor EL en un recipiente limpio y seco. Se pesó la cantidad correcta de compuesto y se añadió gradualmente al Kolliphor EL mientras se mezclaba en un agitador magnético. El calentamiento a 30 °C ayudó a mezclar el fármaco en la preparación de Kolliphor. En un recipiente separado, se preparó una solución acuosa de HPMC al 0,5 % p/v, povidona al 0,5 % p/v y polisorbato 80 al 0,1 % en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) con un pH de 7,4. Se añadió un volumen de 600 µl de la solución acuosa al Kolliphor EL y al fármaco mientras se mezclaba y se agitó con vórtice inmediatamente. El pH se ajustó a 7,4 utilizando NaOH de 1 M en la formulación mientras se mezclaba. El volumen se ajustó al volumen objetivo usando la solución acuosa. La formulación se filtró usando un filtro de 0,2 µm en un vial estéril dentro de una campana biológica de clase II. Las formulaciones están listas para la dosificación.

Para los compuestos que crearon suspensiones, se siguió el siguiente método de fabricación: Se pesó una cantidad de 50 mg de Kolliphor EL en un recipiente limpio y seco. Se pesó la cantidad correcta de los diferentes compuestos y se añadió gradualmente al Kolliphor EL mientras se mezclaba en un agitador magnético. El calentamiento a 30 °C ayudó a mezclar el fármaco en el Kolliphor. En un recipiente separado, se preparó una solución acuosa de HPMC al 0,5 % p/v, povidona al 0,5 % p/v y polisorbato 80 al 0,1 % en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) con un pH de 7,4. La solución acuosa se filtró usando un filtro de 0,22 µm. Se añadió un volumen de 600 ml de la solución acuosa al Kolliphor y al fármaco mientras se mezclaban, y después se agitó en vórtice inmediatamente. El pH se ajustó a 7,4 utilizando NaOH de 1 M filtrado con mezcla continua de la formulación. El volumen se ajustó al volumen objetivo usando la solución acuosa. Las formulaciones se sonicaron antes de la dosificación para permitir que los floculados se rompieran y se dispersaran.

Formulación ocular de los compuestos Ic-007a, Ilc-007a

Tabla 28: Composición de la formulación ocular con Ic-007a y Ilc-007a.

	1	2
Componentes	Cantidad (%)	
Ic-007a	0,5 % p/v (5 mg/ml)	-
Ilc-007a	-	0,5 % p/v (5 mg/ml)
Kolliphor EL	5 % p/v	5 % p/v
Povidona	0,5 % p/v	0,5 % p/v
HPMC	0,5 % p/v	0,5 % p/v
Polisorbato 80	0,1 % v/v	0,1 % v/v
Regulador PBS de pH 7,4 (ajuste del pH con 0,5 M de NaOH)	Al volumen	Al volumen

Método de fabricación:

Se pesaron un total de 50 mg de Kolliphor EL en un recipiente limpio y seco. Se pesó la cantidad correcta de compuesto y se añadió gradualmente al Kolliphor EL mientras se mezclaba en un agitador magnético. El calentamiento a 30 °C ayudó a mezclar el fármaco en la preparación de Kolliphor. En un recipiente separado, se preparó una solución acuosa de HPMC al 0,5 % p/v, povidona al 0,5 % p/v y polisorbato 80 al 0,1 % en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) con un pH de 7,4. Se añadió un volumen de 600 µl de la solución acuosa al Kolliphor EL y al fármaco mientras se mezclaba y se agitó con vórtice inmediatamente. El pH se ajustó a 7,4 utilizando NaOH de 1 M en la formulación mientras se mezclaba. El volumen se ajustó al volumen objetivo usando la solución acuosa. La formulación se filtró usando un filtro de 0,2 µm en un vial estéril dentro de una campana biológica de clase II.

Solución del compuesto Ilc-007a: Se pesaron un total de 50 mg de Kolliphor EL en un recipiente limpio y seco. Se pesó la cantidad correcta de compuesto (concentración objetivo de 5 mg/ml) y se añadió gradualmente al Kolliphor EL mientras se mezclaba en un agitador magnético. El calentamiento a 30 °C ayudó a mezclar el fármaco en la preparación de Kolliphor. En un recipiente separado, se preparó una solución acuosa de HPMC al 0,5 % p/v, povidona

al 0,5 % p/v y polisorbato 80 al 0,1 % en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) con un pH de 7,4. Se añadió un volumen de 600 µl de la solución acuosa al Kolliphor EL y al fármaco mientras se mezclaba y se agitó con vórtice inmediatamente. El pH se ajustó hasta 7,4 usando NaOH 0,5 M en la formulación mientras se mezclaba. El volumen se ajustó al volumen objetivo usando la solución acuosa. La formulación se filtró usando un filtro de 0,2 µm en un vial estéril dentro de una campana biológica de clase II. Las formulaciones están listas para la dosificación. Antes de usar, se agita con vórtice las soluciones del compuesto II-007a durante 2 minutos y se utilizan en 10 minutos.

*Se puede observar la apariencia de una estructura coloidal o gelatinosa, pero se vuelve a dispersar después de agitar con vórtice.

Suspensión del compuesto Ic-007a: Se pesaron un total de 50 mg de Kolliphor EL en un recipiente limpio y seco. Se pesó la cantidad correcta de compuesto (concentración objetivo de 5 mg/ml) y se añadió gradualmente al Kolliphor EL mientras se mezclaba en un agitador magnético. El calentamiento a 30 °C ayudó a mezclar el fármaco en la preparación de Kolliphor. En un recipiente separado, se preparó una solución acuosa de HPMC al 0,5 % p/v, povidona al 0,5 % p/v y polisorbato 80 al 0,1 % en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) con un pH de 7,4.

La solución acuosa se filtró usando un filtro de 0,22 µm. Se añadió un volumen de 600 µl de la solución acuosa al Kolliphor EL y al fármaco mientras se mezclaba y se agitó con vórtice inmediatamente. El pH se ajustó hasta 7,4 usando NaOH 0,5 M en la formulación mientras se mezclaba. El volumen se ajustó al volumen objetivo usando la solución acuosa.

Antes de usar, la suspensión del compuesto Ic-007a se sonicó para romper el floculado/los agregados usando el siguiente protocolo: una pequeña placa de Petri/vaso de precipitados se llenó con agua dentro de un sonicador. El vial se puso dentro del vaso de precipitados/placa de Petri y se sonicó durante 10 minutos a 40 °C. Después de 10 minutos, se retiró el vial y se agitó con vórtex durante 2 minutos y se sonicó nuevamente durante 10 minutos. El proceso se repitió durante un total de 50 minutos.

Formulaciones oculares de Ic-007a

La composición de los vehículos y la concentración del compuesto se muestran en la tabla 29.

Tabla 29: composiciones de las formulaciones A, B y C

Formulación	Composición	Concentración de Ic-007a
A	TRIS al 0,4 % p/p	5 mg/g
	HPMC al 0,5 % p/p	
	PVP Al 0,5 % p/p	
	Tween 80 al 0,1 % p/p	
	en H ₂ O	
B	TRIS al 0,4 % p/p	5 mg/g
	Cremophor EL al 5 % p/p en H ₂ O	
C	Cremophor El al 5 % p/p	10 mg/g
	PVP K90 al 1,2 % p/p	
	TRIS al 0,9 % p/p	
	en H ₂ O	
D	Dietilamina al 0,3 % p/v:	10 mg/g
	en H ₂ O	

Para preparar una solución de 10 mg/g, se pesaron con precisión 10 mg del compuesto en un vial y se añadió 1 ml del vehículo directamente al API y se agitó con vórtex para dar una solución.

Para preparar una solución de 5 mg/g, se pesaron con precisión 5 mg del compuesto en un vial y se añadió 1 ml del vehículo directamente al API y se agitó con vórtex para dar una solución.

Preparación de vehículos

Formulación A: Se prepararon 50 g de vehículo pesando 0,25 g de HPMC (0,5 % p/p) dentro de una botella de vidrio Duran de 100 ml. Después se añadieron 49,25 g de agua de tipo 1 a la botella, seguidos de 0,200 g de TRIS

(0,4 % p/p), 50 mg de Tween 80 (0,1 % p/p) y 0,25 g de PVP K30 (0,5 % p/p). La mezcla se dejó agitar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran.

Formulación B: Se prepararon 50 g de vehículo pesando 2,5 g de cremophor EL (5 % p/p) dentro de una botella de vidrio Duran de 100 ml. A continuación, se añadieron 47,3 g de agua de tipo 1 a la botella, seguidos de 200 mg de TRIS (0,4 % p/p).

Formulación C: Se prepararon 50 g de vehículo pesando 2,5 g de cremophor EL (5 % p/p) dentro de una botella de vidrio Duran de 100 ml. A continuación, se añadieron 46,45 g de agua de tipo 1 a la botella, seguidos de 450 mg de TRIS (0,9 % p/p) y 600 mg de PVP K90 (1,2 % p/p). La mezcla se dejó agitar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran.

Formulación D: Dietilamina al 0,3 % p/v: Se prepararon 9,9 g de vehículo de dietilamina añadiendo 9869 µl de agua tipo 1 en un vial de vidrio de 14 ml. A continuación, se añadieron 44,2 ml (31,3 mg) de dietilamina al vial con una pipeta. La solución se dejó agitar durante 5 minutos para garantizar la homogeneidad.

Formulaciones oculares de IVc-059a

La composición de los vehículos y la concentración del compuesto se muestran en la tabla 30.

Tabla 30: composiciones de las formulaciones A, B y C

Formulación	Composición	Concentración de IVc-059a
A	Cremophor EL al 5 % p/p	10 mg/g
	PVO K90 al 1,2 % p/p	
	TRIS al 0,9 % p/p en H ₂ O	
B	Dietilamina al 0,3 % p/v: en H ₂ O	10 mg/g
	pH ajustado con dietilamina	
C	HPMC al 0,5 % p/p,	10 mg/g
	PVP K30 al 0,5 % p/p,	
	Tween 80 al 0,1 % p/p en PBS	
	pH ajustado con NaOH	

Para preparar una solución de 10 mg/g, se pesaron con precisión 10 mg del compuesto en un vial y se añadió 1 ml del vehículo directamente al API y se agitó con vórtex para dar una solución.

Preparación de vehículos

Formulación A: Se prepararon 50 g de vehículo pesando 2,5 g de cremophor EL (5 % p/p) dentro de una botella de vidrio Duran de 100 ml. A continuación, se añadieron 46,45 g de agua de tipo 1 a la botella, seguidos de 450 mg de TRIS (0,9 % p/p) y 600 mg de PVP K90 (1,2 % p/p). La mezcla se dejó agitar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran.

Formulación B: Dietilamina al 0,3 % v/v: Se prepararon 9,9 g de vehículo de dietilamina añadiendo 9869 µl de agua tipo 1 en un vial de vidrio de 14 ml. A continuación, se añadieron 44,2 ml (31,3 mg) de dietilamina al vial con una pipeta. La solución se dejó agitar durante 5 minutos para garantizar la homogeneidad.

Formulación C: Se prepararon 50 g de vehículo pesando 49,45 g de PBS (método de preparación a continuación) y se pesaron dentro de una botella de vidrio Duran de 100 ml. Sucesivamente, se añadieron 250 mg de HPMC (0,5 % p/p), 250 mg de PVP K30 (0,5 % p/p) y 50 µl (pipeta de desplazamiento de líquido) de Tween 80 (0,1 % p/p) a la botella de vidrio. La mezcla se dejó agitar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran.

Preparación de PBS: Se pesaron con precisión 799,1 mg de NaCl, 21,6 mg de KCl, 24,9 mg de KH₂PO₄ y 180,4 mg de Na₂HPO₄·2H₂O y se disolvieron en 100 ml de agua de tipo 1. El pH de la solución era de 7,6.

Formulaciones oculares de Ic-007a e Ilc-007a

Los compuestos se formularon como soluciones en los vehículos mostrados en la tabla 31.

Tabla 31: composiciones de las formulaciones A, B, C y D

Componente	Cantidad (% p/p)			
	Vehículo A	Vehículo B	Vehículo C	Vehículo D
Cremophor EL	5,0	5,0	5,0	5,0
PEG 400	0	0	0,4	0
TRIS	0,9	0,9	0,9	0,9
Meglumina	0	0	0	1,0
Kollophor RH40	0	0,2	0,2	0,2
Agua	94,1	93,9	93,5	92,9

Preparación del vehículo a escala de 50 g

Vehículo A: Se prepararon 50 g de vehículo añadiendo 0,45 g de TRIS (0,9 % p/p) y 2,5 g de Cremphor EL (5,0 % p/p) a 47,05 g de agua (94,1 % p/p). La mezcla se dejó agitar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran.

Vehículo B: Se prepararon 50 g de vehículo añadiendo 0,45 g de TRIS (0,9 % p/p), 2,5 g de Cremphor EL (5,0 % p/p), seguidos de 0,1 g de Kolliphor RH40 (0,2 % p/p) a 46,95 de agua (93,9 % p/p). La mezcla se dejó agitar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran.

Vehículo C: Se prepararon 50 g de vehículo añadiendo 0,45 g de TRIS (0,9 % p/p), 2,5 g de Cremphor EL (5,0 % p/p), seguidos de 0,1 g de Kolliphor RH40 (0,2 % p/p) y 0,2 g de PEG400 a 46,75 g de agua (93,5 % p/p). La mezcla se dejó agitar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran.

Vehículo D: Se prepararon 50 g de vehículo añadiendo 0,45 g de TRIS (0,9 % p/p), 0,5 g de meglume (1,0 % p/p), 2,5 g de Cremphor EL (5,0 % p/p), seguidos de 0,1 g de Kolliphor RH40 (0,2 % p/p) a 46,45 g de agua (92,9 % p/p). La mezcla se dejó agitar durante 1 h a temperatura ambiente para permitir que todos los componentes se disolvieran.

El vehículo se añadió directamente al API para crear las concentraciones enumeradas en la tabla 32. La muestra se agitó con vórtex y se sonicó hasta que se obtuvo una solución.

Tabla 32: Concentración del compuesto en formulaciones que utilizan los vehículos A, B, C y D

	Concentración de API (mg/ml)			
	Vehículo A	Vehículo B	Vehículo C	Vehículo D
lc-007a	10	10	10	20
llc-007a	10	10	10	20

Para preparar una solución de 10 mg/g, se pesaron con precisión 10 mg del compuesto en un vial y se añadió 1 ml del vehículo directamente al API y se agitó con vórtex para dar una solución.

Para preparar una solución de 20 mg/g, se pesaron 20 mg del compuesto con precisión en un vial y se añadió 1 ml del vehículo directamente al API y se agitó con vórtex para dar una solución.

Ejemplo 5: Actividad terapéutica de los compuestos

Ejemplo 5.1: Tratamiento y/o prevención de la pancreatitis aguda

La eficacia terapéutica de los compuestos según la presente invención se evaluó en un modelo murino de pancreatitis aguda. Se obtuvieron muestras de tejido para permitir el análisis posterior a la vida de los parámetros de la pancreatitis. También se obtuvieron muestras de plasma para evaluar los niveles de exposición después de que los animales recibieron los compuestos.

Animales: Para el estudio se usaron un total de 70 ratones BALB/c hembras de 8 a 10 semanas con un peso aproximado de 20 a 25 g (Charles River). Después de 7 días de aclimatación, se distribuyeron en los diferentes grupos. Los ratones se alojaron en jaulas IVC (hasta 5 ratones por jaula) y los ratones individuales se identificaron mediante marcas en la cola. Las jaulas, el lecho y el agua se desinfectaron antes del uso. A los animales se les proporcionó lecho enriquecido con mazorcas de maíz para proporcionar material de anidación y enriquecimiento medioambiental. Todos los animales tenían acceso libre a una dieta comercial certificada estándar y agua. La sala de alojamiento de animales se mantuvo de

la siguiente manera: temperatura ambiente a 20-24 °C, humedad al 30-70 % y se usó un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Aunque los animales utilizados en este estudio eran inmunocompetentes, la preparación de las soluciones de dosificación y la dosificación/pesaje de los animales se realizaron en una cabina de bioseguridad estéril.

5 Sustancia de ensayo y formulación: en un primer experimento, los compuestos Ia-001a, Ia-001atz, Ic-001aTz/004a, Ic-007a, Ib-010a, IIIv-061a, IVv-059a se pesaron y se solubilizaron en DMSO. La formulación final constaba de DMSO al 5 %, solutol al 10 %, PEG400 al 10 %, 75 % de solución salina al 0,9 % y el pH se ajustó hasta 7 con una solución de NaOH 0,5 M.

10 En un segundo experimento, los compuestos Ic-001aTz2, Ilc-007a, IIIa-001aTz, IIIc-061a, IIIc-061a-E3, IVc-059a se pesaron y se solubilizaron en DMSO. La formulación final consta de DMSO al 5 %, solutol al 10 %, PEG400 al 10 %, 75 % de solución salina al 0,9 % y el pH ajustado hasta 7 con una solución de NaOH 0,5 M. Para la dosificación por vía oral (PO), el IVc-059a se formula en agua. Las soluciones farmacológicas se formularon el día de la dosificación.

15 Los propósitos de este estudio fueron evaluar la eficacia de los compuestos en un modelo de pancreatitis aguda (14 días), generar muestras de tejido para permitir el análisis posterior a la vida de los parámetros de la pancreatitis y generar cuatro muestras de plasma para evaluar los niveles de exposición después de la primera y la última inyección a los animales, donde las muestras se obtuvieron de muestras de sangre tomadas 1 y 24 horas después de la primera y la última inyección.

20 Diseño del estudio: El primer día del estudio, los animales se asignaron aleatoriamente a los grupos de tratamiento, garantizando una distribución equitativa del peso corporal. Los ratones (excepto el grupo de control negativo) que se trataron con los compuestos del ensayo recibieron 5 minutos antes una dosificación de caeruleína, seguida de una inyección de caeruleína a 2 µg/kg por vía intraperitoneal (IP) diariamente durante el estudio.

Tabla 33: Primer experimento.

Grupo	n.º de animales	Agente	Nivel de dosis; Ruta
1	3	Control negativo (no inducido)	Vehículo (pendiente de confirmación); I.V.
2	3	Control negativo (inducido)	Vehículo (pendiente de confirmación); I.V.
3	8	Pirfenidona	40 mg/kg; I.V.
4	8	Ia-001a	15 mg/kg; I.V.
5	8	Ia-001aTz	15 mg/kg; I.V.
6	8	Ic-001aTz/004a	15 mg/kg; I.V.
7	8	Ic-007a	15 mg/kg; I.V.
8	8	Ib-010a	150 mg/kg; PO
9	8	IIIc-061a	15 mg/kg; I.V.
10	8	IVc-059a	150 mg/kg; PO

Tabla 34: Segundo experimento.

Grupo	n.º de animales	Compuestos	Nivel de dosis; Ruta
1	3	Control negativo (no inducido)	Vehículo (pendiente de confirmación); I.V.
2	3	Control negativo (inducido)	Vehículo (pendiente de confirmación); I.V.
3	8	Pirfenidona	40 mg/kg; I.V.
4	8	Ic-001aTz2	15 mg/kg; I.V.
5	8	Ilc-007a	15 mg/kg; I.V.
6	8	IIIa-001aTz	15 mg/kg; I.V.
7	8	IIIc-061a	15 mg/kg; I.V.
8	8	IIIc-061a-E3	150 mg/kg; PO
9	8	IVc-059a	15 mg/kg; I.V.
10	8	IVc-059a	150 mg/kg; PO

65 El tratamiento con los compuestos probados se administró 5 minutos antes de la administración de caeruleína.

Tabla 35: programa del estudio.

	Tiempo (días)	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14
5	Compuesto intravenoso	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis	Sacrificio
	Caeruleína intraperitoneal	1er	2°	3er	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	
10	Toma de muestras de sangre para PK	T0+1 h													T12+ 24 h	
		T0+24 h													T13+ 1 h	
15	Análisis de órganos															Páncreas

Observaciones seriadas

20 Peso corporal: el peso corporal de todos los ratones del estudio se midió y se registró diariamente; esta información se utilizó para calcular la dosificación precisa para cada animal.

Signos y síntomas generales: se observó a los ratones a diario y se observó cualquier signo de angustia o cambio en el estado general, p. ej., pelo puntiagudo, falta de movimiento o dificultad para respirar.

25 Muestreo y análisis posteriores a la vida: en los momentos indicados anteriormente, se tomó una muestra de sangre completa (60 µl) de la vena lateral de la cola en tubos recubiertos con K2-EDTA. Las muestras de plasma se prepararon y se almacenaron congeladas a -20 °C. Para la cuantificación del compuesto, las muestras de plasma se enviaron al cliente, el proveedor de bioanálisis Eurofins (FR).

30 Muestreo terminal: Antes de la terminación, se pesaron los animales. Los animales del estudio terminal se sacrificaron mediante inhalación de CO₂. Se tomó una muestra de sangre terminal mediante punción cardíaca y se preparó el plasma. Las actividades de la lipasa y la amilasa se midieron mediante ELISA utilizando kits de ELISA disponibles en el mercado. El plasma restante se almacenó para futuros análisis de citocinas. El tejido del páncreas se resecó y se pesó, y una sección (50 µg) se congeló instantáneamente y se analizó para cuantificar el compuesto en la muestra de páncreas. Se procesó una sección (50 µg) para medir la actividad de MPO, los niveles de IL-33 y TGF-β mediante ELISA. El resto se fijó en formalina y se incluyó en cera de parafina. Se realizó la tinción con H&E y se evaluó la sección utilizando el sistema de puntuación estándar de Schmidt, examinando: edema, infiltración inflamatoria, necrosis parenquimatosa y hemorragia. Se realizó la tinción tricromática de Massons y se cuantificó digitalmente el área cubierta por tejido fibrótico utilizando el software QuPath. Las muestras de suero terminales se usaron para evaluar la química sanguínea usando un clip IdeXX CHEM15 y LYTE4 (4 animales por grupo de tratamiento).

Resultados de pancreatitis aguda después de 15 días de tratamiento intravenoso

45 La evaluación histopatológica de la lesión pancreática se basó en 4 criterios: edema, infiltración inflamatoria, necrosis parenquimatosa, hemorragia, y se calificó como se describe a continuación.

Tabla 36: Niveles de puntuación basados en 4 criterios

Artículo	Niveles de puntuación			
	0	1	2	3
Edema intersticial	Ninguno	Interlobular	Lóbulo implicado	Islas aisladas como células acinares
Infiltración de leucocitos	Ninguno	<20 %	20 %- 50 %	>50 %
Necrosis de células acinares	Ninguno	< 5 %	5 % - 20 %	> 20 %
Hemorragia	Ninguno	1-2 puntos	3-5 puntos	> 5 puntos

Tabla 37: Niveles de puntuación de resultados para grupos de animales

		Resumen de puntuación			
5		Edema intersticial	Infiltración de leucocitos	Necrosis de células acinares	Hemorragia
	Puntuación	1	2	3	4
	Control negativo (no inducido)	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0
10	Control negativo (inducido por caeruleína)	2-3-3	3-3-3	2-2-3	2-2-2
	Ia-001a (inducido por caeruleína)	1-1-1-1-1-2-2	3-3-3-3-3-3-3	0-1-1-1-1-1	1-1-1-1-1-1-2
15	Ia-001aTz (inducido por caeruleína)	1-1-1-1-2-2-2-2	2-3-3-3-3-3-3-3	0-0-0-0-1-1-1-1	0-1-1-1-1-1-1-1
	Ic-001aTz/004a (inducido por caeruleína)	1-1-1-1-2-2-2-3	1-3-3-3-3-3-3-3	1-1-1-1-2-2-2-2	1-1-1-1-1-1-1-1
20	Ic-007a (inducido por caeruleína)	1-1-1-1-1-1-1-1	3-3-3-3-3-3-3-3	1-1-1-1-1-1-1-1	1-1-1-1-1-1-1-1
	Ib-010a (inducido por caeruleína)	1-1-1-1-2-2-2-2	3-3-3-3-3-3-3-3	1-1-1-1-1-1-1-1	0-0-1-1-1-1-1-1
25	IIIc-061a (inducido con caeruleína)	1-1-1-1-1-1-1-1	1-1-1-1-1-1-1-1	0-0-0-0-1-1-1-1	1-1-1-1-1-1-1-1
	IVc-059a (inducido con caeruleína)	1-1-1-1-1-1-1-1	1-1-1-1-1-1-1-1	0-0-1-1-1-1-2-2	1-1-1-1-1-1-1-1
30	Pirfenidona (inducido con caeruleína)	1-1-1-1-1-1-1-1	2-2-2-2-2-2-2-2	0-0-1-1-1-1-1-1	0-0-0-0-1-1-1-1

Puntuación de Schmidt

35 La puntuación de Schmidt es la evaluación de la eficacia de los compuestos basándose en los cuatro criterios histopatológicos que se describen en la tabla siguiente. Orden de los compuestos con una puntuación de Schmidt creciente (la puntuación más alta = 10 es el tratamiento inducido con caeruleína + el vehículo y la puntuación más baja = 0 es en animales no inducidos). Gráfico de puntuación de Schmidt para los compuestos de la figura 2 donde todos los

40 productos muestran una puntuación de Schmidt mejorada en comparación con los animales de control con caeruleína.

Tabla 38: Tabla de puntuación y cuatro parámetros de Schmidt

45	Compuesto de ensayo	Edema intersticial	Infiltración de leucocitos	Necrosis de células acinares	Hemorragia	Puntuación de Schmidt (H&E)	
	No inducido + vehículo	0	0	0	0	0	Borde apical intacto
50							Acinos sanos con abundancia de gránulos secretores
							No hay signos de necrosis
55							No hay signos de edema
							No hay signos de hemorragia
60	Inducido + IIIc-061a	1,0	1,0	0,5	1,0	3,5	Se observó edema leve
							Se observó hemorragia leve
65							Se observó necrosis leve de células acinares

	Compuesto de ensayo	Edema intersticial	Infiltración de leucocitos	Necrosis de células acinares	Hemorragia	Puntuación de Schmidt (H&E)	
5							Se observó una leve infiltración leucocitaria
10							Se observó una morfología normal de los islotes
15							A diferencia de otros grupos de tratamiento, la patología general en
20							estas áreas fue relativamente normal, pero se observó
25							un edema leve
30	Inducido + IVc-059a	1,0	1,0	1,0	1,0	4,0	Se observó menos edema leve
35							Se observó menos hemorragia leve
40							Se observó necrosis leve de células acinares
45							Se observó una leve infiltración leucocitaria
50							Se observó cierta hiperplasia de los islotes pancreáticos
55	Inducido + pirfenidona	1,0	2,0	0,8	0,4	4,1	Alteración de la región basófila
60							Se observó edema leve
65							Se observó hemorragia leve
70							Se observó necrosis leve de células acinares
75							Se observó infiltración de leucocitos
80	Inducido + Ib-001aTz	1,5	2,9	0,6	0,9	5,9	Se observó una morfología normal de los islotes en algunas áreas
85							Se observó edema en todo el páncreas
90							Se observó hemorragia leve
95							Se observó necrosis leve de células acinares
100							Infiltración de leucocitos en todas partes
105							Se observó una morfología anormal de los islotes (trazas)

ES 3 002 189 T3

	Compuesto de ensayo	Edema intersticial	Infiltración de leucocitos	Necrosis de células acinares	Hemorragia	Puntuación de Schmidt (H&E)	
5							Alteración de la región basófila
10	Inducido + lc-007a	1,0	3,0	1,0	1,0	6,0	Se observó edema leve
							Se observó hemorragia leve
15							Se observó necrosis leve de células acinares
							Se observó infiltración de leucocitos
							Alteración de la región basófila
20	Inducido + lb-010a	1,5	3,0	1,0	0,8	6,3	Se observó edema en todo el páncreas y dentro de
							las células acinares
25							Se observó hemorragia leve
							Se observó necrosis leve de células acinares
30							Se observó infiltración de leucocitos
							Alteración de la región basófila
35	Inducido + la-001a	1,3	3,0	0,9	1,1	6,3	Se observó edema en todo el páncreas
							Se observó hemorragia
40							Se observó menos necrosis leve en células acinares
45							Infiltración de leucocitos en todas partes
							Se observó morfología anormal de los islotes
50							Alteración de la región basófila
55	Inducido + lc-001aTz/004a	1,6	2,8	1,5	1,0	6,9	Se observó edema en todo el páncreas
							Se observó hemorragia leve
60							Se observó necrosis de células acinares
							Infiltración de leucocitos en todas partes
65							Alteración de la región basófila

Compuesto de ensayo	Edema intersticial	Infiltración de leucocitos	Necrosis de células acinares	Hemorragia	Puntuación de Schmidt (H&E)	
Inducido + vehículo	2,7	3,0	2,3	20	10,0	Se observó edema en todo el páncreas
						Se observó hemorragia, particularmente en la
						cabeza de páncreas
						Se observó necrosis de células acinares
						Infiltración de leucocitos en todas partes
						Alteración de la región basófila

Como se muestra en las tablas siguientes, todos los compuestos Ia-001a, Ia-001aTz, Ic-001aTz/004a, Ic-007a, Ib-010a, IIlc-061a, IVc-059a mostraron una disminución significativa en los niveles de IL33 en el tejido pancreático en comparación con el grupo "inducido". Los niveles de TGF-b disminuyeron significativamente para Ic-007a, Ib-010a, IIlc-061a, IVc-059a. Las puntuaciones globales de Schmidt mejoraron especialmente para todos los compuestos, pero especialmente para los compuestos IIlc-061a, IVc-059a.

Las tablas 39 y 40 siguientes muestran las concentraciones terminales de MPO en el páncreas en muestras de tejido pancreático, las concentraciones tisulares de IL33 y las concentraciones de TGF-B.

Tabla 39:

Compuestos del ensayo	Peso corporal terminal medio (% del inicial)	Peso terminal medio del páncreas (g)	Actividad de MPO en el páncreas	Nivel de IL33 en el páncreas	valor p frente a inducido	Nivel de TGF-B en el páncreas	valor p frente a inducido
Vehículo	93,8	0,148	2,81	76 ± 19	-	184 ± 107	-
Ia-001a	90,3	0,083	3,76	330 ± 162	0,017	592 ± 358	0,984
Ia-001aTz	89,1	0,084	2,68	154 ± 49	0,000	507 ± 289	0,663
Ic-001aTz/004a	93,5	0,104	2,15	180 ± 54	0,000	369 ± 195	0,113
Ic-007a	91,2	0,109	1,65	147 ± 47	0,000	188 ± 77	0,000
Ib-010a	91	0,091	1,83	157 ± 70	0,000	219 ± 140	0,00035
IIlc-061a	91,4	0,086	213	177 ± 80	0,000	295 ± 146	0,015
IVc-059a	93,3	0,09	2,88	86 ± 23	0,000	231 ± 199	0,020
Pirfenidona	97,6	0,136	1,26	78 ± 23	0,000	289 ± 170	0,024
Inducido	93,8	0,148	2,81	628 ± 57	0,000	592 ± 358	0,015

Tabla 40:

Compuestos del ensayo	Nivel de amilasa en suero	Nivel de lipasa en suero	Nivel de IL33 en suero	Nivel de TGF-B en suero	Solución salina/PBS para formulación	Puntuación de Schmidt (H&E)
Vehículo	43,69	11,66	37,22	10,88	-	1,0
Ia-001a	34,07	6,72	39,52	8,69	Solución salina	6,3
Ia-001aTz	35,35	8,57	37,02	8,69	Solución salina	5,9
Ic-001aTz/004a	36,51	8,21	35,43	8,99	PBS	6,9
Ic-007a	34,86	9,28	34,93	6,17	PBS	6,0

Compuestos del ensayo	Nivel de amilasa en suero	Nivel de lipasa en suero	Nivel de IL33 en suero	Nivel de TGF-B en suero	Solución salina/PBS para formulación	Puntuación de Schmidt (H&E)
Ib-010a	37,46	9,06	35,36	6,87	PBS	6,3
IIlc-061a	38,38	9,79	33,72	4,65	Solución salina	3,5
IVc-059a	38,56	10,21	46,54	5,69	Solución salina	4,0
Pirfenidona	37,71	7,65	39,16	5,5	-	4,1
Inducido	43,69	11,66	37,22	10,88		100

En un segundo experimento, los compuestos Ic-001a-TZ(2), IIc-007a, Ia-015a, IIlc-061a, IVc-059a se evaluaron a una dosis de 15 mg/k en el mismo modelo utilizando 100 mg/kg de pirfenidona como control positivo.

Tabla 41: Resultados

Grupos (vía y dosis mg/kg)	Amilasa mU/ml	Lipasa mU/ml	MPO U/mg	IL-33 ng/ml	TGF-B ng/ml	Puntuación de Schmidt	Tinción tricrómica (% de área de fibrosis)
No inducido	25,887 ± 0,63	3,216 ± 0,212	1,37 ± 0,39	88 ± 37	355 ± 67	11,3 ± 0,6	0,33 ± 0,168
Inducido	60,858 ± 7,088	9,027 ± 1,33	2,66 ± 0,28	719 ± 97	1292 ± 263	5,9 ± 1,3	5,313 ± 2,089
Pirfenidona (100 mg/kg)	45,171 ± 608	4,541 ± 1,457	1,68 ± 0,44	226 ± 151	578 ± 230	8 ± 1	1,27 ± 0,888
Ic-001a-Tz(2) (IV, 15 mg/kg)	50,912 ± 5,074	8,305 ± 3,036	2,63 ± 0,63	493 ± 126	696 ± 448	3,9 ± 0,8	1,366 ± 0,562
IIc-007a (IV, 15 mg/kg)	45,325 ± 6,579	6,481 ± 2,908	2,74 ± 0,76	340 ± 211	500 ± 195	8,3 ± 1,6	1,821 ± 1,12
Ia-015a (IV, 15 mg/kg)	51,669 ± 12,029	5,31 ± 2,219	2,68 ± 0,6	398 ± 148	547 ± 373	4,6 ± 0,8	1,704 ± 1,621
IIc-061a (IV, 15 mg/kg)	40,88 ± 6,556	5,038 ± 0,874	1,72 ± 0,21	240 ± 119	514 ± 227	10,9 ± 1,6	0,714 ± 0,452
IVc-059a (IV, 15 mg/kg)	41,149 ± 5,42	4,324 ± 1,121	1,813 ± 0,405	215 ± 84	403 ± 84	1063 ± 2,33	1,048 ± 0,449

Amilasa: Con la excepción de Ia-015a, todos los compuestos probados dieron como resultado niveles de actividad de amilasa significativamente más bajos que en los controles inducidos tratados con vehículo, sin embargo, los niveles no alcanzaron los de los animales no inducidos. **Lipasa:** La actividad de la lipasa en el suero fue mayor en los animales inducidos y tratados con vehículo que en los animales no inducidos. El tratamiento con pirfenidona de control positivo, Ia-015a, IIlc-061a y IVc 059a dio como resultado una actividad de la lipasa significativamente menor que en los animales tratados con vehículo.

Mieloperoxidasa (MPO): La actividad de la MPO en el tejido pancreático de los animales inducidos y tratados con el vehículo fue significativamente mayor que la de los animales no inducidos, lo que indica pancreatitis. El tratamiento con pirfenidona de control positivo, IIlc-061a e IVc-059a dio como resultado niveles de actividad de la MPO significativamente más bajos que los de los controles inducidos tratados con vehículo.

IL-33 y TGF-B: Todos los tratamientos, con la excepción de IIlc-061a e IVc-059a administrados por vía oral, dieron como resultado niveles de IL-33 en el páncreas menores que los de los controles inducidos tratados con vehículo. Al igual que con los niveles de TGF-b en suero, los niveles de TGF-b resultantes fueron significativamente más bajos que los de los controles inducidos tratados con vehículo.

Los criterios de puntuación de Schmidt utilizados clínicamente, basados en el edema intersticial, la infiltración de leucocitos, la necrosis de células acinares y la hemorragia, se utilizaron para evaluar las secciones de tejido pancreático teñidas con H&E. Todos los compuestos probados dieron como resultado puntuaciones de Schmidt significativamente más bajas que las de los controles inducidos tratados con vehículo, obteniendo el IIlc-061a (IV) y el IVc-059a (IV) puntuaciones más bajas que la pirfenidona de control positivo.

Tinción de fibrosis: Un kit de tinción disponible en el mercado (Abeam; ab150686, tinción tricromática) se usó para teñir secciones de tejido pancreático para obtener colágeno. Se utilizó el software de imágenes digitales QuPath para cuantificar

el porcentaje de área cubierta por la tinción de colágeno (azul). Todos los compuestos probados dieron como resultado áreas de tinción tricromática significativamente más bajas que las de los controles inducidos tratados con vehículo.

Ejemplo 5.2: Tratamiento y/o prevención del cáncer de páncreas y riñón:

El objetivo de este estudio fue evaluar preclínicamente el estudio de eficacia terapéutica in vivo de los compuestos según la presente invención para el tratamiento del modelo murino singénico de cáncer de páncreas por vía subcutánea (Pan02) en ratones hembra C57BL/6 y del modelo singénico de cáncer de riñón (Renca) en ratones BALB/c hembras.

Animales: ratones hembra C57BL/6 (para el modelo Pan02); ratones hembra BALB/c (para el modelo Renca), de 6 a 8 semanas, >17 g, hasta 5 ratones por jaula

Tratamiento y grupos del modelo Pan02: compuestos Ia-001a-Tz, Ic-007a, Ib-010a, IVc-059a, Ilc-007a diariamente durante 5 días/semana durante dos semanas mediante inyección intravenosa en bolo a una dosis de 15 mg/kg.

Tratamiento y grupos del modelo Renca: compuestos Ia-001a-Tz, Ic-007a, Ib-010a, IVc-059a, Ilc-007a diariamente durante 7 días/semana durante tres semanas mediante inyección intravenosa en bolo a una dosis de 15 mg/kg

Cultivo celular: las células tumorales de Renca se mantuvieron in vitro con el medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10 % a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en el aire. Las células en fase de crecimiento exponencial se recolectaron y cuantificaron mediante un contador de células antes de la inoculación del tumor.

Cultivo celular: las células tumorales Pan02 se mantuvieron in vitro con el medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10 % a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en el aire. Las células en fase de crecimiento exponencial se recolectaron y cuantificaron mediante un contador de células antes de la inoculación del tumor.

Inoculación tumoral para el modelo Renca: cada ratón se inoculó por vía subcutánea en la región del flanco posterior derecho con células tumorales Renca (1×10^6) en 0,1 ml de PBS para el desarrollo del tumor.

Inoculación tumoral para el modelo Pan02: cada ratón se inoculó por vía subcutánea en la región del flanco frontal derecho con células tumorales Pan02 (3×10^6) en 0,1 ml de PBS para el desarrollo del tumor.

Aleatorización: La aleatorización se inició cuando el tamaño medio del tumor alcanzó aproximadamente 100 (80 - 110) mm³. Para ambos modelos, se incluyeron 48 ratones en el estudio. Todos los animales se asignaron aleatoriamente a 6 grupos de estudio. La aleatorización se realizó basándose en el método de “distribución coincidente” utilizando el método multitarea (software StudyDirectorTM, versión 3.1.399.19). La fecha de la aleatorización se denominó día 0.

Observación y recopilación de datos: Después de la inoculación de las células tumorales, los animales se controlaron diariamente para determinar la morbilidad y la mortalidad. Durante el seguimiento rutinario, se examinó a los animales para detectar cualquier efecto del crecimiento del tumor y los tratamientos sobre el comportamiento, tales como la movilidad, el consumo de alimentos y agua, el aumento o la pérdida de peso corporal (los pesos corporales se midieron dos veces por semana después de la asignación aleatoriamente), ojos/pelo enmarañado y cualquier otra anomalía. La mortalidad y los signos clínicos observados se registraron en detalle para los animales individuales.

Los volúmenes tumorales se midieron dos veces por semana después de la aleatorización en dos dimensiones utilizando un calibrador, y el volumen se expresó en mm³ utilizando la fórmula: “ $V = (L \times W \times W) / 2$ ”, donde V es el volumen del tumor, L es la longitud del tumor (la dimensión más larga del tumor) y W es el ancho del tumor (la dimensión más larga del tumor perpendicular a L). El peso del tumor se midió al final del estudio. La dosificación y las mediciones del peso corporal y del tumor se realizaron en una cabina de flujo laminar.

Criterios de valoración del estudio: Inhibición del crecimiento tumoral (TGI): El % de TGI se usó como una indicación de la actividad antitumoral y se expresó como: $TGI (\%) = 100 \times (1 - T/C)$ T y C fueron el volumen (o peso) medio del tumor de los grupos tratados y de control, respectivamente, en un día determinado.

El análisis estadístico de la diferencia en el volumen tumoral medio entre los grupos se realizó utilizando uno de los métodos siguientes:

Utilizando los datos recopilados el último día de dosificación u observación para cada grupo, a pesar de las diferentes fechas de terminación individuales.

Utilizando los datos recopilados el día en que el volumen tumoral medio del grupo de vehículo alcance los criterios de valoración humanos para poder obtener la TGI de todos o la mayoría de los ratones incluidos en el estudio.

Utilizando los datos recopilados el día en que se interrumpió el tratamiento para cualquiera de los grupos tratados o de control, incluso si los grupos restantes continúan el tratamiento según lo programado.

Diferencia en el AUC (ΔAUC) = Análisis estadístico realizado con un modelo de regresión lineal de efectos mixtos.
Terminación del estudio: El estudio de eficacia se llevó a cabo durante 3 semanas.

Análisis estadístico: Para comparar los volúmenes tumorales de diferentes grupos en un día preespecificado, primero se utilizó la prueba de Bartlett para comprobar la suposición de homogeneidad de la varianza en todos los grupos. Cuando el valor p de la prueba de Bartlett fue $\geq 0,05$, se utilizó un ANOVA unidireccional para probar la igualdad general de las medias en todos los grupos.

Si el valor p del ANOVA unidireccional fue $< 0,05$, se realizaron pruebas post hoc ejecutando las pruebas HSD (diferencia significativa honesta) de Tukey para todas las comparaciones por pares y las pruebas de Dunnett para comparar cada grupo de tratamiento con el grupo de vehículo. Cuando el valor p de la prueba de Bartlett fue $< 0,05$, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comprobar la igualdad general de las medianas entre todos los grupos. Si el valor p de la prueba de Kruskal-Wallis fue $< 0,05$, se realizaron pruebas post hoc ejecutando la prueba no paramétrica de Conover para todas las comparaciones por pares o para comparar cada grupo de tratamiento con el grupo de vehículo, ambas con ajuste del valor p de un solo paso. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el lenguaje R- a y en un entorno para informática estadística y gráficos (versión 3.3.1). Todas las pruebas son bilaterales a menos que se especifique lo contrario, y los valores p de $< 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.

Resultados

Tabla 42: Actividad antitumoral de los artículos de prueba con datos recopilados el día 13

Grupo	Tratamiento	Volumen tumoral $\pm$ SEM (mm ³)	PESO (%)
Control	Vehículo, 5 μ l/g, intravenoso, QD*5 durante 2 semanas	187,91 $\pm$ 11,19 (8)	-
Compuesto IVc-059a	IVc-059a, 15 mg/kg, 5 μ l/g, intravenoso, QD*5 durante 2 semanas	148,49 $\pm$ 7,05 (8)	20,98 %

Tabla 43: Análisis estadístico del volumen del tumor con datos recopilados el día 13

Prueba	valores p	Nivel de significación
Prueba de homogeneidad de varianza y normalidad		
Prueba de Bartlett	2,76E-05	***
Prueba de igualdad general entre los grupos		
Prueba de Kruskal-Wallis	0,00965	**
Prueba de igualdad entre grupos individuales (prueba de comparación no paramétrica de muchos a uno de Conover)		
Control de grupo frente al compuesto IVc-059a	0,0226	*

Resumen de resultados

En este estudio, se evaluó la eficacia terapéutica in vivo del compuesto de prueba IVc-059a para el tratamiento del modelo murino singénico de cáncer pancreático subcutáneo (Pan02) en ratones C57BL/6 hembras. El compuesto IVc-059a, administrado por vía intravenosa a 15 mg/kg, suprimió significativamente el crecimiento del tumor, con un valor de TGI del 20,98 % ($P < 0,05$).

Tabla 44: % medio de inhibición del volumen tumoral (modelo Pan02)

Día	0	3	6	9	13
IVc-059a	-0,11 %	19,86 %	18,64 %	18,49 %	20,98 %
% medio de inhibición = (media(NaCl de control)-media(tratado con Cpd))/media(NaCl de control)* 100 %					

Tabla 45: % medio de inhibición del volumen tumoral (modelo Renca)

Día	0	3	6	9	13	16
IVc-059a	0,05 %	-0,90 %	5,02 %	14,83 %	23,07 %	19,42 %

Ejemplo 5.3: Tratamiento y/o prevención de la retinopatía diabética (DR)

Modelo animal: Se usó el modelo de ratón db/db y se comparó con ratones db/+ como control no diabético. El ratón db/db portaba una mutación en el gen del receptor de leptina y era un modelo para la diabetes tipo 2 inducida por obesidad. Bogdanov y col. PLoS One, 2014, 9, e97302 informó que los ratones db/db reproducen las características del proceso neurodegenerativo que se produce en el ojo diabético humano. Además, este modelo desarrolló anomalías microvasculares tempranas (fuga vascular) inducidas por diabetes (Hernández y col. Diabetes 2016, 65, 172-187; Hernández y col. Diabetología (2017, 60, 2285-2298). Por lo tanto, este modelo se consideró un modelo apropiado para probar la eficacia de los compuestos de la presente invención para el tratamiento de las etapas tempranas de la retinopatía diabética (DR).

El efecto de los colirios que contienen la-007a sobre la pérdida vascular inducida por diabetes se probó en el modelo de ratón db/db. Los ratones db/db (BKS.CG-Dock7 m +/- Lep^{db}/J) y ratones no diabéticos (db/+) de 8 semanas de edad se adquirieron en Charles River Laboratories (Calco, Italia).

Los animales tenían acceso libre a alimentos a voluntad (ENVIGO Global Diet Complete Feed for Rodents, Mucedola, Milán, Italia) y agua filtrada. Los ratones se mantuvieron en condiciones medioambientales estrictas de temperatura (20 °C) y humedad (60 %). Además, tenían ciclos de 12 h/12 h de luz/oscuridad.

Estudio intervencionista: Cuando los ratones db/db tenían 10 semanas de edad, se les administraron aleatoriamente colirios la-007a o colirios con vehículo directamente sobre la superficie corneal superior de cada ojo usando una jeringa. Se les administró una gota (5 µl) de la-007a (5 mg/ml) en cada ojo o vehículo (5 µl de cloruro de sodio al 0,9 %) en cada ojo dos veces al día durante 14 días. El día 15, se instiló en los ojos de los animales una gota de la-007a o vehículo aproximadamente una hora antes de la necropsia. Todos los experimentos se realizaron según los principios de la Comunidad Europea (86/609/CEE).

La permeabilidad de la vasculatura retiniana se examinó *ex vivo* evaluando la fuga de albúmina de los vasos sanguíneos a la retina utilizando el método de albúmina de azul de Evans. Para ello, a cuatro animales por grupo se les inyectó por vía intraperitoneal una solución de azul de Evans (E2129 SIGMA, Saint Louis, Missouri, EE. UU.) (5 mg/ml disueltos en PBS a un pH 7,4). Después de la inyección, los animales se pusieron azules, lo que confirmó la absorción y distribución del tinte. Después de 2 h, los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical y se les sometió a enucleación ocular. Las retinas de cada animal se aislaron, se pesaron y se protegieron rápidamente de la luz. Se obtuvieron portaobjetos de montaje plano y la cubierta se deslizó con una gota del medio de montaje Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Oregon, EE. UU.). Se adquirieron imágenes digitales de diferentes campos aleatorios de todas las retinas utilizando un microscopio de barrido láser confocal (FV1000; Olympus, Hamburgo, Alemania) a $\times 60$ utilizando la línea láser 561 nm, y cada imagen se grabó con una intensidad de haz idéntica con un tamaño de 1024 píxeles $\times$ 1024 píxeles. Para el análisis cuantitativo del azul de Evans unido a albúmina, se contó el número de extravasaciones por campo de 0,44 mm². Este análisis fue realizado por investigadores que desconocían el tratamiento recibido por los ratones.

Resultados

La concentración de glucosa en sangre y el peso corporal al final del tratamiento de los ratones db/db tratados con colirios la-007a fueron similares a los de los ratones db/db tratados con vehículo. Se identificaron sitios extravasculares de azul de Evans en la retina de los ratones diabéticos (figura 1, flechas blancas). El tratamiento tópico con la-007a pudo reducir significativamente el número de extravasaciones por campo, evitando así la fuga vascular debida a la alteración de la barrera retiniana sanguínea.

Ejemplo 5.4: Tratamiento y/o prevención de la peritonitis

La eficacia terapéutica de los compuestos de la presente invención se evaluó usando modelos murinos de peritonitis inducida por tioglicolato como los descritos por Cook AD y col. (J Immunol. 2003;171 (9):4816-4823) y Tsai JM y col. (Blood Adv. 2019;3 (18): 2713-2721. doi: 10.1182/Blood Advances.2018024026).

A los ratones C57BL/6J se les inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) 1 ml de compuestos a 50 mg/kg 1 h antes de la inducción de la peritonitis. A continuación, se indujo la peritonitis con 1 ml de caldo de tioglicolato estéril al 4 % (peso/volumen) o PBS como control. Después de 3 h, los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal con una solución de PBS que contenía 5 mg/ml de ketamina y 1 mg/ml de xilazina y las cavidades peritoneales se lavaron con 5 ml de HBSS 1X estéril sin Ca²⁺/Mg²⁺ enfriado con hielo que contenía EDTA 2 mM. Las células del exudado peritoneal (PEC, por sus siglas en inglés) se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C y los glóbulos rojos se lisaron. Los PEC se lavaron, se resuspendieron en PBS con FBS al 10 %, se incubaron con bloqueadores del FcR anti-CD16/CD32 y mlgG y, a continuación, se tiñeron con anticuerpos conjugados fluorescentes para caracterizar los leucocitos migrados (anti-CD45, anti-CD11b, anti-Ly6G, anti-CD8a, anti-CD4, anti-CD3). La viabilidad celular se midió mediante la exclusión de 7-AAD. Las muestras se adquirieron mediante citometría de flujo con el analizador MACSQuant (Miltenyi Biotec) y se analizaron con el software FlowJo. **Animales:** cuatro ratones C57BL/6J por grupo para cada compuesto frente a cuatro ratones tratados con vehículo.

Tratamiento con CPDS: 50 mg/kg por inyección intraperitoneal de los compuestos

- Ic-007a: Volumen inyectado: Ic-007a: 68,5 µl de compuesto en DMSO (1.375 mg) + 431,5 µl de PBS (500 µl de volumen total, 5,87 mM) ratón, aproximadamente 28 g

5 - Ilc-007a: Volumen inyectado: 67,25 µl de compuesto en DMSO (1345 mg) + 431,5 µl de PBS (500 µl de volumen total, 5,74 mM) ratón aproximadamente 27 g

10 - Illc-061a: Volumen inyectado: 58,75 µl de compuesto en DMSO (1175 mg) + 441,25 µl de PBS (500 µl de volumen total, 4,56 mM) ratón aproximadamente 23,5 g

- IVc-059a: Volumen inyectado: 52,25 µl de compuesto en DMSO (1.045 mg) + 447,75 µl de PBS (500 µl de volumen total, 5,25 mM) ratón aproximadamente 20,9 g

15 El tratamiento con los productos Ic-007a, Ilc-007a, Illc-061a, IVc-059a se realizó 60 minutos antes de la peritonitis inducida con tioglicolato. La lectura se realizó 1 hora después de la inyección de tioglicolato.

Método de lectura: citometría de flujo para caracterizar los leucocitos migrados utilizando anti-CD45, anti-CD11b, anti-Ly6G, anti-CD8a, anti-CD4, anti-CD3.

20 Resultados y análisis estadísticos: los resultados se analizaron con el software FlowJo. Los datos se mostraron como media $\pm$ SEM. Para el análisis estadístico se utiliza la prueba t de Student de dos vías con un nivel de significancia de 0,05.

Resultados

25 Tabla 46: Ejemplo de datos para el compuesto Ic-007a

Recuentos de células	Ratones tratados con vehículo	Ratones tratados con C76/24	% de reducción
Leucocitos (células CD45+)	$60,8 \times 10^4 (\pm 10,8 \times 10^4)$	$31,3 \times 10^4 (\pm 6,66 \times 10^4)$	48 %
PMN (células CD11b-Ly6G doble +)	$10,4 \times 10^4 (\pm 7,75 \times 10^4)$	$2,03 \times 10^4 (\pm 0,36 \times 10^4)$	80 %
Linfocitos CD4+	$1,58 \times 10^4 (\pm 0,54 \times 10^4)$	$1,03 \times 10^4 (\pm 0,15 \times 10^4)$	35 %
Linfocitos CD8+	$1,86 \times 10^4 (\pm 0,59 \times 10^4)$	$0,54 \times 10^4 (\pm 0,15 \times 10^4)$	71 %

35 Tabla 47: resumen de los resultados para los cuatro compuestos

Salida por lectura	Porcentaje de reducción de ratones tratados con C20 en comparación con ratones tratados con vehículo			
Recuentos de células	Ic-007a	Ilc-007a	Illc-061a	IVc-059a
Leucocitos (células CD45+)	48,0 %	11,8 %	-2,4 %	4,0 %
PMN (células CD11b-Ly6G doble +)	80,0 %	27,3 %	-8,3 %	-13,0 %
Linfocitos CD4+	35,0 %	40,0 %	42,9 %	6,0 %
Linfocitos CD8+	71,0 %	20,0 %	33,3 %	23,0 %
El compuesto Ic-007a tuvo el efecto antiinflamatorio más fuerte y disminuyó el reclutamiento de leucocitos (48 %), con un efecto muy fuerte sobre los PMN (80 %), los linfocitos CD8+ (71 %) y los linfocitos CD4+ (35 %).				

Ejemplo 5.5: Tratamiento y/o prevención de la miocardiopatía diabética

55 La eficacia terapéutica de los compuestos de la presente invención se prueba usando modelos murinos de miocardiopatía diabética descritos por Li C y col. (Cardiovasc Diabetol. 2019;18 (1):15. Publicado el 2 de febrero de 2019. doi:10.1186/s12933-019-0816-2).

60 Procedimiento animal y tratamiento farmacológico: Treinta ratones KK-Ay de 8 semanas de edad (modelo genético de diabetes tipo 2) y ratones C57BL/6J se alojan en jaulas (4-6 por jaula) con libre acceso a las cajas de bebida/pienso. Los ratones se alojan en una habitación mantenida a 24 °C con un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h.

65 Los ratones modelo de diabetes tipo 2 se alimentan con una dieta alta en grasas. La glucosa en sangre se mide a diario. Los ratones con una concentración de glucosa en sangre superior a 15 mM (200 mg/dl) durante 2 semanas consecutivas se utilizan para los siguientes experimentos. Posteriormente, los animales se distribuyen aleatoriamente en grupos (15 por grupo) y se crían durante 8 semanas. Los grupos incluyen los grupos de control:

(1) ratones C57BL/6J sanos sin tratamiento; (2) ratones KK-Ay con diabetes tipo 2 sin tratamiento; y (3) ratones KK-ay con diabetes tipo 2 tratados con los compuestos de la presente invención.

Evaluación ecocardiográfica: La medición ecocardiográfica se realiza antes de la intervención experimental y al final del período de estudio. Se utiliza un ecocardiógrafo en modo M equipado con un sistema de transductor de matriz lineal de 17,5 MHz (sistema de imágenes de alta resolución Vevo 2100™; Visual Sonics). Se evalúan la frecuencia cardíaca (FC) y las siguientes variables estructurales: la dimensión interna del ventrículo izquierdo en la diástole (LVIDD, por sus siglas en inglés), la dimensión interna del ventrículo izquierdo en la sístole (LVIDS, por sus siglas en inglés), el grosor del tabique interventricular en la sístole (IVSs) y la diástole (IVSd) y el grosor de la pared posterior del VI en la sístole (LVPWs) y la diástole (LVPWd). La masa LV se calcula mediante la fórmula $[(LVIDd + LVPWd + IVSd)^3 - (LVIDd)^3 \times 1,04 \times 0,8 + 0,6]$. La función LV se evalúa mediante los siguientes parámetros, que incluyen el acortamiento fraccionario (FS, por sus siglas en inglés), la fracción de eyección (EF, por sus siglas en inglés) y la relación E/A. Todas las mediciones las realiza un solo investigador que no conoce los grupos experimentales.

Concentración de hidroxiprolina en el miocardio: La concentración de hidroxiprolina en el miocardio del ventrículo izquierdo se mide para estimar el contenido de colágeno del miocardio. Las mediciones se realizan mediante un espectrofotómetro utilizando un kit comercial (BioVision, Mountain View, CA, EE. UU.) según los protocolos del fabricante.

Detección de los niveles en suero de lípidos, glucosa, insulina y HbA1c: Al final del estudio, los ratones se anestesian mediante la inhalación de isopentano al 3 % en el aire. Las muestras de sangre en ayunas se recogen en tubos comerciales que contienen heparina de litio como anticoagulante a través de la vena sublingual de cada animal y se centrifugan durante 6 minutos a 3000 rpm/min. El plasma se mantiene en un tubo plano y se almacena a -20 °C hasta el análisis. Las concentraciones en plasma de colesterol total (TC), triglicéridos (TG), colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) y colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) se determinan mediante métodos espectrofotométricos. Los niveles de glucosa en sangre se miden usando un glucómetro (ACCU-CHEK, Roche, EE. UU.). Después de un ayuno nocturno, se determinan los niveles de insulina y proinsulina en ayunas utilizando kits de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de insulina y proinsulina de ratones, respectivamente (Nanjing Jiancheng Biotech, China). La sangre también se retiene para medir la HbA1c mediante un kit de intercambio iónico cromatográfico-espectrofotométrico (Biosystems, España).

Evaluación del estrés oxidativo en el tejido cardíaco: Los animales se sacrifican y los corazones se extraen y se enjuagan retrógradamente con una solución de Krebs-Ringer (NaCl 115 mM, KCl 5 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,25 mM y glucosa 11 mM) al final del estudio. La temperatura de la solución de infusión se mantiene a 37 °C. A continuación, se pesan los corazones y los tejidos cardíacos se homogeneizan en hielo en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada con un pH de 7,4, que contiene EDTA 1 mM. Los homogeneizados se centrifugan en solución salina fría durante 10 min a 7000 rpm/min. La concentración de proteína del sobrenadante se determina mediante el kit de albúmina de suero bovino como estándar. Los sobrenadantes se utilizan para analizar el nivel de hidróperóxido lipídico y los niveles de glutatión peroxidasa (GSH-Px), superóxido dismutasa (SOD) y malondialdehído (MDA). Las mediciones se realizan mediante un espectrofotómetro utilizando kits comerciales (Solarbio, China) según los protocolos del fabricante. El nivel de hidróperóxido lipídico se expresa como nmol/mg de proteína. Los niveles de GSH-Px, SOD y MDA se expresan como pmol/mg de proteína, nmol/mg de proteína y mmol/mg de proteína, respectivamente. El nivel de expresión de NOX4 se mide mediante transferencia Western. Se utilizan anticuerpos monoclonales de ratón anti-Nox4 (1:1000, Abcam) y anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (CWBIO). Se utiliza β-actina (1:1000, Abcam) como referencia.

Análisis histológico e inmunohistoquímico: Los tejidos del corazón se fijan en paraformaldehído al 4 % en un tampón de fosfato 0,1 M durante 48 h, se deshidratan y se incluyen en parafina, se seccionan con un grosor de 4 μm y se montan en portaobjetos de vidrio. La tinción tricrómica de Masson se usa para evaluar el grado de fibrosis en el músculo cardíaco.

Para la recuperación del antígeno, los portaobjetos desparafinados se mantienen en una solución de citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) durante 10 minutos a 100 °C. A continuación, las secciones se incuban en peróxido de hidrógeno al 3 % para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena y se incuban con un anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal de ratón contra TGF-β1, colágeno I y colágeno III; Abcam) durante 1,5 h, seguido del correspondiente anticuerpo secundario durante 2,5 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las secciones se lavan en PBS tres veces y se incuban en una solución de diamino bencidina al 0,02 % durante 2-8 min. Después de la contratinción con hematoxilina, los portaobjetos se lavan brevemente, se montan con resina y se observan en el microscopio óptico.

Análisis de la vía NRF2/ARE y TGF-β/SMAD mediante transferencia Western: El protocolo de la transferencia Western se describe en nuestro estudio anterior. En resumen, el tejido miocárdico se lisa en un tampón RIPA enfriado con hielo (150 g de cloruro de sodio mM, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1 %, desoxicolato de sodio al 0,5 %, NP-40 al 1,0 %, PMSF 1 mM y 50 mM de Tris, pH 8,0) para la extracción total de proteínas. La concentración total de proteína se cuantifica mediante un kit de ensayo de proteína BCA (Medchem Express, EE. UU.). Se separan cantidades iguales de proteína mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12 % (PAGE). A continuación, la proteína se transfiere del gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno. Después del bloqueo con leche desnatada al 5 %, la membrana se incuba durante la noche en el anticuerpo primario (Nrf2, HO-1, TGF-β1, p-Smad2, Smad2, p-Smad3, Smad3, Smad7, α-SMA 1:

1000, Abcam). Las bandas se detectan con un anticuerpo secundario específico conjugado con peroxidasa de rábano picante (CWBIO). Se usa β -actina (1: 1000, Abcam) como referencia de la proteína celular total.

Ejemplo 5.6: Tratamiento y/o prevención de la diabetes y cicatrización de heridas diabéticas

Se obtuvieron modelos murinos de diabetes utilizando estreptozotocina (diabetes inducida con STZ) para evaluar la eficacia de los compuestos de la presente invención para la cicatrización de heridas diabéticas y generar muestras de tejido que permitan el análisis posterior a la vida del tejido cutáneo.

Animales: un total de 104 ratones CD-1 hembras de 5 a 7 semanas con un peso aproximado de 25 a 30 g se implantaron para el estudio. Estos animales se compraron en Charles River y se aclimataron durante 7 días tras su llegada.

Alojamiento de animales: Los ratones se alojaron en jaulas IVC (hasta 5 ratones por jaula) y los ratones individuales se identificaron mediante marcas en la cola. Las jaulas, el lecho y el agua se desinfectaron antes del uso. A los animales se les proporcionó lecho enriquecido con mazorcas de maíz para proporcionar material de anidación y enriquecimiento medioambiental. Cada jaula se etiquetó claramente con una tarjeta que indicaba el número de animales, el sexo, la cepa, la fecha de nacimiento, el número del estudio y la fecha de inicio y el tratamiento. Las jaulas se cambiaban una vez a la semana y se sustituían los alimentos y el agua cuando era necesario.

La sala de alojamiento de animales se mantuvo de la siguiente manera: temperatura ambiente a 20-24 °C, humedad al 30-70 % y se usó un ciclo de luz/oscuridad de 12 h.

Técnica aséptica y dosificación: Aunque los animales que se utilizarían en este estudio eran inmunocompetentes, la preparación de las soluciones de dosificación y la dosificación/pesaje de los animales se realizaron en una cabina de bioseguridad estéril. Dosificación intravenosa: Los compuestos se formularon en DMSO al 5 %: Solutol al 10 %: PEG400 al 10 %: PBS al 75 % y pH ajustado hasta 7 con una solución de NaOH 0,5 M. Dosificación por vía oral: la formulación es en agua.

Las soluciones farmacológicas se formularon el día de la dosificación, y cualquier resto al final de la dosificación se almacenó a -20 °C.

Diseño del estudio: A los ratones (excepto al grupo de control negativo) se les inyectó STZ (55 mg/kg; IP) diariamente durante 5 días consecutivos. Los ratones estuvieron sin comer durante 6 horas antes de la inyección. Una semana después de completar la inducción, se monitorizaron los niveles de glucosa y los ratones con niveles más bajos que 15 mmol/l (280 mg/dl) se retiraron del estudio porque no habían desarrollado la gravedad ideal de la diabetes. Los animales se anestesiaron y se creó una herida de 6 mm de grosor completo usando un punzón de biopsia esterilizado. Se tomaron imágenes de las heridas (días 0). Los animales se trataron y se les tomó imágenes cada 2 días hasta el día 14 (cuando cicatrizaron las heridas de ratones no diabéticos de control). Las imágenes de la herida se evaluaron digitalmente para determinar el área de herida y el porcentaje de cierre frente al tiempo se representó gráficamente.

Tabla 48:

Grupo	n.º de animales	Compuestos probados	Nivel de dosis; Ruta
1	3 (3)	Control negativo (no inducido)	Vehículo; I.V.
2	3 (3)	Control negativo (inducido)	Vehículo; I.V.
3	8 (3)	Pirfenidona	250 mg/kg; PO
4	8 (3)	Ia-001a	15 mg/kg; I.V.
5	8 (3)	Ia-001aTZ	15 mg/kg; I.V.
7	8 (3)	Ib-010a	15 mg/kg; I.V.
8	8 (3)	IIIC-061a	15 mg/kg; I.V.
9	8 (3)	IVC-059a	15 mg/kg; I.V.
10	8 (3)	IVC-059a	150 mg/kg; PO

El tratamiento continuará durante 2 semanas (14 días). Los números de animales entre paréntesis se dosifican durante 7 días y, a continuación, se toman muestras para el análisis de PD a mitad del estudio.

Tabla 49: programa del estudio:

Tiempo (semanas)	W1	W2	W3	W4	W5
5	STZ	Dosis (5 días)	---	-	---
10	Pruebas		Glucosa en sangre	Glucosa en sangre	Glucosa en sangre
15	Compuesto	---	---	---	Dosis intravenosa, dosis oral diaria, diaria
	Órgano			Se tomaron muestras de 3 animales por grupo después de 7 días de dosificación. Muestreo de tejido cutáneo.	

Observaciones seriadas

Peso corporal: el peso corporal de todos los ratones del estudio se midió y se registró diariamente; esta información se utiliza para calcular la dosificación precisa para cada animal.

Signos y síntomas generales: se observó a los ratones a diario y se observó cualquier signo de angustia o cambio en el estado general, p. ej., pelo puntiagudo, falta de movimiento o dificultad para respirar.

Muestreo a mitad del estudio: Tras 7 días de dosificación, se sacrificaron 3 animales por grupo y se extirpó el tejido de la herida y se dividió en 2 secciones (A) y (B):

(A) la primera sección es FFPE y se tiñó con lo siguiente: H&E, tricromo de Masson, CD31, TGF- β .

(B) la segunda sección se homogeneizó y se utilizó para los siguientes ELISA: Niveles de SOD, GTPx, catalasa, TNF- α , IL-6, TGF- β .

Terminación: Los animales del estudio terminales se sacrifican mediante inhalación de CO₂. Antes de la terminación, se pesan los animales. *Terminación anticipada*: La terminación prematura de un animal se realiza si se mide una pérdida de peso igual o superior al 20 % y en el caso de cualquier animal comprometido que presente signos y síntomas críticos o no pueda comer ni beber.

Resultados:

Glucosa en sangre: La inducción con STZ dio como resultado un aumento significativo de la glucosa en la sangre en comparación con los controles con vehículo no inducidos. El tratamiento con Ia-001a, Il1c-061a and IVc-059a por vía intravenosa dio como resultado una reducción significativa de los niveles de glucosa en sangre en comparación con los controles de vehículo inducidos. Después de 7 días, todos los compuestos mostraron cierto grado de aceleración de la cicatrización de las heridas en el modelo de diabetes inducida con STZ (figura 10, se tomaron muestras de 3 animales por grupo después de 7 días de dosificación). Se tomaron muestras de tejido cutáneo.

Ejemplo 5.7: Tratamiento y/o prevención de las úlceras de pie diabético

Los compuestos de la presente invención se prueban usando un modelo de úlcera diabética en ratas, tal como lo describen Zhang Y y col. (J Diabetes Res. 2016, 2016, 5782904. doi: 10.1155/2016/5782904).

La cicatrización de heridas en la piel y otros tejidos mucosos implica una secuencia compleja de eventos que incluyen la coagulación, la inflamación aguda y crónica, la reepitelización, la formación de tejido de granulación, la contracción de la herida y la remodelación del tejido conectivo. Sin embargo, varias afecciones genéticas y adquiridas, tales como el envejecimiento, la desnutrición (p. ej., la deficiencia de vitamina C y proteínas), las infecciones, la hipoxia y las enfermedades genéticas como el síndrome de Ehlers-Danlos, pueden afectar este proceso de reparación. Entre estas afecciones, la diabetes mellitus es la causa más común de heridas dañadas o que no cicatrizan. Por ejemplo, datos alarmantes indican que 85 % de las úlceras de pie diabético que no cicatrizan finalmente requieren la amputación, lo que destaca la importancia clínica de la hiperglucemia a largo plazo. La “vía hacia una herida crónica”, como describieron los autores de un estudio reciente, se centra en la inflamación prolongada o crónica caracterizada por la activación de macrófagos (así como la acumulación de neutrófilos), lo que conduce a niveles elevados de citocinas proinflamatorias, especies reactivas de oxígeno, metaloproteinasas de matriz (MMP) y otras proteinasas neutras (p. ej., la elastasa). Todo esto, junto con una deficiencia de inhibidores de proteinasa endógenos, conduce a una “degradación excesiva de la matriz, degradación de los factores de crecimiento y alteración de la epitelización”.

En el primer experimento, a quince ratas Sprague-Dawley macho adultas (peso corporal de 300 a 325 g, Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, MA) se les inyecta a través de la vena de la cola un tampón salino citratado 10 mM con un pH de 4,5 (controles no diabéticos, NDC) o la misma solución que contiene estreptozotocina (STZ; ENZO Life Sciences, Inc., reunión de Plymouth, Pensilvania; 70 mg/kg de peso corporal) para inducir diabetes tipo I. A continuación, las ratas se distribuyen en los cinco grupos experimentales que se describen a continuación ($n = 3$ ratas/grupo). Todas las ratas tienen acceso ilimitado a comida y agua. En 48 horas, las ratas inyectadas con STZ mostraron niveles de glucosa en la orina muy elevados. Tres semanas después de inducir la diabetes, se afeita la piel de la espalda de todas las ratas y se realiza una serie de seis heridas estándar por rata, cada una de 6 mm de diámetro, utilizando un trépano quirúrgico. Se establecen los siguientes cinco grupos experimentales (en este experimento inicial, el tratamiento en todos los grupos fue de siete días; más adelante, en el experimento 3, se describe un estudio a más largo plazo): ratas de control no diabéticas (NDC) tratadas mediante la aplicación tópica diaria de vaselina blanca ("vehículo"); ratas diabéticas (grupo D) tratadas por vía tópica a diario con el vehículo solo; ratas diabéticas tratadas con los compuestos probados.

Al final de este período de tiempo, las seis heridas circulares por rata se evalúan clínicamente midiendo con un calibrador el diámetro de las heridas en milímetros, se recogen muestras de sangre, las ratas se sacrifican y las muestras de piel se diseccionan para la evaluación histológica/histoquímica y bioquímica como se describe a continuación.

El séptimo día después de crear las heridas estandarizadas, se anestesian todos los animales y se extraen muestras de sangre para determinar la glucosa en sangre (One Touch Ultra Glucometer; Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ) y mediciones de HbA1c (Bayer A1CNow Selfcheck, Sunnyvale, CA) y, una vez completados los procedimientos siguientes, las ratas se sacrifican por inhalación de CO₂.

Se toman fotografías para las mediciones clínicas para evaluar el cierre de herida (18 heridas por grupo experimental). El porcentaje de reducción de la superficie de la herida se calcula midiendo el diámetro (en milímetros) de cada herida antes y después del protocolo de tratamiento.

El día 7, los tejidos de la herida se extirpan de dos sitios por rata y se agrupan para el análisis bioquímico. Cada conjunto de tejido se homogeneiza, se extrae a 4 °C con urea 5 M en un tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,8) que contiene NaCl 0,2 M y CaCl₂ 5 mM durante una noche y, a continuación, se centrifuga durante 1 hora a 11.000 x g, como se ha descrito anteriormente. Los sobrenadantes se dializan contra el tampón Tris-HCl, NaCl y CaCl₂, y las proteinasas se purifican parcialmente mediante sulfato de amonio añadido al 60 % de saturación. Las proteinasas precipitadas se analizan mediante ELISA para determinar las collagenasas MMP-8 (Sigma-Aldrich Life Sciences Inc., St. Louis, MO) y MMP-13 (TSZ Scientific LLC, Framingham, MA).

Se toman biopsias de cada uno de los dos sitios de la herida, incluido el tejido circundante no lesionado, y se fijan en formalina tamponada neutra al 10 % durante 24 horas y, a continuación, se transfieren a etanol al 50 % antes de realizar un examen macroscópico, la deshidratación con alcohol, la eliminación del xileno, la incrustación en parafina y el seccionamiento. Las secciones de cinco micrones se tiñen con H&E y tricromo de Masson y la distancia entre los márgenes de la herida se mide histomorfométricamente utilizando un micrómetro ocular calibrado y un análisis de imagen confirmado. Las dos últimas heridas por rata se diseccionan, hidrolizan y analizan para determinar la hidroxiprolina como se describe a continuación.

Al final de los protocolos de tratamiento de 14 y 30 días, las mediciones físicas y las evaluaciones histológicas e histoquímicas son las mismas que las descritas anteriormente para el experimento de 7 días. Además, durante los tres períodos de tiempo, las muestras de tejido de las biopsias por punción de 6 mm se hidrolizan dos veces en NaOH 2 N a 120 °C durante 1 hora cada vez. A continuación, se analizan alícuotas de 50 µl de los hidrolizados de tejido cutáneo para determinar la hidroxiprolina, un aminoácido que se encuentra esencialmente solo en el colágeno.

Ejemplo 5.8: Tratamiento y/o prevención de la retinopatía diabética y la nefropatía diabética

La eficacia terapéutica de los compuestos según la presente invención se evaluó utilizando un modelo de ratón diabético utilizando la cepa de ratón DBA/2 con inducción de diabetes por STZ y seguimiento de la retinopatía diabética, incluido el daño renal. Cinco semanas después de la inducción de la diabetes mediante una inyección de STZ en dosis bajas durante 5 días consecutivos, la relación albúmina urinaria:CR es de 424 veces, en comparación con 36,9 en los controles de la misma edad.

Para el tratamiento de la nefropatía diabética, se indujo a ratones DBA/2 con STZ (dosis baja durante 5 días consecutivos). Una semana después de completar la inducción, se monitorizaron los niveles de glucosa y se retiró del estudio a los ratones con niveles más bajos que 15 mmol/l (280 mg/0,1 l), ya que no habían desarrollado una diabetes lo suficientemente grave como para provocar una lesión renal. Los niveles de glucosa se monitorizaron semanalmente y, 5 semanas después de la inducción del STZ, se realizó una evaluación bioquímica de la lesión renal midiendo los niveles de albúmina y creatinina en la orina y confirmando que estaban dentro del rango deseado. Después de completar con éxito esta etapa, los animales se asignaron a los grupos de tratamiento.

El tratamiento se realizó durante cuatro semanas (dosificación intravenosa) con una evaluación semanal de los niveles de glucosa en sangre y albúmina/creatinina en la orina. Al final del período de tratamiento, se tomaron las siguientes muestras de los animales:

- sangre para medir la glucosa y el nitrógeno ureico en sangre (BUN)

- sangre para medir la creatinina en suero

- orina para determinar la relación albúmina/creatinina final.

- Se extirpó el riñón y se realizó una FFPE: Se realizó una tinción con Picro-Sirius Red, tricromo de Masson y H&E para identificar áreas de fibrosis, junto con evidencia de esclerosis mesangial, hialinosis arteriolar y engrosamiento de la membrana basal glomerular (GBM, por sus siglas en inglés)

Para evaluar el efecto del compuesto sobre la retinopatía diabética, se tomaron imágenes semanales a los animales con una cámara de fondo de ojo. Inmediatamente antes del sacrificio, a los animales se les inyectó FITC-dextrano a través de la vena de la cola. Durante el muestreo, se tomaron muestras de los ojos y se fijaron en formalina. Se prepararon montajes planos de retina y se examinaron con fluorescencia para observar los efectos de los compuestos sobre la vascularidad y la permeabilidad de los vasos (lo que se indica por una alta tinción de fondo). Grupos de animales (n = 8 ratones por grupo):

Tabla 50:

Grupo	n.º de animales	Compuestos
1	3	Control negativo (no inducido)
2	3	Control positivo (inducido)
3	8	Captopril 50 mg/kg
4	8	Ia-001a 15 mg/kg por vía intravenosa I.V.
5	8	Ia-001aTZ 15 mg/kg por vía intravenosa I.V.
6	8	Ic-007a 15 mg/kg por vía intravenosa I.V.
7	8	Ib-010a 15 mg/kg por vía intravenosa I.V.
8	8	IIIC-061a 15 mg/kg por vía intravenosa I.V.
9	8	IVc-059a 15 mg/kg por vía intravenosa I.V.
10	8	IVc-059a 150 mg/kg por vía oral P.O.

El tratamiento continuó durante 4 semanas (28 días) con una medición semanal de la glucosa en sangre y de la albúmina/creatinina en la orina.

Sacrificio después de la última dosificación del compuesto (agente) y toma de muestras de órganos y sangre.

Tabla 51: programa de estudio

Tiempo (semanas)	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	sacrificio en W9 final
STZ	Dosis (5 días)	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Pruebas		Glucosa en sangre	Glucosa en sangre		Glucosa en sangre ALB/CREA en orina	Glucosa en sangre ALB/CREA en orina	Glucosa en sangre ALB/CREA en orina	Glucosa en sangre ALB/CREA en orina	Glucosa en sangre ALB/CREA en orina	Glucosa en sangre ALB/CREA en orina
Compuesto	---	---	---	---	---	Dosis intravenosa, diaria	Dosis intravenosa, diaria	Dosis intravenosa, diaria	Dosis intravenosa, diaria	---
Órgano										Sangre (plasma) Riñones Ojos

Observaciones seriadas

Peso corporal: El peso corporal de todos los ratones del estudio se midió y se registró diariamente; esta información se utilizó para calcular la dosificación precisa para cada animal.

Signos y síntomas generales: Se observó a los ratones a diario y se observó cualquier signo de angustia o cambio en el estado general, por ejemplo, pelo puntiagudo, falta de movimiento o dificultad para respirar.

Muestreo y análisis posterior a la vida

- Inmediatamente antes del muestreo terminal, a 4 animales por grupo se les inyectó FITC-dextrano para evaluar el montaje plano de la retina.

- Muestreo terminal:

- Se tomaron muestras de sangre terminales mediante punción cardíaca y se preparó plasma/suero de cada animal.

- Medición de glucosa en sangre

- Medición de creatinina en suero

- BUN medido

- ALB/CREATININA en orina

- ELISA para PCR, TNF- α , IL-6 y TGF- β

- El plasma restante se almacenó para el análisis de citocinas.

- El tejido renal se resecó y se pesó

- Un riñón se congeló instantáneamente para un posible bioanálisis u otro análisis.

- Un riñón se fijó en formalina y se incluyó en cera de parafina.

- Detección de tinción tricromática de H&E y Masson para

- Esclerosis mesangial y glomeruloesclerosis,

- Hialinosis arteriolar

- Engrosamiento GBM

- El tejido ocular debe ser FFPE

- Se usó otro ojo (4 por grupo de tratamiento) para el análisis de montaje plano de la retina para medir el patrón vascular.

- Área cubierta por vasos

- Evaluación de la fuga vascular

Terminación: Los animales del estudio terminales se sacrificaron mediante inhalación de CO₂. Antes de la terminación, se pesaron los animales.

Resultados: los compuestos Ia-001a, IIc-061 y IVc-059a redujeron significativamente el nivel de glucosa en sangre en la cepa de ratones DBA/2 con inducción de diabetes mediante STZ, como se muestra en la figura 9 (se muestran una y dos semanas).

Ejemplo 5.9: Tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Behçet (BD)

La eficacia terapéutica de los compuestos según la presente invención se prueba usando el modelo murino de enfermedad de Behçet tal como lo describen ZHENG y col. (Acta Derm Venereol 2015; 95: 952-958).

La enfermedad de Behcet es un trastorno crónico, recurrente, multisistémico e inflamatorio que afecta principalmente a la mucosa oral y urogenital y al tracto uveal. Aunque se desconocen la etiología y la patogénesis de la enfermedad de Behcet, se han propuesto numerosas etiologías, incluidos los factores medioambientales, infecciosos e inmunológicos; una base autoinmune, caracterizada por complejos inmunes circulantes y la activación del complemento, cada vez gana más aceptación. Para probar y comprender la inmunopatogénesis de la enfermedad de Behcet, se desarrollan modelos animales basados en contaminantes medioambientales, péptidos derivados de proteínas de choque térmico bacterianos y humanos e inyecciones de virus. El uso de estos modelos animales por separado o simultáneamente permite una investigación más eficaz de la enfermedad de Behcet.

Recientemente se han desarrollado modelos animales para encontrar opciones de tratamiento eficientes y seguras. La activación de los neutrófilos es uno de los aspectos inmunopatogénicos de la EB. Los neutrófilos tienen un papel fundamental en las respuestas inmunitarias innatas. Como las lesiones típicas de la EB, tales como la foliculitis pustulosa, las reacciones patológicas y el hipopión, tienen infiltraciones importantes de neutrófilos, se han investigado las funciones y el estado de activación de los neutrófilos. Hay informes contradictorios sobre si la producción de superóxido basal y estimulada por fMLP, la fagocitosis, la quimiotaxis y la adhesión endotelial de neutrófilos aumentan, son normales o se reducen en la EB. En el supuesto modelo de EB en ratones transgénicos con HLA, la única anomalía observada es el aumento de la liberación de superóxido en respuesta al fMLP. En el mismo estudio, los pacientes positivos para HLA-B51 y los controles sanos también presentan altas respuestas de superóxido.

El modelo murino similar a la enfermedad de Behcet se desarrolla inoculando el HSV tipo 1 cultivado en células Vero en ratones macho del Instituto de Investigación del Cáncer (ICR, por sus siglas en inglés) de 4-5 semanas de edad. En resumen, los lóbulos de las orejas de los ratones experimentales se rascan con una aguja y se inoculan dos veces con el virus, con un intervalo de 10 días. Los ratones infectados se observan durante 16 semanas después de la inoculación final. Los ratones inoculados con el HSV que presentan al menos 2 síntomas similares a los de Behcet se utilizan como modelo de ratón similar a EB (n = 5). Tanto ratones ICR no infectados (n = 2) como ratones inoculados con HSV, pero asintomáticos.

Ejemplo 5.10: Tratamiento y/o prevención de la uveítis (UVE)

La eficacia terapéutica de los compuestos de la presente invención se prueba usando modelos animales de uveítis autoinmune, incluida la uveítis inducida por endotoxinas (UIE) en la rata, tal como lo describen Fruchon S y col. (Molecules. 2013;18 (8):9305-9316. Publicado el 5 de agosto de 2013, doi: 10.3390/molecules18089305). Este modelo se considera un modelo clínicamente relevante para la uveítis anterior humana. Consiste en la administración sistémica de lipopolisacáridos (LPS) que produce una respuesta inflamatoria aguda en los segmentos anterior y posterior del ojo con una ruptura de la barrera hematoocular y una infiltración de células inflamatorias. Los signos clínicos de la UIE reflejan los cambios observados en las enfermedades humanas. Por lo tanto, el efecto terapéutico de los compuestos de la presente invención se prueba en el modelo de UIE en ratas, en comparación con la dexametasona "estándar de oro".

Animales: Solo se incluyen animales sin signos visibles de defectos oculares. Los animales se examinan durante el período previo al ensayo y se presta especial atención a los ojos. Se mantienen en observación durante una semana antes de los experimentos. Los animales se alojan individualmente en jaulas estándar y tienen libre acceso a la comida y al agua del grifo.

Estudio de tolerabilidad ocular: El estudio consistió en tres grupos de tres ratas Sprague-Dawley machos. El día 0, los animales se pesan, se anestesian y se les administra una única inyección intravítrea de 5 µl en ambos ojos. El primer grupo recibe el vehículo salino (NaCl al 0,9 %) y los otros grupos reciben diferentes dosis de los compuestos de la presente invención. A continuación, cada animal se evalúa mediante observación clínica y exámenes oculares. Los exámenes oculares incluyen una funduscopia y un examen de la córnea con lámpara de hendidura (LES) con un colorante de fluoresceína que permite obtener la puntuación de McDonald-Shadduck. El sistema de puntuación McDonald-Shadduck aborda: los parámetros conjuntivales (congestión, hinchazón y secreción) y la exacerbación acuosa (intensidad del fenómeno de Tyndall) como presunta evidencia de la ruptura de la barrera hematoacuosa; inyección de vasos secundarios y terciarios en el iris; nubosidad, área relativa de la misma, neovascularización e integridad epitelial (marcaje con fluoresceína) de la córnea; integridad de la lente. Después del examen ocular final, se sacrifican todos los animales. Los ojos se recogen en la necropsia, se fijan en una solución de Davidson modificada durante 12 h, seguida de formalina tamponada neutra al 10 % y se procesan para la histología. Un patólogo veterinario certificado evalúa las secciones de tejido teñidas con hematoxilina-eosina mediante microscopía óptica.

Modelo de rata con uveítis inducida con endotoxinas (UIE): Treinta y seis ratas Lewis albinas hembras se dividen aleatoriamente en seis grupos de seis animales cada uno. La UIE se induce mediante una inyección en la almohadilla de la pata de 100 µl de solución salina estéril libre de pirógenos que contiene 200 µg de LPS (lipopolisacárido de Salmonella typhimurium, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Francia). Los animales se tratan inmediatamente antes de la inducción de la UIE con una inyección intravítrea en ambos ojos de 5 µl de una solución salina (NaCl al 0,9 %) que no contiene ningún ingrediente activo, o con los compuestos probados, o 20 µg de dexametasona. Los animales se examinan con una lámpara de hendidura (SLE) a las 24 h, p. ej., el pico clínico de la enfermedad en este modelo. La intensidad de la inflamación ocular clínica se puntúa en una escala de 0 a 5 para cada ojo. El grado 0 indica que no hay inflamación. El grado 1 indica la presencia de una vasodilatación mínima del iris y la conjuntiva, pero sin la observación de eritema o células en la cámara anterior (CA). El grado 2 indica la presencia de una dilatación moderada del iris y los vasos

conjuntivales, pero sin eritemas evidentes ni células en la cámara anterior. El grado 3 indica la presencia de una dilatación intensa de los vasos del iris, un eritema y menos de diez células por campo de lámpara de hendidura en la cámara anterior. El grado 4 indica la presencia de signos clínicos más graves que los del grado 3, con más de diez células por campo de lámpara de hendidura en la cámara anterior, con o sin la formación de un hipopión. El grado 5 indica la presencia de una reacción inflamatoria intensa, la formación de fibrina en la cámara anterior y la reclusión total de la pupila. Al final del experimento, es decir, 24 h después de la exposición al LPS, las ratas se anestesian mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital (30 mg/kg) y, a continuación, se sacrifican con una dosis letal de pentobarbital.

Medición de las concentraciones de citocinas en los fluidos oculares: El humor acuoso y el vítreo de ambos ojos de cada animal se extraen después del sacrificio. Las cantidades de citocinas T auxiliares proinflamatorias TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17 e IFN γ , así como de las citocinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10, se determinan mediante análisis multiplex.

Medición de las concentraciones de citocinas en suero: Los sueros de los tres grupos de ratas (vehículo salino, 10 μ g de compuesto y dexametasona) se recogen al final del experimento y se almacenan a -80 °C. Se utilizan para la determinación simultánea de los niveles de cinco niveles de citocinas (IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4 e IL-10) con Cytometric Bead Array (rat CBA Flex set, BD Biosciences, BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.) en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante. Las cantidades de cada una de las citocinas se analizan en relación con las curvas estándar utilizando el software FCAP Array (BD Biosciences).

Ejemplo 5.11: Tratamiento y/o prevención de la polineuropatía sensoriomotora diabética y la neuropatía diabética

La eficacia terapéutica de los compuestos de la presente invención se prueba usando modelos de rata con neuropatía periférica diabética (Kambiz S. y col. (PLoS One. 2015;10(6):e0131144]; PLoS One. 2015;10(5):e0126892. Publicado el 18 de mayo de 2015. doi:10.1371/journal.pone.0126892).

Animales: Las ratas hembra WAG/RiJHSD (n = 27, de 10 semanas de edad, con un peso de 130-150 gramos) se adquieren en Charles River (l'Arbresle, Francia). Los animales se alojan en parejas en jaulas cubiertas a temperatura ambiente en un horario de 12 horas de luz/oscuridad y disponen de agua y comida a voluntad.

Inducción de la diabetes: La diabetes se induce en 21 ratas mediante una única inyección intraperitoneal de STZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) a una dosis de 65 mg/kg de peso corporal en 0,05 mol/l de tampón de citrato de sodio, pH 4,5, como se ha descrito anteriormente. Las ratas se asignan aleatoriamente en 3 grupos: A, B y C (n = 7 en cada grupo). Tras la inducción de la diabetes, el grupo A muere después de 4 semanas, el grupo B después de 6 semanas y el grupo C después de 8 semanas. El grupo de control está formado por 6 ratas que reciben una sola inyección intraperitoneal con un volumen igual de vehículo sin STZ. Se hace un seguimiento de las ratas de control durante 8 semanas. La glucosa en sangre se mide a partir de la sangre de la vena de la cola con un glucómetro (OneTouch, Life Scan, Milpitas, California, EE. UU.). La diabetes se diagnostica en ratas cuando los niveles de glucosa en sangre superan los 20 mmol/l durante las 4 semanas completas posteriores a la inducción de la diabetes.

El flujo sanguíneo y la oxigenación de la piel plantar de las patas traseras: Se utiliza un sistema combinado de flujometría y espectrofotometría láser Doppler (O2C, LEA Medizintechnik, Giessen, Alemania) para medir de forma no invasiva el flujo sanguíneo y la saturación de oxígeno de las plantas glabras de las patas traseras. Tanto en las ratas diabéticas como en las de control, el porcentaje de saturación de oxígeno y la cantidad de flujo sanguíneo cutáneo se evalúan a las 4, 6 y 8 semanas.

Velocidad de recalentamiento después de la exposición al frío: La temperatura de la piel se evalúa utilizando la cámara de vídeo digital infrarroja integrada (320 x 240 píxeles) mediante un sistema de adquisición de datos de 1 Hz (ThermaCam Researcher 2001 HS; FLIR Systems, Berchem, Bélgica), y todos los datos se recopilan continuamente en un ordenador portátil. La distancia entre la cámara y la pata trasera es de 13 cm $\pm$ 2 cm. El tamaño de píxel de los registros de temperatura es de 0,8 x 0,8 mm. La temperatura cutánea de toda la planta de la pata trasera se registra mientras se inmoviliza al animal tras colocarlo en una placa a 14 °C durante 5 segundos. La temperatura mínima de las plantas de las patas traseras se exporta a archivos de texto utilizando ThermaCam Researcher Pro (versión 2001-HS; FLIR Systems, Wilsonville, Oregón, EE. UU.). El área de interés se selecciona trazando una línea que rodea todas las plantas de las patas traseras. La velocidad promedio de recalentamiento se muestra como el aumento de la temperatura de la piel cada 120 segundos.

Sensibilidad térmica: Para determinar la aparición de hipersensibilidad térmica, las pruebas de placa fría y caliente se realizan como se ha descrito anteriormente. En resumen, las ratas se colocan en una cámara abierta con paredes transparentes con una temperatura superficial de 5 °C (placa fría) o 50 °C (placa caliente). Estos experimentos se realizan en días distintos para evitar interferencias. Se observa hasta que el animal retira la pata trasera o la lame.

Prueba de Von Frey: En la prueba de von Frey, utilizada para determinar el umbral de sensibilidad mecánica para la nocicepción, cada rata se coloca en una cámara con un suelo de malla metálica. A continuación, se aplican pelos de von Frey, que varían de 2 a 300 gramos, 5 veces y se obtiene una puntuación positiva cuando se observan un mínimo de 3 movimientos de las patas (la respuesta refleja de retirada del animal), como se ha descrito anteriormente. El grupo de control sirvió como grupo de referencia.

Electromiografía (EMG): La inervación de los axones motores en los músculos se evalúa registrando las amplitudes y latencias máximas del CMAP evocadas de los músculos gastrocnemios en los grupos diabéticos y en los animales de control. Las amplitudes y latencias pico y pico del CMAP se registran y promedian en un lote de 20 respuestas. Las amplitudes promedio en cada grupo de diabetes se comparan con las del grupo de control. La MNCV se calcula como la distancia del electrodo de estimulación al electrodo de registro (mm) /latencia (ms). **Preparación de tejidos:** Después de 4, 6 u 8 semanas, los animales se sacrifican con una sobredosis de pentobarbital (100 mg/kg ip). Para cada rata, la piel plantar de la pata trasera se disecciona y se fija directamente por inmersión en paraformaldehído-peryodato de lisina (PLP) al 2 % durante 24 horas a 4 °C. La piel se procesa adicionalmente y se incluye en gelatina como se ha descrito anteriormente. Finalmente, la piel embebida se secciona a 40 µm con un micrótopo de congelación y se recoge en glicerol para el almacenamiento a largo plazo a -20 °C.

Se recoge el tejido pancreático de las ratas, se fija en una solución de formalina tamponada neutra al 10 % y se incluye en parafina. Posteriormente, estas muestras se tiñen con hematoxilina y eosina (H&E). Cada muestra se evalúa con un microscopio de campo claro y se escanea en portaobjetos digitales (serie Nanozoomer 2.0, Hamamatsu, Japón).

Inmunohistoquímica: El análisis inmunohistoquímico de las secciones de piel se realiza como se ha descrito anteriormente para semicuantificar la densidad de las fibras nerviosas sensoriales que inervan la piel y para evaluar la presencia de células endoteliales positivas para CD-31. Las secciones de piel se incuban durante 48 horas en un cóctel de BSA al 2 % que contiene el anticuerpo primario diluido Protein Gene Product 9.5 (PGP9.5, 1/10.000, anticonejo, Enzo Life Sciences, Nueva York, EE. UU.) o el anti-CD31+ (1/5000, anticonejo, Spring Bioscience, California, EE. UU.) a 4 °C. Posteriormente, las secciones de piel se incuban con el anticuerpo biotinilado secundario apropiado marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (1/200, Biotine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) durante 90 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se usa la reacción de 3,3'-diaminobencidina (DAB) para revelar los sitios de unión antigénica de los anticuerpos primarios. Posteriormente, las secciones se montan en portaobjetos y las secciones teñidas CD31+ se tiñen con tiónina al 0,05 % durante 4 minutos, lo que tiñe los queratinocitos de azul. Finalmente, todas las secciones de piel se deshidratan utilizando etanol absoluto (<0,01 % metanol), se transfieren a xileno y se cubren con Permount (Fisher Scientific, Hampton, NH).

Cada sección de piel se escanea en 3 capas de 8 µm cada una mediante la serie Nanozoomer 2.0 (serie Nanozoomer 2.0, Hamamatsu, Japón). Se cuantifican cuatro secciones de piel proximales y cuatro distales de la planta de la pata trasera para determinar las fibras nerviosas epidérmicas en la parte central de la planta de la pata trasera (80.000 µm²) utilizando un objetivo 40x en el software ImageScope (Aperio ImageScope v11.12.760). Se calculan para cada rata el promedio de fibras nerviosas marcadas por mm² y el grosor epidérmico promedio. El porcentaje de células positivas para CD31 se calcula mediante Leica Cell-D (Olympus, software de imágenes para microscopía de ciencias de la vida, EE. UU.) en 4 secciones de piel proximales y cuatro distales en toda la dermis superior de la planta de la pata trasera.

Ejemplo 5.12: Tratamiento y/o prevención de la fibrosis intestinal

La eficacia terapéutica de los compuestos de la presente invención se prueba usando modelos murinos o de rata tal como los describen Pham BT y col. (Physiol Rep. 2015;3(4):e12323. doi: 10.14814/phy2.12323).

Preparación de núcleos intestinales de ratas y ratones: Se utilizan ratas Wistar machos adultos que no han ayunado y ratones C57BL/6 (Harlan PBC, Zeist, Países Bajos). Las ratas y los ratones se alojan bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h en una habitación con temperatura y humedad controladas con comida (Harlan chow no 2018, Horst, Países Bajos) y agua a voluntad. Se permite que los animales se aclimaten durante al menos siete días antes del inicio del experimento.

Las ratas y los ratones se anestesian con isoflurano/O₂ (Nicholas Piramal, Londres, Reino Unido). El yeyuno de rata (a unos 25 cm de distancia del estómago y 15 cm de longitud) y el yeyuno de ratón (a unos 15 cm de distancia del estómago y 10 cm de longitud) se extirpan y se conservan en un tampón Krebs-Henseleit (KHB) enfriado con hielo suplementado con 25 mM de d-glucosa (Merck, Darmstadt, Alemania), NaHCO₃ 25 mM (Merck), HEPES 10 mM (MP Biomedicals, Aurora, OH), saturada con carbógeno (O₂ al 95 %/CO₂ al 5 %) y ajustada hasta un pH de 7,4. El yeyuno se limpia haciendo pasar el KHB a través del lumen y, posteriormente, se divide en segmentos de 2 cm. Estos segmentos se rellenan con una solución de agarosa al 3 % (p/v) en NaCl al 0,9 % a 37 °C y se incluyen en una unidad de inclusión de núcleo de agarosa.

Preparación de los núcleos intestinales humanos: El tejido sano del yeyuno humano se obtiene para la investigación del intestino extirpado de pacientes que se sometieron a una pancreatoduodenectomía.

El yeyuno sano se conserva en KHB enfriado con hielo hasta el procedimiento de incrustación. La submucosa, la muscularis y la serosa se retiran cuidadosamente de la mucosa dentro de una hora después de la recolección del tejido. La mucosa se divide en láminas de 0,4 cm × 1 cm. Estas láminas se incluyen en una solución de agarosa al 3 % (p/v) en NaCl al 0,9 % a 37 °C y se insertan en la unidad de inclusión.

Preparación del PCIS: El PCIS se prepara en KHB enfriado con hielo mediante la cortadora de tejidos Krumdieck (Alabama Research and Development). Las secciones con un peso húmedo de 3-4 mg tenían un grosor estimado de 300-400 µm. Las secciones se almacenan en KHB enfriado con hielo hasta el inicio de los experimentos.

Incubación de secciones intestinales: Las secciones se incuban en placas de 12 pocillos para el PCIS humano (hPCI) y el PCIS de rata (rPCI) o en placas de 24 pocillos para el PCIS de ratón (mPCI). Los hPCI y los rPCI se incuban individualmente en 1,3 ml y los mPCI en 0,5 ml del medio Williams Medium E con L-glutamina (Invitrogen, Paisly, Reino Unido) suplementado con glucosa 25 mM, 50 µg/ml de gentamicina (Invitrogen) y 2,5 µg/ml de anfotericina B (Invitrogen). Durante la incubación (a 37 °C y O₂ al 80 %/ CO₂ al 5 %) en una incubadora (MCO-18M, Sanyo), las placas se agitan horizontalmente a 90 rpm (amplitud 2 cm). Los rPCI se incuban hasta 24 h, los mPCI y los hPCI se incuban hasta 72 h, con y sin TGF-β1 humano (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en un rango de concentración de 1 a 10 ng/ml. Todas las incubaciones se realizan de forma múltiple (usando de 3 a 6 secciones incubadas individualmente en pocillos separados) y en réplicas de 3 a 16 intestinos de seres humanos, ratas o ratones diferentes.

Viabilidad y morfología: La viabilidad se evalúa midiendo el contenido de trifosfato de adenosina (ATP) del PCIS. En resumen, después de la incubación, las secciones se transfieren a 1 ml de solución de sonicación (que contiene etanol al 70 % y EDTA 2 mM), se congelan instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenan a -80 °C. Para determinar la viabilidad, se miden los niveles de ATP en el sobrenadante de muestras sonicadas durante 45 segundos y centrifugadas durante 2 minutos a 4 °C a 16.000 × g, utilizando el kit de bioluminiscencia de ATP (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Los valores de ATP (pmol) se normalizan con respecto al contenido total de proteína (µg) del PCIS estimado mediante el método de Lowry (Bio-rad RC DC Protein Assay, Bio Rad, Veenendaal, Países Bajos). Para evaluar la morfología, las secciones incubadas se fijan en formalina al 4 % y se incluyen en parafina. Se cortan secciones de 4 µm y se tiñen con hematoxilina y eosina (HE). Las secciones de EH se puntúan según una puntuación de Park modificada, que describe la secuencia de desarrollo de la lesión tisular en el intestino después de la isquemia y la reinfusión. La integridad de siete segmentos del PCIS se puntúa en una escala de 0 a 3. La viabilidad del epitelio, el estroma, las criptas y la capa muscular se puntúa por separado con una puntuación de 0 si no hay necrosis y de 3 si hay necrosis masiva. Las otras partes de la sección intestinal se clasifican de la siguiente manera: Forma del epitelio: 0 = epitelio cúbico, 3 = más de 2/3 de las células son planas, aplanamiento de las vellosidades: 0 = normal, 3 = más de 2/3 de las vellosidades están aplanadas, y la cantidad de edema: 0 = sin edema, 3 = edema grave. Una puntuación máxima de 21 indica un daño grave. En muestras humanas, la puntuación morfológica de la muscularis mucosae se determina en la sección "capa muscular". B.T.P., W.T.v.H. y J.N. realizaron la puntuación a ciegas; se calcula la media de las tres puntuaciones totales.

Expresión génica: La expresión de los genes de la fibrosis, a saber, COL1A1, αSMA, HSP47, CTGF, FN2, TGF-β1, PAI-1 y SYN, se determinó mediante el método Taqman o SybrGreen. En los hPCI, la expresión del gen ELA también se midió mediante el método SYBRgreen.

La fibrosis intestinal es un resultado grave, aunque frecuente, en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII). A pesar de los avances en el desarrollo de nuevas modalidades de tratamiento para controlar la inflamación intestinal crónica característica de la EII, hasta la fecha no existen terapias antifibróticas eficaces. Por lo tanto, una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares que subyacen a la fibrosis intestinal y la disponibilidad de modelos animales relevantes son fundamentales para avanzar en esta área de investigación.

IL-17 y mediadores asociados: Las células Th17 definen un subconjunto de células T auxiliares que producen principalmente IL-17A, pero también IL-17F, IL-21 e IL-22, y cada vez se reconoce más que son fundamentales en varios trastornos inflamatorios crónicos, incluida la EII (7). La IL-17A está asociada con la fibrosis en múltiples órganos, incluidos los pulmones (8), el hígado (9) y el corazón (10); estudios recientes también respaldan su papel en el intestino, al vincular las respuestas inmunitarias de la IL-17/Th17 y otros mediadores asociados en la patogénesis de la fibrosis intestinal.

Otros modelos animales de fibrosis intestinal se describen a continuación:

Tabla 52:

CATEGORÍA	MODELO	MODOS DE ADMINISTRACIÓN/RESULTADO
Inducido químicamente	DSS	Cuando se administra en agua potable, provoca daño epitelial y permeabilización de la mucosa del colon con la consiguiente inflamación aguda; el ciclo del DSS provoca inflamación crónica y la consiguiente fibrosis
	TNBS	La administración de TNBS/etanol por enema colónico daña la barrera epitelial y provoca una inflamación transmural dependiente de las células T; la administración a largo plazo produce fibrosis colónica
Microbiano	PG-PS	La inyección directa en la pared cecal o del intestino delgado induce una enterocolitis granulomatosa con fibrosis significativa
	Inyección fecal	La inyección de suspensión fecal directamente en la pared intestinal del colon provoca colitis agresiva y fibrosis transmural
	Infección crónica por salmonella	La administración oral después del tratamiento previo con estreptomicina provoca inflamación transmural y de la mucosa del colon con fibrosis significativa.

CATEGORÍA	MODELO	MODO DE ADMINISTRACIÓN/RESULTADO
5	Infección por AIEC	La administración por sonda nasogástrica del aislado de CD humano de AIEC, NRG857, después del tratamiento previo con estreptomycinina provoca ileocólica y fibrosis mediada por Th1 y Th17.
10	TGFβ1-Tg TβRIIΔk-fib-Tg	La administración de enemas de estos vectores adenovirales que sobreexpresan el TGFβ en el colon provoca inflamación aguda y crónica, deposición de ECM y engrosamiento de las capas musculares.
15	MCP-1-Tg	La inyección intramural del vector adenoviral que porta la MCP-1 en el recto provoca inflamación transmural, depósito de colágeno y fibrosis
20	Deficiencia de IL-10	La delección genética de la IL-10 produce lesiones inflamatorias transmurales del colon, abscesos en las criptas y engrosamiento de la pared intestinal; evidencia de una mayor susceptibilidad a desarrollar fibrosis posquirúrgica en el intestino delgado después de la resección ileocecal
	Mediado por el sistema inmunitario	Transferencia de células T
	Espontáneo	Cepa de ratón SAMP1/YITFC
		Desarrolla ileítis terminal espontánea y fibrosis posterior

Ejemplo 5.13: Tratamiento y/o prevención de la fibrosis ovárica

La eficacia terapéutica de los compuestos de la presente invención se prueba usando el modelo murino del síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS) descrito por Pala S y col. (Drug Des Devel Ther. 2015;9: 1761-1766. Publicado el 24 de marzo de 2015. doi: 10.2147/DDDT.S75266) para examinar los efectos de los compuestos probados sobre la histopatología ovárica, los niveles de VEGF en suero y endotelina 1 en el síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS) en un entorno experimental.

Animales: Se utilizan ratas albinas Wistar hembras de 22 días de edad y se dividen aleatoriamente en grupos. Se administran 10 UI de hormona foliculoestimulante por vía subcutánea en 15 ratas durante 4 días consecutivos, con inducción del síndrome de hiperestimulación ovárica el día 5 con 30 UI de gonadotropina coriónica humana. El grupo 1 comprende ratas de control de 35 días de edad, el grupo 2 comprende ratas con OHSS de 35 días de edad, el grupo 3 comprende ratas con OHSS de 27 días de edad que recibieron los compuestos probados durante 7 días. A continuación, todas las ratas se decapitan el día 35. Se evalúan el VEGF en suero, la endotelina 1 y la reserva folicular ovárica en todas las ratas.

Las mediciones del hematocrito y el peso se realizan el día 13 y la decapitación se realiza el día 35 bajo anestesia general mediante la administración intraperitoneal de ketamina (75 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg).

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas: Se obtuvieron aproximadamente 3 ml de muestra de sangre de cada rata decapitada. Los sueros se separan mediante centrifugación de muestras de sangre a 2500 rpm durante 4 minutos y se mantienen a -20 °C hasta los ensayos de VEGF y endotelina 1. El VEGF se analiza usando un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de VEGF de ratón (ELM-VEGF-001; RayBio, EE. UU.) y la endotelina se mide usando un kit E/Kit de endotelina 1 (EK-023-01; Phoenix Pharmaceuticals, EE. UU.).

Morfología ovárica: Después de la laparotomía, se extirpan los ovarios y se limpian retirando el tejido adherido en el medio de cultivo y se pesan. El tejido ovárico se fija con formaldehído al 10 % y, a continuación, las muestras de tejido incluidas en parafina se cortan en secciones transversales de 4 μm para estimar el recuento medio de folículos ováricos. Las secciones se tiñen con el tricromo de Masson para determinar la OFR con microscopía óptica (Olympus BX-50). Las secciones transversales de 4 μm de grosor se montan a intervalos de 50 μm en portaobjetos de microscopio para evitar el recuento de la misma estructura dos veces, según un método descrito anteriormente. Los 12 folículos se clasifican en primordiales, primarios, secundarios y terciarios. Un folículo atrético (FA) se define como un folículo que presenta más de diez núcleos picnóticos; para los folículos más pequeños, los criterios de atresia son un ovocito degenerado, una formación precoz de antros o ambos.

Principales medidas de resultado: Las principales medidas de resultado son la edad (días), el peso (g), el hematocrito (%), el peso de los ovarios (mg), los niveles en suero de VEGF (pg/ml) y endotelina 1 (ng/ml) y el recuento total de folículos con la determinación del número de folículos primordiales, primarios, secundarios y terciarios.

Ejemplo 5.14: Tratamiento y/o prevención del síndrome de ovario poliquístico (SOP)

La eficacia terapéutica de los compuestos de la presente invención se prueba usando un modelo animal de hiperfibrosis ovárica inducida por DHEA tal como lo describen Wang D y col. (J Ovarian Res. 2018;11 (1):6. Publicado el 10 de enero de 2018. doi:10.1186/s13048-017-0375-7).

5 El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es un trastorno metabólico y endocrino frecuente cuyos mecanismos patológicos siguen sin estar claros. El siguiente estudio investiga la formación de hiperfibrosis ovárica a través de la vía de señalización del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) en un modelo de rata con síndrome de ovario poliquístico (SOP) inducido por la dehidroepiandrosterona (DHEA).

10 Animales: Para este ensayo se utilizan treinta ratas Sprague-Dawley (SD) hembras, de 21 días de edad y con un peso de ~50 g. Los animales se alojan en un entorno libre de patógenos específicos (SPF) con una temperatura de 22 ± 1 °C, una humedad relativa del 50 ± 1 % y un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h. Se proporciona acceso libre a alimentos y agua.

15 Métodos: Treinta ratas Sprague-Dawley hembras se dividen aleatoriamente en el grupo en blanco (n = 6), el grupo aceite (n = 6) y el grupo modelo aceite + inducido con DHEA (n = 6 + 12). Los grupos modelo se establecen mediante inyección subcutánea de DHEA durante 35 días consecutivos. Las ratas se dividen adicionalmente en el grupo de vehículo (n = 6) y el grupo tratado (n = 6). El tratamiento se administra una vez al día y durará 35 días. Dieciocho días después del tratamiento, se recogen diariamente frotis vaginales de todas las ratas evaluando los tipos de células durante 14 días, para determinar sus ciclos estrales diarios. El día 36, todas las ratas de los grupos en blanco y tratados con aceite y seis ratas de los grupos modelo inducidos con DHEA se sacrifican (mediante una inyección intraperitoneal de un exceso de hidrato de cloral al 5 %), se extrae sangre (de la vena cava superior) y se diseccionan los ovarios y los úteros bilaterales.

20 Los ovarios se fijan en paraformaldehído al 4 % durante 24 h a 4 °C y, a continuación, se incluyen en parafina. El resto de los tejidos se congelan a -80 °C para el posterior análisis por transferencia Western y por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real.

25 Las 12 ratas restantes de los grupos modelo inducidos con DHEA se distribuyen aleatoriamente en dos grupos adicionales: grupo tratado y grupo de tratamiento con vehículo (grupo de control), seis ratas por grupo. Durante este tratamiento, ya no se administra DHEA a las ratas. El tratamiento dura 2 semanas, después de las cuales se sacrifica a todos los animales, se extrae sangre y se diseccionan los ovarios y úteros bilaterales siguiendo las instrucciones mencionadas anteriormente.

30 La morfología ovárica, la localización y expresión de fibrina y colágeno en los ovarios se detectan mediante tinción H&E, análisis inmunohistoquímico y tinción con rojo de Sirio. La proteína ovárica y el ARN se examinan mediante transferencia Western y RT-PCR.

35 Ciclo estral: El día 18 después del tratamiento con DHEA, se recogen frotis vaginales de todas las ratas. A continuación, las muestras se tratan con azul de toluidina durante 30 min y, en consecuencia, la morfología celular y los ciclos estrales se examinan bajo el microscopio óptico (Leica Microsystems, Alemania).

40 Niveles de hormonas en suero: Se toman muestras de sangre de la vena cava superior. El suero se separa inmediatamente y se almacena a -20 °C para la posterior determinación hormonal mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (testosterona [T], estradiol [E2], hormona luteinizante [LH], hormona foliculoestimulante [FSH]) (kits de ELISA T, E2, LH y FSH de rata, USCN, Wuhan, China).

45 Ejemplo 5.15: Tratamiento y/o prevención de la colangitis biliar primaria (CBP)

La eficacia terapéutica de los compuestos de la presente invención se evalúa usando el modelo murino de PBC descrito por Hohenester S y col. (Cells. 2020, 9(2), 281. doi: 10.3390/cells9020281).

50 Las enfermedades hepáticas colestásicas, tales como la colangitis biliar primaria (CBP) o la colangitis esclerosante primaria (CEP), son trastornos crónicos progresivos que frecuentemente provocan cirrosis hepática, con sus consiguientes complicaciones. Se considera que las sales biliares hidrófobas promueven la fibrosis hepática en la colestasis. Sin embargo, la evidencia de esta hipótesis ampliamente aceptada sigue siendo escasa.

55 En modelos animales establecidos de colestasis, p. ej., por inactivación de Mdr2, la colestasis y la fibrosis son secundarias al daño biliar.

60 Por lo tanto, para probar la contribución específica de la acumulación de sales biliares a la fibrosis hepática en la enfermedad colestática, se utiliza el modelo único de colestasis hepatocelular inducible en ratones Atp8b1G308V/G308V alimentados con colato. El glicocenosodisoxicolato (GCDCA) se suplementa para humanizar la reserva de sales biliares murinas, como se confirma mediante HPLC. Se cuantifican los biomarcadores de la colestasis y la fibrosis hepática. Las células estrelladas hepáticas (HSC) aisladas de ratones silvestres se estimulan con sales biliares. Se determinan la proliferación, la acumulación celular y el depósito de colágeno de las HSC. En ratones colestáticos ATP8B1G308v/G308v, el aumento de la expresión hepática de ARNm de α SMA y colágeno 1a y el exceso de depósito de colágeno hepático indican el desarrollo de fibrosis hepática solo tras la suplementación con GCDCA. In vitro, el número de miofibroblastos y el depósito de colágeno aumentan después de la incubación con sales biliares

hidrófobas pero no hidrófilas y se asocian con la activación del EGFR y la MEK1/2. Las sales biliares pueden tener efectos profibróticos directos sobre las HSC, lo que supuestamente implica la señalización del EGFR y la MEK1/2.

Experimentos con animales: Los machos se utilizan para estudios in vivo a las 8 semanas de edad. Los animales se mantienen en un ciclo de luz y oscuridad de 12 h y se alojan en un ambiente enriquecido y con acceso a voluntad a la dieta y al agua.

Mediciones de bioquímica en suero y sales biliares en sueros: los niveles en suero de fosfatasa alcalina, bilirrubina y alanina aminotransferasa se cuantifican a partir de suero fresco en un analizador totalmente automatizado resposn® 910 (DiaSys, Holzheim, Alemania). Los niveles en suero totales de sales biliares se cuantifican enzimáticamente utilizando un kit de sales biliares totales Diazyme (Diazyme Laboratories, Poway, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante.

Histología hepática, análisis inmunohistoquímico y cuantificación de hidroxiprolina Los bloques de parafina se cortan en secciones de 4 µm de grosor y se montan en portaobjetos de microscopio (Superfrost plus, Thermo Scientific/Menzel, Braunschweig, Alemania). Después de la desparafinización y rehidratación escalonadas, los portaobjetos se tiñen con hematoxilina y eosina según los procedimientos estándar. El análisis inmunohistoquímico se realiza contra la alfa-SMA, utilizando un anticuerpo monoclonal de conejo contra la actina del músculo liso alfa (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Para la cuantificación del colágeno, los portaobjetos se tiñen durante 1 h con Direct Red 80 (Sirius Red, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) y se decoloran dos veces en etanol y una vez en xilol. Para cuantificar el ADN total como sustituto del número de células, las HSC se incuban con PicoGreen® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) y las señales de fluorescencia se detectan con un sistema CytoFluor 4000 (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, EE. UU.). La proliferación de las HSC se cuantifica utilizando un kit de ensayo BrdU (Roche, Penzberg, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Para cuantificar el recuento total de células, las HSC, sembradas en portaobjetos de cámara Lab-Tek II (Nunc, Rochester, NY, EE. UU.), se montan en portaobjetos de cubierta con el medio de montaje Vectashield, que incluye DAPI (Vector, Burlingame, CA, EE. UU.). Los portaobjetos se escanean con un escáner Pannoramic Midi Slide (3Dhistech, Budapest, Hungría) y el recuento de núcleos se realiza con el software ImageJ2 en el portaobjetos completo (0,7 cm²).

Cuantificación del colágeno in vitro Las células se lavan con PBS y se tiñen durante 1 h con rojo de Sirio al 0,1 % en ácido pícrico saturado. A continuación, las células se lavan tres veces con etanol al 100 %, el tinte unido se disuelve en metanol al 50 %/hidróxido de sodio (50 mmol/l) y la absorción se mide a 540 nm.

Ejemplo 5.16: Tratamiento y/o prevención de la fibrosis o cirrosis hepática (HF)

La eficacia terapéutica de los compuestos según la presente invención para inhibir la inflamación hepática crónica y espontánea y la fibrosis se evalúa usando modelos murinos establecidos NOD-fibrosis por inflamación (N-IF), tal como los describen Fransén Pettersson y col. (PLoS One. 2018; 13(9): e0203228. doi: 10.1371/journal.pone.0203228).

Animales: Los ratones N-IF desarrollan espontáneamente inflamación crónica y fibrosis hepática impulsadas por las células T asesinas naturales (NKT)-II transgénicas del receptor de células T (TCR) generadas en ratones NOD.Rag2^{-/-} inmunodeficientes. Varios componentes de la patología hepática en el ratón N-IF se superponen con los de las afecciones humanas en las que una inflamación crónica progresiva precede al desarrollo de la fibrosis. Además, se ha demostrado que la fibrosis que se desarrolla en el hígado de ratones N-IF está asociada con una acumulación de células estrelladas hepáticas que expresan α-SMA. Estas similitudes fenotípicas hacen que el modelo murino N-IF sea único en comparación con otros modelos de roedores disponibles para la fibrosis hepática y proporciona una herramienta novedosa para probar la eficacia de los candidatos a fármacos antifibróticos.

Los animales se observan diariamente para detectar signos de mala salud, se recoge la orina y se mide la proteína en la orina. Los pesos del hígado y los riñones se registran en el momento de la disección. Se diseccionan el hígado y el riñón de cada animal, se fijan, se seccionan y se tiñen con Sirius Red y H&E. Se usa una porción de cada hígado para medir la hidroxiprolina.

Medición de hidroxiprolina: El contenido de hidroxiprolina del hígado y el bazo se determina usando el kit de ensayo colorimétrico de hidroxiprolina (BioVision, Milpitas, CA, EE. UU.).

Histología: Tras el tratamiento, los ratones se anestesian y se perfunden con PBS mediante punción intracardiaca. Se pesan los hígados y los bazos y las biopsias de los órganos se fijan en formalina tamponada neutra al 4 %, se incluyen en parafina y se seccionan.

Ejemplo 5.17: Tratamiento y/o prevención de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH)

La eficacia terapéutica de los compuestos según la presente invención se evalúa usando el modelo murino de NASH tal como lo describen Barbara Ulmasov B. y col. (Hepatology Communications, 2018, 3 (2) - <https://doi.org/10.1002/hep4.1298>).

Ratones: Los ratones macho C57BL/6J de 5 semanas de edad se alojan en instalaciones estándar en condiciones controladas de temperatura, humedad y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas/12 horas con acceso libre al agua.

Modelo de ratón de NASH con deficiencia de colina, definido por L-aminoácidos y alto contenido de grasas: La dieta deficiente en colina, definida por aminoácidos y alta en grasas (CDAHFD) 22 se obtiene de Research Diets (A06071309); Nuevo Brunswick, Nueva Jersey). Esta dieta está formulada como una dieta alta en grasas y deficiente en colina que incluye un 0,1 % de metionina y un 45 % de Kcal% de grasa (20 % de manteca de cerdo, 25 % de aceite de soja). La dieta de control es un alimento estándar para roedores que contiene un 13,6 % de calorías provenientes de grasas. A partir de las 6 semanas de edad, 30 ratones se someten a la CDAHFD y 30 ratones a la dieta estándar. Al final de las 6 semanas, 10 ratones de cada grupo dietético se dejan en ayunas durante 5 horas y se sacrifican. Se toman muestras de sangre e hígado. Los hígados se dividen en secciones que se fijan en formalina tamponada con fosfato al 10 %, se congelan en nitrógeno líquido o se colocan en una solución de estabilización del ARN para una evaluación futura. Los ratones restantes se mantienen en las dietas durante 4 semanas más durante un total de 10 semanas y, a continuación, se dejan en ayunas, se sacrifican y se recolectan muestras.

Análisis bioquímico: El contenido de triglicéridos hepáticos se midió usando el kit de ensayo colorimétrico de triglicéridos (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) según las instrucciones del fabricante. Los niveles plasmáticos de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), glucosa, insulina, triglicéridos y colesterol se midieron comercialmente en Advanced Veterinary Laboratory (Saint Louis, MO).

RT-PCR: La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa en tiempo real se realiza para calcular los cambios en la abundancia de ARNm.

Histopatología: Las secciones hepáticas fijadas con formalina se incluyen en parafina, se seccionan a 5 µm y se tiñen con hematoxilina y eosina (H&E) utilizando un protocolo estándar para la evaluación microscópica. Para evaluar el contenido de colágeno del hígado, las secciones del hígado incluidas en parafina se tiñen con tintes rojo sirio/verde intenso. El rojo sirio se une a todos los tipos de colágeno, mientras que el verde rápido tiñe las proteínas no colagenosas.

Las secciones de hígado se tratan previamente para eliminar la parafina y los núcleos se tiñen con la solución de hematoxilina de hierro de Weigert. Después del lavado, los tejidos se tiñen con rojo sirio al 0,1 % (Direct Red 80; Sigma, Saint Louis, MO), certificado FCF de color verde rápido al 0,1 % (Sigma) en ácido pícrico saturado durante 2 horas. A continuación, los portaobjetos se lavan en agua, se deshidratan con etanol y xileno y, finalmente, se montan en Permaslip (Alban Scientific, Inc., Saint Louis, MO). El grado de acumulación de colágeno se evalúa mediante análisis morfométrico.

Determinación del contenido de hidroxiprolina hepática: El contenido de hidroxiprolina se determina como una medida de la cantidad de colágeno total presente en el hígado. Los tejidos del hígado se homogeneizan en agua destilada, se precipitan con ácido tricloroacético y se hidrolizan durante 48 horas en HCl 12 N a 105 °C. Las muestras se evaporan y los gránulos secos se reconstituyen en agua destilada. Las muestras reconstituidas se centrifugan durante 10 minutos a 13.000 g y los sobrenadantes se diluyen con HCl 12 N para lograr una concentración de HCl 4 N en las muestras finales. El contenido de hidroxiprolina en el hígado se determina usando el ensayo de hidroxiprolina en tejidos sensibles.

Inmunohistoquímica: Los tejidos del hígado fijados con formalina se tratan previamente para eliminar la parafina mediante métodos estándar. La actividad de la peroxidasa endógena se bloquea mediante incubación en peróxido de hidrógeno al 3,3 % en metanol durante 1 hora a temperatura ambiente.

Detección de células apoptóticas en tejidos del hígado: Las células apoptóticas en los tejidos del hígado se identifican mediante el marcado y la detección de las roturas de las cadenas de ADN mediante el método de marcado de extremos cortados con trifosfato de desoxiuridina mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) utilizando el kit de detección de peroxidasa ApopTag (Millipore, Temecula, CA). Se cuentan las células apoptóticas teñidas con morfología de hepatocitos. Para detectar células apoptóticas con morfología de HSC, los tejidos del hígado teñidos con TUNEL se tiñen posteriormente con el anticuerpo contra la desmina (un marcador del HSC), excepto que la actividad secundaria de la peroxidasa del anticuerpo se detecta con el kit de sustrato de peroxidasa IMPact VIP (Vector Laboratories).

Transferencia Western: La transferencia Western se realiza como se describe usando los siguientes anticuerpos primarios: madres antifosforiladas contra el homólogo 3 decapentapléjico (p-Smad3), ab52903, 1: 1000 (Abeam); antigliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (anti-GAPDH), sc-25778 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX).

Ejemplo 5.18: Tratamiento y/o prevención de la nefropatía diabética o la enfermedad renal diabética (DN o DKD)

La eficacia terapéutica de los compuestos según la presente invención se investiga in vivo utilizando un modelo murino con diabetes tipo I (diabetes inducida con STZ).

Modelo animal: Los ratones 129/SV machos de 10 semanas de edad (Charles River, Alemania) se mantienen en jaulas ventiladas individualmente, recibiendo una dieta estándar con acceso libre al agua del grifo. Los ratones 129/SV del mismo peso reciben 125 mg/kg de peso corporal de STZ (Sigma-Aldrich) en citrato de sodio 50 mM (pH 4,5) o tampón de citrato de sodio (grupo de control no diabético) por vía intraperitoneal los días 1 y 4 para inducir la hiperglucemia (glucosa >15 mmol/l). Los ratones no reciben insulina durante el estudio.

A los ratones diabéticos se les administra placebo (solución salina) durante 12 semanas o los compuestos probados. El peso corporal y los niveles de glucosa se miden cada semana. La HbA1c (Olympus AU400) y la función renal (creatinina en suero) se miden a las 6 y 12 semanas. La albuminuria se evalúa usando un kit ELISA de albúmina de ratón. Los estudios de velocidad de conducción nerviosa sensorial (NCV, por sus siglas en inglés) se realizan en ratones anestesiados con isoflurano al 2 % en las semanas 6 y 12. La NCV sensorial de la cola se determina estimulando proximalmente a lo largo de la cola a una distancia registrada de 3 cm. Para la medición, se utiliza un neurocribado de Toennies Inc. Después de 12 semanas de seguimiento, los ratones se sacrifican y se realizan toracotomías y laparotomías bilaterales, y los riñones se perfunden con solución salina enfriada con hielo a través del ventrículo cardíaco izquierdo.

Inmunohistoquímica: Para la inmunofluorescencia, se procesan secciones de tejido fijadas con paraformaldehído e incluidas en parafina (2 µm). Después del bloqueo con suero de conejo al 10 %, las secciones de parafina se tiñen con anticuerpos contra pP38 y F4/80 y con un anticuerpo secundario conjugado con Cy3.

Ejemplo 5.19: Tratamiento y/o prevención de la nefropatía diabética, la enfermedad renal diabética y la retinopatía diabética en el modelo diabético inducido por ITS.

Para el estudio se utilizaron un total de 70 ratones CD-1 hembras de 5 a 7 semanas de edad con un peso aproximado de 25 a 30 g. Estos ratones se adquirieron en Charles River, Reino Unido y tuvieron un período de aclimatación de 7 días. Los animales se alojaron en jaulas IVC (hasta 5 por jaula) y los ratones individuales se identificaron por la marca en la cola. A todos los animales se les permitió el libre acceso a una dieta comercial certificada estándar y a agua desinfectada durante el estudio. El sitio de alojamiento se mantuvo en condiciones estándar: 18-24 °C, 55-70 % de humedad y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas.

Todos los protocolos utilizados en este estudio han sido aprobados por el Comité de Revisión Ética y Bienestar Animal, y todos los procedimientos se llevaron a cabo según las directrices de la Ley de Procedimientos Científicos Animales de 1986.

A los ratones (excepto al grupo de control negativo) se les inyectó STZ (55 mg/kg; IP) diariamente durante 5 días consecutivos. Los ratones estuvieron sin comer durante 6 horas antes de la inyección. Una semana después de completar la inducción, se monitorizaron los niveles de glucosa y los ratones con niveles más bajos que 15 mmol/l (280 mg/dl) se retiraron del estudio porque no habían desarrollado la gravedad ideal de la diabetes. Los niveles de glucosa se monitorizaron semanalmente y 5 semanas después de la inducción del STZ, se realizó una evaluación bioquímica de la lesión renal midiendo los niveles de albúmina y creatinina en la orina y confirmando que estaban dentro del rango deseado. Después de completar con éxito esta etapa, los animales se asignaron a los grupos de tratamiento.

Tabla 53:

Grupo	n.º de animales	Agente	Nivel de dosis; Ruta
1	3	Control negativo (no inducido)	Vehículo; I.V.
2	3	Control negativo (inducido)	Vehículo; I.V.
33	8	Ia-001a	15 mg/kg; I.V.
4	8	Ia-001a-TZ	15 mg/kg; I.V.
5	8	Ic-001a-Tz/1-004a	15 mg/kg; I.V.
6	8	Ic-007a	15 mg/kg; I.V.
7	8	Ib-010a	15 mg/kg; I.V.
8	8	IIIc-061a	15 mg/kg; I.V.
9	8	IVc-059a	15 mg/kg; I.V.
10	8	Captopril	50 mg/kg; PO

El tratamiento continuó durante 4 semanas (28 días) con una medición semanal de la glucosa en sangre y de la albúmina/creatinina en la orina. El programa del estudio se detalla a continuación e incluye niveles de glucosa en sangre semanales (semanas 5 a 9), relación entre albúmina-creatinina en la orina y química sanguínea (semana 9) y citocinas terminales, histología renal y pérdida de retina ocular.

Tabla 54:

Tiempo (semanas)	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Sacrificio al final de la semana 9
5	STZ	Diariamente durante 5 días	---	---	---	---	---	---	---	---
10	Pruebas		Glucosa en sangre	Glucosa en sangre		Glucosa en sangre ALB/CREA en orina	Glucosa en sangre ALB/CREA en orina	Glucosa en sangre ALB/CREA en orina	Glucosa en sangre ALB/CREA en orina	Glucosa en sangre ALB/CREA en orina
15	Compuesto	---	---	---	---	Dosis intravenosa, diaria	Dosis intravenosa, diaria	Dosis intravenosa, diaria	Dosis intravenosa, diaria	---
20	Órgano									Sangre (plasma) Riñones Ojos

Resultados

Signos clínicos: Se observó una caída inicial del peso corporal en muchos grupos de tratamiento, lo que era de esperar y, en la mayoría de los casos, el peso corporal se recuperó gradualmente hacia el final del período de dosificación. El peso corporal de algunos animales cayó por debajo del 90 % del peso corporal inicial, sin embargo, no fue necesario suspender la dosificación de ningún animal.

Glucosa en sangre: La inducción con STZ dio como resultado un aumento significativo de la glucosa en sangre en comparación con los controles con vehículo no inducidos (tabla 55). El tratamiento intravenoso con IVc-059a dio como resultado una reducción significativa** de los niveles de glucosa en sangre en comparación con los controles con vehículo inducidos el día 28. El tratamiento con IIIc-061a IV también dio como resultado una reducción de los niveles de glucosa en sangre, pero esto no alcanzó significación estadística.

Tabla 55: Concentración media de glucosa en sangre el día 0 y el día 28 de ratones ICR-CD1 hembras en un modelo de diabetes inducida con STZ. Los valores mostrados son la media $\pm$ SD; n = 3 para grupos de vehículo inducidos y no inducidos; n = 8 para todos los demás grupos de tratamiento.

Grupo de tratamiento	Tratamiento	n	Concentración media del día 0 (mmol/l) (SD)	Concentración media del día 28 (mmol/L) (SD)	valor p comparado con el control de vehículo
1	Control negativo (no inducido)	3	6,7 (0,2)	8,9 (18)	n/a
2	Control negativo (inducido)	3	24,9 (1,8)	33,0 (-)	n/a
3	Ia-001a	8	25,7 (6,3)	31,6 (3,8)	0,7082
4	Ia-001a-TZ	8	24,9 (7,4)	30,8 (6,2)	0,5618
5	Ic-001a-Tz/1-004a	8	25,8 (5,7)	29,6 (7,8)	0,3745
6	Ic-007a	8	25,5 (5,7)	31,1 (4,6)	0,6241
7	Ib-010a	8	25,1 (6,1)	31,1 (3,4)	0,6110
8	IIIc-061a	8	24,8 (6,2)	26,3 (7,8)	0,0775
9	IVc-059a	8	24,3 (6,4)	23,7 (6,6)	0,0159
10	Captopril	8	23,7 (6,9)	32,2 (2,3)	0,8256

Peso de los riñones: No hubo diferencia estadística ni en el peso del riñón húmedo ni en el peso del riñón como porcentaje del peso corporal del animal.

Albumina urinaria: Creatinina (ALB: CRE): La orina se recolectó semanalmente y se agrupó para cada grupo de tratamiento. El tratamiento con Ib-010a, IIIc-061a e IVc-059a dio como resultado una reducción de ALB:CREA (tabla 56) el último día de tratamiento 28 antes del sacrificio (semana 9 del programa).

Nitrógeno ureico en sangre (BUN): El tratamiento con Ic-007, Ib-010a, IlIc-061a e IVc-059a dio como resultado niveles de nitrógeno ureico en sangre significativamente más bajos que los de los controles con vehículo inducidos.

ELISA: Al final del período de tratamiento, se recolectó sangre y se procesó para obtener suero. Los niveles en suero de PCR, TGF- β , IL-6 y TNF- α se cuantificaron utilizando kits de ELISA disponibles en el mercado; los resultados se muestran en la tabla 56.

PCR en suero: niveles en suero de PCR en ratones ICR-CD1 hembras en un modelo de diabetes inducida con STZ después de 28 días de tratamiento. Los niveles en suero de PCR aumentaron significativamente en los animales inducidos con STZ. El tratamiento con Ia-001a, Ia-001atz y el Captopril de control redujo significativamente los niveles de PCR en suero en comparación con los controles con vehículo inducidos (**p=0,0074, *p=0,0304 y **p=0,0026 respectivamente, ANOVA unidireccional, tabla 56).

TGF- β en suero: los niveles en suero de TGF- β se elevaron significativamente en los controles inducidos con STZ. El tratamiento con todos los compuestos excepto el Ic-007a y el IlIc-061a dio como resultado niveles de TGF- β significativamente más bajos que los de los controles con vehículo inducidos (p $\leq$ 0,05); ANOVA unidireccional, tabla 56).

Los niveles en suero de IL-6 se elevaron significativamente en los controles inducidos con STZ. El tratamiento con todos los compuestos excepto el IVc-059a y el compuesto de control Captopril dio como resultado niveles de IL-6 que fueron significativamente más bajos que los de los controles con vehículo inducidos (p $\leq$ 0,05); ANOVA unidireccional, tabla 56).

Los niveles en suero de TNF- α se elevaron significativamente en los controles inducidos con STZ. El tratamiento con Ia-001a, Ia-001aTz, Ic-001aTz/1-004a e IlIc-061a dio como resultado niveles de TNF- α significativamente más bajos que los de los controles con vehículo inducidos (p $\leq$ 0,05); ANOVA unidireccional, tabla 56).

Histología renal: La cuantificación del colágeno se realizó al final del período de dosificación. Los animales se sacrificaron y se resecaron los riñones. El tejido se fijó con formalina y se incluyó en cera de parafina y, a continuación, se tiñó con Trichrome de Masson según las instrucciones del fabricante. El colágeno se cuantificó mediante un método publicado por Chen y col., 2017. La cobertura de colágeno aumentó significativamente en los controles con vehículo inducidos con STZ en comparación con los controles con vehículo no inducidos. El tratamiento con IlIc-061a e IVc-059a dio como resultado una disminución significativa de los niveles de colágeno en comparación con los controles con vehículo inducidos (p = 0,0210 y p = 0,0134, respectivamente); ANOVA unidireccional, tabla 56).

Puntuación de la enfermedad: La puntuación de la enfermedad renal se cuantificó mediante la tinción H&E y la evaluación de la esclerosis mesangial y glomeruloesclerosis, la hialinosis arteriolar y el engrosamiento del GBM. Obviamente, la puntuación de la enfermedad aumentó significativamente en los controles con vehículo inducidos con STZ en comparación con los controles con vehículo no inducidos. El tratamiento con todos los compuestos excepto el Ic-001aTz/1-004a dio como resultado una disminución significativa de la puntuación de la enfermedad en comparación con los controles con vehículo inducidos (p $\leq$ 0,005); ANOVA unidireccional, tabla 56).

Histología de la retina ocular: al final del período de dosificación, inmediatamente antes del muestreo terminal, se inyectó FITC-dextrano a 4 animales por grupo para evaluar el montaje plano de la retina y se sacrificaron los animales y se resecaron los ojos. Se prepararon montajes planos de retina y se obtuvieron imágenes usando un microscopio fluorescente (EVOS, Thermo Fisher). El área cubierta por la vasculatura aumentó significativamente en los controles con vehículo inducidos con STZ en comparación con los controles con vehículo no inducidos. El tratamiento con Ic-007a, IlIc-061a e IVc-059a dio como resultado una reducción significativa de la cobertura vascular en comparación con los controles con vehículo inducidos (p=0,0432, p=0,0337 y p=0,0131, respectivamente); ANOVA unidireccional, tabla 56).

Tabla 56: Relación entre albúmina y creatinina (ALB:CRE) en orina, BUN en sangre, PCR en sangre, TGF-beta en sangre, IL-6 en sangre, TNF-alfa en sangre, tinción tricromática (fibrosis renal), puntuación de la enfermedad y zona de los ojos el día 28 de tratamiento (semana 9 del programa)

Grupo	Tratamiento 28 días	n	ALBÚMINA: CREATININA	BUN	PCR	TGF-beta	IL-6	TNF-alfa	Tinción tricromática	Puntuación de enfermedad	Zona de los ojos
1	Control negativo (no inducido)	3	1,45	15,8 $\pm$ 0,4	3558 $\pm$ 106	11,64 $\pm$ 0,81	70,56 $\pm$ 1,25	261,7 $\pm$ 21	0,48 $\pm$ 0,4	1 $\pm$ 0	6,7 $\pm$ 1,2
2	Control negativo (inducido)	3	37,04	28,6 $\pm$ 0,9	6759 $\pm$ 993	19,64 $\pm$ 1,97	151,4 de 15,59	389 $\pm$ 24	2,63 $\pm$ 0,5	11 $\pm$ 2	11,2 $\pm$ 1
3	Ia-001a	8	35,68	25,1 $\pm$ 3,1	4759 $\pm$ 181	15,54 $\pm$ 2,8	114,16 $\pm$ 29,96	342,3 $\pm$ 15,6	1,87 $\pm$ 0,65	7 $\pm$ 1	9,9 $\pm$ 1,9

	Grupo	Tratamiento 28 días	n	ALBÚMINA: CREATININA	BUN	PCR	TGF- beta	IL-6	TNF- alfa	Tinción tricomática	Puntuación de enfermedad	Zona de los ojos
5	4	Ia-001a-TZ	8	29,86	25,3 ± 3,1	5191 ± 993	14,76 ± 2,95	112,35 ± 20,01	327 ± 40,7	2,6 ± 0,98	8 ± 3	11,8 ± 1
	5	Ic-001a- Tz/1-004a	8	35,10	24,1 ± 4,1	607 ± 863	15,48 ± 1,73	104,66 ± 22,89	322,8 ± 40,1	2,48 ± 0,46	9 ± 1	10,7 ± 2,1
10	6	Ic-007a	8	38,10	21,7 ± 3,0	5707 ± 892	16,66 ± 2,11	109,27 ± 19,03	326,8 ± 63	2,23 ± 0,61	7 ± 1	9,1 ± 1,1
	7	Ib-010a	8	24,28	20,5 ± 3,4	5915 ± 1352	13,17 ± 3,11	102,72 ± 25,4	395,6 ± 46,7	1,97 ± 0,8	6 ± 1	11,8 ± 1
15	8	IIIc-061a	8	24,12	22,5 ± 4,1	5963 ± 849	17,35 ± 2,09	117,59 ± 29,21	324,6 ± 43,6	1,54 ± 0,55	8 ± 1	9,1 ± 1,1
	9	IVc-059a	8	18,85	22,5 ± 2,8	569,1 ± 1395	13,47 ± 3,33	120,88 ± 23,05	350,2 ± 41,4	1,48 ± 0,73	7 ± 1	8,7 ± 1,2
20	10	Captopril	8	24,40	28,5 ± 7,6	45,34 ± 821	14,55 ± 2,86	125,56 ± 15,75	415 ± 51,7	1,98 ± 0,47	6 ± 1	11,8 ± 1,4

Ejemplo 5.20: Tratamiento y/o prevención de la enfermedad renal poliquística (ERP)

La eficacia terapéutica de los compuestos según la presente invención se investiga in vivo usando el modelo de ratón Pcy descrito por Lee EC y col. (Nat Commun 10, 4148 (2019)).

Modelo preclínico: el ratón pcy, un modelo de ERP en roedores genéticamente relevante, estrechamente correlacionado con la enfermedad humana y para uso en la evaluación de la eficacia de nuevos agentes. Este modelo desarrolla la ERP asociada con el gen que causa la enfermedad humana, proporcionando un modelo de roedor trasladable, que refleja fielmente el desarrollo de la ERP en humanos. Se ha caracterizado minuciosamente por la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, lo que proporciona un alto nivel de confianza para los estudios de descubrimiento de fármacos.

Modelo animal: ratón pcy, cepa CD-1-*pcy*^{l^{usm}} (CrownBio) con una mutación genética asociada al mismo gen que causa la nefronoptosis tipo 3 en humanos. Los síntomas y la progresión de la enfermedad son una enfermedad quística renal de progresión lenta, con quistes que se forman en los túbulos colectores y otros segmentos de la nefrona se vuelven quísticos a medida que avanza la enfermedad. Los ratones macho y hembras se ven afectados de manera similar por la enfermedad. Los ratones tienen 5 semanas de edad y reciben una dieta normal, una dieta normal con el vehículo (control negativo), respectivamente el control positivo y los compuestos probados, todos mezclados con la dieta normal. Controles: el vehículo usado para los compuestos se usa como el control negativo en un grupo de animales y el tolvaptán, un antagonista del receptor 2 de la vasopresina (V2), se usa como un control positivo en un grupo de animales.

Lectura y criterios de valoración: El volumen de los quistes y la fibrosis renal, incluida la verificación histológica, el peso renal, el BUN en suero, la concentración del artículo de ensayo en la sangre, el peso corporal y la ingesta de alimentos, se registran semanalmente.

Ejemplo 5.21: Tratamiento y/o prevención de la fibrosis inducida por radiación (RIF, por sus siglas en inglés)

La eficacia terapéutica de los compuestos según la presente invención se investiga in vivo utilizando el modelo de ratón RIF descrito por Ryu SH y col. (Oncotarget. 2016, 7(13), 15554-15565, doi:10.18632/oncotarget.6952).

La fibrosis inducida por radiación (RIF) es una de las complicaciones tardías más frecuentes de la radioterapia. En la RIF, un modelo de ratón, se usa un ensayo de contractura de la pata para probar la eficacia in vivo de los compuestos.

La fibrosis inducida por radiación (RIF) se caracteriza por una acumulación excesiva de matriz extracelular en la piel y los tejidos blandos, y la proliferación de fibroblastos es una de las complicaciones tardías más frecuentes de la radioterapia. Además, la RIF es un proceso irreversible para el tejido fibroso muerto y un proceso dinámico relacionado con la remodelación del tejido cicatricial por parte de los miofibroblastos reactivados.

Modelo de ratón RIF: Se usan ratones BALB/c machos para el modelo de ratón RIF. Bajo anestesia, la extremidad posterior derecha de cada ratón recibe dosis de radiación de 44 Gy (22 Gy × 2 veces durante 2 semanas) utilizando un acelerador lineal. Se utiliza un blindaje especialmente diseñado para proteger el resto del cuerpo y se aplica un bolo de 1 cm de grosor sobre la piel para garantizar una dosis de radiación adecuada en la superficie de la pata trasera. Después de la irradiación, los ratones se dividen aleatoriamente en dos grupos. Cada grupo se tratará una vez al día con solución salina (grupo de control) o compuestos (grupo tratado). Los ratones que no recibieron irradiación ni fármaco se usaron como grupo de control negativo.

Para demostrar el efecto antifibrótico de los compuestos en la piel y los tejidos blandos de las piernas irradiadas, se mide el grosor epitelial desde la superficie de la epidermis hasta la base de la dermis mediante tinción H & E.

5 Ejemplo 5.22: Tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Stargards (SD, por sus siglas en inglés)

La eficacia terapéutica de los compuestos según la presente invención se investiga in vivo usando un modelo de ratón SD tal como lo describen Fang Y. y col. (Revista Faseb, 2020, DOI: 10.1096/fj.201901784RR). Animales: Los ratones Abca4^{-/-} pigmentados (129S4/SVJAE-Abca4^{tm1ght}) se adquirirán en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, EE. UU.). Los ratones pigmentados silvestres (WT) (129S2/SVPas) se obtienen en Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Francia). En cada grupo, la proporción entre machos y hembras es de 1:1. Los ratones se crían y se alojan en un ciclo de 12:12 h de luz (aproximadamente 50 lux en jaulas) y oscuridad con comida y agua a voluntad.

Iluminación de luz azul (BLI): los ratones Abca4^{-/-} y WT pigmentados de la misma edad (9 meses) se anestesian por vía intraperitoneal con narcosis de tres componentes que comprende 0,05 mg/kg de fentanilo, 5 mg/kg de midazolam y 0,5 mg/kg de medetomidina. Las pupilas se dilatan con una mezcla de tropicamida al 0,5 % y clorhidrato de fenilefrina al 2,5 %. Se aplica METHOCEL (Omni Vision, Puchheim, Alemania) para humedecer la córnea. Durante la iluminación con luz, se coloca una lámina de vidrio en la córnea del ojo expuesto. El ojo iluminado de cada ratón se expone a la luz azul (longitud de onda: 430 nm) a una intensidad de 50 mW/cm² durante 15 minutos. El ojo no iluminado, como control, se cubre cuidadosamente para protegerlo de la luz parásita.

Se realizan una serie de pruebas que incluyen la tomografía de coherencia óptica (TCO), la microscopía óptica y la microscopía electrónica de transmisión (MET), la cuantificación de los bisretinoides mediante HPLC y la electroretinografía de campo completo ERG antes y siete días después del BLI.

25 Ejemplo 5.23: Tratamiento y/o prevención de la vitreorretinopatía proliferativa (PVR, por sus siglas en inglés)

La eficacia terapéutica de los compuestos según la presente invención se investiga in vivo utilizando el modelo de ratón PVR descrito por Hou H y col. (Ophthalmic Res 2018;60: 195-204. doi: 10.1159/000488492) o de Márkus B. y col. (FEBS Open Bio. 2017;(78):1166-1177. Publicado el 29 de junio de 2017. doi: 10.1002/2211-5463.12252).

Muestras de animales: Se usa un modelo de ratón de PVR mediante la aplicación de una inyección intravítrea de una enzima proteolítica, la dispasa. Se sabe que este modelo induce la activación glial, así como la formación de membranas epirretinianas y subretinianas.

Las hembras silvestres de 4 a 6 meses de edad se anestesian con pentobarbital (90 mg·kg⁻¹, i.p.) y también reciben una gota de clorhidrato de procaína al 1 % (novocaína, EGIS, Budapest, Hungría) para anestesia local y una gota de tropicamida (Mydrum, Chauvin Aubeans, Montpellier, Francia) para la dilatación del iris. Se inyectan cuatro microlitros de dispasa (Sigma-Aldrich; 0,4 U·μl⁻¹, disueltos en solución salina fisiológica estéril) por vía intravítrea en el ojo derecho bajo control (Ctrl) estereomicroscópico con una pipeta automática. Los animales control reciben 4 μl de solución salina fisiológica estéril. Se toman imágenes de tomografía de coherencia óptica (TCO) Stratus; (Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA, EE. UU.) después de las inyecciones para confirmar la inducción de la PVR y controlar la progresión de la enfermedad. Los ratones control y los tratados con dispasa se sacrifican a los 14 días después de las inyecciones, cuando eran evidentes los signos de formación de la PVR: presencia de membrana epirretiniana y/o desprendimiento de retina en el examen TCO.

Preparación y purificación de muestras: Los cuerpos vítreos de los ratones se aíslan después de la extracción de la córnea junto con un túnel escleral utilizando una hoja de bisturí, seguida de la extracción del cristalino. Después de la solubilización del cuerpo vítreo con un tampón de lisis (pH de 8,5) que contiene urea 7 m, Tris 30 mm, tiourea 2 m y CHAPS al 4 %, los lisados se sonicen en un baño de agua helada durante 5 minutos y se centrifugan a 16 900 g durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se transfieren a tubos LoBind Eppendorf y se purifican mediante el kit de limpieza 2-D Ready-Prep (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.) según el protocolo del fabricante. En resumen, después de la precipitación y la centrifugación, los gránulos se secan y se resuspenden en 240 μl de tampón de rehidratación que contiene urea 7 m, tiourea 2 m, CHAPS al 4 % p/v, ditiotretitol (DTT) al 1 %, Bio-Lyte (Bio-Rad) al 2 % v/v y azul de bromofenol al 0,001 %, y se usan inmediatamente para el enfoque isoelectrico.

Electroforesis en gel 2D: Tres muestras vítreas procedentes de cada grupo se sometieron a 2-DE. Las primeras tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) con un IPG (24 cm, pH 4-7; Bio-Rad) se rehidrataron con proteínas vítreas extraídas mediante rehidratación pasiva a 20 °C durante la noche. A continuación se realiza el enfoque isoelectrico, aplicando 300 V durante 3 h, que se aumentan gradualmente hasta 3500 V en 5 h y, a continuación, se mantiene a 3500 V durante 18 h. Después del enfoque isoelectrico, las tiras de IPG se colocan inmediatamente a -70 °C hasta que se equilibran. Las tiras de IPG se equilibran durante 15 minutos en un tampón de equilibrio (500 mm de Tris/HCl, pH 8,5, urea 6 m, SDS al 2 %, glicerol al 20 %) que contiene un DTT al 0,6 % y durante 15 minutos en un tampón de equilibrio que contiene un yodoacetamida al 1,2 %. En la segunda dimensión, las tiras se colocan encima de geles de poli(acrilamida) al 12 % y se cubren con agarosa. Usando una célula Dodeca Protean Plus (Bio-Rad), la electroforesis se realiza a 100 mA por gel durante 24 h hasta que el tinte azul de bromofenol alcanza el fondo del gel. Los 12 geles se procesan juntos en las mismas condiciones. Las proteínas se tiñen usando el tinte fluorescente 25 de tris(disulfonato

de batofenantrolina) de rutenio II preparado de forma casera y las imágenes en gel se registran con el generador de imágenes moleculares Pharos FX Plus (Bio-Rad). En todos los casos se analizan tres réplicas biológicas, las muestras de los grupos Controles y los tratados con dispa se procesan juntas el mismo día.

5 Ejemplo 5.24: Tratamiento y/o prevención de la degeneración macular húmeda y seca relacionada con la edad (ARMD o AMD)

La eficacia terapéutica de los compuestos según la presente invención se investiga in vivo usando un modelo murino con AMD tal como lo describen Matsuda Y y col. (Mol Ther Nucleic Acids. 2019;17:819-828. doi:10.1016/j.omtn.2019.07.018).

Animales: los ratones hembra C57BL/6J se obtienen de Charles River Laboratories, Japón. Se obtienen ratas BN machos. Los conejos blancos de Nueva Zelanda (NZW) machos se obtienen de Kitayama Labes, Japón. Los ratones, ratas y conejos se mantienen en condiciones especiales libres de patógenos.

Ensayo EMT de células RPE: Las células RPE cultivadas a 37 °C se siembran a 1 x 10⁵ células/pocillo en placas de cultivo de microtitulación de 96 pocillos. Después de la incubación durante 24 h, las células se tratan con FGF2 (2 ng/ml) y TGF-02 (3 ng/ml) con y sin compuestos según la presente invención durante 3 días. Los niveles de expresión del ARNm de los biomarcadores de EMT α -SMA y colágeno tipo I se evalúan mediante la PCR cuantitativa en tiempo real.

Ensayo Matrigel Plug: Se mezclan 0,5 ml de solución Matrigel Matrix GFR (factor de crecimiento reducido)-PRF (sin rojo de fenol) (BD Biosciences) con 1 μ g de FGF2 y se implanta por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones hembra C57BL/6J (8 semanas, n = 3). Los compuestos según la presente invención se administran por vía intraperitoneal, y los tapones de Matrigel se retiran y se obtienen imágenes de los mismos el día 7 después de la implantación. La clasificación de la angiogénesis se determina por la concentración de hemoglobina en el tapón de Matrigel, utilizando el método de la cianmetahemoglobina según las instrucciones del fabricante. Los valores de densidad óptica a 540 nm (OD540) de las muestras se miden en un lector de microplacas y las concentraciones de hemoglobina se calculan según los estándares de hemoglobina (Sigma-Aldrich).

Modelos de CNV inducida por láser en ratones: La solución oftálmica Mydrin-P se instila en los ojos de los ratones macho C57BL/6J para dilatar las pupilas. A continuación, se realiza una irradiación láser (longitud de onda, 532 nm; tamaño del punto, 50 μ m; tiempo de irradiación, 0,1 s; salida de láser, 120 mW) en 6 sitios del ojo utilizando una lámpara de hendidura (SL-130) y un fotocoagulador láser multicolor (MC-300), evitando los grandes capilares retinianos. Inmediatamente después de la inducción de la CNV mediante irradiación láser, los compuestos probados según la invención y el control se administran mediante inyección intravítrea. Siete días después de la irradiación láser, se administra una solución de FITC-dextrano al 4 % en la vena de la cola a un volumen de 0,5 ml/animal. De uno a cinco minutos después de la administración de FITC-dextrano, los animales se sacrifican mediante dislocación cervical. Se extraen los globos oculares y se fijan en un tampón de fosfato de paraformaldehído al 4 % durante 12-24 h. Se preparan montajes planos coroides bajo un microscopio estereoscópico. Se toman fotografías de los sitios de la CNV con un microscopio confocal. A lo largo de los experimentos con animales con CNV inducida por láser, se confirma el éxito de la irradiación mediante la formación de burbujas de aire en el ojo de los modelos animales con cada irradiación.

Modelos de fibrosis subretiniana y CNV inducidas por láser en ratas: La misma técnica se empleará en el modelo de rata que utiliza ratas BN machos. Para el modelo CNV, los ajustes del láser son un tamaño de punto de 80 μ m y un tiempo de irradiación de 0,05 s a 120 mW en 8 sitios de la retina-coroides. Para el modelo CNV y fibrosis subretiniana, la potencia del láser utilizada es de 240 mW. Inmediatamente después de la irradiación láser, se realiza una inyección intravítrea con los compuestos de control y probados según la presente invención. Para los estudios de la CNV de fibrosis subretiniana, se usan (1) un vehículo salino y (2) los compuestos de la presente invención (15 μ g/ojo para una sola inyección o 2 o 3 inyecciones a intervalos de 2 semanas). Después de la irradiación láser, para los estudios de la CNV, se utiliza el protocolo FITC-dextrano anterior 14 días después de la irradiación láser, con la preparación de los ojos enucleados para la microscopía confocal de la coroides de montura plana. Para los estudios de fibrosis subretiniana, después de 6 semanas, se sacrifican los animales y los ojos enucleados se preparan para estudios histopatológicos para cuantificar la fibrosis subretiniana mediante microscopía óptica. Los ojos se incluyen en bloques de parafina y se seccionan y tiñen con tricromo de Masson según los métodos de rutina. La fibrosis la clasifican dos o tres investigadores independientes de manera ciega, según la siguiente escala: grado 0, ninguno; grado 1, mínimo; grado 2, leve; grado 3, moderado; grado 4, grave.

55 Ejemplo 5.25: Tratamiento y/o prevención del pterigión (PTE)

Se evalúa la eficacia terapéutica de los compuestos según la presente invención sobre la angiogénesis corioidea y el crecimiento del pterigión usando un modelo murino neovascular corioideo (CNV), un ensayo de angiogénesis in vivo directo (DIVAA) y un modelo murino de pterigión.

El pterigión es un crecimiento fibrovascular benigno de la superficie ocular asociado habitualmente a molestias y enrojecimiento ocular y, a medida que la enfermedad progresa, se relaciona frecuentemente con una disminución de la visión (astigmatismo topográfico) y una restricción de la motilidad ocular en los casos graves. En la patogénesis del pterigión se ven implicadas una amplia variedad de citocinas proinflamatorias inducidas por factores de crecimiento fibrogénicos, estrés oxidativo y metilación del ADN. Debido a la incidencia que tiene la exposición a

la luz ultravioleta (UV) sobre algunos de estos factores, la evidencia actual de múltiples fuentes sugiere que las personas con una alta exposición a la luz solar corren un mayor riesgo de padecer pterigión. A pesar de la extensa investigación, no hay una comprensión clara de la patogénesis del pterigión, pero uno de los factores más importantes que contribuyen a la patogénesis son los cambios neoplásicos de las células madre limbales asociados a la exposición a la luz ultravioleta y el posible papel del virus oncogénico (virus del papiloma humano).

Hasta la fecha, se han descrito tres modelos animales de pterigión, que utilizan la inyección de células de pterigión epiteliales humanas, matriz extracelular exógena o radiación UV dispersa en conejos y ratones. Los resultados del modelo de conejo que utiliza luz UV dispersa se centran en la predicción asistida por ordenador del tamaño y la forma del crecimiento del tejido, sin análisis histológico. El modelo de ratón mostró las características histológicas del pterigión humano, sin embargo, la manipulación de conejos para procedimientos oftalmológicos es más fácil dado que la estructura y el tamaño oculares se parecen más a los del humano.

Métodos: Los ratones reciben agua con o sin los compuestos probados. Para la CNV, el volumen de la lesión neovascular se determina en montajes planos del epitelio pigmentario de la retina (EPR) corioide-retiniano mediante microscopía confocal siete días después de la inducción con láser. En el caso del DIVAA, se implantan cápsulas de silicona que contienen 10.000 células epiteliales del pterigión humano en los flancos de los ratones por vía subcutánea. Después de once días, la neovascularización (NV) se cuantifica mediante espectrofluorimetría después de que a un ratón se le inyecta dextrano marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en la vena de la cola. Se desarrolla un modelo de células epiteliales de pterigio inyectando 10.000 células epiteliales de pterigio humano en el espacio subconjuntival nasal en ratones desnudos atímicos.

Principales medidas de resultado: La prueba t de Student se usa para evaluar los datos de los modelos CNV y DIVAA y las preparaciones histológicas se usan para evaluar las lesiones de pterigia.

Ejemplo 5.26: Tratamiento y/o prevención de la coriorretinopatía serosa central (CSC)

La eficacia terapéutica de los compuestos según la presente invención se investiga in vivo utilizando el modelo animal CSC tal como lo describen Wei-Da Chio, y col., Life Sci J 2019;16 (12): 115-126]. ISSN: 1097-8135).

La patogénesis de la coriorretinopatía serosa central (CSC) aún no se comprende completamente. La participación de los corticosteroides es indiscutible, aunque no se ha aclarado su función exacta; otras partes del mecanismo subyacente de la CSC se han dilucidado principalmente mediante técnicas de imagen tales como la angiografía con fluoresceína y verde de indocianina. Si bien la mayoría de los casos de CSC son autolimitados, existen ciclos graves y recurrentes, y para estos pacientes solo hay un número limitado de opciones de tratamiento disponibles: la fotocoagulación con láser, con riesgo de escotoma y neovascularización coroidea, y la terapia fotodinámica.

Método: El tratamiento se realiza con ratas SD machos con CSCR. El ojo derecho de los casos se divide aleatoriamente en 2 grupos (con el control y con los compuestos probados) a los que se les realizó una serie de exámenes, incluida una oftalmoscopia indirecta y una tomografía computarizada, todas las semanas. Todas las ratas SD se inducen primero en el modelo CSCR. Si la CSCR desaparece en las imágenes de TCO, el compuesto se considera eficiente.

Ejemplo 5.27: Tratamiento o prevención de la fibrosis quística (FQ) que afecta a los pulmones, pero también al páncreas, el hígado, los riñones y el intestino

La eficacia terapéutica de los compuestos según la presente invención se investiga in vivo usando el modelo murino FQ descrito por McCarron A y col. (Respir Res. 2018;19 (1):54. Publicado el 2 de abril de 2018 doi: 10.1186/s12931-018-0750-y)

En los seres humanos, la enfermedad pulmonar por fibrosis quística (FQ) se caracteriza por una infección crónica, inflamación, remodelación de las vías respiratorias y obstrucción de la mucosa. La falta de manifestaciones pulmonares en los modelos murinos FQ ha obstaculizado las investigaciones sobre la patogénesis de las enfermedades de las vías respiratorias, así como el desarrollo y las pruebas de posibles tratamientos. Sin embargo, los modelos animales FQ generados recientemente, incluidos modelos de ratas, hurones y cerdos, demuestran una variedad de fenotipos de enfermedad pulmonar bien caracterizados con diversos grados de gravedad. Están disponibles diferentes fenotipos de las vías respiratorias de los modelos animales FQ disponibles actualmente y presentan posibles aplicaciones de cada modelo en la investigación de FQ relacionada con las vías respiratorias. En particular, se han desarrollado alelos mutantes con mutaciones comunes que causan la FQ humana (p. ej., Phe508del o Gly551Asp) introducidos en la secuencia CFTR de ratones.

Ejemplo 5.28: Tratamiento y/o prevención de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI)

La eficacia terapéutica de los compuestos según la presente invención se investiga in vivo usando un modelo animal FPI tal como lo describen Chen SS y col. (J. Thorac Dis. 2017;9(1):96-105. doi: 10.21037/jtd.2017.01.22).

La fibrosis pulmonar idiopática es una enfermedad pulmonar intersticial progresiva crónica con fibrosis pulmonar grave. La etiología de la fibrosis pulmonar idiopática sigue sin estar clara. Por lo general, los pacientes solo sobreviven de 2 a 3 años después de recibir el diagnóstico de fibrosis pulmonar idiopática. La incidencia y el desarrollo de la FPI están asociados con la lesión de las células epiteliales, la proliferación de fibrocitos, las reacciones inflamatorias y el depósito de la matriz extracelular. La manifestación patológica de la FPI es la neumonía intersticial usual (NIU). Actualmente, la mortalidad en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática es bastante alta. Sin embargo, faltan tratamientos eficaces para la fibrosis pulmonar idiopática. La principal causa de muerte asociada a la FPI es la exacerbación aguda de la FPI (EA-FPI), que representa más del 50 % de las muertes relacionadas con la FPI. La mayoría de los pacientes con EA-FPI no pueden tolerar la broncoscopia o la biopsia pulmonar debido a su estado crítico. La falta de una biopsia de la EA-FPI limita sustancialmente las investigaciones en profundidad de la EA-FPI. Los modelos animales experimentales que podrían imitar la EA-FPI serían herramientas útiles para estudiar la EA-FPI.

Se utilizan modelos animales de FPI inducida con bleomicina (BLM). El modelo de FPI en ratas se desarrolla mediante una infusión intratraqueal de BLM. Teóricamente, una segunda infusión intratraqueal de BLM debería inducir una lesión pulmonar adicional en las ratas que ya han desarrollado fibrosis pulmonar a partir de la primera infusión. La lesión pulmonar adicional puede parecerse a las características patológicas de la EA de la IPF.

Las ratas Sprague Dawley (SD) se distribuyen aleatoriamente en diferentes grupos: un grupo de control tratado solo con compuestos, un grupo modelo EA-FPI con compuestos + BLM + BLM, un grupo modelo EA-FPI (grupo cpd + BLM + BLM), un grupo modelo de FPI tratado con compuestos (grupo Cpd + BLM), un grupo modelo de FPI (grupo BLM) y un grupo de control normal sin BLM.

Las ratas de los grupos BLM + BLM se someten a una segunda infusión de BLM el día 28 después de la primera infusión de BLM. Las ratas de los otros dos grupos reciben solución salina como segunda infusión. Seis ratas de cada grupo se sacrifican el día 31, el día 35 y el día 42 después de la primera infusión, respectivamente.

Las características fisiopatológicas de las ratas del grupo BLM + BLM se parecen a las de los pacientes con EA-FPI y, como se describe (Chen SS, J Thorac Dis 2017;9(1):96-105), una segunda infusión de BLM parece inducir una exacerbación aguda de la fibrosis pulmonar y puede usarse para modelar la EA-FPI en ratas. En este modelo de rata, los efectos de las formulaciones de compuestos que utilizan EA-FPI inducida con una sola infusión de bleomicina intratraqueal y dos, respectivamente, deberían mejorar los hallazgos histopatológicos (las secciones teñidas con H & E y Masson se analizaron y puntuaron para determinar la lesión pulmonar aguda), así como la supervivencia.

Ejemplo 5.29: Fibrosis pulmonar inducida con bleomicina en ratones C57BL/6 con 21 días

Para el estudio se usaron un total de 40 ratones Balb/c machos de 8 a 10 semanas de edad. Estos ratones se adquirieron en Charles River, Reino Unido y tuvieron un período de aclimatación de 7 días. Los animales se alojaron en jaulas IVC (hasta 5 por jaula) y los ratones individuales se identificaron por la marca en la cola. A todos los animales se les permitió el libre acceso a una dieta comercial certificada estándar y a agua desinfectada durante el estudio. El sitio de alojamiento se mantuvo en condiciones estándar: 18-24 °C, 55-70 % de humedad y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas.

Todos los protocolos utilizados en este estudio han sido aprobados por el Comité de Revisión Ética y Bienestar Animal, y todos los procedimientos se llevaron a cabo según las directrices de la Ley de Procedimientos Científicos Animales de 1986.

Los ratones se anestesiaron usando una inyección IP de xilazina y ketamina. Una vez que se alcanzó un plano de anestesia apropiado, se instiló a los animales 1,0 U/kg de sulfato de bleomicina por vía intratraqueal. El volumen total de líquido fue de 50 µl. Los ratones se asignaron aleatoriamente a los grupos de tratamiento como se muestra en la tabla 57 siguiente:

Tabla 57:

Número de grupo	Inducción de TI	Tratamiento	Cantidad de animales	Terminación	Régimen de dosificación
1	Solución salina	Vehículo desde el día 1	6	Día 21	QD (IV)
2	Bleomicina: 1 U/kg el día 0	Vehículo desde el día 1	12	Día 21	QD (IV)
3	Bleomicina: 1 U/kg el día 0	Pirfenidona: 100 mg/kg desde el día 1	12	Día 21	QD (PO)
4	Bleomicina: 1 U/kg el día 0	IVc-059a 15 mg/kg desde el día 1	12	Día 21	QD (IV)

La dosificación de control (pirfenidona) intravenoso y positivo se inició 24 horas después de la instilación de bleomicina.

La solución del fármaco se formuló inmediatamente antes de la dosificación. Para una dosis de 15 mg/kg (suficiente para 12 ratones de 30 g), se pesaron 4,5 mg del compuesto. Se añadieron 75 µl (5 %) de DMSO y se mezclaron hasta que el fármaco estuviera en solución. Se añadieron 150 µl (10 %) de solutol y se agitó con vórtex suavemente, se añadieron 150 µl (10 %) de PEG400 y se agitó con vórtex suavemente. Se añadieron 1000 ml de PBS (pH 7) y se midió la matriz para garantizar que se mantuviera el pH de 7,0. Se añadió el PBS restante (hasta un total de 1500 µl). El compuesto permaneció en solución.

Toma de muestras tras la terminación (último día de dosificación): El día de la toma de muestras, 2 horas después de la dosis final, los ratones se sacrificaron mediante una sobredosis de anestesia. Se tomaron muestras de los animales para determinar lo siguiente:

Suero: Inmediatamente después del sacrificio, se extrajo sangre mediante punción cardíaca y se colocó en tubos Eppendorf. Los tubos se almacenaron a temperatura ambiente durante al menos 20 minutos antes de centrifugarlos a 6.000 rpm durante 5 minutos. Las muestras se almacenaron a -80 °C.

Necropsia macroscópica: Tras la terminación, los órganos internos se expusieron y observaron. Se observó cualquier anomalía.

Pulmón: Los pulmones se inflaron con formalina antes de la resección. Brevemente, se expuso la tráquea del ratón y se hizo una pequeña incisión con una cuchilla. El material de sutura se colocó suavemente alrededor de la parte posterior de la tráquea por debajo de la incisión y se ató sin apretar. La formalina se insertó suavemente en los pulmones y la sutura se cerró herméticamente para garantizar la inflación. Los pulmones se colocaron en formalina y se tiñeron con tinción tricromática y H&E para analizar el depósito de colágeno y la progresión de la enfermedad (puntuación de Ashcroft). Se congeló rápidamente una sección de tejido pulmonar.

Puntuación de Ashcroft:

0 Pulmón normal

1 Engrosamiento fibrótico mínimo de los vasos alveolares o bronquiolares

2 Entre mínimo y moderado

3 Engrosamiento moderado de las paredes sin daño evidente a la arquitectura pulmonar

4 Entre fibrosis moderada y creciente con daño a la estructura pulmonar

5 Fibrosis creciente con daño definitivo a la estructura pulmonar y formación de bandas fibrosas o pequeñas masas fibrosas

6 Entre fibrosis creciente y grave distorsión de la estructura pulmonar

7 Distorsión grave de la estructura y grandes áreas fibrosas; "pulmón en forma de panal"

8 Obliteración fibrosa total del campo

Resultados

Signos clínicos: No se observaron cambios en el peso corporal y ningún animal tuvo que dejar de tomar la dosis durante el estudio.

Puntuación de *Ashcroft*: Los pulmones de cada animal se sometieron a FFPE, se seccionaron y se tiñeron con H&E según un protocolo interno. Se tomaron imágenes de las portaobjetos en un escáner de portaobjetos Glissando para obtener imágenes de portaobjetos completas. Cada pulmón se puntuó utilizando el sistema de clasificación de Ashcroft para medir el grado de inflamación/fibrosis según Hübner y col., 2008. La puntuación se realizó a ciegas. Tanto la pirfenidona a 100 mg/kg como el IVc-059a a 15 mg/kg redujeron la aparición de fibrosis en el pulmón de los ratones ($p = 0,0018$ y $0,0130$, respectivamente, ANOVA). El tratamiento con pirfenidona tuvo el mismo efecto en el inicio de la fibrosis que el tratamiento con IVc-059a ($p=0,4441$, prueba T de dos vías). Las imágenes representativas se muestran en la figura 11A.

La figura 11A muestra imágenes representativas de la fibrosis pulmonar el día 21 de tratamiento: Imágenes de ejemplo de tinción tricromática del tejido conectivo (x20); (A1) no inducido (saludable); A2, bleomicina inducida con tratamiento con vehículo; A3, bleomicina inducida con tratamiento de 100 mg/kg de pirfenidona; A4, bleomicina inducida con tratamiento con IVc-059a. La figura 11B muestra la puntuación de Ashcroft de pacientes sanos, inducidos con bleomicina, no tratados, frente a pirfenidona frente a IVc-059a.

Un pulmón completo de cada animal se fijó con formalina y se almacenó en etanol al 70 %. Estas secciones se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol antes de incluirse en cera de parafina. Las secciones se cortaron a 5 µm y se hornearon en portaobjetos Superfrost durante 2 h. Las secciones se tiñeron usando un kit

disponible comercialmente para tejido conectivo (Abeam ab150686). El porcentaje de área cubierta por la tinción tricrómica se cuantificó utilizando los programas Qupath e ImageJ.

Ejemplo 5.30: Resultados in vitro y toxicología del ADME

Se realizó una evaluación exhaustiva de toxicología ADME en los compuestos Ic-007a, Ilc-007a, Illc-061a y IVc-059a.

Se evaluó el panel Core QPatch de los ensayos de canal iónico cardíaco (CiPA) para c-007a, Ilc-007a, Illc-061a e IVc-059a: Se usaron los tres ensayos siguientes para CiPA: Ensayo qPatch CiPA basado en células del canal iónico de sodio humano Nav1.5, ensayo qPatch CiPA basado en células del canal iónico de potasio humano hERG, ensayo qPatch CiPA basado en células del canal iónico de calcio humano Cav1.2 (tipo L).

Se evaluó el metabolismo de los hepatocitos, los microsomas y los hepatocitos humanos. Se evaluó un conjunto completo de ensayos de unión, enzimas y ensayos de absorción, así como las propiedades de solución, la absorción *in vitro*, el metabolismo y la toxicidad. La toxicidad genética se evaluó mediante ensayos AMES* y micronúcleos.

*Ames es un ensayo bacteriano para la identificación de compuestos que pueden producir mutaciones genéticas y muestra un alto valor predictivo con las pruebas de carcinogenicidad en roedores. En el *in vitro*

** En los ensayos de micronúcleos *in vitro* utilizados para la identificación de compuestos que inducen daño cromosómico (clastógenos y aneugenos)

Resultados

Los compuestos altamente polares muestran un metabolismo bajo en los microsomas hepáticos con vidas medias superiores a 60 minutos. No se observó ningún efecto tóxico significativo en las células de los hepatocitos al analizar su viabilidad. La mayoría de los compuestos con carga negativa se unen en gran medida a las proteínas plasmáticas. No se observó ningún efecto de genotoxicidad. Los compuestos no muestran ningún efecto significativo en las pruebas de fluctuación de Ames* TA100 -S9, TA100 + S9, TA1535 - S9, TA1535 + S9, TA1537 - S9, TA1537 + S9, TA98 - S9, TA98 + S9 en la concentración de 5 μ M a 0,1 mM. No se observó toxicidad bacteriana en TA100 -S9, TA1535 - S9, TA1537 - S9, TA98 - S9.

No se observaron efectos en el ensayo de micronúcleos para el intervalo de concentración evaluado de 8 pM a 1 mM. En el panel de CiPA, se utilizaron tres ensayos basados en células: el ensayo de CiPA con pinza de parche automatizado basado en células de canal iónico de calcio humano Cav1.2 (tipo L), el ensayo de CiPA con pinza de parche automatizado basado en células de canal iónico de potasio humano hERG y el ensayo de CiPA con pinza de parche automatizado basado en células de canal iónico de sodio humano Nav1.5; todos se evaluaron en 3 niveles de concentración y no se observó ninguna inhibición significativa entre 0,1 μ M y 10 μ M.

En un ensayo con panel de seguridad, los compuestos tuvieron efectos inhibidores nulos o muy bajos en los siguientes sistemas enzimáticos, mostrando un buen perfil de seguridad en el transportador de 5-HT humano (h) (radioligando antagonista); 5-HT1A (h) (radioligando agonista); 5-HT1B (h) (radioligando antagonista); 5-HT2A (h) (radioligando agonista); 5-HT2B (h) (radioligando agonista); 5-HT3 (h) (radioligando antagonista); A2A (h) (radioligando agonista); acetilcolinesterasa (h); alfa 1A (h) (radioligando antagonista); alfa 2A (h) (radioligando antagonista); AR (h) (radioligando agonista); beta 1 (h) (radioligando agonista); beta 2 (h) (radioligando antagonista); BZD (central) (radioligando agonista); canal Ca²⁺ (L, sitio de dihidropiridina) (radioligando antagonista); CB1 (h) (radioligando agonista); CB2 (h) (radioligando agonista); CCK1 (CCKA) (h) (radioligando agonista); D1 (h) (radioligando antagonista); D2S (h) (radioligando agonista); delta (DOP) (h) (radioligando agonista); transportador de dopamina (h) (radioligando antagonista); ETA (h) (radioligando agonista); GR (h) (radioligando agonista); H1 (h) (radioligando antagonista); H2 (h) (radioligando antagonista); kappa (h) (KOP) (radioligando agonista); canal KV (radioligando antagonista); quinasa Lck (h); M1 (h) (radioligando antagonista); M2 (h) (radioligando antagonista); M3 (h) (radioligando antagonista); MAO-A (radioligando antagonista); mu (MOP) (h) (radioligando agonista); alfa 4beta 2 (h) neuronal N (radioligando agonista); canal Na⁺ (sitio 2) (radioligando antagonista); NMDA (radioligando antagonista); transportador de norepinefrina (h) (radioligando antagonista); PDE3A (h); PDE4D2 (h); Canal de potasio hERG (humano)-[3H] Dofetilida; V1a (h) (radioligando agonista).

El efecto antiinflamatorio de los compuestos estuvo en línea con la inhibición parcial de las enzimas ciclooxigenasas, por ejemplo, Ic-007a, Ilc-007a, Illc-061a y IVc-059a mostraron una inhibición parcial de la COX2 (ciclooxigenasa-2).

Ejemplo 5.31: Elaboración de perfiles in vitro usando BioMap Plus

Se realizó una serie de ensayos *in vitro* utilizando ensayos basados en células primarias humanas que modelan la biología compleja de tejidos y enfermedades de los órganos (vasculatura, sistema inmunitario, piel, pulmón) y la biología general de tejidos para la elaboración de perfiles fenotípicos de compuestos en condiciones que preservan los mecanismos de diafonía y retroalimentación relevantes para los resultados *in vivo*.

La potencia, la selectividad, la seguridad, el mecanismo de acción y la indicación de enfermedad de los compuestos Ic-007a, Ilc-007a, Illic-061a, IVc-059a se evaluaron a concentraciones de 30 μ M, 10 μ M, 3,3 μ M, 1,1 μ M en los siguientes sistemas celulares utilizando el ensayo celular fenotípico BioMaps Plus (Eurofins-DiscoverX, San Francisco, CA, EE. UU.):

- 5 - Células endoteliales venulares para evaluar la enfermedad cardiovascular, la inflamación crónica, el asma, la alergia, la enfermedad autoinmune y la enfermedad atópica
- PBMC con células endoteliales venulares para evaluar la enfermedad cardiovascular, la inflamación crónica, la enfermedad autoinmune y la inflamación crónica;
- 10 - células B con PBMC para evaluar la enfermedad autoinmune o la inflamación;
- células epiteliales bronquiales para evaluar la inflamación pulmonar y la EPOC
- 15 - células del músculo liso de las arterias coronarias para evaluar la inflamación cardiovascular y la restenosis
- fibroblastos dérmicos para evaluar la fibrosis, la inflamación crónica, la cicatrización de heridas, la remodelación tisular y la modulación matricial
- 20 - queratinocitos/fibroblastos dérmicos para evaluar la psoriasis, la dermatitis y la biología de la piel
- fibroblastos pulmonares para evaluar la fibrosis, la inflamación crónica y la remodelación de la matriz
- células endoteliales venulares con macrófagos para evaluar la inflamación cardiovascular, la restenosis y la inflamación crónica
- 25

Referencias de BiomPas Plus: Libro: Phenotypic Drug Discovery, capítulo 2: Development and Validation of Disease Assays for Phenotypic Screening. Ellen L. Berg, Sheryl P. Denker y Alison O'Mahony. <https://doi.org/10.1039/9781839160721-00020> ISBN 978-1-83916-072-1

30 Assessing bioactivity-exposure profiles of fruit and vegetable extracts in the BioMAP profiling system. Wetmore BA, Clewell RA, Cholewa B, Parks B, Pendse SN, Black MB, Mansouri K, Haider S, Berg EL, Judson RS, Houck KA, Martin M, Clewell HJ 3rd, Andersen ME, Thomas RS, McMullen PD. Toxicology in Vitro. 2019;54,41-57.

35 Resultados

El Ic-007a no resultó citotóxico en las concentraciones probadas en este estudio. El Ic-007a resultó antiproliferativo para las células T primarias humanas (30 μ M) y los fibroblastos (30 μ M, 10 μ M, 3,3 μ M, 1,1 μ M). El Ic-007a estuvo activo con 20 lecturas anotadas y los cambios mediados en las actividades clave de los biomarcadores se enumeran según las clasificaciones biológicas y de enfermedad. Principalmente, el Ic-007a tuvo un efecto en las actividades relacionadas con la inflamación (disminución de VCAM-1, STNF α , MIP-1 α , I-TAC, MIG; aumento de IL-8; IP-10 modulada), actividades inmunomoduladoras (disminución de CD40, M-CSF) y actividades de remodelación tisular (disminución del colágeno I, colágeno IV, TIMP-1, tPA, colágeno III, PAI-1, uPAR, bFGF).

45 El Ilc-007a no resultó citotóxico a las concentraciones probadas en este estudio. El Ilc-007a no tuvo ningún efecto antiproliferativo en estas células primarias humanas a las concentraciones probadas.

El Ilc-007a estuvo activo con 12 lecturas anotadas y los cambios mediados en las actividades clave de los biomarcadores se enumeraron según las clasificaciones biológicas y de enfermedad. Principalmente, el Ilc-007a tuvo un efecto en las actividades relacionadas con la inflamación (disminución del STNF α , MIP-1 α ; aumento de IL-8; MCP-1 modulada), actividades inmunomoduladoras (disminución de sIL-10, sIL-2) y actividades de remodelación tisular (disminución de colágeno I, colágeno IV, colágeno III, PAI-1).

55 El Illic-061a no resultó citotóxico a las concentraciones probadas en este estudio. El Illic-061a no tuvo ningún efecto antiproliferativo en estas células primarias humanas a las concentraciones probadas. El Illic-061a estuvo activo con seis lecturas anotadas y los cambios mediados en las actividades clave de los biomarcadores se enumeraron según las clasificaciones biológicas y de enfermedad. El Illic-061a tuvo un efecto en las actividades relacionadas con la inflamación (disminución del I-TAC, MIG), las actividades inmunomoduladoras (disminución del sIL-17a) y las actividades de remodelación tisular (disminución del colágeno I, colágeno III, PAI-1).

60 El IVc-059a no resultó citotóxico a las concentraciones probadas en este estudio. El IVc-059a resultó antiproliferativo para las células endoteliales primarias humanas (1,1 μ M). El IVc-059a estuvo activo con tres lecturas anotadas y los cambios mediados en las actividades clave de los biomarcadores se enumeraron según las clasificaciones biológicas y de enfermedad. El IVc-059a tuvo un efecto en las actividades relacionadas con la inflamación (disminución del sTNF α) y las actividades inmunomoduladoras (disminución del sIL-10, sIL-2).

65

Ejemplo 5.32: Resultados in vitro en células epiteliales pigmentarias retinianas (RPE) humanas ARPE-19 y células endoteliales retinianas humanas (HREC)

Los compuestos Ic-007a, Ilc-007a, IVc-059a y bevacizumab (BEVA) se evaluaron para determinar su efecto sobre la alteración de la barrera hematorretiniana interna y externa inducida por afecciones diabéticas. Se evaluaron dos concentraciones diferentes 25 μ M y 50 μ M de los compuestos Ic-007a, Ilc-007a, IVc-059a. Los mecanismos de acción implicados en el efecto antipermeabilidad de los tratamientos probados se exploraron evaluando la permeabilidad a la producción de dextrano fluorescente y citocinas proinflamatorias utilizando sus niveles de expresión de ARNm mediante RT-PCR.

Condiciones de la barrera hematorretiniana externa: los cultivos de células epiteliales pigmentarias retinianas (EPR) humanas ARPE-19, una línea celular EPR humana inmortalizada espontáneamente, se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, EE. UU.). Las células ARPE-19 se cultivaron en condiciones euglucémicas (D-glucosa (D-Glc), 5,5 mmol/l) e hiperglucémicas (D-glucosa, 25 mmol/l) durante 18 días a 37 °C bajo CO₂ al 5 % (vol./vol.) en el medio (DMEM/F12) suplementado con FBS al 10 % (vol. /vol.) (Hyclone; Thermo Fisher Scientific, UT, EE. UU.) y penicilina/estreptomicina al 1 % (vol. /vol.) (Hyclone; Thermo Fisher Scientific). Se usaron células ARPE-19 del pase 20 y el medio se cambió cada 3-4 días. Para los estudios de permeabilidad, se sembraron células ARPE-19 a 400.000 células/ml (80.000 células RPE/pocillo) en pocillos HTS-Transwells de 0,33 cm² (Costar; Corning, NY, EE. UU.). Para la PCR en tiempo real, el análisis de transferencia Western y las células de inmunofluorescencia se siembran a 20.000 células/ml.

Condiciones experimentales y tratamientos: aparte de la condición euglucémica, se probaron dieciocho condiciones diferentes en células cultivadas con 25 mmol/l de D-glucosa:

Condición 1) Las células de control no recibieron ningún tratamiento D-glucosa 5 mM

Condición 2) Las células se tratan con un medio diabético D-Glucosa 25 mM + vehículo (días 15, 16 y 17 en una aplicación/día) para evaluar su efecto en la prevención del daño celular provocado por el medio diabético.

Condición 3, 4, 5, 6, 7, 8) Las células se trataron con D-glucosa 25 mM y dos concentraciones diferentes de cada producto: Ic-007a (3, 4) 25 μ g/ml (=53 μ M) y 50 μ g/ml (=107 μ M); Ilc-007a (5, 6) 25 μ g/ml (=53 μ M) y 50 μ g/ml (=107 μ M); IVc-059a (7, 8) 20 μ g/ml (=50 μ M) y 40 μ g/ml (=100 μ M) durante 72 h (días 15, 16 y 17 con una sola aplicación/día) para evaluar sus posibles efectos citotóxicos. Condición 9) Las células se trataron con D-glucosa 25 mM y bevacizumab (0,2 mg/ml) durante 72 h (días 15, 16 y 17 con una aplicación/día) para evaluar sus posibles efectos citotóxicos.

Condición (10) = Medio diabético; las células se trataron con D-glucosa 25 mM + IL-1 β (10 ng/ml) + TNF- α (25 ng/ml) + VEGF (25 ng/ml), durante 48 h (días 16 y 17 con una aplicación/día) para provocar la alteración de la monocapa.

Condiciones 11, 12, 13, 14, 15, 16) Las células se trataron con un medio diabético (D-glucosa 25 mM + IL-1 β [10 ng/ml] + TNF- α [25 ng/ml] + VEGF [25 ng/ml]) + dos concentraciones de los nuevos compuestos (Ic-007a, Ilc-007a e IVc-059a (días 15, 16 y 17 con una aplicación/día) para evaluar su efecto para prevenir el daño celular provocado por el medio diabético.

Condición 17) Las células se tratan con un medio diabético (D-glucosa 25 mM + IL-1 β [10 ng/ml] + TNF- α [25 ng/ml] + VEGF [25 ng/ml]) + bevacizumab (0,2 mg/ml) (días 15, 16 y 17 con una sola aplicación/día) para evaluar su efecto en la prevención del daño celular provocado por el medio diabético.

Medición de la permeabilidad al ARPE-19: La permeabilidad de las células RPE se determinó a los 18 días midiendo los movimientos apicales a basolaterales del FITC-dextrano (40 kDa) (Sigma, St Louis, MI, EE. UU.) siguiendo un procedimiento previamente descrito por Villarroel y col. Exp Eye Res, 2009, 89, 913-920.

Condiciones de la barrera retiniana de la sangre interna: se obtuvieron células endoteliales retinianas humanas primarias (HREC) de un vial de células criopreservadas adquiridas en Innoprot (Vizcaya, España). Estas células se aislaron del tejido retiniano humano de ojos cadavéricos y se digirieron con 0,1 mg/ml de collagenasa tipo I a 37 °C durante 1 hora. A continuación, las células endoteliales se seleccionaron finalmente con perlas magnéticas recubiertas con el anticuerpo contra CD31 (DynaBeads; Dynal, Oslo, Noruega). Las HREC se descongelaron en el laboratorio y se cultivaron en un medio basal endotelial (MBE) que contenía D-glucosa 5,5 mM, FBS (suero fetal bovino) al 5 %, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina y un suplemento ECG (suplemento para el crecimiento de células endoteliales) (Innoprot, Vizcaya, España). Se usó fibronectina humana (MerckMillipore, Madrid, España) a 5 μ g/ml para la unión celular. Las células en los pases 2-3 se usarán para los experimentos. Para los experimentos, las HREC se cultivaron hasta la confluencia y, a continuación, se cambiaron los medios de cultivo celular por un medio suplementado con FBS al 1 % durante 24 h y, a continuación, se expusieron a diferentes tratamientos.

Condiciones/tratamientos: Se usaron las mismas condiciones especificadas para el experimento en células ARPE-19. Medición de la permeabilidad a las HREC: La permeabilidad en monocapas de HREC se obtuvo sobre soportes permeables a 12×10^5 células/pocillo (24 pocillos, filtros PCF, Merck Millipore). Los insertos se incubaron durante 48 horas a 37 °C en aire con CO₂ al 5 % para formar la monocapa. Al final, se eliminó el suero del medio 24 h antes

de continuar con los tratamientos. La cámara inferior se llenó con 600 µl del medio EBM completo y la cámara superior con 100 µl de suspensión celular libre de suero (1 %).

Para detectar cambios en la permeabilidad, se añadieron 100 µg/ml de FITC-DEXTRAN fluorescente (Sigma, Madrid, España) a la parte superior del inserto. Se leyeron alícuotas de 200 µl del compartimento basal en un SpectraMax Gemini (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a una longitud de onda de excitación/emisión de 485/528 nm cada 30 min. Finalmente, la concentración de dextrano se determinó extrapolando las lecturas de fluorescencia en una curva estándar. Cada condición se probó por triplicado.

Viabilidad y proliferación celular: El recuento de células y el ensayo de MTT se realizaron en HREC para evaluar la viabilidad de las células en las condiciones probadas. Se midió la viabilidad y la proliferación de las HREC. En resumen, las células se tiñeron con DAPI y se tomaron fotografías (20x) en un microscopio invertido fluorescente (Olympus iX71 con V-RFL-T Olympus). Los núcleos celulares se contaron con la ayuda del software Image J en tres campos diferentes para cada condición. Los experimentos se repitieron tres veces. Además, se usó el ensayo MTT (Sigma, Madrid, España) para evaluar la viabilidad de las células. En resumen, se añadieron 10 µl de 5 mg/ml de MTT en PBS a cada pocillo después de los tratamientos y se incubaron durante 1 h adicional a 37 °C. Se retiró el medio y los gránulos de formazán obtenidos se disolvieron en sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 100 % y se detectó la absorbancia a 562 nm con un lector de placas ELISA (ELx800. Bio-Tek Instruments, Vermont, EE. UU.). Este ensayo descartó un posible sesgo en los resultados debido a los cambios en la proliferación celular entre las diferentes condiciones.

Mecanismos de acción:

Las citocinas proinflamatorias se evaluaron en las células ARPE-19 mediante RT-PCR y el ARNm para la IL-6, el TNF-α, la IL-1β, la IL-18, el VEGF, la IL-10 y el FGF se midió utilizando el método de tomografía computarizada de doble delta 2-ΔCT con valores de Cts para el gen de interés y la actina B humana endógena para obtener ΔCT; Los valores de ARNm se expresaron como un cambio relativo con respecto a la condición 25 mM de D-Gluc. (referencia: Livak KJ, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔCT Method, Methods, 2001, 25(4), 402-408, doi 10.1006/meth.2001.1262)

La producción de ROS se evaluó mediante el ensayo de ROS intracelular OxiSelect™ de Cell Biolabs (fluorescencia verde) (Bionova, Madrid, España). El ensayo emplea la sonda fluorogénica permeable a las células diacetato de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), que se oxida mediante ROS celulares a 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF) altamente fluorescente.

Se analizó la expresión de endotelina-1, PDGF y VCAM-1 en monocapas de HREC mediante análisis inmunohistoquímico y mediante RT-PCR.

La expresión de TJ (ZO) se analiza en monocapas de ARPE-19 y HREC mediante análisis inmunohistoquímico.

Resultados:

Los resultados de permeabilidad de la barrera hematorretiniana externa (monocapa ARPE19) y la barrera hematorretiniana interna (HREC) se muestran en la tabla 58. Los compuestos Ic-007a, Ilc-007a, IVc-059a disminuyeron la permeabilidad de las monocapas externa e interna.

El efecto de los compuestos Ic-007a, Ilc-007a, IVc-059a sobre la producción de ROS y ARNm de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-18 y VEGF en células monocapa ARPE19 expuestas a medios diabéticos y no diabéticos se muestra en la tabla 59.

Tabla 58: Permeabilidad de la barrera hematorretiniana externa y la barrera hematorretiniana interna basada en la fuga de fluorescencia de FITC-dextrano (ng/ml/cm²).

No	Condición	ARPE19		HREC	
		% de permeabilidad	p<0,05	% de permeabilidad	p<0,05
1	DMEM y F-12 de HAM 1 % D-Gluc 5,5 mM	105,1 ± 34,1		88,3 ± 26,2	
2	DMEM y F-12 de HAM 10 % D-Gluc (#) 25 mM	94,9 ± 10,3		100,0 ± 15,6	
3	(n.º) + Ic-007a 25 µg/ml	75,2 ± 11,1		126,3 ± 8,3	
4	(n.º) + Ilc-007a 25 µg/ml	66,1 ± 4,9		136,3 ± 16,7	
5	(n.º) + IVc-059a 25 µg/ml	70,2 ± 8,8		109,9 ± 24,7	

		ARPE19	HREC
No	Condición	% de permeabilidad p<0,05	% de permeabilidad p<0,05
5	6 (#) + IC-007a 50 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	107,3 ± 43,9	127,4 ± 2,1
	7 (#) + II-007a 50 µg/ml + VEGF, TNF-α, IL-1β	113,1 ± 11,4	147,7 ± 17,6
10	8 (n.º) + IVc-059a 50 µg/ml + VEGF, TNF-α, IL-1β	112,6 ± 19,8	135,4 ± 6,7
	9 (#) + BEVA 0,2 mg/ml	109,5 ± 22,9	127,1 ± 26,2
15	10 (#) + VEGF, TNF-α, IL-1β = MEDIO DIABÉTICO	159,9 ± 5,0	170,0 ± 12,0
	11 (n.º) + Ic-007a 25 µg/ml + VEGF, TNF-α, IL-1β	103,7 ± 15,7 *	11,6 ± 24,2 *
	12 (#) + II-007a 25 µg/ml + VEGF, TNF-α, IL-1β	114,7 ± 19,0 *	135,8 ± 16,6 *
20	13 (n.º) + IVc-059a 25 µg/ml + VEGF, TNF-α, IL-1β	98,5 ± 36,5 *	124,0 ± 6,3 *
	14 (#) + IC-007a 50 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	127,1 ± 13,5 *	159,0 ± 23,9
25	15 (#) + II-007a 50 µg/ml + VEGF, TNF-α, IL-1β	136,8 ± 13,0 *	145,2 ± 8,8
	16 (n.º) + IVc-059a 50 µg/ml + VEGF, TNF-α, IL-1β	130,4 ± 24,8	115,3 ± 14,7 *
30	17 (#) + BEVA 0,2 mg/ml + VEGF, TNF-α, IL-1β	120,7 ± 30,1	129,0 ± 35,3
* p<0,05 para la fuga de FITC-dextrano medida después de 90 min en [ng/ml/cm2] en comparación con el medio diabético (D-Glucosa 25 mM + VEGF, TNF-α, IL-1β)			

Tabla 59: Producción de ROS y ARNm de TNF-α, IL-1b, IL-6, IL-18 y VEGF por células monocapa ARPE19 en medios diabéticos y no diabéticos.

		ROS	IL-1β	IL-6	TNFα	IL-18	VEGF
No	Condición	%	R.Q. de ARNm	R.Q. de ARNm	R.Q. de ARNm	R.Q. de ARNm	R.Q. de ARNm
40	1 DMEM y F-12 de HAM 1 % D-Gluc 5,5 mM	86 ± 12	0,11 ± 0,02	0,93 ± 0,01	0,18 ± 0,16	1,08 ± 0,44	1,60 ± 0,05
45	2 DMEM y F-12 de HAM 10 % D-Gluc (#) 25 mM	100 ± 9	1,02 ± 0,20	100 ± 0,03	1,36 ± 0,86	1,04 ± 0,35	1,54 ± 0,32
	3 (n.º) + Ic-007a 25 µg/ml	32 ± 15	0,12 ± 0,01	0,52 ± 0,49	0,27±0,07	0,45 ± 0,18	0,09 ± 0,02
50	4 (n.º) + IIc-007a 25 µg/ml	55 ± 6,4	0,74 ± 0,26	0,73 ± 0,00	0,57±0,18	0,75 ± 0,09	0,06 ± 0,01
	5 (n.º) + IVc-059a 25 µg/ml	62 ± 9	0,20 ± 0,05	0,28 ± 0,11	0,27±0,08	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,01
55	6 (n.º) + Ic-007a 50 µg/ml	26 ± 4,6	0,15 ± 0,03	0,20 ± 0,07	0,59±0,33	0,07 ± 0,01	0,12 ± 0,03
	7 (n.º) + IIc-007a 50 µg/ml	72 ± 11	0,24 ± 0,11	0,34 ± 0,08	0,45±0,30	0,04 ± 0,00	0,12 ± 0,03
60	8 (n.º) + IVc-059a 50 µg/ml	116 ± 12	0,21 ± 0,13	0,28 ± 0,11	0,27±0,10	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,03
	9 (#) + BEVA 0,2 mg/ml	110 ± 54	1,46 ± 0,72	0,64 ± 0,34	0,46±0,63	0,09 ± 0,01	1,68 ± 0,83
65	10 (n.º) + VEGF, TNF-α, IL-1β = MEDIO DIABÉTICO	145 ± 9,3	96,07 ± 48,11	65,49 ± 21,16	9,13±1,84	2,22 ± 0,19	2,01 ± 0,69

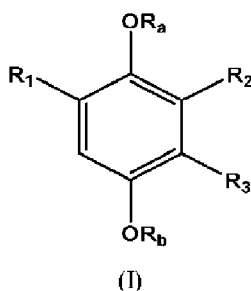
		ROS	IL-1β	IL-6	TNFα	IL-18	VEGF
No	Condición	%	R.Q. de ARNm	R.Q. de ARNm	R.Q. de ARNm	R.Q. de ARNm	R.Q. de ARNm
11	(n.º) + Ic-007a 25 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-Lb	33±4,8 *	12,21 ± 1,46 *	0,52 ± 0,49 *	11,26±0,96	0,02 ± 0,00 *	0,06 ± 0,02
12	(n.º) + Il-007a 25 µg/ml + VEGF, TNF-α, IL-1β	47± 7,6 *	41,03 ± 17,57 *	10,83 ± 6,90 *	6,31±0,06 *	0,07 ± 0,01 *	0,11 ± 0,01 *
13	(n.º) + IvC-059a 25 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-1β	61 ± 40 *	20,81 ± 5,11 *	5,84 ± 1,13 *	5,39 ± 1,01 *	0,03 ± 0,01 *	0,04 ± 0,00
14	(n.º) + IC-007a 50 µg/mL + VEGF, TNF-α, IL-Lb	27 ± 13 *	10,66 ± 3,01 *	3,28 ± 1,46 *	5,22±3,96	0,02 ± 0,00 *	0,17 ± 0,05 *
15	(#) + Il-007a 50 µg/ml + VEGF, TNF-α, IL-1β	74 ± 38 *	11,39 ± 6,52 *	1,50 ± 1,19 *	4,24 ± 0,77 *	0,03 ± 0,00 *	0,13 ± 0,02 *
16	(n.º) + IvC-059a 50 gg/ml + VEGF, TNF-α, IL-1β	159 ± 32	27,76 ± 5,18 *	9,78 ± 2,30 *	3,61±1,82 *	0,01 ± 0,00 *	0,20 ± 0,03 *
17	(#) + BEVA 0,2 mg/ml + VEGF, TNF-α, IL-1β	111 ± 50	31,22 ± 12,65 *	32,35 ± 13,48*	1,37 ± 0,27 *	0,53 ± 0,04 *	3,88 ± 0,68

% ROS para D-glucosa 25 mM; R.Q. = Cuantificación relativa del ARNm para los valores de citocinas y factores de crecimiento expresados como cambio relativo con respecto a la condición D-Glucosa 25 mM.

* p<0,05 entre D-Glc 25 mM + VEGF + TNF- α + IL-1 β (medio diabético) y los compuestos Ic-007a, Ilc-007a, IVc-059

REIVINDICACIONES

1. Una hidroquinona sustituida de fórmula (I):



en donde:

$R_a, R_b = H$, acilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , arilo $C_6-C_{10}CO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, alquilo C_1-C_7NHCO , fosfono, fosfonooximetilo, aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi-1-etilo C_1-C_6 , alcoxycarboniloximetilo C_1-C_6 , o alcoxycarboniloxi-1-etilo C_1-C_6 ;

$R_1 = COOR_4, (CH_2)_nCOOR_4, SO_3H, (CH_2)_nSO_3H$, o $CONH-R_{10}$;

uno de R_2 o R_3 es H y el otro es R_5 ;

$R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_1-C_6 , pirrolidino-alquilo C_1-C_6 , N-metilpiperazino-alquilo C_1-C_6 , aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi-1-etilo C_1-C_6 , alcoxycarboniloximetilo C_1-C_6 , alcoxycarboniloxi-1-etilo C_1-C_6 u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

$R_5 = R_6, R_7$, o R_8

$R_6 = CONH-R_9, CONHCOR_9, CONH(CH_2)_n-R_9, CONHCH(COOR_4)(CH_2)_kR_9$; en donde $k = 0-4$;

$R_7 =$ benzoheteroarilo sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de: $COOR_4, (CH_2)_nCOOR_4, SO_3H, (CH_2)_nSO_3H, OR_4$, heterociclos de 5 miembros que contienen N, o flúor;

$R_8 = (CH_2)_mX(CH_2)_pR_9$;

$X = O, S, SO_2, NH, NAc$, o $N(CH_2)_qR_9$;

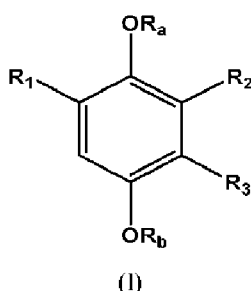
$R_9 =$ arilo, heteroarilo, sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de $COOR_4, (CH_2)_nCOOR_4, (CH_2)_nSO_3H, OR_4, SO_3H$, heterociclos de 5 miembros que contienen N, flúor, $C=O$ o $NHCO-R_{10}$;

$R_{10} =$ arilo, heteroarilo, sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de $COOR_4, (CH_2)_nCOOR_4, (CH_2)_nSO_3H, OR_4, SO_3H$, heterociclos de 5 miembros que contienen N, o flúor;

en donde el arilo de R_9 y R_{10} es un grupo aromático que contiene de 6 a 14 átomos de carbono, seleccionado de entre el grupo fenilo, naftilo, o bifenilo; y el heteroarilo de R_9 y R_{10} es un grupo aromático que contiene de 1 a 14 átomos de carbono y uno o más de nitrógeno; y

n, m, p y q son un número entero independientemente 1-4.

2. El compuesto de fórmula (I), según la reivindicación 1:



en donde:

$R_a, R_b = H$, acilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , arilo $C_6-C_{10}CO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, alquilo C_1-C_7NHCO , fosfono, fosfonooximetilo, aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi-1-etilo C_1-C_6 , alcoxycarboniloximetilo C_1-C_6 , o alcoxycarboniloxi-1-etilo C_1-C_6 ;

$R_1 = COOR_4, (CH_2)_nCOOR_4, SO_3H, (CH_2)_nSO_3H$, o $CONH-R_{10}$;

uno de R_2 o R_3 es H y el otro es R_5 ;

$R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_1-C_6 , pirrolidino-alquilo C_1-C_6 , N-metilpiperazino-alquilo C_1-C_6 , aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6 -1-etilo, alcoxycarboniloximetilo C_1-C_6 , alcoxycarboniloxi C_1-C_6 -1-etilo u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

R₅ = R₆, o R₇,

R₆ = CONH-R₉, CONHCOR₉, CONH(CH₂)_n-R₉, o CONHCH(COOR₄)(CH₂)_kR₉; en donde k = 0-4;

R₇ = benzoheteroarilo sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de: COOR₄, (CH₂)_nCOOR₄, SO₃H, (CH₂)_nSO₃H, OR₄, heterociclos de 5 miembros que contienen N, o flúor;

R₉ = arilo, heteroarilo, sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de COOR₄, (CH₂)_nCOOR₄, (CH₂)_nSO₃H, OR₄, SO₃H, heterociclos de 5 miembros que contienen N, flúor, C=O o NHCO-R₁₀;

R₁₀ = arilo, heteroarilo, sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de COOR₄, (CH₂)_nCOOR₄, (CH₂)_nSO₃H, OR₄, SO₃H, heterociclos de 5 miembros que contienen N, o flúor;

en donde el arilo de R₉ y R₁₀ es un grupo aromático que contiene de 6 a 14 átomos de carbono, seleccionado de entre el grupo fenilo, naftilo, o bifenilo; y el heteroarilo de R₉ y R₁₀ es un grupo aromático que contiene de 1 a 14 átomos de carbono y uno o más de nitrógeno; y n, es independientemente 1-4.

3. El compuesto según la reivindicación 2, en donde:

(A)

R_a, R_b = H, acilo C₁₋₄, arilalquilo C₁₋₄, arilo C₆-C₁₀CO, HOOC(CH₂)_nCO, alquilo C₁-C₇NHCO, fosfona, fosfonooximetilo, aciloximetilo C₁-C₆, aciloxi-1-etilo C₁-C₆, alcoxicarboniloximetilo C₁-C₆, o alcoxicarboniloxi-1-etilo C₁-C₆;

R₁ = COOR₄, R₄ = H, alquilo C₁₋₄, arilo C₁₋₄alquilo, morfolino-alquilo C₁-C₆, pirrolidino-alquilo C₁-C₆, N-metilpiperazino-alquilo C₁-C₆, aciloximetilo C₁-C₆, aciloxi C₁-C₆-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo C₁-C₆, alcoxicarboniloxi C₁-C₆-1-etilo u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

R₂ = H; R₃ = R₅; y

R₅ = R₆ = CONH-R₉;

o

(B)

R_a, R_b = H, acilo C₁₋₄, arilalquilo C₁₋₄, arilo C₆-C₁₀CO, HOOC(CH₂)_nCO, alquilo C₁-C₇NHCO, fosfona, fosfonooximetilo, aciloximetilo C₁-C₆, aciloxi-1-etilo C₁-C₆, alcoxicarboniloximetilo C₁-C₆, o alcoxicarboniloxi-1-etilo C₁-C₆;

R₁ = COOR₄, R₄ = H, alquilo C₁₋₄, arilo C₁₋₄alquilo, morfolino-alquilo C₁-C₆, pirrolidino-alquilo C₁-C₆, N-metilpiperazino-alquilo C₁-C₆, aciloximetilo C₁-C₆, aciloxi C₁-C₆-1-etilo, alcoxicarboniloximetilo C₁-C₆, alcoxicarboniloxi C₁-C₆-1-etilo u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

R₃ = H; R₂ = R₅; y

R₅ = R₆ = CONH-R₉;

o

en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

ácido 4-(2-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;

ácido 4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;

ácido 2,5-dihidroxi-4-(2-sulfofenilaminocarbonil)benzoico;

ácido 4-(3-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;

ácido 4-(3-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;

ácido 2,5-dihidroxi-4-(3-sulfofenilaminocarbonil)benzoico;

ácido 4-(4-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;

ácido 4-(4-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;

ácido 2,5-dihidroxi-4-(4-sulfofenilaminocarbonil)benzoico;

ácido 4-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;

ácido 4-(4-carboxi-3-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;

ácido 4-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;

ácido 4-(2-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;

ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-4-carboxibenzoilamino)benzoico;

ácido 3-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico;

ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)tereftálico;

ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isofáltico;

ácido 4-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico;

ácido 5-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isofáltico;

ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;

ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico;

ácido 6-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;

ácido 6-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;

ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)-5-fluoronicotínico;

- ácido 6-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)piridin-2,5-dicarboxílico;
 ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)piridin-3,5-dicarboxílico;
 ácido 3-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico;
 ácido 5-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;
 ácido 5-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;
 ácido 3-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;
 ácido 5-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)-2-fluoroisonicotínico;
 ácido 4-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;
 ácido 4-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;
 ácido 4-(4-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-(3-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 2,5-dihidroxi-4-(3-(1-hidroxi-1H-pirazol-4-il)fenilaminocarbonil)benzoico;
 ácido 4-(2-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 4-(2-(etoxicarbonil)fenilaminocarbonil)-2,5-diacetoxibenzoato de etilo;
 4-(2-(etoxicarbonil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoato de etilo;
 4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-diacetoxibenzoato de etilo;
 4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoato de etilo;
 2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3-(metoxicarbonil)fenilaminocarbonil)benzoato de etilo;
 3,5-bis(2,5-diacetoxi-4-etoxicarbonilbenzoilamino)benzoato de etilo;
 3,5-bis(2,5-dihidroxi-4-etoxicarbonilbenzoilamino)benzoato de etilo;
 3-(4-(etoxicarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotinato de etilo;
 4-(4-etoxicarbonil-2,5-dihidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoato de etilo;
 ácido 3-(2-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 2,5-dihidroxi-3-(2-sulfofenilaminocarbonil)benzoico;
 ácido 3-(3-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-(3-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 2,5-dihidroxi-3-(3-sulfofenilaminocarbonil)benzoico;
 ácido 3-(4-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-(4-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 2,5-dihidroxi-3-(4-sulfofenilaminocarbonil)benzoico;
 ácido 3-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-(4-carboxi-3-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-(2-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-3-carboxibenzoilamino)benzoico;
 ácido 3-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico;
 ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)tereftálico;
 ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isofotálico;
 ácido 4-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico;
 ácido 5-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isofotálico;
 ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;
 ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico;
 ácido 6-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;
 ácido 6-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;
 ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)-5-fluoronicotínico;
 ácido 6-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)piridin-2,5-dicarboxílico;
 ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)piridin-3,5-dicarboxílico;
 ácido 3-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico;
 ácido 5-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;
 ácido 5-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;
 ácido 3-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;
 ácido 5-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)-2-fluoroisonicotínico;
 ácido 4-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;
 ácido 4-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;
 ácido 3-(4-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-(3-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 2,5-dihidroxi-3-(3-(1-hidroxi-1H-pirazol-4-il)fenilaminocarbonil)benzoico;
 ácido 3-(2-(carboximetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 3-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoato de etilo; y
 3-(2-(etoxicarbonilmetil)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoato de etilo;

4. El compuesto según la reivindicación 2, en donde:

(A)

$R_a, R_b = H$;

$R_1 = \text{SO}_3\text{H}$;
 $R_2 = \text{H}$; $R_3 = R_5$; y
 $R_5 = R_6 = \text{CONH-R}_9$;

o

(B)

$R_a, R_b = \text{H}$;
 $R_1 = \text{SO}_3\text{H}$;
 $R_3 = \text{H}$; $R_2 = R_5$; y
 $R_5 = R_6 = \text{CONH-R}_9$;

o

en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)benzoico;
 ácido 2,5-dihidroxi-4-(2-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico;
 ácido 3-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)benzoico;
 ácido 2,5-dihidroxi-4-(3-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico;
 ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)benzoico;
 ácido 2,5-dihidroxi-4-(4-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico;
 ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)-2-hidroxibenzoico;
 ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)-2-hidroxibenzoico;
 ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)-5-hidroxibenzoico;
 ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)benzoico;
 ácido 3-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)ftálico;
 ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)tereftálico;
 ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)isofáltico;
 ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)ftálico;
 ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)isofáltico;
 ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)nicotínico;
 ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)isonicotínico;
 ácido 6-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)nicotínico;
 ácido 6-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)picolínico;
 ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)-5-fluoronicotínico;
 ácido 6-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)piridin-2,5-dicarboxílico;
 ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)piridin-3,5-dicarboxílico;
 ácido 3-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)isonicotínico;
 ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)nicotínico;
 ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)picolínico;
 ácido 3-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)picolínico;
 ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)-2-fluoroisonicotínico;
 ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)nicotínico;
 ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)picolínico;
 ácido (4-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)fenil)acético;
 ácido (3-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)fenil)acético;
 ácido (2-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)fenil)acético;
 ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)benzoico;
 ácido 2,5-dihidroxi-3-(2-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico;
 ácido 3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)benzoico;
 ácido 2,5-dihidroxi-3-(3-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico;
 ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)benzoico;
 ácido 2,5-dihidroxi-3-(4-sulfofenilaminocarbonil)bencenosulfónico;
 ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-2-hidroxibenzoico;
 ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-2-hidroxibenzoico;
 ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-5-hidroxibenzoico;
 ácido 3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-5-(2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)benzoico;
 ácido 3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)ftálico;
 ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)tereftálico;
 ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)isofáltico;
 ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)ftálico;
 ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)isofáltico;
 ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)nicotínico;
 ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)isonicotínico;

ácido 6-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)nicotínico;
 ácido 6-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)picolínico;
 ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-5-fluoronicotínico;
 ácido 6-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)piridin-2,5-dicarboxílico;
 ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)piridin-3,5-dicarboxílico;
 ácido 3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)isonicotínico;
 ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)nicotínico;
 ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)picolínico;
 ácido 3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)picolínico;
 ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)-2-fluoroisonicotínico;
 ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)nicotínico;
 ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)picolínico;
 ácido (4-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)fenil)acético;
 ácido (3-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)fenil)acético; y
 ácido (2-(2,5-dihidroxi-3-sulfobenzamido)fenil)acético.

5. El compuesto según la reivindicación 2, en donde:

(A)

$R_a, R_b = H$,
 $R_1 = (CH_2)_nCOOR_4$; $R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_1-C_6 , pirrolidino-alquilo C_1-C_6 ,
 N-metilpiperazino-alquilo C_1-C_6 , aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6 -1-etilo, alcocarboniloximetilo C_1-C_6 ,
 alcocarboniloxi C_1-C_6 -1-etilo u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo (éster de guayacol);
 $R_2 = H$ o R_5 , $R_3 = R_5$; y
 $R_5 = R_6 = CONH-R_9$;

O
 (B)

$R_a, R_b = H$;
 $R_1 = (CH_2)_nCOOR_4$; $R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_1-C_6 , pirrolidino-alquilo C_1-C_6 ,
 N-metilpiperazino-alquilo C_1-C_6 , aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6 -1-etilo, alcocarboniloximetilo C_1-C_6 ,
 alcocarboniloxi C_1-C_6 -1-etilo u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo (éster de guayacol);
 $R_3 = H$; $R_2 = R_5$; y
 $R_5 = R_6 = CONH-R_9$;
 o en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico;
 ácido (2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético;
 ácido (2,5-dihidroxi-4-(2-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético;
 ácido 3-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico;
 ácido (2,5-dihidroxi-4-(3-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético;
 ácido 4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico;
 ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-(4-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético;
 ácido 5-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico;
 ácido 4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico;
 ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-5-hidroxibenzoico;
 ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-4-carboximetilbenzoilamino)benzoico;
 ácido 3-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico;
 ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)tereftálico;
 ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isofotálico;
 ácido 4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico;
 ácido 5-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isofotálico;
 ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;
 ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico;
 ácido 6-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;
 ácido 6-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;
 ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-5-fluoronicotínico;
 ácido 6-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)piridin-2,5-dicarboxílico;
 ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)piridin-3,5-dicarboxílico;
 ácido 3-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico;
 ácido 5-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;
 ácido 5-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;
 ácido 3-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;

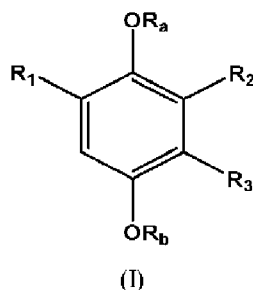
- ácido 5-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-fluoroisonicotínico;
 ácido 4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;
 ácido 4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;
 ácido (4-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético;
 ácido (3-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético;
 ácido (2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético;
 2-(4-(etoxicarbonilmetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoato de metilo;
 (4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acetato de etilo;
 5-(4-(etoxicarbonilmetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isofталato de dietilo;
 3,5-bis(4-(etoxicarbonilmetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoato de metilo;
 ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico;
 ácido (2,5-dihidroxi-3-(2-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético;
 ácido 3-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico;
 ácido (2,5-dihidroxi-3-(3-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético;
 ácido 4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)benzoico;
 ácido (2,5-dihidroxi-3-(4-sulfofenilaminocarbonil)fenil)acético;
 ácido 5-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico;
 ácido 4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico;
 ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-5-hidroxibenzoico;
 ácido 3,5-bis(2,5-dihidroxi-3-carboximetilbenzoilamino)benzoico;
 ácido 3-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico;
 ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)tereftálico;
 ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isofталico;
 ácido 4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)ftálico;
 ácido 5-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isofталico;
 ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;
 ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico;
 ácido 6-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;
 ácido 6-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;
 ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-5-fluoronicotínico;
 ácido 6-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)piridin-2,5-dicarboxílico;
 ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)piridin-3,5-dicarboxílico;
 ácido 3-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)isonicotínico;
 ácido 5-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;
 ácido 5-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;
 ácido 3-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;
 ácido 5-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-fluoroisonicotínico;
 ácido 4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)nicotínico;
 ácido 4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)picolínico;
 ácido (4-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético;
 ácido (3-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético; y
 ácido (2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxibenzamido)fenil)acético.
6. El compuesto según la reivindicación 2, en donde:
- (A)
- $R_a, R_b = H$, acilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , arilo $C_6-C_{10}CO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, alquilo C_1-C_7NHCO ,
 fosfono, fosfonooximetilo, aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi-1-etilo C_1-C_6 , alcoxicarboniloximetilo C_1-C_6 ,
 o alcoxicarboniloxi-1-etilo C_1-C_6 ;
 $R_1 = CONH-R_{10}$; $R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_1-C_6 , pirrolidino-alquilo C_1-C_6 , N-
 metilpiperazino-alquilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6 metilo, aciloxi C_1-C_6 -1-etilo, alcoxicarboniloxi C_1-C_6 metilo,
 alcoxicarboniloxi C_1-C_6 -1-etilo u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo (éster de guayacol);
 $R_2 = H$; $R_3 = R_5$; y
 $R_5 = R_6 = CONH-R_9$;
- O
- (B)
- $R_a, R_b = H$, acilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , arilo $C_6-C_{10}CO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, alquilo C_1-C_7NHCO ,
 fosfono, fosfonooximetilo, aciloximetilo C_1-C_6 , aciloxi-1-etilo C_1-C_6 , alcoxicarboniloximetilo C_1-C_6 ,
 o alcoxicarboniloxi-1-etilo C_1-C_6 ;
 $R_1 = CONH-R_{10}$; $R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_1-C_6 , pirrolidino-alquilo C_1-C_6 , N-
 metilpiperazino-alquilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6 metilo, aciloxi C_1-C_6 -1-etilo, alcoxicarboniloxi C_1-C_6 metilo,
 alcoxicarboniloxi C_1-C_6 -1-etilo u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

R₃ = H; R₂ = R₅; y
R₅ = R₆ = CONH-R₉.
o

en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

ácido 5-(4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico;
N₁,N₄-bis(2-(1H-tetrazol-5-il)fenil)-2,5-dihidroxitereftalamida;
ácido 5-(4-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico;
ácido 5-(2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3-sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-2-hidroxibencenosulfónico;
ácido 4-(4-(4-carboxi-3-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico;
ácido 4-(2,5-dihidroxi-4-(3-hidroxi-4-sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-2-hidroxibencenosulfónico;
ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-2-carboxifenilaminocarbonil)benzamido)-5-hidroxibenzoico;
ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-2-sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-5-hidroxibencenosulfónico;
5-(4-(2-(1H-tetrazol-5-il)fenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoato de metilo;
5-(2,5-diacetoxi-4-(4-acetoxi-3-(metoxycarbonil)fenilaminocarbonil)benzamido)-2-acetoxibenzoato de metilo;
5-(2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3-(metoxycarbonil)fenilaminocarbonil)benzamido)-2-hidroxibenzoato de metilo;
2-(2,5-dihidroxi-4-(4-hidroxi-2-(metoxycarbonil)fenilaminocarbonil)benzamido)-5-hidroxibenzoato de metilo;
5-[[4-[3-[1-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etoxycarbonil]-4-hidroxifenil]aminocarbonil]-2,5-dihidroxibenzoil]amino]-2-hidroxibenzoato de 5-(2,2-dimetilpropanoiloxi)etilo;
ácido 5-(3-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico;
ácido 5-(2,5-dihidroxi-3-(4-hidroxi-3-sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-2-hidroxibencenosulfónico;
ácido 4-(3-(3-hidroxi-4-carboxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico;
ácido 4-(2,5-dihidroxi-3-(3-hidroxi-4-sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-2-hidroxibencenosulfónico;
ácido 2-(3-(2-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-5-hidroxibenzoico; y
ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-(4-hidroxi-2-sulfofenilaminocarbonil)benzamido)-5-hidroxibencenosulfónico.

7. El compuesto según la reivindicación 2 que tiene la fórmula (I):

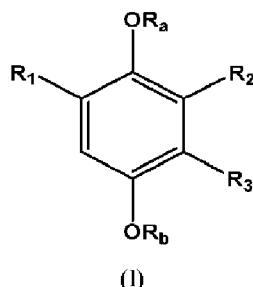


en donde:

R_a, R_b = H;
R₁ = CONH-R₁₀;
R₁₀ = fenilo sustituido con COOR₄ y con OR₄;
R₂ = H;
R₃ = CONH-R₉;
R₉ = fenilo sustituido con COOR₄ y con OR₄; y

$R_4 = H$;
y en donde dicho compuesto es el ácido 5-(4-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico.

8. El compuesto según la reivindicación 2 que tiene la fórmula (I):



en donde:

$R_a, R_b = H$;
 $R_1 = CONH-R_{10}$;
 $R_{10} =$ fenilo sustituido con $COOR_4$ y con OR_4 ;
 $R_2 = CONH-R_9$;
 $R_3 = H$;
 $R_9 =$ fenilo sustituido con $COOR_4$ y con OR_4 ; y
 $R_4 = H$;
y en donde dicho compuesto es el ácido 5-(3-(3-carboxi-4-hidroxifenilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzamido)-2-hidroxibenzoico.

9. El compuesto según la reivindicación 2, en donde:

(A)

$R_a, R_b = H$;
 $R_1 = COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; $R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_1-C_6 , pirrolidino-alquilo C_1-C_6 , N-metilpiperazino-alquilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6 metilo, aciloxi C_1-C_6-1 -etilo, alcoxicarboniloxi C_1-C_6 metilo, alcoxicarboniloxi C_1-C_6-1 -etilo u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo (éster de guayacol);
 $R_2 = H$; $R_3 = R_5$; y
 $R_5 = R_6 = CONHCOR_9$;

o

(B)

$R_a, R_b = H$;
 $R_1 = COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; $R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_1-C_6 , pirrolidino-alquilo C_1-C_6 , N-metilpiperazino-alquilo C_1-C_6 , aciloxi C_1-C_6 metilo, aciloxi C_1-C_6-1 -etilo, alcoxicarboniloxi C_1-C_6 metilo, alcoxicarboniloxi C_1-C_6-1 -etilo u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo (éster de guayacol);
 $R_3 = H$; $R_2 = R_5$; y
 $R_5 = R_6 = CONHCOR_9$;
o en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

N-(1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexilcarbonil)4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida;
N-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida;
N-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida;
N-(3,4-dihidroxibenzoil)4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida;
N-(3,5-dihidroxibenzoil)4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida;
N-(1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexilcarbonil)3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida;
N-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)4-carboxi-2,5-dihidroxi-benzamida;
N-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)4-carboxi-2,5-dihidroxi-benzamida;
N-(3,4-dihidroxibenzoil)3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida;
N-(3,5-dihidroxibenzoil)3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida;

N-(1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexilcarbonil)4-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida;
 N-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)4-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida;
 N-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)4-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida;
 N-(3,4-dihidroxibenzoil)4-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida;
 N-(3,5-dihidroxibenzoil)4-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida;
 N-(1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexilcarbonil)3-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida;
 N-(4-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)4-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida;
 N-(3-carboxi-2,5-dihidroxibenzoil)4-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida;
 N-(3,4-dihidroxibenzoil)3-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida; y
 N-(3,5-dihidroxibenzoil)3-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida.

10. Un compuesto según la reivindicación 2, en donde

(A)

$R_a, R_b = H$;
 $R_1 = COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; $R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_{1-C_6} ,
 pirrolidino-alquilo C_{1-C_6} , N-metilpiperazino-alquilo C_{1-C_6} , aciloxi C_{1-C_6} metilo, aciloxi C_{1-C_6-1} -etilo,
 alcocarboniloxi C_{1-C_6} metilo, alcocarboniloxi C_{1-C_6-1} -etilo u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo
 (éster de guayacol);
 $R_2 = H$; $R_3 = R_5$; y
 $R_5 = R_6 = CONH(CH_2)_n-R_9$;

O
 (B)

$R_a, R_b = H$;
 $R_1 = COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; $R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_{1-C_6} ,
 pirrolidino-alquilo C_{1-C_6} , N-metilpiperazino-alquilo C_{1-C_6} , aciloxi C_{1-C_6} metilo, aciloxi C_{1-C_6-1} -etilo,
 alcocarboniloxi C_{1-C_6} metilo, alcocarboniloxi C_{1-C_6-1} -etilo u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo
 (éster de guayacol);
 $R_3 = H$; $R_2 = R_5$; y
 $R_5 = R_6 = CONH(CH_2)_n-R_9$;
 o en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

ácido 4-(3,4-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-(2-(3,4-dihidroxifenil)etilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-(3,5-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 2,5-dihidroxi-4-((3,4,5-trihidroxiciclohexil)metilaminocarbonil)benzoico;
 ácido 4-(2-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-(3-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-(4-carboxifenilmetilaminocarbonil) 2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-(3,4-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-(2-(3,4-dihidroxifenil)etilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-(3,5-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 2,5-dihidroxi-3-((3,4,5-trihidroxiciclohexil)metilaminocarbonil)benzoico;
 ácido 3-(2-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-(4-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-(4-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido (4-(3,4-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético;
 ácido (4-(3,5-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético;
 ácido (4-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético;
 ácido (2,5-dihidroxi-4-((3,4,5-trihidroxiciclohexil)metilaminocarbonil)fenil)acético;
 ácido (4-(2-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético;
 ácido (4-(3-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético;
 ácido (4-(4-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético;
 ácido (3-(3,4-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético;
 ácido (3-(3,5-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético;
 ácido (3-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético;
 ácido (2,5-dihidroxi-3-((3,4,5-trihidroxiciclohexil)metilaminocarbonil)fenil)acético;
 ácido (3-(2-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético;
 ácido (3-(3-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético; y
 ácido (3-(4-carboxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético.

11. El compuesto según la reivindicación 2, en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

N-(1,3,4,5-tetrahidroxyciclohexilcarbonil)4-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida;
 N-(1,3,4,5-tetrahidroxyciclohexilcarbonil)3-carboxi-2,5-dihidroxibenzamida;
 N-(1,3,4,5-tetrahidroxyciclohexilcarbonil)4-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida;
 N-(1,3,4,5-tetrahidroxyciclohexilcarbonil)3-carboximetil-2,5-dihidroxibenzamida;
 ácido 4-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 2,5-dihidroxi-4-((3,4,5-trihidroxyciclohexil)metilaminocarbonil)benzoico;
 ácido 3-(3,5-dihidroxifenilmetilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético;
 ácido (2,5-dihidroxi-4-((3,4,5-trihidroxyciclohexil)metilaminocarbonil)fenil)acético;
 ácido 3-((4,5-dihidroxi-3-oxociclohex-1-enil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético; y
 ácido (2,5-dihidroxi-3-((3,4,5-trihidroxyciclohexil)metilcarbonilamino)fenil)acético.

12. El compuesto según la reivindicación 2, en donde:

$R_a, R_b = H$;
 $R_1 = SO_3H$;
 $R_2 = H$; $R_3 = R_5$; y
 $R_5 = R_6 = CONH(CH_2)_nR_9$;
 o en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

ácido 2-((2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)metil)benzoico;
 ácido 3-((2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)metil)benzoico; y
 ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfobenzamido)metil)benzoico.

13. El compuesto según la reivindicación 2, en donde:

(A)

$R_a, R_b = H$;
 $R_1 = COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; $R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_{1-C_6} ,
 pirrolidino-alquilo C_{1-C_6} , N-metilpiperazino-alquilo C_{1-C_6} , aciloxi C_{1-C_6} metilo, aciloxi C_{1-C_6} -1-etilo,
 alcocarboniloxi C_{1-C_6} metilo, alcocarboniloxi C_{1-C_6} -1-etilo u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo
 (éster de guayacol);
 $R_2 = H$; $R_3 = R_5$; y
 $R_5 = R_6 = CONHCH(COOR_4)(CH_2)_kR_9$;

o

(B)

$R_a, R_b = H$;
 $R_1 = COOR_4$; $(CH_2)_nCOOR_4$; $R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_{1-C_6} ,
 pirrolidino-alquilo C_{1-C_6} , N-metilpiperazino-alquilo C_{1-C_6} , aciloxi C_{1-C_6} metilo, aciloxi C_{1-C_6} -1-etilo,
 alcocarboniloxi C_{1-C_6} metilo, alcocarboniloxi C_{1-C_6} -1-etilo u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo
 (éster de guayacol);
 $R_3 = H$; $R_2 = R_5$; y
 $R_5 = R_6 = CONHCH(COOR_4)(CH_2)_kR_9$;
 o en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

ácido 4-(1-carboxi-2-(3,4-dihidroxifenil)etilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-(carboxi(3,4-dihidroxifenil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-(1-carboxi-2-(3,4-dihidroxifenil)etilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico ácido 3-
 (carboxi(3,4-dihidroxifenil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-(carboxi(3,4-dihidroxifenil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético; y
 ácido 3-(carboxi(3,4-dihidroxifenil)metilaminocarbonil)-2,5-dihidroxifenil)acético.

14. El compuesto según la reivindicación 2, en donde:

(A)

$R_a, R_b = H$;
 $R_1 = COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, SO_3H , $(CH_2)_nSO_3H$, $CONH-R_{10}$;

$R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_{1-6} , pirrolidino-alquilo C_{1-6} , N-metilpiperazino-alquilo C_{1-6} , aciloximetilo C_{1-6} , aciloxi C_{1-6} -1-etilo, alcóxicarboniloximetilo C_{1-6} , alcóxicarboniloxi C_{1-6} -1-etilo, u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

$R_2 = H$; $R_3 = R_5$; y

$R_5 = R_7 =$ benzoheteroarilo sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de: $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, SO_3H , $(CH_2)_nSO_3H$, OR_4 , heterociclos de 5 miembros que contienen N, o flúor;

o
(B)

$R_a, R_b = H$;

$R_1 = COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, SO_3H , $(CH_2)_nSO_3H$, $CONH-R_{10}$;

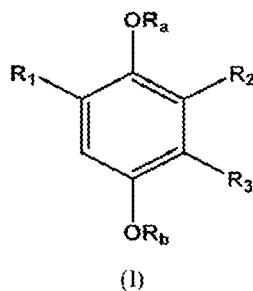
$R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_{1-6} , pirrolidino-alquilo C_{1-6} , N-metilpiperazino-alquilo C_{1-6} , aciloximetilo C_{1-6} , aciloxi C_{1-6} -1-etilo, alcóxicarboniloximetilo C_{1-6} , alcóxicarboniloxi C_{1-6} -1-etilo, u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

$R_3 = H$; $R_2 = R_5$; y

$R_5 = R_7 =$ benzoheteroarilo sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de: $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, SO_3H , $(CH_2)_nSO_3H$, OR_4 , heterociclos que contienen N de 5 miembros, o flúor; o en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico;
2-(4-etoxicarbonil-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxilato de metilo;
ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico;
ácido 2-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico;
ácido 2-(2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico;
ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico;
ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico;
ácido 2-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico;
ácido 2-(2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico;
ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico;
ácido 2-(4-(carboximetil)-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico;
ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-4-carboxílico; y
ácido 2-(3-(carboximetil)-2,5-dihidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxílico.

15. El compuesto de fórmula (I), según la reivindicación 1:



en donde:

$R_a, R_b = H$, acilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , arilo $C_6-C_{10}CO$, $HOOC(CH_2)_nCO$, alquilo $C_{1-7}NHCO$, fosfono, fosfonooximetilo, aciloximetilo C_{1-6} , aciloxi-1-etilo C_{1-6} , alcóxicarboniloximetilo C_{1-6} , o alcóxicarboniloxi-1-etilo C_{1-6} ;

$R_1 = COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, SO_3H , $(CH_2)_nSO_3H$, o $CONH-R_{10}$;

uno de R_2 o R_3 es H y el otro es R_5 ;

$R_4 = H$, alquilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo C_{1-6} , pirrolidino-alquilo C_{1-6} , N-metilpiperazino-alquilo C_{1-6} , aciloxi C_{1-6} metilo, aciloxi C_{1-6} -1-etilo, alcóxicarboniloxi C_{1-6} metilo, alcóxicarboniloxi C_{1-6} -1-etilo u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo (éster de guayacol);

$R_5 = R_8$

$R_8 = (CH_2)_mX(CH_2)_pR_9$;

$X = O, S, SO_2, NH, NAc$, o $N(CH_2)_qR_9$;

$R_9 =$ arilo, heteroarilo, sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de $COOR_4$, $(CH_2)_nCOOR_4$, $(CH_2)_nSO_3H$, OR_4 , SO_3H , heterociclos de 5 miembros que contienen N, flúor, $C=O$ o $NHCO-R_{10}$;

R_{10} = arilo, heteroarilo, sustituido con al menos uno o más grupos seleccionados de COOR_4 , $(\text{CH}_2)_n\text{COOR}_4$, $(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$, OR_4 , SO_3H , heterociclos de 5 miembros que contienen N, o flúor; en donde el arilo de R_9 y R_{10} es un grupo aromático que contiene de 6 a 14 átomos de carbono, seleccionado entre el grupo fenilo, naftilo o bifenilo; y el heteroarilo R_9 y R_{10} es un grupo aromático que contiene de 1 a 14 átomos de carbono y uno o más de nitrógeno; y n , m , p y q son un número entero independientemente igual a 1-4.

16. El compuesto según la reivindicación 14, en donde:

(A)

R_a , R_b = H, acilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , arilo $\text{C}_6\text{-C}_{10}\text{CO}$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{CO}$, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_7\text{NHCO}$, fosfona, fosfonooximetilo, aciloximetilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, aciloxi-1-etilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, alcocixarboniloximetilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, o alcocixarboniloxi-1-etilo $\text{C}_1\text{-C}_6$;
 R_1 = COOR_4 , $(\text{CH}_2)_n\text{COOR}_4$, SO_3H , $(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$, CONH-R_{10} ;
 R_4 = H, alquilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, pirrolidino-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, N-metilpiperazino-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, aciloximetilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, aciloxi $\text{C}_1\text{-C}_6$ -1-etilo, alcocixarboniloximetilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, alcocixarboniloxi $\text{C}_1\text{-C}_6$ -1-etilo, u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo (éster de guayacol);
 R_2 = H; R_3 = R_5 ; y
 R_5 = R_8 = $(\text{CH}_2)_m \text{X} (\text{CH}_2)_p \text{R}_9$;
 en donde X = O, S, SO_2 , NH, NAc, o $\text{N}(\text{CH}_2)_q \text{R}_9$;

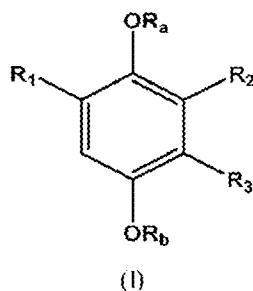
o
 (B)

R_a , R_b = H, acilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , arilo $\text{C}_6\text{-C}_{10}\text{CO}$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{CO}$, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_7\text{NHCO}$, fosfona, fosfonooximetilo, aciloximetilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, aciloxi-1-etilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, alcocixarboniloximetilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, o alcocixarboniloxi-1-etilo $\text{C}_1\text{-C}_6$;
 R_1 = COOR_4 , $(\text{CH}_2)_n\text{COOR}_4$, SO_3H , $(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$, CONH-R_{10} ;
 R_4 = H, alquilo C_{1-4} , arilalquilo C_{1-4} , morfolino-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, pirrolidino-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, N-metilpiperazino-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, aciloxi $\text{C}_1\text{-C}_6$ metilo, aciloxi $\text{C}_1\text{-C}_6$ -1-etilo, alcocixarboniloxi $\text{C}_1\text{-C}_6$ metilo, alcocixarboniloxi $\text{C}_1\text{-C}_6$ -1-etilo u (oxodioxolil)metilo; o-metoxifenilo (éster de guayacol);
 R_3 = H; R_2 = R_5 ; y
 R_5 = R_8 = $(\text{CH}_2)_m \text{X} (\text{CH}_2)_p \text{R}_9$;
 en donde X = O, S, SO_2 , NH, NAc, o $\text{N}(\text{CH}_2)_q \text{R}_9$;
 o en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

bis(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina;
 ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetilamino)metil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetilamino)metil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 bis(2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetil)amina;
 N,N-bis(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida;
 N-(2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetil)N-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida;
 N-(2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetil)N-(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida;
 N,N-bis(2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetil)acetamida;
 ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-carboxifenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-carboxifenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibencenosulfónico;
 ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-carboxifenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 4-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibencenosulfónico;
 tris(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina;
 tris(4-etoxicarbonil-2,5-dihidroxifenilmetil)amina;
 bis(3-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina;
 ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetilamino)metil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetilamino)metil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 bis(2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetil)amina;
 N,N-bis(3-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida;

N-(2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetil)N-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida;
 N-(2,5-dihidroxi-4-sulfofenilmetil)N-(3-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)acetamida;
 N,N-bis(2,5-dihidroxi-3-sulfofenilmetil)acetamida;
 ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-carboxifenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metiltiometil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibencenosulfónico;
 ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-carboxifenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibencenosulfónico;
 ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-carboxifenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-((2,5-dihidroxi-4-sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibenzoico;
 ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-sulfofenil)metoximetil)-2,5-dihidroxibencenosulfónico;
 3-((2,5-diacetoxi-3-metoxicarbonilfenil)metilsulfonilmetil)-2,5-diacetoxibenzoato de metilo;
 3-((2,5-dihidroxi-3-metoxicarbonilfenil)metilsulfonilmetil)-2,5-hidroxibenzoato de metilo;
 3-((2,5-dihidroxi-3-(2-morfolinoetoxicarbonil)fenil)metilsulfonilmetil)-2,5-hidroxibenzoato de
 2-morfolinoetilo;
 tris(3-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina; y
 tris(3-etoxicarbonil-2,5-dihidroxifenilmetil)amina.

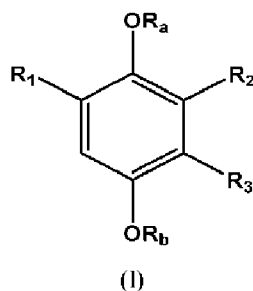
17. El compuesto según la reivindicación 2, que tiene la fórmula (I):



en donde:

$R_a, R_b = H$;
 $R_1 = COOR_4$;
 $R_2 = H$;
 $R_3 = R_8$;
 $R_4 = H$;
 $R_8 = (CH_2)_m X (CH_2)_p R_9$;
 $R_9 = \text{fenilo sustituido con } COOR_4 \text{ y con } OR_4$;
 $X = N(CH_2)_q R_9$; y
 $m, p \text{ y } q = 1$; y
 en donde dicho compuesto es tris(4-carboxi-2,5-dihidroxifenilmetil)amina.

18. El compuesto según la reivindicación 2, que tiene la fórmula (I):



en donde:

$R_a, R_b = H$;
 $R_1 = COOR_4$;

$$R_2 = (CH_2)_m X (CH_2)_p R_9$$

$$R_3 = H;$$

$$R_9 = \text{fenilo sustituido con } COOR_4 \text{ y con } OR_4;$$

$$R_4 = H;$$

$$X = SO_2; y$$

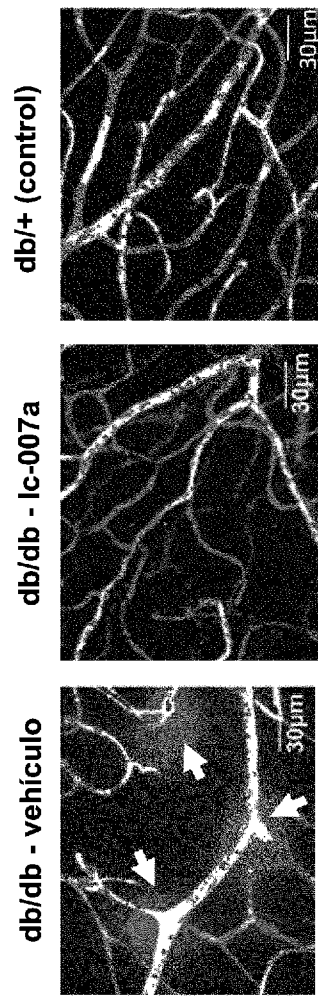
$$m \text{ y } p = 1;$$

y dicho compuesto es el ácido 3-((2,5-dihidroxi-3-carboxifenil)metilsulfonilmetil)-2,5-dihidroxibenzoico.

19. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-18 o una sal farmacéuticamente aceptable, o un estereoisómero del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
20. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-19 es para usar en un método de tratamiento y/o prevención de trastornos autoinmunitarios, inmunológicos, reumatológicos, vasculares, oftalmológicos, fibróticos, metabólicos y gastrointestinales, enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas, neoplasias y trastornos asociados al cáncer, enfermedades relacionadas con hormonas o trastornos inmunológicos derivados de enfermedades infecciosas virales y/o bacterianas y/o complicaciones de las mismas.
21. Productos intermedios en la síntesis de compuestos según la reivindicación 2, escogiéndose dichos productos intermedios entre el ácido 2,5-bis(benciloxi)-4-(etoxicarbonil)benzoico; 2,5-bis(benciloxi)isofthalaldehído; ácido 2,5-bis(benciloxi)isoftálico; 2,5-bis(benciloxi)-4-(hidroximetil)benzoato de etilo; o 2,5-bis(benciloxi)-3-(hidroximetil)benzoato de etilo.

Figura 1

A)



B)

Número de extravasaciones por campo (0,44 mm²)

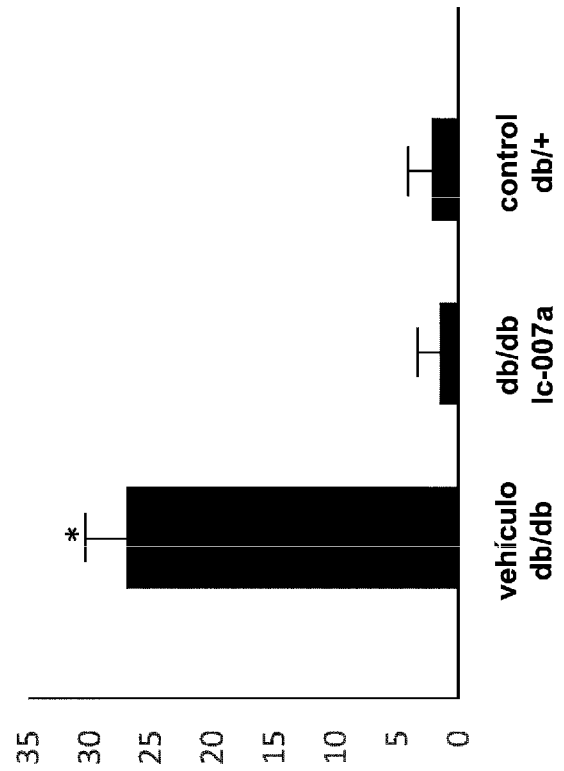


Figura 2

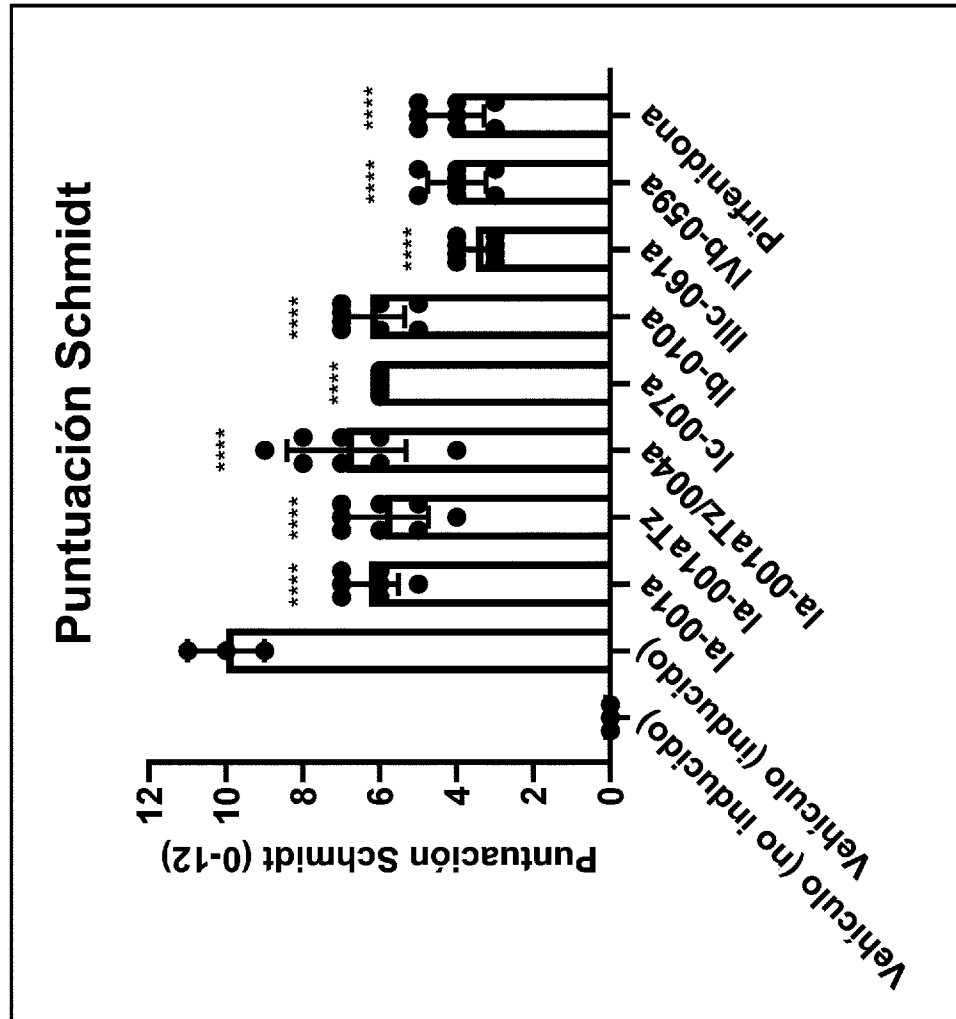
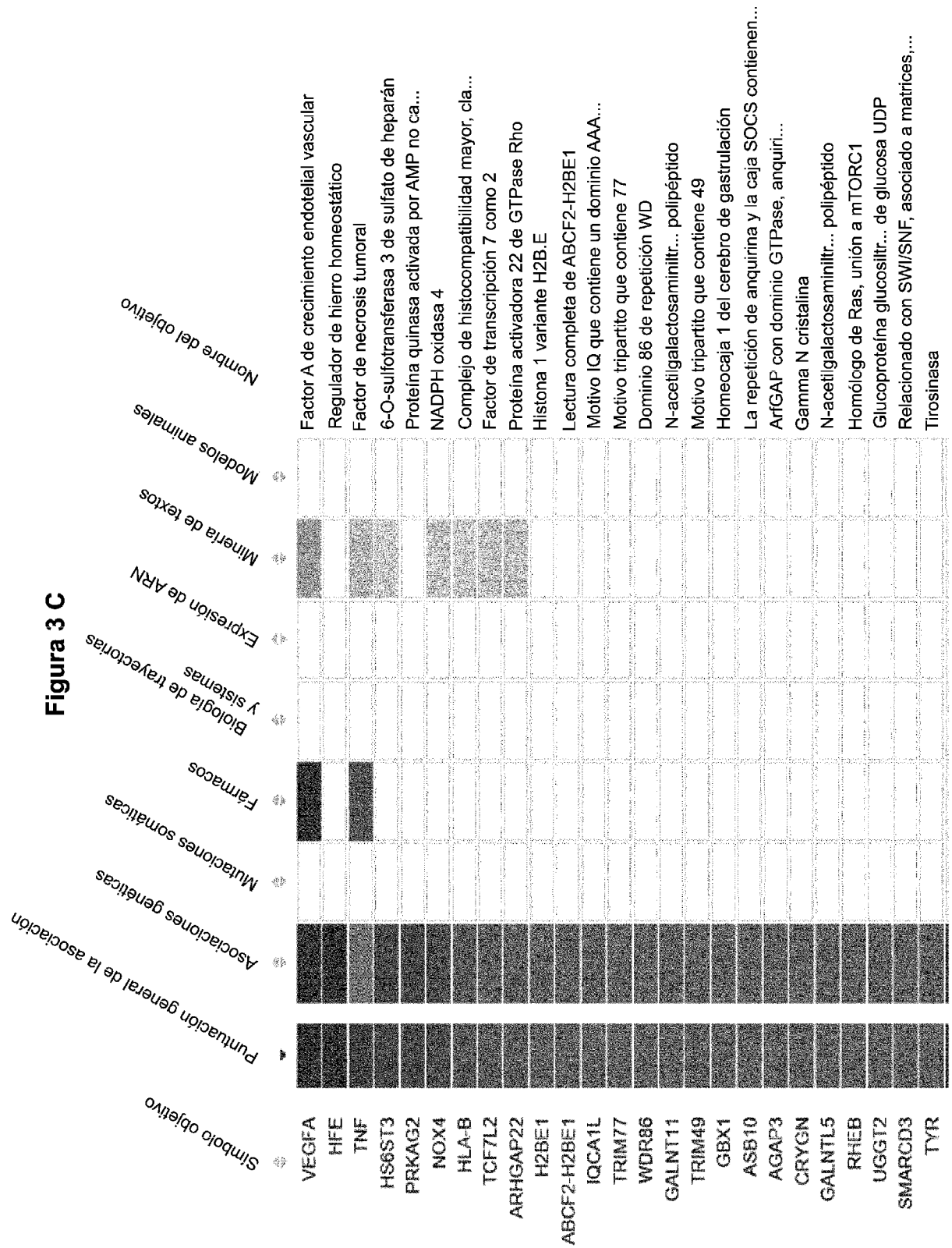


Figura 3 A

Citocinas	IL-1b	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-9	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-14	IL-15	IL-17A	IL-17F	IL-18	IL-21	IL-22	IL-23	IL-33	IFN γ	IFNb	TNF α	TGFbeta	TNFbeta	MCP-1	MMPs
Enfermedades																												
ALL/AML		X	X	X	X	X		X	X			X		X														
Asma alérgica	X	X	X	X	X	X			X			X		X			X						X					
Rinitis alérgica				X						X							X							X	X			
Alzheimer	X																X							X				
Espondilitis anquilosante															X									X				X
Arteriosclerosis																												
Dermatitis atópica					X		X			X				X			X					X		X				
Infecciones bacterianas	X																											
Enfermedad de Behcet																		X										
Cáncer	X	X	X							X	X							X	X	X		X		X				
Patologías cardiovasculares																									X			
CLL				X																								
COPD	X				X			X																				
Enfermedad de Crohn																					X		X					
Fibrosis quística								X									X											
Diabetes				X			X			X												X						
GI eosinofílico					X																							
Encefalomiелitis autoinmune experimental																					X							
Fibrosis						X						X													X			
Alergia alimentaria									X																			
GHVD																												
Artritis de células gigantes																												
Gota	X					X		X																X				X
Enfermedad de Grave	X																											

	IL-1b	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-9	IL-10	IL-12p70	IL-13	IL-14	IL-15	IL-17A	IL-17F	IL-18	IL-21	IL-22	IL-23	IL-33	IFN γ	IFNb	TNF α	TCFBeta	TNFBeta	MCP-1	Citocinas
Enfermedades									x																			
Infecciones por helmintos	x						x			x	x			x	x	x				x								
Enfermedad intestinal inflamatoria																												
Artritis idiopática juvenil JID SIDA, enfermedad autoinflamatoria que incluye la enfermedad de Still	x					x																		x				
Linfoma													x															
Eslerosis múltiple	x						x							x			x						x					
Infección miocárdica	x																											
Osteoartritis	x							x																				x
Pancreatitis						x		x							x									x				
Infecciones parasitarias			x																		x							
Psoriasis	x					x		x			x			x	x	x		x					x					
Artritis psoriásica																												
Artritis reumatoide	x					x	x	x		x				x	x	x		x	x			x	x					
Síndrome de Sjögren													x															
Lupus eritematoso sistémico					x				x			x	x	x				x					x					
Eslerosis sistémica																								x				
Enfermedades autoinmunes mediadas por células T		x																										
Colitis ulcerosa									x															x				
Enfermedades vasculares																												
Infecciones virales	x																						x					



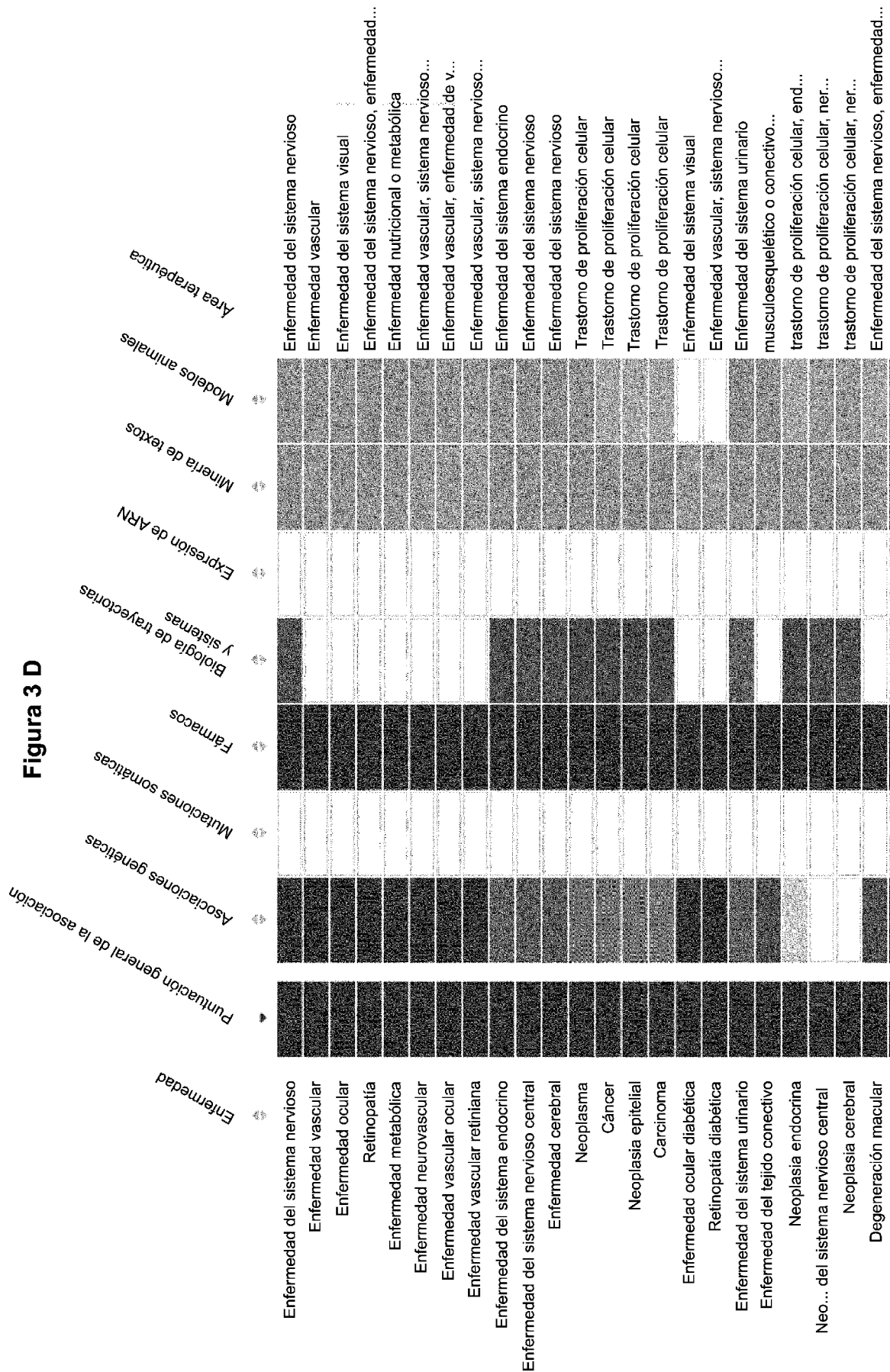


Figura 4A

Productos de KI-1 y KI-6										
ArCOOH	R-NH ₂	Condiciones de acoplamiento	Rendimiento	Condiciones-A de desprotección	Rendimiento	Condiciones-B de desprotección	Rendimiento	Procedimiento de purificación	Producto final (cantidad, rendimiento)	Comentarios
KI-1 (12,95 g)		TCFH (1,2 eq) NMI (5 eq) MeCN	86 %	LiOH (4 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 36 h, T° = 23 °C	89 %	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 48 h, T° = 23 °C	84 %	Trituración con MeCN	la-001a (13,4 g, 36 %)	
KI-1 (53 g)		TCFH (1,2 eq) NMI (5 eq) MeCN	86 %	LiOH (4 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 26 h, T° = 23 °C	Cuantitativo.	H ₂ , tiempo de Pd/C THF/EtOH = 18 h, T° = 23 °C	82 %	Trituración con MeCN y Et ₂ O	la-001aTz (30 g, 40 %)	
KI-1 (1 g)		1) SOCl ₂ (27 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (2,2 eq), DMF	43 %	LiOH (5 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 18 h, T° = 23 °C	86 %	H ₂ , tiempo de Pd/C EtOAc = 18 h, T° = 23 °C	80 %	Tratamiento normal	la-001c (95 mg, 17 %)	
KI-1 (203 mg)		1) SOCl ₂ (49 eq) DCM, 50 °C, 4h 2) DIPEA (1,1 eq) DCM	62 %	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 1,5h, T° = 23 °C	57 %	NaOH acuoso (22 eq) 2 h, después HCl 1N T° = 23 °C	60 %	Filtración después de la adición de ácido y la trituración del sólido en MeOH	la-002a (34 mg, 60 %)	
KI-1 (1 g)		HATU (1,5 eq) DIPEA (5 eq) DMF	64 %	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 18 h, T° = 23 °C	90 %	H ₂ , tiempo de Pd/C EtOAc/EtOH = 18 h, T° = 23 °C	91 %	Trituración con MeCN y MTBE	la-002aTz (285 mg, 30 %)	
KI-1 (190 mg) AX050 + LG043		1) SOCl ₂ (50 eq) DCM, 50 °C 2) NaOH ac. 0,5 M (1,1 eq), Na ₂ CO ₃ (0,6 eq), TBAB (0,1 eq), THF, ta, 5 d.	95 % (Na ⁺ sal)	H ₂ , tiempo de Pd/C H ₂ O/EtOH = 2,5 h, T° = 23 °C	88 %	NaOH acuoso (18 eq) 2h15, después HCl 1N T° = 23 °C	50 %	Filtración después de la adición de ácido; la liofilización del filtrado proporciona el producto	la-002c	
KI-1Bn (76 mg)		1) SOCl ₂ (50 eq) DCM, 50 °C, 3h 2) DIPEA (1,1 eq) DCM	82 %	H ₂ , tiempo de Pd/(OH) ₂ DCM/EtOH = 4 h, T° = 23 °C	95 %			El producto final tiene baja solubilidad en Purif de EtOH. Cromatogr. AcOEt/AcOH 95:5	la-003a (11 mg, 95 %)	Paso de desprotección único, ya que ambos precursores son ésteres de bencilo RMN ok

Figura 4B

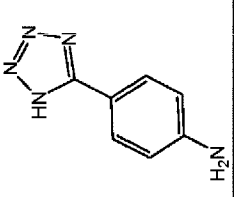
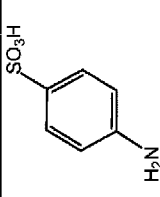
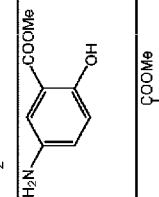
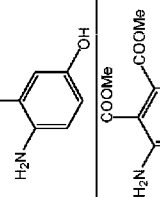
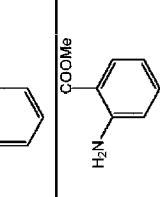
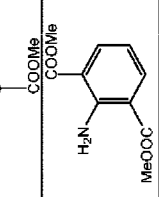
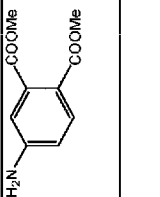
KI-1 (1 g)		HATU (1,5 eq) DIPEA (5 eq) DMF	96 %	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 21 h, T° = 23 °C	37 %	H ₂ , tiempo de Pd/C EtOAc/EtOH = 18 h, T° = 23 °C	37 %	Trituración con MeCN y MTBE	Ia-003aTz (0,022 g, 7 %)
KI-1 (118 mg) (LG 038)		1) SOCl ₂ (58 eq) DCM, 50 °C 2) NaOH ac. 0,5 M (1,1 eq), Na ₂ CO ₃ (0,5 eq), TBAB (0,12 eq), THF, ta.	69 %	H ₂ , tiempo de Pd/C H ₂ O/EtOH = 5,5 h, T° = 23 °C	88 %	NaOH ac. 0,9 M, 2 h, después HCl al 37 % (3,5 ml)	82 %	Evaporación de disolventes y eliminación de sales mediante solubilización selectiva en EtOH	Ia-003c (45 mg, 82 %)
KI-1 (1 g)		1) SOCl ₂ (27 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (1,1 eq), DCM, DMF	24 %	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF/DMF-H ₂ O = 5 días, T° = 75 °C	86 %	H ₂ , tiempo de Pd/C DMF/EtOH = 24 h, T° = 23 °C	76 %	Trituración con MeCN y Et ₂ O	Ia-004a (0,145 g, 9 %)
KI-1 (1 g)		1) SOCl ₂ (27 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (1,1 eq), DCM, DMF	33 %	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 18 h, T° = 23 °C	94 %	H ₂ , tiempo de Pd/C EtOAc = 2 h, T° = 23 °C	84 %	Tratamiento normal	Ia-006a (0,155 g, 15 %)
KI-1 (1 g)		1) SOCl ₂ (27 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (1,1 eq), DCM.	75 %	LiOH (7 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 18 h, T° = 23 °C	95 %	H ₂ , tiempo de Pd/C EtOAc/EtOH = 4 h, T° = 23 °C	66 %	Tratamiento normal	Ia-011a (0,46 g, 27 %)
KI-1 (1 g)		1) SOCl ₂ (27 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (1,1 eq), DCM	57 %	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 20 h, T° = 23 °C	Cuanti- tativo.	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 1 h, T° = 23 °C	88 %	Tratamiento normal	Ia-012a (0,414 g, 28 %)
KI-1 (1,125 g)		1) SOCl ₂ (27 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (1,1 eq), DCM	75 %	LiOH (30 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 36 h, T° = 23 °C	Cuanti- tativo.	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 18 h, T° = 23 °C	98 %	Tratamiento normal	Ia-013a (0,644 g, 42 %)
KI-1 (2,11 g)		1) SOCl ₂ (27 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (1,1 eq), DCM	41 %	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 18 h, T° = 23 °C	Cuanti- tativo.	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 18 h, T° = 23 °C	94 %	Tratamiento normal	Ia-014a (0,156 g, 22 %)

Figura 4C

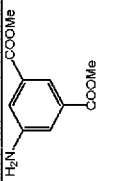
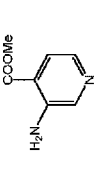
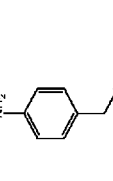
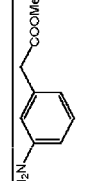
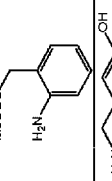
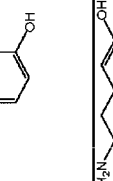
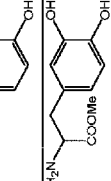
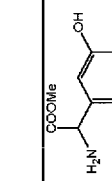
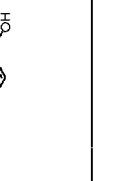
KI-1 (1,12 g)		1) SOCl ₂ (50 eq) DCM, 50 °C, 4h 2) DIPEA (1,2 eq) DCM-12h, ta cromatogr. en frío PE/AcOEt	58%	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 18 h, T° = 23 °C	98%	NaOH acuoso (65 eq) 2 h, i.a., después HCl al 37 % a 0 °C, filtración, secado y lavado con agua acuosa, HCl, EtOH	84 %	Trituración en H ₂ O, secado	Ia-015a (380 mg, 84 %)	Producto parcialmente soluble en EtOH, evitar el EtOH para lavados
KI-1 (0,5 g)		TCFH (1,2 eq) NMI (5 eq) MeCN	58%	LiOH (8 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 42 h, T° = 23 °C	Cuantitativo.	H ₂ , tiempo de Pd/C THF/EtOH = 18 h, T° = 23 °C	41 %	Trituración con MeCN	Ia-023a (0,054 g, 13 %)	
KI-1Bn (84 % + 16 % de diéster)		1) SOCl ₂ (25 eq) DCM, 50 °C, 4h 2) DIPEA (1,2 eq), DCM - 18h, ta cromatogr. en frío PE/DCM 1:1 → DCM	86%	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 2 h, T° = 23 °C	99%			Trituración con THF	Ia-032a (107 mg, 99 %)	Paso de desprotección único, ya que ambos precursores son ésteres de bencilo.
KI-1 (1 g)		1) SOCl ₂ (27 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (1,1 eq), DCM	73 %	H ₂ , tiempo de Pd/C EtOAc = 18 h, T° = 23 °C	97%	LiOH (8 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 42 h, T° = 23 °C	83 %	Tratamiento normal	Ia-033a (0,147 g, 46 %)	
KI-1 (1 g)		1) SOCl ₂ (27 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (1,1 eq), DMF	39%	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 18 h, T° = 23 °C	85%	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 20 h, T° = 23 °C	31 %	HPLC preparatoria	Ia-034a (0,07 g, 6 %)	
KI-1 (1 g)		HOBT (1,5 eq) EDC (1,5 eq) TEA (3,2 eq) DMF	57%	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 18 h, T° = 23 °C	96%	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 2 h, T° = 23 °C	92 %	Tratamiento normal	Ia-035a (0,314 g, 22 %)	Paso de bencilación antes de la hidrólisis: BnBr (2 eq), K ₂ CO ₃ (2 eq), DMF. Tiempo = 24 h T° = 23 °C, Y = 79 %
KI-1 (1 g)		1) SOCl ₂ (26 eq) 2) DIPEA (2,2 eq) DCM	70%	--	--	HCl (10 ml) AcOH (10 ml)	31 %	HPLC preparatoria	Ia-035a-2 (0,081 g, 12 %)	
KI-1 (1 g)		1) SOCl ₂ (28 eq) 2) DIPEA (2,2 eq) DCM	12%	LiOH (4 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 18 h, T° = 23 °C	92%	H ₂ , tiempo de Pd/C EtOH/EtOAc = 20 h, T° = 23 °C	34 %	HPLC preparatoria	Ia-035a-3 (0,05 g, 1 %)	Paso de bencilación antes de la hidrólisis: BnBr (4 eq), K ₂ CO ₃ (4 eq), DMF. Tiempo = 18 h T° = 23 °C, Y = 99 %
KI-1 (0,5 g)		1) SOCl ₂ (25 eq) 2) DIPEA (2,2 eq) DMF	39%	LiOH (8 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 18 h, T° = 23 °C	96%	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/AcOH = 20 h, T° = 23 °C	24 %	HPLC preparatoria	Ia-036a (0,036 g, 2 %)	Paso de bencilación antes de la hidrólisis: BnBr (5 eq), K ₂ CO ₃ (8 eq), DMF. Tiempo = 18 h T° = 23 °C, Y = 51 % Descompuesto después de la purificación preparatoria (80 % puro)

Figura 4D

KI-1 (1 g)		1) SOCl ₂ (27 eq) 2) DIPEA (2,2 eq) DCM	81%	–	–	–	44%	HPLC preparatoria	Ia-053a (106 mg, 20%)	
KI-1 (1 g)?		TCFH (1,2 eq) NMI (5 eq) Anilina (1,1 eq) MeCN	92%	LiOH (27 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O DMSO = 120 h, T° = 25 °C	93%	H ₂ , tiempo de Pd/C THF/EtOH = 18 h, T° = t.a.	80%	Trituración con MeCN y n- pentano	Ia-056a (322 mg, 39%)	
KI-1 (35,5 g, 2 eq)		HATU (3 eq) DIPEA (6 eq) DMF	87%	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF-DMSO-H ₂ O = 48 h, T° = 23 °C	98%	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 18 h, T° = 23 °C	98%	Trituración con MeCN	Ib-010a (19,3 g, 47%)	
KI-6 (500 mg)		TCFH (2,4 eq) NMI (6 eq) MeCN	74%	--	--	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 18 h, T° = 23 °C	41%	Trituración con EtOH y Et ₂ O	Ic-001aTz2 (0,191 g, 17%)	
KI-6 (20,3 g)		1) SOCl ₂ (40 eq) 2) DIPEA (2,2 eq) DCM	85%	LiOH (6 eq.) Tiempo de DMSO-H ₂ O = 18 h, T° = 100 °C	71%	H ₂ , tiempo de Pd/C DMF = 1 h, T° = 23 °C	quant	Trituración con MeCN	Ic-007a (25,7 g, 34%)	
KI-6 (1 g)		1) SOCl ₂ (23 eq) 2) DIPEA (2,2 eq) DCM/DMF	64%	NaOH (20 eq.) Tiempo de H ₂ O = 6 h, T° = 23 °C	88%	H ₂ , tiempo de Pd/C DMF = 4 h, T° = 23 °C	24%	Trituración con acetona	Ic-009a (41 mg, 8%)	
KI-1 (70 g)		TCFH (1,2 eq) NMI (5 eq) MeCN	77%	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 96 h, T° = 23 °C	98%	H ₂ , tiempo de Pd/C THF/EtOH = 36 h, T° = 23 °C	80%	Trituración con Et ₂ O	Ic-001aTz/004a (40,8 g, 34%)	Las condiciones para el primer acoplamiento (R') y la hidrólisis se han mencionado en la entrada 2.
KI-1 (0,5 g)		1) SOCl ₂ (28 eq) 2) DIPEA (2,2 eq) DMF	78%	LiOH (7 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 72 h, T° = 23 °C	60%	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 24 h, T° = 23 °C	15%	HPLC preparatoria	Id-030a (10 mg, 4%)	Paso de ciclización: MeSO ₃ H (3,3 eq), MeOH. Tiempo = 17 h, T° = 70 °C

Figura 5A

Productos de KI-2 y KI-7										
ArCOOH	R-NH ₂	Condiciones de acoplamiento	Rendimiento	Condiciones A de desprotección	Rendimiento	Condiciones B de desprotección	Rendimiento	Procedimiento de purificación	Producto final (cantidad, rendimiento)	Comentarios
KI-2		1) SOCl ₂ (32 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (1,1 eq), DCM	72%	–	–	Tiempo de cHCl (10 ml) AcOH (10 ml) = 18 h, T° = 80 °C	64%	Trituración con DCM y MeOH	Ila-001a (142 mg, 46%)	
KI-2		TCFH (1,2 eq) NMI (5 eq) MeCN	71%	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 48 h, T° = t.a.	77%	H ₂ , tiempo de Pd/C THF/EtOH = 18 h, T° = t.a.	53%	Trituración con MeCN, DCM y Et ₂ O	Ila-001aTz (125 mg, 29%)	
KI-2		1) SOCl ₂ (70 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (2,2 eq), DMF	70%	LiOH (4 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 72 h, T° = t.a.	15%	H ₂ , tiempo de Pd/C THF/EtOH = 18 h, T° = t.a.	54%	Trituración con MeCN	Ila-001c (20 mg, 4%)	
KI-2Aq 675 mg		1. SOCl ₂ , DCM, reflujo, 5 h, concentración 2. DCM, amina (1 eq), iPrNEt ₂ (1,1 eq), 12 h, ta. Extracto, cromatogr en columna	15%	EtOH, NaOH 1 M, 0 °C, después 2 h, t.a.. Acidificación, conc.	55%	No es necesario			Ila-002a	Compuesto elaborado a partir del diacetato de éster metílico del ácido 2,5-dihidroxisoftálico
KI-2Aq 500 mg		1. SOCl ₂ , DCM, reflujo, 5 h, concentración 2. DCM, amina (1,1 eq), iPrNEt ₂ (1,1 eq), 12 h, extracción ta, cromat en columna	16%	EtOH, NaOH 1 M, 0 °C, después 2 h, t.a.. Acidificación, conc.	69%	No es necesario			Ila-003a	Compuesto elaborado a partir del diacetato de éster metílico del ácido 2,5-dihidroxisoftálico
KI-2Aq		1) SOCl ₂ (30 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (1,1 eq), DCM	75%	–	–	Tiempo de cHCl (10 ml) AcOH (10 ml) = 18 h, T° = 80 °C	61%	Tratamiento normal	Ila-004a (136 mg, 45%)	Compuesto de KI 2Ac ₂
KI-2		1) SOCl ₂ (26 eq), DMF (gotas) 2) Piridina (1,2 eq), DCM	72%	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 24 h, T° = t.a.	95%	H ₂ , tiempo de Pd/C EtOH/EtOAc = 24 h, T° = t.a.	71%	Tratamiento normal	Ila-005a (209 mg, 51%)	La anilina de partida se protegió con un grupo <i>tert</i> -butildifenilsililo.

Figura 5 B

KI-2Ac₂		1) SOCl ₂ (32 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (2,2 eq), DCM	70%	-	-	NaOH acuoso (60 eq) 6,5 h, después HCl 1N T° = t.a.	32%	Tratamiento acuoso y después preparación de HPLC	Ila-011a (130 mg, 22 %)	Compuesto proveniente de KI- 2Ac ₂
KI-2Ac₂		1) SOCl ₂ (40 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (1,1 eq), DCM	33%	-	-	Tiempo de cHCl (10 ml) AcOH (10 ml) = 18 h, T° = 80 °C	29%	HPLC preparatoria	Ila-012a (58 mg, 9 %)	Compuesto proveniente de KI- 2Ac ₂
KI-2Ac₂		1) SOCl ₂ (32 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (1,1 eq), DCM	34%	LiOH (12 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 96 h, T° = t.a.	74%	H ₂ , tiempo de Pd/C EtOH/EtOAc = 24 h, T° = t.a.	95%	Tratamiento normal	Ila-013a (58 mg, 23 %)	El acoplamiento de la amida se realizó a partir del KI-2Ac ₂ , seguido de una metátesis cuantitativa y posterior reprotección con grupos protectores de bencilo.
KI-2		1) SOCl ₂ (61 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (1,1 eq), DCM	59%	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 48 h, T° = t.a.	93%	H ₂ , tiempo de Pd/C EtOH/EtOAc = 18 h, T° = t.a.	77%	Trituración con MeCN	Ila-014a (170 mg, 42 %)	
KI-2Ac₂ 675 mg		1. SOCl ₂ (25 eq), DCM, reflujo, 5 h, concentración 2. DCM, amina (1,0 eq), IPrNEt ₃ (1,1 eq), 12 h, extracción a t.a. cromatólogo en columna	12%	EtOH, NaOH 1 M, 0 °C, después 2 h, t.a.. Acidificación, conc.	77%	No es necesario			Ila-015a	Compuesto elaborado a partir del diacetato de éster metílico del ácido 2,5-dihidroxisoftálico
KI-2Ac₂		1) SOCl ₂ (32 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (1,1 eq), DCM	55%	-	-	Tiempo de cHCl (9 ml) AcOH (9 ml) = 24 h, T° = 100 °C	34%	HPLC preparatoria	Ila-033a (91 mg, 34 %)	
KI-2		1) SOCl ₂ (25 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (2,2 eq), DMF	35%	LiOH (8 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 6 h, T° = t.a.	97%	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOAc = 24 h, T° = t.a.	26%	Trituración con MeCN	Ila-034a (37 mg, 8 %)	

Figura 5C

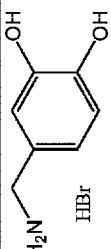
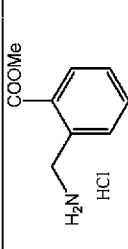
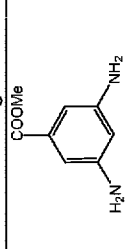
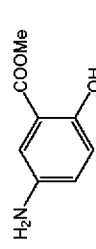
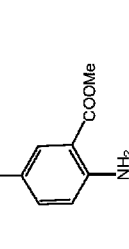
KI-2		1) SOCl ₂ (25 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (2,2 eq), DMF (3) cHCl (5 ml)	97 %	LiOH (4 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 24 h, T° = t.a.	56 %	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 24 h, T° = t.a.	59 %	HPLC preparatoria	Ila-035a (90 mg, 13 %)	El acoplamiento de la amida se realizó a partir del KI-2Ac ₂ , seguido de la desacetilación con cHCl en el tratamiento y, a continuación, la protección posterior con 4 grupos protectores de bencilo (rendimiento del 43 %) antes de la hidrólisis del LiOH.
KI-2Ac₂		1) SOCl ₂ (40 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (2,2 eq), DMF	78 %	-	-	Tiempo de cHCl (19 ml) AcOH (19 ml) = 17 h, T° = 80 °C	24 %	HPLC preparatoria	Ila-053a (104 mg, 24 %)	A partir de KI-2Ac ₂
KI-2Ac₂		1) SOCl ₂ (40 eq), DMF (gotas) 2) DIPEA (1,1 eq), Anilina (0,5 eq), DCM	22 %	LiOH (8 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 24 h, T° = t.a.	34 %	H ₂ , tiempo de Pd/C THF/EtOH = 24 h, T° = t.a.	17 %	HPLC preparatoria	Ilb-010a (8 mg, 5 %)	El acoplamiento de la amida se realizó a partir del KI-2Ac ₂ , seguido de la metanolisis del acetilo protector (rendimiento del 98 %) y la posterior protección con 4 grupos protectores de bencilo (rendimiento del 40 %) antes de la hidrólisis del LiOH.
KI-7		TCFH (2,4 eq) NMI (10 eq) Anilina (2,4 eq) MeCN	Cuantitativo.	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 24 h, T° = 80 °C	70 %	H ₂ , tiempo de Pd/C THF = 24 h, T° = t.a.	88 %	Trituración con MeCN y Et ₂ O	Ilc-007a (5,7 g, 61 %)	
KI-7		1) SOCl ₂ (50 eq), DMF (gotas) 2) piridina (2,2 eq), anilina (2,2 eq), DCM	76 %	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 24 h, T° = t.a.	95 %	H ₂ , tiempo de Pd/C EtOAc/EtOH = 24 h, T° = t.a.	3 %	Purificado dos veces por prep	Ilc-009a (11 mg, %)	La anilina de partida se protegió con un grupo <i>tert</i> -butilidifenilsilo (TBDPS, por sus siglas en inglés).

Figura 6

Productos de KI-8 y KI-9									
ArCOOH	R-NH ₂	Condiciones de acoplamiento	Rendimiento	Condiciones-A de desprotección	Rendimiento	Condiciones-B de desprotección	Rendimiento	Procedimiento de purificación	Producto final (cantidad, rendimiento)
KI-8		1) (COCl) ₂ (6 eq), DMF (gotas), DCM 2) DIEPA (1,1 eq), anilina (1,1 eq), DCM	75 %	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 24 h, T° = t.a.	80 %	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOAc = 24 h, T° = t.a.	51 %	Trituración con MeCN	IIIa-001a
KI-8		TCFH (1,2 eq) NMI (5 eq) Anilina (1,2 eq) MeCN	75 %	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 18 h, T° = 70 °C	93 %	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 18 h, T° = t.a.	43 %	Trituración con MeCN	IIIa-001aTz (27 mg, 29 %)
KI-8		TCFH (1,2 eq) NMI (5 eq) Anilina (1,2 eq) MeCN	29 %	LiOH (16 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 48 h, T° = t.a.	Cuantitativo.	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 18 h, T° = t.a.	Cuantitativo.	Trituración con Et ₂ O	IIIa-013a (50 mg, 29 %)
KI-8		TCFH (1,2 eq) NMI (5 eq) Anilina (1,2 eq) MeCN	71 %	LiOH (8 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 18 h, T° = t.a.	90 %	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 18 h, T° = t.a.	26 %	HPLC preparatoria	IIIa-015a (26 mg, 16 %)
KI-8		TCFH (1,2 eq) NMI (3 eq) Anilina (0,5 eq) MeCN	75 %	LiOH (6 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O, DMSO = 72 h, T° = 55 °C	85 %	H ₂ , tiempo de Pd/C THF/EtOH = 18 h, T° = t.a.	57 %	El residuo se disolvió en agua, se filtró y el agua se retiró en un liofilizador.	IIIB-010a (755 mg, 57 %)

Figura 7

Productos de KI-8 y KI-9						
SUSTRATO						
Procedimientos de desprotección						
Condiciones A de desprotección	Rendimiento	Condiciones B de desprotección	Rendimiento	Procedimiento de purificación	Producto final (cantidad, rendimiento)	Comentarios
	Cuantitativo.	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 18 h, T° = t.a.	50 %	Trituración con MeCN	IIIc-056a (44 mg, 50 %)	Es posible que el producto sea la sal de HCl (la prueba de HCl/dioxano no reveló cambios de protones)
	Cuantitativo.	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM/EtOH = 48 h, T° = t.a.	67 %	Trituración con Et ₂ O	IIIc-057a	
	Mismas condiciones	Mismas condiciones			IIIc-058a	
	Mismas condiciones	Mismas condiciones			IIIc-059a	
	Cuantitativo.	H ₂ , tiempo de Pd/C DCM = 18 h, T° = t.a.	55 %	HPLC preparatoria	IIIc-060a (39 mg, 55 %)	
	87 %	H ₂ , tiempo de Pd/C THF/EtOH = 18 h, T° = t.a.	73 %	Trituración con agua/acetona	IIIc-061a (9,1 g,	Síntesis a gran escala

Figura 8

ArCOOH	R-NH ₂	Condiciones de acoplamiento	Rendimiento	Condiciones-A de desprotección	Rendimiento	Condiciones-B de desprotección	Rendimiento	Procedimiento de purificación	Producto final (cantidad, rendimiento)
		TCFH (4,2 eq) NMI (9 eq) MeCN	58%	LiOH (8 eq.) Tiempo de DMSO-H ₂ O = 18 h, T° = 100 °C	42 %	H ₂ , tiempo de Pd/C THF/EtOH = 18 h, T° = 23 °C	88 %	Trituración con MeCN y Et ₂ O	V-001a (110 mg, 21 %)
		TCFH (2,2 eq) NMI (6 eq) MeCN	76%	LiOH (10 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 48 h, T° = t.a.	77 %	H ₂ , tiempo de Pd/C THF/EtOH = 48 h, T° = t.a.	90 %	Trituración con Et ₂ O	V-002a (513 mg, 52 %)
Procedimientos de desprotección									
				LiOH (20 eq.) Tiempo de THF-H ₂ O = 168 h, T° = de t.a. a 80 °C	76 %	H ₂ , tiempo de Pd/C THF/EtOH = 72 h, T° = t.a.	67 %	Trituración con Et ₂ O	V-003a (48 mg, 50%)

Figura 9

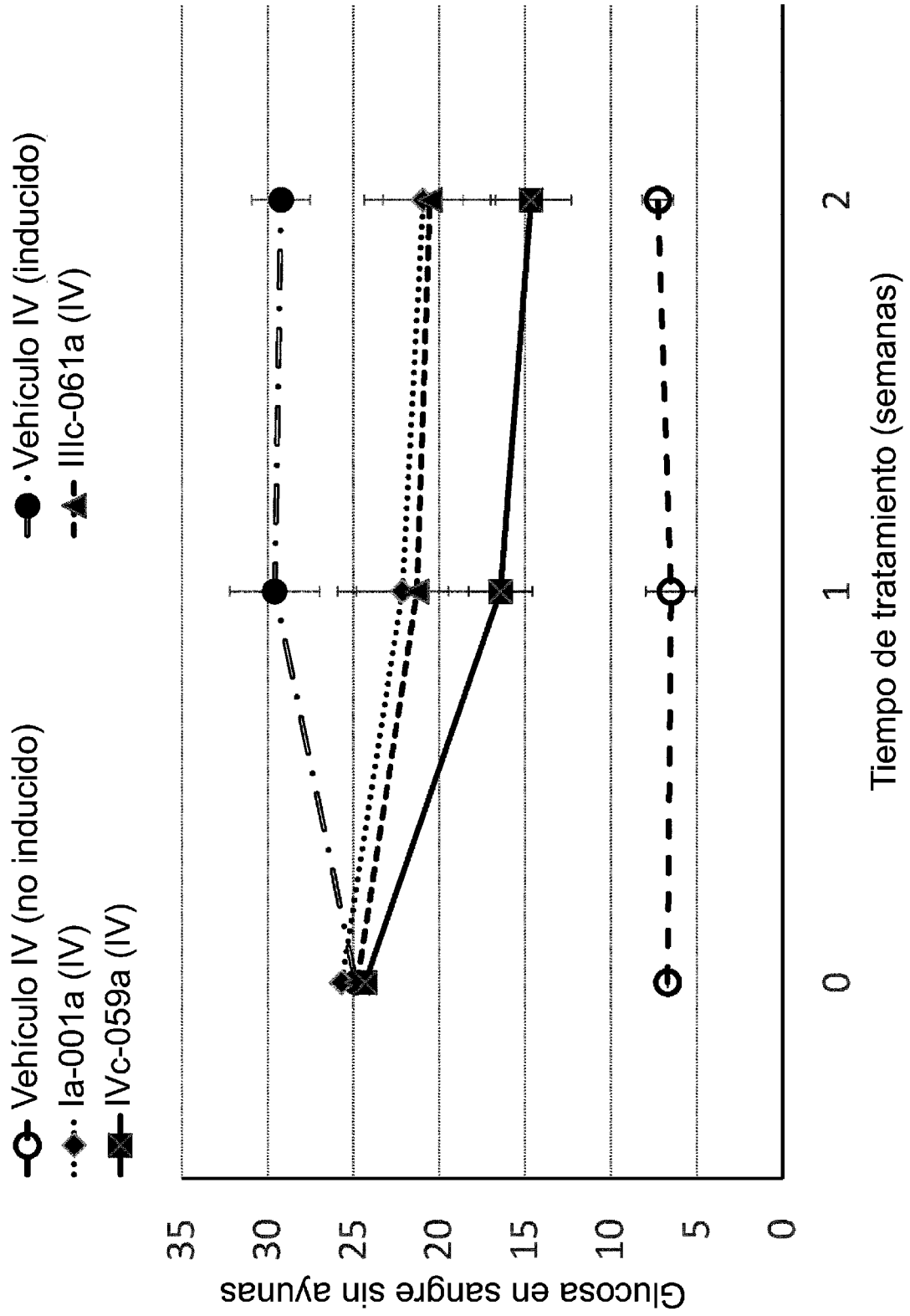


Figura 10

Día 7 del tratamiento

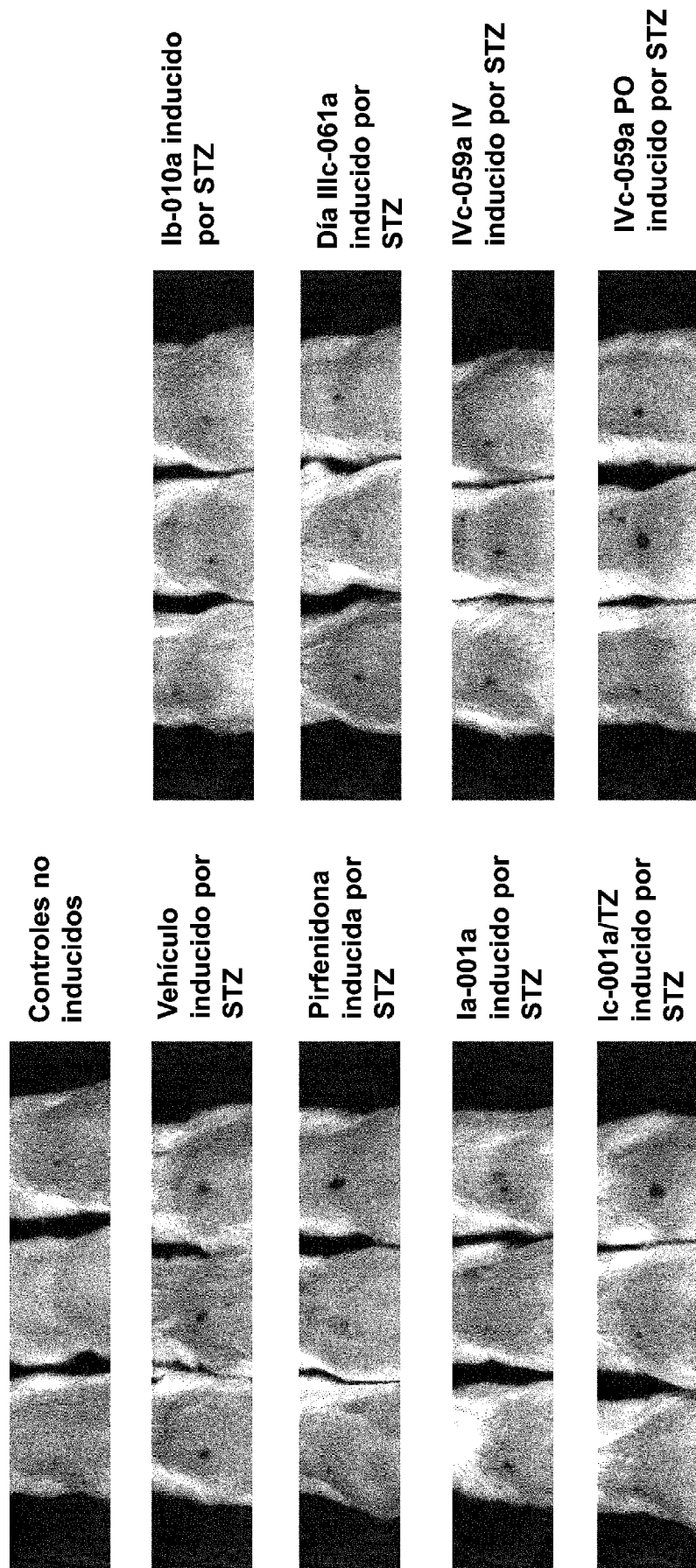


Figura 11

