

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 997 240**

51 Int. Cl.:

C07D 498/18 (2006.01)
C07H 19/01 (2006.01)
A61K 31/435 (2006.01)
A61K 31/706 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2020** **PCT/US2020/014699**
87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2020** **WO20154455**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2020** **E 20746065 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2024** **EP 3914599**

54 Título: **Análogos de FK506 no inmunosupresores y uso de los mismos**

30 Prioridad:

23.01.2019 US 201962795700 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
14.02.2025

73 Titular/es:

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.00%)
3400 North Charles Street
Baltimore, Maryland 21218, US

72 Inventor/es:

LIU, JUN O.;
SUN, ZHAOLI;
PEIFFER, BRANDON J.;
WANG, YUEFAN;
QI, LE;
GUO, ZUFENG;
PENG, HANJING y
AHMADI, ALI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 997 240 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

Análogos de FK506 no inmunosupresores y uso de los mismos

Antecedentes de la invención

Las heridas debidas a accidentes, enfermedades y conflicto armado son uno de los problemas médicos más comunes. Se ha estimado que el coste de atención para heridas crónicas que no cicatrizan asociadas con quemaduras y enfermedades graves tal como la diabetes supera los 50 mil millones de dólares al año (Fife et al., 2012). Las heridas crónicas hacen que el cuerpo humano sea más susceptible a la infección, aumentando el riesgo de adquirir patógenos oportunistas que pueden conducir a sepsis. Por tanto, acelerar la cicatrización de heridas (WH) puede reducir el riesgo de infección, mejorar las tasas de mortalidad y morbilidad de pacientes heridos. Sin embargo, hay opciones limitadas para acortar la cicatrización de heridas, lo que requiere el desarrollo de nuevas terapias.

Los inventores han informado previamente del descubrimiento de una combinación de fármacos sinérgica para la aceleración de la WH cutánea (Lin et al., 2014) y la inducción de la supervivencia de aloinjertos a largo plazo a través de la repoblación del huésped (Okabayashi et al., 2011, Hu et al., 2016, Cameron et al., 2016). La combinación de dos fármacos aprobados por la FDA, Tacrolimus (FK506) y Plerixafor (AMD3100), redujo el tiempo de cicatrización completa en un 25 % en ratones con cuatro heridas escisionales circulares de espesor completo, lo que no tiene precedentes por las modalidades terapéuticas existentes. La WH acelerada está acompañada por la movilización de células madre derivadas de la médula ósea (BM) (CD133, CD34 y cKit) y el reclutamiento de células madre CD133 en los sitios de las heridas, así como la liberación aumentada del factor derivado del estroma 1 (SDF-1), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en tejidos de granulación (Lin et al., 2014).

El mecanismo molecular subyacente mediante el cual la combinación de FK506 y AMD3100 (AF) acelera la WH no se ha estudiado extensamente. AMD3100 es un antagonista selectivo del receptor de quimioquina CXCR4 (Hatse et al., 2002) y se ha usado clínicamente para dirigir a las células madre hematopoyéticas (HSC) fuera de la médula ósea (BM) a la sangre periférica (Liles et al., 2003) donde se pueden recuperar y conservar hasta la finalización de la irradiación ablativa y/o quimioterapia. Además de las HSC, la inyección de AMD3100 aumentó la movilización de células progenitoras endoteliales (EPC) derivadas de la BM, que se asoció con una neovascularización más rápida y una recuperación funcional después de un infarto de miocardio en ratones (Jujo et al., 2010, Balaji et al., 2013). Sin embargo, el aumento del número de células madre circulantes por el tratamiento con AMD3100 solo, mostró solo una cicatrización ligeramente más rápida debido al reclutamiento reducido en los sitios de las heridas (Lin et al., 2014).

En contraste con AMD3100, el papel preciso desempeñado por FK506 a dosis baja en el tratamiento de combinación (AF) ha permanecido como un misterio. FK506, un macrólido producido por la bacteria *Streptomyces tsukubaensis*, es un inmunosupresor ampliamente usado para la prevención del rechazo de trasplantes, así como para el tratamiento de ciertos trastornos autoinmunitarios (Tanaka et al., 1987; Fung et al., 2004). El mecanismo subyacente para la actividad inmunosupresora de FK506 ha sido bien establecido. A nivel celular, FK506 inhibe la activación de las células T auxiliares. A nivel de la ruta, bloquea la transducción de señales intracelulares que emanan del receptor de células T que conduce a la activación transcripcional de IL-2 y otros genes de citoquinas. A nivel molecular, se une a FKBP12 y otros miembros de la familia FKBP antes de que el complejo binario FKBP-FK506 se asocie con e inhiba la actividad de la actividad proteína fosfatasa de la calcineurina, evitando la desfosforilación dependiente de calcio del factor nuclear de las células T activadas (NFAT) (Liu et al., 1991; Griffith et al., 1995; Kissinger et al., 1995).

Un posible mecanismo subyacente para FK506 en WH es a través de la inhibición de calcineurina. Sin embargo, se ha mostrado que FK506 tópico tiene un efecto perjudicial sobre WH (Schäffer et al., 1998). Además, hemos mostrado que los animales tratados con FK506 a dosis baja (0,1 mg/kg) solo, mostraron una cicatrización ligeramente más rápida en comparación con el grupo de control de solución salina, pero las dosis estándar de FK506 (1 mg/kg) para la inmunosupresión retrasó el tiempo de cicatrización, dejando sin respuesta la cuestión de si la inhibición de la calcineurina es responsable del efecto de FK506 sobre WH.

Aunque FKBP12 desempeña un papel auxiliar en la actividad inmunosupresora de FK506, también se ha mostrado que inhibe la activación del receptor de BMP de tipo 1 (Wang et al., 1996). Es importante destacar que esta interacción podría aliviarse mediante FK506 (Spiekerkoetter et al., 2013). La señalización de BMP aún no se ha relacionado directamente con ninguna etapa de la cicatrización de heridas, aunque se ha informado que las células epiteliales regulan a la baja muchos receptores de BMP en respuesta a la lesión (Lewis et al., 2014). Por el contrario, recientemente se ha informado que la señalización de BMP aumentada dentro de los miofibroblastos puede promover la cicatrización de heridas sin cicatriz (Piikus et al., 2017). Se ha demostrado que las BMP producen un fenotipo proinflamatorio en células endoteliales, aumentando de este modo la adhesión de leucocitos y la secreción de SDF-1 (Csizsar et al., 2006; Young et al., 2012). Tras la activación, los receptores de BMP fosforilan y activan los factores de transcripción SMAD 1, 5 y 8. Un gen diana principal de estos SMAD es el inhibidor de la diferenciación 1 (ID-1), que inhibe la transcripción de varios genes relacionados con la embriogénesis y la autorrenovación de las células madre. Estudios previos han examinado algunos de los efectos aguas abajo de la activación del receptor de BMP después del tratamiento con FK506, que está acompañada por aumentos en la fosforilación de SMAD1 y SMAD5 (denotada SMAD1/5) y/o SMAD8 (denotada SMAD1/5/8) en células del músculo esquelético (Spiekerkoetter et al., 2013) y células

del estroma sinovial humano (hSSC) (Tateishi et al., 2007). Adicionalmente, se observaron aumentos en la fosforilación de MAPKK y la expresión de ID-1, y la actividad de FK506 fue suficiente para rescatar la disfunción endotelial en ratones inducida por una inactivación condicional del receptor de BMP de tipo 2 (BMPR2) (Spiekerkoetter et al., 2013). Se ha informado que FK506 regulaba al alza la fosforilación de SMAD aguas abajo de la ruta de señalización de TGF- β (SMAD 2 y 3) en células de músculo liso (Giordano et al. Cardiovasc Res. 2008; Bennet et al. J Clin Med. 2016). Sin embargo, la actividad transcripcional aguas abajo solo se observó en presencia de TGF- β exógeno suplementado (Spiekerkoetter et al., 2013; Wang et al., 1996). En otro estudio, se mostró que FK506 aumentaba la expresión del coreceptor de TGF- β tipo 3 endoglina, y estimulaba la actividad tanto migratoria como angiogénica de células endoteliales (Albiñana et al., 2011). Conjuntamente, estas observaciones plantearon la posibilidad de que FK506 pudiera ejercer su efecto WH a través de FKBP12, independientemente de la inhibición de calcineurina.

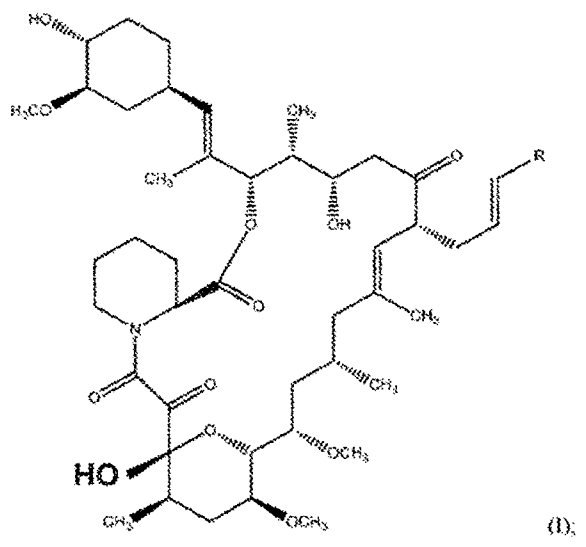
Por lo tanto, todavía existe la necesidad de compuestos y composiciones que puedan mejorar la cicatrización de heridas.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han sintetizado ahora análogos de FK506 no inmunosupresores novedosos que conservan la unión a FKBP y carecen de actividad de inhibición de calcineurina (Fig. 1). Se encontró que los análogos de FK506 recién sintetizados activaban la señalización de BMP en linfocitos y células endoteliales a través de la alteración de la interacción FKBP12-BMPR1. Además, los inventores pueden mostrar ahora que se encontró que la combinación de estos análogos de FK506 y AMD3100 aceleraba la cicatrización de heridas en ratas diabéticas de una manera dependiente del receptor de BMP.

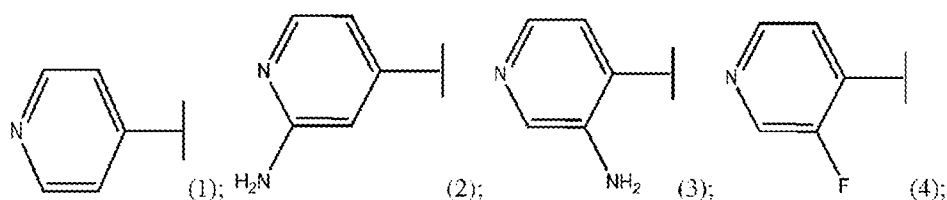
Los análogos de FK506 recién sintetizados análogos de FK506 muestran cualidades inmunosupresoras variables mientras que todos activan un indicador de la ruta de BMP en células Jurkat con una potencia similar a FK506. Además, los derivados muestran efectos dependientes de la estructura en la inhibición del indicador NFAT en células Jurkat.

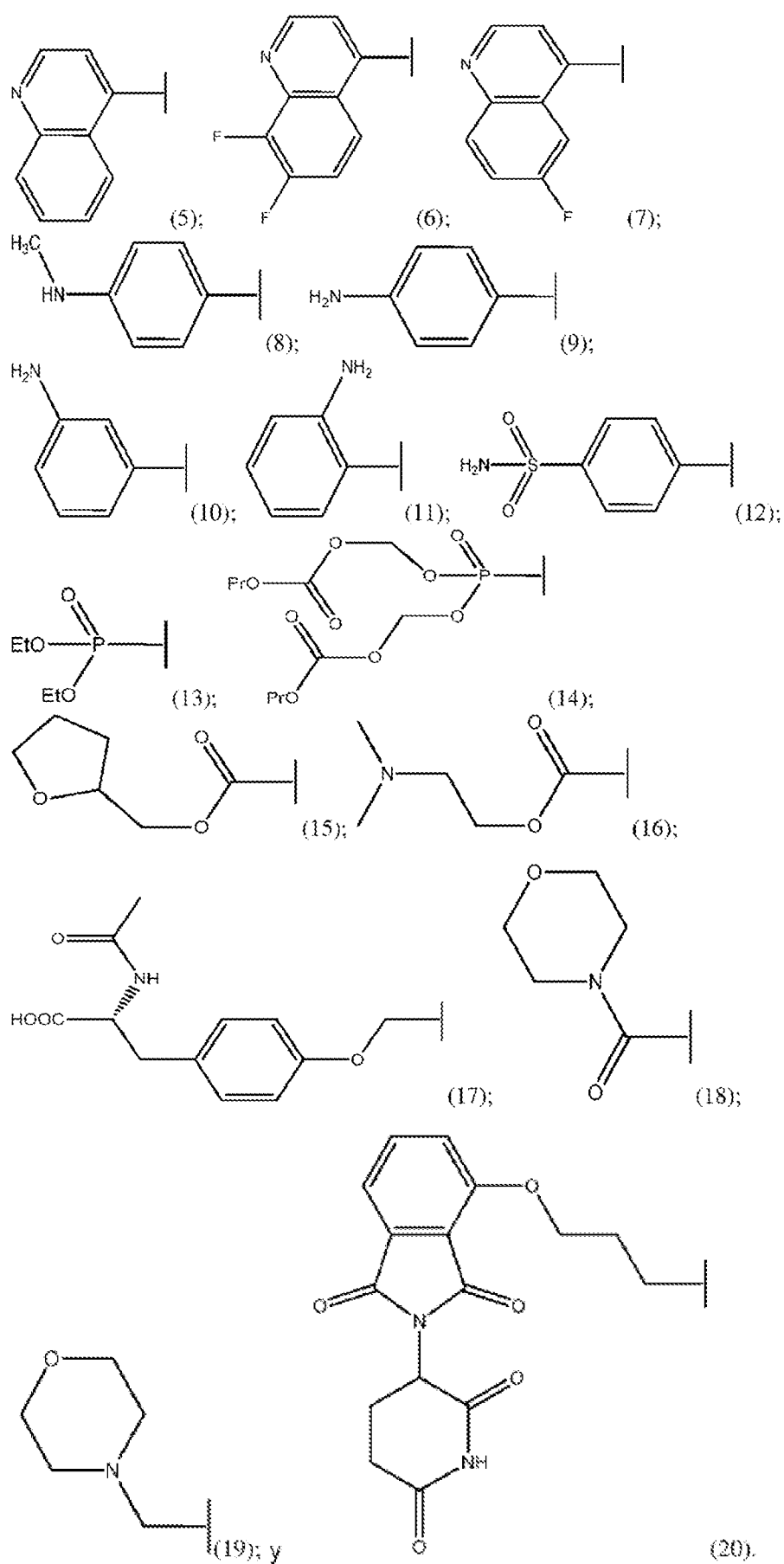
Según una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I:



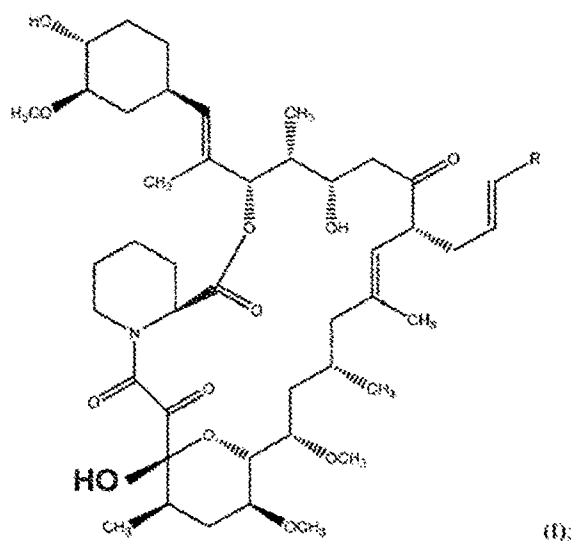
o una sal o solvato del mismo, en donde R es un grupo cicloalquilo, arilo o heteroarilo, sustituido con H, halo, N, O, P, alquilo C₁-C₆, imidazoilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo y en donde los grupos heteroarilo y heterocicloalquilo comprenden nitrógeno, oxígeno o azufre.

Según una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I, en donde R se selecciona del grupo que consiste en:



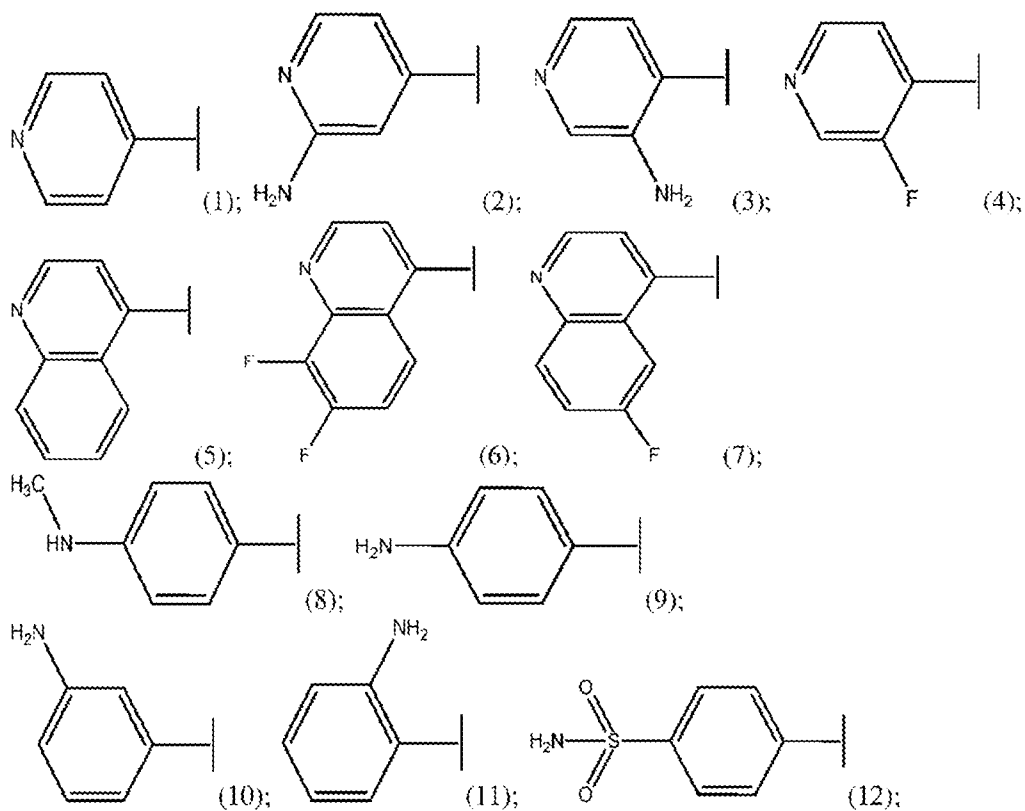


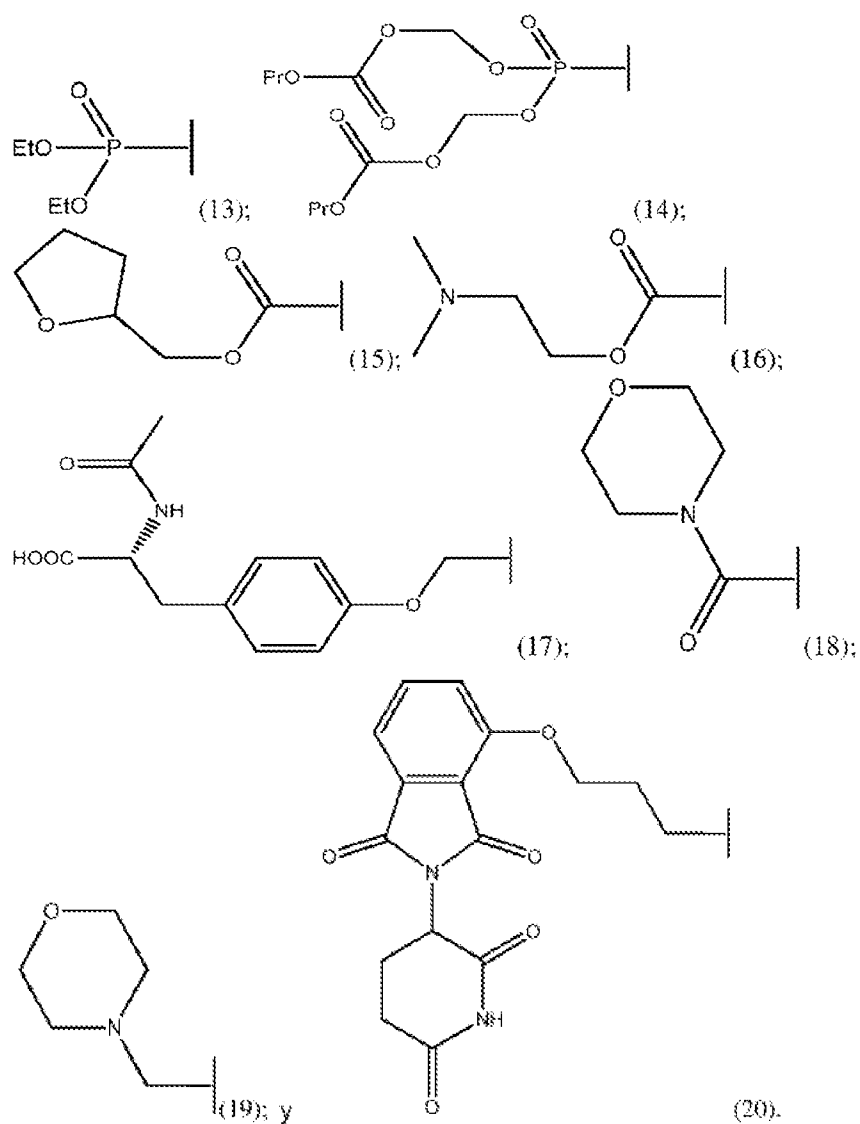
Según una realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un compuesto de fórmula I:



5 o una sal o solvato del mismo, en donde R es un grupo cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido con H, halo, N, O, P, alquilo C₁-C₆, imidazoilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo y en donde los grupos heteroarilo y heterocicloalquilo comprenden nitrógeno, oxígeno o azufre; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

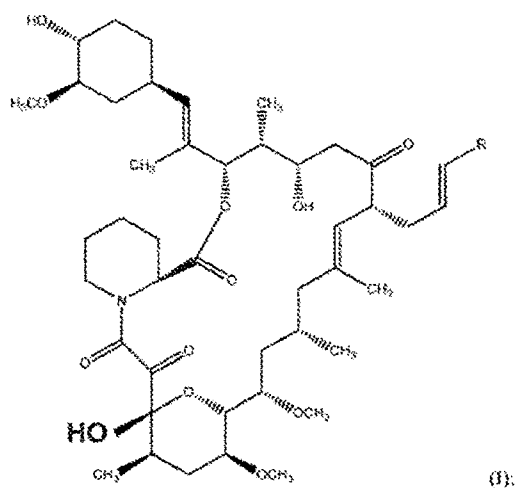
Según una realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un compuesto de fórmula I, en donde R se selecciona del grupo que consiste en:





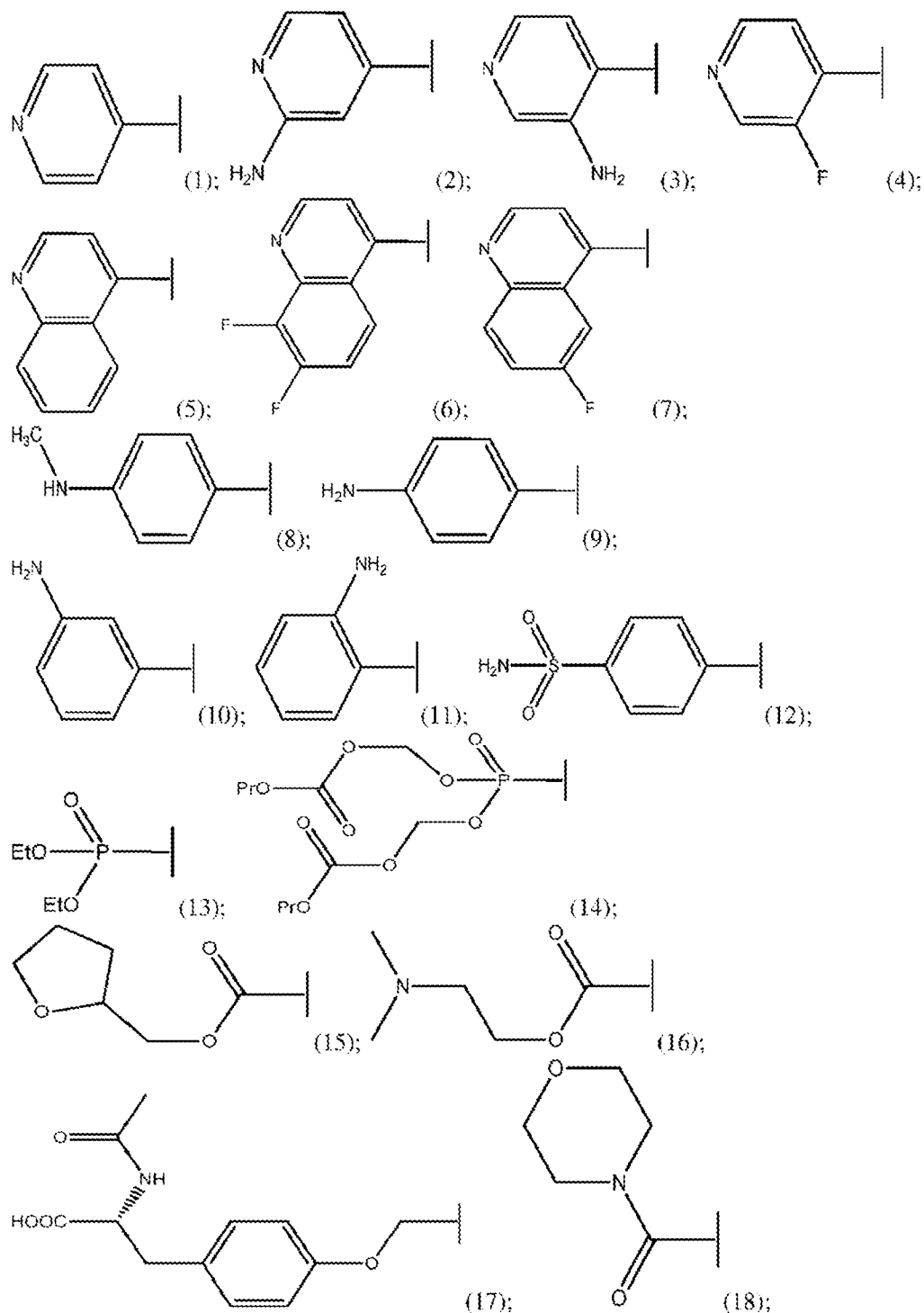
- 5 Según una realización adicional, la presente invención proporciona los compuestos de fórmula I, o composiciones que comprenden los compuestos de fórmula I, y al menos uno o más agentes biológicamente activos.

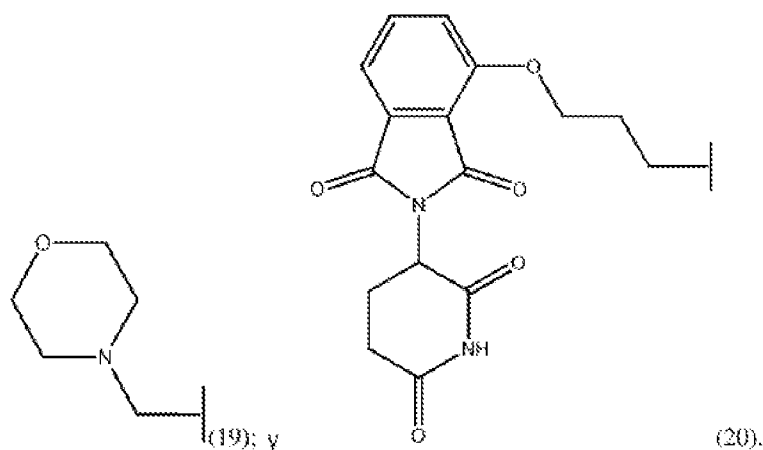
Según una realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un compuesto de fórmula I:



o una sal o solvato del mismo, en donde R es un grupo cicloalquilo, arilo o heteroarilo, sustituido con H, halo, N, O, P, alquilo C₁-C₆, imidazoilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, en donde los grupos heteroarilo y heterocicloalquilo comprenden nitrógeno, oxígeno o azufre; al menos un movilizador de células madre; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

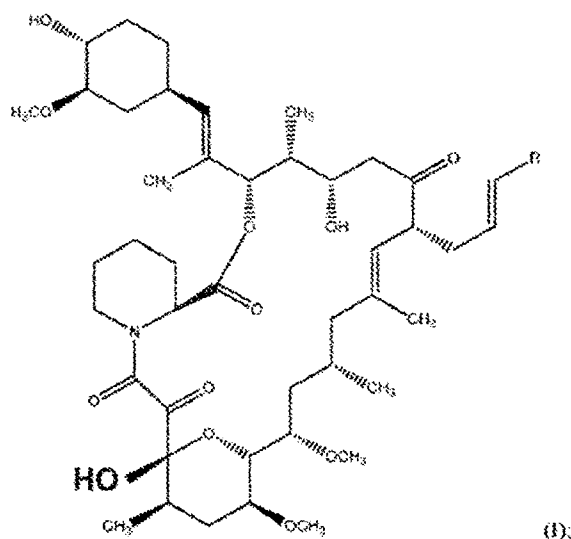
- 5 Según una realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un compuesto de fórmula I, en donde R se selecciona del grupo que consiste en:





En una realización específica, el movilizador de células madre comprende un antagonista de CXCR4. Por ejemplo, el antagonista de CXCR4 puede comprender AMD3100, TG-0054 o AMD3465.

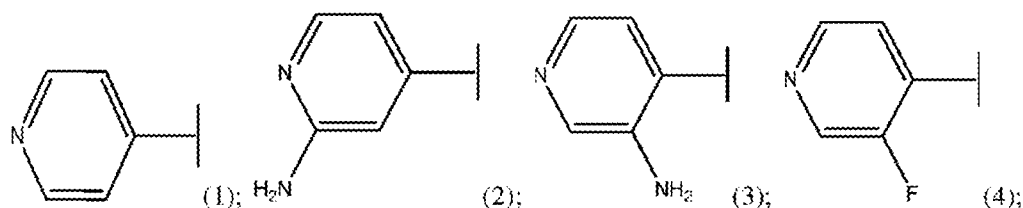
- 5 Según una realización, la presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de lesión tisular en un sujeto, en donde la composición comprende una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula I:

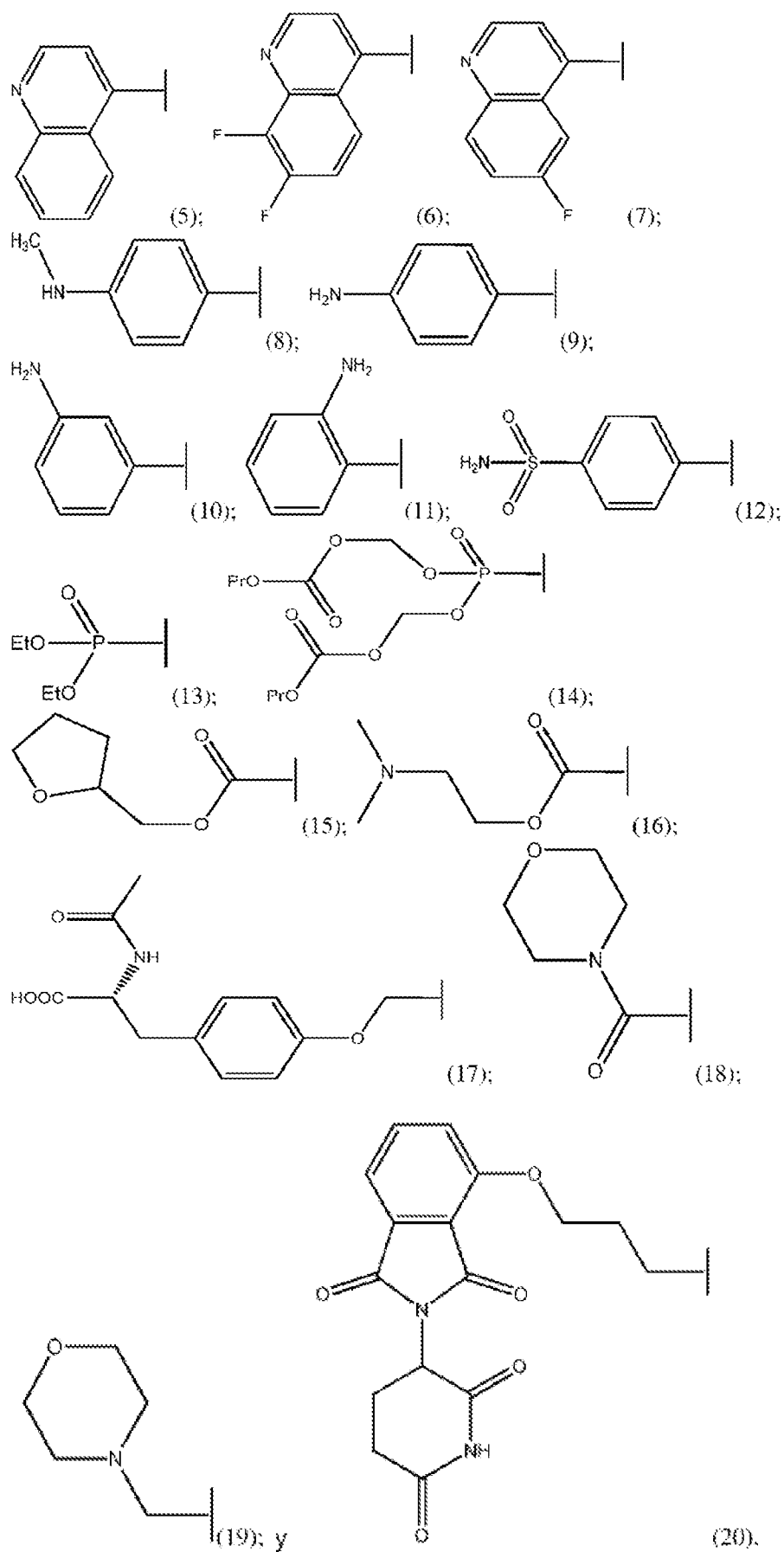


o una sal o solvato en donde R es un grupo cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido con H, halo, N, O, P, alquilo C₁-C₆, imidazoilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, en donde los grupos heteroarilo y heterocicloalquilo comprenden nitrógeno, oxígeno o azufre; y una cantidad efectiva de al menos un movilizador de células madre.

- 10 Según otra realización, la presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de lesión tisular en un sujeto, comprendiendo la composición una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula I, una cantidad efectiva de al menos un movilizador de células madre y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 15 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de lesión tisular en un sujeto, comprendiendo la composición una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula I, en donde R se selecciona del grupo que consiste en:





Según una realización adicional, la presente invención proporciona una composición para el tratamiento de lesión tisular en un sujeto, comprendiendo la composición una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula I, una cantidad efectiva de al menos un movilizador de células madre, al menos un agente biológicamente activo adicional y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 También se divulga un método para preparar una molécula de FK506 sustituida con arilo, que comprende las etapas de: a) añadir una cantidad suficiente de FK506 a una mezcla que comprende una cantidad suficiente de un haluro de arilo en presencia de un catalizador de paladio y una base en un disolvente aprótico polar; b) calentar la mezcla durante un tiempo suficiente para que el haluro de arilo reaccione con FK506 para crear una sustitución de arilo en las moléculas de FK506 y c) aislar el producto de FK506 sustituido con arilo.

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa las estructuras químicas de FK 506 y FKVP.

- Las Figuras 2a-2c muestran que los análogos de FK506 muestran cualidades inmunosupresoras variables. (2a) Viabilidad celular después de un tratamiento con análogo de 72 horas en células HUVEC. (2b) Todos los análogos activan un indicador de la ruta de BMP en células Jurkat con una potencia similar a FK506. (2c) Los derivados muestran efectos dependientes de la estructura en la inhibición del indicador NFAT en células Jurkat. Las barras de error representan la desviación estándar de la media para todas las mediciones (n=3) y los valores de absorbancia/luminiscencia se normalizaron a las células tratadas con DMSO.

La Figura 3 representa curvas de respuesta a la dosis para la activación del indicador de BMP por tres análogos no inmunosupresores (1b, 2b y 3b) y FK506.

- 20 Las Figuras 4a-4b muestran detalles de unión hacia la calcineurina. (4a) Primer plano de olefina terminal FK-506 con calcineurina. (4b) Efecto estérico de FKVP con calcineurina.

- Las Figuras 5a-5c (1a-1c) ilustran la síntesis novedosa de un análogo no inmunosupresor (FKVP) modificando FK506 en la posición C40. (5a) Estructuras químicas de FK506, FKVP, SLF y CsA. (5b) Ensayo de viabilidad celular basado en resazurina de células Jurkat después de 3 días de tratamiento con FKVP o FK506 (n = 3). Los valores de absorbancia se normalizaron al control de DMSO. Las barras de error representan la desviación estándar. (5c) La actividad indicadora de NFAT-Luciferasa de las células Jurkat activadas con PMA/Ionomicina se inhibe por FK506 y CsA, pero no por FKVP y SLF. Las curvas de respuesta a la dosis se obtuvieron tratando células Jurkat que expresan el gen indicador de NFAT-luciferasa con diluciones en serie de los compuestos indicados y las actividades relativas de la luciferasa se determinaron tras la normalización a valores de control de DMSO. (n = 3).

- 30 La Figura 6 muestra un esquema de la síntesis de FVKP mediante metátesis cruzada catalizada por rutenio. Esquema de síntesis de FVKP.

Las Figuras 7a-7b representan el tratamiento con FVKP de células Jurkat

- Las Figuras 8a-8b muestran que FKVP compite tanto con FK506 como con rapamicina por la unión de FKBP12. Tanto FK506 como rapamicina requieren FKBP12 para su actividad. (8a) FKVP bloquea la inhibición de FK506 de la desfosforilación de NFAT mediada por calcineurina (banda inferior), (8b) así como la inhibición de la fosforilación de S6 mediada por mTOR por rapamicina.

- Las Figuras 9a-9c muestran la cicatrización acelerada de heridas en ratas GK diabéticas tratadas con combinación de AMD3100 y FK506 o FKVP. (9a) El modelo de herida: se crearon cuatro heridas escisionales circulares (8 mm de diámetro) en la parte dorsal de ratas GK. (9b) Fotografías representativas de heridas en ratas GK para cada grupo de tratamiento (AF=AMD3100+FK506 AV=AMD3100+FKVP), los días 0, 6, 12, 18 y 24. (9c) Análisis cuantitativo del tiempo de cicatrización completa en ratas GK. Todos los datos se representan por la media $\pm$ SEM.

- Las Figuras 10a-10c muestran que análogos no inmunosupresores, tales como los compuestos de fórmula I, activan el indicador de ID-1 y la fosforilación de pSMAD1/5 a través de la activación del receptor de BMP tipo 1. (10a) Actividad indicadora del elemento de respuesta a BMP (BRE) en células Jurkat después del tratamiento con cantidades crecientes de FK506 y FKVP. Esta actividad se inhibe fuertemente mediante la adición de LDN-193182 100 nM. TGF- β 1 sirve como control negativo, mientras que BMP4 muestra una fuerte inducción de la expresión de luciferasa después de 18 horas. Las actividades relativas de la luciferasa se determinaron tras la normalización a valores de control de DMSO. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. (10b) Inducción dependiente de la dosis de la fosforilación de SMAD1/5 por FKVP en células Jurkat. (10c) El inhibidor selectivo de BMPRI1, LDN-193189 inhibe la fosforilación de SMAD1/5 inducida por BMP-4 o FKVP en células Jurkat.

La Figura 11 muestra que, a diferencia de SMAD/16, FKVP no activa la fosforilación de SMAD2/3. Las células Jurkat no muestran un aumento apreciable en la fosforilación de SMAD2/3 después de 2 h. Tratamiento con FKVP en comparación con controles positivos (TGF- β 1).

La Figura 12 muestra que AMD-3100 no afecta la señalización de BMP solo, o en combinación con FKVP. Tratamientos individuales y de combinación de FKVP y AMD3100 en el ensayo de luciferasa de FKVP de BMP Jurkat (n = 3). Las actividades relativas de la luciferasa se determinaron tras la normalización a valores de control de DMSO. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

- 5 La Figura 13 muestra que FKVP activa la señalización de BMP en presencia del inhibidor de BMP, Nogina. Tratamientos de combinación de BMP-4, FKVP, FK506 y Nogina en el ensayo de activación de BMP en Jurkat (n = 3). Las actividades relativas de la luciferasa se determinaron tras la normalización a valores de control de DMSO. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

- 10 La Figura 14 ilustra que FKVP aumenta la sensibilidad de las células a la estimulación de BMP-4. BMP-4, FKVP, y tratamientos de combinación en el ensayo de activación de BMP en Jurkat (n = 3). Las actividades relativas de la luciferasa se determinaron tras la normalización a valores de control de DMSO. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

- 15 Las Figuras 15a-15c representan que FKVP activa la fosforilación de SMAD1/5 y la expresión de ID-1 en HUVEC. (15a) Transferencia Western de la fosforilación de SMAD1/5 después de 2 h. Tratamiento con tratamientos de combinación de BMP-4, FKVP, LDN en células HUVEC. (15b) Transferencia Western en el transcurso del tiempo de células HUVEC tratadas con FKVP 200 nM y transferidas para fosforilación de SMAD1/5 y (15c) expresión de ID-1.

- 20 Las Figuras 16a-16d muestran que se requiere FKBP12 sola para la fosforilación de SMAD1/5 inducida por FK506 y FKVP. (16a) Inducción de la fosforilación de SMAD1/5 por FKVP y BMP-4 en células de tipo salvaje y con inactivación de diferentes isoformas de FKBP. (16b) Activación del indicador de la ruta de BMP por FKVP y FK506 en diferentes células con inactivación de diferentes isoformas de FKBP e inhibición de la activación del gen indicador por LDN (n = 3). Las actividades relativas de la luciferasa se determinaron tras la normalización a valores de control de DMSO. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. (16c) La expresión de la proteína de fusión FKBP12-SNAP restaura la activación de la ruta de BMP por FKVP y FK506 en células Jurkat FKBP12KO (n = 3). (16d) Sedimentación de receptores ALK usando FKBP12-SNAP junto con perlas funcionalizadas con SNAP en ausencia y
25 presencia de FKVP.

La Figura 17 ilustra que FKBP12-SNAP interactúa tanto con mTOR como con calcineurina. Sedimentación de la etiqueta SNAP y transferencia Western que muestran que FKBP12-SNAP se asocia eficientemente tanto con calcineurina como con mTOR en presencia de FK506 y rapamicina, respectivamente. Como control negativo, FKVP no induce la asociación de calcineurina. Los tratamientos con proteína BMP no se sondaron para este experimento.

- 30 Las Figuras 18a-18c muestran que el bloqueo de la señalización de BMP anula el efecto beneficioso de la terapia de combinación de AF en la cicatrización de heridas. (18a) Fotografías representativas de heridas en ratas GK tratadas con solución salina, LDN, AF o AF más LDN que muestran la diferencia entre AF y AF más LDN comenzando el día 12. (18b) Análisis cuantitativo del tiempo de cicatrización completa en ratas GK. Todos los datos se representan por la media $\pm$ SEM. (18c) Tinciones inmunohistoquímicas representativas para el marcador de células madre CD133 en tejidos de granulación de ratas GK el día 7. Las ratas que recibieron tratamiento con AF tenían un número significativamente mayor de células CD133 (marrones) en tejidos de granulación en comparación con el grupo de control de solución salina, mientras que el tratamiento con LDN redujo drásticamente el número de células madre CD133 en los sitios de la herida.

- 40 Figura 19 Sin limitarse a ninguna teoría particular, la ilustración muestra una visión general mecánica de la cicatrización mejorada por el compuesto ejemplar de fórmula I, FKVP y el estimulador de células madre, AMD3100, de la presente invención. AMD3100 libera células madre CD133+ en la circulación, donde la activación de BMP mediada por FKVP influye en el reclutamiento a tejidos heridos. La inhibición sistémica de FKBP12 por FKVP permite la expresión génica relacionada con BMP tanto en células madre/progenitoras movilizadas como en el endotelio sin afectar a las respuestas inmunitarias necesarias para la herida.

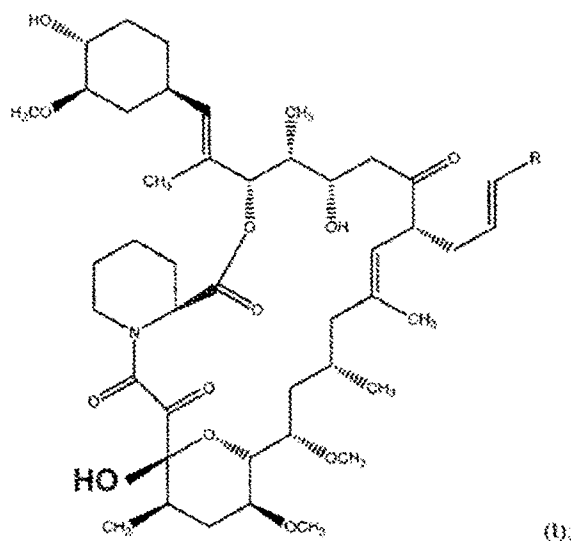
- 45 La Figura 20 es la estructura de FKVP y los espectros de masas del compuesto $[C_{49}H_{72}N_2O_{12}+H]^+$ 881,5 (HRMS-ESI (m/z): calc. para $C_{49}H_{72}N_2O_{12}$ [FKVP+ H]⁺ 881,5164, encontrado 881,5135).

La Figura 21 representa los espectros de RMN para la caracterización de la estructura de FKVP. Espectros de ¹H-RMN de (21a) FKVP y (21b) FK506 (CDCl₃), incluyendo el detalle de 5,5 ppm-6,0 ppm que muestra la desaparición del alqueno terminal en FKVP (presente en FK506, resaltado en amarillo).

50 Descripción detallada de la invención

Los siguientes ejemplos se han incluido para proporcionar orientación a un experto en la técnica para practicar realizaciones representativas de la materia objeto actualmente divulgada.

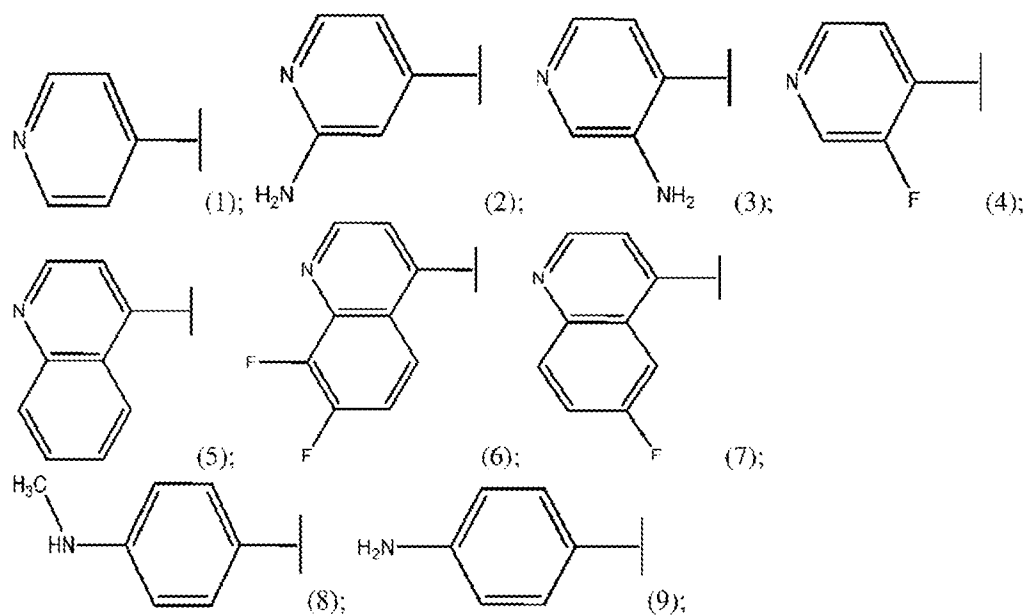
Según una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I:

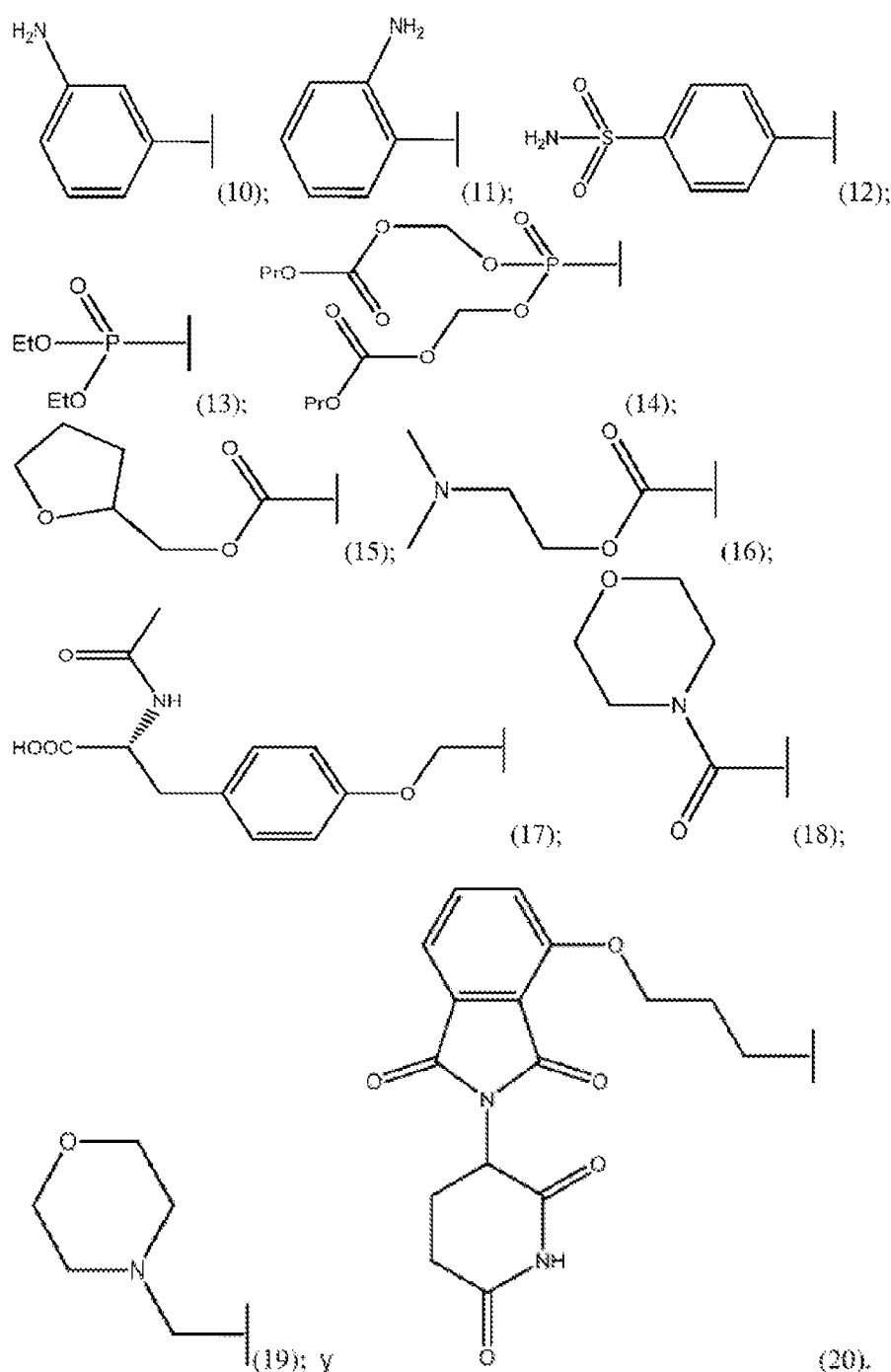


o una sal o solvato del mismo, en donde R es un grupo cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido con H, halo, N, O, P, alquilo C₁-C₆, imidazoilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo y en donde los grupos heteroarilo y heterocicloalquilo comprenden nitrógeno, oxígeno o azufre.

Los compuestos no inmunosupresores de fórmula I se derivan del agente inmunosupresor, Tacrolimus. El tacrolimus (también FK-506 o Fujimicina) es un fármaco inmunosupresor que se usa principalmente después del trasplante de órganos alogénico para reducir la actividad del sistema inmunitario del paciente y así disminuir el riesgo del rechazo de órganos. Reduce la producción de interleucina-2 (IL-2) por las células T. También se usa en una preparación tópica en el tratamiento de dermatitis atópica grave (eccema), uveítis refractaria grave después de trasplantes de médula ósea y la afección de la piel vitíligo. Es una lactona macrólida de 23 miembros descubierta en 1984 a partir del caldo de fermentación de una muestra de suelo japonesa que contenía la bacteria *Streptomyces tsukubaensis*. El fármaco se vende con los nombres comerciales Prograf® administrado dos veces al día (intravenoso), Advagraf® una formulación de liberación sostenida que permite una dosificación (oral) y una vez al día y la formulación tópica Protopic®.

Según una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I, en donde R se selecciona del grupo que consiste en:





El término "alifático" es un término reconocido en la técnica e incluye alcanos, alquenos o alquinos lineales, ramificados y cíclicos. En ciertas realizaciones, los grupos alifáticos en la presente invención son lineales o ramificados y tienen de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono.

El término "alquilo" está reconocido en la técnica e incluye grupos alifáticos saturados, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal, grupos alquilo de cadena ramificada, grupos cicloalquilo (alícíclicos), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo. En ciertas realizaciones, un alquilo de cadena lineal o cadena ramificada tiene aproximadamente 30 o menos átomos de carbono en su estructura principal (por ejemplo, C₁-C₃₀ para cadena lineal, C₃-C₃₀ para cadena ramificada), y alternativamente, aproximadamente 20 o menos átomos de carbono. Asimismo, los cicloalquilos tienen de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono en su estructura de anillo, y alternativamente aproximadamente 5, 6 ó 7 carbonos en la estructura de anillo.

Además, el término "alquilo" (o "alquilo inferior") incluye tanto "alquilos no sustituidos" como "alquilos sustituidos", el último de los cuales se refiere a restos alquilo que tienen sustituyentes que reemplazan el hidrógeno en uno o más carbonos de la cadena principal de hidrocarburo. Dichos sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, un halógeno, un

hidroxilo, un carbonilo (tal como un carboxilo, un alcoxicarbonilo, un formilo o un acilo), un tiocarbonilo (tal como un tioéster, un tioacetato o un tioformiato), un alcoxilo, un fosforilo, un fosfonato, un fosfinato, un amino, una amidina, una imina, un ciano, un nitro, un azido, un sulfhidrilo, un alquiltio, un sulfato, un sulfonato, un sulfamoilo, un sulfonamido, un sulfonilo, un heterociclilo, un aralquilo o un resto aromático o heteroaromático. Los expertos en la técnica entenderán que los restos sustituidos en la cadena de hidrocarburo pueden estar sustituidos por sí mismos, si es apropiado. Por ejemplo, los sustituyentes de un alquilo sustituido pueden incluir formas sustituidas y no sustituidas de grupos amino, azido, imino, amido, fosforilo (incluyendo fosfonato y fosfinato), sulfonilo (incluyendo sulfato, sulfonamido, sulfamoilo y sulfonato), y sililo, así como éteres, alquiltios, carbonilos (incluyendo cetonas, aldehídos, carboxilatos, y ésteres), $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ y similares. A continuación, se describen alquilos sustituidos ejemplares. Los cicloalquilos pueden estar sustituidos adicionalmente con alquilos, alquenilos, alcoxis, alquiltios, aminoalquilos, alquilos sustituidos con carbonilo, $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ y similares.

El término "aralquilo" está reconocido en la técnica e incluye grupos arilo (por ejemplo, un grupo aromático o heteroaromático).

Los términos "alquenilo" y "alquinilo" están reconocidos en la técnica, y en una molécula orgánica, generalmente incluyen un átomo de cualquier elemento distinto de carbono o hidrógeno. Los heteroátomos ilustrativos incluyen boro, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre y selenio.

El término "arilo" está reconocido en la técnica e incluye grupos aromáticos de anillo único de 5, 6 y 7 miembros que pueden incluir de cero a cuatro heteroátomos, por ejemplo, benceno, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina, y similares. Los grupos arilo que tienen heteroátomos en la estructura del anillo también pueden denominarse "aril heterociclos" o "heteroaromáticos". El anillo aromático puede estar sustituido en una o más posiciones del anillo con sustituyentes tales como los descritos anteriormente, por ejemplo, halógeno, azida, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquiltio, sulfonilo, sulfonamido, cetona, aldehído, éster, heterociclilo, restos aromáticos o heteroaromáticos, $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ o similares. El término "arilo" también incluye sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos contiguos (los anillos son "anillos condensados") en donde al menos uno de los anillos es aromático, por ejemplo, los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos y/o heterociclicos, o anillos unidos por restos no cíclicos.

Los términos "orto", "meta" y "para" son reconocidos en la técnica y se aplican a ciclohexanos disustituidos en 1,2, 1,3 y 1,4, respectivamente. Por ejemplo, los nombres 1,2-dimetilbenceno y orto-dimetilbenceno son sinónimos.

Los términos "heterociclilo" y "grupo heterocíclico" están reconocidos en la técnica e incluyen estructuras de anillo de 3 a aproximadamente 10 miembros, tales como anillos de 3 a aproximadamente 7 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen de uno a cuatro heteroátomos. Los heterociclos también pueden ser policíclicos. Los grupos heterociclilo incluyen, por ejemplo, tiofeno, tiantreno, furano, pirano, isobenzofurano, cromeno, xanteno, fenoxantina, pirrol, imidazol, pirazol, isotiazol, isoxazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, indazol, purina, quinolizina, isoquinolina, quinolina, ftalazina, naftiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, pirimidina, fenantrolina, fenazina, fenarsazina, fenotiazina, furazano, fenoxazina, pirrolidina, oxolano, tiolano, oxazol, piperidina, piperazina, morfolina, lactonas, lactamas tales como azetidionas y pirrolidinonas, sultamas, sultonas y similares. El anillo heterocíclico puede estar sustituido en una o más posiciones con sustituyentes tales como los descritos anteriormente, como, por ejemplo, halógeno, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquiltio, sulfonilo, cetona, aldehído, éster, un heterociclilo, un resto aromático o heteroaromático, $-\text{CD}_3$, $-\text{CN}$ o similares.

Los términos "policiclilo" y grupo policíclico" están reconocidos en la técnica e incluyen estructuras con dos o más anillos (por ejemplo, cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos y/o heterociclicos) en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos contiguos, por ejemplo, los anillos son "anillos condensados". Los anillos que están unidos a través de átomos no adyacentes, por ejemplo, tres o más átomos son comunes a ambos anillos, se denominan anillos "puenteados". Cada uno de los anillos del policiclo puede estar sustituido con sustituyentes tales como los descritos anteriormente, como, por ejemplo, halógeno, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquiltio, sulfonilo, cetona, aldehído, éster, un heterociclilo, un resto aromático o heteroaromático, $-\text{CD}_3$, $-\text{CN}$ o similares.

El término carbociclo está reconocido en la técnica e incluye un anillo aromático o no aromático en el que cada átomo del anillo es carbono. Los siguientes términos reconocidos en la técnica tienen los siguientes significados: "nitro" significa $-\text{NO}_2$; el término "halógeno" designa $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$ o $-\text{I}$; el término "sulfhidrilo" significa $-\text{SH}$; el término "hidroxilo" o "hidroxi" significa $-\text{OH}$; y el término "sulfonilo" significa $-\text{SO}_2$.

Los términos "amina" y "amino" están reconocidos en la técnica e incluyen aminas tanto no sustituidas como sustituidas. Una amina primaria porta dos hidrógenos, una amina secundaria, un hidrógeno y otro sustituyente y una amina terciaria, los dos hidrógenos están sustituidos. Los sustituyentes para uno o ambos de los hidrógenos pueden ser, por ejemplo, alquilo, alquenilo y arilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, heterociclo, policiclo, etc. Si ambos hidrógenos

están sustituidos con carbonilos, el nitrógeno con el marco carbonilo forma una imida.

El término "alquilamina" incluye un grupo amina, como se ha definido anteriormente, que tiene un alquilo sustituido o no sustituido unido al mismo.

El término "amido" se reconoce en la técnica como un carbonilo sustituido con amina.

- 5 El término "alquiltio" está reconocido en la técnica e incluye un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, que tiene un radical azufre unido al mismo. En ciertas realizaciones, el resto "alquiltio" está representado por uno de -S-alquilo, -S-alquenilo, -S-alquinilo, etc. Los grupos alquiltio representativos incluyen metiltio, etiltio y similares.

El término carbonilo está reconocido en la técnica e incluye una estructura C=O. Los carbonilos están implicados en ésteres; grupos carboxilo; formiatos; tiocarbonilos; tioésteres; ácidos tiocarboxílicos; tioformiatos; cetonas; y aldehídos.

- 10 Los términos "alcoxilo" y "alcoxi" están reconocidos en la técnica e incluyen un grupo alquilo, tal como se definió anteriormente, que tiene un radical oxígeno unido al mismo. Los grupos alcoxilo representativos incluyen metoxi, etoxi, propiloxi, terc-butoxi y similares.

- 15 Un "éter" son dos hidrocarburos unidos covalentemente por un oxígeno. Por consiguiente, el sustituyente de un alquilo que convierte a ese alquilo en un éter es o se asemeja a un alcoxilo, tal como puede representarse por uno de -O-alquilo, -O-alquenilo, -O-alquinilo y así sucesivamente.

El término "sulfonato" está reconocido en la técnica e incluye un resto en donde un átomo de azufre lleva dos oxígenos unidos por doble enlace y un oxígeno unido por enlace sencillo.

El término "sulfato" está reconocido en la técnica e incluye un resto que se asemeja a un sulfonato, pero incluye dos oxígenos unidos por enlace sencillo.

- 20 Los términos "sulfonamida", "sulfamoilo", "sulfonilo" y "sulfóxido" están reconocidos en la técnica y cada uno puede incluir una variedad de sustituyentes del grupo R como se describe en la presente memoria.

Los términos "fosforamidita" y "fosfonamidita" están reconocidos en la técnica.

- 25 El término "selenoalquilo" está reconocido en la técnica e incluye un grupo alquilo que tiene un grupo seleno sustituido unido al mismo. Los "selenoéteres" ejemplares que pueden estar sustituidos en el alquilo se seleccionan de uno de -Se-alquilo, -Se-alquenilo, -Se-alquinilo, etc.

Se pueden realizar sustituciones en grupos alquenilo y alquinilo para producir, por ejemplo, aminoalquenilos, aminoalquinilos, amidoalquenilos, iminoalquenilos, iminoalquinilos, tioalquenilos, tioalquinilos, alquenilos o alquinilos sustituidos con carbonilo.

- 30 Un hidrocarburo es un término reconocido en la técnica e incluye todos los compuestos permisibles que tienen al menos un hidrógeno y un átomo de carbono. Por ejemplo, los hidrocarburos permisibles incluyen compuestos orgánicos acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos que pueden estar sustituidos o no sustituidos.

- 35 La expresión "grupo protector" está reconocida en la técnica e incluye sustituyentes temporales que protegen un grupo funcional potencialmente reactivo de transformaciones químicas no deseadas. Los ejemplos de tales grupos protectores incluyen ésteres de ácidos carboxílicos, silil éteres de alcoholes, y acetales y cetales de aldehídos y cetonas, respectivamente. Se ha revisado el campo de la química de grupos protectores, Greene et al., Protective Groups in Organic Synthesis 2ª ed., Wiley, Nueva York, (1991), por ejemplo.

- 40 La definición de cada expresión, por ejemplo, alquilo, arilo, etc., cuando se produce más de una vez en cualquier estructura, pretende ser independiente de su definición en cualquier parte de la misma estructura a menos que se indique expresamente lo contrario o por el contexto.

- 45 Los términos triflilo, tosilo, mesilo y nonaflilo están reconocidos en la técnica y se refieren a grupos trifluorometanosulfonilo, p-toluenosulfonilo, metanosulfonilo y nonafluorobutanossulfonilo, respectivamente. Los términos triflato, tosilato, mesilato y nonaflato están reconocidos en la técnica y se refieren a grupos funcionales éster trifluorometanosulfonato, éster p-toluenosulfonato, éster metanosulfonato y éster nonafluorobutanossulfonato y a moléculas de que contienen dichos grupos, respectivamente.

- 50 Las abreviaturas Me, Et, Ph, Tf, Nf, Ts y Ms están reconocidas en la técnica y representan metilo, etilo, fenilo, trifluorometanosulfonilo, nonafluorobutanossulfonilo, p-toluenosulfonilo y metanosulfonilo, respectivamente. Una lista más exhaustiva de las abreviaturas utilizadas por los químicos orgánicos de experiencia ordinaria en la técnica aparece en el primer número de cada volumen del Journal of Organic Chemistry; esta lista se presenta típicamente en una tabla titulada Lista Estándar de Abreviaturas.

Se entenderá que "sustitución" o "sustituido con" incluye la condición implícita de que tal sustitución es según la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente, y que la sustitución da como resultado un compuesto estable, por ejemplo, que no experimenta espontáneamente transformación, tal como por transposición, ciclación, eliminación u otra reacción.

- 5 El término "sustituido" también se contempla que incluya todos los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos tales como el reactivo imida de interés. En un aspecto amplio, los sustituyentes permisibles incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos de compuestos orgánicos. Los sustituyentes ilustrativos incluyen, por ejemplo, los descritos en la presente memoria. Los sustituyentes permisibles pueden ser uno o más y los mismos o diferentes para los compuestos orgánicos apropiados.
- 10 Para los fines de esta invención, los heteroátomos tales como nitrógeno pueden tener sustituyentes hidrógeno y/o cualquier sustituyente permisible de compuestos orgánicos descritos en la presente memoria que satisfagan las valencias de los heteroátomos. Esta invención no pretende estar limitada de ninguna manera por los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos.

- 15 Según una realización, la presente invención proporciona un método para preparar una molécula de FK506 sustituida con arilo, que comprende las etapas de: a) añadir una cantidad suficiente de FK506 a una mezcla que comprende una cantidad suficiente de un haluro de arilo en presencia de un catalizador de paladio y una base en un disolvente aprótico polar; b) calentar la mezcla durante un tiempo suficiente para que el haluro de arilo reaccione con FK506 para crear una sustitución de arilo en las moléculas de FK506 y c) aislar el producto de FK506 sustituido con arilo.

- 20 Como se usa en la presente memoria, la presente invención proporciona un nuevo método para producir sustituciones de arilo en la molécula de FK506 en el carbono alquénico terminal (carbono 40) de la molécula. La presente invención usa la reacción de Heck. La reacción de Heck (también denominada reacción de Mizoroki-Heck) es la reacción química de un haluro insaturado (o triflato) con un alqueno en presencia de una base y un catalizador de paladio (o catalizador basado en nanomaterial de paladio) para formar un alqueno sustituido. Se denomina por Tsutomu Mizoroki y Richard F. Heck. A Heck se le adjudicó el Premio Nobel en Química de 2010, que compartió con Ei-ichi Negishi y Akira Suzuki,
- 25 por el descubrimiento y desarrollo de esta reacción. Esta reacción fue el primer ejemplo de una reacción de formación de enlaces carbono-carbono que seguía un ciclo catalítico de Pd(0)/Pd(II), el mismo ciclo catalítico que se observa en otras reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por Pd(0).

En algunas realizaciones, los métodos divulgados se usan para preparar los compuestos sustituidos con arilo de compuestos de FK506 (compuestos de fórmula I).

- 30 En algunas realizaciones, los catalizadores usados en los métodos divulgados pueden ser catalizadores y precatalizadores típicos que incluyen tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0), cloruro de paladio y acetato de paladio(II).

En algunas realizaciones, los ligandos de soporte que se usan en los métodos divulgados son trifenilfosfina, PHOX y BINAP.

- 35 En algunas realizaciones, las bases usadas en los métodos divulgados son trietilamina, carbonato potásico, tris(o-tolil)fosfina y acetato sódico.

En algunas realizaciones, el electrófilo de arilo usado en los métodos divulgados son haluros, así como un triflato, así como haluros de bencilo o vinilo.

En algunas realizaciones, el método divulgado ocurre en ausencia de oxígeno.

- 40 En algunas realizaciones, el método divulgado ocurre en un disolvente aprótico polar. Los ejemplos de tales disolventes incluyen N-metilpirrolidona, THF, acetato de etilo, acetona, DMF, acetonitrilo, DMSO y carbonato de propileno.

En algunas realizaciones, los métodos divulgados calientan los reactantes en el intervalo de 80-130 °C. En una realización preferida, la reacción se calienta hasta aproximadamente 100 °C.

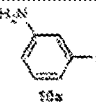
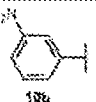
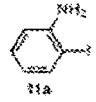
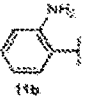
- 45 En algunas realizaciones, la cantidad suficiente de haluro de arilo respecto a FK506 está en el intervalo de 1 a 3 equivalentes molares. En algunas realizaciones, la cantidad suficiente de catalizador de paladio es de aproximadamente el 2 a aproximadamente el 20 % en moles. En algunas realizaciones, la cantidad suficiente de base está entre aproximadamente el 5 y aproximadamente el 30 % en moles de tris(o-tolil)fosfina o trimetilamina.

En algunas realizaciones, los haluros de arilo usados en los métodos divulgados se seleccionan de los mostrados en la Tabla 1 a continuación.

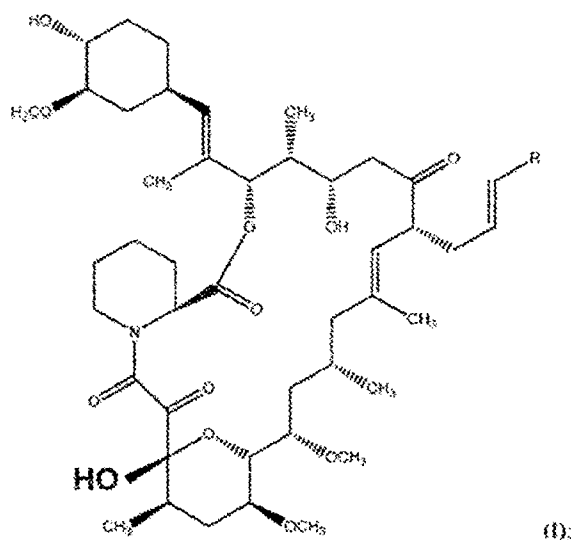
50

Tabla 1: Un esquema de los métodos divulgados y los haluros de arilo que se pueden usar con los métodos divulgados.

Entrada	Haluro de arilo	Producto (Ar =)	Tiempo/h	Rendimiento (%) ^b
1			24	66
2			24	42 (52) ^c
3			24	40 (54) ^c
<			24	78
5			18	72
6			18	70
7			18	68
a			20	62
9			12	36

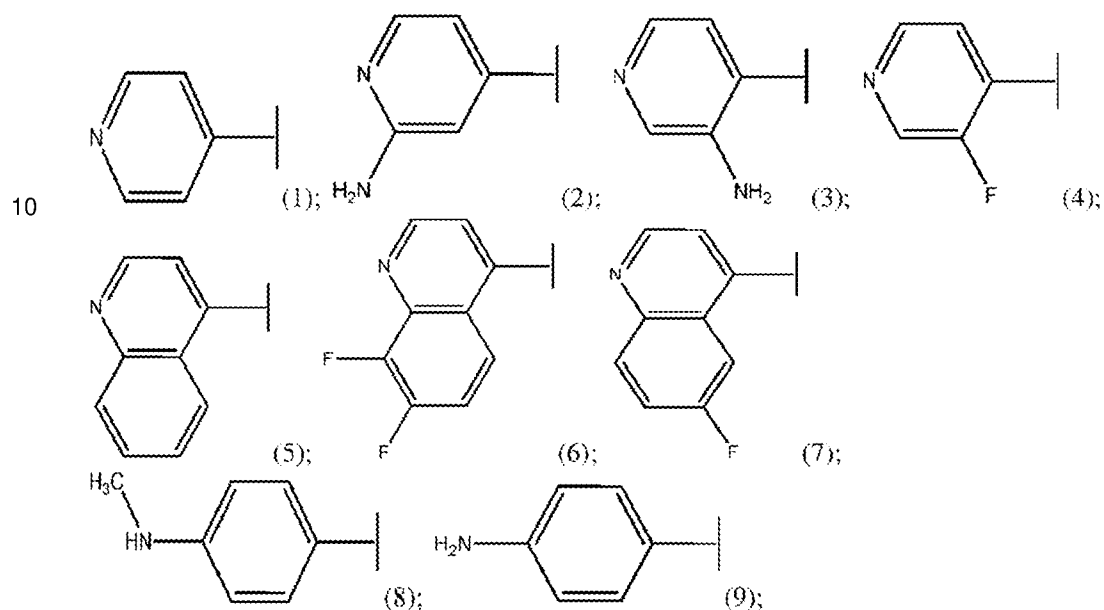
10			12	42
11			12	45

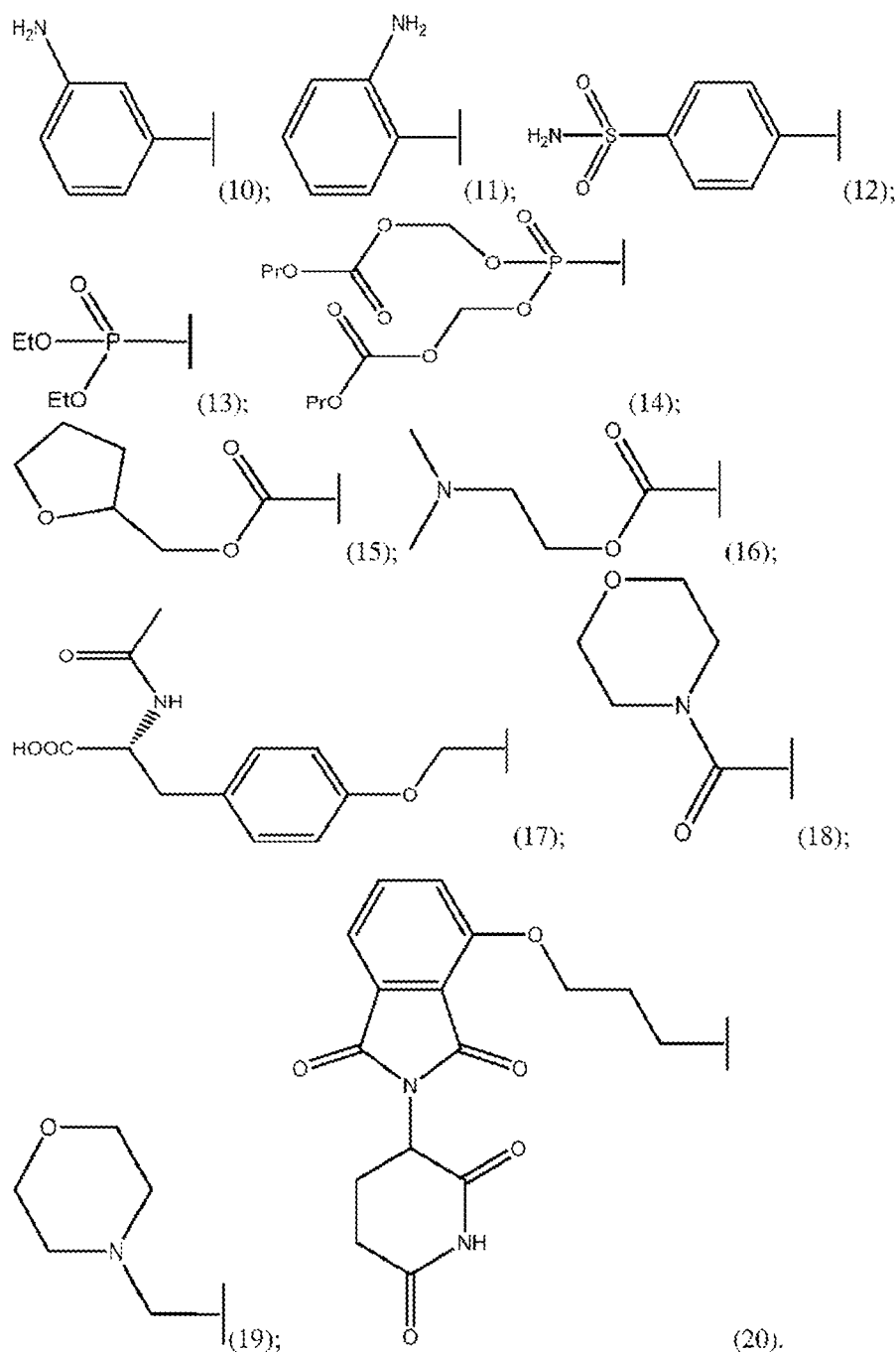
Según una realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un compuesto de fórmula I:



- 5 o una sal o solvato del mismo, en donde R es un grupo cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido con H, halo, N, O, P, alquilo C₁-C₆, imidazoilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, en donde los grupos heteroarilo y heterocicloalquilo comprenden nitrógeno, oxígeno o azufre; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Según una realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un compuesto de fórmula I, en donde R se selecciona del grupo que consiste en:





5

10

15

Como se usa en la presente memoria, el término "efectivo" significa adecuado para lograr un resultado deseado, esperado o previsto. Más particularmente, una "cantidad efectiva" o una "cantidad terapéuticamente efectiva" se usa indistintamente y se refiere a una cantidad de un movilizador de células madre y/o un agente inmunosupresor, quizás en combinación adicional con otro agente terapéutico, necesaria para proporcionar el "tratamiento" (definido en la presente memoria) o efecto terapéutico deseado, por ejemplo, una cantidad que es efectiva para prevenir, aliviar, tratar o mejorar los síntomas de una lesión o herida tisular. Como apreciará un experto en la técnica, la cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la edad, el estado general del sujeto, la gravedad de la afección que se está tratando, el compuesto y/o composición particular administrado, y similares. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" apropiada en cualquier caso individual puede ser determinada por un experto en la técnica por referencia a los textos y bibliografía pertinentes y/o usando experimentación rutinaria.

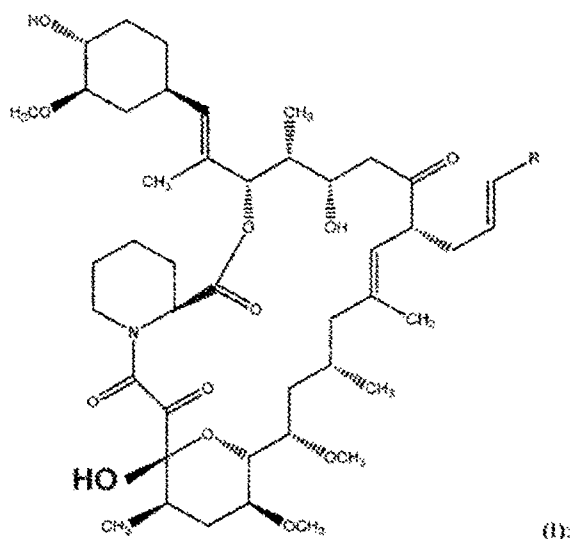
20

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención están en una forma biológicamente compatible adecuada para la administración tópica o in vivo para sujetos. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente, en seres humanos. El término "vehículo"

se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o portador con el que se administran el movilizador de células madre y/o los compuestos de fórmula I. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, incluyendo, pero sin limitarse a, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua puede ser un vehículo cuando la composición farmacéutica se administra por vía oral. La solución salina y la dextrosa acuosa pueden ser vehículos cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol pueden emplearse como vehículos líquidos para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche diluida seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición farmacéutica también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos estándar tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. En una realización específica, una composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva de un movilizador de células madre y/o un compuesto de fórmula I junto con una cantidad adecuada de un vehículo farmacéuticamente aceptable para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe adaptarse al modo de administración. Una formulación preferida es una formulación subcutánea.

Según una realización, la presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de lesión tisular en un sujeto en donde la composición comprende una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula I:

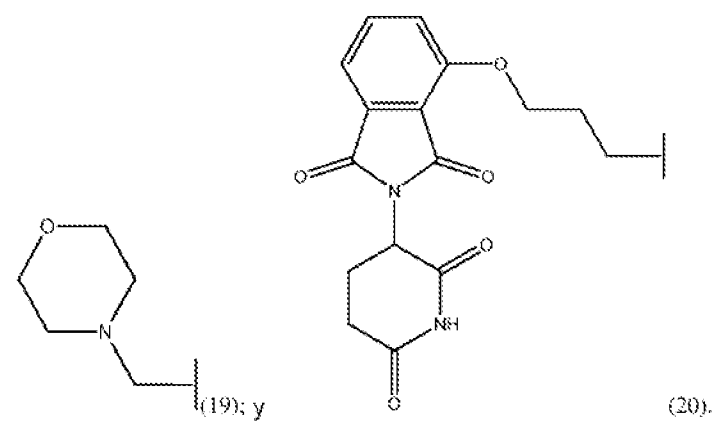
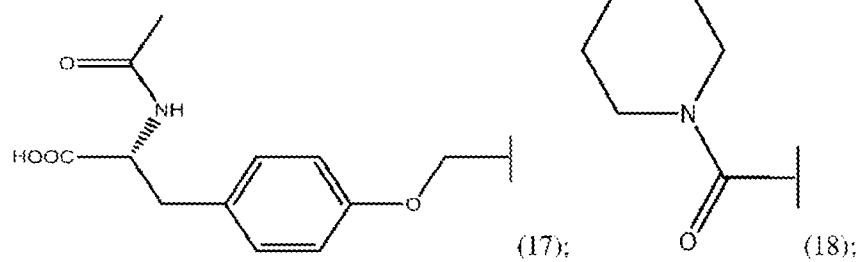
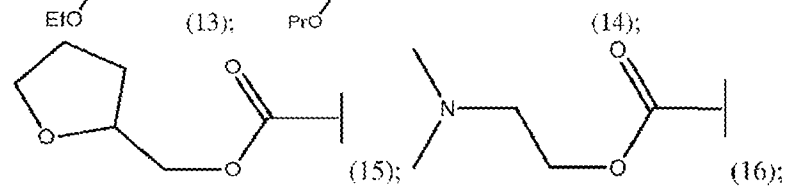
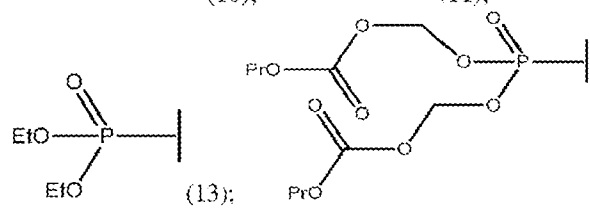
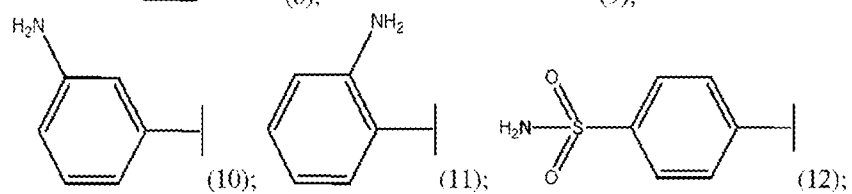
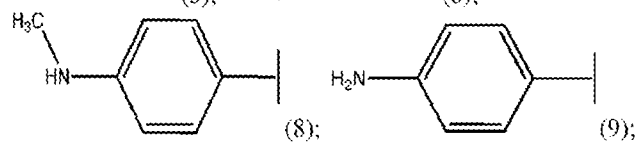
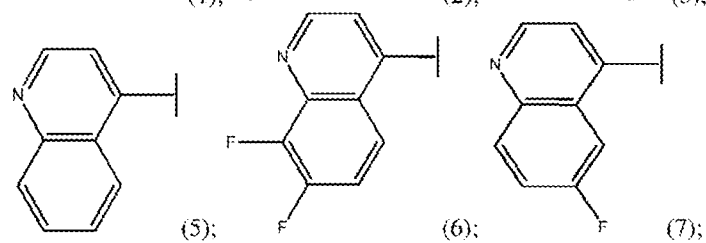
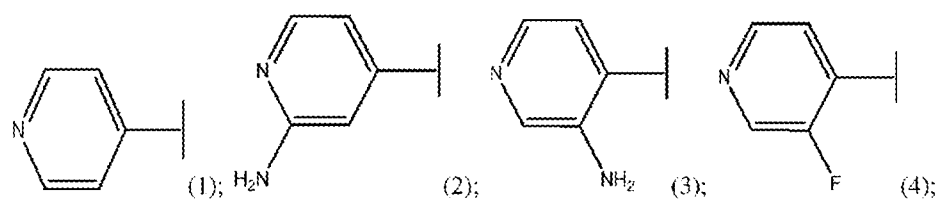


o una sal o solvato del mismo, en donde R es un grupo cicloalquilo, arilo o heteroarilo, sustituido con H, halo, N, O, P, alquilo C₁-C₆, imidazoilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, y en donde los grupos heteroarilo y heterocicloalquilo comprenden nitrógeno, oxígeno y azufre.

Según otra realización, la presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de lesión tisular en un sujeto, en donde la composición comprende una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula I y una cantidad efectiva de al menos un movilizador de células madre.

Según una realización adicional, la presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de lesión tisular en donde la composición comprende una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula I, y una cantidad efectiva de al menos un movilizador de células madre, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de lesión tisular en un sujeto en donde la composición comprende una cantidad efectiva de a que comprende un compuesto de fórmula I, en donde R se selecciona del grupo que consiste en:



Según una realización adicional, la presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de lesión tisular en un sujeto en donde la composición comprende una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula I, una cantidad efectiva de al menos un movilizador de células madre, al menos un agente biológicamente activo adicional y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía de administración particular incluyendo, pero sin limitarse a, oral, parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraósea, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniana, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, medios iontoforéticos o medios transdérmicos. Las vías más adecuadas son la administración oral o inyección. En ciertas realizaciones, se prefiere la inyección subcutánea.

En general, las composiciones farmacéuticas que comprenden un movilizador de células madre y los compuestos de fórmula I divulgados en la presente memoria pueden usarse solos (por ejemplo, una formulación que comprende un movilizador de células madre y los compuestos de fórmula I) o junto con otros agentes terapéuticos a dosificaciones apropiadas definidas por ensayos rutinarios con el fin de obtener una eficacia óptima mientras se minimiza cualquier toxicidad potencial. El régimen de dosificación que utiliza una composición farmacéutica de la presente invención puede seleccionarse según una variedad de factores que incluyen el tipo, especie, edad, peso, sexo, estado médico del paciente; la gravedad de la afección que va a tratarse; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y la composición farmacéutica particular empleada. Un médico de experiencia ordinaria puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad efectiva de la composición farmacéutica (y potencialmente de otros agentes incluyendo agentes terapéuticos) requerida para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la afección.

La precisión óptima para lograr concentraciones del régimen terapéutico (por ejemplo, composiciones farmacéuticas que comprenden un movilizador de células madre y/o compuesto de fórmula I en combinación con otro agente terapéutico) dentro del intervalo que produce la máxima eficacia con toxicidad mínima puede requerir un régimen basado en la cinética de la disponibilidad de la composición farmacéutica para uno o más sitios diana. La distribución, equilibrio y eliminación de una composición farmacéutica se puede considerar cuando se determina la concentración óptima para un régimen de tratamiento. Las dosificaciones de una composición farmacéutica divulgada en la presente memoria pueden ajustarse cuando se combinan para lograr los efectos deseados. Por otro lado, las dosificaciones de las composiciones farmacéuticas y diversos agentes terapéuticos pueden optimizarse y combinarse independientemente para lograr un resultado sinérgico en donde la patología se reduce más de lo que lo haría si cualquiera de los dos se usara solo.

En particular, la toxicidad y la eficacia terapéutica de una composición farmacéutica divulgada en la presente memoria se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50 % de la población). La relación de dosis entre el efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren las composiciones farmacéuticas que presentan índices terapéuticos grandes excepto cuando la citotoxicidad de la composición es la actividad o el resultado terapéutico que se desea. Aunque pueden usarse composiciones farmacéuticas que muestran efectos secundarios tóxicos, un sistema de administración puede dirigir tales composiciones al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a células no infectadas y, por tanto, reducir los efectos secundarios. Generalmente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de una manera que maximice la eficacia y minimice la toxicidad.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios con animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificaciones para su uso en seres humanos. Las dosificaciones de tales composiciones se encuentran preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier composición usada en los métodos de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la CI_{50} (La concentración de la composición de ensayo que logra una inhibición de los síntomas que es la mitad de la máxima) como se determina en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con precisión dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Además, la administración de la dosificación de las composiciones de la presente invención puede optimizarse usando un sistema de modelado farmacocinético/farmacodinámico. Por ejemplo, se pueden elegir uno o más regímenes de dosificación y se puede usar un modelo farmacocinético/farmacodinámico para determinar el perfil farmacocinético/farmacodinámico de uno o más regímenes de dosificación. A continuación, se puede seleccionar uno de los regímenes de dosificación para la administración que consiga la respuesta farmacocinética/farmacodinámica deseada basándose en el perfil farmacocinético/farmacodinámico particular. Véase, WO 00/67776, que se incorpora expresamente de forma completa en la presente memoria por referencia.

"Agente" se refiere a todos los materiales que se pueden usar como o en composiciones farmacéuticas, o que pueden ser compuestos tales como pequeños compuestos orgánicos sintéticos o derivados de manera natural, ácidos nucleicos, polipéptidos, anticuerpos, fragmentos, isoformas, variantes u otros materiales que se pueden usar independientemente para tales propósitos, todos según la presente invención.

- 5 "Antagonista" se refiere a un agente que regula a la baja (por ejemplo, suprime o inhibe) al menos una bioactividad de una proteína. Un antagonista puede ser un compuesto que inhibe o disminuye la interacción entre una proteína y otra molécula, por ejemplo, un péptido diana o sustrato enzimático. Un antagonista también puede ser un compuesto que regula a la baja la expresión de un gen o que reduce la cantidad de proteína expresada presente.

- 10 "Hematopoyesis" se refiere al proceso altamente orquestado del desarrollo y homeostasis de las células sanguíneas. Prenatalmente, la hematopoyesis se produce en el saco vitelino, luego en el hígado y eventualmente en la médula ósea. En adultos normales, se produce en la médula ósea y los tejidos linfáticos. Todas las células sanguíneas se desarrollan a partir de células madre pluripotentes. Las células pluripotentes se diferencian en células madre que están comprometidas a tres, dos o una vía de diferenciación hematopoyética. Sin embargo, ninguna de estas células madre es morfológicamente distinguible.

- 15 El término "agente inmunosupresor" se refiere a un agente que inhibe, ralentiza o revierte la actividad del sistema inmunitario. Los agentes inmunosupresores actúan suprimiendo la función de las células inmunitarias respondedoras (incluyendo, por ejemplo, las células T), directamente (por ejemplo, actuando sobre la célula inmunitaria) o indirectamente (actuando sobre otras células mediadoras).

- 20 Los términos "células madre" y "células madre hematopoyéticas" se usan indistintamente en la presente memoria. Las células madre se distinguen de otros tipos celulares por dos características importantes. En primer lugar, las células madre son células no especializadas capaces de renovarse a sí mismas a través de la división celular, a veces después de largos períodos de inactividad. En segundo lugar, bajo ciertas condiciones fisiológicas o experimentales, se puede inducir a las células madre para que se conviertan en células específicas de tejido u órgano con funciones especiales. En algunos órganos, tales como el intestino y la médula ósea, las células madre se dividen regularmente para reparar y reemplazar tejidos desgastados o dañados. Sin embargo, en otros órganos, tales como el páncreas y el corazón, las células madre se dividen únicamente en condiciones especiales.

- 25 El término "células madre" puede referirse a células madre multipotentes que son capaces de diferenciarse en todas las células sanguíneas, incluidos eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Por ejemplo, las "células madre hematopoyéticas" o "células madre" como se usan en la invención están contenidas no solo en la médula ósea, sino también en células derivadas de sangre del cordón umbilical.

- 30 Un "paciente", "sujeto" o "huésped", que se va a tratar mediante los presentes métodos se refiere a un animal humano o no humano, tal como primates, mamíferos y vertebrados.

- 35 Una "molécula pequeña" se refiere a una composición que tiene un peso molecular de menos de 3 kilodaltons (kDa), menos de aproximadamente 1,5 kilodaltons o menos de aproximadamente 1 kilodalton. Las moléculas pequeñas pueden ser ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas orgánicas (que contienen carbono) o inorgánicas. Una "molécula orgánica pequeña" es un compuesto orgánico (o compuesto orgánico que forma un complejo con un compuesto inorgánico (por ejemplo, metal)) que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 3 kilodaltons, menos de aproximadamente 1,5 kilodaltons o menos de aproximadamente 1 kDa.

- 40 Como se usan en la presente memoria, los términos "tratamiento", "que trata", "tratar" y similares, se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. Los términos también se usan en el contexto de la administración de una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un agente, por ejemplo, un movilizador de células madre y/o un agente inmunosupresor. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente un resultado, enfermedad o síntoma particular de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se usa en la presente memoria, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un sujeto, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad ocurra en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero que aún no se ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, por ejemplo, provocar la regresión de la enfermedad, por ejemplo, para eliminar completa o parcialmente los síntomas de la enfermedad. En realizaciones particulares, el término se usa en el contexto de promover o mejorar la cicatrización de heridas en pacientes. En otras realizaciones, el término se usa en el contexto de tratar receptores de trasplantes de órganos, heridas, víctimas de quemaduras y enfermedades autoinmunitarias que incluyen EII.

- 55 Como se usa en la presente memoria, el término "lesión tisular" significa heridas agudas o crónicas o úlceras de la piel o tejido blando. Los ejemplos de tales heridas incluyen llagas y úlceras diabéticas, quemaduras, escaldaduras, lesiones por congelación, pinchazos, abrasiones y similares.

Según algunas realizaciones, los compuestos y composiciones farmacéuticas descritos en la presente memoria pueden usarse en la preparación de un medicamento para su uso en la modulación de la respuesta de cicatrización de heridas en la piel de un mamífero, que comprende la aplicación tópica o subcutánea de las composiciones en una

cantidad efectiva durante un periodo de tiempo suficiente. Como se usa en la presente memoria, la expresión "modular la respuesta de cicatrización de heridas" significa la prevención o regulación a la baja de la respuesta patológica a la lesión tisular, que se caracteriza por fibrosis, incluyendo, por ejemplo, producción de queloides y cicatrices hipertróficas en la piel, adherencias de tendones, bloqueo de la transmisión después de lesión nerviosa, esclerodermia, enfermedad de Crohn, estenosis esofágicas, estenosis uretrales, cápsulas alrededor de implantes mamarios, cirrosis hepática, aterosclerosis y no unión fibrótica en el hueso. Las úlceras dérmicas crónicas que no cicatrizan son también ejemplos de la respuesta patológica a la lesión tisular y son aliviadas por los compuestos de fórmula I.

Movilizadores de células madre

Un "movilizador de células madre", "movilizador de células madre o células progenitoras hematopoyéticas" o "movilizar", (usado indistintamente), como se describe en la presente memoria, se refiere a cualquier compuesto, ya sea una molécula orgánica pequeña, sintética o de origen natural, o un polipéptido, tal como un factor de crecimiento o factor estimulante de colonias o un fragmento activo o mimético del mismo, un ácido nucleico, un carbohidrato, un anticuerpo, o cualquier otro agente que actúa para potenciar la migración de células madre desde la medula ósea a la sangre periférica. Un movilizador de células madre puede aumentar el número de células madre hematopoyéticas o células progenitoras/precursoras hematopoyéticas en la sangre periférica, permitiendo de este modo una fuente más accesible de células madre para su uso en el tratamiento de los receptores de trasplante de órganos, víctimas de quemaduras, EII y/o para promover la cicatrización de heridas. En realizaciones particulares, un movilizador de células madre se refiere a cualquier agente que movilice células madre CD34+ y/o CD133+. En otras realizaciones, un movilizador de células madre interrumpe la quimioatracción mediada por CXCL12 (SDF-1) de células que expresan CXCR4.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un movilizador de células madre y al menos un fármaco inmunosupresor. Generalmente, los movilizadores de células madre incluyen, pero no se limitan a, moléculas orgánicas pequeñas, polipéptidos, ácidos nucleicos, e hidratos de carbono.

En el caso de un polipéptido, el movilizador de células madre puede comprender una citocina, un factor estimulante de colonias, una proteasa o una quimiocina. Más específicamente, la citocina puede incluir, pero no se limita a, interleucina-1 (IL-1), interleucina-3 (IL-3), interleucina-6 (IL-6), interleucina-11 (IL-11), interleucina-7 (IL-7) e interleucina-12 (IL12).

En el caso de un factor estimulante de colonias, el movilizador de células madre puede incluir, pero no se limita a, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de células madre, ligando de FLT-3 o una combinación de los mismos.

En otra realización, el movilizador de células madre de proteasa puede incluir, pero no se limita a, metaloproteínasa (como MMP2 o MMP9), una serina proteasa (como cathepsina G o elastasa), una cisteína proteasa (como cathepsina K) y una dipeptidil peptidasa-1 (DDP-1 o CD26).

En otra realización más, el movilizador de células madre de quimiocina puede incluir, pero no se limita a, CXCL12, IL-8, Mip-1 α y GRO β .

En otra realización más, el movilizador de células madre de ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN. En realizaciones más específicas, el ácido nucleico puede ser una molécula de ARN de interferencia pequeño (ARNsi) o una molécula antisentido específica para CXCL12.

En el caso de un carbohidrato, el movilizador de células madre puede ser un carbohidrato sulfatado que puede incluir, pero no se limita a, fucoidan y dextrano sulfatado. El fucoidan es un carbohidrato que consiste en L-fucosa, sulfato y acetato en una proporción molar de 1:1,23:0,36 y se puede aislar del alga marina marrón del Pacífico *Fucus evanescens*. Véase, Bilan et al., 337(8) CARBOHYDRATE RESEARCH 719-30 (2002). Los dextranos sulfatados se refieren a una serie de polisacáridos que tienen patrones sulfatados variables. Véase, por ejemplo, Pomin et al., 15(12) GLYCOBIOLOGY 1376-1385 (2005); Melo et al., 279(2) J. BIOL. CHEM. 20824-20835 (2004); y Farias et al., 275(38) J. BIOL. CHEM. 29299-29307 (2000).

Los movilizadores de células madre pueden incluir además, pero no se limitan a, AMD3100; factor derivado de células estromales (SDF-1); análogos de SDF-1 (por ejemplo, CTCE-0214 (Chemokine Therapeutics Corp.)); anticuerpos anti-SDF-1; ciclofosfamida; factor de células madre (SCF); filgrastim; ancestim; factor inhibidor de progenitores mieloides-1 (MPIF-1) (véase, la Publicación de Patente de EE. UU. No. 20080274109); y antagonistas del antígeno muy tardío (VLA-4) (por ejemplo, un antagonista de integrina alfa-4, tal como un anticuerpo que incluye natalizumab o anti-fosfo-integrina $\alpha 4$ (Ser988), clon 6.33 (Upstate Cell Signaling Solutions), o un péptido (por ejemplo, fenilacetil-leu-asp-phe-D-prolineamida (Cytel Corp., San Diego Calif.)).

En realizaciones particulares, el movilizador de células madre comprende un antagonista de CXCR4. En realizaciones específicas, el antagonista de CXCR4 es TG-0054 (Burixafor; ácido fosfónico, p-(2-(4-(6-amino-2-(((trans-4-(((3-(ciclohexilamino)propil)amino)metil)ciclohexil)metil)amino)-4-pirimidinil)-1-piperazinil)etil)-) (TaiGen Biotechnology Co., Ltd. (Taipei, Taiwán)). En otras realizaciones específicas, el antagonista de CXCR4 es AMD3465 (N-(piridin-2-

ilmetil)-1-[4-(1,4,8,11-tetrazacicotetradec-1-ilmetil)fenil]metanamina). En otras realizaciones más, el antagonista de CXCR4 es AMD3100. AMD3100 (1,1'-[1,4-fenilenbis(metilen)]bis-1,4,8,11-tetraazaciclo-tetradecano) es un biciclam simétrico, antagonista no peptídico prototipo del receptor de quimiocinas CXCR4. Véanse, las Patentes de EE. UU. No. 6.835.731 y No. 6.825.351. El término "AMD" o "AMD3100" se usa indistintamente con Plerixafor, rINN, USAN, JM3100, y su nombre comercial, Mozobil™. Por conveniencia, el término "Plerixafor" se usa en todo el documento para hacer referencia a un antagonista de CXCR4.

La presente invención también contempla el uso de miméticos de AMD3100. Las sustituciones mutacionales en 16 posiciones localizadas en TM-III, -IV, -V, -VI y -VII que recubren el principal bolsillo de unión al ligando del receptor CXCR4 han identificado tres residuos ácidos: Asp¹⁷¹ (AspIV:20), Asp²⁶² (AspVI:23) y Glu²⁸⁸ (GluVII:06) como los principales puntos de interacción para AMD3100. El modelado molecular sugiere que un anillo ciclam de AMD3100 interactúa con Asp¹⁷¹ en TM-IV, mientras que el otro anillo está intercalado entre los grupos ácido carboxílico de Asp²⁶² y Glu²⁸⁸ a partir de TM-VI y -VII, respectivamente. En un estudio, se encontró que la introducción de sólo un Glu en la posición VII:06 y la eliminación de un residuo de Lys neutralizante en la posición VII:02 daba como resultado un aumento de 1.000 veces en la afinidad de AMD3100 a dentro de 10 veces su afinidad en CXCR4. Por tanto, pueden diseñarse miméticos, tales como, por ejemplo, antagonistas peptídicos o no peptídicos con biodisponibilidad oral mejorada para bloquear eficaz y selectivamente el receptor CXCR4.

En otras realizaciones, el movilizador de células madre es BKT140 (Biokin Therapeutics, Ltd. (Rehovot, Israel). BKT140 (4F-benzoil-TN14003) se une e inhibe el receptor de la quimiocina CXCR4 con alta afinidad, mostrando una Cl₅₀ de ~1 nmol/l en comparación con los valores obtenidos con AMD3100. Además, BKT140 dificulta la migración celular estimulada por CXCL12 dentro de valores de Cl₅₀ de 0,5 a 2,5 nmoles/l en comparación con el valor de Cl₅₀ de 51 ± 17 nmoles/l para Plerixafor, sugiriendo una alta capacidad de movilización. Véase, Peled et al., 20 CLIN. CANCER RES. 469-79 (2013).

Ligandos de la proteína de unión de FK

Junto con al menos un movilizador de células madre, las composiciones farmacéuticas comprenden ligando(s) de la proteína de unión de FK no inmunosupresores. Además de los compuestos de fórmula I divulgados en la presente memoria, otros ejemplos de ligandos no inmunosupresores incluyen meridamicina, antascomicinas y ligando sintético de FKBP (SLF).

Una dosis normal de los compuestos de fórmula I es de aproximadamente 0,1 mg/kg/día-0,3 mg/kg/día (oral) y de aproximadamente 0,01 mg/kg/día-0,05 mg/kg/día (IV). En ciertas realizaciones, una dosis baja de Tacrolimus es aproximadamente una décima parte de la dosis normal, por ejemplo, aproximadamente 0,01 mg/kg/día-0,03 mg/kg/día (oral) y aproximadamente 0,001 mg/kg/día-0,005 mg/kg/día (IV).

En ciertas realizaciones, el movilizador de células madre es AMD3100. En tales realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender una dosis típica para AMD3100. Este fármaco se administra típicamente a pacientes humanos a aproximadamente 0,12-0,24 mg/kg. En un paciente que tiene un peso corporal de 60 kg, la dosificación de ADM3100 es de aproximadamente 0,24 mg/kg/día mediante inyección subcutánea.

Las composiciones farmacéuticas pueden describirse en términos de una relación de (a) un compuesto de fórmula I o un ligando de FKBP no inmunosupresor a (b) un movilizador de células madre (por ejemplo, un antagonista de CXCR). En ciertas realizaciones, la relación puede ser 1/1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, 1/7, 1/8, 1/9, 1/10, 1/11, 1/12, 1/13, 1/14, 1/15, 1/16, 1/17, 1/18, 1/19, 1/20, 1/21, 1/22, 1/23, 1/24, 1/25, 1/26, 1/27, 1/28, 1/29, 1/30, 1/31, 1/32, 1/33, 1/34, 1/35, 1/36, 1/37, 1/38, 1/39, 1/40, 1/41, 1/42, 1/43, 1/44, 1/45, 1/46, 1/47, 1/48, 1/49, 1/50, 1/51, 1/52, 1/53, 1/54, 1/55, 1/56, 1/57, 1/58, 1/59, 1/60, 1/61, 1/62, 1/63, 1/64, 1/65, 1/66, 1/67, 1/68, 1/69, 1/70, 1/71, 1/72, 1/73, 1/74, 1/75, 1/76, 1/77, 1/78, 1/79, 1/80, 1/81, 1/82, 1/83, 1/84, 1/85, 1/86, 1/87, 1/88, 1/89, 1/90, 1/91, 1/92, 1/93, 1/94, 1/95, 1/96, 1/97, 1/98, 1/99, 1/100 o más.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender (a) un compuesto de fórmula I o un ligando de FKBP no inmunosupresor y (b) un movilizador de células madre en un intervalo de relación de aproximadamente 1/10-1/100, 1/10-1/99, 1/10-1/98, 1/10-1/97, 1/10-1/96, 1/10-1/95, 1/10-1/94, 1/10-1/93, 1/10-1/92, 1/10-1/91, 1/10-1/90, 1/10-1/89, 1/10-1/88, 1/10-1/87, 1/10-1/86, 1/10-1/85, 1/10-1/84, 1/10-1/83, 1/10-1/82, 1/10-1/81, 1/10-1/80, 1/10-1/79, 1/10-1/78, 1/10-1/77, 1/10-1/76, 1/10-1/75, 1/10-1/74, 1/10-1/73, 1/10-1/72, 1/10-1/71, 1/10-1/70, 1/10-1/69, 1/10-1/68, 1/10-1/67, 1/10-1/66, 1/10-1/65, 1/10-1/64, 1/10-1/63, 1/10-1/62, 1/10-1/61, 1/10-1/60, 1/10-1/59, 1/10-1/58, 1/10-1/57, 1/10-1/56, 1/10-1/55, 1/10-1/54, 1/10-1/53, 1/10-1/52, 1/10-1/51, 1/10-1/50, 1/10-1/49, 1/10-1/48, 1/10-1/47, 1/10-1/46, 1/10-1/45, 1/10-1/44, 1/10-1/43, 1/10-1/42, 1/10-1/41, 1/10-1/40, 1/10-1/39, 1/10-1/38, 1/10-1/37, 1/10-1/36, 1/10-1/35, 1/10-1/34, 1/10-1/33, 1/10-1/32, 1/10-1/31, 1/10-1/30, 1/10-1/29, 1/10-1/28, 1/10-1/27, 1/10-1/26, 1/10-1/25, 1/10-1/24, 1/10-1/23, 1/10-1/22, 1/10-1/21, 1/10-1/20, 1/10-1/19, 1/10-1/18, 1/10-1/17, 1/10-1/16, 1/10-1/15, 1/10-1/14, 1/10-1/13, 1/10-1/12, o 1/10-1/11.

En realizaciones alternativas, las composiciones farmacéuticas pueden comprender (a) un compuesto de fórmula I o un ligando de FKBP no inmunosupresor y (b) un movilizador de células madre en un intervalo de relación de aproximadamente 1/15-1/100, 1/15-1/99, 1/15-1/98, 1/15-1/97, 1/15-1/96, 1/15-1/95, 1/15-1/94, 1/15-1/93, 1/15-1/92, 1/15-1/91, 1/15-1/90, 1/15-1/89, 1/15-1/88, 1/15-1/87, 1/15-1/86, 1/15-1/85, 1/15-1/84, 1/15-1/83, 1/15-1/82, 1/15-1/81,

1/15-1/80, 1/15-1/79, 1/15-1/78, 1/15-1/77, 1/15-1/76, 1/15-1/75, 1/15-1/74, 1/15-1/73, 1/15-1/72, 1/15-1/71, 1/15-1/70, 1/15-1/69, 1/15-1/68, 1/15-1/67, 1/15-1/66, 1/15-1/65, 1/15-1/64, 1/15-1/63, 1/15-1/62, 1/15-1/61, 1/15-1/60, 1/15-1/59, 1/15-1/58, 1/15-1/57, 1/15-1/56, 1/15-1/55, 1/15-1/54, 1/15-1/53, 1/15-1/52, 1/15-1/51, 1/15-1/50, 1/15-1/49, 1/15-1/48, 1/15-1/47, 1/15-1/46, 1/15-1/45, 1/15-1/44, 1/15-1/43, 1/15-1/42, 1/15-1/41, 1/15-1/40, 1/15-1/39, 1/15-1/38, 1/15-1/37, 1/15-1/36, 1/15-1/35, 1/15-1/34, 1/15-1/33, 1/15-1/32, 1/15-1/31, 1/15-1/30, 1/15-1/29, 1/15-1/28, 1/15-1/27, 1/15-1/26, 1/15-1/25, 1/15-1/24, 1/15-1/23, 1/15-1/22, 1/15-1/21, 1/15-1/20, 1/15-1/19, 1/15-1/18, 1/15-1/17 o 1/15-1/16.

El intervalo de relación de (a) un compuesto de fórmula I o un ligando de FKBP no inmunosupresor a (b) un movilizador de células madre dentro de una composición farmacéutica puede comprender aproximadamente 1/20-1/100, 1/20-1/99, 1/20-1/98, 1/20-1/97, 1/20-1/96, 1/20-1/95, 1/20-1/94, 1/20-1/93, 1/20-1/92, 1/20-1/91, 1/20-1/90, 1/20-1/89, 1/20-1/88, 1/20-1/87, 1/20-1/86, 1/20-1/85, 1/20-1/84, 1/20-1/83, 1/20-1/82, 1/20-1/81, 1/20-1/80, 1/20-1/79, 1/20-1/78, 1/20-1/77, 1/20-1/76, 1/20-1/75, 1/20-1/74, 1/20-1/73, 1/20-1/72, 1/20-1/71, 1/20-1/70, 1/20-1/69, 1/20-1/68, 1/20-1/67, 1/20-1/66, 1/20-1/65, 1/20-1/64, 1/20-1/63, 1/20-1/62, 1/20-1/61, 1/20-1/60, 1/20-1/59, 1/20-1/58, 1/20-1/57, 1/20-1/56, 1/20-1/55, 1/20-1/54, 1/20-1/53, 1/20-1/52, 1/20-1/51, 1/20-1/50, 1/20-1/49, 1/20-1/48, 1/20-1/47, 1/20-1/46, 1/20-1/45, 1/20-1/44, 1/20-1/43, 1/20-1/42, 1/20-1/41, 1/20-1/40, 1/20-1/39, 1/20-1/38, 1/20-1/37, 1/20-1/36, 1/20-1/35, 1/20-1/34, 1/20-1/33, 1/20-1/32, 1/20-1/31, 1/20-1/30, 1/20-1/29, 1/20-1/28, 1/20-1/27, 1/20-1/26, 1/20-1/25, 1/20-1/24, 1/20-1/23, 1/20-1/22 o 1/20-1/21.

En otras realizaciones, el intervalo de relación de (a) un compuesto de fórmula I o un ligando de FKBP no inmunosupresor a (b) un movilizador de células madre dentro de una composición farmacéutica puede comprender aproximadamente 1/30-1/100, 1/30-1/99, 1/30-1/98, 1/30-1/97, 1/30-1/96, 1/30-1/95, 1/30-1/94, 1/30-1/93, 1/30-1/92, 1/30-1/91, 1/30-1/90, 1/30-1/89, 1/30-1/88, 1/30-1/87, 1/30-1/86, 1/30-1/85, 1/30-1/84, 1/30-1/83, 1/30-1/82, 1/30-1/81, 1/30-1/80, 1/30-1/79, 1/30-1/78, 1/30-1/77, 1/30-1/76, 1/30-1/75, 1/30-1/74, 1/30-1/73, 1/30-1/72, 1/30-1/71, 1/30-1/70, 1/30-1/69, 1/30-1/68, 1/30-1/67, 1/30-1/66, 1/30-1/65, 1/30-1/64, 1/30-1/63, 1/30-1/62, 1/30-1/61, 1/30-1/60, 1/30-1/59, 1/30-1/58, 1/30-1/57, 1/30-1/56, 1/30-1/55, 1/30-1/54, 1/30-1/53, 1/30-1/52, 1/30-1/51, 1/30-1/50, 1/30-1/49, 1/30-1/48, 1/30-1/47, 1/30-1/46, 1/30-1/45, 1/30-1/44, 1/30-1/43, 1/30-1/42, 1/30-1/41, 1/30-1/40, 1/30-1/39, 1/30-1/38, 1/30-1/37, 1/30-1/36, 1/30-1/35, 1/30-1/34, 1/30-1/33, 1/30-1/32 o 1/30-1/31.

En realizaciones adicionales, las composiciones farmacéuticas pueden comprender (a) un compuesto de fórmula I o un ligando de FKBP no inmunosupresor y (b) un movilizador de células madre en un intervalo de relación de aproximadamente 1/40-1/100, 1/40-1/99, 1/40-1/98, 1/40-1/97, 1/40-1/96, 1/40-1/95, 1/40-1/94, 1/40-1/93, 1/40-1/92, 1/40-1/91, 1/40-1/90, 1/40-1/89, 1/40-1/88, 1/40-1/87, 1/40-1/86, 1/40-1/85, 1/40-1/84, 1/40-1/83, 1/40-1/82, 1/40-1/81, 1/40-1/80, 1/40-1/79, 1/40-1/78, 1/40-1/77, 1/40-1/76, 1/40-1/75, 1/40-1/74, 1/40-1/73, 1/40-1/72, 1/40-1/71, 1/40-1/70, 1/40-1/69, 1/40-1/68, 1/40-1/67, 1/40-1/66, 1/40-1/65, 1/40-1/64, 1/40-1/63, 1/40-1/62, 1/40-1/61, 1/40-1/60, 1/40-1/59, 1/40-1/58, 1/40-1/57, 1/40-1/56, 1/40-1/55, 1/40-1/54, 1/40-1/53, 1/40-1/52, 1/40-1/51, 1/40-1/50, 1/40-1/49, 1/40-1/48, 1/40-1/47, 1/40-1/46, 1/40-1/45, 1/40-1/44, 1/40-1/43, 1/40-1/42 o 1/40-1/41.

En realizaciones alternativas, las composiciones farmacéuticas pueden comprender (a) un compuesto de fórmula I o un ligando de FKBP no inmunosupresor y un movilizador de células madre en un intervalo de relación de aproximadamente 1/50-1/100, 1/50-1/99, 1/50-1/98, 1/50-1/97, 1/50-1/96, 1/50-1/95, 1/50-1/94, 1/50-1/93, 1/50-1/92, 1/50-1/91, 1/50-1/90, 1/50-1/89, 1/50-1/88, 1/50-1/87, 1/50-1/86, 1/50-1/85, 1/50-1/84, 1/50-1/83, 1/50-1/82, 1/50-1/81, 1/50-1/80, 1/50-1/79, 1/50-1/78, 1/50-1/77, 1/50-1/76, 1/50-1/75, 1/50-1/74, 1/50-1/73, 1/50-1/72, 1/50-1/71, 1/50-1/70, 1/50-1/69, 1/50-1/68, 1/50-1/67, 1/50-1/66, 1/50-1/65, 1/50-1/64, 1/50-1/63, 1/50-1/62, 1/50-1/61, 1/50-1/60, 1/50-1/59, 1/50-1/58, 1/50-1/57, 1/50-1/56, 1/50-1/55, 1/50-1/54, 1/50-1/53, 1/50-1/52, 1/50-1/51, 1/60-1/100, 1/60-1/99, 1/60-1/98, 1/60-1/97, 1/60-1/96, 1/60-1/95, 1/60-1/94, 1/60-1/93, 1/60-1/92, 1/60-1/91, 1/60-1/90, 1/60-1/89, 1/60-1/88, 1/60-1/87, 1/60-1/86, 1/60-1/85, 1/60-1/84, 1/60-1/83, 1/60-1/82, 1/60-1/81, 1/60-1/80, 1/60-1/79, 1/60-1/78, 1/60-1/77, 1/60-1/76, 1/60-1/75, 1/60-1/74, 1/60-1/73, 1/60-1/72, 1/60-1/71, 1/60-1/70, 1/60-1/69, 1/60-1/68, 1/60-1/67, 1/60-1/66, 1/60-1/65, 1/60-1/64, 1/60-1/63, 1/60-1/62, 1/60-1/61.

En otras realizaciones, el intervalo de relación de (a) un compuesto de fórmula I o un ligando de FKBP no inmunosupresor a (b) un movilizador de células madre dentro de una composición farmacéutica puede comprender aproximadamente 1/70-1/100, 1/70-1/99, 1/70-1/98, 1/70-1/97, 1/70-1/96, 1/70-1/95, 1/70-1/94, 1/70-1/93, 1/70-1/92, 1/70-1/91, 1/70-1/90, 1/70-1/89, 1/70-1/88, 1/70-1/87, 1/70-1/86, 1/70-1/85, 1/70-1/84, 1/70-1/83, 1/70-1/82, 1/70-1/81, 1/70-1/80, 1/70-1/79, 1/70-1/78, 1/70-1/77, 1/70-1/76, 1/70-1/75, 1/70-1/74, 1/70-1/73, 1/70-1/72, 1/70-1/71, 1/80-1/100, 1/80-1/99, 1/80-1/98, 1/80-1/97, 1/80-1/96, 1/80-1/95, 1/80-1/94, 1/80-1/93, 1/80-1/92, 1/80-1/91, 1/80-1/90, 1/80-1/89, 1/80-1/88, 1/80-1/87, 1/80-1/86, 1/80-1/85, 1/80-1/84, 1/80-1/83, 1/80-1/82, 1/80-1/81, 1/90-1/100, 1/90-1/99, 1/90-1/98, 1/90-1/97, 1/90-1/96, 1/90-1/95, 1/90-1/94, 1/90-1/93, 1/90-1/92, o 1/90-1/91.

En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse al menos una vez a la semana en el transcurso de varias semanas. En una realización, las composiciones farmacéuticas se administran al menos una vez a la semana durante varias semanas a varios meses. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran una vez a la semana durante de cuatro a ocho semanas. En otra realización más, las composiciones farmacéuticas se administran una vez a la semana durante cuatro semanas.

Más específicamente, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse al menos una vez al día durante aproximadamente 2 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 3 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 4 días, al menos una vez al día durante aproximadamente 5 días, al menos una vez al día durante

durante aproximadamente 12 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 13 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 14 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 15 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 16 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 17 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 18 semanas, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 19 semanas, o al menos una vez a la semana durante aproximadamente 20 semanas.

Alternativamente, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse al menos una vez a la semana durante aproximadamente 1 mes, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 2 meses, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 3 meses, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 4 meses, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 5 meses, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 6 meses, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 7 meses, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 8 meses, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 9 meses, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 10 meses, al menos una vez a la semana durante aproximadamente 11 meses, o al menos una vez a la semana durante aproximadamente 12 meses.

En realizaciones particulares, la presente invención se refiere al uso de fármacos aprobados por la FDA - tales como el agente movilizador de células madre AMD3100 y los compuestos de fórmula I, ya sea secuencialmente, o en forma de combinación para el tratamiento de una variedad de lesiones tisulares (heridas), trasplante de órganos y trastornos inflamatorios o autoinmunes tales como enfermedades inflamatorias del intestino (EII). Por tanto, las composiciones farmacéuticas que comprenden una combinación de un agente movilizador de células madre AMD3100 con un inmunosupresor FK506 son útiles para el tratamiento de una variedad de trastornos.

AMD3100. AMD3100 (Plerixafor o Mozobil) es un antagonista de CXCR4, desarrollado originalmente como una medicina anti-VIH, pero se ha encontrado que moviliza potentemente células madre CD34 y otras de su nicho de la médula ósea. AMD3100 fue aprobado por primera vez por la FDA en 2008 para su uso en pacientes con cáncer de mieloma múltiple para el almacenamiento de células madre antes de la quimioterapia mieloablativa. Hoy en día, el Plerixafor se usa, a menudo con neupogen (G-CSF), para movilizar células madre hematopoyéticas en pacientes con cáncer de mieloma múltiple para su almacenamiento antes de la quimioterapia mieloablativa. Las células madre movilizadas se trasplantan posteriormente de nuevo al paciente después del tratamiento del cáncer. Por lo tanto, está bien establecido que el fármaco es seguro y efectivo.

FK506. FK506 (Tacrolimus o Prograph) se descubrió en 1987 a partir de un tipo de bacteria del suelo, *Streptomyces tsukubaensis*. FK506 reduce la actividad peptidil-prolil isomerasa uniéndose a la inmunofilina FKBP12 (proteína de unión a FK506) creando un nuevo complejo. FK506 fue aprobado por primera vez por la FDA en 1994 para su uso en trasplantes de hígado; esto se ha extendido para incluir trasplantes de riñón, corazón, intestino delgado, páncreas, pulmón, tráquea, piel y córnea, médula ósea y extremidades. Los compuestos de fórmula I reducen la actividad peptidil-prolil isomerasa uniéndose también a la inmunofilina FKBP12, pero no tienen la acción inmunosupresora de FK506.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria proporcionan una actividad potente y sinérgica de AMD3100 y los compuestos de fórmula I en la movilización, reclutamiento y retención de células madre en los sitios lesionados. El tratamiento de combinación induce la aceptación del trasplante de órganos, acelera la cicatrización de heridas y promueve la regeneración de la mucosa intestinal en enfermedades inflamatorias del intestino. En ciertas realizaciones, la relación de los compuestos de fórmula I a AMD3100 es de aproximadamente 1/10 a 1/100 en la composición. En realizaciones particulares, una composición farmacéutica comprende solo dos ingredientes activos en donde el primer ingrediente activo es AMD3100 y el segundo ingrediente activo es un compuesto de fórmula I, en donde la composición comprende 10-40 mg de AMD3100 y 0,1 a 4 mg del compuesto de fórmula I, en donde dicho compuesto aumenta la potencia de dicho AMD3100 y en donde la composición farmacéutica comprende además un excipiente. La composición se formula para inyección subcutánea o intravenosa, o quizás se formula para administración oral o administración tópica.

Las dosificaciones del AMD3100 y los compuestos de fórmula I pueden determinarse individualmente. En los regímenes terapéuticos de la técnica anterior, el AMD3100 se administra típicamente a pacientes humanos a aproximadamente 0,12-0,24 mg/kg/día. Los compuestos de fórmula I se administran típicamente por vía intravenosa a aproximadamente 0,01-0,05 mg/kg/día o por vía oral a 0,1-0,2 mg/kg/día para prevenir el rechazo mediado por el sistema inmunitario después del trasplante de órganos. La dosificación de los compuestos de fórmula I se ajusta según la respuesta clínica y las concentraciones mínimas en sangre completa de FK506 observadas (6-20 ng/ml). En animales (roedores), AMD3100 se administra típicamente a aproximadamente 1 mg/kg/día para movilizar eficazmente las células madre de la médula ósea. Los compuestos de fórmula I se administran típicamente a roedores a aproximadamente 0,5-3 mg/kg/día para prevenir el rechazo mediado por el sistema inmunitario después del trasplante de órganos. En los métodos y composiciones de la presente invención, los compuestos de fórmula I se usarán típicamente en dosificaciones más bajas (por ejemplo, concentración mínima en sangre de aproximadamente 0,5-4 ng/ml) que las dadas anteriormente. Por tanto, el AMD3100 puede usarse a una dosificación de 0,12 a 0,24 mg/kg/día en seres humanos (1 mg/kg/día en animales), y los compuestos de fórmula I pueden usarse a una dosificación de 0,001-0,005 mg/kg (por vía subcutánea).

En una realización, las composiciones de la presente invención proporcionadas en la presente memoria pueden ser composiciones de liberación controlada, es decir, composiciones en donde el uno o más compuestos se liberan durante un período de tiempo después de la administración. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen la formulación en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). En otra realización, la composición es una composición de liberación inmediata, es decir, una composición en la que todo o sustancialmente todo el compuesto se libera inmediatamente después de la administración.

En otra realización más, los compuestos de la presente invención pueden administrarse en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el agente puede administrarse usando infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico u otros modos de administración. En una realización, se puede usar una bomba. En una realización, se pueden usar materiales poliméricos.

Sin más elaboración, se cree que un experto en la técnica, usando la descripción anterior, puede utilizar la presente invención en toda su extensión.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo se preparan y evalúan los compuestos, composiciones, artículos, dispositivos y/o métodos descritos y reivindicados en la presente memoria, y se pretende que sean puramente ilustrativos. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero en la presente memoria deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, la temperatura está en grados Celsius o está a temperatura ambiente, y la presión es atmosférica o cercana a ella. Hay numerosas variaciones y combinaciones de condiciones de reacción, por ejemplo, concentraciones de componentes, disolventes deseados, mezclas de disolventes, temperaturas, presiones y otros intervalos y condiciones de reacción que se pueden usar para optimizar la pureza y el rendimiento del producto obtenido a partir del proceso descrito. Sólo se requerirá experimentación razonable y rutinaria para optimizar tales condiciones del proceso.

Síntesis química de los compuestos de fórmula I.

Los inventores sintetizaron un primer análogo de FK506 no inmunosupresor novedoso, denominado FKVP que retenía la unión a FKBP y carecía de actividad de inhibición de calcineurina (Fig. 1). Se encontró que FKVP activa la señalización de la proteína morfogénica ósea (BMP) en linfocitos y células endoteliales a través de la alteración de la interacción FKBP12-BMPRI. Además, se encontró que la combinación de FKVP y AMD3100 aceleraba la cicatrización de heridas en ratas diabéticas de una manera dependiente del receptor de BMP.

Síntesis y formulación de FKVP para estudios en animales

A una solución de FK506 (100 mg, 0,120 mmoles) y catalizador Zhan1b al 40 % en moles $\text{RuCl}_2[\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2][\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{S}]$, en 3 ml de DCE anhidro, se añadió 4-vinilpiridina (14,2 μl , 0,132 mmoles). La mezcla se agitó durante 30 seg antes de la irradiación con microondas a 120 °C durante 20 min. La mezcla se purificó después usando cromatografía ultrarrápida (MeOH al 0-25 % en DCM), TLC preparativa (9:1 de DCM:MeOH) y HPLC de fase inversa (ACN al 45-85 % en H_2O). Conversión = 25 %, Rendimiento purificado = 8 %. Se usaron experimentos de LC-MS y ^1H -RMN para confirmar que el nuevo compuesto estaba >99 % libre del compuesto parental (FK506). El producto se caracterizó usando MS de Alta Resolución (Fig. 20) y ^1H -RMN (Fig. 21A-B), después se disolvió en DMSO o se usó en formulación para experimentos en animales.

Para experimentos en animales, se disolvió polvo de FKVP en una solución de EtOH al 80 %/Cremophor RH60 al 20 % a 5 mg/ml. Esta solución madre se diluyó 1:50 en solución salina antes de la inyección subcutánea.

Tabla 2: Información de los anticuerpos

Diana	Conjugación	Concentración Recomendada	Fabricante	No. de Catálogo	Uso del Anticuerpo
p-SMAD1/5	Ninguna	1:750	Cell Signaling	41D10	WB Primario
SMAD1	Ninguna	1:500	Cell Signaling	9473S	WB Primario
p-SMAD2/3	Ninguna	1:400	Cell Signaling	8828S	WB Primario
NFATc2	Ninguna	1:100	Santa Cruz	SC-7296	WB Primario
p-S6	Ninguna	1:1.000	Santa Cruz	SC-293144	WB Primario
S6	Ninguna	1:1.000	Cell Signaling	2217	WB Primario

ID1	HRP	1:100 o 1:500 con secundario	Santa Cruz	SC-133104- HRP	WB Primario
FKBP12	Ninguna	1:750	Abcam	92459	WB Primario
FKBP51	Ninguna	1:750	Abcam	Ab126715	WB Primario
FKBP52	Ninguna	1:750	Santa Cruz	SC-1803	WB Primario
mTOR	Ninguna	1: 1.000	Cell Signaling	2983S	WB Primario
Calcineurina General	Ninguna	1: 1.000	Cell Signaling	2614S	WB Primario
Etiqueta HA	Ninguna	1: 1.000	Cell Signaling	3724S	WB Primario
Etiqueta V5	Ninguna	1: 1.000	Thermo	46-0705	WB Primario
HSP90 α/β	Ninguna	1: 1.000	Santa Cruz	SC-13119	Control de Carga (WB Primario)
GAPDH	Ninguna	1:2.000	Santa Cruz	SC-20357	Control de Carga (WB Primario)
HSP90 α/β	Ninguna	1: 1.000	Santa Cruz	SC-7947	Control de Carga (WB Primario)
2º Ab Conejo	HRP	1: 10.000	Cell Signaling	7074S	WB Secundario
2º Ab Conejo	Alexa 647	1: 1.000	Thermo	A-31573	WB Secundario
2º Ab Ratón	HRP	1: 8.000	GE Healthcare	NA931V	WB Secundario
2º Ab Cabra	HRP	1: 10.000	Santa Cruz	SC-2354	WB Secundario
CD133	Ninguna	1:300	Abcam	ab19898	IHC Primario
2º Ab Conejo	Biotina	1:200	Cell Signaling	14708S	IHC Secundario

Productos químicos: se adquirió FK506 de grado de investigación (>98 %) de APEXBio. El hidrocloreto de LDN-193189, la 4-vinilpiridina y los disolventes se adquirieron de MilliporeSigma. El catalizador de rutenio Zhan-1b (CAS: 918870-76-5) se adquirió de STREM Chemicals.

Cultivo celular y transfecciones

- 5 Se cultivaron células Jurkat (E6.1, ATCC) en RPMI con FBS al 10% y PenEstrep al 1,5 %. Se transfectaron células Jurkat (1×10^6) con 10 μ g de BRE-Luciferasa (amablemente proporcionada por Martine Roussel y Peter ten Dijke) o ADNc de NFAT-Luciferasa (Promega) por electroporación (BioRad, onda cuadrada, 250V, 950 μ F) en 400 μ l de RPMI sin suero/antibiótico con DMSO al 0,5 %. Treinta minutos después de la transfección, las células se transfirieron a RPMI completo y se dejaron reposar durante una noche. Antes de sembrar en placa, las células se resuspendieron en medio fresco y se diluyeron a $0,5 \times 10^6$ células/ml. Se cultivaron células HEK293T en DMEM con FBS al 10 %, PenEstrep al 1 % y 500 μ g/ml de G418 (Corning). Las células se transfectaron usando reactivo SuperFect y los protocolos de transfección suministrados. Se cultivaron células HUVEC en medio de crecimiento de células endoteliales Lonza (EGM-2) y se usaron entre los subcultivos 3 y 7. Todas las células se cultivaron a 37 °C con CO₂ al 5 %.
- 10
- 15 Ensayos de viabilidad celular

- Se sembraron en placas células Jurkat o HUVEC a 1.000 células/pocillo en 180 μ l de medio de crecimiento antes de la adición de 20 μ l de solución madre de fármaco/proteína 10X. Después de la incubación durante 72 h, se añadieron 22 μ l de una solución de sal sódica de resazurina (solución madre de 0,1 mg/ml en agua) a cada pocillo y se dejó incubar a 37 °C. La conversión metabólica del colorante resazurina se monitorizó por absorbancia a 570 nm después de 6 h. Después de la sustracción del fondo (medio solo + colorante), los valores de absorbancia se dejaron como unidades de absorbancia arbitrarias o se normalizaron a los obtenidos de las células tratadas con DMSO.
- 20

Transferencia Western

Se recogieron células Jurkat T por centrifugación (300 g, 5 min), se lavaron con PBS y se lisaron en tampón RIPA que contenía inhibidores de proteasa y fosfatasa (Cell Signaling) con sonicación. Los lisados se normalizaron usando el ensayo de DC (BioRad) y se corrieron en geles de SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante la noche a 100 mA. Después de bloquear con leche al 5 % en TBS-T durante 20 min, las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios (Tabla 2). Después de lavar tres veces con TBS-T, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario (Tabla 2) durante 1 hora. Después de 3 lavados adicionales, las transferencias se visualizaron usando SynGene, usando sustrato ECL (Thermo) o excitación y filtro láser (647 nm).

10 Sedimentaciones de FKBP12-SNAP

Se clonó FKBP12-SNAP usando el vector pSNAPf (New England Bio) y FKBP12 amplificado por PCR (un obsequio de Tobias Meyer, plásmido Addgene no. 20175) con sitios de restricción EcoRI y BsrGI añadidos. Los plásmidos purificados en gel se ligaron usando ADN ligasa T4 (Thermo), se transformaron en DH5 α , y se sembraron en agar LB más ampicilina para la selección de colonias individuales, secuenciación, y purificación de plásmidos.

15 El plásmido Alk1-V5 se generó mediante clonación Gateway de los vectores pDONR223-ACVRL1 (Alk1) (un obsequio de William Hahn y David Root, plásmido Addgene no. 23873) y pEF-DEST51 (Thermo) usando mezcla de enzimas clonasa LR (Thermo). El plásmido se transformó en DH5 α y se sembró en placas de agar LB más ampicilina para la selección de colonias individuales, secuenciación y purificación del plásmido. Los plásmidos Alk2, Alk3 y Alk6 etiquetados con HA fueron un obsequio de Aristidis Moustakas (plásmido Addgene no. 80870, 80873, 80882).

20 Se cotransfectaron FKBP12-SNAP (5 μ g) y plásmidos de receptores ALK etiquetados (5 μ g) en células Hek293T usando SuperFect y el protocolo suministrado. Después de 48 horas, las células se trataron con DMSO (0,1 %) o FKVP 1 μ M durante 30 min. Después de 1 hora, las células se lisaron en un recipiente con 1 ml de tampón de lisis (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, Triton-100 al 0,1 %, glicerol al 5 %, inhibidores de proteasa y fosfatasa) y raspador de placas. El lisado se transfirió a un eppendorf de 2 ml y se hizo rotar a 4 °C durante 20 min. Los lisados se centrifugaron a 14.000 g durante 10 min, y se transfirió ~1 ml de sobrenadante a un nuevo tubo con fármaco 200 nM o DMSO al 0,2 %. Se tomaron 20 μ l de entrada y se mezclaron con 20 μ l de tampón de carga 2x antes de hervir. Cada muestra de lisado se mezcló después con 250 μ l de tampón SNAP (tampón de lisis + DTT 5 mM) que contenía 40 μ l de perlas magnéticas de captura SNAP (New England Bio) y se hizo rotar a 4 °C durante 1 hora. Las perlas se lavaron 3 veces con 1 ml de tampón de lisis antes de hervir en 100 μ l de tampón de carga 2X. Los lisados hervidos se agitaron con vórtex y se centrifugaron, el lisado (~90 μ l) se retiró cuidadosamente de las perlas y se usó para transferencia Western.

Se usó el mismo método para las sedimentaciones de calcineurina-FK506 y mTOR-rapamicina después de la transfección de 10 μ g de ADNc de FKBP12-SNAP solamente.

Líneas con inactivación de FKBP

35 Las células T Jurkat y Hek293T se transfectaron como se ha descrito previamente con plásmidos CRISPR/Cas9 (marcados con mCherry) todos en uno (Genecopeia) que contenían ARN guía para FKBP12 (HCP267023-CG01-3-B), FKBP51 (HCP257374-CG01-3-B) o FKBP52 (HCP205551-CG01-3-B). Después de 48 horas, las células se clasificaron para fluorescencia de mCherry (láser de 650 nm) en placas de 96 pocillos (1 célula/pocillo). Después de 2 semanas de cultivo, se validaron clones individuales mediante transferencia Western.

40 Indicadores de la ruta de BMP y NFAT

Las células T Jurkat transfectadas con BRE-Luc se dividieron en una placa de 96 pocillos (80 μ l/pocillo de 0,5x10⁶ células/ml) y se trataron con los compuestos/proteínas, establecidos previamente (20 μ l de solución madre 5X en RPMI, DMSO al 0,5 %) durante 18 h. Se usaron rBMP-4 y rTGF- β 1 (R&D) como controles positivos y negativos, respectivamente. Las placas se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 min, después se aspiraron cuidadosamente. Las células se resuspendieron en 100 μ l de tampón de lisis (por pocillo) y se colocaron en un agitador de placas durante 30 min. Se transfirió una alícuota de 80 μ l de lisado a una placa de 96 pocillos de pared blanca, y se registró la luminiscencia 2 segundos después de la inyección automatizada de sustrato de luciferasa. Los valores de luminiscencia se restaron del fondo (tampón de lisis + sustrato) y se normalizaron a los valores de control de DMSO.

50 Las células T Jurkat FKBP12KO transfectadas con el plásmido FKBP12-SNAP se seleccionaron con 1.200 μ g/ml de G418 durante siete días antes de su uso en los ensayos BRE-Luc.

Las células T Jurkat transfectadas con NFAT-Luc se dividieron en una placa de 96 pocillos (80 μ l/pocillo de 0,5x10⁶ células/ml) y se trataron con los compuestos indicados (20 μ l de solución madre 5X en RPMI, DMSO al 0,5 %) 30 min antes de la activación con PMA/ionomicina (40 nM/1 μ M). Después de 6 h, los pocillos se aspiraron, se lisaron y se midió la luminiscencia como se ha descrito anteriormente. FK506 y CsA sirvieron como control positivo, mientras que DMSO y los pocillos no activados dieron valores de control negativo. Con la excepción de los experimentos con células con inactivación, las células Jurkat usadas para cada experimento se transfectaron al mismo tiempo y se cultivaron

juntas durante la noche hasta la siembra en placas y el tratamiento al día siguiente.

Declaración de cuidado y uso ético de animales

- 5 Se alojaron ratas con diabetes de tipo 2 Goto-Kakizaki (GK) obtenidas de Charles River (Boston, MA) en una instalación libre de patógenos y se cuidaron según las directrices del NIH y un protocolo aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales (ACUC) de la Universidad Johns Hopkins. En este estudio, se usaron ratas GK tanto macho como hembra de 4-5 meses de edad.

Modelo de herida escisional in vivo

- 10 Se crearon heridas de espesor completo en la piel dorsal de ratas con un punzón de biopsia desechable estéril (8 mm de diámetro). A los animales se les inyectó subcutáneamente solución salina, AMD3100 (1 mg/kg) más FK506 (0,1 mg/kg) o AMD3100 (1 mg/kg) más FKVP (0,1 mg/kg) inmediatamente después de causar la herida y en días alternos hasta la cicatrización completa, definida como reepitelización completa del área de la herida. Para evaluar el papel de la señalización de BMP, se inyectó a los animales intraperitonealmente (i.p.) LDN-193189 (2 mg/kg/día) además del tratamiento con solución salina o AF convencional. Las heridas se evaluaron diariamente según el método descrito anteriormente (Lin et al., 2014).

15 Inmunohistoquímica

- 20 Se prepararon secciones de corte de 5 μ m a partir de tejido congelado para tinción inmunohistoquímica. Las secciones congeladas se fijaron con acetona a -20 °C durante 10 min y se secaron durante 1 h a temperatura ambiente. Después de la inactivación de la peroxidasa endógena y el bloqueo de la unión no específica de anticuerpos, los especímenes se incubaron con anti-CD133 (1:300, ab19898; Abcam) a 4 °C durante la noche. Las secciones de tejido se incubaron posteriormente con IgG anti-conejo de cabra conjugada con biotina (1:200, Cell Signaling no. 14708S, Danvers, MA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se usó el kit VectaStain Elite ABC (HRP) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para aumentar la sensibilidad de la tinción. Se usó tetrahidrocloreuro de diaminobencidina (5 min, D4293, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como cromógeno, y se usó hematoxilina de Mayer (30 s, Dako, S3309) para contratinción.

25 Estadísticas

Se usó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar la diferencia estadística en la cicatrización de heridas entre los grupos AF, AF+LDN, solución salina y S+LDN o entre los grupos AF, AV y solución salina cuando se comparan los días de cicatrización de las heridas. Se usó el procedimiento post-hoc de Bonferroni-Holm para el ajuste del valor p. $p < 0,05$ se considera significativamente diferente.

30 Ejemplo 1

- 35 Para realizar un estudio de relación estructura-actividad, los inventores sintetizaron nuevos análogos de FKVP que contenían la estructura central de piridina. En el pasado, los inventores y otros se han basado en la reacción de metátesis cruzada (CM) catalizada por rutenio para modificar el alqueno terminal de FK506 (C40) para generar análogos de FK506 no inmunosupresores. Desafortunadamente, FKVP y otros análogos que contienen nitrógeno sólo se pudieron obtener con rendimientos muy bajos. Esto se debe, muy probablemente, al par de electrones solitario del nitrógeno que se coordina competitivamente con el centro metálico del rutenio. El uso de sales tosilladas solubles de aminas podría mejorar los rendimientos, pero no ayudó en el caso de FKBP.

- 40 Para abordar el problema asociado con sustratos que contienen bases nitrogenadas en la reacción de CM, se volvió a la reacción de Heck como alternativa, ya que los catalizadores de paladio usados en la reacción de Heck son compatibles con heterociclos que contienen nitrógeno tales como piridina. Después de optimizar las condiciones de la reacción, encontramos que haciendo reaccionar FK506 con 4-yodopiridina (2,0 equiv.) en presencia de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (10 % en moles) y $\text{P}(\text{o-tol})_3$ (20 % en moles) en DMF a 100 °C se obtuvo el mejor rendimiento (66 %).

- 45 Como ejemplo, a una mezcla de FK-506 (0,0500 mmoles, 40 mg, 1,0 equiv.), haluros de arilo (2,0 equiv.) y $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,00500 mmoles, 1,1 mg, 0,10 equiv.) y $\text{P}(\text{o-tol})_3$ (0,0100 mmoles, 3,0 mg, 0,20 equiv.) en un tubo Schlenk de 10 ml secado a la llama, se añadió DMF seca (1,0 ml) y Et_3N (0,10 ml) secado sobre K_2CO_3 bajo protección con globo de argón, y la mezcla se agitó a 100°C. Las reacciones se monitorizaron mediante espectrometría de masas. Cuando la reacción terminó, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, y se purificó por columna ultrarrápida con disolvente en gradiente (diclorometano y metanol) para dar el producto correspondiente. Si era necesario, se usó PLC como purificación adicional para separar epímeros.

- 50 Con FKVP como líder, se seleccionaron 7 haluros heterocíclicos que contenían nitrógeno con un núcleo de piridina y 4 haluros con anilinas sustituidas como sustratos para la reacción de Heck. Para nuestro deleite, todos los sustratos de haluro se acoplaron con éxito a FK506 con rendimientos de moderados a buenos (véase la Tabla 1).

Los sustratos de haluro presentaron una reactividad distinta en la reacción de Heck. En primer lugar, los bromuros y yoduros proporcionaron rendimientos similares. En segundo lugar, los grupos aceptores de electrones en las piridinas y quinolinas parecían aumentar los rendimientos (Tabla 1, entrada 4, 6, 7). En tercer lugar, las anilinas no protegidas dieron los rendimientos más bajos (Tabla 1, entrada 9-11). Es importante destacar que el material de partida FK506 sin reaccionar en la mezcla de reacción se separó fácilmente de los productos que contenían nitrógeno, más polares, con cromatografía ultrarrápida.

Ejemplo 2

Con análogos de FK506 disponibles, se evaluaron sus efectos sobre la viabilidad celular, la activación de BMP y la activación de NFAT a dos concentraciones (Fig. 2). En el ensayo de viabilidad de células HUVEC, encontramos que los análogos de quinolina (5b-7b) inhibían la proliferación celular a 10 μ M (Fig. 2a), mientras que otros compuestos eran comparables a FK506 en su citotoxicidad.

Usamos un indicador de la ruta del elemento de respuesta a BMP (BRE) (luciferasa bajo el control del promotor del gen ID1) en células T Jurkat para determinar si los nuevos análogos eran capaces de activar la ruta de señalización de BMP. El cribado inicial de los compuestos mostró que la mayoría de los análogos tenían una actividad similar a FK506 o FKVP. Esto se espera en cierto modo, ya que hemos mostrado previamente que la unión de FKBP12 es necesaria y suficiente para la activación de la señalización de BMP (Fig. 2b).

Para determinar el efecto de los análogos sobre la calcineurina, empleamos un indicador de factor nuclear activado por PMA/ionomicina de células T activadas (NFAT) en células T Jurkat^{8d} (luciferasa bajo el control del promotor de IL-2) (Fig. 2c). Dos análogos (2b, 3b) no causaron inhibición significativa del indicador NFAT-Luciferasa a concentraciones de hasta 10 μ M, de manera similar a FKVP (1b). Sorprendentemente, la mayoría de los otros análogos mostraron inhibición parcial o casi completa del indicador NFAT a 1 μ M (Fig. 2c). Es digno de mención que, algunos de los análogos inmunosupresores, incluyendo 5b, 6b y 7b, tienen sustituyentes más voluminosos que 2b y 3b debido a la presencia de un anillo aromático condensado. Queda por determinar cómo se acomodan esos grupos más voluminosos en el sitio de unión de la calcineurina.

Ejemplo 3

Determinamos los valores de CE₅₀ de tres análogos no inmunosupresores (1b-3b) en el ensayo de luciferasa de BMP. Se encontró que los 3 análogos eran ligeramente más potentes que FK506 (Fig. 3), lo que probablemente se puede atribuir a una solubilidad aumentada debido a los sustituyentes más polares de la piridina. Entre los tres análogos, FKVP permaneció como el más activo con una CI₅₀ de 12,4 nM.

Ejemplo 4

La estructura del complejo de FKBP12-FK506-calcineurina se ha determinado previamente mediante cristalografía de rayos X. En este complejo, el alqueno terminal de FK-506 encaja en un bolsillo de unión en la calcineurina formado por aminoácidos hidrófobos (Fig. 4a). Cuando se modela en lugar de FK506, el resto de piridina en FKVP (1b) tiene un choque estérico con el residuo M118 de la calcineurina (Fig. 4b), lo que explica la eliminación de la unión de calcineurina por los análogos 1b-3b. Sin embargo, la forma en que otros análogos, algunos de los cuales contienen sustituyentes más voluminosos que FKVP en la misma posición, siguen siendo inmunosupresores, no puede explicarse por la estructura.

Después de estudiar los valores de pKa de todos los análogos que contienen nitrógeno, observamos que los compuestos con valores de pKa más altos (1b,2b,3b,5b) mostraban menos inhibición de calcineurina. Por el contrario, aquellos con un pKa más bajo causado por grupos aceptores de electrones fueron todos inmunosupresores a 1 μ M (4b,6b,7b). El valor de pKa de la anilina (9b-11b) es menor que la piridina (1b), lo que también puede explicar su retención de la actividad inhibidora de la calcineurina. Estas observaciones sugieren que la formación de apéndice de piridinio cargado positivamente en el alqueno terminal de FK506 desempeña un papel más importante en la alteración de la interacción entre el alqueno terminal de FK506 y el bolsillo hidrófobo en la calcineurina. Estas observaciones presentan un mecanismo alternativo y complementario para la pérdida de la inhibición de la calcineurina en análogos de FK506 no inmunosupresores, que, en el pasado, se ha racionalizado por una gran "protuberancia" molecular para impedir estéricamente la unión de la calcineurina. Es probable que el mismo bolsillo de unión en la calcineurina tenga una flexibilidad conformacional significativa para acomodar anillos aromáticos voluminosos no cargados tales como los presentes en 4b, 6b y 7b.

En resumen, los inventores han desarrollado un método inventivo que comprende una síntesis en una etapa de análogos de FK506 que contienen bases de nitrógeno usando la reacción de Heck. Se identificaron tres análogos no inmunosupresores con una mayor potencia en la activación de la ruta de señalización de BMP. Se encontró que un elemento clave en la alteración de la interacción FK506-calcineurina es a través de interacciones electrostáticas en lugar de estéricas. Dado el papel de la señalización de BMP en la cicatrización de heridas y la regeneración de tejidos, la ruta sintética recién desarrollada para FKVP y análogos facilitará el desarrollo de análogos de FK506 no inmunosupresores para medicina regenerativa.

Ejemplo 5

La modificación de FK506 en C40 condujo a un análogo no inmunosupresor - FKVP

Se ha establecido que la actividad inmunosupresora *in vivo* de FK506 está mediada a través de la inhibición de calcineurina (Buno et al., 2002). Estudios previos han mostrado que la modificación en el alqueno terminal de FK506 podría bloquear la inhibición de calcineurina mientras se retiene la unión de FKBP (Clemons et al., 2002). Para determinar si la inhibición de calcineurina era necesaria para la cicatrización aumentada por la combinación de AF, diseñamos y sintetizamos un análogo de FK506 no inmunosupresor usando metátesis cruzada para fusionar un resto de vinil piridina al alqueno terminal como una "protuberancia" en el dominio efector de FK506. El análogo resultante se denominó FKVP (Fig. 5a). El resto de piridina recién añadido estaba destinado a aumentar la solubilidad en agua mientras proporcionaba volumen estérico para alterar su interacción con calcineurina (Fig. 6). La citotoxicidad de FKVP se evaluó y se comparó con la de FK506 tanto en células T Jurkat (Fig. 5b, Fig. 7a) como HUVEC primarias (Fig. 7b). Al igual que FK506, FKVP no afectó a la viabilidad celular a concentraciones de hasta 10 μ M (Fig. 5b). Después, determinamos el efecto de FKVP sobre un gen indicador de NFAT-luciferasa activado con PMA/ionomicina en células T Jurkat (Clemons et al., 2002). Aunque tanto FK506 como CsA exhibieron una potente inhibición del indicador, FKVP no provocó una inhibición significativa a concentraciones de hasta 10 μ M (Fig. 5c), lo que sugiere que FKVP ya no es capaz de inhibir la calcineurina. Para confirmar que FKVP retenía la capacidad de unirse a FKBP, lo aplicamos a un ensayo de competición en combinación con FK506 y rapamicina, ya que el secuestro de FKBP libre evitará la formación de complejos activos de FKBP12-FK506 o FKBP-rapamicina y, por lo tanto, antagonizará la actividad de ambos fármacos (Rao et al., 1997, Abraham et al., 1996). El efecto de FK506 sobre la calcineurina se determinó usando como lectura el estado de fosforilación de NFATc2. Así, FK506 bloqueaba la desfosforilación de NFATc2 en respuesta a la estimulación con PMA e ionomicina (Fig. 8a). La presencia de 10 μ M de FKVP revirtió el efecto inhibitorio de FK506 sobre la desfosforilación de NFATc2, sugiriendo un antagonismo mutuo entre FKVP y FK506. De manera similar, examinamos el efecto de la rapamicina sobre la actividad de mTOR como se juzga por el estado de fosforilación de su sustrato p70s6k. Una vez más, una alta concentración de FKVP revirtió la inhibición de rapamicina sobre la fosforilación de p70s6k (Fig. 8b). Conjuntamente, estos resultados mostraron claramente que FKVP es capaz de antagonizar las actividades tanto de FK506 como de rapamicina a través de la unión competitiva a proteínas FKBP endógenas.

Ejemplo 6

FKVP en combinación con AMD3100 aceleró la cicatrización de heridas.

Previamente, hemos informado de una actividad sinérgica de AMD3100 y FK506 a baja dosis (AF) en la aceleración de la cicatrización de heridas después de la escisión de la piel de espesor completo (Lin et al., 2014). Para determinar si FKVP tiene el efecto equivalente, realizamos un experimento de cicatrización de heridas en un modelo de rata de diabetes tipo 2. Se generaron cuatro heridas de espesor completo mediante escisiones circulares de 8 mm de diámetro en el lomo afeitado de una rata GK diabética y cada sitio de la herida se fotografió digitalmente a los intervalos de tiempo indicados (Fig. 9a). Se usó la reepitelización de áreas de heridas completas como parámetro definido de cicatrización completa, y se calculó el tiempo de cicatrización completa de cuatro heridas en cada animal en días (Fig. 9b).

Las ratas lesionadas se dividieron aleatoriamente en tres grupos experimentales y recibieron inyecciones subcutáneas de solución salina, AF (AMD3100 (1,0 mg/kg) más FK506 (0,1 mg/kg)) o AV (AMD3100 más FKVP (0,1 mg/kg)) inmediatamente después de la herida y en días alternos hasta la cicatrización completa. Mientras que el grupo de control salino mostró un tiempo de cicatrización completa promedio de 26 días, los animales tratados con AF exhibieron una cicatrización significativamente más rápida ya que las heridas alcanzaron la reepitelización completa el día 21, lo que es consistente con nuestro informe en modelos de roedores no diabéticos de heridas escisionales quirúrgicas (Lin et al., 2014). Es importante destacar que diez ratas que recibieron terapia AV presentaron un efecto equivalente a AF de tiempo significativamente reducido para la cicatrización completa de 26 a 20 días (Fig. 9c). Estos resultados sugieren fuertemente que la inhibición de la calcineurina no está implicada en la actividad sinérgica de AMD3100 y FK506 en la aceleración de la cicatrización de heridas.

Ejemplo 7

FKVP activa el indicador de ID-1 y la fosforilación de SMAD1/5 a través del receptor de BMP tipo 1

Habiendo descartado la calcineurina como mediador relevante de la actividad de aceleración de WH de FK506, retornamos a FKBP12 y a la ruta de señalización de BMP que se ha informado que regula. Comenzamos determinando si FK506 y FKVP son ambos capaces de activar la ruta de señalización de BMP empleando un indicador de ruta del elemento de respuesta a BMP (BRE) (luciferasa bajo el control del promotor del gen ID1) (Spiekerkoetter et al., 2013) en células T Jurkat [E6.1]. Se encontró que la línea Jurkat expresaba componentes de trabajo de la señalización de BMP (BMPR, SMAD1/5) además de altos niveles de FKBP12 y CXCR4, lo que la convierte en un sistema modelo excelente. Para confirmar la selectividad del indicador, se usaron rBMP-4 y rTGF- β 1 como controles positivos y negativos, respectivamente. El tratamiento tanto con FKVP como con FK506 provocó la activación dependiente de la dosis del indicador, y los aumentos en la actividad de luciferasa se bloquearon completamente por el inhibidor selectivo

de BMP1R LDN-193189 (LDN) (Fig. 10a). En contraste con FK506 y FKVP, la ciclosporina A (CsA) no activó el indicador (Fig. 10a), lo que es consistente con la noción de que la calcineurina no está implicada en la activación de la quinasa BMPR1 por FK506.

Para estudiar los eventos de señalización de BMPR1 aguas abajo, determinamos los efectos de FK506 y FKVP sobre la fosforilación de SMAD1/5. Ambos compuestos indujeron fosforilación de SMAD1/5 de una manera dependiente de la dosis (Fig. 10b), un efecto suprimido por el tratamiento con LDN (Fig. 10c). Por el contrario, no hubo aumentos en SMAD2/3 fosforilado en las mismas condiciones (Fig. 11), sugiriendo que, aunque FKBP12 puede unirse a receptores de TGF- β (Chen et al., 1997), su disociación es insuficiente para activar la actividad de la quinasa del receptor en ausencia de TGF- β . Este resultado está de acuerdo con estudios previos que muestran que FK506 y análogos no funcionales son incapaces de activar indicadores de la ruta de TGF- β sin la adición de ligando exógeno (Spiekerkoetter et al., 2013; Wang et al., 1996). En el indicador BRE-luciferasa, se encontró que AMD3100 no tenía efecto sobre la estimulación del promotor de ID-1 solo o en combinación con FKVP (Fig. 12), sugiriendo que la actividad sinérgica de estos fármacos no se produce al nivel de señalización de BMP. Además, encontramos que la proteína inhibidora de BMP extracelular, Noggin, no era efectiva para reducir la inducción mediada por FK506 o FKVP del indicador de BMP (Fig. 13). Estas observaciones sugieren que no se requiere BMP endógeno para la activación de la señalización por FK506 o FKVP, y que estos compuestos podrían activar BMP en tejidos con subexpresión de la proteína BMP, o sobreexpresión de inhibidores extracelulares como Noggin. Además, FKVP aumentó la sensibilidad de las células a la estimulación de BMP-4 de una manera aditiva, sugiriendo que la inhibición de la unión de FKBP12 promueve la activación del receptor por el ligando endógeno (Fig. 14). Tanto la fosforilación de SMAD1/5 como la expresión de ID-1 aumentaron significativamente en células HUVEC después del tratamiento con FKVP (Fig. 15), proporcionando evidencia de que más de un tipo celular es sensible a la activación de BMP por FKVP. Conjuntamente, estos resultados indicaron que tanto FK506 como FKVP son capaces de activar la señalización de la quinasa BMPR1, aumentando la posibilidad de que esta activación desempeñe un papel clave en la actividad de aceleración de la cicatrización de FK506 en la terapia de combinación de AF.

Ejemplo 8

FKBP12 solo se requiere para la fosforilación de SMAD1/5 inducida por FKVP.

FKBP12 es un miembro de la superfamilia de proteínas FKBP. En trabajos previos, se ha mostrado que FKBP12 está asociada con la quinasa 2 similar a activina BMPR1 (ALK2). Sin embargo, los intentos de inactivar varias FKBP no pudieron revelar un efecto específico sobre la señalización de BMPR1 (Spiekerkoetter et al., 2013), probablemente debido a la estabilidad relativa y a la alta abundancia de FKBP. Para abordar este problema, generamos inactivaciones por CRISPR-Cas9 de tres FKBP citosólicas, FKBP12, FKBP51 y FKBP52. Se ha informado que las tres proteínas se unen a FK506 (Kozany et al., 2009), y en el ensayo de indicador de BRE-luciferasa, se encontró que solo las células con inactivación de FKBP12 perdieron sensibilidad a FK506 y FKVP (Fig. 16a, 16b). También se puede observar que las células FKBP12KO mostraron niveles constitutivamente elevados de fosforilación de SMAD1/5 (Fig. 16a), explicando el bajo valor del tratamiento con BMP-4 en células FKBP12KO en relación con una muestra tratada con DMSO con niveles ya elevados. Además, la reconstitución de FKBP12 mediante una construcción de fusión novedosa etiquetada con SNAP restauró la sensibilidad a FK506/FKVP en células KO a la de la línea parental original (Fig. 16c). Fuimos capaces de usar esta proteína de fusión para sedimentar la calcineurina y mTOR en presencia de FK506 y rapamicina, respectivamente, sugiriendo que la etiqueta SNAP fusionada no interfería con las interacciones de los complejos FKBP12-FK506 y FKBP12-rapamicina con calcineurina o mTOR (Fig. 17). Luego, aplicamos la misma construcción para sedimentar receptores de ALK etiquetados con V5 o HA de células HEK293T transfectadas. Observamos que los receptores SNAP-FKBP12 y ALK realmente interactúan entre sí y la asociación fue sensible a la competición por FKVP (Fig. 16d). Estas observaciones sugieren fuertemente que la interacción FKBP12-BMPR1 es únicamente responsable de mediar el efecto de la activación de BMP inducida por FKVP.

Ejemplo 9

La señalización de BMP se requiere para el efecto de la combinación de AF en la aceleración de la cicatrización de heridas

Para determinar si la activación de BMP por FK506 es responsable de la cicatrización acelerada de heridas, se administró un inhibidor selectivo de la quinasa de BMPR1, LDN-193189 (2 mg/kg/día, i.p.) a ratas GK lesionadas tratadas con solución salina o combinación de AF. Se ha mostrado que LDN es efectivo in vivo (Cuny et al., 2008; Sun et al., 2013), y por sí solo no mostró ningún efecto sobre la cicatrización de heridas. Curiosamente, LDN suprimió el efecto beneficioso de la terapia de combinación de AF y aumentó el tiempo para la cicatrización completa de 21 a 25 días (Fig. 18a, 18b). Hemos informado que FK506 desempeña un papel clave en el reclutamiento de células madre CD133 movilizadas por AMD3100 en sitios de heridas (Lin et al., 2014) u órganos lesionados (Okabayashi et al., 2011; Hu et al., 2016; Cameron et al., 2016; Zhai et al., 2018). Para confirmar adicionalmente si el bloqueo de la señalización de BMP inhibe el reclutamiento de células madre, realizamos tinción inmunohistoquímica para CD133 en secciones de tejido de herida recuperadas de animales el día 7 después de la cirugía. Se identificaron unas pocas células CD133+ en secciones de tejido de herida de animales tratados con solución salina (Fig. 18c). El número de células CD133+ aumentó significativamente en los tejidos de granulación recién formados de las heridas en animales que recibieron terapia de combinación de AF. Sorprendentemente, la administración del inhibidor de BMP LDN redujo drásticamente

el número de células CD133+ en las heridas en animales con tratamiento de combinación de AF. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el reclutamiento de más células madre CD133+ en los sitios de la herida por el tratamiento de combinación con AF depende de la activación de BMP por FK506, y que el bloqueo de la señalización de BMP con LDN elimina el efecto beneficioso de la terapia de combinación con AF.

Los inventores investigaron el mecanismo por el que FK506 aceleraba la WH cuando se usaba en combinación con AMD3100. Usando FKVP, un análogo no inmunosupresor novedoso de FK506, descartamos a la calcineurina como mediador de la aceleración de WH, aumentando la posibilidad de que las FKBP sean la diana primaria para ambos efectos. Además, demostramos que los ligandos macrocíclicos de FKBP activan la señalización de BMP al aliviar la inhibición de BMPR1 por FKBP12 endógeno. Mostramos que FKBP12 desempeña un papel esencial en la ruta de señalización de BMP, un efecto que puede mediarse sin inhibición de calcineurina a través del uso de análogos de FK506 no inmunosupresores. Encontramos que la señalización del receptor de BMP se requiere para la potenciación de la cicatrización de heridas por FK506, y que el bloqueo de esta activación da como resultado un menor número de células madre reclutadas en el área de la herida. La señalización de BMP puede manipular varios tipos de células en el mecanismo de cicatrización de heridas, tales como quimiotaxis de células madre o adhesión endotelial de células movilizadas en el tejido herido (Fig. 19).

Se ha mostrado que FKBP12, un miembro fundador de la superfamilia de FKBP, posee múltiples funciones celulares y fisiológicas además de su papel en mediar la inhibición de la calcineurina y la activación de las células T por FK506. La asociación con, e inhibición por, FKBP12 añade otra capa de regulación de la quinasa de BMPR1. Que el alivio de la inhibición de FKBP12 por FK506 o FKVP es suficiente para activar el gen indicador de luciferasa ID-1 sugiere que hay un nivel basal de actividad de BMPR que normalmente se suprime por FKBP12 y el alivio de esta inhibición conduce a una activación significativa, aunque moderada, de la ruta de señalización en comparación con la unión de BMP-4. Por lo tanto, BMPR puede existir en tres estados de activación distintos, tras la liberación de la inhibición de FKBP12, tras la unión de BMP y ambas. La presente invención revela que la activación parcial de BMP farmacológicamente con FK506 o FKVP es suficiente para acelerar la cicatrización de heridas en combinación con AMD3100.

Se ha informado que los receptores de BMP de tipo 2 fosforilan constitutivamente el dominio GS de receptores de tipo 1 (ALK). Se cree que FKBP12 inhibe la activación aleatoria de los ALK mediante la unión a residuos en el dominio GS (Chaikuad et al., 2012). Los resultados de los inventores indicaron que FKVP compite por esta asociación para todos los ALK específicos de BMP. Se mostró que la pérdida de FKBP12 da como resultado una fosforilación basal elevada de SMAD1/5, sugiriendo un estado parcialmente activado de los ALK en ausencia de su inhibidor intracelular endógeno FKBP12. El aumento aditivo en la estimulación del indicador ID-1 del tratamiento concomitante con FKVP y rBMP también es consistente con los tres estados de activación de BMPR1. Además, la adición del inhibidor de BMP noggina no evitó la estimulación del indicador ID-1 por FKVP, sugiriendo que la regulación de BMPR por FKBP12 endógeno es independiente de la unión proteína BMP-receptor.

Se ha mostrado que la inhibición de la calcineurina por FK506 es responsable tanto de su potente actividad inmunosupresora como de varios de sus efectos secundarios, incluyendo nefrotoxicidad y neurotoxicidad (Bechstein et al., 2000; Naesens et al., 2009). Mediante el nuevo desarrollo de una "protuberancia" molecular en el dominio efector de interacción con calcineurina de FK506, el FKVP resultante perdió su actividad inmunosupresora a juzgar por el ensayo del gen indicador NFAT. En comparación con la calcineurina, la pérdida de función de FKBP12 y otros miembros parece tener un impacto mucho menor y menos drástico tanto en levaduras como en mamíferos. Aparte de los receptores de BMP, se ha informado que FKBP12 modula el flujo de calcio en los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y rianodina (Cameron et al., 1995; Jayaraman et al., 1992), sugiriendo que FK506 puede afectar a la contractilidad del músculo liso vascular o cardíaco. Sin embargo, la inhibición de la calcineurina sola se ha reconocido como un potenciador clave de la hipertensión (Hoorn et al., 2012). Como tales, los ligandos de FKBP no inmunosupresores de la presente invención deberían tener menos efectos secundarios, dando como resultado, agonistas de BMP farmacológicos más seguros y más selectivos. Además, se ha mostrado que la inhibición de FKBP52 por FK506 aumenta la regeneración nerviosa (Gold, B.G., 1999; Gold, B.G. et al, 1999), lo que sugiere que el efecto puede experimentar sinergia con la regeneración tisular mediada por FKBP12 a través de la señalización de BMP.

El hecho de que uno de los compuestos de fórmula I, FKVP, sea tan efectivo en la potenciación de WH como FK506 también tiene implicaciones clínicas importantes debido a su falta de efecto inmunosupresor. En pacientes con mayor riesgo de infección, tales como los que padecen diabetes, el tratamiento con FKVP proporcionará un tratamiento efectivo sin los riesgos asociados con los inmunosupresores. Esto se resalta en nuestro uso de ratas Goto-Kakazaki para este estudio; un modelo de rata que desarrolla espontáneamente diabetes tipo 2 después de 3-4 meses de edad y sufre de muchos de las mismas manifestaciones fisiológicas que afectan a los seres humanos con la enfermedad, incluyendo cicatrización de heridas significativamente deteriorada. Mediante el uso de dicho modelo para este estudio, ilustramos el poder de estos compuestos de fórmula I y su uso en el tratamiento y su aplicación al uso clínico. Nuestra demostración de que FKVP recapitula la eficacia de WH de FK506 en el modelo de rata desafiante hizo que FKVP fuera un compuesto líder atractivo, y podemos mostrar que otros compuestos de fórmula I no inmunosupresores carecen de actividad inhibidora hacia la calcineurina de manera similar a FKVP, y que poseen efectos beneficiosos similares. Además, las actividades sinérgicas de AMD3100 y FKVP demuestran una terapia regenerativa que puede aplicarse a varios otros tipos de daño tisular. Más allá de la WH, nuestro laboratorio ha mostrado una regeneración

hepática mejorada después de hepatectomía parcial y tratamiento de combinación de AF (Zhai et al., 2018). Por tanto, FKVP y otros ligandos de FKBP12 no inmunosupresores de los compuestos de fórmula I pueden encontrar uso tanto en la cicatrización de heridas como en terapias regenerativas.

Todas las referencias, incluyendo publicaciones, solicitudes de patente y patentes, citadas en la presente memoria se incorporan en este documento por referencia en la misma medida que si indicara que cada referencia se incorporara individual y específicamente por referencia y se expusieran en su totalidad en la presente memoria.

El uso de los términos "un" y "una" y "el" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe interpretarse que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o se contradiga claramente por el contexto. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como términos de extremos abiertos (es decir, que significan "que incluye, pero no se limita a") a menos que se indique lo contrario. La mención de intervalos de valores en la presente memoria está destinada simplemente a servir como un método abreviado para hacer referencia individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se enumerara individualmente en la presente memoria. Todos los métodos descritos en la presente memoria pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente de otro modo. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionados en la presente memoria, pretende meramente iluminar mejor la invención y no supone una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como indicativo de que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

En la presente memoria se describen realizaciones preferidas de esta invención, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Las variaciones de esas realizaciones preferidas pueden resultar evidentes para los expertos en la técnica tras leer la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores pretenden que la invención se ponga en práctica de manera diferente a la descrita específicamente en la presente memoria. Por consiguiente, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto mencionada en las reivindicaciones adjuntas a la presente memoria tal como lo permite la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las posibles variaciones de los mismos está abarcada por la invención a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o se contradiga claramente de otro modo por el contexto.

Referencias

H. Tanaka, A. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, **109**, 5031; (b) J. J. Fung, *Transplantation*, 2004, **77**, S41.

S. Barik *Cell Mol. Life Sci.*, 2006, **63**, 2889.

J. Liu, J. D. Farmer, W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman y S. L. Schreiber, *Cell* 1991, **66**, 807; (b) J. P. Griffith et al. *Cell* 1995, **82**, 506; (c) C. R. Kissinger et al. *Nature* 1995, **378**, 641.

Y. Chen, F. Liu, y J. Massagué, *EMBO J.* 1997, **16**, 3866; (b) M. Huse, Y. Chen, J. Massagué, y J. Kuriyan, *Cell* 1999, **96**, 425; (c) T. Wang et al. *Cell* 1996, **86**, 435; (d) M. S. Rahman, N. Akhtar, H. M. Jamil, R. S. Banik y S. M. Asaduzzaman, *Bone Res.* 2015, **3**, 15005.

E. Spiekerkoetter et al. *J. Clin. Invest.* 2013, **123**, 3600.

T. Kawahara et al. *Oncotarget* 2015, **6**, 1582.

B. J. Peiffer et al. No publicado.

P. S. Marinec, C. G. Evans, G. S. Gibbons, M. A. Tarnowski, D. L. Overbeek y J. E. Gestwicki *Bioorg. Med. Chem.* 2009, **17**, 5763; (b) M. Nambu. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017, **27**, 2465; (c) Z. Guo, R. Zhang y F. Liang, *RSC Adv.* 2014, **4**, 11400; (d) P. A. Clemons, B. G. Gladstone, A. Seth, E. D. Chao, M. A. Foley, y S. L. Schreiber *Chemistry & Biology* 2002, **9**, 49.

P. Compain, *Adv. Synth. Catal.* 2007, **349**, 1829.

C. P. Woodward, N. D. Spiccia, W. R. Jackson y A. J. Robinson, *Chem. Commun.* 2011, **47**, 779

R. F. Heck y J.P. Nolley, *J. Org. Chem.* 1972, **37**, 2320; (b) T. Mizoroki, K. Mori y A. Ozaki, *Bull. Chem. Soc. Jap.* 1971, **44**, 581; (c) R. F. Heck, *Org. React.* 1982, **27**, 345; (d) A. de Meijere y F. E. Meyer *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1994, **33**, 2379; (e) I. P. Beletskaya y A. V. Cheprakov, *Chem. Rev.* 2000, **100**, 3009.

Abraham, R.T., y Wiederrecht, G.J. (1996). Immunopharmacology of rapamycin. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 483-510

- Albiñana, V., Sanz-Rodríguez, F., Recio-Poveda, L., Bernabéu, C., y Botella, L.M. (2011). Immunosuppressor FK506 increases endoglin and activin receptor-like kinase 1 expression and modulates transforming growth factor- β 1 signaling in endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* 79, 833-843.
- 5 Balaji, S., King, A., Crombleholme, T.M., y Keswani, S.G. (2013). The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2, 283-295.
- Bechstein, W.O. (2000). Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management. *Transpl. Int.* 13, 313-326.
- 10 Bennett, J., Cassidy, H., Slattery, C., Ryan, M.P., y McMorow, T. (2016). Tacrolimus Modulates TGF- β Signaling to Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Renal Proximal Tubule Epithelial Cells. *Journal of Clinical Medicine* 5, 50.
- Bueno, O.F., Brandt, E.B., Rothenberg, M.E., y Molkentin, J.D. (2002). Defective T cell development and function in calcineurin A beta -deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 9398-9403.
- 15 Cameron, A.M., Steiner, J.P., Sabatini, D.M., Kaplin, A.I., Walensky, L.D., y Snyder, S.H. (1995). Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates calcium flux. *PNAS* 92, 1784-1788.
- Cameron, A.M., Wesson, R.N., Ahmadi, A.R., Singer, A.L., Hu, X., Okabayashi, T., Wang, Y., Shigoka, M., Fu, Y., Gao, W., *et al.* (2016). Chimeric Allografts Induced by Short-Term Treatment With Stem Cell Mobilizing Agents Result in Long-Term Kidney Transplant Survival Without Immunosuppression: II, Study in Miniature Swine. *Am. J. Transplant.* 16, 2066-2076.
- 20 Chaikuad, A., Alfano, I., Kerr, G., Sanvitale, C.E., Boergermann, J.H., Triffitt, J.T., Delft, F. von, Knapp, S., Knaus, P., y Bullock, A.N. (2012). Structure of the Bone Morphogenetic Protein Receptor ALK2 and Implications for Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. *J. Biol. Chem.* 287, 36990-36998.
- Chen, Y.G., Liu, F., y Massague, J. (1997). Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J* 16, 3866-3876.
- 25 Clemons, P.A., Gladstone, B.G., Seth, A., Chao, E.D., Foley, M.A., y Schreiber, S.L. (2002). Synthesis of calcineurin-resistant derivatives of FK506 and selection of compensatory receptors. *Chem. Biol.* 9, 49-61.
- Csiszar, A., Ahmad, M., Smith, K.E., Labinskyy, N., Gao, Q., Kaley, G., Edwards, J.G., Wolin, M.S., y Ungvari, Z. (2006). Bone Morphogenetic Protein-2 Induces Proinflammatory Endothelial Phenotype. *Am J Pathol* 168, 629-638.
- 30 Cuny, G.D., Yu, P.B., Laha, J.K., Xing, X., Liu, J.-F., Lai, C.S., Deng, D.Y., Sachidanandan, C., Bloch, K.D., y Peterson, R.T. (2008). Structure-activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 4388-4392.
- Fife, C.E., y Carter, M.J. (2012). Wound Care Outcomes and Associated Cost Among Patients Treated in US Outpatient Wound Centers: Data From the US Wound Registry. *Wounds* 24, 10-17.
- Fung, J.J. (2004). Tacrolimus and transplantation: a decade in review. *Transplantation* 77, S41-43.
- 35 Giordano, A., Romano, S., Mallardo, M., D'Angelillo, A., Cali, G., Corcione, N., Ferraro, P., y Romano, M.F. (2008). FK506 can activate transforming growth factor-beta signalling in vascular smooth muscle cells and promote proliferation. *Cardiovasc. Res.* 79, 519-526.
- Gold, B.G. (1999). FK506 and the role of the immunophilin FKBP-52 in nerve regeneration. *Drug Metab. Rev.* 31, 649-663.
- 40 Gold, B.G., Densmore, V., Shou, W., Matzuk, M.M., y Gordon, H.S. (1999). Immunophilin FK506-binding protein 52 (not FK506-binding protein 12) mediates the neurotrophic action of FK506. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 1202-1210.
- Griffith, J.P., Kim, J.L., Kim, E.E., Sintchak, M.D., Thomson, J.A., Fitzgibbon, M.J., Fleming, M.A., Caron, P.R., Hsiao, K., y Navia, M.A. (1995). X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* 82, 507-522.
- 45 Hatse, S., Princen, K., Bridger, G., De Clercq, E., y Schols, D. (2002). Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett.* 527, 255-262.
- Hoorn, E.J., Walsh, S.B., McCormick, J.A., Zietse, R., Unwin, R.J., y Ellison, D.H. (2012). Pathogenesis of calcineurin inhibitor-induced hypertension. *J. Nephrol.* 25, 269-275.
- 50 Hu, X., Okabayashi, T., Cameron, A.M., Wang, Y., Hisada, M., Li, J., Raccusen, L.C., Zheng, Q., Montgomery, R.A., Williams, G.M., *et al.* (2016). Chimeric Allografts Induced by Short-Term Treatment With Stem Cell-Mobilizing Agents

- Result in Long-Term Kidney Transplant Survival Without Immunosuppression: A Study in Rats. *Am. J. Transplant.* **16**, 2055-2065.
- Jayaraman, T., Brillantes, A.M., Timerman, A.P., Fleischer, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., y Marks, A.R. (1992). FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* **267**, 9474-9477.
- Jujo, K., Hamada, H., Iwakura, A., Thorne, T., Sekiguchi, H., Clarke, T., Ito, A., Misener, S., Tanaka, T., Klyachko, E., *et al.* (2010). CXCR4 blockade augments bone marrow progenitor cell recruitment to the neovasculature and reduces mortality after myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 11008-11013.
- Kissinger, C.R., Parge, H.E., Knighton, D.R., Lewis, C.T., Pelletier, L.A., Tempczyk, A., Kalish, V.J., Tucker, K.D., Showalter, R.E., y Moomaw, E.W. (1995). Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* **378**, 641-644.
- Kozany, C., März, A., Kress, C., y Hausch, F. (2009). Fluorescent probes to characterise FK506-binding proteins. *Chembiochem* **10**, 1402-1410.
- Lewis, C.J., Mardaryev, A.N., Poterlowicz, K., Sharova, T.Y., Aziz, A., Sharpe, D.T., Botchkareva, N.V., y Sharov, A.A. (2014). Bone morphogenetic protein signaling suppresses wound-induced skin repair by inhibiting keratinocyte proliferation and migration. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 827-837.
- Liles, W.C., Broxmeyer, H.E., Rodger, E., Wood, B., Hübel, K., Cooper, S., Hangoc, G., Bridger, G.J., Henson, G.W., Calandra, G., *et al.* (2003). Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* **102**, 2728-2730.
- Lin, Q., Wesson, R.N., Maeda, H., Wang, Y., Cui, Z., Liu, J.O., Cameron, A.M., Gao, B., Montgomery, R.A., Williams, G.M., *et al.* (2014). Pharmacological mobilization of endogenous stem cells significantly promotes skin regeneration after full-thickness excision: the synergistic activity of AMD3100 and tacrolimus. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2458-2468.
- Liu, J., Farmer, J.D., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., y Schreiber, S.L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807-815.
- Mueller, T.D., y Nickel, J. (2012). Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Letters* **586**, 1846-1859.
- Naesens, M., Kuypers, D.R.J., y Sarwal, M. (2009). Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity. *CJASN* **4**, 481-508.
- Okabayashi, T., Cameron, A.M., Hisada, M., Montgomery, R.A., Williams, G.M., y Sun, Z. (2011). Mobilization of host stem cells enables long-term liver transplant acceptance in a strongly rejecting rat strain combination. *Am. J. Transplant.* **11**, 2046-2056.
- Plikus, M.V., Guerrero-Juarez, C.F., Ito, M., Li, Y.R., Dedhia, P.H., Zheng, Y., Shao, M., Gay, D.L., Ramos, R., Hsi, T.-C., *et al.* (2017). Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science* **355**, 748-752.
- Rao, A., Luo, C., y Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 707-747.
- Schäffer, M.R., Fuchs, N., Proksch, B., Bongartz, M., Beiter, T., y Becker, H.D. (1998). Tacrolimus impairs wound healing: a possible role of decreased nitric oxide synthesis. *Transplantation* **65**, 813-818.
- Shin, K., Lim, A., Zhao, C., Sahoo, D., Pan, Y., Spiekeroetter, E., Liao, J.C., y Beachy, P.A. (2014). Hedgehog Signaling Restrains Bladder Cancer Progression by Eliciting Stromal Production of Urothelial Differentiation Factors. *Cancer Cell* **26**, 521-533.
- Spiekeroetter, E., Tian, X., Cai, J., Hopper, R.K., Sudheendra, D., Li, C.G., El-Bizri, N., Sawada, H., Haghighat, R., Chan, R., *et al.* (2013). FK506 activates BMPR2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* **123**, 3600-3613.
- Sun, C.C., Vaja, V., Chen, S., Theurl, I., Stepanek, A., Brown, D.E., Cappellini, M.D., Weiss, G., Hong, C.C., Lin, H.Y., *et al.* (2013). A hepcidin lowering agent mobilizes iron for incorporation into red blood cells in an adenine-induced kidney disease model of anemia in rats. *Nephrol Dial Transplant* **28**, 1733-1743.
- Tanaka, H., Kuroda, A., Marusawa, H., Hatanaka, H., Kino, T., Goto, T., Hashimoto, M., y Taga, T. (1987). Structure of FK506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5031-5033.
- Tateishi, K., Higuchi, C., Ando, W., Nakata, K., Hashimoto, J., Hart, D.A., Yoshikawa, H., y Nakamura, N. (2007). The immunosuppressant FK506 promotes development of the chondrogenic phenotype in human synovial stromal cells via modulation of the Smad signaling pathway. *Osteoarthritis and Cartilage* **15**, 709-718.

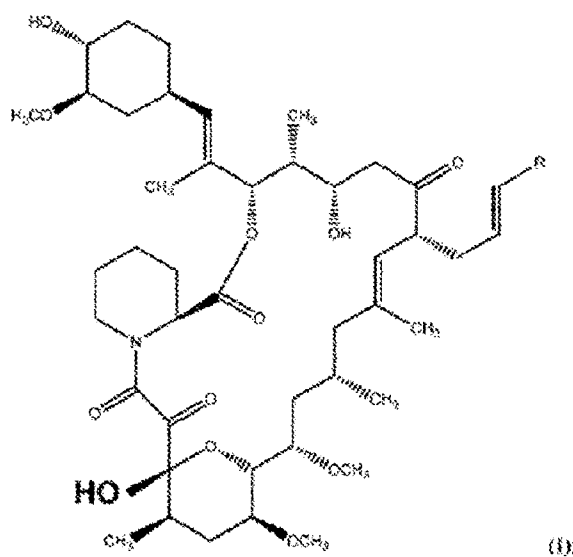
Wang, T., Li, B.Y., Danielson, P.D., Shah, P.C., Rockwell, S., Lechleider, R.J., Martin, J., Manganaro, T., y Donahoe, P.K. (1996). The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell* 86, 435-444.

5 Young, K., Conley, B., Romero, D., Tweedie, E., O'Neill, C., Pinz, I., Brogan, L., Lindner, V., Liaw, L., y Vary, C.P.H. (2012). BMP9 regulates endoglin-dependent chemokine responses in endothelial cells. *Blood* 120, 4263-4273.

Zhai, R., Wang, Y., Qi, L., Williams, G.M., Gao, B., Song, G., Burdick, J.F., y Sun, Z. (2018). Pharmacological Mobilization of Endogenous Bone Marrow Stem Cells Promotes Liver Regeneration after Extensive Liver Resection in Rats. *Scientific Reports* 8, 3587.

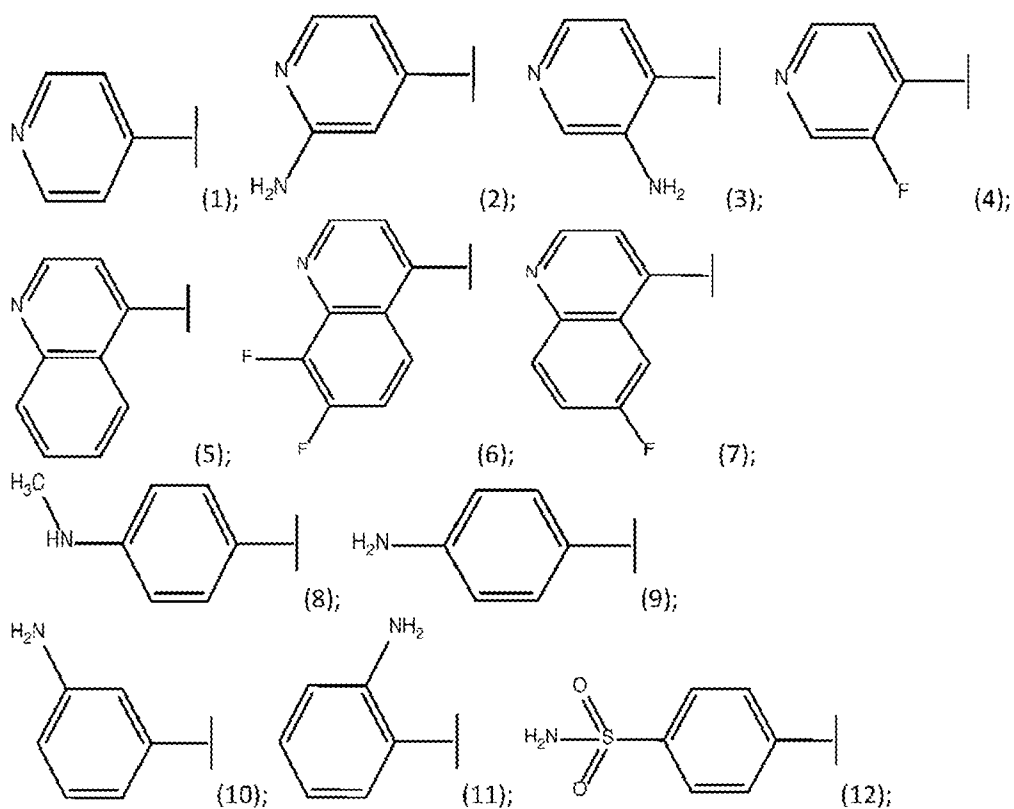
REIVINDICACIONES

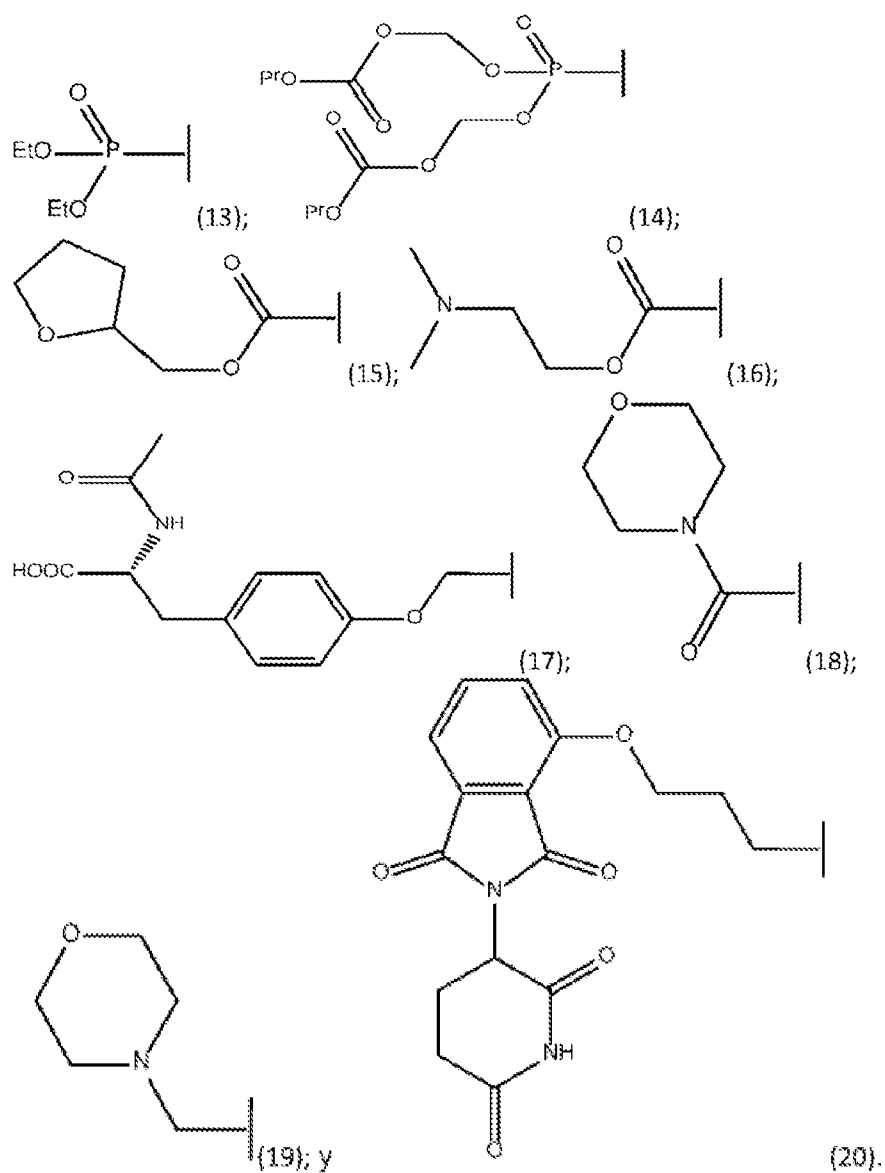
1. Un compuesto de fórmula I:



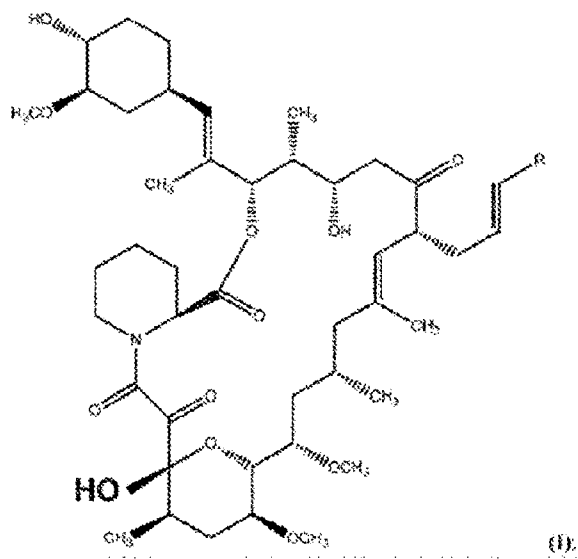
5 o una sal, o solvato del mismo, en donde R es un grupo cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido con H, halo, N, O, P, alquilo C₁-C₆, imidazoilo, cicloalquilo, o heterocicloalquilo, y en donde los grupos heteroarilo y heterocicloalquilo comprenden nitrógeno, oxígeno o azufre.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R se selecciona del grupo que consiste en:



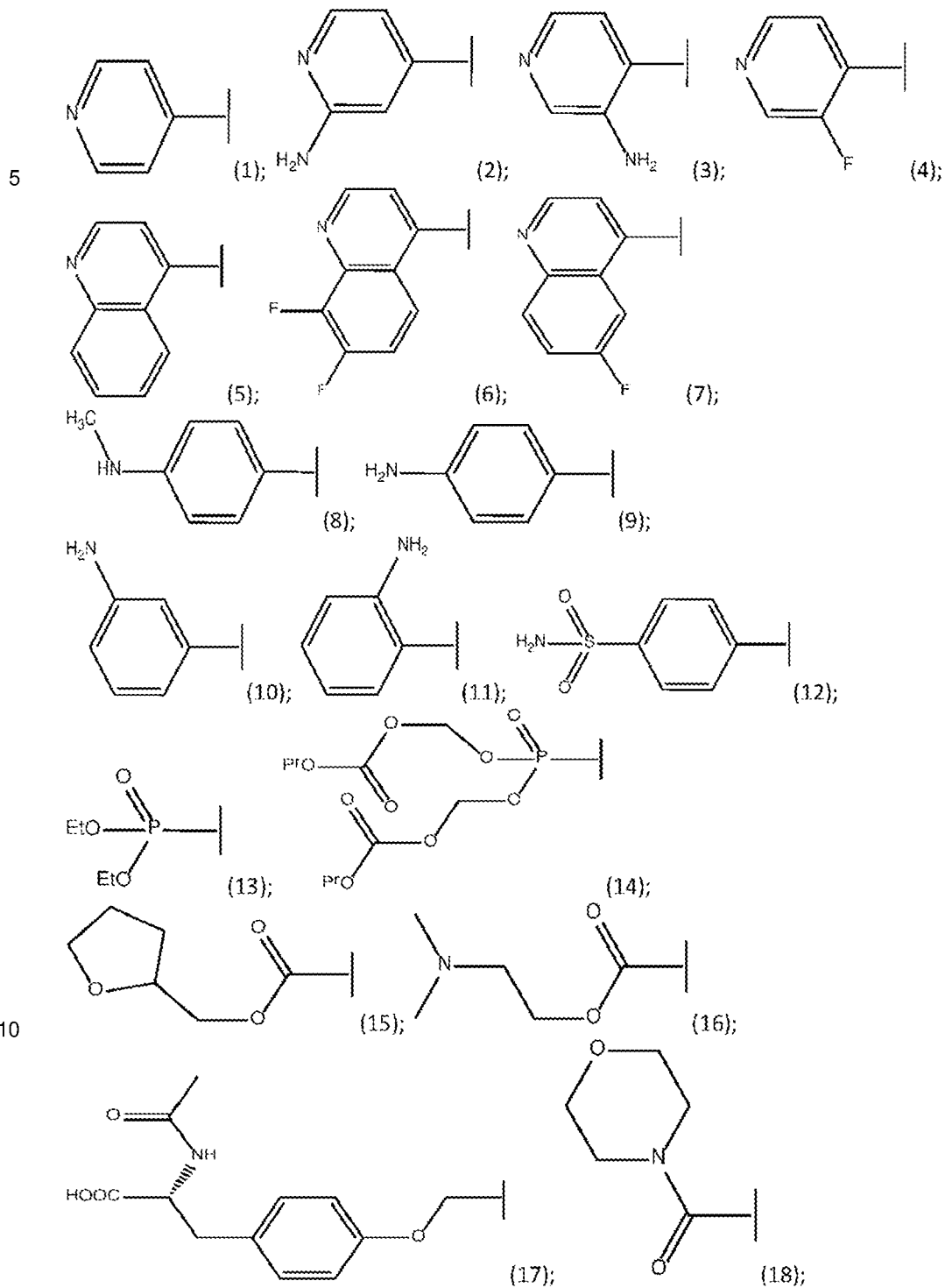


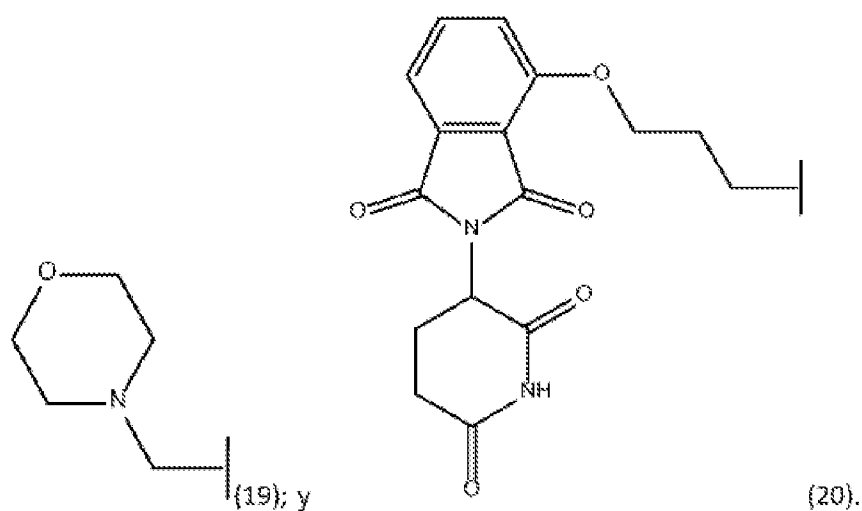
5 3. Una composición que comprende un compuesto de fórmula I:



o una sal o solvato del mismo, en donde R es un grupo cicloalquilo, arilo o heteroarilo sustituido con H, halo, N, O, P, alquilo C₁-C₆, imidazóilo, cicloalquilo, o heterocicloalquilo, y en donde los grupos heteroarilo y heterocicloalquilo comprenden nitrógeno, oxígeno o azufre; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

4. La composición de la reivindicación 3, en donde R se selecciona del grupo que consiste en:

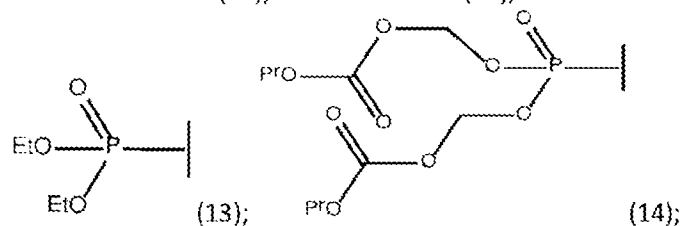
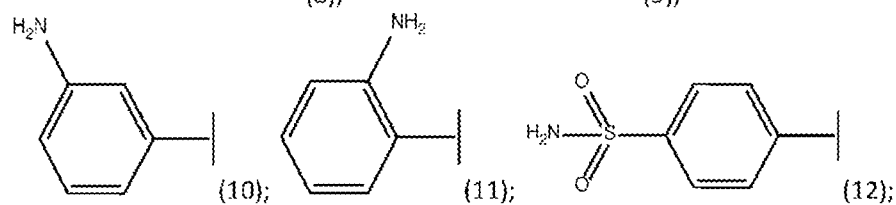
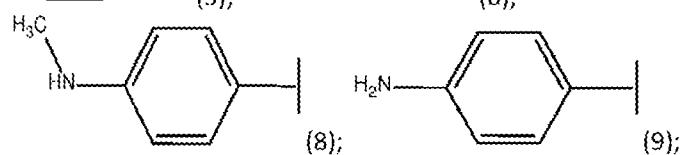
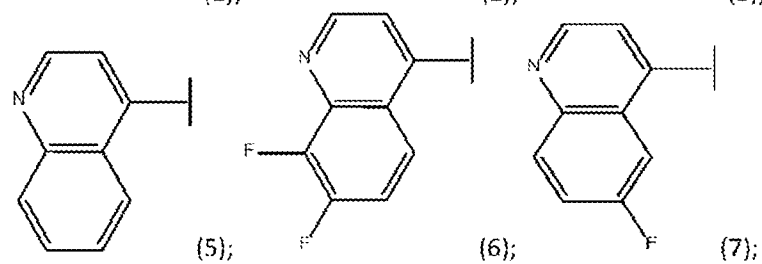
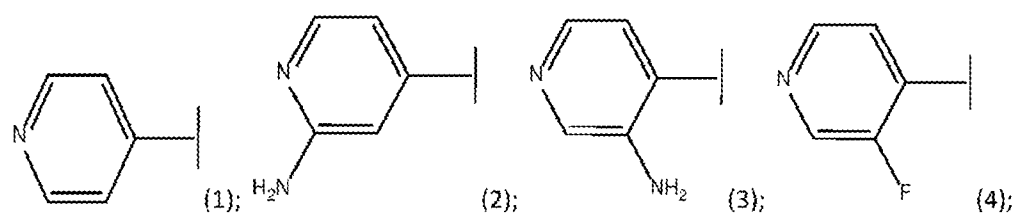




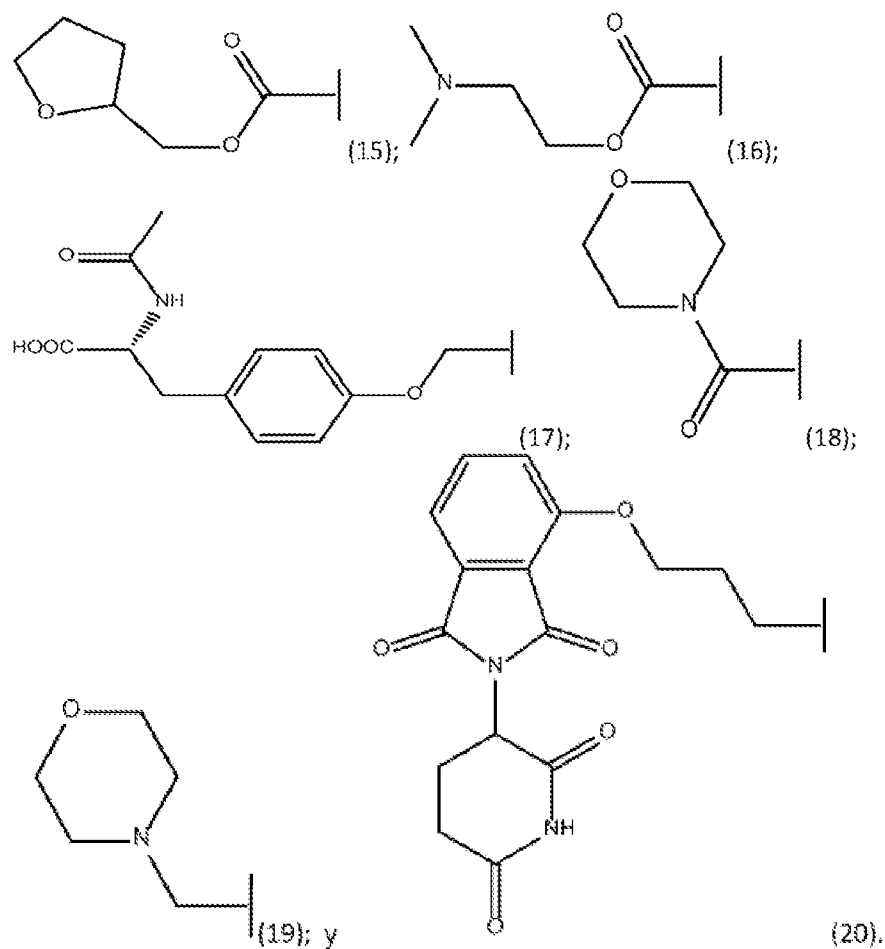
5. La composición de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, que comprende además agente(s) biológicamente activo(s).

5 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, que comprende además al menos un movilizador de células madre.

7. La composición de la reivindicación 6, en donde R se selecciona del grupo que consiste en:

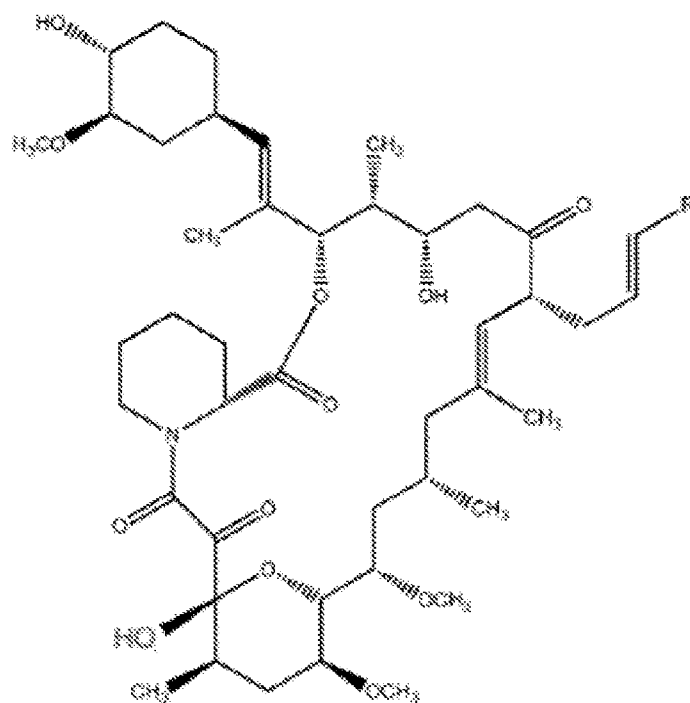


10

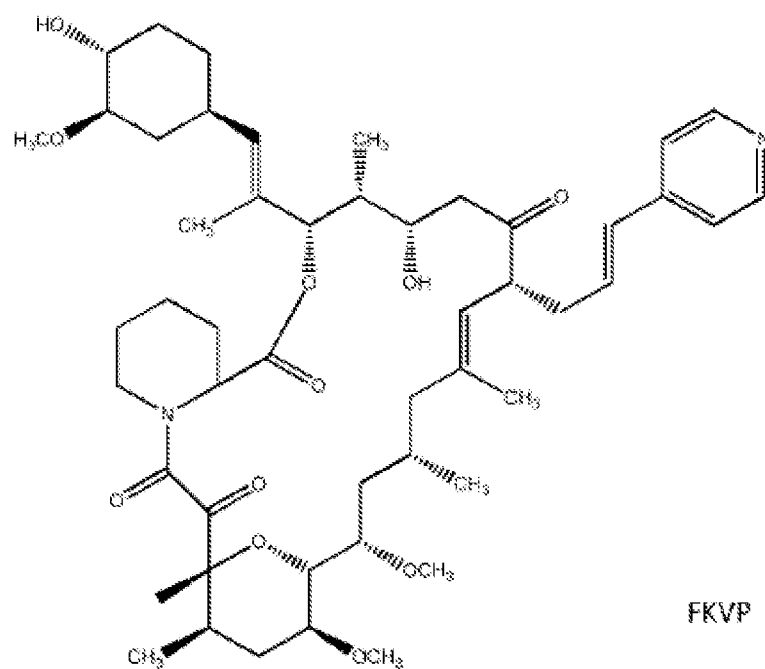


8. La composición de la reivindicación 7, en donde el movilizador de células madre comprende un antagonista de CXCR4.
9. La composición de la reivindicación 8, en donde el antagonista de CXCR4 se selecciona del grupo que consiste en: AMD3100, TG-0054 o AMD3465.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3-9 para su uso en el tratamiento de lesión tisular en un sujeto que lo necesita.
11. La composición para su uso según la reivindicación 10, en donde la composición comprende además al menos un agente biológicamente activo adicional.
12. La composición para su uso según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde la lesión tisular se selecciona del grupo que consiste en: heridas crónicas, úlceras diabéticas, quemaduras, escaldaduras, heridas por congelación y pinchazos.

FIGURA 1



FK506



FKVP

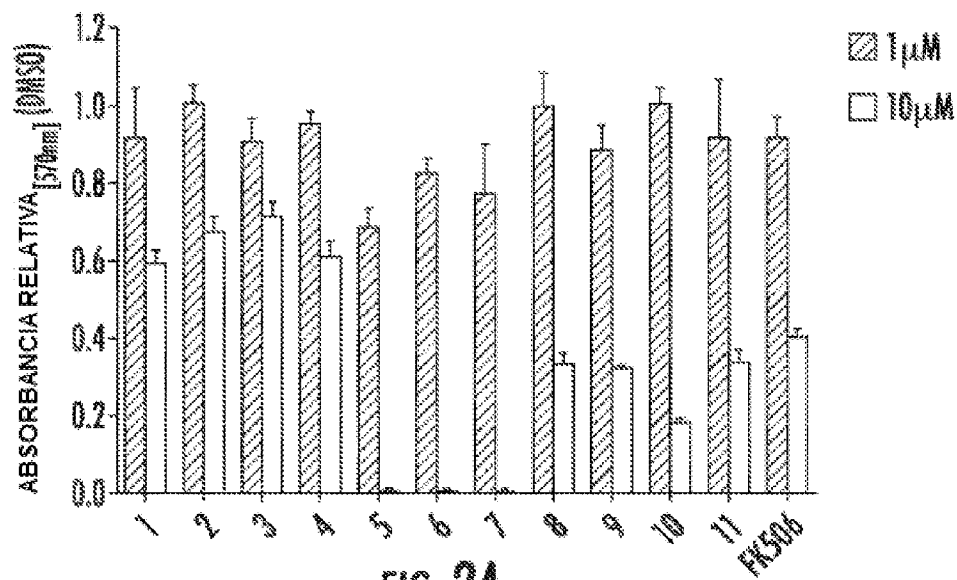


FIG. 2A

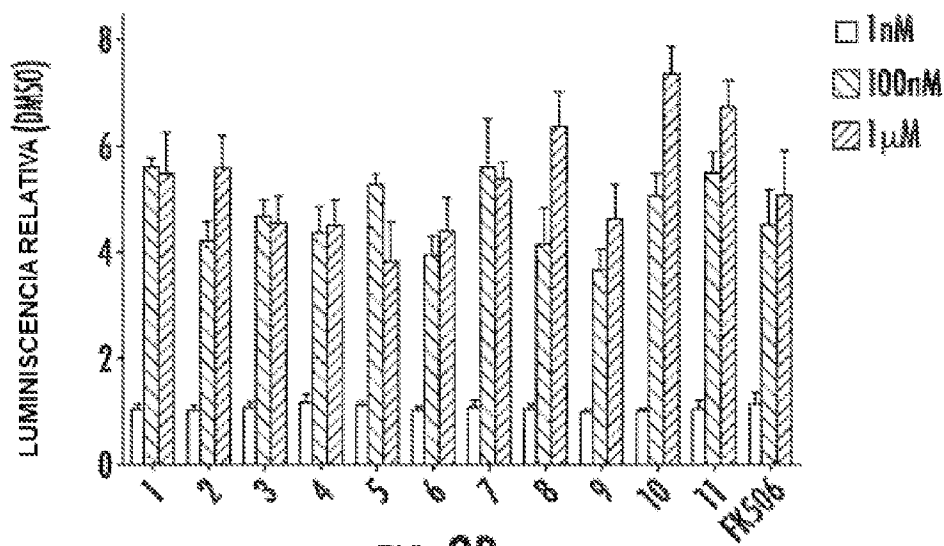


FIG. 2B

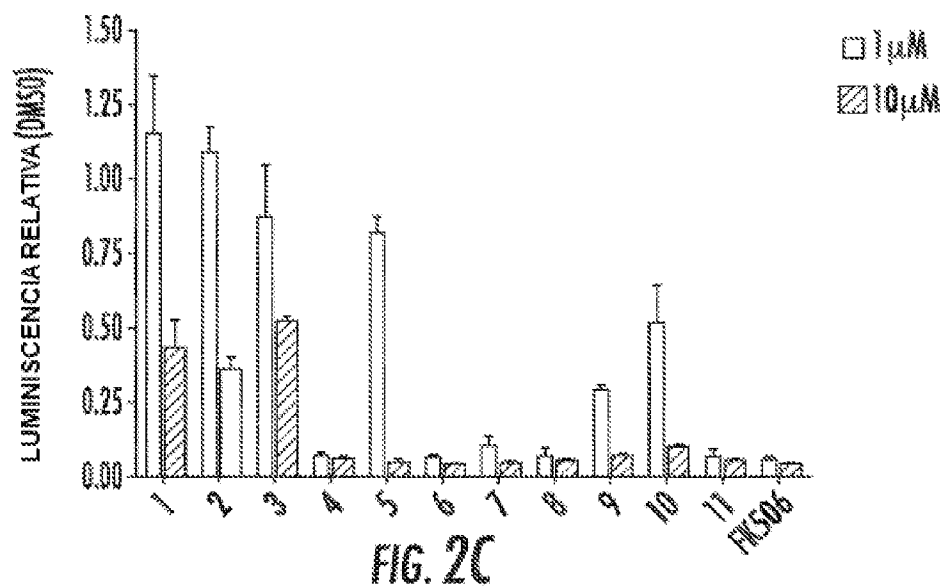


FIG. 2C

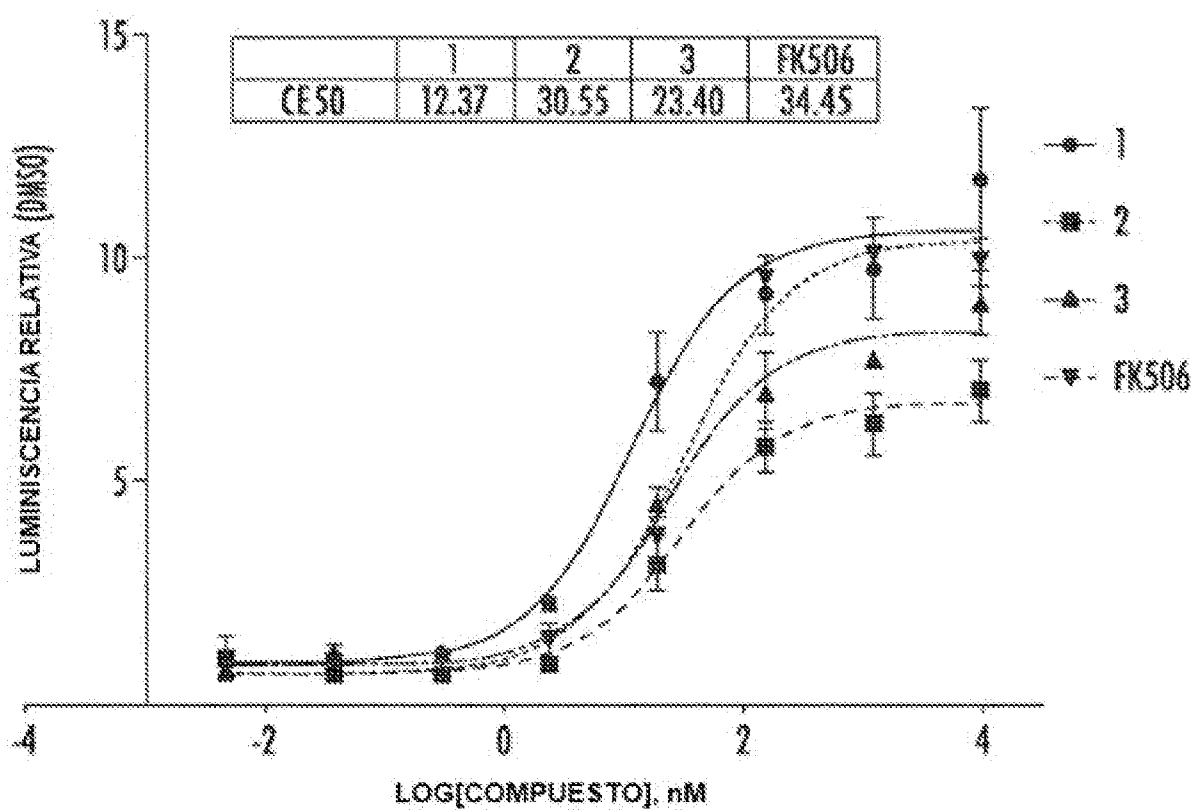
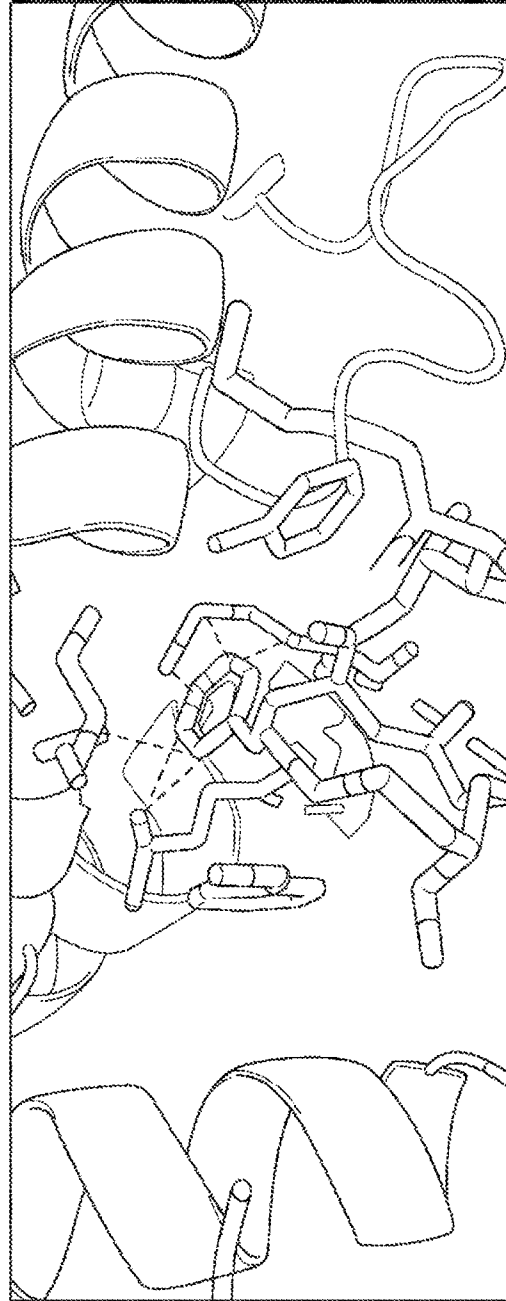
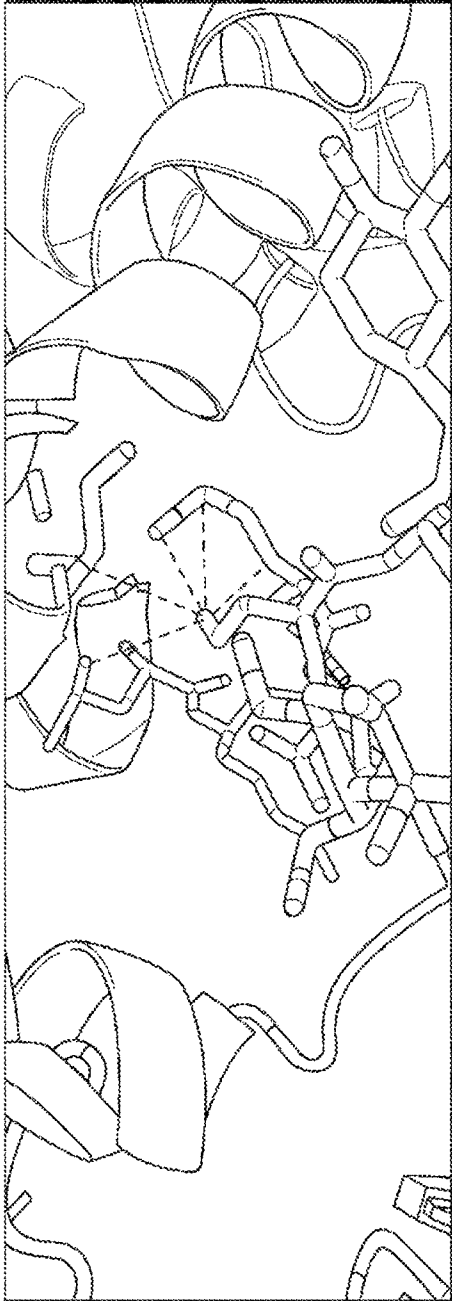


FIG. 3



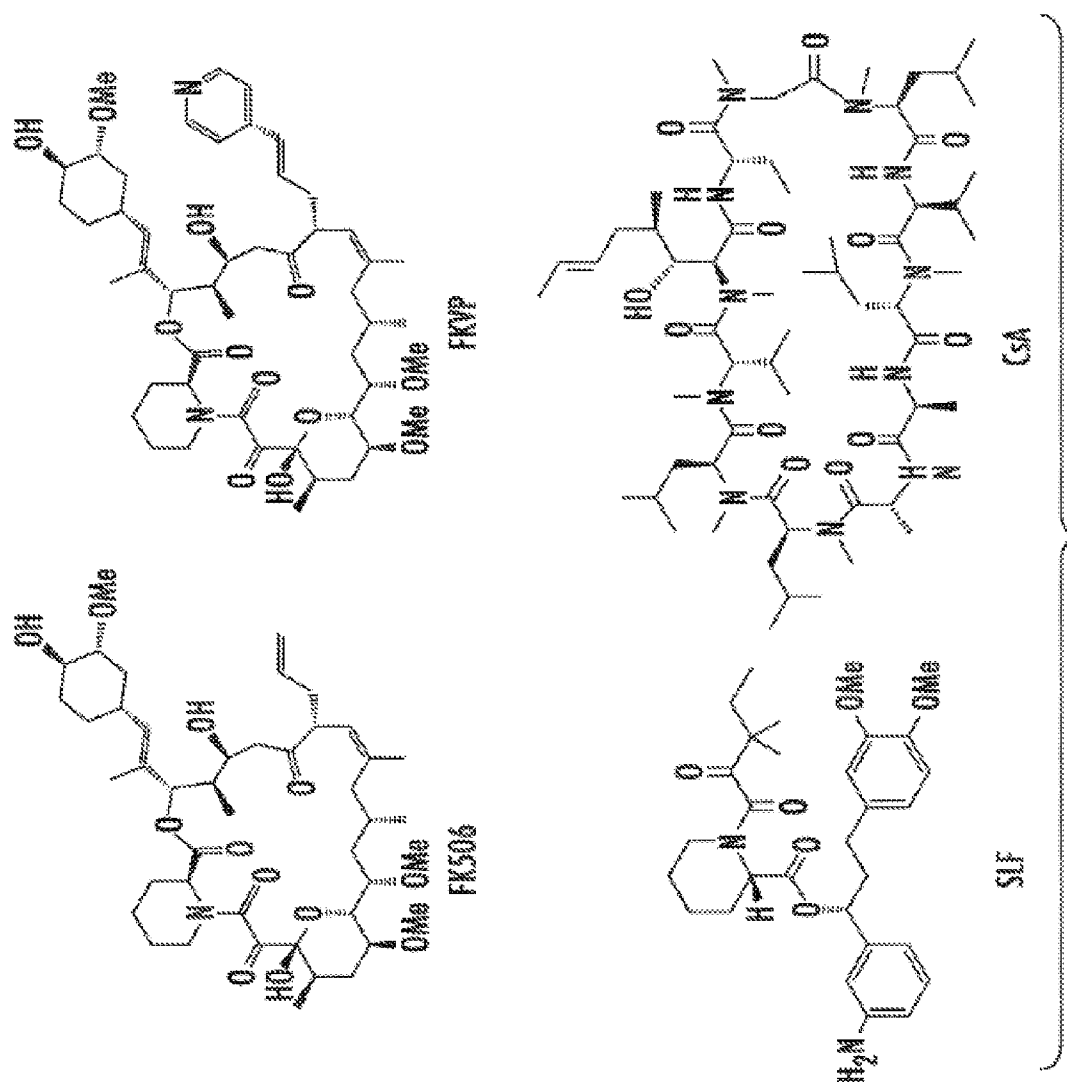


FIG. 5A

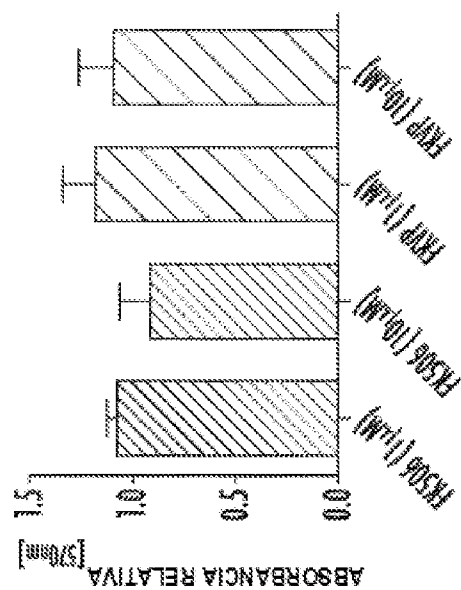


FIG. 5B

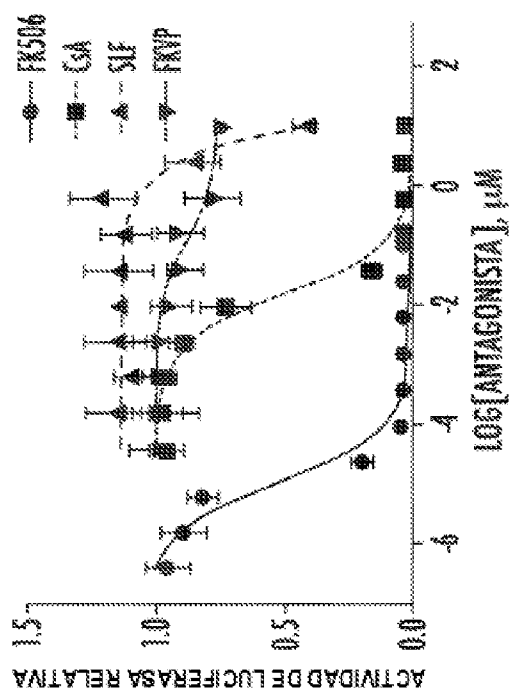


FIG. 5C

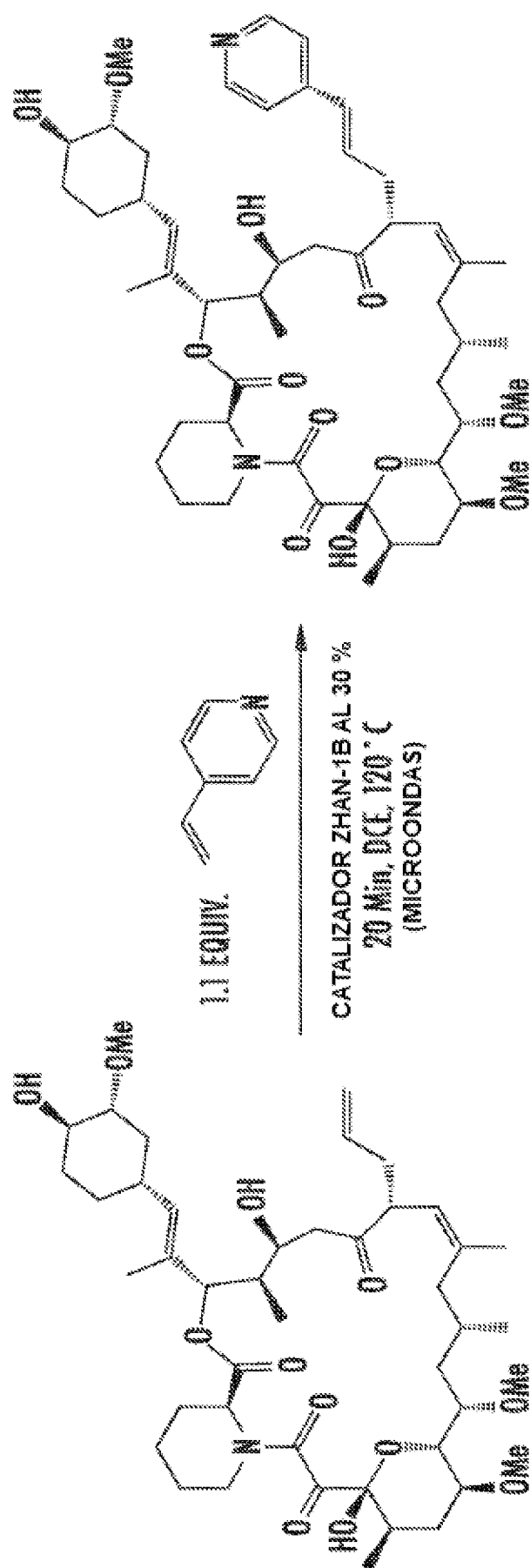


FIG. 6

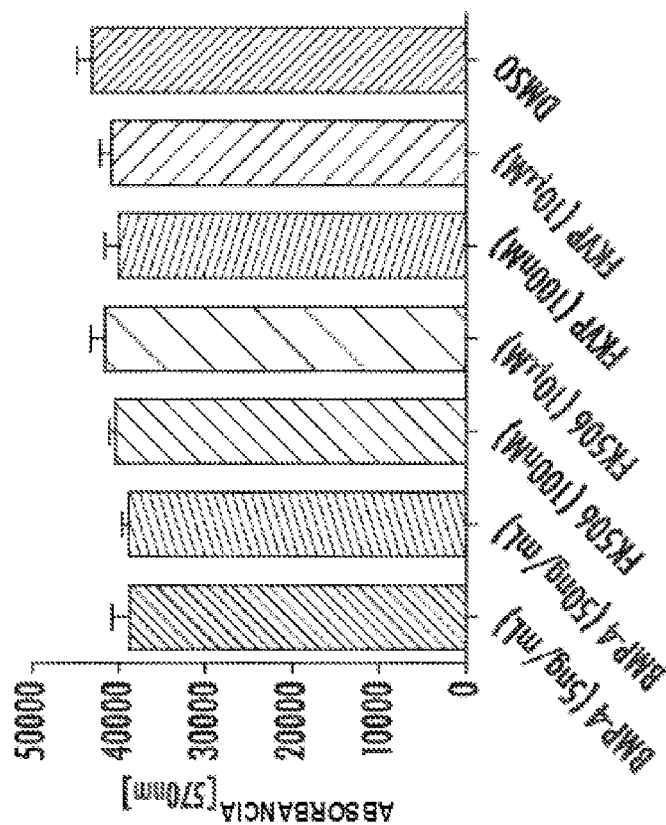


FIG. 7B

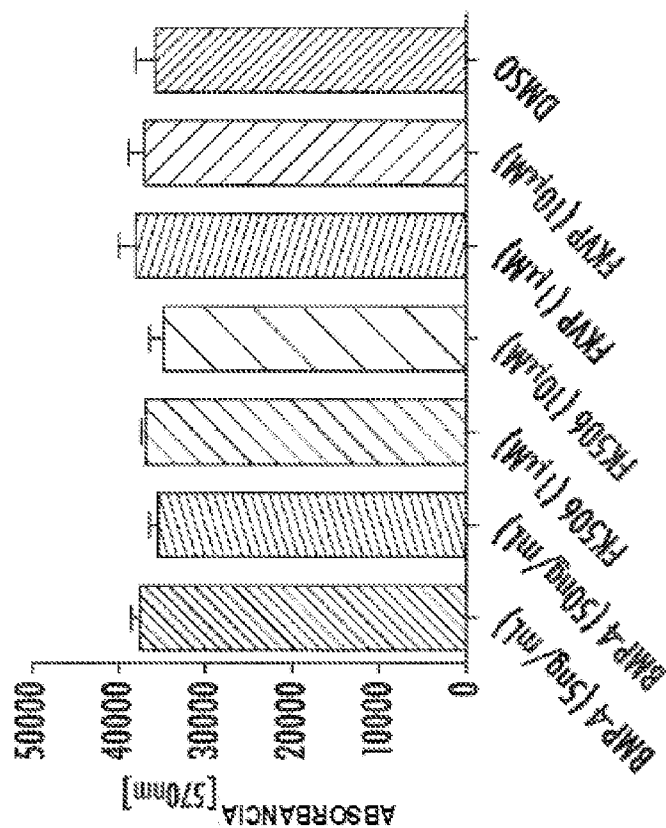


FIG. 7A

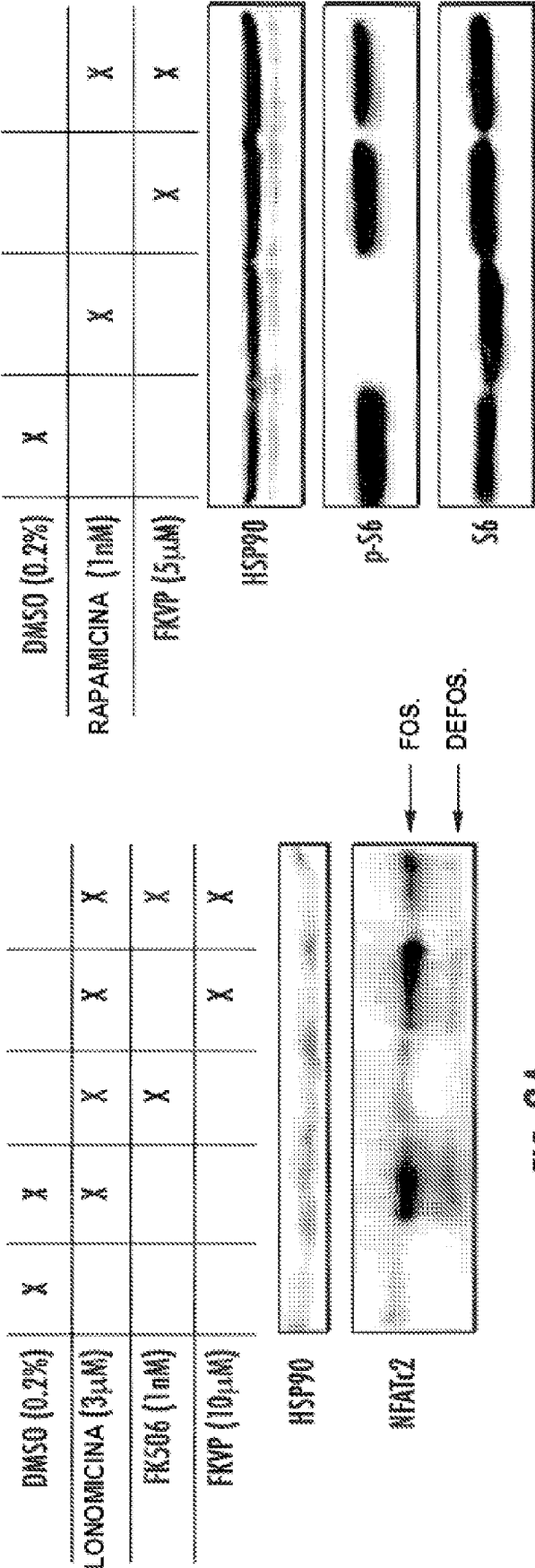


FIG. 8A

FIG. 8B

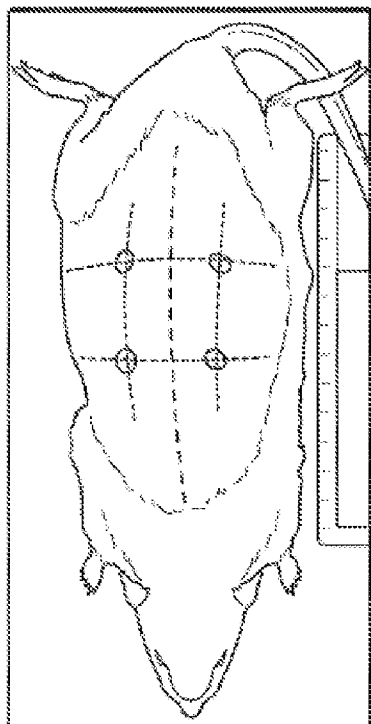


FIG. 9A

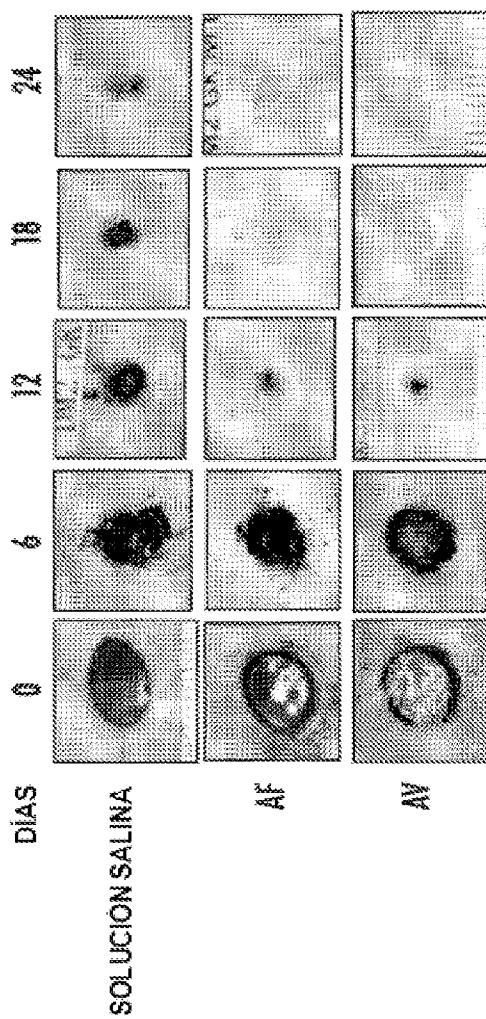


FIG. 9B

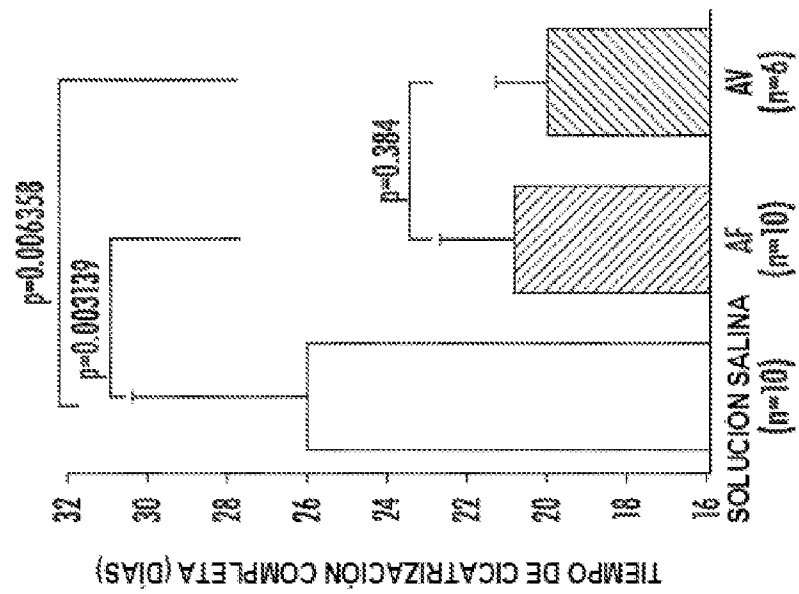
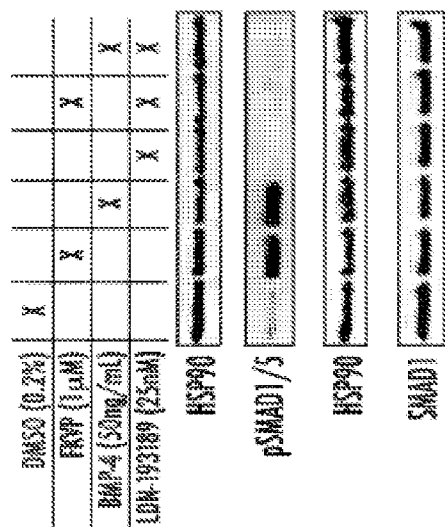
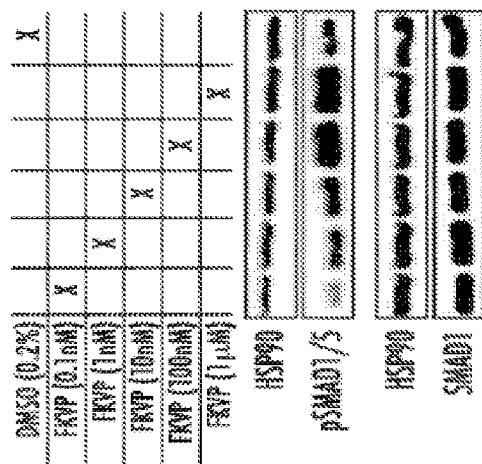
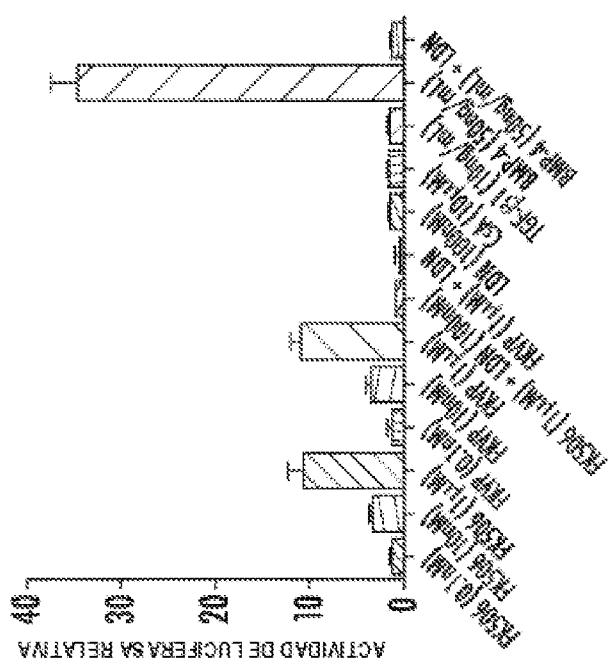


FIG. 9C



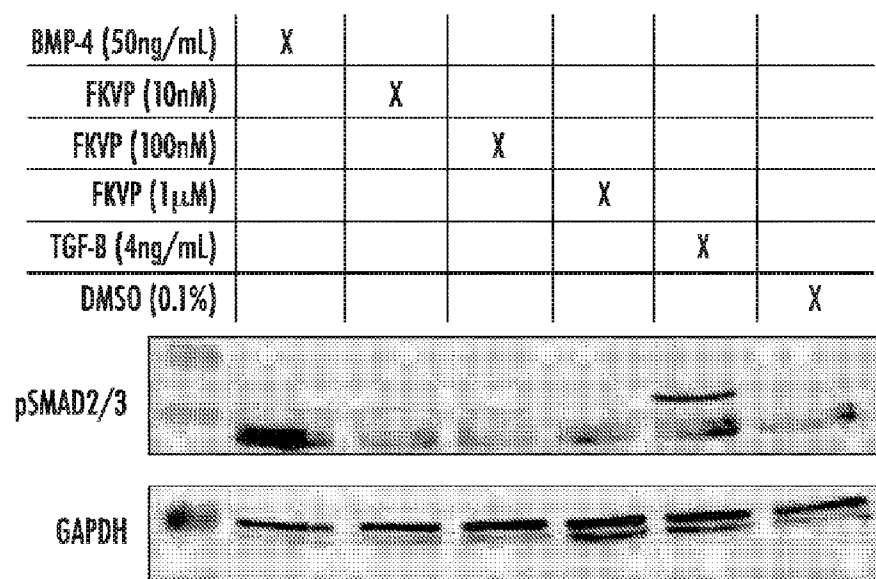


FIG. 11

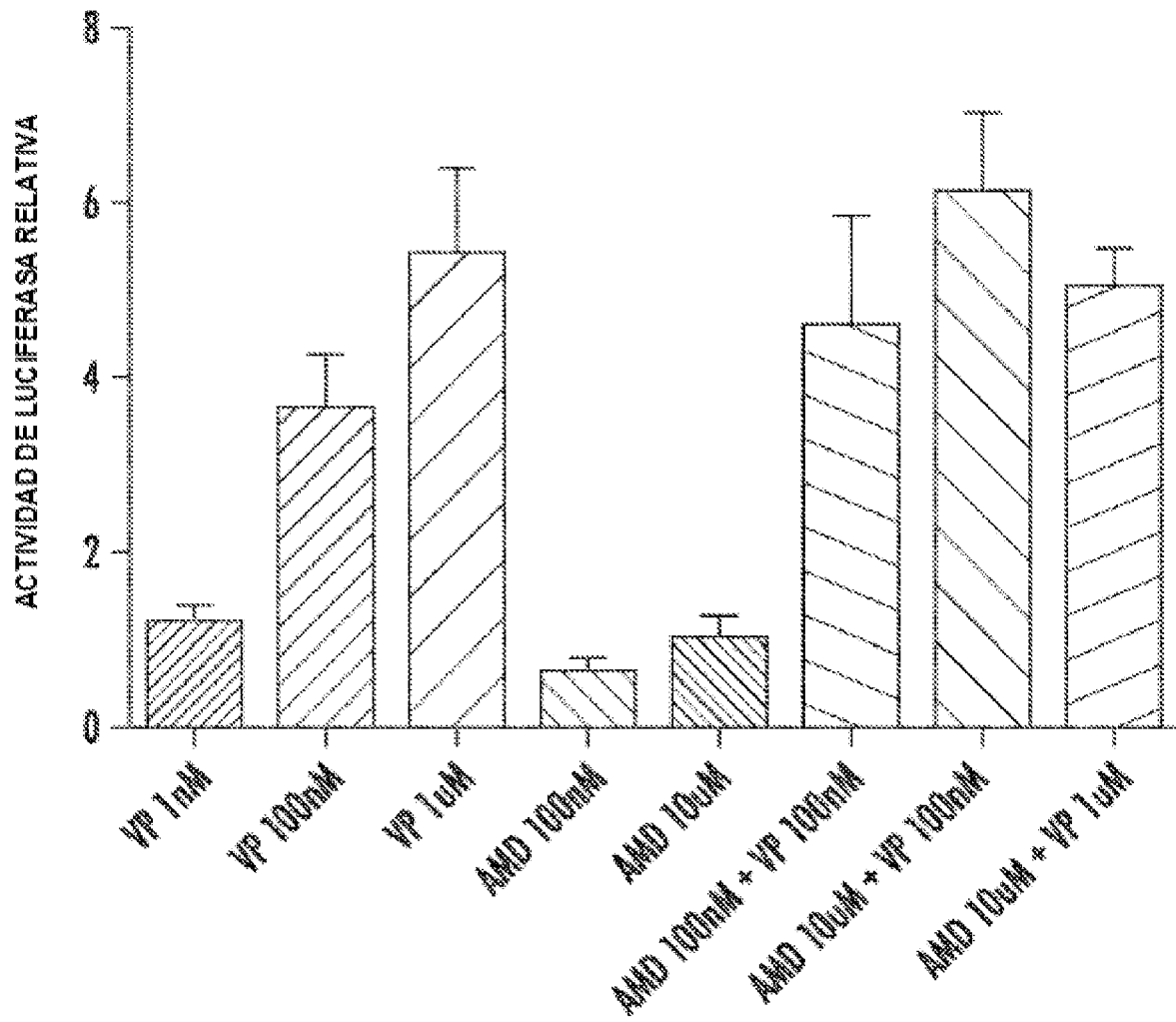
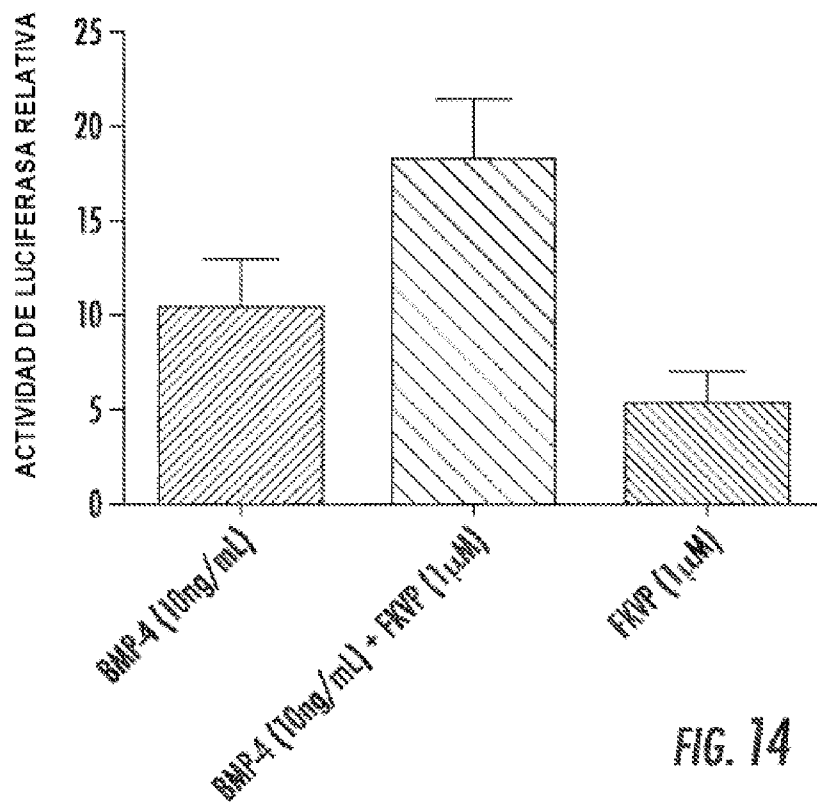
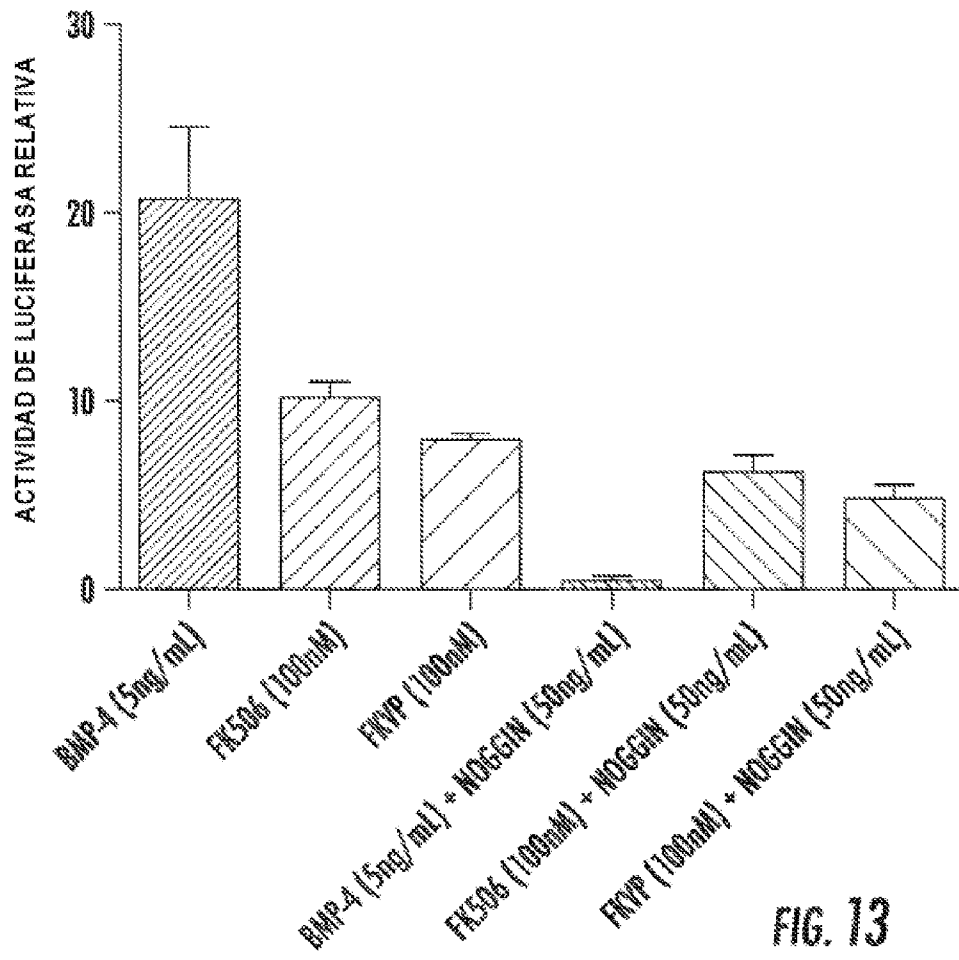
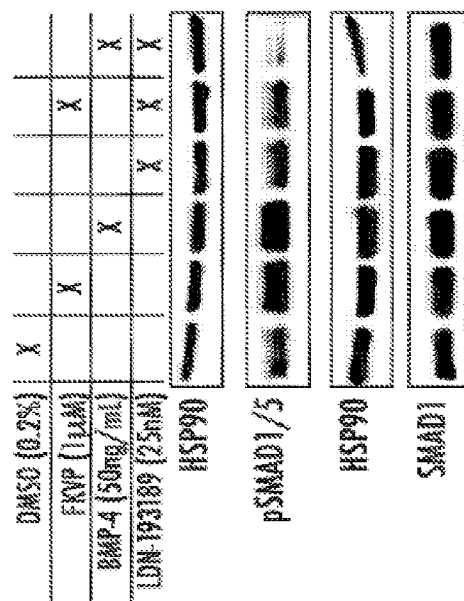
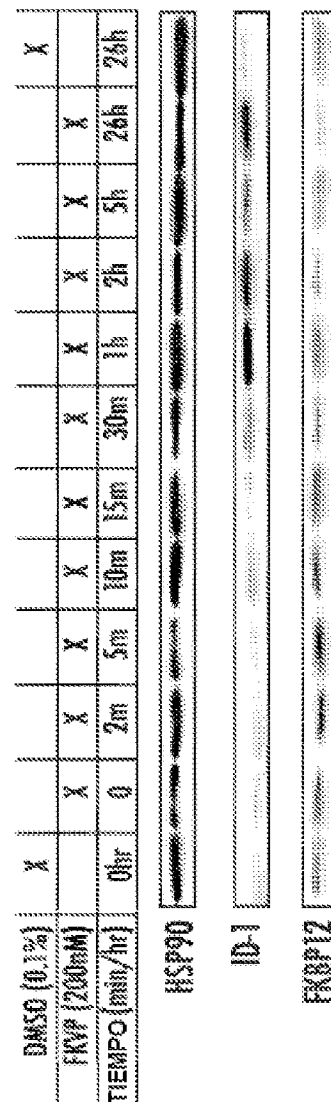
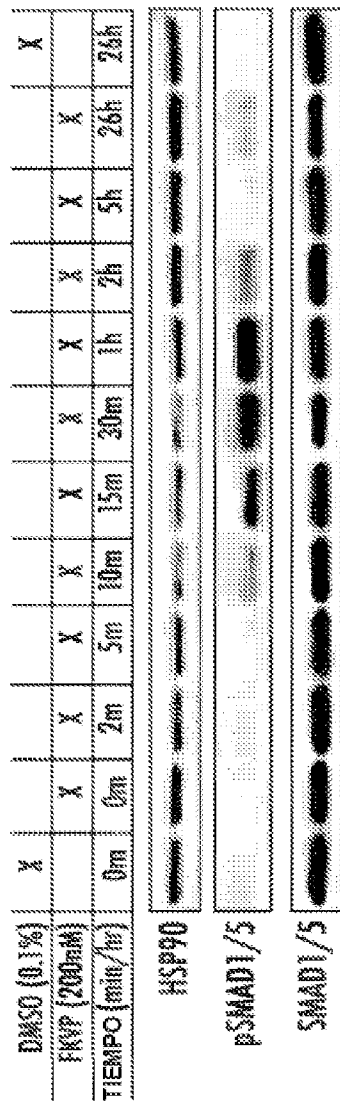


FIG. 12





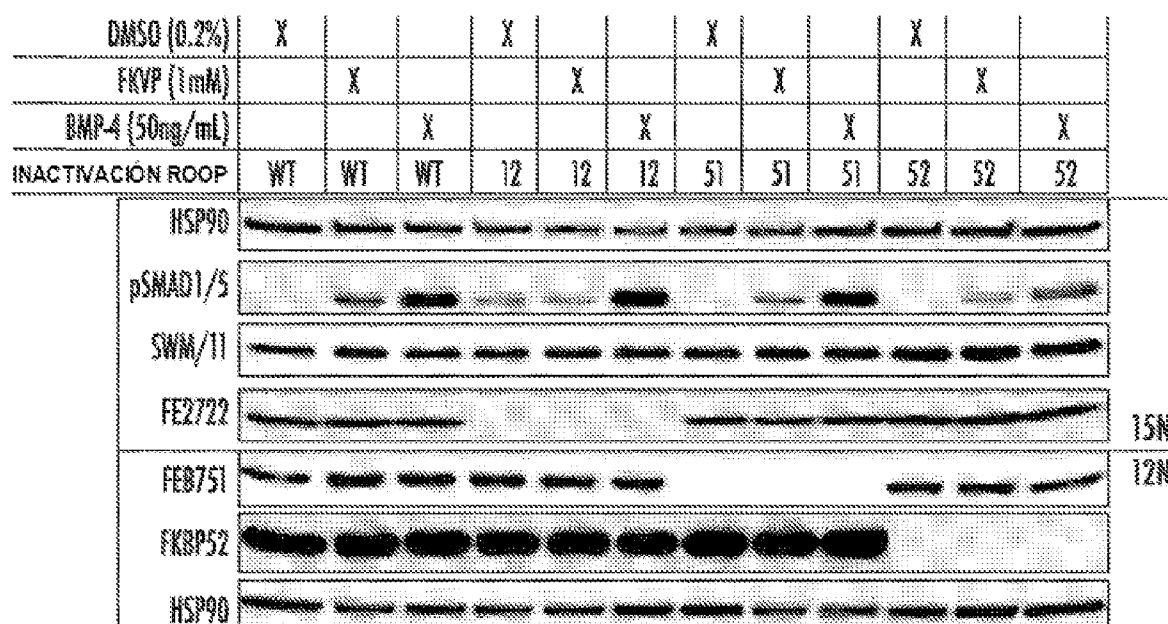


FIG. 16A

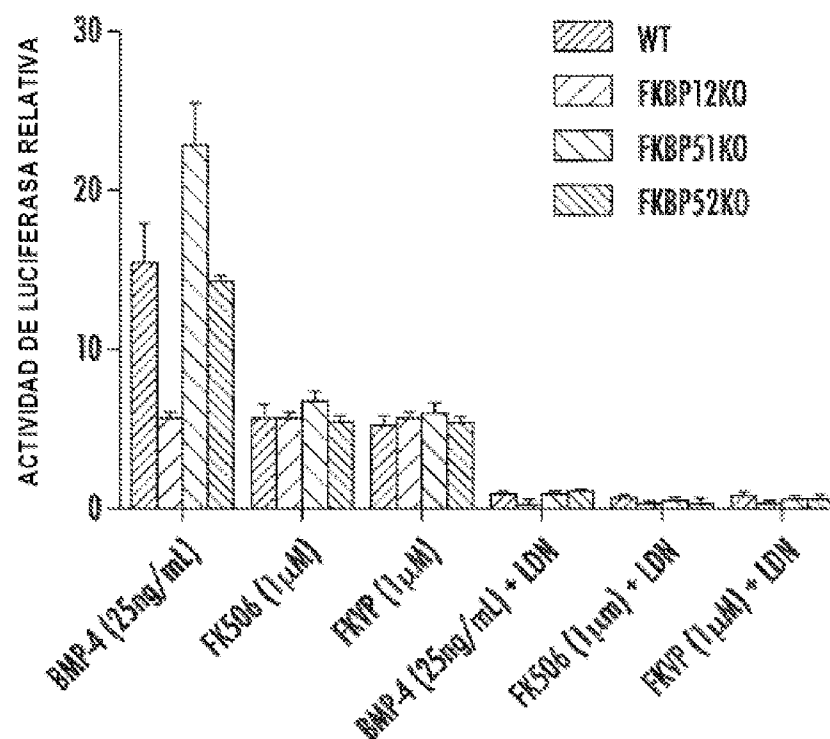
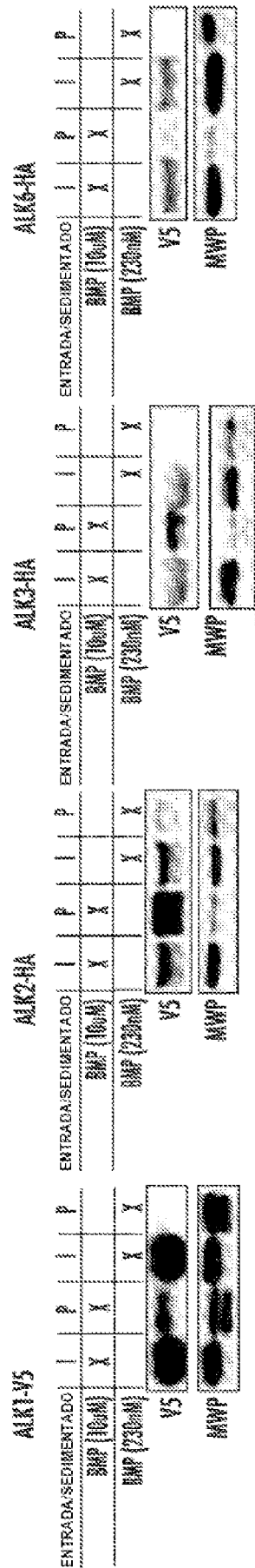
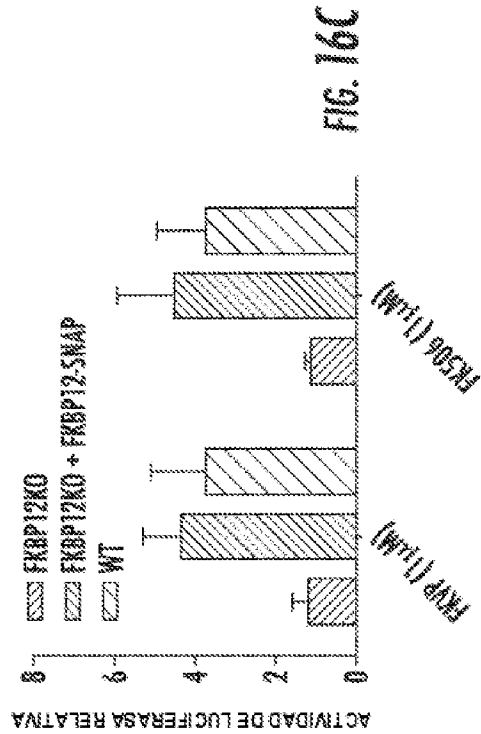


FIG. 16B



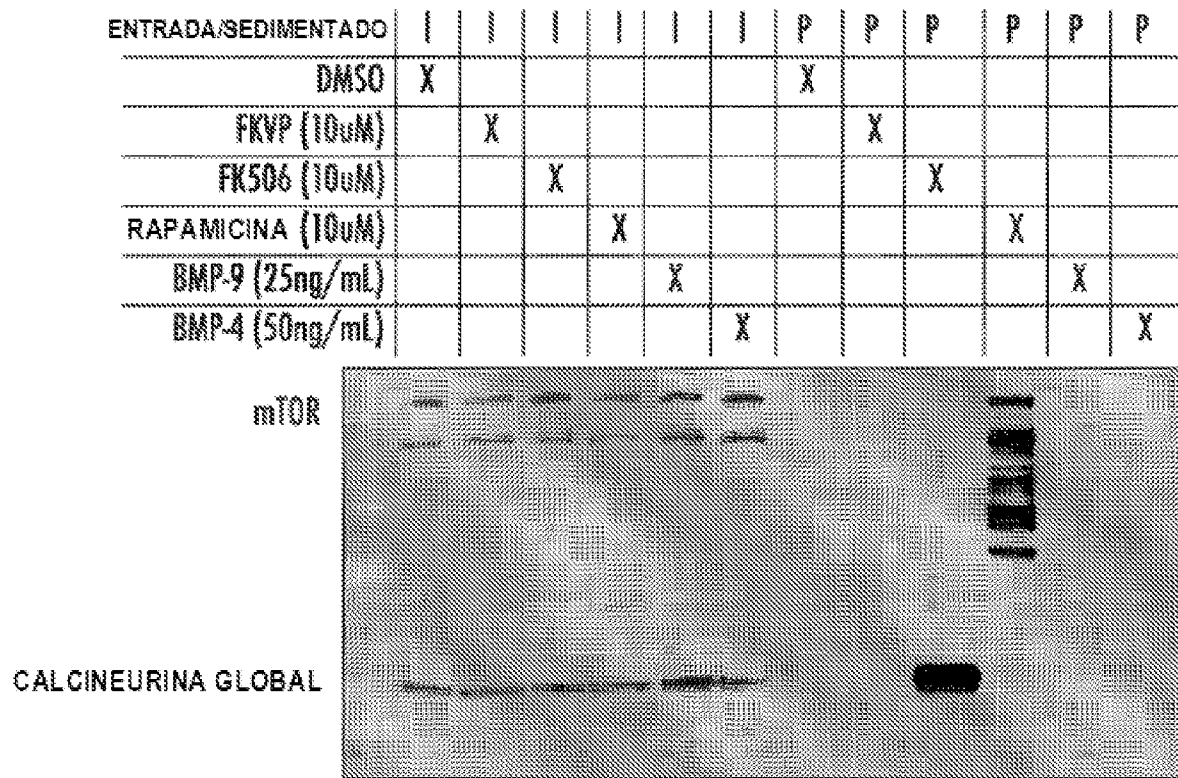


FIG. 17

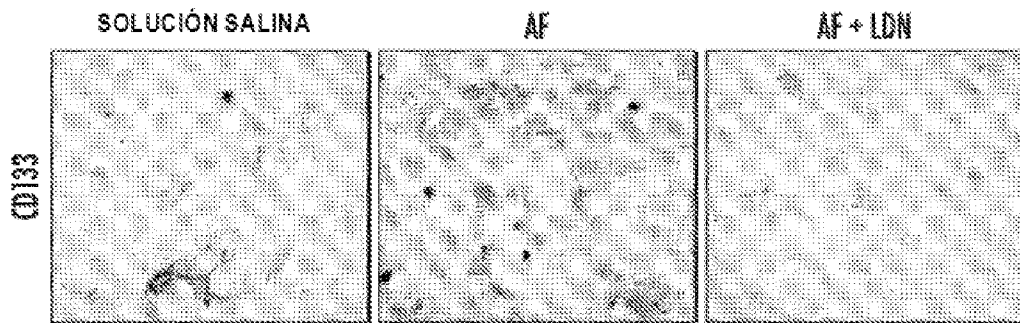
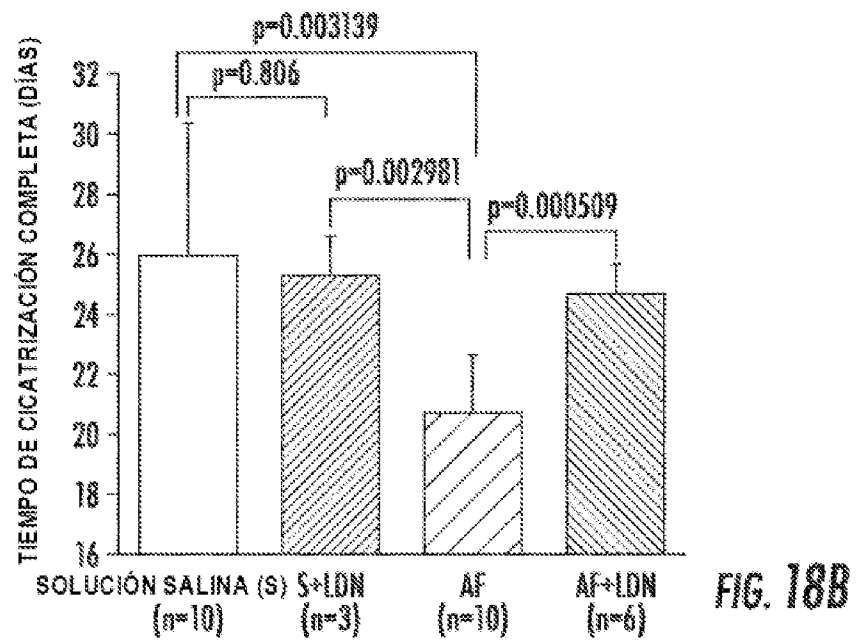
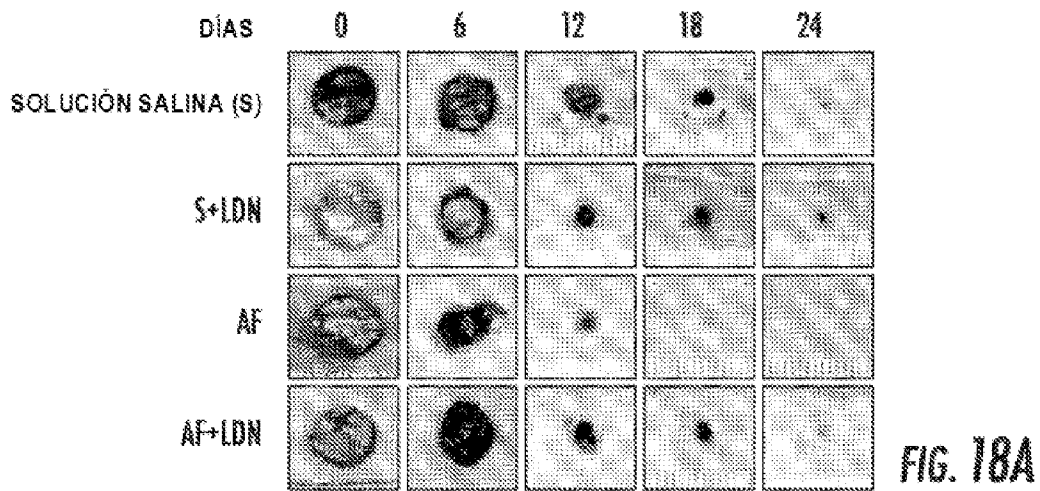


FIG. 18C

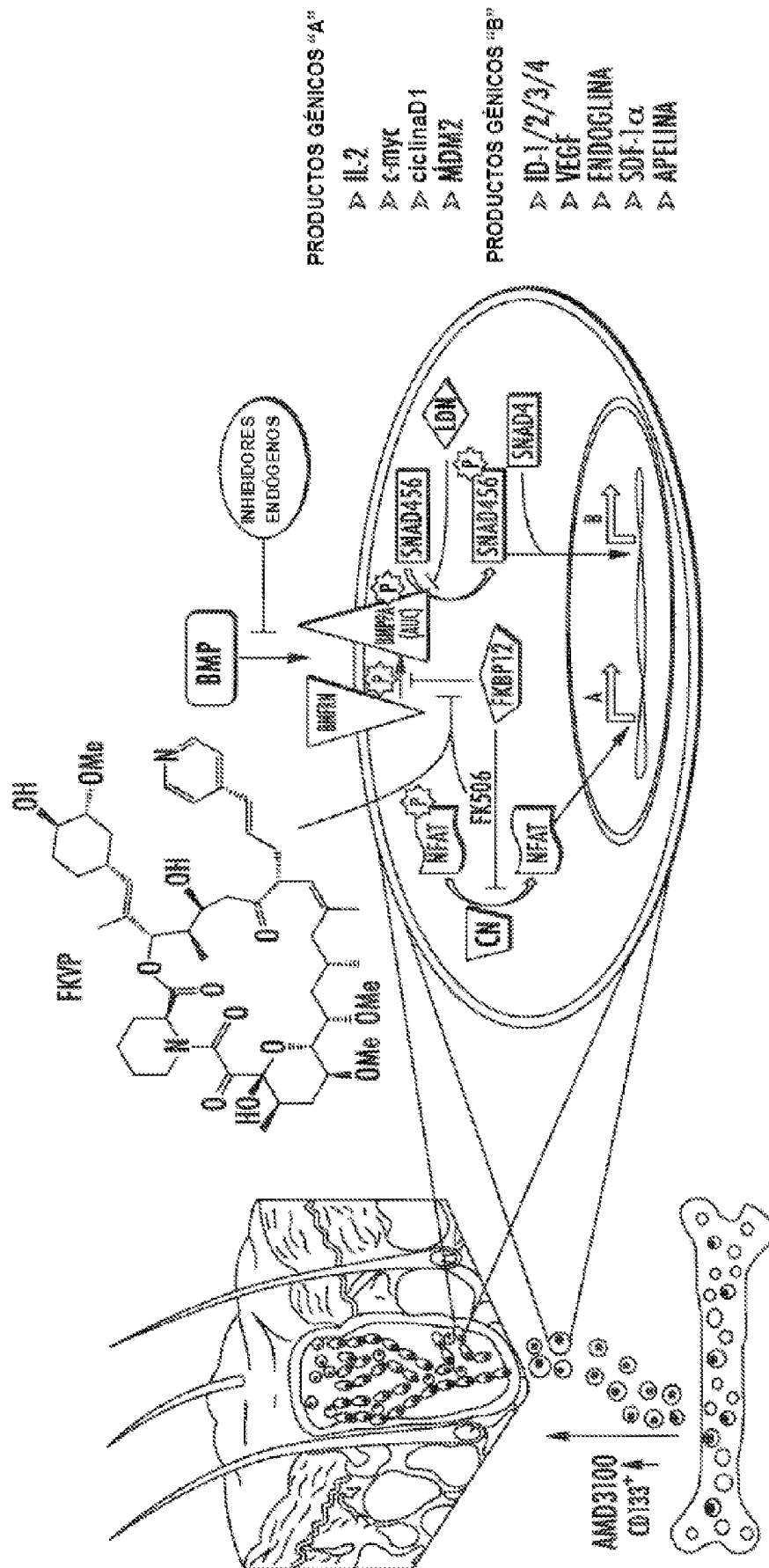


FIG. 19

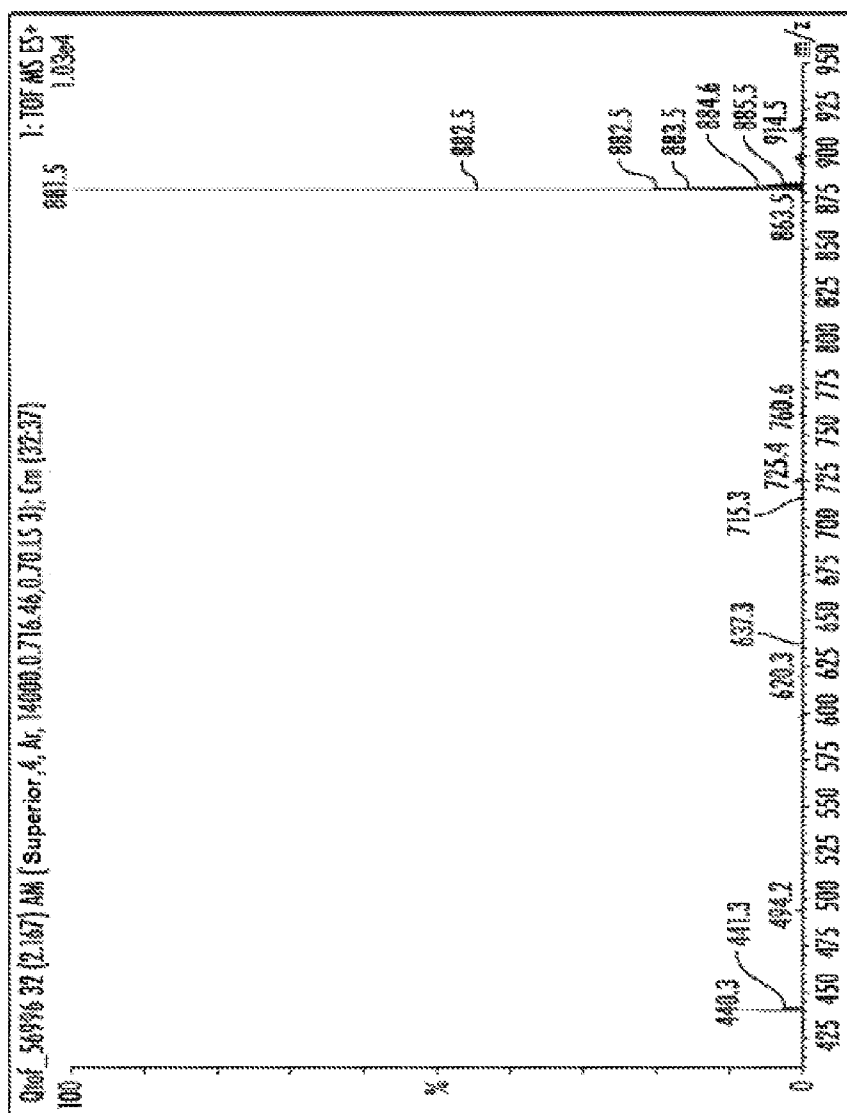


FIG. 20

