

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 907 624**

51 Int. Cl.:

C07D 271/04 (2006.01)
C07D 271/06 (2006.01)
C07D 271/07 (2006.01)
C07D 271/08 (2006.01)
C07D 271/10 (2006.01)
C07D 271/107 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.01.2018** **PCT/US2018/012512**
87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2018** **WO18129274**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2018** **E 18736110 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.09.2021** **EP 3565807**

54 Título: **Inhibidores de oxadiazol de HIPK2 para el tratamiento de la fibrosis renal**

30 Prioridad:

06.01.2017 US 201762443370 P
12.01.2017 US 201762445461 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.04.2022

73 Titular/es:

ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI
(50.0%)
One Gustave L. Levy Place, Box 1675
New York, NY 10029, US y
THE UNIVERSITY OF KANSAS (50.0%)

72 Inventor/es:

HE, JOHN CIJIANG;
LIU, RUIJIE;
DAS, BHASKAR;
XIAO, WENZHEN;
LI, ZHENGZHE y
LEE, KYUNG

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 907 624 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

Inhibidores de oxadiazol de HIPK2 para el tratamiento de la fibrosis renal

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a inhibidores químicos basados en oxadiazol de proteína quinasa 2 que interacciona con homeodominio (HIPK2). Los compuestos que se dan a conocer son útiles en tratamiento de enfermedades renales.

ANTECEDENTES

[0002] La fibrosis se caracteriza por una producción excesiva y la acumulación de proteínas de la matriz extracelular, que provoca la pérdida progresiva de función de tejido y finalmente el fallo orgánico. Las enfermedades renales crónicas, independientemente de la agresión primaria, están acompañadas por fibrosis intersticial renal. La estrategia terapéutica para la enfermedad renal crónica, a efectos de detener la disminución de la función renal, no requiere solamente la eliminación de los factores causales, tales como hiperglucemia, hipertensión e infección por VIH, sino también la terapia antifibrosis para recuperar la estructura y función normales del riñón.

[0003] Se ha identificado que el factor- β 1 de crecimiento transformante (TGF- β 1) es el factor profibrogénico más importante para enfermedad renal. TGF- β 1 se une al receptor de TGF- β de tipo II, permitiendo su dimerización con el receptor de TGF- β de tipo I y permitiendo la fosforilación de Smad2 y Smad3. El Smad3 fosforilado se reubica en los núcleos, uniéndose de este modo a un elemento de unión a Smad en el promotor y activando la transcripción de los genes diana que incluyen genes profibróticos, tales como colágeno I, fibronectina y alfa actina de músculo liso (α -SMA). Se conoce que Smad3 se activa altamente en riñón fibrótico y que la eliminación de Smad3 atenúa la fibrosis renal en modelos animales con enfermedad renal. El bloqueo de la vía TGF- β 1/Smad3 proporciona, por lo tanto, una estrategia terapéutica para fibrosis renal.

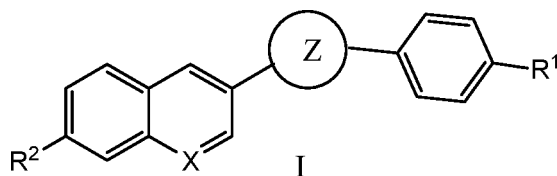
[0004] Cozza et al ((2014) Synthesis and Properties of a Selective Inhibitor of Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2 (HIPK2). PLoS ONE 9(2): e89176.) da a conocer determinados compuestos que son activos como inhibidores contra HIPK2, que son derivados de 2-aril-4,5,6,7-tetrabromoisoindolina-1,3-diona, en particular el derivado 2-(1H-imidazol-2-il) (denominado TBID).

[0005] Narayana et al ((2005) Synthesis of Some New 2-(6-Methoxy-2-Naphthyl)-5-Aryl-1,3,4-Oxadiazoles as Possible Non-steroidal Anti-inflammatory and Analgesic Agents. Arch. Pharm. 338(8) 373-377) da a conocer 2-(6-metoxi-2-naftil)-5-aril-1,3,4-oxadiazoles y demostró actividad analgésica y antiinflamatoria de estos. Nugent et al. ((2015) HIPK2 es una diana para fármacos nuevo para terapia antifibrosis en enfermedad renal. Frontiers in Physiology, 6, XP05715570) da a conocer que HIPK2 es una diana para fármacos para terapia antifibrosis en enfermedad renal.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0006] Ahora se ha descubierto que determinados compuestos descritos a continuación inhiben la activación de Smad3.

[0007] En un aspecto, la invención se refiere a los compuestos de fórmula general I, tal como se define en las reivindicaciones



en la que

Z es en oxadiazol;

X se selecciona de N y CH;

R¹ y R² se seleccionan independientemente de - hidrocarbilo (C₁-C₈), OH, -O-hidrocarbilo (C₁-C₈), halógeno, nitro, alquilamino (C₁-C₃), dialquilamino (C₁-C₃), acilamino (C₁-C₃), alquilsulfonilo (C₁-C₃), alquiltio (C₁-C₃), haloalquilo (C₁-C₃), haloalcoxi (C₁-C₃), haloalquiltio (C₁-C₃), -COOH, -C(=O)O-alquilo (C₁-C₃), -B(OR³)₂, y - BF₃K;

y

R³ es H o hidrocarbilo (C₁-C₈); o (OR³)₂ junto al boro al que se une forma un anillo de dioxaborolano o dioxaborinano sustituido opcionalmente con de uno a cuatro hidrocarbilos (C₁-C₈).

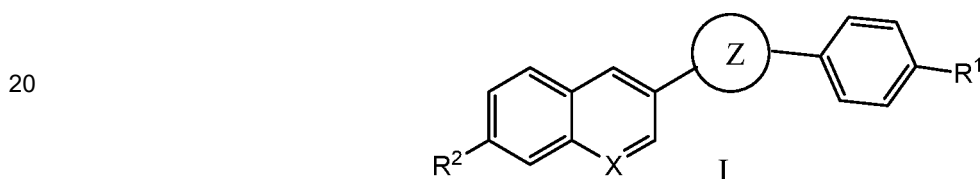
[0008] En otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable y un compuesto de fórmula I.

5 **[0009]** En otro aspecto, la presente invención se refiere a procedimientos *in vitro* para inhibir la interacción de la proteína quinasa 2 que interacciona con homeodominio (HIPK2) con Smad3. El procedimiento comprende poner en contacto HIPK2 con un compuesto de fórmula I.

10 **[0010]** En otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I para su uso en el tratamiento de una enfermedad fibrótica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 **[0011]** En un aspecto, la presente invención se refiere a compuestos que tienen la fórmula general I, tal como se describe anteriormente y se define en las reivindicaciones:



25 **[0012]** En algunas realizaciones de la fórmula I, Z es un [1,2,4]oxadiazol 3,5-disustituido.

[0013] En algunas realizaciones de la fórmula I, R¹ se selecciona de halógeno, -COOH, -C(=O)O-alquilo (C₁-C₃), -B(OR³)₂ y -BF₃K. En algunas realizaciones, R¹ puede ser bromo, COOEt o -BF₃K.

30 **[0014]** En algunas realizaciones de la fórmula I, R² se selecciona de halógeno, haloalquilo (C₁-C₃), -O-alquilo (C₁-C₃), -B(OR³)₂ y -BF₃K. En algunas realizaciones, R² puede ser bromo, OCH₃ o -CF₃.

[0015] En algunas realizaciones de la fórmula I, X es nitrógeno.

35 **[0016]** Por conveniencia y claridad, ciertos términos empleados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones se describen en el presente documento. Los sustituyentes Rⁿ se definen en general cuando introducen y conservan esa definición a lo largo de la memoria descriptiva y en todas las reivindicaciones independientes.

40 **[0017]** A menos que se especifique lo contrario, alquilo (o alquilen) pretende incluir estructuras de hidrocarburo saturado lineal o ramificado y combinaciones de las mismas. Alquilo se refiere a grupos alquilo de desde 1 hasta 20 átomos de carbono, preferiblemente, desde 1 hasta 10 átomos de carbono, más preferiblemente, desde 1 hasta 6 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, s-butilo, t-butilo y similares.

45 **[0018]** Cicloalquilo es un subconjunto de hidrocarburo e incluye grupos de hidrocarburo cíclico desde 3 hasta 8 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen c-propilo, c-butilo, c-pentilo, norbornilo y similares.

50 **[0019]** Hidrocarburo C₁ a C₂₀ incluye alquilo, cicloalquilo, policicloalquilo, alqueno, alquino, arilo y combinaciones de los mismos. Los ejemplos incluyen bencilo, fenetilo, ciclohexilmetilo, adamantilo, alcanforilo y naftiletilo. Hidrocarburo o hidrocarbilo hacen referencia a cualquier sustituyente compuesto por hidrógeno y carbono como los únicos constituyentes elementales. Los hidrocarburos o hidrocarbilos alifáticos son hidrocarburos o hidrocarbilos que no son aromáticos; pueden ser saturados o insaturados, cíclicos, lineales o ramificados. Los ejemplos de hidrocarburos o hidrocarbilos alifáticos incluyen isopropilo, 2-butenilo, 2-butinilo, ciclopentilo, norbornilo, etc. Los hidrocarburos o hidrocarbilos aromáticos incluyen benceno (fenilo), naftaleno (naftilo), antraceno, etc.

55 **[0020]** Hidrocarbilo se refiere a grupos de desde 1 hasta 20 átomos de carbono, preferiblemente, desde 1 hasta 10 átomos de carbono, más preferiblemente, desde 1 hasta 6 átomos de carbono unidos a la estructura original a través de un oxígeno. Alcoxi es un subconjunto de hidrocarbilo y incluye grupos con una configuración lineal o ramificada. Los ejemplos incluyen metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi y similares. Alcoxi inferior hace referencia a grupos que contienen desde uno hasta cuatro carbonos.

60

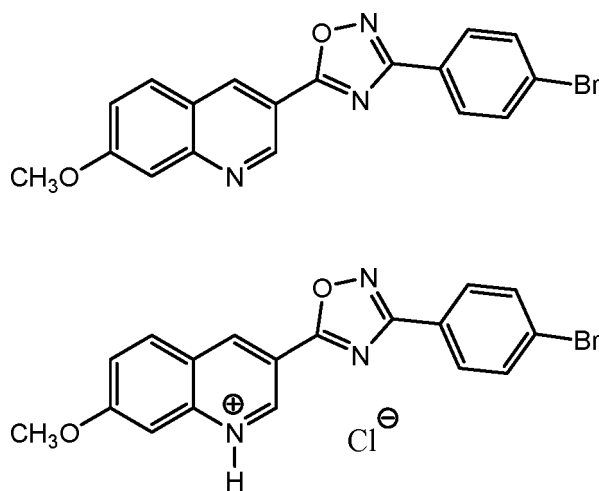
[0021] En algunas realizaciones, 1, 2 o 3 átomos de hidrógeno se reemplazan por un radical específico. En el caso de alquilo o cicloalquilo, pueden reemplazarse más de tres átomos de hidrógeno por flúor; de hecho, todos los átomos de hidrógeno disponibles podrían reemplazarse por flúor. Tales compuestos (por ejemplo, perfluoroalquilo) están dentro de la clase de "halohidrocarburo" y "haloalquilo".

65

[0022] El término "halógeno" significa átomos de flúor, cloro, bromo o yodo.

[0023] A menos que se especifique lo contrario, acilo hace referencia a formilo y a grupos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 átomos de carbono de una configuración lineal, ramificada, cíclica, saturados, insaturados y aromáticos y combinaciones de los mismos, unidos a la estructura original a través de una función de carbonilo. Los ejemplos incluyen acetilo, benzoilo, propionilo, isobutirilo y similares. Acilo inferior hace referencia a grupos que contienen desde uno hasta cuatro carbonos. El oxígeno de doble enlace, cuando se refiere como un sustituyente en sí, se llama "oxo".

[0024] Tal como se utiliza en el presente documento, y tal como lo entendería un experto en la técnica, la expresión de "un compuesto", a menos que se limite adicionalmente de manera expresa, pretende incluir sales de ese compuesto. De este modo, por ejemplo, la frase "un compuesto de fórmula I", tal como se representa anteriormente, en el que X es N, incluiría sales de la quinolina:



[0025] De manera similar, los compuestos que incorporan un sustituyente COOH, incluirían sales en las que el sustituyente es COO⁻ M⁺, en el que M es cualquier contraión, y los compuestos que contienen un sustituyente de amino, NH₂, incluirían también sales en las que el sustituyente es NH₃⁺ X⁻, en el que X es cualquier contraión. En una realización particular, el término "compuesto de fórmula I" hace referencia al compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0026] El término "sal farmacéuticamente aceptable" hace referencia a sales cuyo contraión deriva de ácidos y bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables. Los ácidos farmacéuticamente aceptables adecuados para sales de los compuestos de la presente invención incluyen, por ejemplo, ácido acético, adípico, algínico, ascórbico, aspártico, bencensulfónico (besilato), benzoico, bórico, butírico, alcanfórico, camforsulfónico, carbónico, cítrico, etanodisulfónico, etanosulfónico, etilendiaminotetraacético, fórmico, fumárico, glucoheptónico, glucónico, glutámico, glutámico, hidrobromico, hidrocórico, hidroyódico, hidroxinaftoico, isetiónico, láctico, lactobiónico, laurilsulfónico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, mícico, naftilenosulfónico, nítrico, oleico, pamoico, pantoténico, fosfórico, piválico, poligalacturónico, salicílico, esteárico, succínico, sulfúrico, tánico, ácido tartárico, teoclático, p-toluenosulfónico y similares. Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables adecuadas para los compuestos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, sales metálicas formadas a partir de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y cinc o sales orgánicas formadas a partir de lisina, arginina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina) y procaína. Las sales farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen, cuando sea apropiado, cationes y carboxilato de amonio no tóxicos, aniones de sulfonato y fosfonato unidos a alquilo que tienen desde 1 hasta 20 átomos de carbono.

[0027] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad que, cuando se administra a un sujeto para el tratamiento de un trastorno o una afección, es suficiente para llevar a cabo dicho tratamiento.

[0028] Se reconocerá que los compuestos de la presente invención pueden existir en una forma radiomarcada, es decir, los compuestos pueden contener uno o más átomos que contienen una masa atómica o un número de masa diferente de la masa atómica o el número de masa que se encuentra generalmente en naturaleza. Alternativamente, una pluralidad de moléculas de una estructura única puede incluir como mínimo un átomo que aparece en una relación isotópica que es diferente de la relación isotópica que se encuentra en la naturaleza. Los radioisótopos de hidrógeno, carbono, fósforo, flúor, cloro y yodo incluyen ²H, ³H, ¹¹C, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ¹⁸F, ³⁶Cl ¹²⁵I, ¹²⁴I y ¹³¹I respectivamente. Los compuestos que contienen aquellos radioisótopos y/u otros radioisótopos de otros átomos se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los radioisótopos tritiados, es decir, ³H, y carbono-14, es decir, ¹⁴C, son particularmente preferidos por su facilidad en preparación y capacidad de detección. Los compuestos que contienen

isótopos ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{124}I y ^{18}F son adecuados para la tomografía de emisión de positrones. Los compuestos radiomarcados de fórmula I de la presente invención y profármacos de los mismos pueden prepararse generalmente utilizando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. De manera conveniente, dichos compuestos radiomarcados pueden prepararse llevando a cabo procedimientos dados a conocer en los Ejemplos y los Esquemas mediante sustitución de un reactivo radiomarcado fácilmente disponible por un reactivo no radiomarcado.

[0029] Los expertos en la técnica comprenderán fácilmente que los compuestos descritos en el presente documento, cuando se marcan adecuadamente tal como se describe anteriormente, pueden utilizarse en un procedimiento de identificación (es decir, marcaje) de HIPK2. Utilizando los procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, se puede localizar HIPK2 en tejidos, células y orgánulos.

[0030] Mientras sea posible que los compuestos de fórmula I sean administrados como las sustancias químicas sin procesar, es preferible presentarlos como una composición farmacéutica. De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula I, conjuntamente con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables del mismo y, opcionalmente, uno o más de otros ingredientes terapéuticos. El portador o portadores deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con otros ingredientes de la formulación y no dañinos para el receptor de los mismos.

[0031] Las formulaciones incluyen aquellos adecuados para la administración oral, parenteral (que incluye subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa e intraarticular), rectal y tópica (que incluye dérmica, bucal, sublingual e intraocular). Los compuestos se administran preferiblemente por la vía oral o mediante inyección (intravenosa o subcutánea). La cantidad exacta del compuesto administrado a un paciente será responsabilidad del médico. Sin embargo, la dosis empleada dependerá de un número de factores, que incluyen la edad y el sexo del paciente, el trastorno exacto que se trata y su gravedad. También, la vía de administración puede variar dependiendo de la afección y de su gravedad. Las formulaciones pueden presentarse de manera conveniente en formas de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica farmacéutica. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el principio activo con portadores líquidos o portadores sólidos divididos finamente o ambos, y, a continuación, si es necesario, conformando el producto en la formulación deseada.

[0032] Las formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración oral pueden presentarse como unidades discretas, tales como cápsulas, píldoras o comprimidos, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del principio activo; tal como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también puede estar presente como un bolo, electuario o pasta.

[0033] Se debe entender que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica en consideración con el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, aquellos adecuados para la administración oral pueden incluir agentes saborizantes.

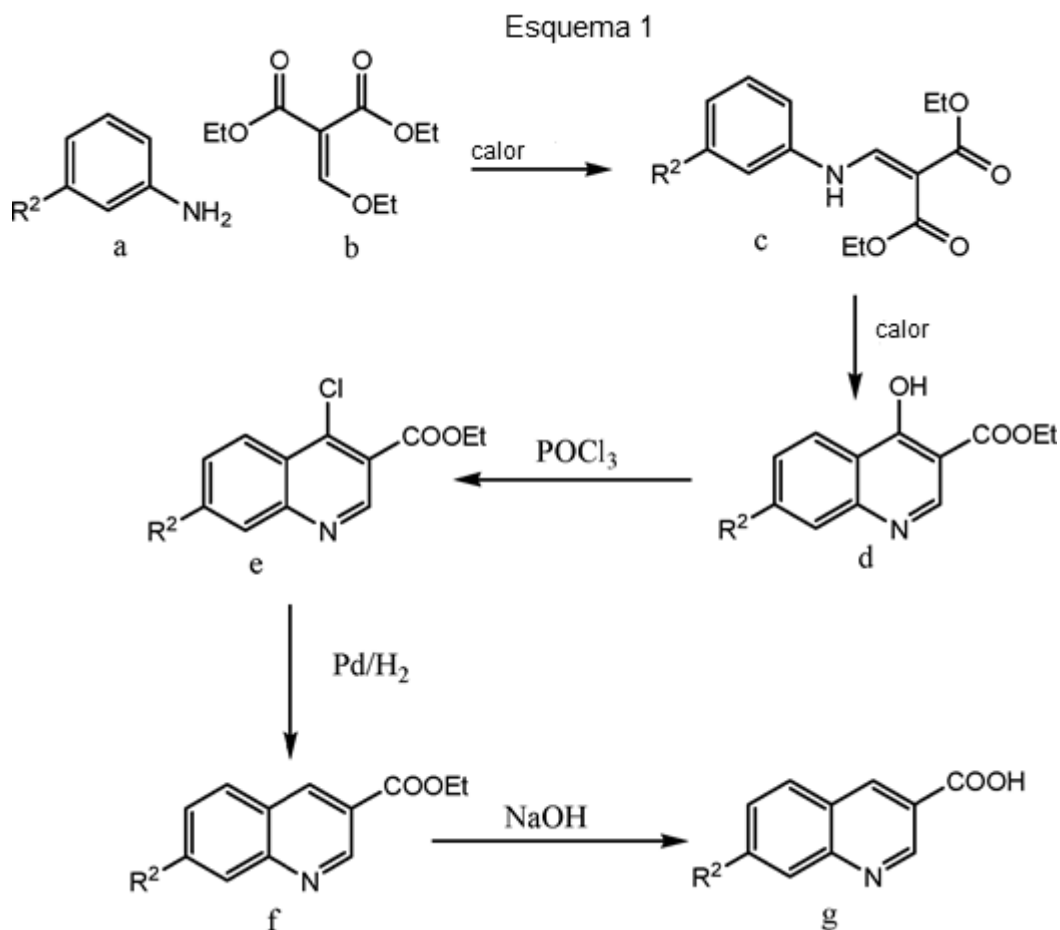
[0034] Tal como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" o "paliar" o "mejorar" se utilizan de forma intercambiable en el presente documento. Estos términos se refieren a un enfoque para obtener un beneficio terapéutico en forma de eliminación o mejoría del trastorno subyacente que se está tratando. También, se logra un beneficio terapéutico con la eliminación o la mejoría de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con el trastorno subyacente, de tal modo que se observa una mejoría en el paciente, a pesar de que el paciente puede estar todavía aquejado por el trastorno subyacente. Las composiciones pueden administrarse a un paciente en riesgo de desarrollar una enfermedad particular o a un paciente que presenta uno o más de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, a pesar de que puede no haberse hecho aún un diagnóstico de esta enfermedad.

[0035] La terminología relacionada con funcionalidades de "proteger", "desproteger" y "protegido" puede aparecer en esta solicitud. Tal terminología se entiende bien por los expertos en la técnica y se utiliza en el contexto de procesos que implican un tratamiento secuencial con una serie de reactivos. En ese contexto, un grupo protector hace referencia a un grupo que se utiliza para enmascarar una funcionalidad durante una etapa de proceso en la que, de otro modo, reaccionaría, pero en la que la reacción es indeseable. El grupo protector impide la reacción durante aquella etapa, pero puede eliminarse posteriormente para exponer la funcionalidad original. La eliminación o "desprotección" tiene lugar después de la finalización de la reacción o las reacciones en las que la funcionalidad interferiría. Por consiguiente, cuando se especifica una secuencia de reactivo, como en los procesos descritos en el presente documento, el experto puede prever fácilmente los grupos que serían adecuados como "grupos protectores". Los grupos adecuados para tal fin se tratan en manuales estándares en el campo químico, tales como Protective Groups in Organic Synthesis por T.W. Greene [John Wiley & Sons, Nueva York, 1991].

[0036] Una lista completa de abreviaturas utilizadas por químicos orgánicos aparece en el primer tema de cada volumen del Journal of Organic Chemistry. La lista, que se expone típicamente como una tabla titulada «Lista Estándar de Abreviaturas».

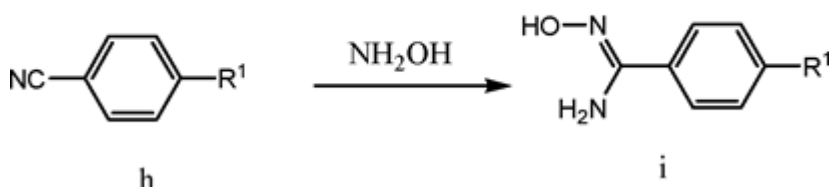
[0037] En general, los compuestos de la presente invención pueden prepararse mediante los procedimientos expuestos en el esquema de reacción general como, por ejemplo, descritos a continuación, o mediante modificaciones de los mismos, utilizando materiales de partida fácilmente disponibles, reactivos y procedimientos de síntesis convencionales. En estas reacciones, también es posible utilizar variantes que son conocidos por sí mismos, pero no se mencionan en el presente documento. Los materiales de partida están disponibles comercialmente, son sintetizados, tal como se describe en los ejemplos, o pueden obtenerse mediante los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

[0038] Los ácidos carboxílicos de quinolina apropiados, que son los bloques de construcción para una parte de la molécula, pueden sintetizarse a partir de las anilinas correspondientes mediante la ruta mostrada en el Esquema 1



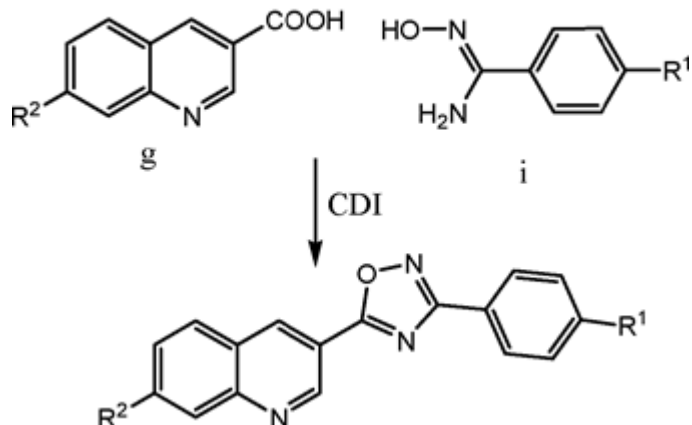
[0039] Las amidoximas adecuadas, que son los bloques de construcción para otra parte de la molécula, pueden sintetizarse a partir de los nitrilos correspondientes mediante el procedimiento del Esquema 2:

Esquema 2



[0040] Los ácidos carboxílicos de quinolina g reaccionan, a continuación, con las amidoximas i en presencia de carbonil diimidazol (CDI) para proporcionar los [1,2,4]oxadiazoles, tal como se muestra en el Esquema 3:

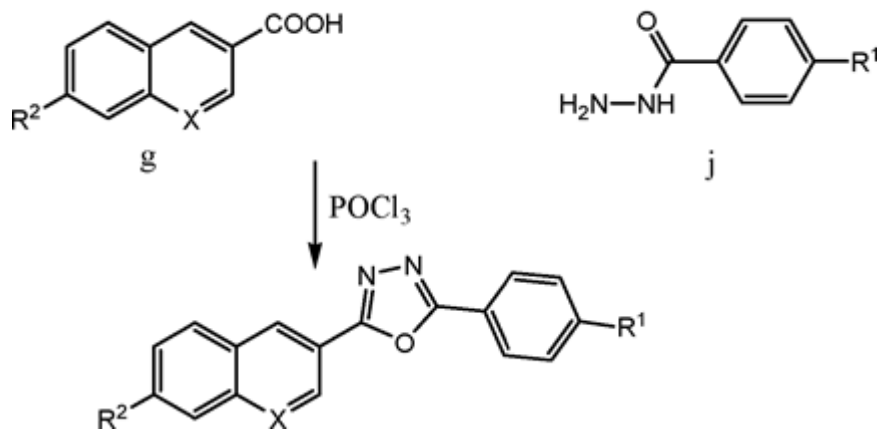
Esquema 3



[0041] Los oxadiazoles de fórmula I en la que X es CH pueden formarse de una manera similar a partir de los ácidos naftalenocarboxílicos correspondientes.

[0042] Se conocen bien varios procedimientos para la síntesis de 1,3,4-oxadiazoles. La ruta de síntesis utilizada de manera común para 1,3,4-oxadiazoles incluye reacciones de hidrazidas de ácido (o hidrazina) con cloruros de ácido/ ácidos carboxílicos y ciclación directa de diacilhidrazinas utilizando una variedad de agentes deshidratantes, tales como oxiclورو de fósforo, cloruro de tionilo, pentaóxido de fósforo, anhídrido trifílico o ácido polifosfórico.

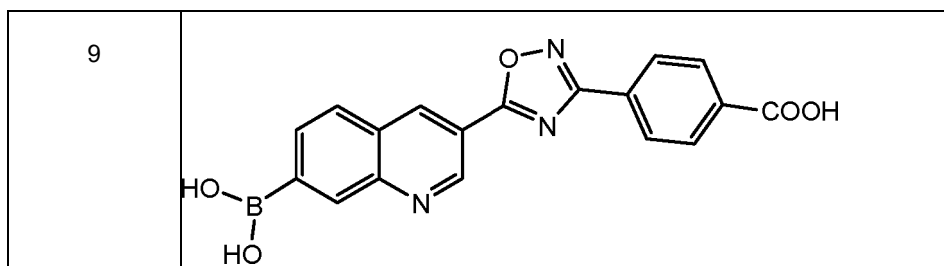
Esquema 4



[0043] Los ejemplos específicos de compuestos de la presente invención formados a través de los esquemas anteriores incluyen:

Ejemplo #	Estructura
1	

2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	



[0044] Síntesis representativas a continuación:

5 Ejemplo 1. 3-(4-Bromofenil)-5-(7-metoxiquinolin-3-il)-1,2,4-oxadiazol

[0045]

2-(((3-Metoxifenil)amino)metileno)malonato de dietilo

10 Se mezclaron *m*-anisidina (3,5 g, 0,028 mol, 3,18 ml) y etoximetileno malonato de dietilo (7,4 g, 6,915 ml, 0,034 mol) y se calentaron hasta 130 °C durante 1 hora. El enfriamiento hasta la temperatura ambiente dio como resultado un aceite amarillo que se colocó en un baño de hielo colocado en una nevera durante 2 horas. El sólido que se formó se cristalizó con hexano para producir un producto (5,2 g, 62,5%) como un sólido blanco plumoso. δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 1,30 (3H, t, $J = 8,0$ Hz), 1,35 (3H, t, $J = 8,0$ Hz), 3,82 (3H, s), 4,23 (2H, q, $J = 8,0$ Hz), 4,28 (2H, q, $J = 8,0$ Hz), 6,65 (1H, t, $J = 4,0$ Hz), 6,72 (2H, m), 7,27 (1H, q, $J = 8,0$ Hz), 8,50 (1H, d, $J = 12,0$ Hz, H-7), 10,97 (1H, d, $J = 12,0$ Hz).

4-hidroxi-7-metoxiquinolona-3-carboxilato de etilo

20 Se añadió 2-(((3-Metoxifenil)amino)metileno)malonato de dietilo (1,48 g, 5,05 mmol) a fenil éter (10 ml) que estaba ya a reflujo (265 °C). La mezcla se dejó a reflujo durante 1 hora y, a continuación, se enfrió hasta la temperatura ambiente. El sólido que se formó se filtró y se lavó minuciosamente con hexano para producir un producto (0,7 g, 57%) como un polvo blanco. δ_H (400 MHz; d -DMSO) 1,29 (3H, t, $J = 8,0$ Hz), 3,86 (3H, s), 4,20 (2H, q, $J = 8,0$ Hz), 7,01 (2H, m), 8,05 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 8,49 (1H, s), 12,11 (1H, br, s).

4-cloro-7-metoxiquinolona-3-carboxilato de etilo

25 Se añadió 4-hidroxi-7-metoxiquinolona-3-carboxilato de etilo (0,68 g, 2,75 mmol) a oxiclورو de fósforo (2 ml) y se calentó a 140 °C durante una hora. A continuación, la mezcla se vertió en hielo, se neutralizó con NaOH 1 M dando como resultado un sólido que se filtró, se lavó con agua y se secó para producir un producto (0,50 g, 68 %) como un sólido amarillento. δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 1,46 (3H, t, $J = 4,0$ Hz), 3,99 (3H, s), 4,48 (2H, q, $J = 8,0$ Hz), 7,33 (1H, m), 7,44 (1H, d, $J = 2,8$ Hz), 8,30 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 9,17 (1H, s). δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 14,2, 55,8, 61,8, 107,6, 120,7, 121,5, 126,7, 143,4, 150,9, 151,7.

Clorhidrato de 7-metoxiquinolona-3-carboxilato de etilo

35 A una suspensión agitada de 4-cloro-7-metoxiquinolona-3-carboxilato de etilo (1,99 mmol, 0,5 g) en EtOH (5 ml) bajo atmósfera inerte se añadió $Pd(OH)_2$ al 10 % (0,05 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo H_2 durante 2 horas. La mezcla se filtró y el disolvente se evaporó al vacío para producir el producto (0,41 g, 82%). δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 1,47 (3H, t, $J = 4,0$ Hz), 4,1 (3H, s), 4,53 (2H, br q), 7,47 (1H, br d), 8,01 (2H, br s), 9,13 (1H, s), 9,46 (1H, br s).

Ácido 7-metoxiquinolona-3-carboxílico

40 Se hidrolizó clorhidrato de 7-metoxiquinolona-3-carboxilato de etilo (1,5 g, 5,5 mmol) en 10 ml de EtOH e hidróxido de sodio 2 M. La mezcla de reacción se agitó durante la noche. Después de concentrarse al vacío, la mezcla se acidificó con HCl 1 M. El sólido resultante se filtró, se lavó con agua y se secó para obtener un sólido beige (1,05 g, 89 %), se obtuvo como un sólido blanco. δ_H (400 MHz; d -DMSO) 3,97 (3H, s), 7,35 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 7,47 (1H, s), 8,10 (1H, d, $J = 12,0$ Hz), 8,87 (1H, s), 9,24 (1H, s). δ_C (100 MHz; d -DMSO) 55,7, 107,2, 120,1, 121,6, 121,8, 130,6, 137,8, 150,2, 151,0, 162,0, 166,5.

45 Se disolvieron 3-(4-bromofenil)-5-(7-metoxiquinolin-3-il)-1,2,4-oxadiazol (Ejemplo 1), ácido 7-metoxiquinolona-3-carboxílico (2,0 mmol, 0,4 g) y CDI (2,4 mmol, 0,39 g) en 18 ml de DMF y se agitaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió (*E*)-4-bromo-*N*'-hidroxibenzimidamida (2,4 mmol, 0,54 g) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 24 h. La mezcla se vertió en agua (40 ml), se extrajo con EtOAc (3x 20 ml) y la capa combinada se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice para proporcionar el producto de oxadiazol como un sólido blanco (0,3 g). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): 9,57 (1H, s), 8,89 (1H, s), 8,09 (2H, d, $J = 8$ Hz), 7,87 (1H, d, $J = 12$ Hz), 7,68 (2H, d, $J = 8$ Hz), 7,51 (1H, s), 7,33 (1H, dd, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 4$ Hz), 4,01 (3H, s). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$): 174,4, 168,3, 162,9, 151,7, 148,6, 135,9, 129,9, 129,0, 125,6, 122,1, 121,4, 115,3, 107,7, 55,8.

55 Ejemplo 3. 5-(7-metoxiquinolin-3-il)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)-1,2,4-oxadiazol

[0046] El compuesto del Ejemplo 1 (0,52 mmol, 0,2 g) conjuntamente con B_2Pin_2 (1,15 mmol, 0,292 g), AcOK (2,6 mmol, 0,254 g), $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (0,052 mmol, 0,0365 g) y 1,4-dioxano (10 ml) se añadieron a un matraz de fondo redondo de 25 ml bajo N_2 . La mezcla resultante se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, la mezcla resultante se agitó a 80 °C durante 2 días. La mezcla se diluyó con agua (30 ml), se extrajo utilizando acetato de etilo (3 x30 ml). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró al vacío. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice para proporcionar el producto de dioxaborolano (0,1 g). 1H RMN (400 MHz; $CDCl_3$): 9,60 (1H, d, $J = 4,0$ Hz), 8,92 (1H, d, $J = 4,0$ Hz), 8,21 (2H, d, $J = 12,0$ Hz), 7,97 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), 7,88 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 7,52 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 7,32 (1H, dd, $J_1 = 8,0$ Hz, $J_2 = 4,0$ Hz), 4,02 (3H, s), 1,38 (12H, s).

Ejemplos 5, 6, 8 y 9

[0047] Se añadió dihidrato de cloruro de estaño (II) (9,026 g, 40,0 mmol) a una solución de 4-bromo-2-nitrobenzaldehído (2,3 g, 10,0 mmol) y EtOH (40 ml), seguido de éster etílico de ácido 3,3-dietoxipropionico (4,75 g, 25,0 mmol). La reacción se calentó hasta 90 °C durante 4 horas después del enfriamiento, la mezcla de reacción se concentró y el residuo se disolvió en EtOAc y se detuvo con una solución saturada de $NaHCO_3$. La emulsión resultante se filtró a través de una almohadilla de celite y se enjuagó bien con EtOAc. La capa acuosa restante se extrajo con EtOAc y la capa orgánica combinada se lavó con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice con 10-30 % de EtOAc en hexanos para proporcionar 7-bromoquinolina-3-carboxilato de etilo (0,6 g, 21,5%). δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 1,47 (3H, t, $J = 8,0$ Hz), 4,50 (2H, q, $J = 8,0$ Hz), 7,72 (1H, t, $J = 4,0$ Hz), 7,80 (1H, s), 8,36 (1H, s), 8,82 (1H, s), 9,45 (1H, s). δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 14,3, 61,7, 123,5, 125,4, 126,3, 130,2, 131,1, 138,5, 150,2, 151,0, 165,0.

[0048] Se añadieron 7-bromoquinolina-3-carboxilato de etilo (0,526 g, 1,88 mmol), LiOH (0,45 g, 18,8 mmol) a un matraz con fondo redondo de 25 ml. Se añadió un disolvente mixto de THF/ H_2O (2:1, 10 ml de THF, 5 ml de H_2O) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después se acidificó con HCl 2 M. El precipitado se filtró y se secó para producir ácido 7-bromoquinolina-3-carboxílico (0,45 g, 95 %). δ_H (400 MHz; d_6 -DMSO) 7,86, 7,88 (1H, dd, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz), 8,18 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 8,32 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 9,01 (1H, d, $J = 4,0$ Hz), 9,31 (1H, d, $J = 4,0$ Hz). δ_C (100 MHz; d_6 -DMSO) 124,5, 125,9, 131,1, 131,9, 139,1, 150,0, 151,4, 166,5.

[0049] Se disolvieron ácido 7-bromoquinolina-3-carboxílico (0,252g, 1,0 mmol) y CDI (0,204 g, 1,2 mmol) en 10 ml de DMF y se agitaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió 4-(amino(hidroxiamino)metil)benzoato de etilo (0,2496 g, 1,2 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante aproximadamente 24 horas. La mezcla se vertió en agua (30 ml) y se extrajo con EtOAc (3x10 ml) y la capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó mediante gel de sílice para proporcionar 4-(5-(7-bromoquinolin-3-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il)benzoato de etilo (**Ejemplo 5**) (0,35 g, 83 %). δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 1,44 (3H, t, $J = 4,0$ Hz), 4,44 (2H, q, $J = 8,0$ Hz), 7,79 (1H, dd, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz), 7,89 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 8,20 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), 8,29 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), 8,41 (1H, d, $J = 4,0$ Hz), 9,0 (1H, d, $J = 4,0$ Hz), 9,67 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 14,3, 61,4, 117,7, 125,5, 127,5, 130,1, 131,8, 136,3, 149,2, 150,0, 165,9, 168,6, 173,9, 176,1.

[0050] Se añadieron 4-(5-(7-bromoquinolin-3-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il)benzoato de etilo (**5**) (0,212 g, 0,5 mmol) conjuntamente con B_2Pin_2 (0,254 g, 1,0 mmol), AcOK (0,245 g, 2,5 mmol), $Pd(dppf)Cl_2$ (0,037 g, 0,05 mmol) y 1,4-dioxano (10 ml) a un matraz con fondo redondo de 25 ml bajo N_2 . La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, a continuación, se calentó a 90 °C durante aproximadamente 24 horas bajo N_2 . Después de que la reacción se completara, la mezcla de reacción se vertió en 20 ml de H_2O y se extrajo utilizando EtOAc. La capa orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó mediante gel de sílice para proporcionar 4-(5-(7-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)quinolin-3-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il)benzoato de etilo (**Ejemplo 8**) (0,16 g, 68 %). δ_H (400 MHz; $CDCl_3$) 1,43 (15H, m), 4,43 (2H, q, $J = 8,0$ Hz), 8,0 (2H, q, $J = 8,0$ Hz), 8,21 (2H, d, $J = 12,0$ Hz), 8,30 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), 8,70 (1H, s), 9,01 (1H, d, $J = 4,0$ Hz), 9,69 (1H, d, $J = 2,0$ Hz). δ_C (100 MHz; $CDCl_3$) 14,3, 24,9, 61,4, 84,4, 117,8, 127,5, 127,9, 128,4, 130,1, 136,3, 137,3, 148,2, 149,1, 165,9, 168,5, 174,2.

[0051] Se añadieron 4-(5-(7-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)quinolin-3-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il)benzoato de etilo (**8**) (0,11 g, 0,23 mmol) y LiOH (0,056 g, 2,3 mmol) a un matraz con fondo redondo de 25 ml, se añadió un disolvente mixto de THF/ H_2O (4 ml:2 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de la acidificación mediante HCl 2,0 M, la mezcla de reacción se extrajo utilizando EtOAc, la capa orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante recristalización. El producto en bruto se disolvió en acetona y se precipitó al añadir dietil éter, se filtró y se secó para producir el ácido 4-(5-(7-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)quinolin-3-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il)benzoico (**Ejemplo 6**) (0,097 g, 95 %). δ_H (400 MHz; d_6 -DMSO) 1,34 (12H, s), 7,91 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 8,15 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), 8,24 (3H, m), 8,39 (1H, s), 9,30 (1H, s), 9,56 (1H, d, $J = 4,0$ Hz). δ_C (100 MHz; d_6 -DMSO) 25,1, 84,8, 118,1, 127,9, 128,7, 129,4, 130,1, 130,7, 132,4, 137,3, 148,6, 167,0, 168,3, 174,6.

Se disolvió ácido 4-(5-(7-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)quinolin-3-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il)benzoico (**6**) (0,09 g, 0,2 mmol) en un disolvente mixto de MeOH/ H_2O (1:1), y, a continuación, se añadió gota a gota 1,0 M de HCl a la mezcla de reacción hasta llegar a pH = 2. El precipitado resultante se filtró y se secó al vacío para producir ácido 4-(5-(7-boroquinolin-3-il)-1,2,4-oxadiazol-3-il)benzoico (**Ejemplo 9**) (0,07 g, 96 %). δ_H (400 MHz; d_6 -DMSO) 8,06 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 8,22 (5H, m), 8,59 (1H, s), 9,25 (1H, s), 9,55 (1H, s). δ_C (100 MHz; d_6 -DMSO) 117,5, 127,9, 128,6,

130,2, 130,7, 133,0, 137,1, 148,1, 148,9, 167,0, 168,2, 174,8.

[0052] Utilizando una biología de sistemas combinados y enfoque experimental, hemos identificado previamente la proteína quinasa 2 que interactúa con homeodominio (HIPK2) como un regulador crítico de las múltiples vías profibrosis que incluye la vía TGF- β 1/Smad3. HIPK2 regula la vía mediante la asociación física con Smad3, que de este modo modula su actividad. La eliminación de HIPK2 en células tubulares primarias humanas suprime la activación de la vía TGF- β 1/Smad3 inducida por TGF- β 1. *In vivo*, la eliminación de HIPK2 inhibe la actividad de TGF- β 1/Smad3 y fibrosis renal tanto en ratones transgénicos de VIH1 (Tg26) como ratones con obstrucción uretral unilateral (UUO). La supresión de la vía TGF- β 1/Smad3 a través de la inhibición de HIPK2, proporciona, por lo tanto, un enfoque a

[0053] Los inhibidores de HIPK2 no han sido desarrollados y no están disponibles comercialmente. Recientemente Cozza et al [PLoS One, 9: e89176, 2014] describió un inhibidor HIPK2 selectivo que compite por la unión a ATP en el dominio quinasa. Sin embargo, debido a que HIPK2 regula múltiples vías de señalización, que incluyen la regulación de p53, existe preocupación que una inhibición amplia de HIPK2 puede no ser beneficiosa en todos los contextos celulares. En el presente documento se describen compuestos identificados mediante un ensayo con informador de Smad3, que son capaces de inhibir la vía de TGF- β 1/Smad3 a través de la interrupción de la interacción de proteína-proteína de HIPK2-Smad3 sin una inhibición importante de actividad quinasa de HIPK2 ni inhibición de la activación de p53. En las pruebas mostradas a continuación, el Ejemplo 1 inhibió la vía de profibrosis *in vitro* en células epiteliales tubulares renales (RTEC) humanas cultivadas e *in vivo* en modelos murinos de fibrosis renal (ratones Tg26 y UUO).

[0054] Las células HEK 293T (293T) (ATCC) se cultivaron en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (Invitrogen) que contenía 10 % de suero bovino fetal (FBS), 0,5 % de penicilina y estreptomycin a 37 °C y un ambiente humidificado con 5% de CO₂. Para todos los estudios se utilizaron células tubulares primarias humanas (PromoCell GmbH, Heidelberg, Alemania) que se cultivaron en un Medio de Crecimiento de Células Epiteliales Renales 2 (Promocell GmbH) con suplementos de acuerdo con el protocolo de fabricante de células epiteliales tubulares renales primarias humanas con < 5 pases. Para la infección con VIH de hRTECs, se utilizaron pNL4-3:ΔG/P-EGFP, una construcción de VIH-1 con *gag/pol* eliminado que contiene EGFP en el marco de lectura abierto *gag* y pHR-IRES-EGFP, una construcción de EGFP de control, para generar el virus pseudotipado VSV-G. Las células se infectaron con el virus pseudotipado VIH o un virus de control durante 2 días antes del tratamiento con el compuesto de prueba.

[0055] Se adquirió plásmido de luciferasa de luciérnaga dirigida por elemento de unión a Smad 4X (SBE4-Luc) de Addgene (#16495). Se adquirió el plásmido informador de luciferasa de renilla (pRL) de Promega. HIPK2 con dominio activo eliminado se describió anteriormente en Jin et al. [Nat Med, 18: 580-588]. La construcción de His₆-HIPK2 se generó utilizando amplificación por PCR de la región codificante utilizando un plásmido que contiene el gen de HIPK2 humano (GeneCopoeia™) como molde.

[0056] Se cotransfectaron células 293T sembradas en una placa de 12 pocillos (~60% de confluencia) con SBE4-Luc (0,5 μg) y plásmidos pRL (0,2 μg) utilizando el kit de transfección PolyJet de acuerdo con las instrucciones del fabricante (SignaGen Laboratories, MD). Las células cuarenta y ocho horas después de la transfección se trataron con concentraciones asignadas del compuesto de prueba conjuntamente con o sin 10 ng/ml de TGF- β 1 durante 16 horas. Las actividades de luciferasa se midieron utilizando el kit de Ensayo Informador de Luciferasa Dual (Promega, #E1910). Los datos se expresan como la proporción de actividad de luciferasa de luciérnaga sobre actividad de luciferasa de renilla. Para el experimento con HIPK2 dominante negativo, conjuntamente con los plásmidos de luciferasa de luciérnaga SBE4 y pRL (luciferasa de renilla), se cotransfectaron el vector vacío pcADN 3.1 (0,5 μg) o plásmido HIPK2 KD (0,5 μg) en las células 293T. 48 horas después de la transfección, se midieron las actividades de luciferasa.

[0057] Se realizó la medición promedia de LDH utilizando un kit de Ensayo de Citotoxicidad LDH (ThermoFisher scientific, NY) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0058] El ensayo de quinasa HIPK2 se realizó por ProQinase GmbH (Freiburg, Alemania).

[0059] Se extrajo el ARN total utilizando Trizol (Invitrogen). 400 ng de ARN total se transcribieron de manera inversa a ADNc utilizando un sistema de síntesis de primera cadena de SuperScript III (Invitrogen).

[0060] Se realizó una RT-PCR cuantitativa utilizando un Sistema de PCR en Tiempo-Real 7500 (Applied Biosystems). El nivel de genes se normalizó hasta gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y se expresó como factor de cambio. Los conjuntos de cebadores utilizados fueron los siguientes: colágeno humano I (directo: 5'-CTCCCCAGCTGTCTTATGGC-3' (SEQ ID NO:1); inverso: 5'-GACCCATGGGACCTGAAGG-3' (SEQ ID NO: 2); CTGF (directo: 5'-CTTCTGTGACTTCGGCTCCC-3' (SEQ ID NO: 3); inverso: 5'-CTGGTACTTGACGCTGCTCT-3' (SEQ ID NO:4)); fibronectina 1 (directo: 5'-TGCAGTGGCTGAAGACACAA-3' (SEQ ID NO: 5); inverso: 5'-ACGTCCTGCCATTGTAGGTG-3' (SEQ ID NO:6)); MMP2 (directo: 5'-CCTGCAAGTTTCCATTCCGC-3' (SEQ ID NO: 7); inverso: 5'-GTGAAGGGGAAGACACAGGG-3' (SEQ ID NO:8)); PAI1 (directo: 5'-ATCAGCCACTGGAAAGGCCAA-3' (SEQ ID NO: 9); inverso: 5'-CTCTAGGGGCTTCCTGAGGT-3' (SEQ ID NO:10)); α-SMA (directo: 5'-GTATGTGGCTATCCAGCCGG-3' (SEQ ID NO:11); inverso: 5'-AATAGCCACGCTCAGTCAGG-3' (SEQ ID NO:12));

GAPDH (directo: 5'-AATTGAGCCCGCAGCCTCCC-3' (SEQ ID NO:13); inverso: 5'-CCAGGCGCCCAATACGACCA-3'(SEQ ID NO:14)).

[0061] Se lisaron células 293T en un tampón de equilibrio/lavado (fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 300 mM, imidazol 10 mM; pH 7,4) 48 horas después de la transfección del plásmido de expresión HIPK2 con etiqueta His₆. El lisado celular aclarado se incubó con resina de HisPur Cobalt (Thermo Fisher Scientific, NY) en un rotador vertical a 4°C durante 2 horas. Después de la centrifugación (700xg, 2 minutos, 4 °C), la resina se lavó 3 veces en un tampón de lavado. Los complejos de proteínas unidas se eluyeron finalmente con un tampón de elución (fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 500 mM, imidazol 150 mM; pH 7,4) y se sometieron a análisis de transferencia western.

[0062] Las células se lisaron en un reactivo de extracción de proteína de mamífero M-PER (#78501, Thermo Fisher Scientific, NY) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasa (#11836153001, Roche) e inhibidores de fosfatasa (50 mM de NaF, 10 mM de β-glicerofosfato, 5 mM de pirofosfato de sodio, 2 mM de Na₃VO₄). Se midió la concentración total de proteínas utilizando el reactivo Bradford (#500-0006, Bio-Rad). Las proteínas se separaron sobre SDA-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se realizó una inmunotransferencia utilizando anticuerpos específicos: fosfo-Smad3 (#9520, Cell Signaling), Smad3 total (#9523, Cell Signaling), 6xHis (#ab137839, Abcam), HIPK2, (#5091, Cell Signaling), GAPDH (#2118, Cell Signaling), y α-SMA (#ab5694, Abcam).

[0063] Se utilizó el procedimiento de la estabilidad de objetivos sensibles a la afinidad de fármaco (DARTS) para identificar dianas de proteínas del compuesto de prueba, tal como se describió anteriormente en Pai et al. [Methods Mol Biol, 1263: 287-298, 2015]. De manera resumida, los lisados de 293T se incubaron con un compuesto de prueba a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación, los lisados de células se sometieron a proteólisis con diferentes concentraciones de pronasa (#10165921001, Roche) a temperatura ambiente durante 20 minutos. La proteólisis se detuvo mediante la adición de 5X tampón de carga de proteínas y calentamiento a 90 °C durante 5 minutos. Las muestras de proteínas se sometieron al análisis de transferencia western.

[0064] Los ratones Tg26 con base genética de FVB/N que contienen un provirus VIH-1 detectable que carece de gag-pol se han descrito en Feng et al. [JAm Soc Nephrol 2009; 20: 2138-2146]. En este estudio se utilizaron ratones Tg26 heterocigotos de seis semanas de edad. Se utilizaron miembros de la misma camada de tipo salvaje como controles. Los ratones en el grupo de tratamiento recibieron el compuesto de prueba disuelto en DMSO y diluido en solución salina (DMSO al 5 %) utilizando una sonda oral con una dosis de 200 µg/kg de peso corporal al día. Los ratones en el grupo de control recibieron el mismo volumen de vehículo de DMSO al 5 %/solución salina. Los ratones se trataron durante un total de 4 semanas y se sacrificaron a la edad de 10 semanas. Se estableció el modelo de UUO en ratones C57BL/6 machos (The Jackson Laboratory) mediante la ligadura del uréter izquierdo, tal como se describe en Jin et al. [Lab Invest, 93: 801-811, 2013]. Después de la operación, los ratones UUO se dividieron aleatoriamente en grupo de control (vehículo) y grupo de tratamiento. Los ratones se alimentaron con el compuesto de prueba mediante sonda oral con una dosis de 200 µg/kg de peso corporal por día durante 7 días.

[0065] La tinción con inmunofluorescencia se realizó sobre secciones de riñón incorporados en parafina utilizando procedimientos estándares. De manera resumida, las secciones desparafinadas se incubaron con anticuerpo primario contra colágeno I (1:50, #NB6-00-4-8, Novus) a 4°C durante la noche. Después del lavado, las secciones se incubaron con anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor488 (1:200, #A11034, Invitrogen) a temperatura ambiente durante 1 hora en oscuridad. Después de que los núcleos se tiñeran con 4',6-diamidino- 2-fenilindol (DAPI), los portamuestras se montaron utilizando Aqua PolyMount (Polysciences, Inc) y se obtuvieron las imágenes utilizando el microscopio AxioVision Ile con una cámara digital.

[0066] La fibrosis renal se evaluó histológicamente mediante tinción roja Sirius sobre portamuestras de parafina de tejidos renales de ratones de acuerdo con las instrucciones del fabricante (#ab150681, Abcam). Se realizó la tinción tricrómica de Masson sobre secciones en parafina de tejidos renales de ratones de acuerdo con las instrucciones del fabricante (#87019, Thermo Scientific).

[0067] Los datos se muestran como un promedio ± SEM. Se utilizó el ANOVA seguido de la corrección de Bonferroni para la comparación entre los grupos. Se utilizó el software GraphPad Prism para análisis estadísticos. Todos los experimentos se repitieron como mínimo tres veces, y se muestran experimentos representativos. Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando p<0,05.

RESULTADOS

[0068] Dado que Smad3 es un factor de transcripción en dirección 3' principal activado por HIPK2 y un mediador importante de la fibrosis renal, la actividad de los compuestos de prueba se cribó inicialmente mediante un informador de luciferasa sensible a Smad3 (SBE4-Luc, que contiene un gen de luciferasa de luciérnaga bajo el control de un elemento de unión a Smad multimerizado) en células HEK 293T. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.

	Actividad de Luciferasa (en relación con control de DMSO)	
Ejemplo	-TGF β	+TGF β
DMSO	1,000	2,520
1	0,197	0,457
2	0,660	0,935
3	0,730	1,318
4	0,366	0,508
5	0,512	0,494
6	0,722	2,284
7	0,784	2,355
8	0,818	4,451

[0069] Para confirmar adicionalmente el efecto inhibitor de los compuestos de la invención sobre la actividad de Smad3, se determinó el efecto de dosis de un compuesto de prueba sobre la actividad de SBE4-luciferasa en un intervalo de concentraciones. En ausencia de estimulación de TGF- β 1, el Ejemplo 1 en dosis crecientes (3,3 μ m y 10 μ m) indujo una supresión progresiva y significativa de actividad informadora de Smad3 (~40% y 70% de inhibición en comparación con el control de DMSO, respectivamente). En presencia de TGF- β 1, la actividad de SBE4-luciferasa aumentó notablemente, pero se inhibió de manera significativa por el Ejemplo 1 en las tres dosis probadas (~40%, 60% y 75% de inhibición en comparación con solo control tratado con TGF β 1, respectivamente).

[0070] A efectos de descartar la posibilidad de que la reducción de actividad de Smad3 se deba a la citotoxicidad de concentración creciente del compuesto, se examinó el nivel de lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo celular. La LDH se libera por las células dañadas. Incluso hasta 30 μ M del Ejemplo 1 durante 16 horas de incubación, no se observó ningún aumento significativo del nivel de LDH en el medio de cultivo, sugiriendo que la represión de la actividad de Smad3 por el Ejemplo 1 no se debe a citotoxicidad y muerte celular.

[0071] Debido a que los compuestos de la presente invención atenuaron la actividad de Smad3, examinamos la inhibición de actividad quinasa de HIPK2. El ensayo de quinasa se realizó por ProKinase GmbH (Freiburg, Alemania). No se observó ninguna inhibición de la actividad quinasa de HIPK2 con concentraciones crecientes del Ejemplo 1, mientras que la estaurosporina probada como un control interno en paralelo mostró una IC₅₀ de $4,7 \times 10^{-6}$ M. Este resultado indicó que la actividad disminuida de Smad3 tras la administración de los compuestos de la presente invención no dependía de la alteración de la función quinasa de HIPK2. Sin embargo, la cuestión que quedaba pendiente era si la actividad de HIPK2 es, sin embargo, necesaria para la activación de Smad3. Empleamos la expresión de HIPK2 de quinasa muerta (KD-HIPK2) en células 293T, que sirve como un mutante negativo dominante para inhibir la actividad de HIPK2 endógeno. Encontramos que la sobreexpresión de KD-HIPK2 reprimió de manera significativa la actividad informadora de SBE4-luciferasa en células 293T tratadas con TGF- β 1 cuando se compara con las células tranfectadas con una HIPK2 de tipo salvaje (WT-HIPK2). Estos datos confirman además que la inhibición de actividad quinasa de HIPK2 suprime la fosforilación de Smad3 inducida por TGF- β 1. Adicionalmente, se observó un efecto inhibitor aditivo entre el Ejemplo 1 y la sobreexpresión de KD-HIPK2 en la actividad de Smad3. Conjuntamente con los resultados del ensayo de quinasa, los datos indicaron que la unión de Ejemplo 1 a HIPK2 - que lleva a la represión de la actividad de Smad3 - se realiza a través de un mecanismo distinto que la inhibición de la actividad quinasa de HIPK2.

[0072] Dado que el Ejemplo 1 no afectaba a la actividad quinasa de HIPK2, buscamos determinar si se une físicamente a HIPK2 para alterar sus efectos sobre la actividad de Smad3, dado que se conoce que la unión estérica o alostérica de los compuestos para reconocer proteínas puede cambiar su actividad, funcionando como activadores o como inhibidores. Se ha desarrollado recientemente la estabilidad de objetivos sensibles a la afinidad de fármaco (DARTS) para identificar proteínas diana potenciales de moléculas pequeñas. Se basa en el principio de que la unión de compuestos de molécula pequeña a la proteína diana cambia la estructura de proteína de tal modo que puede aumentar su estabilidad y conferir protección contra proteólisis. A efectos de probar si los compuestos de la presente invención se unen directamente a HIPK2, realizamos los experimentos DARTS utilizando pronasa en presencia del Ejemplo 1. Durante la digestión con una dilución de serie de la relación de concentración de pronasa con respecto al lisado celular, encontramos que HIPK2 se protegió de la degradación con una relación de 1:10.000 de pronasa/lisado celular en presencia del Ejemplo 1, pero no en presencia del control de DMSO. Para confirmar adicionalmente este resultado, examinamos los efectos de dosis del Ejemplo 1 sobre la protección de HIPK2 de la digestión con pronasa.

Con la misma relación de 1:10.000 pronasa/lisado celular, encontramos que se observó una protección parcial a 30 μ m del Ejemplo 1 y una protección completa a 100 μ m, confirmando que el Ejemplo 1 se unía físicamente a HIPK2. Dado que se conoce que HIPK2 interactúa con Smad3 y este estudio mostró que la unión física del Ejemplo 1 a HIPK2 reprime la activación de Smad3, parece que la unión de los compuestos de la presente invención a HIPK2 altera la interacción de proteína-proteína entre HIPK2 y Smad3. Debido a que la abundancia de HIPK2 es bastante baja en muchos tipos de células conocidos, sobreexpresamos HIPK2 con etiqueta His₆ en células 293T para comprobar su interacción con el Smad3 endógeno. La expresión de His₆-HIPK2 y Smad3 en células 293T se confirmó utilizando transferencia western. Se capturó His₆-HIPK2 utilizando microesferas de cobalto y comprobamos la presencia de Smad3 en células tratadas con dos dosis diferentes del Ejemplo 1. De hecho, el Ejemplo 1 redujo la interacción entre Smad3 y HIPK2 de una manera dependiente de la dosis, sugiriendo que la unión de los compuestos de la presente invención a HIPK2 interfiere con su interacción con Smad3.

[0073] También se examinaron los efectos de los compuestos de la presente invención sobre la fosforilación de Smad3 y la expresión de los genes diana en dirección 3' de la vía TGF- β /Smad3. La estimulación de células epiteliales tubulares renales humanas primarias (hRTECs) con TGF- β 1 (5 ng/ml) durante 20 minutos dio como resultado una fosforilación fuerte de Smad3. Sin embargo, la fosforilación de Smad3 inducida por TGF- β 1 se inhibió de manera gradual mediante el pretratamiento de células con el Ejemplo 1 de una manera dependiente de la dosis. Los niveles de expresión de genes diana en dirección 3' de TGF- β 1/Smad3, tales como Col I, CTGF, FN1, MMP2, PAI1 y α -SMA, se examinaron utilizando PCR en tiempo real. En ausencia de la estimulación de TGF- β 1, el pretratamiento del Ejemplo 1 no afectó a la expresión de estos genes. El tratamiento de las células con TGF- β 1 aumentó de manera notable la expresión de estos genes, que se inhibió de manera progresiva mediante el pretratamiento con concentraciones crecientes del Ejemplo 1. Conjuntamente, estos datos apoyan adicionalmente un efecto inhibitorio de los compuestos de la presente invención sobre la vía TGF- β 1/Smad3.

[0074] Las vías TGF- β 1/Smad3 son reguladores claves de la vía de profibrosis en enfermedad renal, y los datos *in vitro* anteriores indican que los compuestos de la presente invención inhiben la expresión de genes de profibrosis. Se utilizó el modelo de ratón con obstrucción ureteral unilateral (UUO), un modelo utilizado de manera habitual para fibrosis renal, para determinar si los compuestos de la presente invención pueden mejorar la fibrosis *in vivo*. Tratamos tanto los ratones con UUO como con operación simulada con el Ejemplo 1 a 200 μ g/kg de peso corporal/día o con DMSO como un vehículo de control utilizando una sonda oral diaria desde el día de la operación hasta 7 días después de la operación. Se observó la fibrosis mediante tinción roja de picosirius, tinción tricrómica de Masson y tinción con inmunofluorescencia de Colágeno I. El tratamiento con el Ejemplo 1 atenuó de manera significativa la fibrosis renal en los ratones con UUO en comparación con los ratones con UUO tratados con un vehículo. La transferencia western de los lisados de corteza renal mostró que el tratamiento con el Ejemplo 1 disminuyó de manera significativa la fosforilación de Smad3 y la expresión de α -SMA en los riñones con UUO, apoyando adicionalmente que la atenuación de la respuesta fibrótica está mediada por la inhibición de la vía HIPK2/Smad3.

[0075] Adicionalmente, la administración del Ejemplo 1 empezando el día 7 después de la cirugía (día 7 hasta 14) que facilitó el comienzo de la fibrosis en los ratones con UUO antes del tratamiento también mostró eficacia en la mejora de la progresión de fibrosis. De manera similar con el tratamiento inicial, a pesar de empezar 7 días después de la cirugía, la administración de BT173 llevó a una atenuación significativa de la fibrosis 14 días después de la cirugía, tal como se observó utilizando tinción roja de picosirius, tinción tricrómica de Masson y tinción con inmunofluorescencia de Colágeno I. La transferencia western de corteza renal mostró una reducción notable en p-Smad3 y α -SMA en el Ejemplo 1 - riñones con UUO tratados en comparación con riñones con UUO tratados con vehículo. Aunque la fosforilación de p53 se elevó de manera significativa en riñones con UUO en comparación con riñones con operación simulada, el Ejemplo 1 no tenía efectos sobre la activación de p53, coherente con lo anterior en los descubrimientos *in vitro*. Adicionalmente, el análisis de PCR en tiempo real mostró una regulación por incremento significativa de genes en la vía Wnt/ β -catenina (Axin2, c-myc y Twist) en riñones con UUO en comparación con los de la operación simulada. El tratamiento con el Ejemplo 1 también disminuyó de manera significativa sus expresiones, corroborando adicionalmente la demostración *in vitro* anterior del efecto del Ejemplo 1 sobre HIPK2 para suprimir la activación de la vía Wnt inducida en el riñón dañado.

[0076] Dado que la utilidad del modelo con UUO está limitada a fibrosis renal y no permite el examen de la función renal, utilizamos un segundo modelo de ratón de fibrosis renal. Se conoce que los ratones Tg26 desarrollan proteinuria a partir de 4 semanas de vida y la proteinuria tiene picos normalmente alrededor de las 8-10 semanas de edad. Los ratones Tg26 también desarrollan glomeruloesclerosis significativa e insuficiencia renal alrededor de las 8-10 semanas de edad. Para determinar si los compuestos de la presente invención podían revertir la lesión renal que ya se ha desarrollado, empezamos a tratar a los ratones Tg26 con el vehículo o el Ejemplo 1 desde la edad de 6 semanas durante un total de 4 semanas, y los ratones se sacrificaron a la edad de 10 semanas. Encontramos que el Ejemplo 1 reducía de manera significativa la proteinuria y mejoraba la función renal en ratones Tg26 en comparación con los ratones tratados con el vehículo, tal como se muestra en la Tabla 2 y la Tabla 3.

Tabla 2.

Relación de Albúmina:Creatinina urinaria (µg/µg)				
	Tipo salvaje + vehículo	Tipo salvaje + Ejemplo 1	Tg26 + Vehículo	Tg26 + Ejemplo 1
Pretratamiento (semana 0)	0,038 ±0,006	0,033 ±0,007	28,427 ±7,931	23,321 ±12,339
Post-tratamiento (semana 4)	0,044 ±0,026	0,036 ±0,008	46,910 ±15,853	19,917 ±5,838

Tabla 3.

BUN (mg/dl)				
	Tipo salvaje + vehículo	Tipo salvaje + Ejemplo 1	Tg26 + Vehículo	Tg26 + Ejemplo 1
Pretratamiento (semana 0)	17,972 ±3,312	21,091 ±3,009	21,255 ±4,975	23,799 ±1,990
Post-tratamiento (semana 4)	20,188 ±4,560	18,875 ±3,485	51,784 ±5,407	22,404 ±4,678

[0077] El Ejemplo 1 atenuó también la lesión renal y la fibrosis renal en ratones Tg26, tal como se muestra mediante tinción roja de picosirius, tinción tricrómica de Masson e inmunofluorescencia de Colágeno I. Adicionalmente, el Ejemplo 1 redujo significativamente la fosforilación de Smad3 y la expresión de α-SMA en ratones Tg26.

LISTA DE SECUENCIAS

[0078]

<110> He, John Cijiang

Liu, Ruijie

Das, Bhaskar

Xaio, Wenzhen

Li, Zhengzhe

Lee, Kyung

<120> INHIBIDORES DE OXADIAZOL Y TIADIAZOL DE HIPK2

<130> 3710.031P

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

< 210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 1

ctccccagct gtcttatggc 20

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400>2

gacccatggg acctgaagg 19

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 3
 cttctgtgac ttcggctccc 20

5 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

10 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 4
 ctggctactg cagctgctct 20

15 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

20 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 5
 tgcagtggct gaagacacaa 20

25 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial Secuencia
 <220>

30 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 6
 acgtcctgcc attgtaggtg 20

35 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

40 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 7
 cctgcaagtt tccattccgc 20

45 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

50 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 8
 gtgaagggga agacacaggg 20

55 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

60 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 9
 atcagccact ggaaaggcaa 20

65 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> oligonucleótido sintético
 <400> 10

ctctaggggc ttctgaggt 20

<210> 11
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 11
 10 gtatgtggct atccagccgg 20

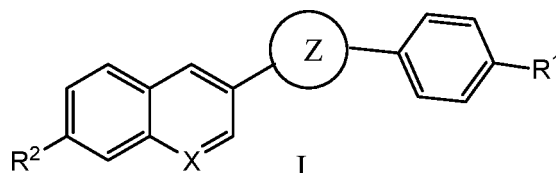
<210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 12
 20 aatagccacg ctgagtcagg 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 13
 aattgagccc gcagcctccc 20

< 210> 14
 <211>20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 14
 ccaggcgccc aatacgacca 20

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula I



en el que

Z es en oxadiazol;

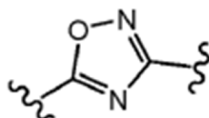
X es N;

R¹ y R² se seleccionan independientemente de - hidrocarbilo (C₁-C₈), OH, -O-hidrocarbilo (C₁-C₈), halógeno, nitro, alquilamino (C₁-C₃), dialquilamino (C₁-C₃), acilamino (C₁-C₃), alquilsulfonilo (C₁-C₃), alquiltio (C₁-C₃), haloalquilo (C₁-C₃), haloalcoxi (C₁-C₃), haloalquiltio (C₁-C₃), -COOH, -C(=O)O-alquilo (C₁-C₃), -B(OR³)₂, y - BF₃K;

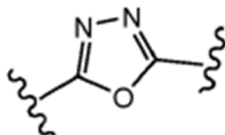
y

R³ es H o hidrocarbilo (C₁-C₈); o (OR³)₂ junto al boro al que se une forma un anillo de dioxaborolano o dioxaborinano sustituido opcionalmente con de uno a cuatro hidrocarbilos (C₁-C₈).

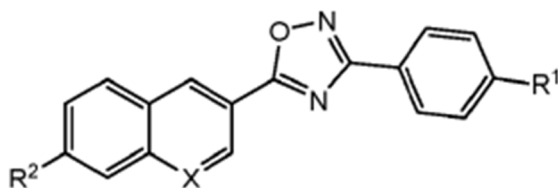
2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que Z es



3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que Z es



4. Compuesto de fórmula



en el que

X se selecciona entre N y CH;

R¹ se selecciona entre n-butilo, s-butilo, t-butilo, c-butilo, c-pentilo, norbornilo, OH, -O-hidrocarbilo (C₁-C₈), halógeno, nitro, alquilamino (C₁-C₃), dialquilamino (C₁-C₃), acilamino (C₁-C₃), alquilsulfonilo (C₁-C₃), alquiltio (C₁-C₃), haloalquilo (C₁-C₃), haloalcoxi (C₁-C₃), haloalquiltio (C₁-C₃), -COOH, -C(=O)O-alquilo (C₁-C₃), -B(OR³)₂ y -BF₃K;

R² se selecciona entre -hidrocarbilo (C₁-C₈), OH, -O-hidrocarbilo (C₁-C₈), halógeno, nitro, alquilamino (C₁-C₃), dialquilamino (C₁-C₃), acilamino (C₁-C₃), alquilsulfonilo (C₁-C₃), alquiltio (C₁-C₃), haloalquilo (C₁-C₃), haloalcoxi (C₁-C₃), haloalquiltio (C₁-C₃), -COOH, -C(=O)O-alquilo (C₁-C₃), -B(OR³)₂ y -BF₃K; y

R³ es H o hidrocarbilo (C₁-C₈); o (OR³)₂ junto al boro al que se une forma un anillo de dioxaborolano o dioxaborinano sustituido opcionalmente con de uno a cuatro hidrocarbilos (C₁-C₈).

5. Compuesto, según la reivindicación 1 ó 4, en el que R¹ se selecciona entre halógeno, -COOH, -C(=O)O-alquilo (C₁-C₃), -B(OR³)₂ y -BF₃K.

6. Compuesto, según la reivindicación 1 ó 4, en el que R^2 se selecciona entre halógeno, haloalquilo (C_1-C_3), -O-alquilo (C_1-C_3), $-B(OR^3)_2$ y $-BF_3K$.
- 5 7. Compuesto, según la reivindicación 1 ó 4, en el que R^1 se selecciona entre bromo, COOEt y $-BF_3K$.
8. Compuesto, según la reivindicación 1 ó 4, en el que R^2 se selecciona entre bromo, CF_3 y $-OCH_3$.
9. Composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 10 10. Procedimiento *in vitro* para inhibir la interacción de la proteína quinasa 2 que interacciona con el homeodominio (HIPK2) con Smad3, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto HIPK2 con un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 15 11. Procedimiento *in vitro* para inhibir la activación de Smad3, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto Smad3 con un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
12. Compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para uso en el tratamiento de una enfermedad fibrótica.
- 20 13. Compuesto de la reivindicación 12, en el que dicha enfermedad es fibrosis renal.