

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 402**

51 Int. Cl.:

A61K 31/137 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2018** **PCT/US2018/029999**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2018** **WO18201074**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2018** **E 18724734 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024** **EP 3615015**

54 Título: **Captadores de gamma-cetoaldehído para el tratamiento de la aterosclerosis**

30 Prioridad:

27.04.2017 US 201762491225 P

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

29.10.2024

73 Titular/es:

VANDERBILT UNIVERSITY (100.0%)
305 Kirkland Hall
Nashville, TN 37240, US

72 Inventor/es:

LINTON, MACRAE;
OATES, JOHN A.;
DAVIES, SEAN S.;
ROBERTS II, L. JACKSON;
AMARNATH, VENKATARAMAN;
YANCEY, PATRICIA y
TAO, HUAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 984 402 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

Captadores de gamma-cetoaldehído para el tratamiento de la aterosclerosis

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general al campo del tratamiento y la prevención de la inflamación, y más específicamente al campo del control de isocetales y neurocetales.

- 10 La presente invención también se refiere al campo del tratamiento y la prevención de la aterosclerosis o el crecimiento de placas en las arterias, la causa subyacente del ataque cardíaco, los accidentes cerebrovasculares y la enfermedad vascular periférica, y más específicamente al tratamiento y la prevención del desarrollo de aterosclerosis y de acontecimientos cardiovasculares mediante el control de los aldehídos reactivos, incluidos el malondialdehído (MDA), los isocetales y los neurocetales, y el daño que causan a las lipoproteínas (LDL y HDL) y a la pared arterial.

15 **Sumario de la invención**

- La peroxidación de lípidos produce estrés oxidativo e inflamación y acelera la patogénesis de la aterosclerosis y los acontecimientos cardiovasculares. La capacidad del captador de aldehídos 2-hidroxibencilamina (2-HOBA) (salicilamina) para prevenir el desarrollo de aterosclerosis se examinó en ratones *Ldlr*^{-/-} alimentados con una dieta occidental durante 16 semanas. En comparación con los ratones tratados con vehículo o el análogo no reactivo, 4-HOBA, el tratamiento con 2-HOBA disminuyó significativamente el desarrollo de aterosclerosis en ratones *Ldlr*^{-/-} hipercolesterolémicos en un 31 % en las aortas proximales y un 60 % en aortas en proyección de cirujano. El tratamiento con 2-HOBA no afectó los niveles de colesterol plasmático, pero dio como resultado una reducción del contenido de aldehídos en HDL, LDL y en las lesiones ateroscleróticas. La dieta occidental aumentó los niveles plasmáticos de aducto de malondialdehído (MDA)-apoA1 en ratones *Ldlr*^{-/-}. De forma importante, el tratamiento con 2-HOBA redujo la formación de MDA-apoA1 y aumentó la capacidad del HDL de ratón para reducir las reservas de colesterol de los macrófagos en comparación con el vehículo o la 4-HOBA. Además, la 2-HOBA redujo *in vivo* la formación de aductos de MDA-apoB, y la captación de MDA con 2-HOBA durante la modificación de LDL redujo la acumulación de colesterol en los macrófagos *in vitro*. Asimismo, la 2-HOBA redujo la muerte de los macrófagos y la inflamación en respuesta al estrés oxidativo. De forma importante, el tratamiento con 2-HOBA redujo el número de células positivas para TUNEL con lesión aterosclerótica en un 72 % y aumentó el número de células muertas que fueron fagocitadas en comparación con los ratones tratados con 4-HOBA o con vehículo. Esto favoreció la formación de placas estables en ratones tratados con 2-HOBA, como lo demuestra la reducción del 69 % ($p < 0,01$) en el núcleo necrótico y el aumento del contenido de colágeno (2,7 veces) y del espesor de la capa fibrosa (2,1 veces). La presente invención demuestra que la captación de aldehídos con 2-HOBA tiene múltiples efectos ateroprotectores sobre las lipoproteínas y reduce la aterosclerosis en modelos murinos. Por consiguiente, la presente invención proporciona un nuevo enfoque terapéutico para la prevención y el tratamiento de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica.
- 40 Por tanto, la presente invención es un compuesto para su uso en el tratamiento, la prevención o la mejora de la aterosclerosis, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

- Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

- Como antecedente, el documento WO2015009977A1 divulga derivados de aminometilbiliarilo y su uso en medicina. Se prevé una gama de aplicaciones médicas, incluido el tratamiento de la aterosclerosis. El documento WO03011808A1 divulga derivados de retinoides y sus usos en el campo médico, incluido su uso para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la aterosclerosis. ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, vol. 1043, n.º 1, 1 de junio de 2005, págs. 759-766, divulga la piridoxamina para el tratamiento de la aterosclerosis. El documento WO2011008202 A1 divulga compuestos reivindicados en el presente documento para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

55 **Breve descripción de las figuras**

- Las figuras 1A-1E demuestran que una realización de la presente invención, 2-HOBA, atenúa la aterosclerosis en ratones *Ldlr*^{-/-} hipercolesterolémicos (un modelo de hipercolesterolemia familiar). Se pretrataron ratones *Ldlr*^{-/-} hembra de 8 semanas con 2-HOBA 1 g/ml o 4-HOBA 1 g/ml (análogo no reactivo) o vehículo (agua) durante 2 semanas y luego el tratamiento continuó durante 16 semanas durante las cuales los ratones fueron alimentados con una dieta occidental con alto contenido de grasas. (Figura 1A y figura 1C) Las imágenes representativas muestran la tinción con Red-Oil-O en secciones de la raíz de la aorta proximal (figura 1A) y en aortas abierta y fijadas con alfileres (figura 1C). (Figura 1B y figura 1D) Cuantificación del área media de lesión teñida con Oil-Red-O en secciones de raíz de aorta (figura 1B) y aorta en proyección de cirujano (figura D). N = 9 o 10 por grupo, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (Figura 1E) Los niveles plasmáticos de colesterol total y triglicéridos. N = 9 o 10 por grupo. Las figuras 2A-2B demuestran que la 2-HOBA disminuye el contenido de MDA de las lesiones ateroscleróticas

aórticas proximales en ratones *Ldlr*^{-/-}. El MDA se detectó mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario anti-MDA y un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. Los núcleos se contratiñeron con Hoechst (azul). (Figura 2A) Imágenes representativas que muestran la tinción del MDA (rojo) en secciones de la raíz aórtica proximal. (Figura 2B) Cuantificación del área media de lesión positiva para MDA en secciones de raíz aórtica utilizando el software ImageJ. Los datos se presentan como media $\pm$ EEM, N = 6 por grupo, *** $p < 0,001$. Las figuras 3A-3D demuestran que 2-HOBA estimula la formación de placas ateroscleróticas estables en ratones *Ldlr*^{-/-}. Se aplicó la tinción tricrómica de Masson para analizar la estabilidad de la lesión aterosclerótica en secciones de la aorta proximal de ratones *Ldlr*^{-/-}. (Figura 3A) Imágenes representativas que muestran la tinción tricrómica de Masson en secciones de la raíz de la aorta. El contenido de colágeno (figura 3B), el espesor de la capa fibrosa (figura 3C) y el área necrótica (figura 3D) se cuantificaron utilizando el software ImageJ. N = 8 por grupo. * $p < 0,05$, barra de escala = 100 μ m. El azul muestra el colágeno, el rojo, el citoplasma, el negro, los núcleos. Las figuras 4A-4D demuestran que 2-HOBA previene la muerte celular y aumenta la eferocitosis en lesiones ateroscleróticas de ratones *Ldlr*^{-/-}. (Figura 4A) Imágenes representativas que muestran células muertas que se detectaron mediante tinción con TUNEL (rojo) de secciones de aorta proximal. Los macrófagos se detectaron mediante anticuerpo primario antimacrófagos (verde) y los núcleos se contratiñeron con Hoechst (azul). (Figura 4B) Una imagen representativa tomada con mayor aumento para indicar la tinción con TUNEL asociada a macrófagos (flechas amarillas), y las flechas blancas indican células muertas libres que no estaban asociadas con macrófagos. (Figura 4C) Cuantificación del número de núcleos positivos para TUNEL en secciones aórticas proximales. (Figura 4D) La eferocitosis se examinó cuantificando las células positivas para TUNEL libres frente a las asociadas a macrófagos en las secciones aórticas proximales. Los datos se indican como media $\pm$ EEM (N = 8 por grupo). Barra de escala = 50 μ m, ** $p < 0,01$. Las figuras 5A-5H demuestran que el tratamiento *in vitro* con 2-hidroxibencilamina suprime la apoptosis y la inflamación celular inducidas por el estrés oxidativo. (Figura 5A y figura 5B) Se incubaron células endoteliales aórticas de ratón (figura 5A) o macrófagos primarios (figura 5B) durante 24 h con H₂O₂ 250 μ M sola o con 4-HOBA o 2-HOBA. Luego se detectaron las células apoptóticas mediante tinción con anexina V y citometría de flujo. (Figura 5C, figura 5D, figura 5E, figura 5F, figura 5G, figura 5H) Los niveles de ARNm de IL-1 β , IL-6 y TNF- α se analizaron mediante PCR en tiempo real en los macrófagos peritoneales incubados durante 24 h con LDL oxidada (figura 5C-figura 5E) o H₂O₂ 250 μ M (figura 5F-figura 5H) sola o con 4-HOBA o 2-HOBA. (Figura 5A a figura 5H) Los datos se presentan como media $\pm$ EEM de tres experimentos independientes, *** $p < 0,001$. Las figuras 6A-6B demuestran los efectos de 2-HOBA sobre la modificación de LDL por MDA (figuras 6A). Los aductos de MDA-LDL se midieron mediante ELISA en ratones *Ldlr*^{-/-} que consumieron una dieta occidental durante 16 semanas y fueron tratados con 2-HOBA, 4-HOBA o vehículo. N = 10 por grupo, *** $p < 0,001$. (Figura 6B) La LDL fue modificada *in vitro* con MDA en presencia de vehículo solo o con 2-HOBA, y luego se incubó la LDL durante 24 h con macrófagos y se midió el colesterol celular. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. Las figuras 7A-7G muestran los efectos de la formación de aductos de HDL-MDA y 2-HOBA sobre la función de HDL. (Figura 7A) Los niveles plasmáticos de aductos de MDA-HDL se midieron mediante ELISA en ratones *Ldlr*^{-/-} tratados como se describe en la figura 6. Los datos se presentan como media $\pm$ EEM (N = 8 por grupo), *** $p < 0,001$. (Figura 7B) Transferencias Western de apoA1 y MDA-apoA1 en plasma de ratón después de inmunoprecipitación usando anticuerpo anti-apoA1 primario. Se trataron ratones *Ldlr*^{-/-} como se describe en la figura 6 y se incluyen, a modo de comparación, apoA1 y MDA-apoA1 procedentes de plasma de ratones *Ldlr*^{-/-} que consumieron una dieta de pienso. (Figura 7C) Cuantificación utilizando el software ImageJ de la densidad media (unidades artificiales) de MDA-apoA1 detectada mediante transferencia Western (figura 7B). (Figura 7D) La HDL se aisló del plasma de ratones *Ldlr*^{-/-} que consumieron una dieta occidental durante 16 semanas y fueron tratados con 2-HOBA o 4-HOBA o vehículo. Se incubaron macrófagos enriquecidos en colesterol durante 24 h con HDL (25 μ g de proteína/ml) y se midió el porcentaje de reducción en el contenido de colesterol celular. Los niveles de modificación de HDL-MDA se analizaron mediante ELISA. Los datos se presentan como media $\pm$ EEM, N = 7 por grupo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (Figura 7E) La HDL humana se modificó con dosis crecientes de MDA y, a continuación, se midió la capacidad del HDL para reducir el contenido de colesterol de los macrófagos enriquecidos en colesterol. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. (Figura 7F) Los niveles plasmáticos de aductos MDA-HDL se midieron mediante ELISA en sujetos control o HF antes y después de LA. (Figura 7G) Capacidad de HDL de sujetos control o HF antes y después de LA 9 (n = 6 por grupo) para reducir el contenido de colesterol de macrófagos apoE^{-/-}.

Descripción de la invención

La presente invención es un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso como tratamiento profiláctico o terapéutico de la aterosclerosis, tal como se establece en la reivindicación 1.

Por "inhibición del desarrollo aterosclerótico" se entiende la supresión del desarrollo, la progresión y/o la gravedad de la aterosclerosis, una enfermedad lentamente progresiva caracterizada por la acumulación de colesterol dentro de la pared arterial, por ejemplo, al inhibir, prevenir o provocar la regresión de una placa aterosclerótica.

La invención proporciona un compuesto para su uso en la inhibición de la aterosclerosis o el desarrollo aterosclerótico en un mamífero (por ejemplo, un ser humano), que comprende administrar una cantidad antiaterosclerosis o antidesarrollo aterosclerótico de un compuesto o una composición de las reivindicaciones, al mamífero.

La aterosclerosis, la causa subyacente del ataque cardíaco y los accidentes cerebrovasculares, es la causa más habitual de muerte y discapacidad en el mundo industrial. Los niveles elevados de lipoproteínas que contienen apolipoproteína B (LDL y VLDL) y los niveles bajos de HDL aumentan el riesgo de aterosclerosis. Aunque se ha demostrado que reducir el LDL con inhibidores de la HMG-CoA reductasa reduce el riesgo de ataque cardíaco y accidente cerebrovascular en grandes ensayos de criterios de valoración, sigue existiendo un riesgo residual sustancial de sufrir acontecimiento cardiovasculares. La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica en la que el estrés oxidativo desempeña un papel fundamental. La modificación oxidativa de las lipoproteínas que contienen apoB mejora la internalización y conduce a la formación de células espumosas. Además, la LDL oxidada induce inflamación, activación de células inmunitarias y toxicidad celular. La HDL protege frente a la aterosclerosis a través de múltiples funciones, que incluyen estimular la expulsión del colesterol, prevenir la oxidación de LDL, mantener la función de barrera endotelial y minimizar el estrés oxidativo celular y la inflamación. La concentración de HDL-C está inversamente asociada con la enfermedad cardiovascular (ECV), pero estudios recientes sugieren que los análisis de la función de las HDL pueden proporcionar nuevos marcadores independientes del riesgo de ECV. Se ha acumulado evidencia de que la modificación oxidativa de la HDL compromete sus funciones, y los estudios sugieren que la HDL oxidada es, de hecho, proaterogénica.

Durante la peroxidación de lípidos, se forman dicarbonilos altamente reactivos, que incluyen 4-oxononanal (4-ONE), malondialdehído (MDA) e isolevuglandinas (IsoLG). Estos dicarbonilos de lípidos reactivos se unen covalentemente al ADN, a proteínas y a fosfolípidos, provocando alteraciones en las funciones de las lipoproteínas y celulares. En concreto, la modificación con dicarbonilos de lípidos reactivos estimula respuestas inflamatorias y toxicidad que pueden ser importantes para la aterosclerosis. Los presentes inventores identificaron la 2-hidroxibencilamina (2-HOBA) como un captador de aldehídos altamente reactivo que reacciona selectivamente con IsoLG y con dicarbonilos estrechamente relacionados. De hecho, los presentes inventores han demostrado que la 2-HOBA protege frente a la hipertensión asociada al estrés oxidativo, la citotoxicidad inducida por oxidantes, la neurodegeneración y la formación de oligómeros de amiloide inducida por electroestimulación rápida. Si bien existen pruebas de que los aldehídos reactivos desempeñan un papel en la aterogénesis, hasta la fecha no se han examinado los efectos de la captación de aldehídos sobre el desarrollo de la aterosclerosis.

La identificación de estrategias eficaces para evaluar la contribución de los dicarbonilos de lípidos reactivos a los procesos patológicos *in vivo* ha sido un desafío. Aunque, en teoría, la formación de dicarbonilos de lípidos reactivos podría suprimirse simplemente reduciendo los niveles de especies reactivas de oxígeno ("reactive oxygen species", ROS) utilizando antioxidantes de la dieta, el uso de antioxidantes para prevenir acontecimientos cardiovasculares ateroscleróticos ha resultado problemático y la mayoría de los ensayos clínicos de criterios de valoración no lograron demostrar un beneficio. Los antioxidantes de la dieta, tales como la vitamina C y la vitamina E, son supresores relativamente ineficaces del daño oxidativo y la peroxidación de lípidos. De hecho, estudios cuidadosos de pacientes con hipercolesterolemia descubrieron que las dosis de vitamina E necesarias para reducir significativamente la peroxidación de lípidos eran sustancialmente mayores que las que suelen utilizarse en la mayoría de los ensayos clínicos. Asimismo, las altas dosis de antioxidantes necesarias para suprimir la peroxidación de lípidos se han asociado con efectos adversos importantes, probablemente porque las ROS desempeñan funciones cruciales en la fisiología normal, incluida la protección contra infecciones bacterianas y en varias vías de transducción de señales celulares. Por último, con fines de descubrimiento, el uso de antioxidantes proporciona poca información sobre el papel de los carbonilos de lípidos reactivos, porque la supresión de ROS inhibe la formación de un amplio espectro de macromoléculas modificadas oxidativamente además de las especies de carbonilo de lípido reactivas.

Un enfoque alternativo para la supresión amplia de ROS con antioxidantes es utilizar captadores de moléculas pequeñas que reaccionan selectivamente con especies de dicarbonilo de lípido sin alterar los niveles de ROS, evitando así que los dicarbonilos de lípidos modifiquen las macromoléculas celulares sin alterar la transducción de señales y la función normal de ROS. La 2-hidroxibencilamina (2-HOBA) (salicilamina) reacciona rápidamente con dicarbonilos de lípidos, tales como IsoLG, ONE y MDA, pero no con monocarbonilos de lípidos, tales como 4-hidroxi-3-penten-2-ona. El isómero de 2-HOBA 4-hidroxibencilamina (4-HOBA) es ineficaz como captador de dicarbonilo. Ambos compuestos son biodisponibles por vía oral, por lo que pueden usarse para examinar los efectos de la captación de dicarbonilos de lípidos *in vivo*. La 2-HOBA protege frente a la hipertensión asociada al estrés oxidativo, la citotoxicidad inducida por oxidantes, la neurodegeneración y la formación de oligómeros de amiloide inducida por electroestimulación rápida. Si bien existen pruebas de que los dicarbonilos de lípidos reactivos desempeñan un papel en la aterogénesis, hasta la fecha no se han examinado los efectos de la captación de dicarbonilos de lípidos sobre el desarrollo de la aterosclerosis.

Los presentes inventores han descubierto que el tratamiento con compuestos de la presente invención, que incluyen 2-HOBA, por ejemplo, atenúa significativamente el desarrollo de aterosclerosis en ratones *Ldlr^{-/-}* hipercolesterolémicos. Lo que es más importante, el tratamiento con los compuestos de la presente invención inhibe la muerte de las células de la lesión y la formación de un núcleo necrótico, lo que conduce a una formación de placas más estable, como lo demuestra el aumento del contenido de colágeno de la lesión y el espesor de la capa fibrosa. En coherencia con que la disminución de la aterosclerosis como consecuencia del tratamiento con 2-HOBA es debida a la eliminación de aldehídos reactivos, el contenido de MDA de la lesión aterosclerótica se redujo notablemente en los ratones tratados con 2-HOBA frente a los de control. Los presentes inventores demuestran además que el tratamiento con 2-HOBA da

como resultado una disminución de MDA-LDL y MDA-HDL en plasma. Además, la formación de aductos de MDA-apoAI disminuyó y, lo que es más importante, el tratamiento con 2-HOBA provocó una función de HDL más eficiente en la reducción de los depósitos de colesterol de los macrófagos. Por tanto, la captación de carbonilos reactivos con 2-HOBA tiene múltiples efectos terapéuticos antiaterogénicos que probablemente contribuyen a su capacidad para reducir el desarrollo de la aterosclerosis en ratones *Ldlr^{-/-}* hipercolesterolémicos.

Antes de divulgar y describir los presentes compuestos, composiciones, artículos, sistemas, dispositivos y/o métodos, se ha de entender que no se limitan a métodos sintéticos específicos, a menos que se especifique lo contrario, ni a reactivos concretos, a menos que se especifique lo contrario, ya que pueden, por supuesto, variar. También se ha de entender que la terminología utilizada en el presente documento es para los fines de describir aspectos concretos únicamente y no pretende ser limitante. Aunque se pueden utilizar en la práctica o en el ensayo de la presente invención cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, a continuación, se describen ejemplos de métodos y materiales.

Las publicaciones analizadas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo expuesto en el presente documento se ha de interpretar como un reconocimiento de que la presente invención no tiene derecho a preceder a tal publicación en virtud de la invención anterior. Por otra parte, las fechas de publicación proporcionadas en el presente documento pueden ser distintas de las fechas de publicación reales, que puede ser necesario confirmar de forma independiente.

Tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un grupo funcional", "un alquilo" o "un residuo" incluye mezclas de dos o más de dichos grupos funcionales, alquilos o residuos, y similares.

Los intervalos se pueden expresar en el presente documento como desde "aproximadamente" un valor concreto y/o asta "aproximadamente" otro valor concreto. Cuando se expresa un intervalo de este tipo, otro aspecto incluye desde un valor concreto y/o hasta el otro valor concreto. De forma similar, cuando se expresan valores como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor concreto forma otro aspecto. Se entenderá además que los valores extremos de cada uno de los intervalos son significativos con respecto al otro valor extremo, e independientemente del otro valor extremo. Se entiende también que en el presente documento se divulga un número de valores y que cada valor se divulga también en el presente documento como "aproximadamente" este valor concreto, además del valor mismo. Por ejemplo, si se divulga el valor "10", entonces también se divulga "aproximadamente 10". Se entiende también que cada unidad entre dos unidades concretas también se divulga. Por ejemplo, si se divulgan 10 y 15, entonces también se divulgan 11, 12, 13 y 14.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "opcional" u "opcionalmente" significan que el acontecimiento o circunstancia descritos posteriormente se pueden producir o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho acontecimiento o circunstancia se produce y casos en los que no.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a una diana de administración. El sujeto de los métodos divulgados en el presente documento puede ser un vertebrado, tal como un mamífero, un pez, un ave, un reptil o un anfibio. Por tanto, el sujeto de los métodos divulgados en el presente documento puede ser un ser humano, un primate no humano, un caballo, un cerdo, un conejo, un perro, una oveja, una cabra, una vaca, un gato, una cobaya o un roedor. El término no indica una edad o género en particular. Por tanto, se prevé que se incluyan sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, sean macho o hembra. Un paciente se refiere a un sujeto que padece una enfermedad o trastorno. El término "paciente" incluye sujetos humanos y veterinarios.

Tal como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere al tratamiento médico de un paciente con la intención de curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, afección patológica o trastorno. Este término incluye el tratamiento activo, es decir, el tratamiento dirigido específicamente a la mejora de una enfermedad, afección patológica o trastorno, y también incluye el tratamiento causal, es decir, el tratamiento dirigido hacia la eliminación de la causa de la enfermedad, afección patológica o trastorno. Además, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, el tratamiento diseñado para el alivio de los síntomas más que para la cura de la enfermedad, la afección patológica o el trastorno; el tratamiento preventivo, es decir, el tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad, la afección patológica o el trastorno; y el tratamiento de apoyo, es decir, el tratamiento que se emplea para complementar otra terapia específica que está dirigida a la mejora de la enfermedad, afección patológica o trastorno.

Tal como se usa en el presente documento, el término "prevenir" se refiere a evitar, prevenir, obviar, impedir, detener u obstaculizar que algo suceda, especialmente mediante una acción anticipada. Se entiende que cuando se usan reducir, inhibir o prevenir en el presente documento, a menos que se indique específicamente lo contrario, también se divulga expresamente el uso de los otros dos términos. Tal como se puede observar en el presente documento, existe una superposición en la definición de tratar y prevenir.

Tal como se usa en el presente documento, el término "diagnosticado" significa haber sido sometido a un examen

físico por un experto, por ejemplo, un médico, que pone de manifiesto que tiene una afección que puede ser diagnosticada o tratada por los compuestos, composiciones o métodos divulgados en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "identificado como que necesita tratamiento para un trastorno" o similares, se refiere a la selección de un sujeto basándose en la necesidad de tratamiento del trastorno. Por ejemplo, se puede identificar un sujeto que tiene una necesidad de tratamiento de un trastorno (por ejemplo, un trastorno relacionado con la inflamación) basándose en un diagnóstico más temprano por parte de un experto y, posteriormente, se puede someter a tratamiento para el trastorno. Se contempla que la identificación puede ser efectuada, en un aspecto, por una persona diferente a la persona que realiza el diagnóstico. También se contempla, en otro aspecto, que la administración pueda ser efectuada por alguien que posteriormente realice la administración.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "administrar" y "administración" se refieren a cualquier método de suministro de un preparado farmacéutico a un sujeto. Tales métodos son bien conocidos para los expertos en la materia e incluyen, entre otros, la administración oral, la administración transdérmica, la administración por inhalación, la administración nasal, la administración tópica, la administración intravaginal, la administración oftálmica, la administración intraauricular, la administración intracerebral, la administración rectal y la administración parenteral, incluida inyectable, tal como la administración intravenosa, la administración intraarterial, la administración intramuscular y la administración subcutánea. La administración puede ser continua o intermitente. En diversos aspectos, un preparado puede administrarse terapéuticamente; es decir, se administra para tratar una enfermedad o afección existente. En diversos otros aspectos, un preparado puede administrarse profilácticamente; es decir, se administra para la prevención de una enfermedad o afección.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que es suficiente para lograr el resultado deseado o para tener un efecto sobre una afección indeseada. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es suficiente para lograr el resultado terapéutico deseado o para tener un efecto sobre síntomas no deseados, pero generalmente es insuficiente para causar efectos secundarios adversos. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente concreto dependerá de diversos factores, que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente; el momento de la administración; la vía de administración; la tasa de excreción del compuesto concreto empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o simultáneos con el compuesto específico empleado y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está dentro de las habilidades del experto comenzar con dosis de un compuesto a niveles inferiores a los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. Si se desea, la dosis diaria eficaz se puede dividir en múltiples dosis para fines de administración. En consecuencia, las composiciones de dosis única pueden contener tales cantidades o submúltiplos de estas para componer la dosis diaria. Cada médico puede ajustar la dosis en el caso de cualquier contraindicación. La posología puede variar, y se puede administrar en una o más administraciones de la dosis a diario, durante uno o varios días. Se pueden encontrar en la bibliografía directrices para las dosis adecuadas de clases determinadas de productos farmacéuticos. En diversos otros aspectos, un preparado se puede administrar en una "cantidad profilácticamente eficaz"; es decir, una cantidad eficaz para la prevención de una enfermedad o afección.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles, así como polvos estériles para su reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso. Algunos ejemplos de vehículos, diluyentes, disolventes o portadores acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, tales como parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse con la inclusión de agentes, tales como monoestearato de aluminio y gelatina, que retardan la absorción. Las formas inyectables de depósito de liberación prolongada se preparan formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables, tales como polilactida-policáido, poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). En función de la proporción entre el fármaco y el polímero y de la naturaleza del polímero concreto empleado, puede controlarse la velocidad de liberación del fármaco. Las formulaciones inyectables de depósito de liberación prolongada también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones, que son compatibles con los tejidos corporales. Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes de su uso. Algunos vehículos inertes adecuados pueden incluir azúcares, tales como lactosa. De manera deseable, al menos el 95 % en peso de las partículas del principio activo tiene un tamaño de partícula eficaz en el intervalo de 0,01 a 10 micrómetros.

Tal como se usa en el presente documento, el término "captador" se refiere a una sustancia química que se puede administrar con el fin de eliminar o inactivar impurezas o productos de reacción no deseados. Por ejemplo, los isocetales forman aductos de manera irreversible específicamente con residuos de lisina en las proteínas. Los captadores de isocetales de la presente invención reaccionan con isocetales antes de que estos formen un aducto con los residuos de lisina. Por consiguiente, los compuestos de la presente invención "captan" isocetales, evitando así que formen un aducto con las proteínas.

Tal como se usa en el presente documento, se contempla que el término "sustituido" incluya todos los sustituyentes permitidos de los compuestos orgánicos. En un amplio aspecto, los sustituyentes permitidos incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, sustituyentes carbocíclicos y heterocíclicos, y aromáticos y no aromáticos de compuestos orgánicos. Algunos sustituyentes ilustrativos incluyen, por ejemplo, los que se describen a continuación. Los sustituyentes permitidos pueden ser uno o más y el mismo o diferente para los compuestos orgánicos adecuados. Para los fines de la presente divulgación, los heteroátomos, tales como nitrógeno, pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquier sustituyente permitido de los compuestos orgánicos descritos en el presente documento que satisfagan las valencias de los heteroátomos. Esta divulgación no pretende estar limitada de ninguna manera por los sustituyentes permitidos de compuestos orgánicos. Además, se entenderá que el término "sustitución" o la expresión "sustituido con" incluyen la condición implícita de que cada sustitución esté conforme con la valencia permitida del átomo sustituido y del sustituyente, y de que la sustitución de como resultado un compuesto estable, por ejemplo, un compuesto que no experimenta espontáneamente una transformación, tal como mediante reorganización, ciclación, eliminación, etc.

El término "alquilo", tal como se usa en el presente documento, es un grupo hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado de 1 a 24 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, s-butilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo, s-pentilo, neopentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, eicosilo, tetracosilo y similares. El grupo alquilo puede ser cíclico o acíclico. El grupo alquilo puede estar ramificado o no ramificado. El grupo alquilo también puede estar sustituido o no sustituido. Por ejemplo, el grupo alquilo puede estar sustituido con uno o más grupos que incluyen, entre otros, alquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo, alcoxi, amino, éter, haluro, hidroxilo, nitro, sililo, sulfo-oxo o tiol, tal como se describe en el presente documento. Un grupo "alquilo inferior" es un grupo alquilo que contiene de uno a seis (por ejemplo, de uno a cuatro) átomos de carbono.

En toda la memoria descriptiva, "alquilo" se utiliza generalmente para referirse tanto a grupos alquilo no sustituidos como a grupos alquilo sustituidos; sin embargo, los grupos alquilo sustituidos también se mencionan específicamente en el presente documento identificando los sustituyentes específicos en el grupo alquilo. Por ejemplo, la expresión "alquilo halogenado" se refiere específicamente a un grupo alquilo que está sustituido con uno o más haluros, por ejemplo, flúor, cloro, bromo o yodo. El término "alcoxi" se refiere específicamente a un grupo alquilo que está sustituido con uno o más grupos alcoxi, como se describe a continuación. El término "alquilamino" se refiere específicamente a un grupo alquilo que está sustituido con uno o más grupos amino, como se describe a continuación.

La práctica de utilizar un término general, tal como "cicloalquilo", y un término específico, tal como "alquilcicloalquilo", no pretende implicar que el término general no incluya también el término específico.

El término "cicloalquilo", tal como se utiliza en el presente documento, es un anillo no aromático basado en el carbono compuesto por al menos tres átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, entre otros, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, norbornilo y similares. El término "heterocicloalquilo" es un tipo de grupo cicloalquilo como se define anteriormente, y está incluido dentro del significado del término "cicloalquilo", en donde al menos uno de los átomos de carbono del anillo se reemplaza por un heteroátomo, tal como, entre otros, nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo. El grupo cicloalquilo y el grupo heterocicloalquilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. El grupo cicloalquilo y el grupo heterocicloalquilo pueden estar sustituidos con uno o más grupos que incluyen, entre otros, alquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo, alcoxi, amino, éter, haluro, hidroxilo, nitro, sililo, sulfo-oxo o tiol como se describe en el presente documento.

La expresión "grupo polialquileno" como se usa en el presente documento es un grupo que tiene dos o más CH_2 grupos enlazados entre sí. El grupo polialquileno puede estar representado por la fórmula $-(\text{CH}_2)_a-$, en donde "a" es un número entero de 2 a 500.

Los términos "alcoxi" y "alcoxilo", tal como se usan en el presente documento, se refieren a un grupo alquilo o cicloalquilo unido a través de un enlace éter; es decir, un grupo "alcoxi" se puede definir como $-\text{OA}^1$, en donde A^1 es alquilo o cicloalquilo como se definió anteriormente. "Alcoxi" también incluye polímeros de grupos alcoxi como se acaba de describir; es decir, un alcoxi puede ser un poliéter, tal como $-\text{OA}^1-\text{OA}^2$ o $-\text{OA}^1-(\text{OA}^2)_a-\text{OA}^3$, en donde "a" es un número entero de 1 a 200, y A^1 , A^2 y A^3 son grupos alquilo y/o cicloalquilo.

Los términos "amina" o "amino", tal como se usan en el presente documento, están representados por la fórmula $\text{NA}^1\text{A}^2\text{A}^3$, en donde A^1 , A^2 y A^3 pueden ser, independientemente, hidrógeno o un grupo alquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, arilo o heteroarilo como se describe en el presente documento.

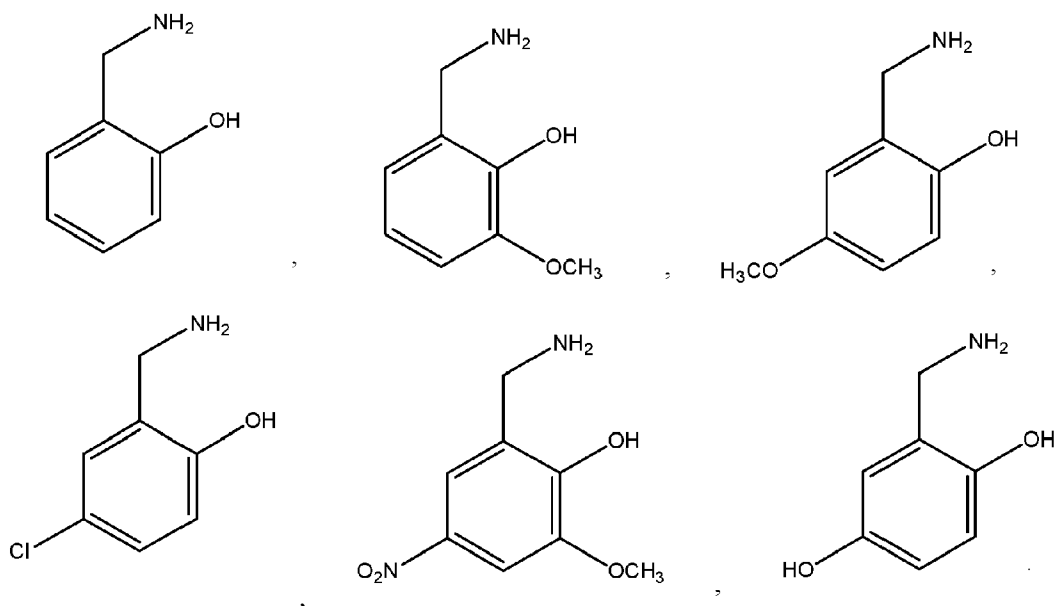
El término "hidroxilo", tal como se utiliza en el presente documento, está representado por la fórmula -OH.

El término "nitro", tal como se utiliza en el presente documento, está representado por la fórmula -NO₂.

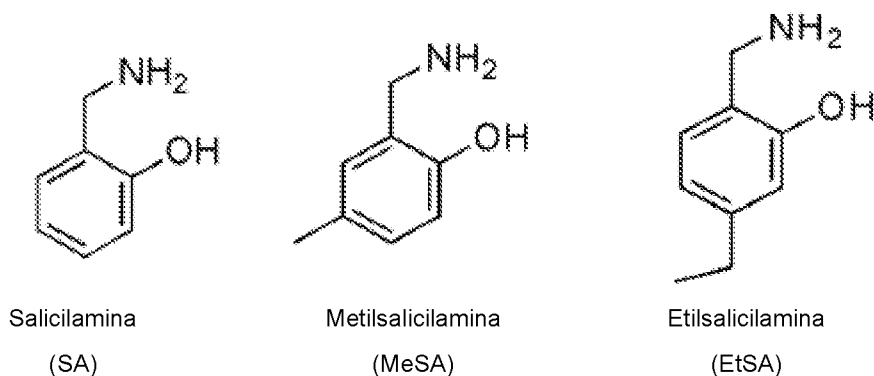
- 5 La expresión "farmacéuticamente aceptable" describe un material que no es biológicamente indeseable ni es indeseable por otras cuestiones, es decir, que no causa un nivel inaceptable de efectos biológicos indeseables o no interactúa de manera perjudicial.

Los compuestos para su uso en la invención se pueden elegir entre:

10



- 15 Los compuestos para su uso en la invención también pueden elegirse entre:



- 20 La invención también se extiende a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos descritos. Es decir, se puede proporcionar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto divulgado o al menos un producto de un método divulgado y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 25 En otros aspectos, las composiciones farmacéuticas divulgadas comprenden los compuestos divulgados (incluidas una o más sales farmacéuticamente aceptables de estos) como principio activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos o adyuvantes. Las presentes composiciones incluyen aquellas adecuadas para la administración oral, rectal, tópica y parenteral (incluida la administración subcutánea, intramuscular e intravenosa), aunque la vía más adecuada en cualquier caso determinado dependerá del hospedador particular y de la naturaleza y gravedad de las afecciones para las que se administra el principio activo. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar de manera conveniente en una forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Cuando el compuesto de la presente

invención es ácido, su sal correspondiente se puede preparar convenientemente a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables, incluidas bases inorgánicas y bases orgánicas. Las sales derivadas de dichas bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, amonio, calcio, cobre (cúpricas y cuprosas), férricas, ferrosas, de litio, magnesio, manganeso (manganésicas y manganosas), potasio, sodio, cinc y sales similares. Se prefieren especialmente las sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, así como aminas cíclicas y aminas sustituidas, tales como aminas sustituidas de origen natural y sintetizadas. Otras bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables a partir de las cuales se pueden formar sales incluyen resinas de intercambio iónico tales como, por ejemplo, arginina, betaína, cafeína, colina, N,N-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripopilamina, trometamina y similares.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables" incluye ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos y sales preparadas a partir de estos, por ejemplo, ácido acético, bencenosulfónico, benzoico, alcanforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, mícico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, *p*-toluenosulfónico y similares. Se prefieren los ácidos cítrico, bromhídrico, clorhídrico, maleico, fosfórico, sulfúrico y tartárico.

En la práctica, los compuestos de la invención, o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, de la presente invención se pueden combinar como principio activo mezclado a fondo con un vehículo farmacéutico de acuerdo con técnicas convencionales de composición farmacéutica. El vehículo puede tomar una amplia variedad de formas en función de la forma de preparación deseada para su administración, por ejemplo, oral o parenteral (incluida intravenosa). Por tanto, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden presentar como unidades discretas adecuadas para la administración oral, tales como cápsulas, obleas o comprimidos, que contienen, cada una, una cantidad predeterminada del principio activo. Por otra parte, las composiciones se pueden presentar en forma de un polvo, en forma de gránulos, en forma de una solución, en forma de una suspensión en un líquido acuoso, en forma de un líquido no acuoso, en forma de una emulsión de aceite en agua o en forma de una emulsión líquida de agua en aceite. Además de las formas farmacéuticas habituales expuestas anteriormente, los compuestos de la invención y/o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismo, también se pueden administrar por medios de liberación controlada y/o dispositivos de administración. Las composiciones se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos de la farmacia. En general, dichos métodos incluyen una etapa de asociar el principio activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes necesarios. En general, las composiciones se preparan mezclando de manera uniforme y minuciosa el principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos. A continuación, se le puede dar forma de manera conveniente al producto en la presentación deseada.

Por tanto, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de los compuestos de la invención. Los compuestos de la invención, o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, también se pueden incluir en composiciones farmacéuticas junto con uno o más compuestos terapéuticamente activos diferentes. El vehículo farmacéutico empleado puede ser, por ejemplo, un sólido, un líquido o un gas. Algunos ejemplos de vehículos sólidos incluyen lactosa, sulfato de calcio dihidratado, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábica, estearato de magnesio y ácido esteárico. Algunos ejemplos de vehículos líquidos son el jarabe de azúcar, el aceite de cacahuete, el aceite de oliva y el agua. Algunos ejemplos de vehículos gaseosos incluyen dióxido de carbono y nitrógeno.

En la preparación de las composiciones para formas farmacéuticas orales, se puede emplear cualquier medio farmacéutico conveniente. Por ejemplo, puede usarse agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares para formar preparados líquidos orales, tales como suspensiones, elixires y soluciones; mientras que pueden usarse vehículos, tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares para formar preparados orales sólidos, tales como polvos, cápsulas y comprimidos. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas son las formas farmacéuticas unitarias orales preferidas en las que se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. Opcionalmente, los comprimidos se pueden recubrir mediante técnicas acuosas o no acuosas convencionales.

Se puede preparar un comprimido que contiene la composición de la presente invención mediante compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares o adyuvantes. Los comprimidos que se han comprimido se pueden preparar mediante compresión, en una máquina adecuada, del principio activo en una forma fluida, tal como polvos o gránulos, opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden preparar mediante moldeo en una máquina adecuada, de una mezcla del compuesto en polvo hidratado con un diluyente líquido inerte.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender un compuesto de la invención (o sales farmacéuticamente aceptables del mismo) como principio activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente uno o más agentes terapéuticos o adyuvantes adicionales. Las presentes composiciones incluyen composiciones adecuadas para la administración oral, rectal, tópica y parenteral (incluida la administración

subcutánea, intramuscular e intravenosa), aunque la vía más adecuada en cualquier caso determinado dependerá del hospedador particular y de la naturaleza y gravedad de las afecciones para las que se administra el principio activo. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar de manera conveniente en una forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia.

Se pueden preparar composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para la administración parenteral en forma de soluciones o suspensiones de los compuestos activos en agua. Se puede incluir un tensioactivo adecuado tal como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos en aceites. Por otra parte, se puede incluir un conservante para evitar el crecimiento perjudicial de microorganismos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para un uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles. Asimismo, las composiciones pueden estar en forma de polvos estériles para la preparación improvisada de dichas soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma inyectable final debe ser estéril y debe ser eficazmente fluida para facilitar la inyectabilidad. Las composiciones farmacéuticas deben ser estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento; por tanto, se deben proteger preferentemente frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), aceites vegetales y mezclas adecuadas de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar en una forma adecuada para su uso tópico, tal como, por ejemplo, un aerosol, crema, pomada, loción, polvo fino, enjuagues bucales, gargarismos y similares. Por otra parte, las composiciones pueden estar en una forma adecuada para su uso en dispositivos transdérmicos. Estas formulaciones se pueden preparar con un compuesto de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, mediante métodos de procesamiento convencionales. Como ejemplo, se prepara una crema o pomada mezclando material hidrófilo y agua, junto con aproximadamente del 5 % en peso a aproximadamente el 10 % en peso del compuesto, para producir una crema o pomada que tenga una consistencia deseada.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar en una forma adecuada para la administración rectal, en donde el vehículo es un sólido. Es preferible que la mezcla forme supositorios de dosis unitaria. Algunos vehículos adecuados incluyen manteca de cacao y otros materiales usados habitualmente en la técnica. Los supositorios se pueden formar de manera conveniente mezclando en primer lugar la composición con el vehículo o vehículos ablandados o fundidos, seguido del enfriamiento y la conformación en moldes.

Además de los ingredientes de vehículo mencionados anteriormente, las formulaciones farmacéuticas descritas anteriormente pueden incluir, según corresponda, uno o más ingredientes de vehículo adicionales, tales como diluyentes, tampones, agentes aromatizantes, aglutinantes, agentes tensioactivos, espesantes, lubricantes, conservantes (incluidos antioxidantes) y similares. Asimismo, se pueden incluir otros adyuvantes para hacer que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado. Las composiciones que contienen un compuesto de la invención y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo también se pueden preparar en forma de polvo o concentrado líquido.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar como el único agente farmacéutico activo, o se pueden usar junto con uno o más agentes útiles para tratar o prevenir diversas complicaciones, tales como, por ejemplo, enfermedades relacionadas con la aterosclerosis. Cuando se administran en forma de combinado, los agentes terapéuticos pueden formularse en forma de composiciones separadas que se administran al mismo tiempo o en momentos diferentes, o los agentes terapéuticos pueden administrarse como una sola composición.

Tal como se indica en el presente documento, los compuestos de la presente invención se pueden preparar en forma sólida (incluidos gránulos, polvos o supositorios) o en forma líquida (por ejemplo, soluciones, suspensiones o emulsiones). Se pueden aplicar en una diversidad de soluciones y se pueden someter a procedimientos farmacéuticos convencionales, tales como esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales, tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, tampones, etc.

Por tanto, para su administración, los compuestos de la presente invención normalmente se combinan con uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración indicada. Por ejemplo, se pueden mezclar con lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, goma arábiga, gelatina, alginato de sodio, polivinilpirrolidina y/o poli(alcohol vinílico) y, opcionalmente, se comprimen o encapsulan para su administración convencional. Como alternativa, se pueden disolver en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, etanol, aceite de maíz, el aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, goma de tragacanto y/o diversos tampones. Otros adyuvantes y modos de administración son bien conocidos en la técnica farmacéutica. El vehículo o diluyente puede incluir un material de liberación retardada, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica.

En aplicaciones terapéuticas, los compuestos de la presente invención se pueden administrar a un paciente mamífero en una cantidad suficiente para reducir o inhibir la indicación deseada. Las cantidades eficaces para este uso dependen de factores que incluyen, entre otros, la vía de administración, el estadio y la gravedad de la indicación, el estado general de salud del mamífero y el criterio del médico prescriptor. Los compuestos de la presente invención son seguros y eficaces en un amplio intervalo de dosis. Sin embargo, se entenderá que las cantidades de piridoxamina realmente administradas serán determinadas por un médico, a la luz de las circunstancias pertinentes anteriores.

Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables de los compuestos adecuados para su uso en los métodos de la invención incluyen sales derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fluorhídrico, fosforoso y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos alcanodioicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, etc. Por tanto, tales sales incluyen sales sulfato, piro sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, nitrato, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, trifluoroacetato, propionato, caprilato, isobutirato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, mandelato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, ftalato, bencenosulfonato, toluenosulfonato, fenilacetato, citrato, lactato, maleato, tartrato, metanosulfonato y similares. También se contemplan sales de aminoácidos, tales como arginato y similares y gluconato, galacturonato, N-metilglutamina, etc. (véase, por ejemplo, Berge *et al.*, J. Pharmaceutical Science, 66: 1-19 (1977)).

Las sales de adición de ácidos de compuestos básicos se preparan poniendo en contacto la forma de base libre con una cantidad suficiente del ácido deseado para producir la sal de la manera convencional. La forma de base libre se puede regenerar poniendo en contacto la forma de sal con una base y aislando la base libre de la manera convencional. Las formas de base libre difieren de sus respectivas formas de sal en determinadas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares, pero, por lo demás, las sales son equivalentes a su respectiva base libre para los fines de la presente invención.

Los sujetos, especialmente los individuos con alto riesgo de desarrollar aterosclerosis, pueden tratarse administrando uno o más de los compuestos descritos anteriormente. Tal como se ha mencionado previamente, la dosis exacta dependerá del compuesto concreto que se administre y se determinará usando procedimientos bien conocidos en la técnica, equilibrando la toxicidad y la eficacia terapéutica. También se pueden administrar compuestos a animales de ensayo para estudiar su efecto sobre el desarrollo de placas ateroscleróticas. En estos casos, las dosis están limitadas únicamente por la toxicidad. También debe reconocerse que los compuestos inhibidores pueden administrarse como únicos agentes activos en una forma farmacéutica, o pueden combinarse con otros fármacos para mejorar la eficacia general.

Por tanto, otra realización de la presente invención es una composición para su uso en el tratamiento, la prevención o la mejora de la aterosclerosis, en donde la composición comprende un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4.

Ejemplos

Además de los ejemplos mostrados anteriormente, los siguientes ejemplos demuestran determinadas realizaciones específicas de la presente invención. Todos los ejemplos deben interpretarse como ilustrativos de determinados aspectos de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes de ésta.

Abreviaturas: 2-HOBA, 2-hidroxibencilamina; 4-HOBA, 4-hidroxibencilamina; MDA, malondialdehído; 4-HNE, 4-hidroxinonenal; IsoLG, isolevuglandinas; HDL, lipoproteínas de alta densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad; LDLR, receptor de lipoproteínas de baja densidad; ApoA1, apolipoproteína A1; ApoB, apolipoproteína B; ROS, especies de oxígeno reactivo; IL, interleucina.

Materiales y métodos:

Ratones: *Ldlr*^{-/-} y WT en ratones con trasfondo C57BL/6 se obtuvieron en Jackson Laboratory. Los protocolos con animales se realizaron de acuerdo con las regulaciones del Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Vanderbilt. Los ratones se mantuvieron con pienso o una dieta de tipo occidental que contenía un 21 % de grasa láctea y un 0,15 % de colesterol (Teklad). Ratones hembra de ocho semanas de edad fueron pretratados con vehículo solo (agua) o que contenía 1 g/l de 4-HOBA o 1 g/l de 2-HOBA. Después de dos semanas, los ratones continuaron recibiendo tratamiento y se les administró una dieta occidental durante 16 semanas para inducir hipercolesterolemia y aterosclerosis.

Cultivo celular: Se aislaron macrófagos peritoneales de ratones 72 horas después de una inyección de tioglicolato al 3 % y se mantuvieron en DMEM más suero bovino fetal al 10 % ("fetal bovine serum", FBS, Gibco) como se describió anteriormente. Las células endoteliales aórticas humanas ("human aortic endothelial cells", HAEC) se obtuvieron de Lonza y se mantuvieron en medio basal de células endoteliales-2 más FBS al 1 % y factores de crecimiento esenciales (Lonza).

Aislamiento de HDL a partir de plasma de ratón y medición de la capacidad de HDL para reducir el colesterol de macrófagos: Se aisló HDL del plasma de ratón utilizando el kit de purificación de HDL (Cell BioLabs, Inc.) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, las lipoproteínas que contenían apoB y HDL se precipitaron secuencialmente con sulfato de dextrano. A continuación, se resuspendió y se lavó la HDL. Después de retirar el sulfato de dextrano, la HDL se dializó frente a PBS. Para medir la capacidad de la HDL para reducir el colesterol de los macrófagos, macrófagos apoE^{-/-} fueron enriquecidos con colesterol mediante incubación durante 48 h en DMEM que contenía 100 µg de proteína/ml de LDL acetilada. Luego se lavaron las células y se incubaron durante 24 h en DMEM solo o con 25 µg de proteína de HDL/ml. El colesterol celular se midió antes y después de la incubación con HDL usando un ensayo enzimático de colesterol como se describe.

Medición de MDA-LDL, MDA-HDL y MDA-ApoAI: Se utilizó un ELISA de tipo "sandwich" para medir los niveles plasmáticos de MDA-LDL y MDA-HDL siguiendo las instrucciones del fabricante (Cell BioLabs, Inc.). Brevemente, se agregaron muestras aisladas de LDL o HDL y patrones de MDA-HDL a placas recubiertas con anti-MDA y, después del bloqueo, las muestras se incubaron con anticuerpo primario anti-apoB o anti-ApoAI biotinilado. A continuación, las muestras se incubaron durante 1 hora con conjugado de estreptavidina-enzima y 15 minutos con solución de sustrato. Después de detener la reacción, se midió la D.O. a una longitud de onda de 450 nm. Se detectó el MDA-ApoAI en plasma de ratón mediante inmunoprecipitación de ApoAI y transferencia Western. Brevemente, se prepararon 50 µl de plasma de ratón con 450 µl de tampón de lisis IP (Pierce) más una mezcla de inhibidor de proteasa al 0,5 % (Sigma) y se inmunoprecipitaron con 10 µg de anticuerpo policlonal contra ApoAI de ratón (Novus). A continuación, se agregaron 25 µl de esferas magnéticas (Invitrogen) y la mezcla se incubó durante 1 hora a 4 °C con rotación. A continuación, se recogieron las esferas magnéticas, se lavaron tres veces y se añadió a las esferas tampón de muestra de SDS-PAGE con β-mercaptoetanol. Después de la incubación a 70 °C durante 5 min, se aplicó un campo magnético al Magnetic Separation Rack (Nueva Inglaterra) y el sobrenadante se usó para detectar ApoAI o MDA de ratón. Para la transferencia Western, se resolvieron 30-60 µg de proteínas mediante electroforesis NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Bioscience). Las membranas se sondaron con anticuerpos primarios de conejo específicos para ApoAI (Novus) o MDA (Cell Signaling) y un anticuerpo secundario IRDye 680 (LI-COR) marcado con fluorescencia. Las proteínas se visualizaron y cuantificaron mediante el software de cuantificación Odyssey 3.0 (LI-COR).

Modificación de HDL y LDL con MDA: Se preparó MDA inmediatamente antes de su uso mediante hidrólisis ácida rápida de maloncarbonil bis-(dimetilacetil) como se describe. Brevemente, se añadieron 20 µl de HCl 1 M a 200 µl de maloncarbonil bis-(dimetilacetil) y la mezcla se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. La concentración de MDA se determinó mediante absorbancia a 245 nm, utilizando el factor de coeficiente 13, 700 M⁻¹ cm⁻¹. La HDL (10 mg de proteína/ml) y dosis crecientes de MDA (0, 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM) se incubaron a 37 °C durante 24 h en tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7,4) que contenía DTPA 100 µM. Las reacciones se iniciaron añadiendo MDA y se detuvieron mediante diálisis de las muestras frente a PBS a 4 °C. Se modificó la LDL (5 mg/ml) *in vitro* con MDA (10 mM) en presencia de vehículo solo o con 2-HOBA a 37 °C durante 24 h en tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7,4) que contenía DTPA 100 µM. Las reacciones se iniciaron añadiendo MDA y se detuvieron mediante diálisis de las muestras frente a PBS a 4 °C. Las muestras de LDL se incubaron durante 24 h con macrófagos y el contenido de colesterol de las células se midió utilizando un ensayo enzimático de colesterol como se describe.

Análisis de aterosclerosis y tinción de inmunofluorescencia en secciones transversales: La extensión de la aterosclerosis se examinó tanto en secciones transversales de la aorta proximal teñidas con Oil-Red-O como mediante análisis en proyección de cirujano utilizando el sistema de obtención de imágenes KS300 (Kontron Elektronik GmbH). Para la tinción de inmunofluorescencia, se fijaron secciones transversales de 5 µm de la aorta proximal en acetona fría (Sigma), se bloquearon en Background Buster (Innovex), y se incubaron con los anticuerpos primarios indicados (MDA y CD68) a 4 °C durante la noche. Después de la incubación con anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia a 37 °C durante 1 hora, el núcleo se contratiñó con Hoechst. Las imágenes se capturaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus IX81) y el software SlideBook 6 (Intelligent-Image) y se cuantificaron utilizando el software ImageJ (NIH).

Apoptosis celular *in vitro* y análisis de apoptosis y eferocitosis de lesiones: La apoptosis celular se indujo como se indica y se detectó mediante tinción con anexina V marcada con fluorescencia y se cuantificó mediante citometría de flujo (BD 5 LSRII) o contando células positivas para anexina V en imágenes capturadas con un microscopio fluorescente. Las células apoptóticas en la lesión aterosclerótica se midieron mediante tinción con TUNEL de secciones transversales de aorta proximal aterosclerótica como se describió anteriormente. Las células positivas para TUNEL no asociadas con macrófagos vivos se consideraron células apoptóticas libres y las células apoptóticas asociadas a macrófagos se consideraron fagocitadas como una medida de la eferocitosis de la lesión como se describió anteriormente.

Tinción tricrómica de Masson: Se aplicó la tinción tricrómica de Masson para medir el contenido de colágeno de la lesión aterosclerótica, el espesor de la capa fibrosa y tamaño del núcleo necrótico siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma) y como se describió anteriormente. Brevemente, se fijaron secciones transversales de 5 µm de raíz de aorta aterosclerótica proximal con solución de Bouin, se tiñeron con hematoxilina para los núcleos (negro), con escarlata de Biebrich y ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico para el citoplasma (rojo) y con azul de anilina para el

colágeno (azul). Las imágenes fueron capturadas y analizadas para determinar el contenido de colágeno, el espesor de la capa aterosclerótica y el núcleo de necrosis mediante el software ImageJ como se describió anteriormente.

Aislamiento de ARN y RT-PCR en tiempo real: El ARN total se extrajo y se purificó utilizando el kit Aurum Total RNA (Bio-Rad) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN complementario se sintetizó con la transcriptasa inversa iScript (Bio-Rad). La cuantificación relativa del ARNm diana se realizó utilizando cebadores específicos, la sonda SYBR (Bio-Rad) y polimerasa iTaqDNA (Bio-Rad) en un termociclador IQ5 (Bio-Rad) y se normalizó con 18S, como se ha descrito anteriormente. Los cebadores 18S, IL-1 β y TNF- α utilizados fueron los descritos anteriormente.

Estadística: Los datos se presentan como la media $\pm$ EEM. La normalidad de las poblaciones de muestra se examinó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, a continuación, las diferencias entre los valores medios se determinaron mediante ANOVA unidireccional (prueba de Bonferroni *a posteriori*), prueba de Kruskal-Wallis (comparación múltiple de Dunn), prueba de Mann-Whitney y prueba de la *t* de Student utilizando GraphPad PRISM. La significación se estableció para $p < 0,05$.

Resultados:

El tratamiento con 2-HOBA atenúa la aterosclerosis sin alterar el colesterol plasmático en ratones *Ldlr*^{-/-}. Ratones *Ldlr*^{-/-} fueron alimentados con una dieta occidental durante 16 semanas y fueron tratados continuamente con vehículo solo (agua) o agua que contenía 2-HOBA o 4-HOBA, un análogo no reactivo. El tratamiento con 2-HOBA redujo la extensión de la aterosclerosis aórtica proximal en un 31,1 % y un 31,5 %, en comparación con el tratamiento con vehículo o 4-HOBA, respectivamente (figuras 1A y 1B). Además, el análisis en proyección de cirujano de la aorta demuestra que el tratamiento de los ratones *Ldlr*^{-/-} con 2-HOBA redujo la aterosclerosis en un 60,3 % y un 59,1 % en comparación con la administración de vehículo y 4-HOBA, respectivamente (figuras 1C y 1D). En comparación con la administración de vehículo o 4-HOBA, el tratamiento con 2-HOBA no afectó el peso corporal (datos no mostrados). Además, los niveles plasmáticos de colesterol total y triglicéridos no fueron significativamente diferentes entre los 3 grupos de ratones (figura 1E). Por tanto, por primera vez, los presentes inventores demuestran que el tratamiento con 2-HOBA disminuye significativamente el desarrollo de aterosclerosis en un modelo de ratón experimental sin cambiar los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma. De acuerdo con los efectos del 2-HOBA sobre la aterosclerosis debidos a la captación de aldehídos, los niveles de MDA en la aorta proximal se redujeron en un 68,5 % y un 66,8 % en ratones tratados con 2-HOBA en comparación con los ratones tratados con vehículo solo o 4-HOBA (figuras 2A y 2B).

El tratamiento con 2-HOBA favorece la formación de placas ateroscleróticas más estables en ratones *Ldlr*^{-/-} hipercolesterolémicos: Como las placas vulnerables presentan un mayor riesgo de sufrir acontecimientos cardiovasculares agudos, los presentes inventores examinaron los efectos del tratamiento con 2-HOBA sobre la estabilización de la placa cuantificando el contenido de colágeno de la lesión aterosclerótica, el espesor de la capa fibrosa y el núcleo necrótico (figuras 3A-3D). En comparación con la administración de vehículo o 4-HOBA, el tratamiento con 2-HOBA aumentó el contenido de colágeno de la aorta proximal en 2,7 y 2,6 veces, respectivamente (figuras 3A y 3B). Además, el espesor de la capa fibrosa fue 2,31 y 2,29 veces mayor en las lesiones de ratones tratados con 2-HOBA frente a ratones tratados con vehículo y 4-HOBA (figuras 3A y 3C). De forma importante, el porcentaje de área necrótica en la aorta proximal disminuyó en un 74,8 % y un 73,5 % en ratones tratados con 2-HOBA frente a los tratados con vehículo y 4-HOBA (figuras 3A y 3D). Considerados en conjunto, estos datos demuestran que la 2-HOBA suprime la formación de placas vulnerables en ratones *Ldlr*^{-/-} hipercolesterolémicos.

El tratamiento con 2-HOBA favorece la supervivencia celular y la eferocitosis y reduce la inflamación: Puesto que la muerte celular potenciada y la eferocitosis insuficiente favorecen la formación de núcleos necróticos y la desestabilización de las placas ateroscleróticas, los presentes inventores examinaron a continuación los efectos del tratamiento con 2-HOBA sobre la muerte celular y la eferocitosis en lesiones ateroscleróticas en la aorta proximal (figuras 4A-4D). En comparación con el tratamiento con vehículo o 4-HOBA, el número de células positivas para TUNEL se redujo en un 72,9 % y un 72,4 % en la lesión aórtica proximal de ratones tratados con 2-HOBA (figuras 4A y 4C). De acuerdo con que la captación de dicarbonilos de lípidos reactivos mantiene una eferocitosis eficiente, el número de células positivas para TUNEL no asociadas con macrófagos aumentó 1,9 y 2,0 veces en lesiones de ratones tratados con vehículo y 4-HOBA frente a 2-HOBA (figuras 4B y 4D). El examen *in vitro* de la captación de dicarbonilos con 2-HOBA sobre la susceptibilidad de macrófagos y células endoteliales a la apoptosis en respuesta al tratamiento con H₂O₂ demuestra que, en comparación con la incubación con vehículo o 4-HOBA, 2-HOBA disminuyó notablemente el número de células apoptóticas tanto en cultivos de células endoteliales como de macrófagos (figuras 5A y 5B). Además, el tratamiento con 2-HOBA redujo significativamente la respuesta inflamatoria de los macrófagos a la LDL oxidada, como lo muestran los niveles reducidos de ARNm de IL-10, IL-6 y TNF- α (figuras 5C-5E). Se observaron resultados similares en la respuesta inflamatoria de macrófagos a H₂O₂ con 2-HOBA frente al tratamiento con vehículo o con 4-HOBA (figuras 5F-5H). Considerados en conjunto, estos datos demuestran que el tratamiento con 2-HOBA mantiene una eferocitosis eficiente *in vivo* y previene la apoptosis y la inflamación en respuesta al estrés oxidativo.

Efectos de la 2-HOBA sobre la modificación de MDA y la función de las lipoproteínas y el impacto de la hipercolesterolemia familiar sobre el contenido y la función del aducto de MDA y lipoproteína: Puesto que la

modificación del LDL favorece la formación de células espumosas, los presentes inventores examinaron los efectos de la captación de dicarbonilos *in vivo* en el contenido de MDA-LDL en plasma (figura 6A). En comparación con el tratamiento con vehículo o 4-HOBA, los niveles plasmáticos de MDA-LDL se redujeron en un 57 % y un 54 % en ratones *Ldlr*^{-/-} tratados con 2-HOBA (figura 6A). Además, la captación de dicarbonilos con 2-HOBA frente al vehículo durante la modificación *in vitro* de LDL con MDA redujo la capacidad de la LDL para aumentar la acumulación de colesterol en los macrófagos (figura 6B). El examen del contenido de MDA-LDL en plasma de los sujetos control frente a los sujetos HF homocigóticos reveló que los pacientes con HF tenían un aumento de los aductos de MDA-LDL. Puesto que la modificación oxidativa del HDL perjudica sus funciones, los presentes inventores examinaron a continuación los efectos del tratamiento con 2-HOBA sobre el contenido y la función de HDL-MDA. El tratamiento de ratones *Ldlr*^{-/-} con 2-HOBA redujo los niveles plasmáticos de MDA-HDL en un 57 % y un 56 % (figura 7A) en comparación con el tratamiento con vehículo o 4-HOBA. A continuación, los presentes inventores examinaron la formación de aductos de ApoAI-MDA mediante inmunoprecipitación de apoAI del plasma y transferencia Western con un anticuerpo contra MDA. Después de 16 semanas con la dieta de tipo occidental, los ratones *Ldlr*^{-/-} tratados con vehículo o 4-HOBA presentaron niveles plasmáticos notablemente aumentados de MDA-apoAI y niveles plasmáticos reducidos de apoAI en comparación con ratones *Ldlr*^{-/-} que consumen una dieta de pienso (figuras 7B y 7C). En cambio, el tratamiento de ratones *Ldlr*^{-/-} que consumieron una dieta occidental con 2-HOBA redujo drásticamente los aductos plasmáticos de MDA-apoAI y aumentaron los niveles de apoAI (figuras 7B y 7C). De forma importante, la HDL aislada de ratones *Ldlr*^{-/-} tratados con 2-HOBA fue 2,2 y 1,7 veces más eficiente en la reducción de los depósitos de colesterol en células espumosas de macrófagos ApoE^{-/-} en comparación con ratones tratados con vehículo y 4-HOBA (figura 7D). De acuerdo con que la modificación con dicarbonilo de HDL desempeña un papel en el compromiso de la función de HDL, la modificación de HDL con MDA *in vitro* alteró la capacidad de la HDL para reducir el contenido de colesterol de las células espumosas de macrófagos de una manera dependiente de la dosis (figura 7E). De forma importante, el plasma de sujetos humanos con HF homocigótica antes y después de la aféresis (LA) de LDL tenía 5,9 veces y 5,6 veces más aductos de MDA-HDL en comparación con el plasma de control (figura 7F). Además, la HDL de los sujetos HF frente a los sujetos de control carecía de la capacidad de reducir el contenido de colesterol de los macrófagos ApoE^{-/-} enriquecidos con colesterol (figura 7G). Considerado en conjunto, la captación de dicarbonilos con 2-HOBA previene la formación de células espumosas de macrófagos al reducir la modificación de LDL por los dicarbonilos y al mejorar la capacidad de la HDL de expulsión neta de colesterol. Además, estos ejemplos demuestran que la captación de dicarbonilos de lípidos reactivos con realizaciones de la presente invención es un enfoque terapéutico en seres humanos, dado que las LDL y HDL de sujetos con HF homocigótica contienen una mayor cantidad de MDA y mejoran la formación de células espumosas.

Análisis:

La peroxidación de lípidos inducida por estrés oxidativo se ha implicado en el desarrollo de la aterosclerosis. Los defectos genéticos y/o factores ambientales provocan un desequilibrio entre el estrés oxidativo y la capacidad del organismo para contrarrestar o desintoxicar los efectos nocivos de los productos de la oxidación. La gran cantidad de pruebas experimentales que sugieren un papel importante de la peroxidación de lípidos en la patogénesis de la aterosclerosis ha estimulado un enorme interés en el potencial de los antioxidantes para prevenir la enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Aunque algunos ensayos con antioxidantes de la dieta en seres humanos demostraron reducciones en la aterosclerosis y los acontecimientos cardiovasculares, la mayoría de los grandes ensayos de criterios de valoración con antioxidantes no han logrado mostrar ningún beneficio en términos de reducción de acontecimientos cardiovasculares. Las posibles razones del fracaso de estos ensayos para reducir los acontecimientos cardiovasculares incluyen dosis inadecuadas de antioxidantes que se utilizan en los ensayos y la inhibición de la transducción de señales normal de ROS que puede ser antiaterogénica. El tratamiento con captadores de especies reactivas de dicarbonilo derivadas de la peroxidación de lípidos representa una nueva estrategia terapéutica alternativa que inhibirá los efectos adversos de las ROS sin destruir la transducción de señales normal mediada por ROS.

En el presente estudio, los presentes inventores intentaron examinar el potencial de una nueva clase de antioxidante, el captador de dicarbonilos de lípidos reactivos, para prevenir el desarrollo de aterosclerosis en ratones *Ldlr*^{-/-}. La peroxidación de lípidos en tejidos/células o en sangre produce una serie de dicarbonilos altamente reactivos que incluyen malondialdehído, isolevuglandinas y 4-oxononenal. Estos electrófilos pueden unirse covalentemente al ADN, a proteínas y a fosfolípidos, provocando alteraciones en las funciones de las lipoproteínas y celulares. Los presentes inventores son los primeros en examinar los efectos de la captación de aldehídos sobre la aterosclerosis, y los presentes inventores demuestran que 2-HOBA, un captador de aldehído reactivo, reduce significativamente el desarrollo de aterosclerosis en el modelo de ratón *Ldlr*^{-/-} hipercolesterolémico (figura 1). De forma importante, los estudios de los inventores demuestran que el tratamiento con 2-HOBA mejora notablemente las características de la estabilidad de la placa aterosclerótica, como lo demuestra la disminución de la necrosis y el aumento del espesor de la capa fibrosa y el contenido de colágeno (figura 3). Por tanto, la captación de aldehídos con 2-HOBA ofrece un potencial terapéutico para reducir el riesgo de acontecimientos clínicos que surgen de la formación de placas ateroscleróticas vulnerables. Asimismo, la captación de dicarbonilos reduce la modificación con MDA de HDL *in vivo*, mejorando así su capacidad neta de expulsión de colesterol (Figura 7). Además, la modificación con MDA aumentó en HF-HDL, lo que probablemente contribuyó a la mayor formación de células espumosas inducida por su HDL (figura 7). Considerado en conjunto, la captación de dicarbonilos con 2-HOBA ofrece un beneficio terapéutico para reducir el desarrollo de aterosclerosis y el riesgo de acontecimientos clínicos resultantes de la formación de placas ateroscleróticas vulnerables.

Las realizaciones de la presente invención demuestran que el 2-HOBA reduce el desarrollo de aterosclerosis sin disminuir los niveles de colesterol en plasma (figura 1). Sin querer ceñirse a ninguna teoría o mecanismo concretos, es probable que los efectos ateroprotectores de la 2-HOBA se deban a la captación de dicarbonilos bioactivos. El hecho de que los efectos de la 2-HOBA estén mediados por su acción como captadores de dicarbonilos se ve respaldado por el hallazgo de que la 4-HOBA, un isómero geométrico de 2-HOBA, que no es un captador, no es ateroprotector. La prevención de la aterosclerosis mediante la eliminación de los dicarbonilos refuerza sustancialmente la hipótesis de que estos dicarbonilos contribuyen a la patogénesis de la aterogénesis.

La HDL media en una serie de funciones ateroprotectoras y se han acumulado pruebas de que los marcadores de disfunción de la HDL, tales como la capacidad de expulsión de colesterol alterada, pueden ser un mejor indicador del riesgo de EAC que los niveles de HDL-C. Se ha demostrado previamente que los pacientes con HF tienen una capacidad de expulsión de colesterol HDL alterada, indicativa de HDL disfuncional. Los presentes inventores demuestran que el consumo de una dieta occidental por ratones *Ldlr^{-/-}* da como resultado una mayor formación de aductos de MDA-apoAI (figura 7), y que ese tratamiento con 2-HOBA reduce drásticamente la modificación tanto de apoAI como de HDL con MDA. De forma similar, los pacientes con HF tenían niveles plasmáticos elevados de aductos de MDA-HDL. Además, la modificación *in vitro* del HDL dio como resultado una disminución de la capacidad neta de expulsión de colesterol, lo cual es coherente con los estudios de Shao y colegas que demuestran que la modificación de la apoAI sin lípidos con MDA bloquea la expulsión de colesterol mediada por ABCA1. Los estudios también han demostrado que fumar cigarrillos a largo plazo aumenta la formación de aductos de MDA-HDL, y dejar de fumar conduce a una mejor función de las HDL con una mayor capacidad de expulsión de colesterol. En línea con estos resultados, los inventores han descubierto que la HDL aislada procedente de ratones tratados con 2-HOBA frente a ratones tratados con vehículo y 4-HOBA tiene una mayor capacidad para reducir los depósitos de colesterol en las células espumosas de macrófagos (figura 7). Asimismo, HF-HDL presentaba aductos de MDA notablemente aumentados y una capacidad gravemente alterada para reducir los depósitos de colesterol de los macrófagos antes y después de la aféresis de LDL (figura 7). Por tanto, es probable que uno de los mecanismos ateroprotectores del 2-HOBA sea la prevención de la formación de aductos de dicarbonilo de las proteínas de HDL, conservando así la función de HDL de expulsión neta de colesterol. Además de disminuir la modificación oxidativa de HDL, los estudios de los inventores demuestran que el tratamiento con 2-HOBA disminuye en gran medida la modificación con MDA de LDL *in vivo* e *in vitro*. Los estudios han demostrado que la modificación del LDL con MDA estimula la formación de células espumosas y una respuesta inflamatoria. De forma importante, la neutralización de los aductos de MDA-apoB con anticuerpos mejora en gran medida la regresión de la aterosclerosis en ratones *Ldlr^{-/-}* transgénicos con apoB 100 humana. Por tanto, es probable que la disminución de la aterosclerosis con el tratamiento con 2-HOBA también se deba en parte a la disminución de la modificación con dicarbonilo de la apoB.

Se han acumulado pruebas de que el aumento del estrés oxidativo en las células de la íntima arterial es fundamental para inducir el estrés del RE, la inflamación y la muerte celular en la aterogénesis. En concreto, la eferocitosis eficiente y la muerte celular limitada son fundamentales para prevenir la necrosis y la inflamación excesiva, características de la placa vulnerable. Los presentes inventores han demostrado que el tratamiento con 2-HOBA favorece características de placas ateroscleróticas más estables en ratones *Ldlr^{-/-}* (figura 3). Los presentes inventores también han demostrado que el tratamiento con 2-HOBA disminuyó el contenido de aductos de MDA de la lesión aterosclerótica (figura 2), respaldando la capacidad de captación de dicarbonilos en la íntima arterial para limitar la muerte celular inducida por el estrés oxidativo y la desestabilización de la placa. Por tanto, una realización de la presente invención implica la captación de dicarbonilos con 2-HOBA *in vitro* para limitar la apoptosis inducida por el estrés oxidativo tanto en células endoteliales como en macrófagos (figura 5). La disminución de la muerte celular probablemente se deba en parte a la respuesta inflamatoria muy disminuida al estrés oxidativo debido a la captación de dicarbonilos con 2-HOBA (figura 5). De forma importante, el tratamiento con 2-HOBA según la presente invención mantuvo una eferocitosis eficiente y redujo el número de células muertas en las lesiones ateroscleróticas (figura 4). Como resultado, la captación de dicarbonilos con 2-HOBA favoreció la formación de placas estables con menor necrosis y mayor contenido de colágeno y espesor de la capa fibrosa (figura 3). Por tanto, la capacidad de 2-HOBA para limitar la muerte y la inflamación en las células arteriales en respuesta al estrés oxidativo y para favorecer la eferocitosis eficiente en la pared arterial proporciona un nuevo mecanismo ateroprotector mediante el cual la captación de dicarbonilos favorece características de estabilización de la placa y reduce la formación de lesiones ateroscleróticas.

En conclusión, los compuestos de la presente invención suprimen el desarrollo de la aterosclerosis en ratones *Ldlr^{-/-}* hipercolesterolémicos. El tratamiento con 2-HOBA disminuyó la formación de aductos de MDA-apoAI manteniendo así una función eficiente de la HDL. Además, la prevención de los aductos de MDA-apoB disminuye la formación de células espumosas y la inflamación. Por último, dentro de la lesión aterosclerótica, la captación de dicarbonilos limitó la muerte celular, la inflamación y la necrosis, estabilizando así eficazmente las placas ateroscleróticas. Puesto que el efecto ateroprotector del tratamiento con 2-HOBA es independiente de cualquier acción sobre los niveles de colesterol plasmático, la presente invención también satisface una antigua necesidad de disminuir terapéuticamente el riesgo residual de EAC que persiste en pacientes tratados con inhibidores de la HMG-CoA reductasa.

Referencias

1. Linton, M.F., Yancey, P.G., Davies, S.S., Jerome, W.G.J., Linton, E.F. y Vickers, K.C., 2000, The Role of Lipids

and Lipoproteins in Atherosclerosis.

2. Sampson, U.K., Fazio, S. y Linton, M.F., 2012, Residual cardiovascular risk despite optimal LDL cholesterol reduction with statins: the evidence, etiology, and therapeutic challenges, *Curr. Atheroscler. Rep.*, 14:1-10.

3. Anderson, T.J., 1997, Oxidative stress, endothelial function and coronary atherosclerosis, *Cardiologia*, 42:701-714.

4. Aviram, M., 2011, Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins--inflammation and oxidative stress in atherogenesis: protective role for paraoxonases, *Curr. Opin. Lipidol.*, 22:243-244.

5. Peluso, I., Morabito, G., Urban, L., Ioannone, F. y Serafini, M., 2012, Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst, *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug Targets*, 12:351-360.

6. Kontush, A., Lindahl, M., Lhomme, M., Calabresi, L., Chapman, M.J. y Davidson, W.S., 2015, Structure of HDL: particle subclasses and molecular components, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 224:3-51.

7. Riwanto, M., Rohrer, L., von Eckardstein, A. y Landmesser, U., 2015, Dysfunctional HDL: from structure-function-relationships to biomarkers, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 224:337-366.

8. Linton, M.F., Tao, H., Linton, E.F. y Yancey, P.G., 2017, SR-BI: A Multifunctional Receptor in Cholesterol Homeostasis and Atherosclerosis, *Trends Endocrinol. Metab.*

9. Brewer, H.B., Jr. y Rader, D.J., 1991, HDL: structure, function and metabolism, *Prog. Lipid Res.*, 30:139-144.

10. Xi, H., Akishita, M., Nagai, K., Yu, W., Hasegawa, H., Eto, M., Kozaki, K. y Toba, K., 2007, Potent free radical scavenger, edaravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis, *Atherosclerosis*, 191:281-289.

11. Vasdev, S., Gill, V.D. y Singal, P.K., 2006, Modulation of oxidative stress-induced changes in hypertension and atherosclerosis by antioxidants, *Exp. Clin. Cardiol.*, 11:206-216.

12. Guo, L., Chen, Z., Amarnath, V., Yancey, P.G., Van Lenten, B.J., Savage, J.R., Fazio, S., Linton, M.F. y Davies, S.S., 2015, Isolevuglandin-type lipid aldehydes induce the inflammatory response of macrophages by modifying phosphatidylethanolamines and activating the receptor for advanced glycation endproducts, *Antioxid. Redox Signal*, 22:1633-1645.

13. Kirabo, A., Fontana, V., de Faria, A.P., Loperena, R., Galindo, C.L., Wu, J., Bikineyeva, A.T., Dikalov, S., Xiao, L., Chen, W., *et al.*, 2014, DC isoketal-modified proteins activate T cells and promote hypertension, *J. Clin. Invest.*, 124:4642-4656.

14. Davies, S.S., Bodine, C., Matafonova, E., Pantazides, B.G., Bernoud-Hubac, N., Harrison, F.E., Olson, S.J., Montine, T.J., Amarnath, V. y Roberts, L.J., 2^o, 2011, Treatment with a gamma-ketoaldehyde scavenger prevents working memory deficits in hApoE4 mice, *J. Alzheimer Dis.*, 27:49-59.

15. Davies, S.S., Brantley, E.J., Voziyan, P.A., Amarnath, V., Zagol-Ikapitte, I., Boutaud, O., Hudson, B.G., Oates, J.A. y Roberts, L.J., 2^o, 2006, Pyridoxamine analogues scavenge lipid-derived gamma-ketoaldehydes and protect against H₂O₂-mediated cytotoxicity, *Biochemistry*, 45:15756-15767.

16. Zagol-Ikapite, I., Sosa, I.R., Oram, D., Judd, A., Amarnath, K., Amarnath, V., Stec, D., Oates, J.A. y Boutaud, O., 2015, Modification of platelet proteins by malondialdehyde: prevention by dicarbonyl scavengers, *J. Lipid Res.*, 56:2196-2205.

17. Sidorova, T.N., Yermalitskaya, L.V., Mace, L.C., Wells, K.S., Boutaud, O., Prinsen, J.K., Davies, S.S., Roberts, L.J., 2nd, Dikalov, S.I., Glabe, C.G., *et al.*, 2015, Reactive gamma-ketoaldehydes promote protein misfolding and preamyloid oligomer formation in rapidly-activated atrial cells, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 79:295-302.

18. Leopold, J.A., 2015, Antioxidants and coronary artery disease: from pathophysiology to preventive therapy, *Coron. Artery Dis.*, 26:176-183.

19. Roberts, L.J., 2nd, Oates, J.A., Linton, M.F., Fazio, S., Meador, B.P., Gross, M.D., Shyr, Y. y Morrow, J.D., 2007, The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans, *Free Radic. Biol. Med.*, 43:1388-1393.

20. Amarnath, V., Amarnath, K., Amarnath, K., Davies, S. y Roberts, L.J., 2^o, 2004, Pyridoxamine: an extremely

potent scavenger of 1,4-dicarbonyls, *Chem. Res. Toxicol.*, 17:410-415.

21. Nakajima, T., Davies, S.S., Matafonova, E., Potet, F., Amarnath, V., Tallman, K.A., Serwa, R.A., Porter, N.A., Balser, J.R., Kupersmidt, S., *et al.*, 2010, Selective gamma-ketoaldehyde scavengers protect Nav1.5 from oxidant-induced inactivation, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 48:352-359.

22. Amarnath, V. y Amarnath, K., 2015, Scavenging 4-Oxo-2-nonenal, *Chem. Res. Toxicol.*, 28:1888-1890.

23. Zagol-Ikapitte, I., Amarnath, V., Bala, M., Roberts, L.J., 2nd, Oates, J.A. y Boutaud, O., 2010, Characterization of scavengers of gamma-ketoaldehydes that do not inhibit prostaglandin biosynthesis, *Chem. Res. Toxicol.*, 23:240-250.

24. Zagol-Ikapitte, I., Matafonova, E., Amarnath, V., Bodine, C.L., Boutaud, O., Tirona, R.G., Oates, J.A., Roberts li, L.J. y Davies, S.S., 2010, Determination of the Pharmacokinetics and Oral Bioavailability of Salicylamine, a Potent gamma-Ketoaldehyde Scavenger, by LC/MS/MS, *Pharmaceutics*, 2:18-29.

25. Tao, H., Yancey, P.G., Babaev, V.R., Blakemore, J.L., Zhang, Y., Ding, L., Fazio, S. y Linton, M.F., 2015, Macrophage SR-BI mediates efferocytosis via Src/PI3K/Rac1 signaling and reduces atherosclerotic lesion necrosis, *J. Lipid Res.*, 56:1449-1460.

26. Robinet, P., Wang, Z., Hazen, S.L. y Smith, J.D., 2010, A simple and sensitive enzymatic method for cholesterol quantification in macrophages and foam cells, *J. Lipid Res.*, 51:3364-3369.

27. Shao, B., Pennathur, S., Pagani, I., Oda, M.N., Witztum, J.L., Oram, J.F. y Heinecke, J.W., 2010, Modifying apolipoprotein A-I by malondialdehyde, but not by an array of other reactive carbonyls, blocks cholesterol efflux by the ABCA1 pathway, *J. Biol. Chem.*, 285:18473-18484.

28. Hartig, S.M., 2013, Basic image analysis and manipulation in ImageJ. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, capítulo 14: unidad 14 15.

29. Livak, K.J. y Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25:402-408,

30. Pirinccioglu, A.G., Gokalp, D., Pirinccioglu, M., Kizil, G. y Kizil, M., 2010, Malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PCO) levels as biomarkers of oxidative stress in subjects with familial hypercholesterolemia, *Clin. Biochem.*, 43:1220-1224.

31. Rodenburg, J., Vissers, M.N., Wiegman, A., Miller, E.R., Ridker, P.M., Witztum, J.L., Kastelein, J.J. y Tsimikas, S., 2006, Oxidized low-density lipoprotein in children with familial hypercholesterolemia and unaffected siblings: effect of pravastatin, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 47:1803-1810.

32. Mollazadeh, H., Carbone, F., Montecucco, F., Pirro, M. y Sahebkar, A., 2018, Oxidative burden in familial hypercholesterolemia, *J. Cell Physiol.*

33. Rahman, T., Hamzan, N.S., Mokhsin, A., Rahmat, R., Ibrahim, Z.O., Razali, R., Thevarajah, M. y Nawawi, H., 2017, Enhanced status of inflammation and endothelial activation in subjects with familial hypercholesterolaemia and their related unaffected family members: a case control study, *Lipids Health Dis.*, 16:81.

34. Yang, C.Y., Raya, J.L., Chen, H.H., Chen, C.H., Abe, Y., Pownall, H.J., Taylor, A.A. y Smith, C.V., 2003, Isolation, characterization, and functional assessment of oxidatively modified subfractions of circulating low-density lipoproteins, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23:1083-1090.

35. Calderón, J.C., Fernández, A.Z. y María de Jesús, A.I., 2008, [Atherosclerosis, oxidative stress and physical activity. Review], *Invest. Clin.*, 49:397-410.

36. Davies, S.S. y Zhang, L.S., 2017, Reactive Carbonyl Species Scavengers-Novel Therapeutic Approaches for Chronic Diseases, *Curr. Pharmacol. Rep.*, 3:51-67.

37. Fisher, E.A., Feig, J.E., Hewing, B., Hazen, S.L. y Smith, J.D., 2012, High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 32:2813-2820.

38. Rohatgi, A., Khera, A., Berry, J.D., Givens, E.G., Ayers, C.R., Wedin, K.E., Neland, I.J., Yuhanna, I.S., Rader, D.R., de Lemos, J.A., *et al.*, 2014, HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events, *N. Engl. J. Med.*, 371, 2383-2393.

39. Khera, A.V., Cuchel, M., de la Llera-Moya, M., Rodrigues, A., Burke, M.F., Jafri, K., French, B.C., Phillips, J.A.,

Mucksavage, M.L., Wilensky, R.L., *et al.*, 2011, Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis, *N. Engl. J. Med.*, 364, 127-135.

40. Takata, K., Imaizumi, S., Kawachi, E., Suematsu, Y., Shimizu, T., Abe, S., Matsuo, Y., Tsukahara, H., Noda, K., Yahiro, E., *et al.*, 2014, Impact of cigarette smoking cessation on high-density lipoprotein functionality, *Circ. J.*, 78:2955-2962.

41. Amaki, T., Suzuki, T., Nakamura, F., Hayashi, D., Imai, Y., Morita, H., Fukino, K., Nojiri, T., Kitano, S., Hibi, N., *et al.*, 2004, Circulating malondialdehyde modified LDL is a biochemical risk marker for coronary artery disease, *Heart*, 90:1211-1213.

42. Schiopu, A., Frendeus, B., Jansson, B., Söderberg, I., Ljungcrantz, I., Araya, Z., Shah, P.K., Carlsson, R., Nilsson, J. y Fredrikson, G.N., 2007, Recombinant antibodies to an oxidized low-density lipoprotein epitope induce rapid regression of atherosclerosis in apobec-1(-)/low-density lipoprotein receptor(-) mice, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 50:2313-2318.

43. Tsimikas, S., Miyanohara, A., Hartvigsen, K., Merki, E., Shaw, P.X., Chou, M.Y., Pattison, J., Torzewski, M., Sollors, J., Friedmann, T., *et al.*, 2011, Human oxidation-specific antibodies reduce foam cell formation and atherosclerosis progression, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 58:1715-1727.

44. Hjerpe, C., Johansson, D., Hermansson, A., Hansson, G.K. y Zhou, X., 2010, Dendritic cells pulsed with malondialdehyde modified low density lipoprotein aggravate atherosclerosis in Apoe(-) mice, *Atherosclerosis*, 209:436-441.

45. Scull, C.M. y Tabas, I., 2011, Mechanisms of ER stress-induced apoptosis in atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 31:2792-2797.

46. Bryk, D., Olejarz, W. y Zapolska-Downar, D., 2017, The role of oxidative stress and NADPH oxidase in the pathogenesis of atherosclerosis, *Postepy. Hig. Med. Dosw. (en línea)*, 71:57-68.

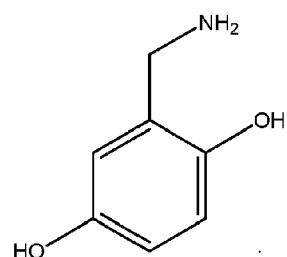
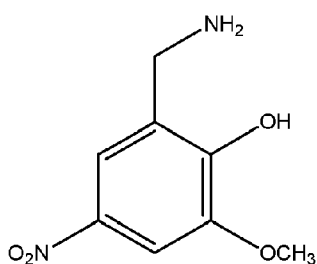
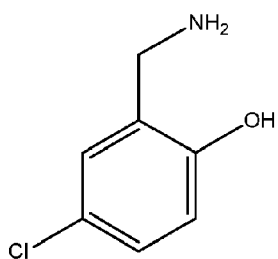
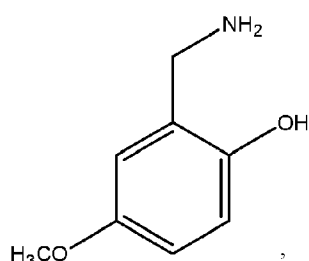
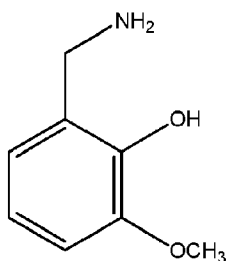
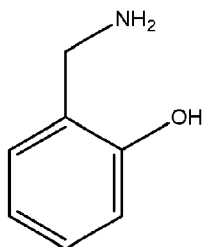
47. Tabas, I., 2007, Apoptosis and efferocytosis in mouse models of atherosclerosis, *Curr. Drug Targets*, 8:1288-1296.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades, tales como las condiciones de reacción, etc., usados en la memoria descriptiva se han de entender como que están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, salvo que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva y las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar en función de las propiedades deseadas que se busca obtener mediante la presente invención.

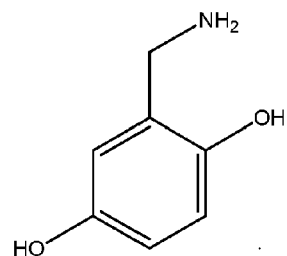
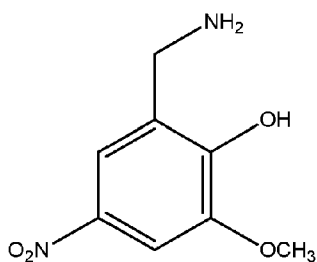
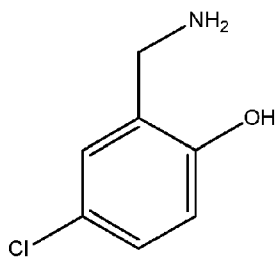
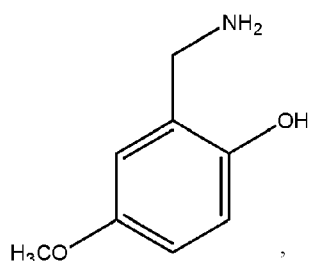
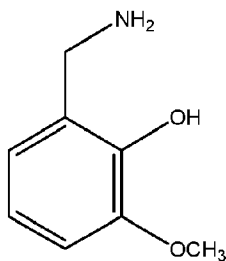
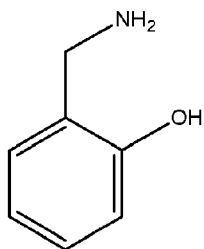
A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros que establecen el amplio alcance de la invención sean aproximaciones, los valores numéricos establecidos en las secciones experimentales o en las secciones de ejemplos se indican con la mayor precisión posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene de forma inherente determinados errores que siempre surgen de la desviación típica que aparecen en sus mediciones de ensayo respectivas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para su uso en el tratamiento, la prevención o la mejora de la aterosclerosis, en donde el compuesto es 2-hidroxibencilamina, 5-metil-2-hidroxibencilamina, o 4-etil-2-hidroxibencilamina, o tiene una estructura representada por una de las siguientes fórmulas:



2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene una estructura representada por una de las siguientes fórmulas:



3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto es 2-hidroxibencilamina, 5-metil-2-hidroxibencilamina o 4-etil-2-hidroxibencilamina.

4. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula:

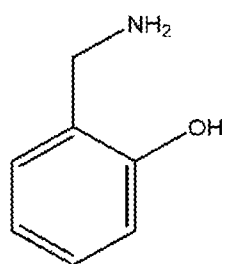


Figura 1

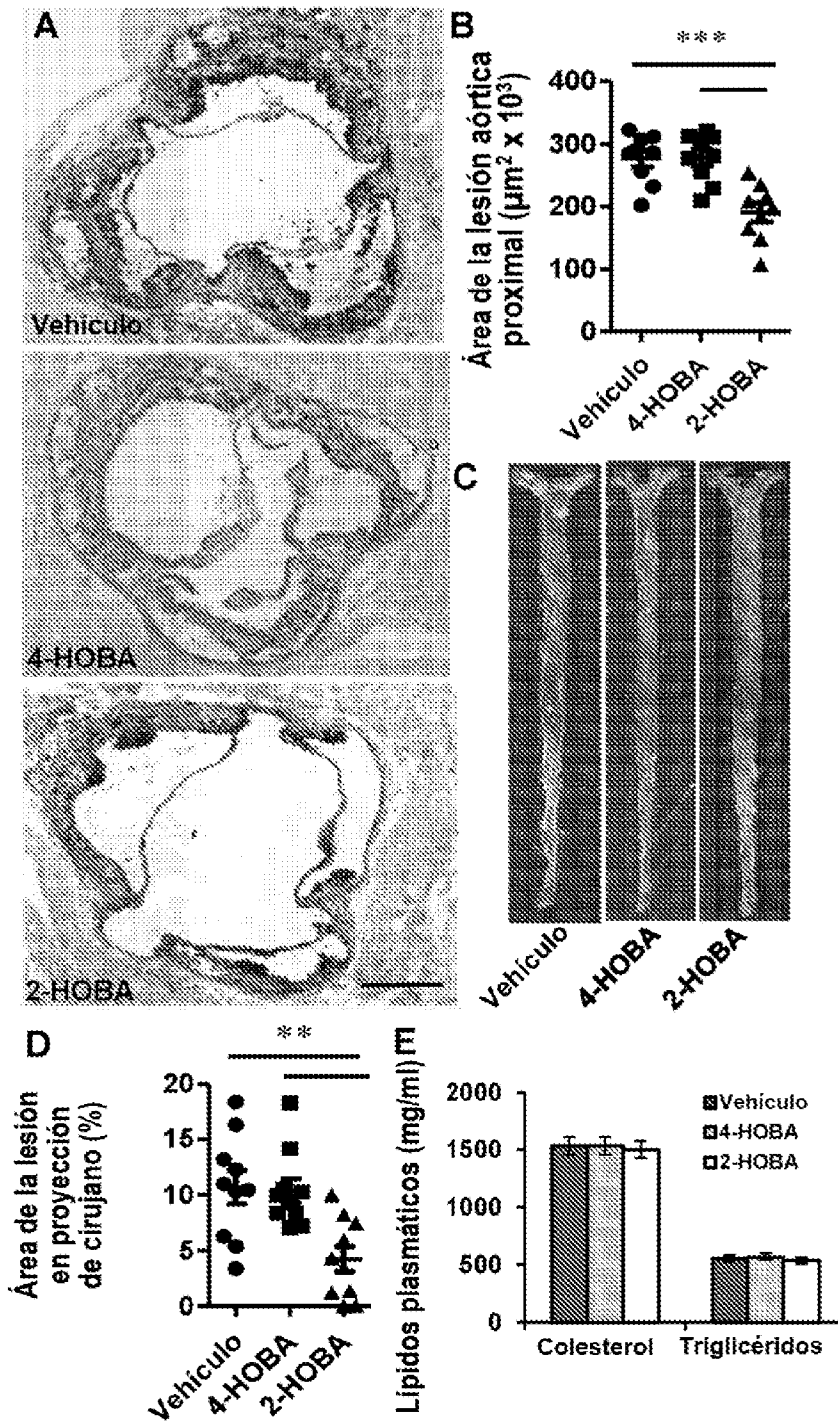


Figura 2

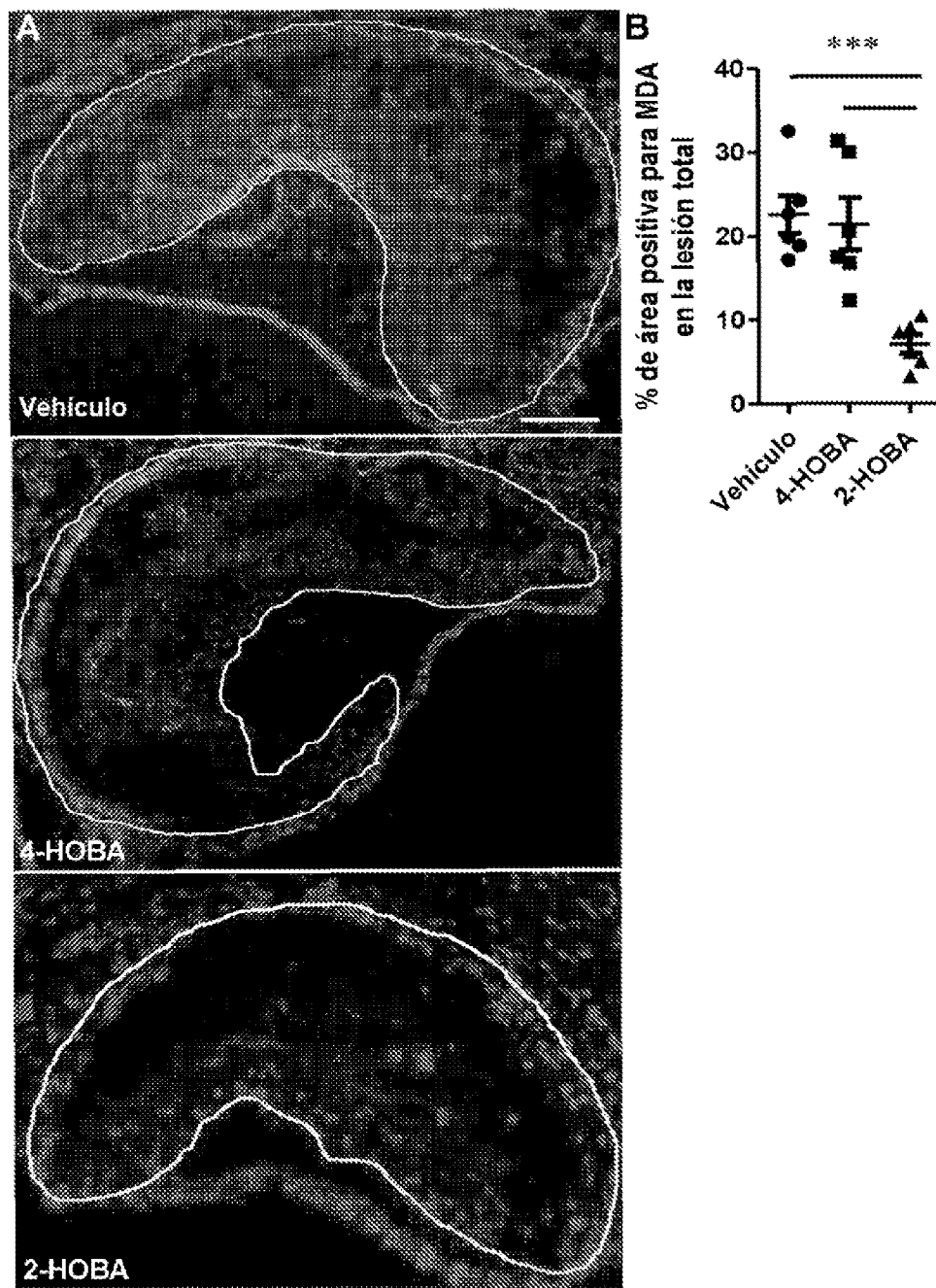


Figura 3

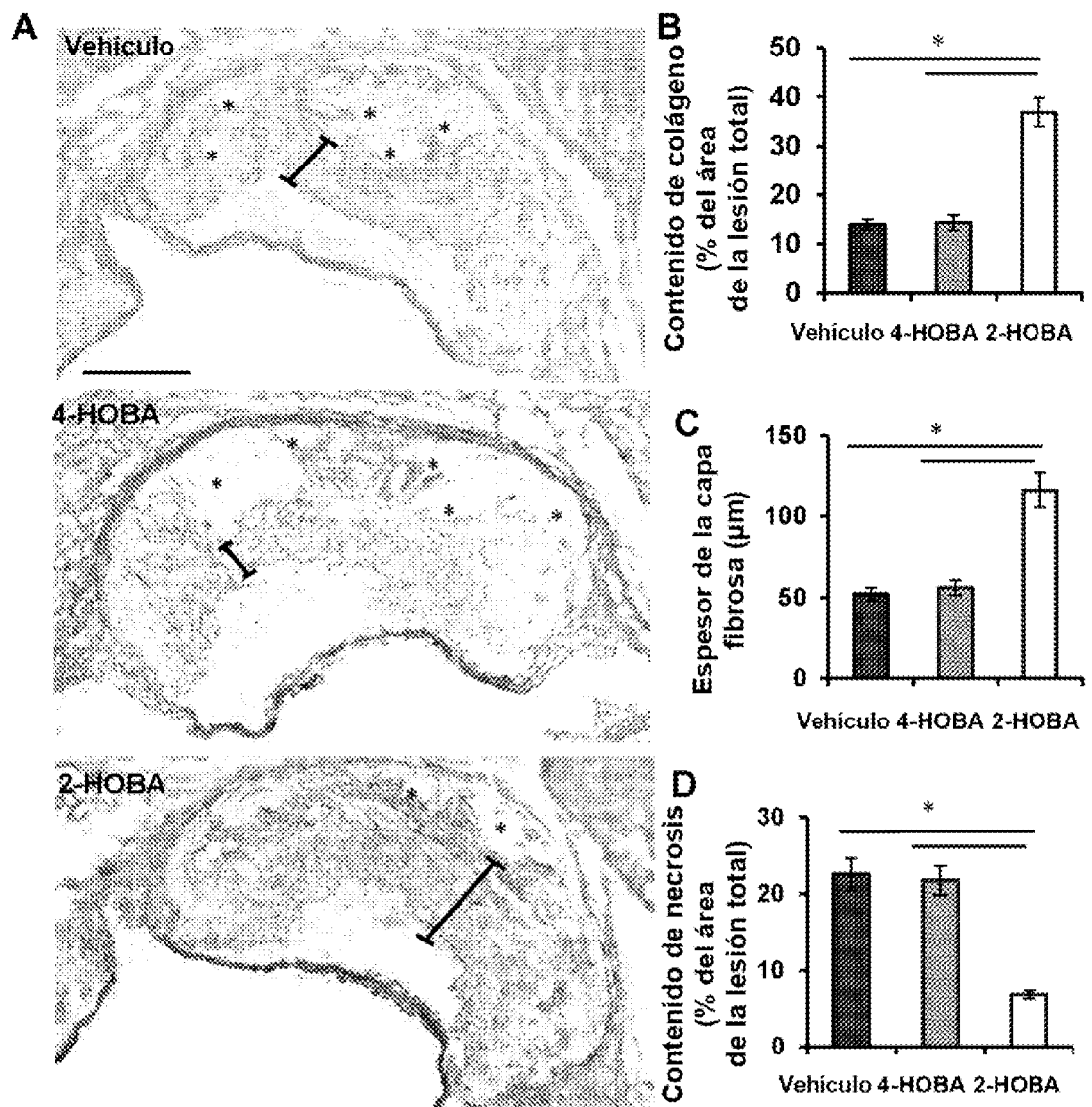


Figura 4

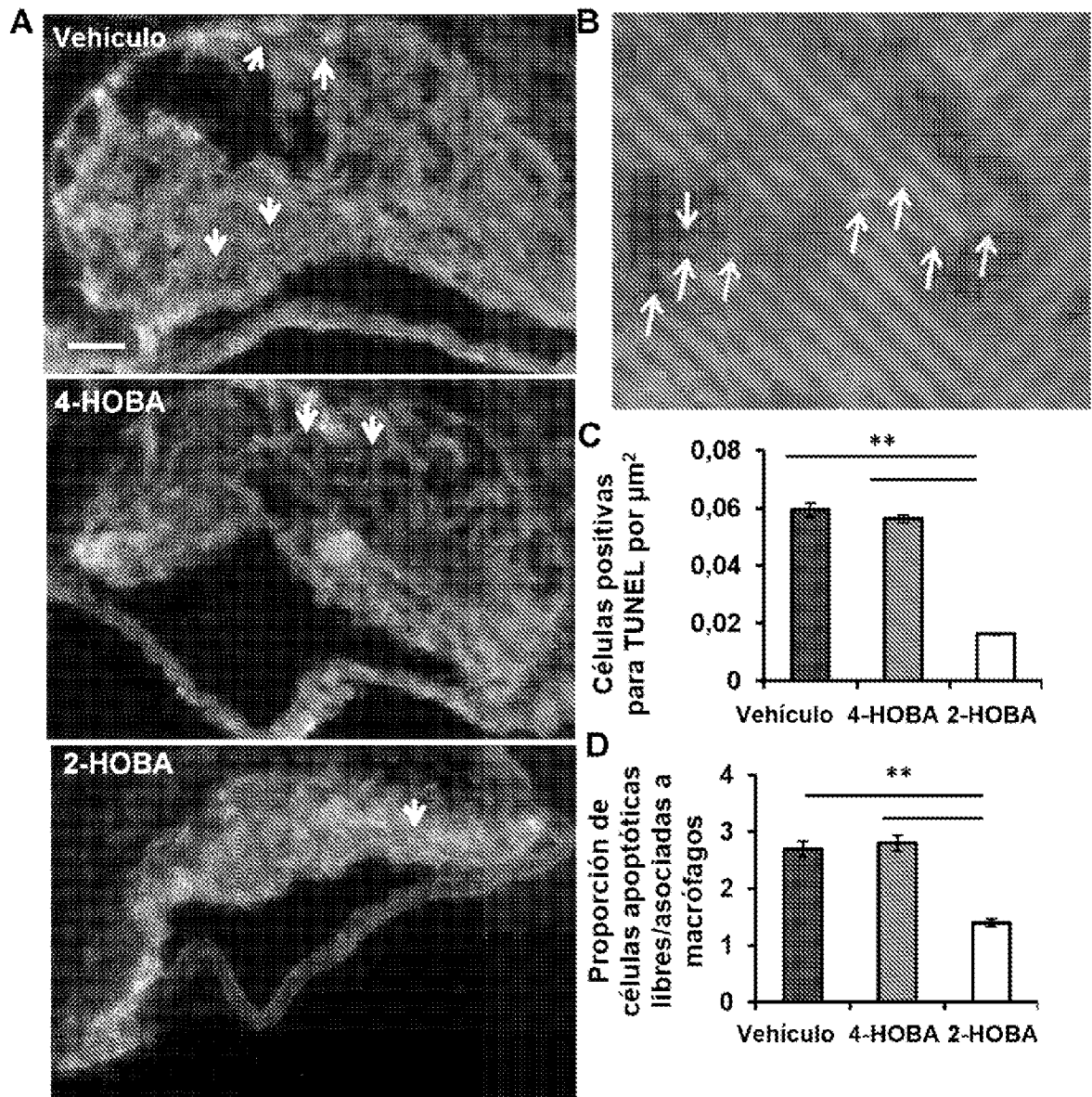


Figura 5

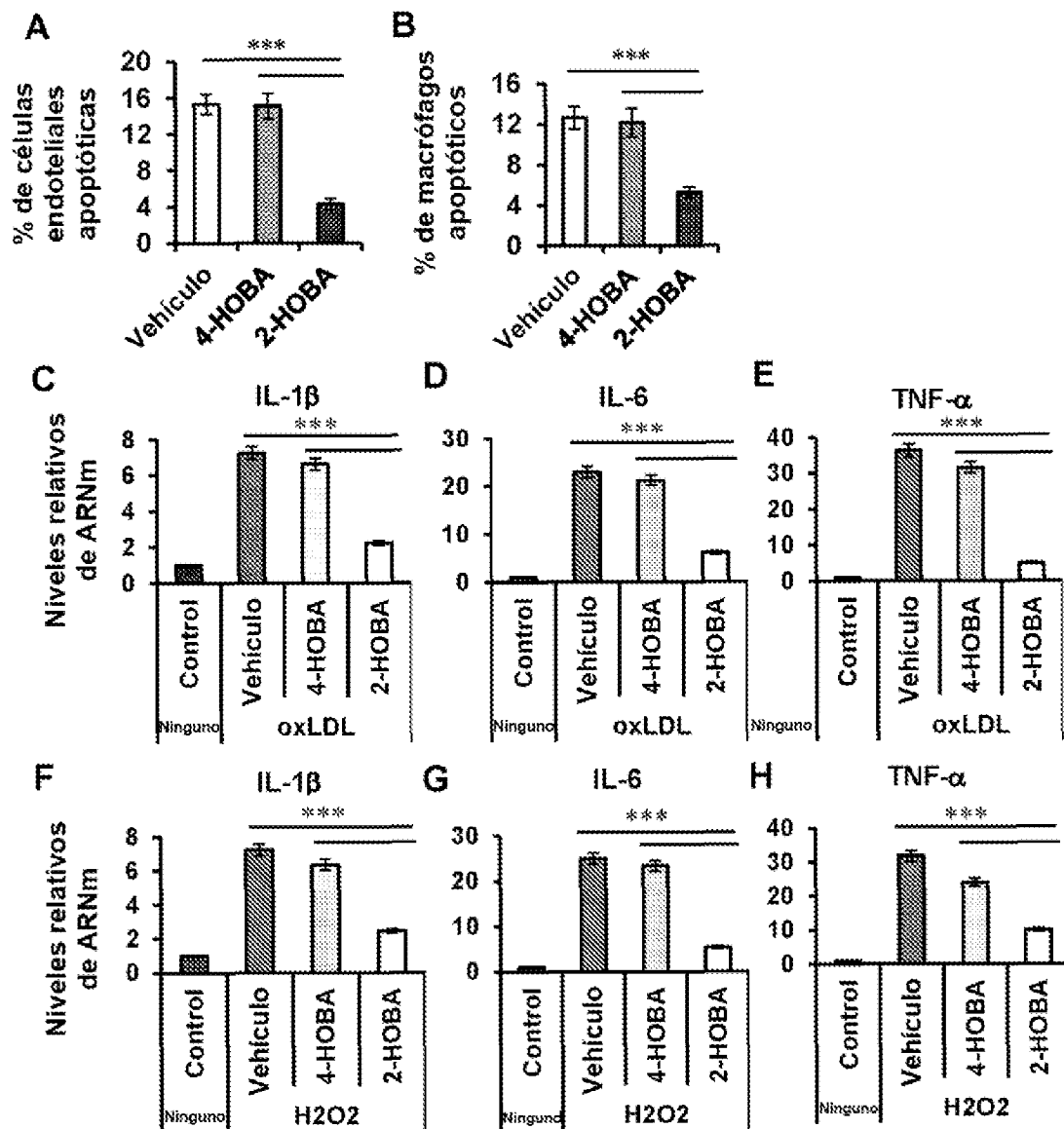


Figura 6

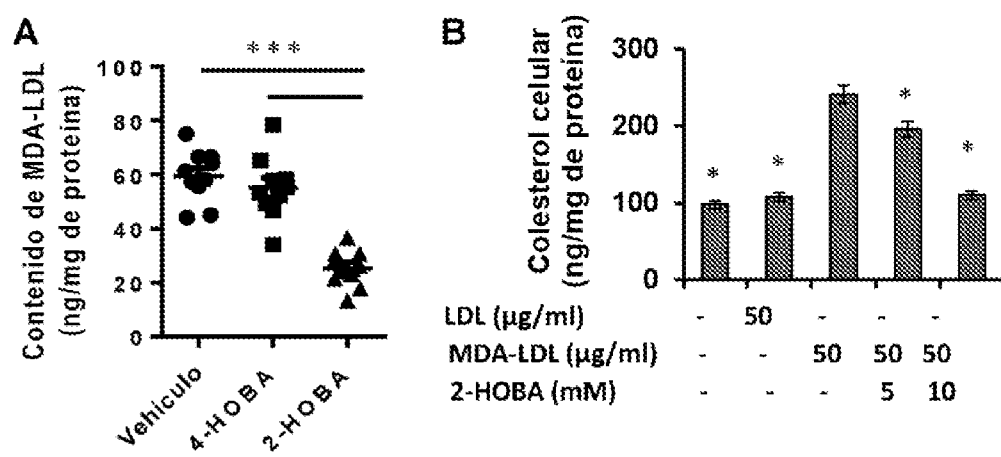


Figura 7

