

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 968 371**

51 Int. Cl.:

A61K 31/045	(2006.01)	C07D 333/36	(2006.01)	C07D 277/52	(2006.01)
A61K 31/10	(2006.01)	C07C 311/44	(2006.01)		
A61K 31/18	(2006.01)	C07D 235/30	(2006.01)		
C12Q 1/26	(2006.01)	C07D 239/69	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)	C07D 417/12	(2006.01)		
A61P 3/00	(2006.01)	C07D 261/16	(2006.01)		
A61P 7/00	(2006.01)	C07D 263/58	(2006.01)		
C07D 213/76	(2006.01)	C07D 277/82	(2006.01)		
C07D 217/02	(2006.01)	C07D 211/28	(2006.01)		
C07D 217/22	(2006.01)	C07D 295/135	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2014** **PCT/US2014/060174**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2015** **WO15054662**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2014** **E 14852765 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2023** **EP 3054936**

54 Título: **Derivados de 4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino) bencenosulfonamida como inhibidores de la 12-lipoxigenasa**

30 Prioridad:

10.10.2013 US 201361889396 P
01.05.2014 US 201461987129 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2024

73 Titular/es:

EASTERN VIRGINIA MEDICAL SCHOOL (25.0%)
735 Fairfax Avenue, Suite 1008C
Norfolk, VA 23507, US;
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA SANTA CRUZ (25.0%);
THE UNITED STATES OF AMERICA
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (25.0%) y
THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY (25.0%)

72 Inventor/es:

MALONEY, DAVID J.;
LUCI, DIANE K.;
JADHAV, AJIT;
HOLMAN, THEODORE;
NADLER, JERRY L.;
HOLINSTAT, MICHAEL;
TAYLOR-FISHWICK, DAVID;
SIMEONOV, ANTON;
YASGAR, ADAM y
MCKENZIE, STEVEN E.

ES 2 968 371 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).

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 968 371**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 968 371 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de 4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino) bencenosulfonamida como inhibidores de la 12-lipoxigenasa

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- Las lipoxigenasas son una clase de enzimas que contienen hierro no hemo y que oxidan de forma regio y estereoespecífica sustratos de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido araquidónico (AA) y el ácido linoleico (LA). (Solomon, et al. Chem. Biol. 1997, 4, 795-808; Brash, J. Biol. Chem. 1999, 274, 23679-23682.) La posición en la que se oxidan estos sustratos de *cis*, *cis*-1,4-pentadieno corresponde a la lipoxigenasa requerida, con las tres principales lipoxigenasas humanas: 5-LOX, 12-LOX y 15-LOX-1, oxidando las posiciones C-5, C-12 y C-15 respectivamente. Las lipoxigenasas intervienen en el primer paso comprometido de una cascada de vías metabólicas y los productos de estas enzimas (eicosanoides) son precursores de hormonas como los leucotrienos y las lipoxinas, que median en una amplia gama de funciones celulares. (Serhan, et al. Chem. Rev. 2011, 111, 5922-5943.) En consecuencia, las enzimas lipoxigenasas y sus metabolitos bioactivos (por ejemplo, el ácido hidroxi-eicosatetraenoico (HETE) y el leucotrieno A4) se han visto implicados en diversas enfermedades inflamatorias y cánceres.
- Concretamente, la 5-LOX se ha implicado en el cáncer y las enfermedades inflamatorias, como el asma, y sigue siendo la única enzima lipoxigenasa para la que existe un inhibidor aprobado por la FDA (Zilueton) en el mercado.
- La 15-LOX-1 reticulocitaria desempeña un papel en la aterogénesis, las enfermedades neurodegenerativas y el daño neuronal asociado a un accidente cerebrovascular isquémico agudo.
- La 12-LOX existe en forma de tres isozimas, de tipo plaquetario, leucocitario y epidérmico, pero la 12-LOX leucocitaria se encuentra en la rata, el ratón, el cerdo y la vaca, pero no en el ser humano. (Yamamoto Biochim. Biophys. Acta. 1992, 1128, 117-131; Funk et al. FEBS Lett. 1997, 402, 162-166).
- Enfermedad cutánea y hemostasia plaquetaria: Además, la 12-LOX ha demostrado un papel en las enfermedades de la piel y en la hemostasia plaquetaria.
- Trasplantes: los inhibidores de la 12-LOX también tienen utilidad en escenarios de trasplante/xenotrasplante, donde, por ejemplo, los islotes pueden tratarse ex vivo para mejorar la supervivencia antes del trasplante.
- Cáncer: Se ha descubierto que la 12-(S)-LOX (12-LOX) de tipo plaquetario se sobre expresa en diversos tejidos tumorales, como el cáncer de próstata, el cáncer colorrectal, el cáncer de mama y el cáncer de pulmón. (Catalano et al. Histol. Histopathol. 2005, 20, 969-975; Nie, D et al. Cancer Res. 1998, 58, 4047-4051; Natarajan et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1997, 82, 1790-1798; Kamitani et al. Adv. Exp. Med. Biol. 1999, 469, 593-598; Soriano et al. Cancer Res. 1999, 59, 6178-6184). Además, los niveles de 12-HETE se han relacionado con un aumento de la metástasis de las células cancerosas al facilitar la motilidad de las células tumorales y la angiogénesis. (Nappey et al. Cancer Lett. 1995, 96, 133-140; Timár et al. Int. J. Cancer, 1993, 55, 1003-1010; Honn et al. Exp. Cell. Res. 1994, 214, 120-130; Nie et al. Blood 2000, 95, 2304-2311).
- Diabetes: La diabetes de tipo 1 y de tipo 2 son trastornos graves que pueden acarrear complicaciones importantes y reducir la esperanza de vida. Existe una necesidad médica no cubierta de identificar nuevas formas de proteger las células beta en estos trastornos metabólicos. la 12-LOX se expresa en los islotes pancreáticos humanos, que son regulados al alza y activados por citoquinas inflamatorias, lo que provoca un aumento de la translocación de la 12-LOX. El producto 12-HETE resultante provoca una reducción de la secreción de insulina, una disminución de la actividad metabólica y la muerte de las células β pancreáticas a través de la amplificación de la respuesta inflamatoria. (Chen et al. Diabetologia 2005, 48, 486-495). Tanto los ratones 12-LOX diabéticos no obesos (NOD) como con inactivación de 12-LOX ("KO") mostraron una resistencia significativa al desarrollo de diabetes en comparación con los controles, lo que demuestra que la 12-LOX es un regulador en esta enfermedad.
- Enfermedad renal diabética: Además, los estudios demuestran que la activación de la vía 12-LOX desempeña un papel en el desarrollo de la enfermedad renal diabética (nefropatía diabética) mediante múltiples mecanismos patogénicos, incluida la disminución de la expresión de P-cadherina glomerular. (Guo, Q. et al. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2011, 300, E708-E716).
- Enfermedad nerviosa diabética: También se ha demostrado que el aumento de la actividad de la aldosa reductasa, la primera enzima de la vía del sorbitol, desempeña un papel clave en la activación de la 12/15-LOX asociada a la diabetes en el nervio periférico y la médula espinal. (Stavniichuk, R. et al Biochem Pharmacol. 2012, 83, 932-940). Así pues, la inhibición de la 12-LOX resulta atractiva en el tratamiento de la enfermedad nerviosa diabética.
- Diabetes y enfermedades cardiovasculares: Un inhibidor selectivo de la 12-LOX proporcionaría un nuevo enfoque terapéutico para prevenir y/o tratar cualquiera de las dos formas de diabetes (tipo I y tipo II). El desarrollo de inhibidores de la 12-hLOX proporciona un potente enfoque intracelular para disminuir la capacidad de las plaquetas de formar grandes coágulos en respuesta a una lesión vascular o a la activación de la vía de la coagulación. Así pues, la inhibición de la 12-hLOX tiene la capacidad de atenuar la formación de coágulos mediada por plaquetas causada por la diabetes y/o las enfermedades cardiovasculares y disminuir significativamente la aparición de infarto de miocardio, insuficiencia

cardíaca congestiva y accidente cerebrovascular. Además, los estudios muestran que el gen *Alox15*, que codifica las proteínas 12-LOX y 15-LOX, está regulado al alza en la insuficiencia cardíaca. Así pues, la inhibición de la 12-LOX podría ser un tratamiento para la insuficiencia cardíaca. (Kayama, Y. et al. J.Exp.Med. 2009, 206, 1565-1574).

5 Trombosis: la 12-LOX y su producto 12-HETE han sido implicados en la modulación de la hemostasia y la trombosis a través de su papel en la regulación de la función plaquetaria (reactividad, formación de coágulos, movilización de calcio). (Brash, A. R. Circulation 1985, 72, 702-707). Además, el FcγRIIa es el receptor de la plaqueta humana responsable de la trombocitopenia inducida por heparina (TIH). Se ha descubierto que 12-LOX es esencial para la actividad PLCγ2 inducida por FcγRIIa que conduce a la activación de la movilización del calcio, la activación de Rap 1 y PKC, y la posterior activación de la integrina αIIbβ3, lo que demuestra el papel de los inhibidores de 12-LOX en el
10 tratamiento de la TIH. (Yeung, J. et al. Blood 2014, (DOI 10.1182/blood-2014-05-575878)). Además, la 12-LOX ha demostrado un papel en las enfermedades de la piel y en la hemostasia plaquetaria.

Enfermedad de Alzheimer: la 12-LOX y la 15-LOX se expresan ampliamente en el sistema nervioso central y se ha informado de que están implicadas en la neurobiología de la enfermedad de Alzheimer porque modulan la beta amiloide y el procesamiento de APP. También se ha descubierto que la 12-LOX y la 15-LOX modulan el metabolismo
15 endógeno de la tau, lo que la convierte en una terapéutica atractiva para tratar el Alzheimer y enfermedades relacionadas. (Giannopoulos, P.F., et al. Aging Cell 2013, 12, 1082-1090).

Esteatohepatitis no alcohólica: Se ha demostrado que la interrupción del gen que codifica para la 12-LOX, *Alox15*, protegía a los ratones contra la esteatosis hepática, la resistencia a la insulina y la inflamación en la enfermedad hepática experimental de origen metabólico. (Martínez-Clemente, M. et al. Hepatology 2010, 52, 1980-1991 véase
20 también Tanaka, N. et al. Hepatology 2012, 56, 118-129).

Una dificultad para poder definir claramente el papel de la 12-LOX en estos sistemas ha sido la falta de inhibidores de molécula pequeña de la 12-LOX potentes y selectivos.

Un inhibidor de 12-LOX previamente descrito, un compuesto basado en 8-hidroxiquinoleína (**ML127**), mostró una excelente selectividad, >50-100 veces selectividad sobre lipoxigenasas y ciclooxigenasas relacionadas. A diferencia de muchos de los inhibidores descritos anteriormente, los experimentos cinéticos revelaron que **ML127** era un inhibidor no competitivo y no reductor. La separación por HPLC quiral de la molécula de la sonda reveló una preferencia quiral para la actividad, siendo el (-)-enantiómero mucho más potente que el (+)-enantiómero (<0,5 μM frente a >25 μM, respectivamente). (Kenyon, V. et al. J. Med. Chem. 2011, 54, 5485-5497.) Sin embargo, la serie química era difícil de optimizar aún más, dado que sutiles modificaciones estructurales conducían a una disminución de la actividad. WO
25 2011/146618 describe inhibidores de la 12-lipoxigenasa humana que son útiles para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno mediado por la 12-lipoxigenasa.

Existe la necesidad de un inhibidor de molécula pequeña 12-LOX potente y selectivo que pueda optimizarse sin reducir la actividad para tratar o prevenir enfermedades y trastornos mediados por 12-LOX. El inhibidor de molécula pequeña debe ser soluble, tener propiedades ADME favorables y buenas propiedades PK *in vivo*.

35 Las plaquetas expresan tres motivos de activación basados en tirosinas inmunorreceptoras (ITAM) que contienen receptores transmembrana (complejo glicoproteína VI (GPVI)/FcγR, receptor tipo lectina C 2 (CLEC-2) y receptor de región Fc de inmunoglobulina gamma de baja afinidad II-a (FcγRIIa)). La ligación de los receptores que contienen ITAM en la superficie de las plaquetas da lugar a una vía de señalización descendente compartida que culmina en la activación plaquetaria. Estos receptores intervienen en diversos grados de hemostasia y trombosis; sin embargo,
40 tienen funciones fisiológicas no redundantes (pato). FcγRIIa, un inmunorreceptor de amplia expresión que está presente en la superficie de las plaquetas humanas, pero no en las de ratón, es más conocido por su papel fisiopatológico en la trombocitopenia inmunomediada y la trombosis; una familia de trastornos que incluye la trombocitopenia inmunitaria, la trombocitopenia asociada a la sepsis y la trombocitopenia inducida por heparina (TIH). La inhibición selectiva de la vía de señalización FcγRIIa en las plaquetas para la prevención de la trombocitopenia
45 inmunomediada y la trombosis ha sido un enfoque largamente buscado para la prevención de la TIH (Reilly et al., Blood 2011, 117, 2241-2246).

La heparina se utiliza ampliamente en la clínica para tratar la trombosis. Sin embargo, más del 3-5 % de los pacientes que toman heparina desarrollarán una respuesta inmunitaria a la heparina y correrán un alto riesgo de trombocitopenia inducida por heparina (TIH), que puede dar lugar a un acontecimiento trombótico potencialmente mortal mediado por
50 el sistema inmunitario. El enfoque terapéutico actual para el tratamiento de la TIH es la supresión del tratamiento con heparina y su sustitución por inhibidores directos de la trombina (IDT) que tienen un riesgo inherentemente alto de hemorragia grave y deben ser monitorizados en la clínica. Incluso con esta complicación potencialmente mortal, la heparina sigue siendo el anticoagulante estándar para la prevención y el tratamiento de la trombosis.

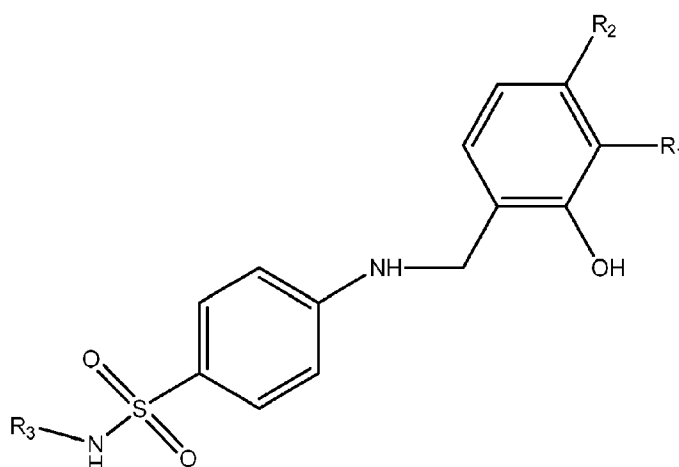
Por lo tanto, también existe la necesidad de enfoques terapéuticos novedosos que se dirijan directamente a la
55 patogénesis de la TIH.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona compuestos y procedimientos que comprenden compuestos útiles como inhibidores de 12-LOX.

La invención proporciona compuestos que son inhibidores potentes y selectivos de 12-LOX. Además, la presente invención proporciona composiciones que comprenden estos compuestos y el uso de estos compuestos como agentes terapéuticos en el tratamiento o prevención de enfermedades y trastornos mediados por la 12-lipoxigenasa. Las enfermedades y trastornos mediados por la 12-LOX incluyen aquellos en los que la 12-LOX es un mediador directo de las enfermedades y trastornos, así como aquellos en los que la inhibición de la 12-LOX, aunque quizás no sea un mediador directo, resulta de valor terapéutico en el tratamiento o prevención de las enfermedades y trastornos. Estas enfermedades o trastornos incluyen, pero no se limitan a, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, enfermedad renal diabética, enfermedad nerviosa diabética, enfermedad cardiovascular, insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer, esteatohepatitis no alcohólica, hemostasia plaquetaria, enfermedades de la piel, trombocitopenia inducida por heparina, trombosis, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de mama y cáncer de pulmón.

La invención actualmente reivindicada proporciona un compuesto de Fórmula (I):



donde R₁ es metoxi y R₂ es H; y

R₃ se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-bencimidazol, 4-metil-2-benzotiazol, 2-tiofeno, 4-metil-2-tiazol, 5-metil-2-tiazol, 5-fenil-2-tiazol, 4,5-dimetil-2-tiazol, fenilo, 1-naftaleno, 2-naftaleno, 1,4-bi-fenilo, 3-piperazin-fenilo, 4-piperazin-fenilo, 4-piperidin-fenilo, 4-piperazin-3-piridina, 3-quinolina, 8-isoquinolina, 2-piridina, 3-piridina, 3-tercbutil-fenilo, 6-metoxi-2-benzotiazol, 6-fluoro-2-benzotiazol, 4-fenil-2-tiazol, 3- morfolina-fenilo, 4N-boc-piperidin-3-fenilo, 3-piperidin-fenilo, 3- isopropil-fenilo, 3- metoxifenilo, 5-metil-3-isoxazol, 2-pirimidina y 1,3-bi-fenilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo o diastereómeros del mismo.

En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I) se selecciona del grupo que consiste en

N-(benzo[d]tiazol-2-il)-4-[(2-hidroxi-3-metoxibencil)amino]bencenosulfonamida;

N-(benzo[d]oxazol-2-il)-4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)bencenosulfonamida;

N-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)-4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)bencenosulfonamida;

4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-*N*-(tiofen-2-il)bencenosulfonamida;

4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-*N*-(5-feniltiazol-2-il)bencenosulfonamida;

4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-*N*-(3-metoxifenil)bencenosulfonamida;

4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-*N*-(isoquinolin-8-il)bencenosulfonamida;

4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-*N*-fenilbencenosulfonamida;

4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-*N*-(naftalen-1-il)bencenosulfonamida;

4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-*N*-(naftalen-2-il)bencenosulfonamida;

N-([1,1'-bifenil]-4-il)-4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)bencenosulfonamida;
N-([1,1'-bifenil]-3-il)-4-(2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)bencenosulfonamida;
N-(3-(terc-butil)fenil)-4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)bencenosulfonamida,
 4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-*N*-(6-metoxibenzo[d]tiazol-2-il)bencenosulfonamida,
 5 4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-*N*-(4-feniltiazol-2-il)bencenosulfonamida,
*terc-buti*l-4-(3-(4-((2-hidroxi-3-metoxibencil) amino) fenilsulfonamido) fenil) piperidin-1-carboxilato;
 4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-*N*-(3-isopropilfenil)bencenosulfonamida;
N-(6-fluorobenzo[d]tiazol-2-il)-4-(2-hidroxi-3-metoxibencil)amino) bencenosulfonamida;
 4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-*N*-(3-(piperazin-1-il)fenil)bencenosulfonamida;
 10 4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-*N*-(4-(piperazin-1-il)fenil)bencenosulfonamida; y
 4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-*N*-(4-(piperidin-4-il)fenil)bencenosulfonamida,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo o diastereómeros del mismo.

La invención actualmente reivindicada también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto, sal, enantiómeros, una mezcla de enantiómeros o diastereómeros de la invención actualmente reivindicada y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención actualmente reivindicada proporciona además un compuesto, sal del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo, o diastereómeros del mismo de la invención actualmente reivindicada para su uso en un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno mediado por 12-lipoxigenasa, comprendiendo el procedimiento administrar a un mamífero del mismo una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto, sal del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo, o diastereómeros del mismo de un compuesto de la presente invención, en el que la enfermedad o trastorno mediado por 12-lipoxigenasa se selecciona del grupo que consiste en diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, enfermedad cardiovascular, esteatohepatitis no alcohólica, hemostasia plaquetaria, enfermedades de la piel, trombocitopenia inducida por heparina, agregación plaquetaria inducida por PAR4-AP, trombosis, síndrome antifosfolípido; síndrome de sepsis; trombocitopenia asociada al receptor de la región Fc de la inmunoglobulina gamma (FcγRIIa); y cáncer.

La información técnica que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de la invención reivindicada en la actualidad, que se define mediante las reivindicaciones adjuntas. La información técnica adicional se proporciona para situar la invención reivindicada en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados.

Las referencias a procedimientos de tratamiento en el presente documento deben interpretarse como referencias a compuestos y composiciones farmacéuticas de la invención actualmente reivindicada para su uso en dichos procedimientos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figuras 1A-1D. Muestra el esquema de reacción para la síntesis de los análogos de la presente invención.

Figura 2. Movilización de calcio inducida por PAR4-AP (A) y agregación plaquetaria (B) en plaquetas humanas.

Figura 3. Inhibición de 12-HETE en células beta de ratón (A) y en islotes humanos (B, C). Secreción de insulina estimulada por glucosa en islotes humanos (D, E).

Figura 4. Datos cinéticos en estado estacionario para la determinación de K_i para 12-LOX con el compuesto **35 (ML355)**. KM/V_{max} (intersección x, las unidades de KM/V_{max} son $\mu M/\mu mol/min/mg$) frente a [Inhibidor] (μM) es la representación secundaria de los datos de inhibición, que arrojó un K_i de $0,35 \pm 0,08 \mu M$.

Figura 5. Datos cinéticos en estado estacionario para la determinación del K_i para 12-LOX con el compuesto **35 (ML355)**. $1/V_{máx}$ (intersección y, las unidades de $1/V_{máx}$ son $1/\mu mol/min/mg$) frente a [Inhibidor] (μM) es la representación secundaria de los datos de inhibición, que dio un K_i de $0,72 \pm 0,1 \mu M$.

Figura 6. Datos cinéticos en estado estacionario para la determinación de K_i para 12-LOX con el compuesto **36**. KM/V_{max} (intersección x, las unidades de KM/V_{max} son $\mu M/\mu mol/min/mg$) frente a [Inhibidor] (μM) es la representación secundaria de los datos de inhibición, que arrojó un K_i de $0,53 \pm 0,2 \mu M$.

Figura 7. Datos cinéticos en estado estacionario para la determinación de K_i para 12-LOX con el compuesto **36**. $1/V_{m\acute{a}x}$ (intersección y, las unidades de $1/V_{m\acute{a}x}$ son $1/\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) frente a $[\text{Inhibidor}]$ (μM) es la representación secundaria de los datos de inhibición, que dio un K_i de $0,63 \pm 0,1 \mu\text{M}$.

Figura 8. Movilización de calcio inducida por PAR4-AP (A) y agregación plaquetaria (B) en plaquetas humanas. Para A: Se estimularon plaquetas humanas lavadas (1×10^6 plaquetas/mL) con $200 \mu\text{M}$ PAR4-AP en ausencia o presencia de concentraciones crecientes del compuesto **36**. La movilización de calcio disminuyó al aumentar la concentración del compuesto **36**. El calcio se midió en tiempo real utilizando un citómetro de flujo C6 Accuri. Los experimentos se realizaron por triplicado. Para B: La agregación plaquetaria de plaquetas humanas (3×10^8 plaquetas/mL) se midió en tiempo real utilizando un Chronolog Lumi-Aggregometer (modelo 700D) tras la adición de PAR4-AP.

Figura 9. Inhibición de 12-HETE por el compuesto **36** en células beta de ratón. Células beta de ratón (BTC3) fueron tratadas con ácido araquidónico e ionóforo de calcio (AA/IONO) solos o en presencia del compuesto **36**. En el gráfico se muestran los niveles de 12-HETE expresados como porcentaje de los detectados en las células estimuladas únicamente con AA/IONO. Los datos graficados en la figura 3A son un experimento representativo con cada punto de datos graficado realizado por triplicado. Estos datos trazados son representativos de cuatro determinaciones experimentales separadas realizadas cubriendo un intervalo de dosis menor. Los datos graficados son la media \pm SEM, $n=3$. Las barras de error de algunos puntos están enmascaradas por el símbolo. Los datos se analizaron mediante regresión no lineal para la inhibición de la curva dosis-respuesta, utilizando pendiente de colina variable o restringida, $R^2 > 0,81$. Este análisis se facilitó con el programa Prism 5. Además del compuesto, se incluyó DMSO (disolvente de reserva) con cada condición. El DMSO es también el disolvente del ionóforo de calcio (estimulante).

Figura 10. Estabilidad del compuesto **35** (ML355) medida como composición porcentual de la molécula sonda en solución acuosa (contiene 20 % de acetonitrilo) a t.a. durante el periodo de tiempo indicado en (A) tampón pH 2 (pH 7,4) (B) tampón pH 10 (C) tampón PBS (pH 7,4) (D) tampón de ensayo UV-Vis de lipoxigenasa (tampón 1M HEPES, pH 7,3) (E) en presencia de 5 mM de glutatión (forma reducida).

Figuras 11A-11B muestran que 12-LOX modula la agregación plaquetaria mediada por Fc γ R1a. Las plaquetas humanas lavadas se pretrataron con DMSO (control del vehículo) o ML355 ($20 \mu\text{M}$) durante 15 minutos y se midió la agregación plaquetaria tras la estimulación de Fc γ R1a mediante (**Fig. 11A**) anti-CD9 o (**Fig. 11B**) entrecruzamiento de IV.3, un anticuerpo monoclonal de ratón Fc γ R1a, y cabra antirratón Fab2 (IV.3 + GAM). El panel izquierdo muestra un trazado de agregación representativo de plaquetas estimuladas con anticuerpos anti-CD9 pretratadas con ML355 o DMSO. El panel derecho muestra la agregación plaquetaria final de plaquetas estimuladas con anti-CD9 que habían sido tratadas con ML355 ($n=7$) o DMSO ($n=4$). $^{**}P < .01$.

Figuras 12A-12C muestran que las plaquetas murinas requieren 12-LOX para la agregación plaquetaria normal inducida por Fc γ R1a. Se realizó una respuesta a la dosis de agregación plaquetaria inducida por anti-CD9 con plaquetas lavadas de ratones hFcR/ALOX $^{12+/+}$ o hFcR/ALOX $^{12-/-}$. Antes de la agregación, se añadió fibrinógeno ($75 \mu\text{g}/\text{mL}$) y CaCl_2 (1 mM) a las plaquetas. (**Fig. 12A**) Trazados representativos de plaquetas estimuladas con $0,25$, $0,5$ y $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-CD9. En el recuadro: Se realizaron transferencias Western para 12-LOX, Fc γ R1a y GAPDH con lisado plaquetario de ratones hFcR/ALOX $^{12+/+}$ o hFcR/ALOX $^{12-/-}$. Se midió el (**Fig. 12B**) tiempo de retraso y (**Fig. 12C**) agregación final en ratones hFcR/ALOX $^{12+/+}$ o hFcR/ALOX $^{12-/-}$ ($n=3-6$ por grupo). $^{*}P < .05$.

Figuras 13A-13B muestran que la activación de Rap1 e integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ mediada por Fc γ R1a es potenciada por 12-LOX. Las plaquetas humanas lavadas y pretratadas con ML355 o DMSO se estimularon con IV.3 y reticulación GAM y (**Fig. 13A**) se evaluó la activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y (**Fig. 13B**) la activación de Rap1. Se utilizó PAC1-FITC para medir la activación de $\alpha\text{IIb}\beta 3$ mediante citometría de flujo. Gráfico de barras compuesto de los cambios de pliegue de PAC1-FITC en relación con la fluorescencia PAC1-FITC no estimulada. La activación de Rap1 se eliminó utilizando Ra-GDS y se cubrió con un anticuerpo Rap1. La Rap1 activa se midió utilizando LI-COR y luego se normalizó con respecto a la Rap1 total y no estimulada para el cambio de pliegues en la actividad Rap1. $^{**}P < .01$.

Figuras 14A-14B muestran que la secreción de gránulos densos mediada por la activación de Fc γ R1a está regulada por 12-LOX. Las plaquetas humanas lavadas y pretratadas con DMSO o ML355 se estimularon mediante la reticulación de Fc γ R1a (IV.3 + GAM) y (**Fig. 14A**) se midió la secreción de gránulos alfa utilizando un anticuerpo conjugado con P-Selectin-PE en un citómetro de flujo, mientras que (**Fig. 14B**) se midió la secreción de ATP como marcador sustitutivo de la secreción de gránulos densos en un agregómetro. Compuesto de plaquetas teñidas con P-Selectina tratadas con ML355 o DMSO ($n=4$). Gráfico de barras de plaquetas tratadas con DMSO o ML355 en las que se midió la secreción de ATP tras la reticulación de Fc γ R1a ($n=4$).

Figuras 15A-15B muestran el papel de 12-LOX en la regulación del complejo de señalización Fc γ R1a. Las plaquetas humanas lavadas se pretrataron con ML355 ($20 \mu\text{M}$) o con un vehículo de control antes de la

estimulación con IV.3 y GAM. (**Fig. 15A**) Inmunoprecipitación de FcγRIIa a los 15, 30 y 60 segundos tras la reticulación y medición de la fosforilación mediante transferencia Western. (**Fig. 15B**) Las plaquetas se lisaron tras la reticulación de FcγRIIa en presencia de ML355 o DMSO y se sometieron a inmunotransferencia para Syk activa (pY323) y total.

Figuras 16A-16C muestran que la 12-LOX modula los componentes de señalización temprana de la vía FcγRIIa en plaquetas humanas. Las plaquetas humanas lavadas se pretrataron con ML355 (20 μM) o con un vehículo de control antes de la estimulación con IV.3 y GAM. (**Fig. 16A**) Un curso temporal de la activación de PLCγ2 transferencia Western en el que las plaquetas estimuladas con reticulación de anticuerpos se detuvieron a los 15, 30, 60 y 300 segundos. Las muestras de activación activa de PLCγ2 se analizaron para la fosforilación de Y759 mediante transferencia Western. Todas las muestras se normalizaron a PLCγ2 total y los cambios en los pliegues se cuantificaron en relación con la condición no estimulada. (**Fig. 16B**) Tras la reticulación con IV.3 y GAM, se midió la movilización de calcio mediante citometría de flujo. Las curvas representativas se cuantificaron en cambio de pliegues de calcio libre en relación con la condición no estimulada durante cuatro minutos. Los gráficos de barras representan la relación del cambio del pliegue de la movilización del calcio. (**Fig. 16C**) Se analizó la actividad PKC en plaquetas humanas lavadas estimuladas con o sin inhibición de 12-LOX. Se utilizó un sustrato de PKC como sustituto de la activación de PKC y Pleckstrin. La cuantificación de la fosforilación de Pleckstrin se muestra en el panel derecho. Los datos representan la media ± E.S.M. *P<.05; **P<.01.

La Figura 17 es un modelo esquemático del papel de 12-LOX en la regulación de la vía FcγRIIa. 12-LOX regula la activación temprana de PLCγ2 mediada por la estimulación de FcγRIIa, que es esencial para la liberación completa de calcio en las plaquetas. El flujo de calcio es necesario para que la actividad de la cPLA2 genere ácidos grasos libres, como el ácido araquidónico (AA). Posteriormente, la activación de Rap1 también depende de la actividad de 12-LOX para activar la integrina αIIbβ3 para la agregación plaquetaria.

La Figura 18 muestra datos de 1H RMN para el compuesto ML355 (**Fig. 18A**) y RMN 13C para el compuesto ML-355 (**Fig. 18B**).

La figura 19 muestra la caracterización LC/MS del compuesto ML355 a 220 nm (arriba) y 254 nm (abajo).

La Figura 20 muestra datos de 1H RMN para el compuesto 36 (**Fig. 20A**) y RMN 13C para el compuesto 36(**Fig. 20B**).

La figura 21 muestra la caracterización LC/MS del compuesto 36 a 220 nm (arriba) y 254 nm (abajo).

La Figura 22 muestra datos de 1H RMN para el compuesto 37 (**Fig. 22A**) y RMN 13C para el compuesto 37(**Fig. 22B**).

La figura 23 muestra la caracterización LC/MS del compuesto 37 a 220 nm (arriba) y 254 nm (abajo).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se entiende que la presente invención no se limita a las metodologías particulares, etc. descritas en el presente documento, ya que éstas pueden variar. También debe entenderse que la terminología empleada en el presente documento se utiliza únicamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención.

En la descripción, se emplean los siguientes términos: LOX es lipoxigenasa; 15-LOX-1 es 15-lipoxigenasa-1 reticulocitaria humana; 15-LOX-2 es 15-lipoxigenasa-2 epitelial humana; 12-LOX es 12-lipoxigenasa plaquetaria humana; COX es ciclooxigenasa; NDGA es ácido nordihidroguayarático; AA es ácido araquidónico; 12-HPETE es ácido 12-(S)-hidroperoxieicosatetraenoico; 12-HETE es ácido 12-(S)-hidroxieicosatetraenoico; LA es ácido linoleico; Vmax es velocidad máxima (mmol/min); KM es la constante de Henri-Michaelis-Menten; [E] es la concentración total de enzima activa; IC₅₀ es la constante del inhibidor al 50 % de inhibición; HTS es cribado de alto rendimiento; qHTS es cribado cuantitativo de alto rendimiento; PAR-4 es receptor activado por proteasa-4; EtOH es etanol; MeOH es metanol; EtOAc es acetato de etilo; AcOH es ácido acético; MW es microondas; Xantphos es 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno; y SD es desviación estándar.

Para uso terapéutico, las "sales" de los compuestos de la presente invención serán fisiológicamente aceptables, es decir, las sales se derivarán de un ácido o base fisiológicamente aceptable. Sin embargo, las sales de ácidos o bases que no son fisiológicamente aceptables también pueden utilizarse en la preparación o purificación de un compuesto fisiológicamente aceptable. Por lo tanto, todas las sales, derivadas o no de un ácido o base fisiológicamente aceptable, están dentro del alcance de la presente invención.

Por "diastereómero" se entiende un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen propiedades físicas diferentes, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros pueden separarse mediante procedimientos analíticos de alta resolución, como la electroforesis y la cromatografía.

Los "enantiómeros" se refieren a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí.

El término "portador farmacéuticamente aceptable", tal y como se utiliza aquí, se refiere a todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción para sustancias farmacéuticamente activas, tal y como son bien conocidos en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse compuestos suplementarios a las composiciones.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto descrito en el presente documento que es eficaz para prevenir, mejorar, tratar o retrasar la aparición de una enfermedad o afección. La expresión "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto descrito en el presente documento que es eficaz para inhibir la aparición o progresión de un trastorno.

"Alquilo" es un hidrocarburo C1-C6 que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, terc-butilo y similares.

"Alquenilo" es un hidrocarburo C2-C6 que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace carbono-carbono, sp². Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, etileno o vinilo ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), alilo ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), ciclopentenilo ($-\text{C}_5\text{H}_7$), y 5-hexenilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), y similares.

"Alquinilo" es un hidrocarburo C2-C6 que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace triple sp carbono-carbono. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, acetilénico ($-\text{C}\equiv\text{CH}$) y propargílico ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), y similares.

"Cicloalquilo" es un sistema de anillos saturados, insaturados o aromáticos que contiene, por ejemplo, de 3 a 8 átomos de carbono, preferiblemente de 3 a 7 átomos de carbono, y más preferiblemente de 3 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, ciclopentenilo y ciclohexenilo. Los grupos alquilo cíclicos pueden estar sin sustituir o más sustituidos.

Por "heterocicloalquilo" se entiende un sistema de anillos saturados, insaturados o aromáticos que incluye al menos un N, O, S o P. El heterociclo incluye por tanto grupos heteroarilo. El heterociclo, tal como se utiliza en el presente documento, incluye, pero no se limitan a, los heterociclos descritos en PAQUETTE, PRINCIPLES OF MODERN HETEROCYCLIC CHEMISTRY (W. A. Benjamin, Nueva York, 1968), en particular los capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; THE CHEMISTRY OF HETEROCYCLIC COMPOUNDS, A SERIES OF MONOGRAPHS (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 hasta la actualidad), en particular los volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; KATRITZKY ET AL., COMPREHENSIVE HETEROCYCLIC CHEMISTRY (Pergamon Press, 1996); y 82 J. AM. QUÍM. SOC. 5566 (1960). Los heterociclos incluyen, pero no se limitan a, piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrobiofenilo oxidado con azufre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, tetrahydrofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidroturanilo, bis-tetrahidroruranilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, decahydroquinolinilo, octahydroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tiantrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purínilo, 4H-quinolizínilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinolinilo, pteridinilo, 4aH-carbazolilo, carbazolilo, beta-carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, rurazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quimiclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, benzisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo e isatinoilo.

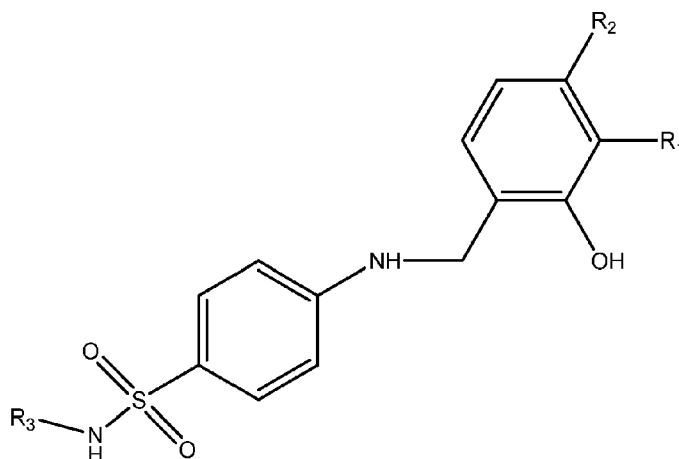
Por "arilo" se entiende un radical hidrocarburo aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema de anillo aromático parental. Los grupos arilo típicos incluyen, pero no se limitan a, radicales derivados del benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares.

Por "heteroarilo" se entiende un radical aromático monovalente de uno o más átomos de carbono y uno o más átomos seleccionados entre N, O, S o P, derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de un sistema de anillo aromático parental. Los grupos heteroarilo pueden ser un monociclo que tenga de 3 a 7 miembros en anillo (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S) o un biciclo que tenga de 7 a 10 miembros en anillo (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S). Los ciclos heteroarilo tienen de 7 a 10 átomos de anillo (de 6 a 9 átomos de carbono y de 1 a 2 heteroátomos seleccionados entre N, O y S) dispuestos como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6]; o de 9 a 10 átomos de anillo (de 8 a 9 átomos de carbono y de 1 a 2 heteroátomos seleccionados entre N y S) dispuestos como un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. El grupo heteroarilo puede estar unido al andamiaje farmacológico a través de un átomo de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo u otro mediante un enlace covalente estable. Los grupos heteroarilo incluyen, pero no se

limitan a, piridilo, isómeros de dihidropiridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, s-triazinilo, oxazolilo, imidazolilo, tiazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, furanilo, tiofuranoilo, tienilo y pirrolilo.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención. Se describen los procedimientos y composiciones preferidos, aunque en la práctica o ensayo de la presente invención pueden utilizarse cualesquiera procedimientos y composiciones similares o equivalentes a los aquí descritos.

En un aspecto, la invención actualmente reivindicada incluye un compuesto de Fórmula (I):



donde R₁ es metoxi y R₂ es H; y

R₃ se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-bencimidazol, 4-metil-2-benzotiazol, 2-tiofeno, 4-metil-2-tiazol, 5-metil-2-tiazol, 5-fenil-2-tiazol, 4,5-dimetil-2-tiazol, fenilo, 1-naftaleno, 2-naftaleno, 1,4-bi-fenilo, 3-piperazin-fenilo, 4-piperazin-fenilo, 4-piperidin-fenilo, 4-piperazin-3-piridina, 3-quinolina, 8-isoquinolina, 2-piridina, 3-piridina, 3-terc-butil-fenilo, 6-metoxi-2-benzotiazol, 6-fluoro-2-benzotiazol, 4-fenil-2-tiazol, 3- morfolina-fenilo, 4N-boc-piperidin-3-fenilo, 3-piperidin-fenilo, 3- isopropil-fenilo, 3- metoxifenilo, 5-metil-3-isoxazol, 2-pirimidina y 1,3-bi-fenilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo o diastereómeros del mismo.

En una realización de la Fórmula (I), R₃ se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-bencimidazol, 4-metil-2-benzotiazol, 3-quinolina, 8-isoquinolina, fenilo y 3-isopropil-fenilo.

En una realización de la Fórmula (I), R₃ se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-bencimidazol, 4-metil-2-benzotiazol, 2-tiofeno, fenilo, 1-naftaleno, 2-naftaleno, 3-quinolina, 8-isoquinolina, 3-terc-butil-fenilo, 6-metoxi-2-benzotiazol, 6-fluoro-2-benzotiazol, 4-fenil-2-tiazol, 4N-boc-piperidin-3-fenilo y 3-isopropil-fenilo.

En una realización de la Fórmula (I), R₃ se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-bencimidazol, 4-metil-2-benzotiazol, 2-tiofeno, fenilo, 1-naftaleno, 2-naftaleno, 3-quinolina, 8-isoquinolina, 3-terc-butil-fenilo, 4N-boc-piperidin-3-fenilo y 3-isopropil-fenilo.

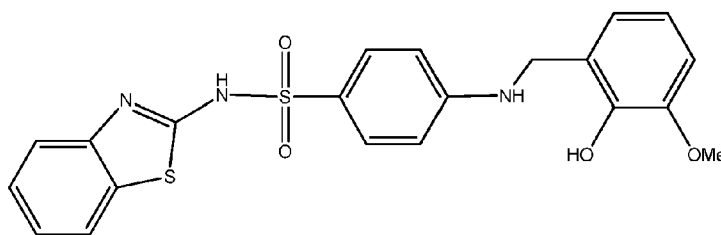
En una realización de la Fórmula (I), R₃ se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-benzimidazol y 3-isopropil-fenilo.

En una realización de la Fórmula (I), R₃ se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-benzimidazol, 4-metil-2-benzotiazol, 2-tiofeno, fenilo, 6-metoxi-2-benzotiazol, 6-fluoro-2-benzotiazol y 4-fenil-2-tiazol.

En una realización de la Fórmula (I), R₃ se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-bencimidazol, 4-metil-2-benzotiazol, 2-tiofeno y fenilo.

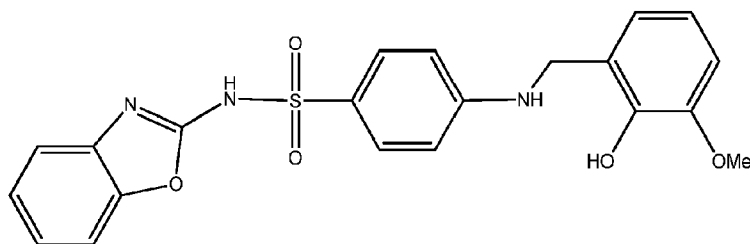
En una realización de la Fórmula (I), R₃ se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-bencimidazol, 4-metil-2-benzotiazol, 2-tiofeno, fenilo, 1-naftaleno, 2-naftaleno, 3-quinolina, 8-isoquinolina, 2-piridina y 3-piridina.

En una realización, el compuesto de fórmula (I) es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo o diastereómeros del mismo. Se trata de **ML355 (compuesto 35)**.

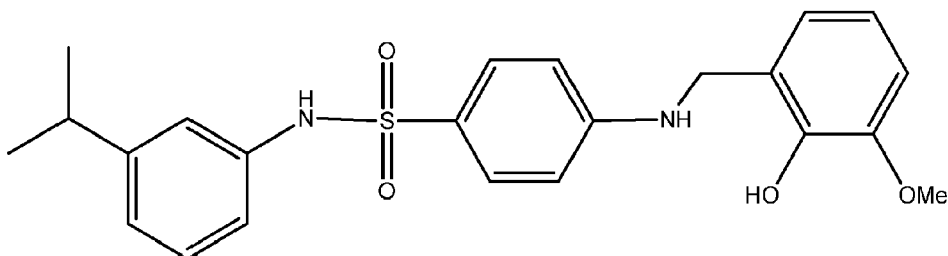
En una realización, el compuesto de fórmula (I) es



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo o diastereómeros del mismo.

En una realización, el compuesto de fórmula (I) es



10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo o diastereómeros del mismo.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, el compuesto o sal incluye cada diastereómero, isómero óptico, enantiómero y las mezclas racémicas.

15 Se entiende además que los compuestos y sales anteriores pueden formar solvatos, o existir en una forma sustancialmente no compleja, como la forma anhidra. Cuando el disolvente incorporado en el solvato es agua, el complejo molecular es un hidrato. Los solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen hidratos, alcoholatos como metanolatos y etanolatos, acetonitrilatos y similares. Estos compuestos también pueden existir en formas polimórficas.

La invención actualmente reivindicada se dirige además a una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y al menos un compuesto descrito en el presente documento.

20 También se divulgan las vías de administración y las dosis de cantidades eficaces de las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos. Los compuestos de la invención actualmente reivindicada pueden administrarse en combinación con otros agentes farmacéuticos en una variedad de protocolos para el tratamiento eficaz de enfermedades.

25 Las composiciones farmacéuticas de las invenciones pueden administrarse a cualquier animal que pueda experimentar los efectos beneficiosos de los compuestos de la invención. Entre estos animales se incluyen los humanos y los no humanos, como los animales de compañía y de granja.

Las composiciones farmacéuticas de la invención actualmente reivindicada se administran a un sujeto de una manera conocida en la técnica. La dosis administrada dependerá de la edad, la salud y el peso del receptor, del tipo de tratamiento concurrente, si lo hubiera, de la frecuencia del tratamiento y de la naturaleza del efecto deseado.

30 Además de los compuestos divulgados en el presente documento, las composiciones farmacéuticas de la invención reivindicada actualmente pueden comprender además al menos uno de los auxiliares adecuados, incluidos, pero no

limitados a, diluyentes, aglutinantes, estabilizadores, tampones, sales, disolventes lipofílicos, conservantes, adyuvantes o similares. Se prefieren auxiliares farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos y procedimientos de preparación de tales soluciones estériles son bien conocidos en el arte y pueden encontrarse en textos bien conocidos tales como, pero no limitados a, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Gennaro, Ed., 18ª edición, Mack Publishing Co. (1990)). Pueden seleccionarse rutinariamente portadores farmacéuticamente aceptables que sean adecuados para el modo de administración, solubilidad y/o estabilidad del compuesto.

Los excipientes y aditivos farmacéuticos útiles en la presente invención también pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos y carbohidratos (p. ej., azúcares, incluyendo monosacáridos, di-, tri-, tetra-, y oligosacáridos; azúcares derivados tales como alditos, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcar), que pueden estar presentes solos o en combinación, comprendiendo solos o en combinación en intervalos de 1-99.99 % en peso o volumen. Entre los excipientes proteicos ejemplares se incluyen la albúmina sérica, como la albúmina sérica humana (HSA), la albúmina humana recombinante (rHA), la gelatina, la caseína y similares. Los componentes de aminoácidos representativos, que también pueden funcionar con capacidad amortiguadora, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo y similares.

Los excipientes carbohidratos adecuados para su uso en la presente invención incluyen monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos, como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditos, como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), mioinositol y similares.

La composición puede contener además, entre otros, portadores farmacéuticamente aceptables como agentes colorantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, etanol, EDTA, tampón citrato, aromatizantes y agua.

La composición de la invención actualmente reivindicada también puede contener los conservantes metilparabeno (también conocido como éster metílico del ácido 4-hidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzoato de metilo; o METIL PARASEPT), etilparabeno (también conocido como éster etílico del ácido 4-hidroxibenzoico; *p*-hidroxibenzoato de etilo; o ETIL PARASEPT), propilparabeno (también conocido como éster propílico del ácido 4-hidroxibenzoico; *p*-hidroxibenzoato de propilo; NIPASOL; o PROPYL CHEMOSEPT) y/o butilparabeno (también conocido como éster propílico del ácido 4-hidroxibenzoico; *p*-hidroxibenzoato de propilo; o BUTYL CHEMOSEPT). En algunas realizaciones, la composición contiene metilparabeno y/o propilparabeno.

Los emulsionantes de la invención reivindicada actualmente incluyen, pero no se limitan a, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención actualmente reivindicada también pueden incluir un tampón o un agente de ajuste del pH. Típicamente, el tampón es una sal preparada a partir de un ácido o una base orgánicos. Los tampones representativos incluyen sales de ácidos orgánicos como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; Tris, clorhidrato de trometamina o tampones de fosfato.

Además, las composiciones farmacéuticas de la invención reivindicada pueden incluir excipientes/aditivos poliméricos como polivinilpirrolidonas, fícoles (un azúcar polimérico), dextratos (p. ej., ciclodextrinas, como 2-hidroxipropil-.beta.-ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes aromatizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos como "TWEEN 20" y "TWEEN 80"), lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (por ejemplo, colesterol) y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA o EGTA). Estos y otros excipientes y/o aditivos farmacéuticos conocidos adecuados para su uso en la presente invención son conocidos en la técnica, por ejemplo, los enumerados en REMINGTON: THE SCIENCE & PRACTICE OF PHARMACY (19ª ed., Williams & Williams (1995)) y PHYSICIAN'S DESK REFERENCE (52ª ed., Medical Economics (1998)).

La invención actualmente reivindicada proporciona composiciones farmacéuticas estables, así como soluciones y composiciones conservadas que contienen un conservante, así como composiciones conservadas multiuso adecuadas para uso farmacéutico o veterinario, que comprenden al menos un compuesto aquí divulgado en una composición farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden contener opcionalmente al menos un conservante conocido. Entre los conservantes se incluyen, pero no se limitan a, fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, nitrito fenilmercúrico, fenoxietanol, formaldehído, clorobutanol, cloruro de magnesio (por ejemplo, hexahidrato), alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos en un diluyente acuoso. Puede utilizarse cualquier concentración o mezcla adecuada conocida en la técnica, como 0,001-5 %, o cualquier intervalo o valor dentro del mismo. Ejemplos no limitantes incluyen, sin conservante, 0,1-2 % m-cresol, 0,1-3 % alcohol bencílico, 0,001-0,5 % timerosal, 0,001-2,0 % feno, 0,0005-1,0 % alquilparabeno(s), y similares.

Otros excipientes, por ejemplo, agentes de isotonicidad, tampones, antioxidantes, potenciadores de la conservación, pueden añadirse opcionalmente al diluyente. Se suele utilizar un agente isotónico, como la glicerina, en concentraciones conocidas. Es preferible añadir un tampón fisiológicamente tolerado para mejorar el control del pH. Las composiciones farmacéuticas pueden abarcar una amplia gama de pH, como por ejemplo, de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 10, específicamente, una gama de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 9, y más específicamente, una gama de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0. En un aspecto, las formulaciones de la presente invención tienen un pH entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,8. Los tampones adecuados incluyen tampones de fosfato, fosfato sódico y solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Otros aditivos, como solubilizantes farmacéuticamente aceptables como Tween 20 (monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán), TWEEN 40 (monopahnato de polioxietileno (20) sorbitán), TWEEN 80 (monooleato de polioxietileno (20) sorbitán), Pluronic F68 (copolímeros en bloque de polioxietileno polioxipropileno), y PEG (polietilenglicol) o tensioactivos no iónicos como polisorbato 20 u 80 o poloxámero 184 o 188, polioles PLURONIC®, otros copolímeros en bloque y quelantes como EDTA y EGTA pueden añadirse opcionalmente a las composiciones farmacéuticas para reducir la agregación. Estos aditivos son especialmente útiles si se utiliza una bomba o un recipiente de plástico para administrar la composición farmacéutica. La presencia de tensioactivos farmacéuticamente aceptables mitiga la propensión de la composición a agregarse.

La composición de la invención actualmente reivindicada también puede contener los conservantes metilparabeno (también conocido como éster metílico del ácido 4-hidroxibenzoico; p-hidroxibenzoato de metilo; o METIL PARASEPT), etilparabeno (también conocido como éster etílico del ácido 4-hidroxibenzoico; p-hidroxibenzoato de etilo; o ETIL PARASEPT), propilparabeno (también conocido como éster propílico del ácido 4-hidroxibenzoico; p-hidroxibenzoato de propilo; NIPASOL; o PROPYL CHEMOSEPT) y/o butilparabeno (también conocido como éster propílico del ácido 4-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzoato de propilo; o BUTYL CHEMOSEPT). En algunas realizaciones, la composición contiene metilparabeno y/o propilparabeno.

Las composiciones de la invención actualmente reivindicada también pueden administrarse en forma de liposomas. Como es conocido en la técnica, los liposomas se derivan generalmente de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos hidratados mono o multilamelares que se dispersan en un medio acuoso. Puede utilizarse cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metaboizable capaz de formar liposomas. Las presentes composiciones en forma de liposomas pueden contener, además de los compuestos de la invención actualmente reivindicados, estabilizantes, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticas. Los procedimientos para formar liposomas son conocidos en la técnica (véase Prescott, ed., METH. CELL BIOL. 14:33 (1976)). Los liposomas, los procedimientos de fabricación y los procedimientos de uso se describen en Patente de EE.UU. n.º 4.089.8091 (proceso para la preparación de liposomas), 4,233,871 (procedimientos relativos a materiales biológicamente activos en vesículas lipídicas), 4,438,052 (proceso para producir miscelas mixtas), 4,485,054 (grandes vesículas multilamelares), 4,532,089 (liposomas de tamaño gigante y procedimientos para producirlos), 4,897,269 (sistema de administración de arrastre liposomal), 5,820,880 (formulaciones liposomales), etc.

Durante cualquiera de los procesos de preparación de los compuestos de la invención actualmente reivindicada, puede ser necesario y/o deseable proteger grupos sensibles o reactivos en cualquiera de las moléculas en cuestión. Esto puede conseguirse mediante grupos protectores convencionales, como los descritos en PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC CHEMISTRY (1973); and GREENE AND WUTS, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (1991). Los grupos protectores pueden eliminarse en una etapa posterior conveniente utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

El compuesto de la invención actualmente reivindicado puede solubilizarse o suspenderse en un preconcentrado (antes de diluirlo con un diluyente), añadirse al preconcentrado antes de diluirlo, añadirse al preconcentrado diluido o añadirse a un diluyente antes de mezclarlo con el preconcentrado. El compuesto de la invención también puede coadministrarse como parte de una forma de dosificación independiente, para obtener un efecto terapéutico. Opcionalmente, el compuesto de la invención reivindicada puede estar presente en una primera cantidad solubilizada y en una segunda cantidad no solubilizada (en suspensión).

La formulación farmacéutica también puede contener portadores farmacéuticamente aceptables adecuados que comprendan excipientes y auxiliares que faciliten la transformación de los compuestos activos en preparados que puedan administrarse a animales, como se describe en el presente documento.

Para la administración oral en forma de comprimido o cápsula, un compuesto puede combinarse con un portador inerte oral no tóxico farmacéuticamente aceptable, como etanol, glicerol, agua y similares. Además, cuando se desee o sea necesario, también pueden incorporarse a la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes desintegrantes y colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen, sin limitación, almidón; gelatina; azúcares naturales como glucosa o beta-lactosa; edulcorantes de maíz; gomas naturales y sintéticas como acacia, tragacanto o alginato sódico, carboximetilcelulosa; polietilenglicol; ceras y similares. Los lubricantes utilizados en estas formas de dosificación incluyen, sin limitación, oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los desintegrantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares.

Para la administración oral, la composición también contiene opcionalmente un edulcorante. Los edulcorantes incluyen, pero no se limitan a, sacarosa, fructosa, sacarina sódica, sucralosa (SPLEND®), sorbitol, manitol, aspartamo, ciclamato sódico y similares, así como sus combinaciones.

- 5 Las suspensiones acuosas, emulsiones y/o elixires para administración oral de esta invención pueden combinarse con diversos agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, tales como, pero no limitados a sabores de naranja o limón, agentes colorantes, tales como colorantes, colorantes naturales o pigmentos, además de los diluyentes tales como agua, glicerina y diversas combinaciones, como se describe en el presente documento.

- 10 Las composiciones farmacéuticas de la invención que se reivindica en la actualidad, adecuadas para la administración oral, pueden presentarse como unidades discretas, como cápsulas, grageas, cápsulas lisas o comprimidos, cada una de las cuales contiene una cantidad predeterminada del compuesto; como polvo o gránulos; como solución o suspensión en un líquido acuoso o en un líquido no acuoso; o como emulsión líquida de aceite en agua o emulsión de agua en aceite, y como bolo, etc.

- 15 Un comprimido puede fabricarse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos pueden prepararse comprimiendo, en una máquina adecuada, el compuesto en forma fluida, como polvo o gránulos, mezclado opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse moldeando, en una máquina adecuada, una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden estar opcionalmente recubiertos o ranurados y pueden estar formulados para proporcionar una liberación lenta o controlada del compuesto que contienen.

- 20 Además, las composiciones que comprenden compuestos pueden incorporarse en polímeros biodegradables que permiten la liberación sostenida del compuesto. Los polímeros biodegradables y sus usos se describen detalladamente en Brem et al., 74 J. NEUROSURG. 441-46 (1991). Ejemplos adecuados de composiciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen un compuesto de la invención actualmente reivindicada, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (incluyendo poli(2-hidroxietilmetacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente estadounidense n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etilvinilacetato no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico y ácido glicólico como el LUPRON DEPOT® (Tap Pharmaceuticals, Inc., Chicago, Ill.) (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico y ácido glicólico y acetato de leuprolida), y poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

- 30 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones pueden presentarse en envases unidos o multidosis, ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en una condición de secado por congelación (liofilizado) requiriendo únicamente la adición del portador líquido estéril, agua para inyectables, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

- 40 Para la administración parenteral, se desean suspensiones y soluciones estériles. Cuando se desea una administración intravenosa, se emplean preparados isotónicos que suelen contener conservantes adecuados. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía parenteral mediante la inyección de una composición farmacéutica que comprende un compuesto disuelto en un portador líquido inerte. El término "parenteral", tal y como se utiliza aquí, incluye, entre otras, inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraperitoneales o técnicas de infusión. Los portadores líquidos aceptables incluyen, aceites vegetales tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo y similares, así como disolventes orgánicos tales como solketal, glicerol formal y similares. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse disolviendo o suspendiendo el compuesto en el portador líquido de forma que la formulación final contenga entre aproximadamente 0,005 % y un 30 % en peso de un compuesto.

- 50 La composición de la invención actualmente reivindicada también puede incluir agentes terapéuticos adicionales tales como, pero no limitados a, fármacos hidrofílicos, fármacos hidrofóbicos, macromoléculas hidrofílicas, citocinas, peptidomiméticos, péptidos, proteínas, toxoides, sueros, anticuerpos, vacunas, nucleósidos, nucleótidos, análogos de nucleósidos, materiales genéticos y/o combinaciones de los mismos.

- 55 El agente terapéutico adicional puede solubilizarse o suspenderse en un preconcentrado (antes de diluirlo con un diluyente), añadirse al preconcentrado antes de diluirlo, añadirse al preconcentrado diluido o añadirse a un diluyente antes de mezclarlo con el preconcentrado. El agente terapéutico adicional también puede coadministrarse como parte de una forma de dosificación independiente, para obtener un efecto terapéutico. Opcionalmente, el(los) agente(s) terapéutico(s) adicional(es) puede(n) estar presente(s) en una primera cantidad solubilizada y en una segunda cantidad no solubilizada (en suspensión) Dicho(s) agente(s) terapéutico(s) adicional(es) puede(n) ser cualquier agente(s) que tenga(n) valor terapéutico o de otro tipo cuando se administra(n) a un animal, en particular a un mamífero, como por ejemplo arrastres, nutrientes y agentes de diagnóstico.

Además del compuesto y las composiciones de la invención actualmente reivindicada, y agentes farmacéuticamente activos adicionales, la formulación farmacéutica también puede contener portadores farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones mat que pueden administrarse a animales, como se describe en el presente documento.

- 5 Las formulaciones farmacéuticas útiles en la invención actualmente reivindicada pueden contener una cantidad de un compuesto(s) según esta invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la afección, trastorno o enfermedad del sujeto que se está tratando.

La invención actualmente reivindicada se refiere además a la administración de al menos un compuesto divulgado en el presente documento por las siguientes vías, incluidas, entre otras, oral, parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelular, intracelular, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, en bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, iontoforética o transdérmica.

- 15 A veces puede ser deseable administrar los compuestos de la invención actualmente reivindicada al sujeto durante periodos de tiempo prolongados, durante periodos de una semana a un año a partir de una única administración. Ciertos dispositivos médicos pueden emplearse para proporcionar una dosificación continua intermitente o a demanda de un paciente. Los dispositivos pueden ser una bomba de difusión u otro dispositivo que contenga un depósito de fármaco y, opcionalmente, componentes de diagnóstico o monitorización para regular la administración del fármaco.
- 20 Pueden utilizarse diversas formas farmacéuticas de liberación lenta, de depósito o de implante. Una forma de dosificación puede contener una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable de un compuesto aquí divulgado que tenga un bajo grado de solubilidad en los fluidos corporales, (a) una sal de adición ácida con un ácido polibásico como ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido tánico, ácido pamóico, ácido alginico, ácido poliglútamico, ácidos naftaleno mono- o di-sulfónico, ácido poligalacturónico y similares; (b) una sal con un catión metálico polivalente, como zinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio y similares, o con un catión orgánico formado a partir de, por ejemplo, N,N'-dibencil-etilendiamina o etilendiamina; o c) combinaciones de a) y b), por ejemplo, una sal de tanato de zinc. Además, los compuestos de la invención reivindicada actualmente o una sal relativamente insoluble como las que se acaban de describir, pueden formularse en un gel, un gel de monoestearato de aluminio con, por ejemplo, aceite de sésamo, adecuado para inyección. Las sales incluyen,
- 25 entre otras, sales de zinc, sales de tanato de zinc, sales de pamoato y similares. Otro tipo de formulación de depósito de liberación lenta para inyección contendría el compuesto de sal dispersado o encapsulado en un polímero de degradación lenta, no tóxico y no antigénico, como un polímero de ácido poliláctico/ácido poliglicólico, incluidas las formulaciones descritas en la Patente de EE.UU. nº 3.773.919. Los compuestos o sales relativamente insolubles de los mismos, como los descritos anteriormente, también pueden formularse en gránulos silásticos de matriz de colesterol, especialmente para su uso en animales. Se conocen en la literatura otras formulaciones de liberación lenta, de depósito o de implante, por ejemplo, liposomas gaseosos o líquidos. Véase, *por ejemplo* Patente estadounidense nº 5.770.222; SUSTAINED AND CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS (1978).
- 30
- 35

Otros ejemplos incluyen la provisión de los compuestos de la invención actualmente reivindicada para ser administrados mediante un sistema de liberación sostenida que contiene una composición biodegradable. La composición biodegradable puede estar compuesta por un material biodegradable, coagulable en agua, no polimérico y un disolvente orgánico biocompatible y no tóxico que sea miscible a dispersable en un medio acuoso. El sistema de administración puede implantarse en una zona de implante haciendo que el disolvente se disipe, disperse o lixivie de la composición al fluido tisular circundante a través de una matriz microporosa resultante.

- 40 El término "sitio de implante" se refiere a un sitio en el que se aplica la composición no polimérica. La implantación o sitio de implantación también puede incluir la incorporación de la composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la invención actualmente reivindicada con un dispositivo sólido. La composición farmacéutica puede incorporarse a un recubrimiento de un stent que se implanta en un sujeto. Además, pueden utilizarse otros materiales sólidos o biodegradables como sustrato sobre el que se aplica la composición farmacéutica. A continuación, el material recubierto, que comprende la composición farmacéutica, se implanta, se inserta o se encuentra adyacente al sujeto o paciente. El término "biodegradable" significa que el material no polimérico y/o la matriz del implante se degradarán con el tiempo por la acción de enzimas, por acción hidrolítica simple o catalizada enzimáticamente y/o por otros mecanismos similares en el cuerpo humano. Por "bioerodible" se entiende que la matriz del implante se erosionará o degradará con el tiempo debido, al menos en parte, al contacto con sustancias que se encuentran en los fluidos tisulares circundantes, la acción celular y similares. Por "bioabsorbible" se entiende que la matriz no polimérica será descompuesta y absorbida dentro del cuerpo humano, por una célula, un tejido y similares.
- 45
- 50
- 55

Los materiales no poliméricos que pueden utilizarse en la composición son generalmente aquellos que son biocompatibles, sustancialmente insolubles en agua y fluidos corporales, y biodegradables y/o bioerodibles. El material no polimérico puede solubilizarse, al menos parcialmente, en un disolvente orgánico soluble en agua. Los materiales no poliméricos también son capaces de coagularse o solidificarse para formar una matriz de implante sólida. El material no polimérico se combina con un disolvente orgánico compatible y adecuado para formar una composición que tenga la consistencia deseada, desde acuosa a viscosa hasta una masilla o pasta untada.

- 60

Los disolventes orgánicos adecuados son aquellos que son biocompatibles, farmacéuticamente aceptables y que disolverán al menos parcialmente el material no polimérico. El disolvente orgánico tiene una solubilidad en agua que oscila entre miscible y dispersable. Opcionalmente, se puede incluir en la composición un agente formador de poros para generar poros adicionales en la matriz del implante. El agente formador de poros puede ser cualquier sustancia orgánica o inorgánica, farmacéuticamente aceptable, que sea sustancialmente soluble en agua o fluido corporal, y se disipará desde el material no polimérico coagulante y/o la matriz sólida del implante al fluido corporal circundante en el lugar del implante.

Los compuestos de la invención actualmente reivindicada son capaces de proporcionar un efecto biológico, fisiológico o terapéutico local o sistémico en el cuerpo de un animal. En la formulación de algunas composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, el compuesto es preferiblemente soluble o dispersable en la composición no polimérica para formar una mezcla homogénea y, tras la implantación, se incorpora a la matriz del implante. A medida que la matriz sólida se degrada con el tiempo, el compuesto es capaz de liberarse de la matriz al fluido tisular adyacente, y al tejido u órgano corporal pertinente, ya sea adyacente o distante del lugar del implante, preferiblemente a una velocidad controlada. La liberación del compuesto de la matriz puede variar en función de la solubilidad del compuesto en un medio acuoso, la distribución del compuesto dentro de la matriz, el tamaño, la forma, la porosidad y la solubilidad y biodegradabilidad de la matriz sólida. Véase, *por ejemplo* Patente estadounidense nº 5.888.533. Las cantidades y concentraciones de los ingredientes de la composición administrada al paciente serán generalmente eficaces para cumplir la tarea prevista.

En otras realizaciones, los compuestos de la invención actualmente reivindicada pueden administrarse mediante sistemas de administración de agentes bioactivos que contienen micropartículas suspendidas en una matriz polimérica. Las micropartículas pueden ser microcápsulas, microesferas o nanoesferas actualmente conocidas en la técnica. Las micropartículas deben ser capaces de ser arrastradas intactas dentro de un polímero que sea o se convierta en gel una vez dentro de un entorno biológico. Las micropartículas pueden ser biodegradables o no biodegradables. Muchas técnicas de microencapsulación utilizadas para incorporar un agente bioactivo en un portador de micropartículas se enseñan en el arte. Véase, *por ejemplo* Patente de EE.UU. n.º 4.652.441; 5,100,669; 4,438,253 y 5,665,428.

Una matriz polimérica preferida será biodegradable y presentará solubilidad en agua a baja temperatura y experimentará una gelificación térmica reversible a temperaturas corporales fisiológicas de mamíferos. La matriz polimérica es capaz de liberar la sustancia arrastrada dentro de su matriz con el tiempo y de forma controlada. Los polímeros se degradan gradualmente por hidrólisis enzimática o no enzimática en medios acuosos o fisiológicos. Véase, *por ejemplo* Patente estadounidense nº 6.287.588.

Los procedimientos de preparación de diversas composiciones farmacéuticas con una cierta cantidad de principios activos son conocidos, o serán evidentes a la luz de la presente divulgación, para los expertos en la materia. Los procedimientos de preparación de dichas composiciones farmacéuticas pueden incorporar otros excipientes farmacéuticos adecuados y sus formulaciones como se describe en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Martin, E.W., ed., Mack Publishing Company, 19ª ed. (1995).

Los procedimientos de preparación de los preparados farmacéuticos de la invención actualmente reivindicada se fabrican de una manera conocida, incluidos los procesos convencionales de mezcla, disolución o liofilización. Así, las preparaciones farmacéuticas líquidas pueden obtenerse combinando los compuestos activos con excipientes sólidos, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir auxiliares adecuados, si se desea o es necesario.

Un experto en la materia apreciará que un procedimiento de administración de cantidades farmacéuticamente eficaces de las composiciones de la invención a un paciente que las necesite puede determinarse empíricamente o mediante normas actualmente reconocidas en las artes médicas. Los agentes pueden administrarse a un paciente como composiciones farmacéuticas en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Se entenderá que, cuando se administra a un paciente humano, el uso diario total de los agentes de las composiciones de la invención reivindicada en la actualidad se decidirá dentro del ámbito del buen juicio médico por el médico tratante. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente concreto dependerá de diversos factores: el tipo y el grado de respuesta celular que se desea conseguir; la actividad del agente o composición específicos empleados; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; el momento de la administración, la vía de administración y la tasa de excreción del agente; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el agente específico; y factores similares bien conocidos en las artes médicas. Está dentro de la habilidad de la técnica comenzar las dosis de los agentes a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente las dosis hasta que se logre el efecto deseado.

La dosificación también puede administrarse de forma específica para cada paciente con el fin de proporcionar una concentración predeterminada de los agentes en la sangre, según se determine mediante técnicas aceptadas y rutinarias en la técnica.

En general, los compuestos aquí descritos pueden usarse solos o en combinación con otros agentes terapéuticos en dosis apropiadas definidas por pruebas rutinarias para obtener una eficacia óptima minimizando cualquier toxicidad potencial. El régimen de dosificación que utiliza un compuesto de la presente invención puede seleccionarse de acuerdo con una variedad de factores que incluyen el tipo, la especie, la edad, el peso, el sexo, la condición médica del paciente; la gravedad de la condición a tratar; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el compuesto particular empleado. Un médico o veterinario con conocimientos ordinarios puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de arrastre necesaria para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la enfermedad.

La precisión óptima para lograr concentraciones de fármaco dentro del intervalo que produce la máxima eficacia con la mínima toxicidad puede requerir un régimen basado en la cinética de la disponibilidad del compuesto a uno o más sitios diana. La distribución, el equilibrio y la eliminación de un fármaco pueden tenerse en cuenta a la hora de determinar la concentración óptima para un régimen de tratamiento. Las dosis de un compuesto descrito en el presente documento pueden ajustarse cuando se combinan para lograr los efectos deseados. Por otra parte, las dosis de estos diversos agentes terapéuticos pueden optimizarse de forma independiente y combinarse para lograr un resultado sinérgico en el que la patología se reduzca más de lo que lo haría si se utilizara cualquiera de los agentes por separado.

En particular, la toxicidad y la eficacia terapéutica de un compuesto divulgado en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la LD_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre el efecto tóxico y el terapéutico es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD_{50}/ED_{50} . Se prefieren compuestos que presenten grandes índices terapéuticos, excepto cuando la citotoxicidad del compuesto sea la actividad o el resultado terapéutico deseado. Aunque pueden utilizarse compuestos que presenten efectos secundarios tóxicos, un sistema de administración puede dirigir dichos compuestos al lugar del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de este modo, reducir los efectos secundarios. En general, los compuestos de la presente invención pueden administrarse de manera que se maximice la eficacia y se minimice la toxicidad.

Los datos obtenidos de ensayos en cultivos celulares y estudios en animales pueden utilizarse en la formulación de una gama de dosis para su uso en seres humanos. Las dosis de tales compuestos se sitúan preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en los procedimientos de la presente invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la IC_{50} (la concentración del compuesto de ensayo que alcanza una inhibición semimáxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Dicha información puede utilizarse para determinar con precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Además, la administración de dosis de las composiciones farmacéuticas de la presente invención puede optimizarse utilizando un sistema de modelado farmacocinético/farmacodinámico. Pueden elegirse uno o más regímenes de dosificación y puede utilizarse un modelo farmacocinético/farmacodinámico para determinar el perfil farmacocinético/farmacodinámico de uno o más regímenes de dosificación. A continuación, puede seleccionarse uno de los regímenes de dosificación para la administración que logre la respuesta farmacocinética/farmacodinámica deseada basándose en el perfil farmacocinético/farmacodinámico particular. Véase Patente estadounidense nº 6.747.002.

Se conocen procedimientos en la técnica para determinar las dosis eficaces con fines terapéuticos y profilácticos para las composiciones farmacéuticas divulgadas o las combinaciones de fármacos divulgadas, formuladas o no en la misma composición. A efectos terapéuticos, el término "cantidad conjuntamente eficaz", tal como se utiliza aquí, significa la cantidad de cada compuesto activo o agente farmacéutico, solo o en combinación, que provoca la respuesta biológica o medicinal en un sistema tisular, animal o humano que busca un investigador, veterinario, médico u otro clínico, que incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando. Con fines profilácticos (es decir, para inhibir la aparición o la progresión de un trastorno), el término "cantidad conjuntamente eficaz" se refiere a la cantidad de cada compuesto activo o agente farmacéutico, solo o en combinación, que inhibe en un sujeto la aparición o la progresión de un trastorno tal como lo busca un investigador, veterinario, médico u otro clínico. Así, la presente invención proporciona además combinaciones de dos o más agentes terapéuticos en las que, (a) cada agente terapéutico se administra en una cantidad independientemente terapéutica o profilácticamente eficaz; (b) al menos un agente terapéutico de la combinación se administra en una cantidad que es subterapéutica o subprofiláctica si se administra solo, pero es terapéutica o profiláctica cuando se administra en combinación con el segundo agente terapéutico o agentes terapéuticos adicionales según la invención; o (c) ambos agentes terapéuticos se administran en una cantidad que es subterapéutica o subprofiláctica si se administran solos, pero son terapéuticos o profilácticos cuando se administran juntos. Las combinaciones de tres o más agentes terapéuticos son análogamente posibles. Los procedimientos de terapia combinada incluyen la administración conjunta de una única formulación que contenga todos los agentes activos; la administración esencialmente simultánea de más de una formulación; y la administración de dos o más agentes activos formulados por separado.

Más específicamente, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una única dosis diaria, o la dosis diaria total puede administrarse en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día. Las dosis pueden administrarse durante una semana, un mes o a lo largo de varios meses, 3, 6, 9 o 12 meses, o intervalos conocidos en la técnica y determinados como clínicamente relevantes. Las dosis pueden continuarse durante toda la vida del paciente, o suspenderse cuando el juicio clínico lo justifique. La dosis diaria de las composiciones puede variar en un amplio intervalo de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 1.000 mg por paciente y día. El intervalo puede ser más particularmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal al día, aproximadamente 0,1-100 mg, aproximadamente 1,0-50 mg o aproximadamente 1,0-20 mg al día para adultos (con aproximadamente 60 kg). Además, las dosis pueden ser de aproximadamente 0,5-10 mg/kg por día, aproximadamente 1,0-5,0 mg/kg por día, 5,0-10 mg/kg por día, o dosis equivalentes según determine un profesional, para alcanzar una concentración sérica que sea clínicamente relevante.

En el caso de las inyecciones, suele ser conveniente administrarlas por vía intravenosa en una cantidad de aproximadamente 0,01-30 mg, aproximadamente 0,1-20 mg o aproximadamente 0,1-10 mg al día a adultos (de unos 60 kg). Las dosis intravenosas pueden incluir un bolo o una dosificación lenta. En el caso de otros animales, puede administrarse también la dosis calculada para 60 kg.

Como ejemplo no limitante, el tratamiento de seres humanos o animales puede proporcionarse como una dosis única o periódica de un compuesto de la presente invención de 0,0001 a aproximadamente 1.000 mg por paciente, por día. El intervalo puede ser más particularmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal al día, aproximadamente 0,1-100 mg, aproximadamente 1,0-50 mg o aproximadamente 1,0-20 mg al día para adultos (con aproximadamente 60 kg). Además, las dosis pueden ser de aproximadamente 0,5-10 mg/kg por día, aproximadamente 1,0-5,0 mg/kg por día, 5,0-10 mg/kg por día, o dosis equivalentes según determine un profesional, para alcanzar una concentración sérica que sea clínicamente relevante.

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

La invención proporciona además un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno mediado por la 12-lipoxigenasa. El procedimiento comprende administrar a un mamífero una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto de la presente invención.

La enfermedad o trastorno mediado por 12-lipoxigenasa a tratar o prevenir es típicamente una enfermedad o trastorno en el que la producción de ácido 12-hidroxiperoxisatetraenoico (12(S)-HPETE) y/o ácido 12-hidroxieicosatetraenoico (12(S)-HETE) está implicada en el desarrollo o progresión de la enfermedad o trastorno. Las enfermedades y los trastornos mediados por la 12-LOX incluyen aquellos en los que la 12-LOX es un mediador directo de las enfermedades y los trastornos, así como aquellos en los que la inhibición de la 12-LOX tiene un valor terapéutico en el tratamiento o la prevención de las enfermedades y los trastornos.

En una realización, la invención actualmente reivindicada proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno mediado por 12-lipoxigenasa, que comprende administrar a un mamífero del mismo una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de cualquiera de los compuestos de Fórmula (I), o una sal, enantiómeros, una mezcla de enantiómeros, o diastereómero del mismo.

En una realización, la 12-lipoxigenasa es la 12-lipoxigenasa humana.

En una realización, la enfermedad o trastorno mediado por la 12-lipoxigenasa se selecciona del grupo que consiste en diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, enfermedad renal diabética, enfermedad nerviosa diabética, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Alzheimer, esteatohepatitis no alcohólica, hemostasia plaquetaria, enfermedades cutáneas, trombocitopenia inducida por heparina, trombosis y cáncer.

En una realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de mama y cáncer de pulmón.

En una realización, la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular.

En una realización, la invención actualmente reivindicada proporciona un procedimiento para tratar o prevenir el tipo 1 y/o tipo 2, que comprende administrar a un mamífero del mismo una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de cualquiera de los compuestos de Fórmula (I), o una sal, enantiómeros, una mezcla de enantiómeros, o diastereómero del mismo.

En una realización, la invención actualmente reivindicada proporciona un procedimiento para tratar o prevenir la trombosis, que comprende administrar a un mamífero del mismo una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz

de cualquiera de los compuestos de Fórmula (I), una sal, enantiómeros, una mezcla de enantiómeros, o diastereómero del mismo.

En una realización, la invención actualmente reivindicada proporciona un procedimiento para reducir la agregación plaquetaria inducida por PAR4-AP, que comprende administrar a un mamífero del mismo una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de cualquiera de los compuestos de Fórmula (I), una sal, enantiómeros, una mezcla de enantiómeros, o diastereómero del mismo.

En una realización, la invención actualmente reivindicada proporciona un procedimiento para reducir la movilización de calcio inducida por PAR4-AP, que comprende administrar a un mamífero del mismo una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de cualquiera de los compuestos de Fórmula (I), una sal, enantiómeros, una mezcla de enantiómeros, o diastereómero del mismo.

En una realización, los inhibidores de 12-LOX tienen utilidad en escenarios de trasplante/xenotrasplante, por ejemplo, donde los islotes son tratados ex vivo para mejorar la supervivencia antes del trasplante.

La invención actualmente reivindicada se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que la 12(S)-lipoxigenasa plaquetaria (12-LOX), una enzima productora de oxilipina altamente expresada en la plaqueta humana, es un componente esencial de la activación plaquetaria mediada por FcγR1a. Por ejemplo, **la Fig. 11** muestra cómo la 12-LOX modula la agregación plaquetaria mediada por FcγR1a. Sin querer ceñirnos a la teoría, las plaquetas son esenciales para mantener la hemostasia tras una inflamación o lesión de la vasculatura. La activación del receptor FcγR1a conduce a una activación plaquetaria inmunomediada, que puede dar lugar a complicaciones trombóticas que desemboquen en infarto de miocardio y accidente cerebrovascular. Se ha demostrado que la inhibición de la activación mediada por FcγR1a en las plaquetas limita la trombosis y es el principal objetivo para la prevención de la activación plaquetaria inmunomediada. Sin embargo, no se sabía que la 12-LOX estuviera implicada en la patogénesis de la trombosis mediada por FcγR1a hasta el descubrimiento de los inventores. En consecuencia, la tecnología aquí divulgada pretende explotar este sorprendente descubrimiento y proporcionar procedimientos novedosos para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en el que esté implicada una vía mediada por FcγR1a. Dicha enfermedad o trastorno puede ser un trastorno inmunomediado de trombocitopenia y trombosis. En algunos aspectos de la invención actualmente reivindicada, se divulgan aquí procedimientos novedosos para inhibir la activación plaquetaria y prevenir o tratar la trombosis.

También se divulga un procedimiento para inhibir o disminuir la activación plaquetaria, el procedimiento comprende contactar una plaqueta con un inhibidor de 12-lipoxigenasa. En algunas realizaciones, la activación plaquetaria es inmunomediada. En algunas realizaciones, la activación plaquetaria inmunomediada es el resultado de la activación de un receptor FcγR1a.

Un compuesto o agente se considera un inhibidor de la 12-LOX si disminuye la función o actividad de la 12-LOX en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 %. Un inhibidor de la 12-LOX puede ser un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico, un compuesto biológico (por ejemplo, proteínas o fragmentos de las mismas, anticuerpos o fragmentos de los mismos, ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos, sacáridos o péptidos), o cualquier combinación de los mismos. Un inhibidor de la 12-LOX también puede ser sintético o natural. Ejemplos no limitantes de inhibidores de la 12-LOX incluyen ETYA (N° CAS: 1191-85-1), baicaleína (N° CAS 491-67-8), 15(S)-HETrE (N° CAS 13222-49-6), ácido cafeico (N° CAS 331-39-5), CDC (N° CAS 132465-11-3), esculetina (N° CAS 305-01-1), 3,4-dihidroxibencilidencianoacetato de etilo (N° CAS 132464-92-7), ETI (N° CAS 13488-22-7), ácido ferúlico (N° CAS 1135-24-6), Gosipol (N° CAS 303-45-7), 2-TEDC (N° CAS 132465-10-2), Hinokitiol (N° CAS 499-44-5), ácido 8,11,14-eicosatriynoico (N° CAS 34262-64-1), dafnodorina A, ML355, y una combinación de los mismos. La estructura química de ML355 se describe en Luci et al. (J Med Chem. 2014, 57, 495-506), cuyo contenido se incorpora íntegramente por referencia.

Los inhibidores de 12-LOX también se divulgan, por ejemplo, en US20130096159, WO1990012008, US6217875, US4605669, US4623661, CA1327204, US20070111965, US4897422, US20060193797, US5120752, US5112848, US5574062, EP0416609, US4822811, EP0456760, US4761403 cuyo contenido se incorpora por referencia para sus enseñanzas sobre los inhibidores de la 12-LOX.

En algunas realizaciones, un inhibidor de 12-LOX utilizado para los procedimientos aquí divulgados puede ser una combinación de inhibidores de 12-LOX. En algunas de estas realizaciones, las proporciones de mezcla de los inhibidores de la 12-LOX se optimizan para proporcionar los máximos efectos terapéuticos.

Se ha descubierto que al menos algunos de los inhibidores de 12-LOX (por ejemplo, ML355) muestran baja toxicidad y buena eliminación del organismo (Luci et al., J Med Chem. 2014, 57, 495-506), lo que demuestra los valores terapéuticos de los procedimientos aquí divulgados.

En algunas realizaciones, el inhibidor de 12-LOX entra en contacto con la plaqueta in vitro. Por ejemplo, las plaquetas pueden obtenerse de un sujeto y luego cultivarse en un recipiente (por ejemplo, una placa de 96 pocillos o una placa de Petri). El contacto in vitro puede utilizarse para aplicaciones como la evaluación de la eficacia del inhibidor de la 12-LOX.

En algunas realizaciones, el inhibidor de 12-LOX entra en contacto con la plaqueta in vivo. En estas realizaciones, el contacto in vivo puede ser en un sujeto que toma heparina. El sujeto podría necesitar tratar o prevenir un trastorno de trombocitopenia y trombosis inmunomediado.

La activación plaquetaria puede evaluarse o medirse mediante diversos procedimientos. Por ejemplo, la activación plaquetaria puede cuantificarse mediante factores como el cambio de forma y la tendencia a la agregación. El cambio de forma de las plaquetas puede evaluarse mediante citometría de flujo o microscopía electrónica. La agregación plaquetaria puede medirse en un agregómetro plaquetario. La activación plaquetaria también puede cuantificarse midiendo los niveles en sangre u orina de productos metabólicos plaquetarios o biomarcadores relevantes (por ejemplo, los componentes del gránulo alfa, la tromboglobulina beta y el factor plaquetario 4, el tromboxano B2 o la forma soluble de la molécula de adhesión P-selectina). Algunos procedimientos para medir la activación plaquetaria se describen en US7011938, WO1996012956 y US6391568.

Como los inhibidores de la 12-LOX pueden inhibir o disminuir la activación plaquetaria mediada por el sistema inmunitario, otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para tratar o prevenir un trastorno de trombocitopenia y trombosis mediado por el sistema inmunitario, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un inhibidor de la 12-lipoxigenasa. Algunos ejemplos de trombocitopenia inmunomediada y trastornos de trombosis son, entre otros, la trombocitopenia inducida por heparina (TIH), el síndrome antifosfolípido, el síndrome de sepsis, la trombosis asociada a anticuerpos monoclonales terapéuticos o de diagnóstico y la púrpura trombótica trombocitopénica.

En algunas realizaciones, un trastorno de trombocitopenia y trombosis inmunomediado puede desencadenarse en el sujeto por el uso de una o más heparinas o derivados de las mismas. En estas realizaciones, el trastorno de trombocitopenia y trombosis inmunomediado es la trombocitopenia inducida por heparina (TIH).

La TIH es un trastorno resultante de la administración de un tratamiento con heparina, y consiste en el desarrollo de un recuento bajo de plaquetas (por ejemplo, <100.000 plaquetas por mililitro en la sangre). En el presente documento, los términos "TIH" y "trombocitopenia y trombosis inducidas por heparina (TIHIT)" se utilizan indistintamente. Paradójicamente, la medicación anticoagulante y la trombocitopenia no se manifiestan como hemorragias, sino como trombosis potencialmente mortales. Los fenómenos trombóticos son multifocales y afectan, por ejemplo, a venas, arterias y microvasculatura. En algunos casos de TIH, los trombos se forman en lechos macrovasculares con síntomas clínicos manifiestos, como TVP/EP, infarto de miocardio, ictus o isquemia de las extremidades. En otros casos, los trombos se encuentran en la microvasculatura, con efectos que son manifiestos clínicamente (por ejemplo, trombosis suprarrenal seguida de hemorragia, necrosis cutánea) o permanecen subclínicos.

Se encontró que la TIH ocurría en el 1 % al 3 % de los pacientes que recibían heparina no fraccionada, y en el 0,1 % de los pacientes que recibían heparina de bajo peso molecular. Actualmente no existe un procedimiento de diagnóstico estándar para la TIH. Algunos procedimientos de diagnóstico para HIT se divulgan, por ejemplo, en WO2001004159 y WO2013165969. También se han desarrollado sistemas de puntuación clínica para predecir la probabilidad de aparición de TIH en diversas situaciones (Elalamy I, et al., Ann. Med. 2000, 32, 60-67; Samama M, et al., Bull Acad Natl Med. 1998, 182, 1517-1533). Por ejemplo, en un sistema de puntuación clínica, se otorgan puntuaciones a factores como la evolución del recuento de plaquetas, el desarrollo de trombosis y otras causas de trombocitopenia.

Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, normalmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal también se utiliza para conseguir un intervalo de concentración y una vía de administración deseables. Esta información puede utilizarse después para determinar las dosis y vías de administración útiles en otros sujetos. Generalmente, la cantidad terapéuticamente eficaz depende del efecto terapéutico deseado.

Los regímenes de dosificación de un inhibidor de 12-LOX pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Puede ser ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y uniformizar la dosificación.

Un médico o veterinario con conocimientos ordinarios en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz necesaria de la composición farmacéutica. Por ejemplo, el médico o veterinario podría iniciar las dosis de un inhibidor de la 12-LOX a niveles inferiores a los necesarios para conseguir el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosis hasta conseguir el efecto deseado.

Un médico o veterinario con conocimientos ordinarios en la materia también puede determinar fácilmente cuándo iniciar la administración de una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de 12-LOX. Debe tenerse en cuenta que el momento de la administración suele depender de los resultados del diagnóstico. Por ejemplo, la composición farmacéutica que comprende un inhibidor de 12-LOX puede administrarse cuando se han producido uno o más síntomas de TIH (por ejemplo, un descenso en el recuento de plaquetas).

El procedimiento aquí divulgado puede usarse en combinación con otros procedimientos o terapias para tratar un trastorno de trombocitopenia y trombosis inmunomediado (por ejemplo, HIT). Por ejemplo, un enfoque terapéutico para tratar la TIH es la supresión del tratamiento con heparina y su sustitución por inhibidores directos de la trombina (por ejemplo, danaparoides, argatroban o lepirudina). Cabe señalar que la simple retirada de la heparina no pone fin al trastorno de trombocitopenia y trombosis inmunomediado. En otro ejemplo, puede utilizarse un inhibidor del Factor Xa (por ejemplo, fondaparinux) para el tratamiento de la TIH. Otras terapias incluyen, entre otras, la terapia trombolítica (por ejemplo, estreptoquinasa o uroquinasa), tromboembolectomía, plasmaféresis, IgG intravenosa a dosis altas e inhibidores de GPIIb/IIIa.

Otro aspecto de la invención reivindicada en la actualidad se refiere a un procedimiento de tratamiento o prevención de un evento trombotico, infarto de miocardio o accidente cerebrovascular, que comprende la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un inhibidor de 12-LOX. La activación plaquetaria inmunomediada puede conducir a la formación de trombos, que pueden coagular las arterias y provocar ictus, infarto de miocardio, infarto de órganos, gangrena de extremidades u otras complicaciones graves.

En algunos aspectos de todas las realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunos aspectos de todas las realizaciones, el sujeto es un ser humano.

En algunos aspectos de todas las realizaciones, el sujeto puede ser uno que presente uno o más factores de riesgo de un trastorno de trombocitopenia y trombosis inmunomediado. En algunos aspectos de todas las realizaciones, el sujeto recibe tratamiento con heparina. En algunos aspectos de todas las realizaciones, el sujeto se somete a cirugía ortopédica. Se sabe que los pacientes de cirugía ortopédica tienen un mayor riesgo de desarrollar TIH que los pacientes que reciben heparina por otras razones médicas.

Aunque se pueden utilizar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos en la práctica o prueba de esta divulgación, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. El término "comprende" significa "incluye". La abreviatura "e.g." deriva del latín *exempli gratia*, y se utiliza aquí para indicar un ejemplo no limitativo. Así, la abreviatura "e.g." es sinónimo del término "por ejemplo".

Aunque las realizaciones preferidas se han representado y descrito en detalle en el presente documento, será evidente para los expertos en la materia que se pueden realizar diversas modificaciones, adiciones, sustituciones y similares sin apartarse del espíritu de la invención y, por lo tanto, se consideran dentro del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones que siguen. Además, en la medida en que no se haya indicado ya, se entenderá por aquellos con conocimientos ordinarios en la materia que cualquiera de las diversas realizaciones aquí descritas e ilustradas pueden modificarse aún más para incorporar características mostradas en cualquiera de las otras realizaciones aquí divulgadas.

Todas las patentes y otras publicaciones; incluyendo referencias bibliográficas, patentes emitidas, solicitudes de patentes publicadas, y solicitudes de patentes co-pendientes; citadas a lo largo de esta solicitud son expresamente incorporadas aquí por referencia con el propósito de describir y divulgar, por ejemplo, las metodologías descritas en tales publicaciones que podrían ser usadas en conexión con la tecnología descrita aquí. Estas publicaciones se facilitan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada a este respecto debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a antedatar dicha divulgación en virtud de una invención anterior o por cualquier otra razón. Toda declaración relativa a la fecha o representación del contenido de estos documentos se basa en la información de que disponen los solicitantes y no constituye admisión alguna sobre la exactitud de las fechas o el contenido de estos documentos.

La descripción de las realizaciones de la divulgación no pretende ser exhaustiva ni limitar la divulgación a la forma precisa divulgada. Si bien las realizaciones específicas y los ejemplos de la divulgación se describen aquí con fines ilustrativos, son posibles diversas modificaciones equivalentes dentro del ámbito de la divulgación, como reconocerán los expertos en la materia. Por ejemplo, mientras que los pasos o funciones del procedimiento se presentan en un orden determinado, otras variantes de realización pueden realizar las funciones en un orden diferente, o las funciones pueden realizarse sustancialmente de forma simultánea. Las enseñanzas de la presente divulgación pueden aplicarse a otros procedimientos o procedimientos, según proceda. Las diversas realizaciones aquí descritas pueden combinarse para proporcionar otras realizaciones. Aspectos de la divulgación pueden ser modificados, si es necesario, para emplear las composiciones, funciones y conceptos de las referencias anteriores y la aplicación para proporcionar aún más realizaciones de la divulgación.

Los elementos específicos de cualquiera de las realizaciones anteriores pueden combinarse o sustituirse por elementos de otras realizaciones. Además, mientras que las ventajas asociadas con ciertas realizaciones de la divulgación se han descrito en el contexto de estas realizaciones, otras realizaciones pueden también exhibir tales ventajas, y no todas las realizaciones necesitan necesariamente exhibir tales ventajas para caer dentro del ámbito de la divulgación.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran algunas realizaciones y aspectos de la invención. Será evidente para los expertos en la materia que pueden realizarse diversas modificaciones, adiciones, sustituciones y similares sin alterar el alcance de

la invención, y tales modificaciones y variaciones están incluidas en el alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones siguientes. Los siguientes ejemplos no limitan en modo alguno la invención. Los compuestos **1**, **8-34**, **57** y **69-83** se proporcionan con fines ilustrativos.

5 La tecnología descrita en el presente documento se ilustra con más detalle mediante los siguientes ejemplos, que en ningún caso deben interpretarse como limitativos.

La descripción siguiente proporciona la composición de materia y el procedimiento de uso en torno a un quimiotipo 4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)bencenosulfonamida. Los nuevos quimiotipos para la inhibición de 12-LO aquí descritos son solubles, tienen propiedades ADME favorables y buenas propiedades PK *in vivo*.

10 La síntesis del compuesto **1** implicó una aminación reductora con 4-aminobenzesulfonamida y 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído. Fue necesario un enfoque por etapas que implicaba la preformación de la imina con 4-amino-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (**2**) y el benzaldehído necesario durante la noche a 100 °C. La reducción posterior de la imina con borohidruro sódico proporcionó los compuestos deseados **1**, **8-10** y **14-33** (Esquema 1, Procedimiento A). La posterior reducción de la imina con borohidruro sódico proporcionó los compuestos deseados **1**, **8-10** y **14-33** (Esquema 1, Procedimiento A). Aunque esta ruta funcionó para la mayoría de los análogos, algunos de ellos (**11-13** y **34**) requirieron una ruta alternativa en la que se utilizó un acoplamiento de tipo Buchwald-Hartwig con la 4-bromo-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida(**3**) disponible comercialmente y aminas bencílicas sustituidas por 2-metoxi para proporcionar los productos deseados con un rendimiento del 25-40 % (Esquema 1, Procedimiento B). Para las modificaciones de la porción tiazol de la molécula quisimos introducir diversidad en el paso final de la síntesis (Esquema 1, Procedimiento C). Por tanto, la reacción de la 4-aminobenzesulfonamida (**4**) disponible comercialmente con 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído en etanol a reflujo durante 18 h, seguida de tratamiento con borohidruro sódico proporcionó el compuesto **5** en un 95 % de rendimiento. El derivado de sulfonamida resultante se sometió a continuación a condiciones de N-arilación catalizadas por Cu utilizando los bromuros de heteroarilo apropiados para obtener los compuestos **35**, **38**, **44-48**, **52**, **53**, **56-59**, **61-69**, **71**, **74** y **75** en buenos rendimientos. (Wang, X. et al. Tetrahedron Lett. 2012, 53, 7-10.) A pesar de la versatilidad general de este procedimiento, hubo algunos casos aislados en los que la reacción catalizada por Cu no produjo el producto deseado (por ejemplo, los compuestos **77-83**), o los bromuros de heteroarilo no estaban fácilmente disponibles. Para estos compuestos se desarrolló una ruta menos directa calentando cloruro de 4-nitrobenceno-1-sulfonyl (**6**) y las aminas heteroarílicas requeridas a 100 °C durante 1,5 a 8 horas dependiendo de la reactividad de la amina para dar los derivados de 4-nitrofenil-sulfonamida **7** (Esquema 1, Procedimiento D). La reducción del grupo nitro se consiguió utilizando el reactor de flujo H-Cube® Pro con un 10 % de Pd sobre carbono a 50 °C y una presión de 50 bar. Alternativamente, para compuestos menos solubles que no eran modificables mediante química de flujo, se realizó una reducción Zn/AcOH a 60 °C en metanol. Una vez que se dispuso de la anilina deseada, se llevó a cabo una aminación reductora con el derivado bencil amina correspondiente para proporcionar los compuestos **36**, **37**, **39-43**, **49-51**, **54**, **55**, **60**, **70**, **72**, **73** y **76-83**. Las condiciones específicas para cada paso del Esquema 1, como se muestra en la Figura 1, son las siguientes: (i) RCHO (1,5 equiv), EtOH, 3-18 h, 100 oC, NaBH₄ (3,0 equiv), 0,5-0,6h; (ii) RCH₂NH₂ (1,2 equiv), Xantphos (0,06 equiv), Pd₂dba₃ (0,02 equiv), NaOtBu (2,5 equiv), 1,4-dioxano, MW, 30 min, 100 oC. (iii) 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (1,2 equiv), EtOH, 6 h, 100 oC, NaBH₄ (1,5 equiv), 30 min, 92 %. (iv) R'Br (1,2 equiv), K₂CO₃ (2,5 equiv), 80 oC, 6-8 h. (v) R'NH₂, piridina, 100 oC, 1,5-18 h. (vi) 10 % Pd/C, MeOH/EtOAc, 50 bar, 50 oC o zinc (4,0 equiv/0 equiv), AcOH (4,0 equiv), metanol, 60 oC, 30 min-2 h. (vii) 2-hidroxi-R-benzaldehído (1,2 equiv), EtOH, 18 h, 100 oC, NaBH₄ (3,0 equiv).

40 **Procedimientos sintéticos generales.** (Esquema 1, Procedimiento A): 4-amino-N-(tiazol-2-il)benceno sulfonamida (0,39 mmol) (**2**), y benzaldehído requerido (0,67 mmol) se combinaron en etanol (2 mL) en un tubo sellado y se calentaron a 100 °C durante 4-18 h. El sólido se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió borohidruro sódico (0,80 mmol) y se agitó durante 30 min, tiempo durante el cual la reacción se volvió clara y luego turbia. Los sólidos resultantes se filtraron, se lavaron con etanol y se purificaron mediante HPLC-prep. (gradiente 10-100 % acetonitrilo c/ 0,1 % TFA en agua c/ 0,1 % TFA) para dar el producto deseado.

45 (Esquema 1, Procedimiento B) Se añadió una solución de 4-bromo-N-(tiazol-2-il)benceno sulfonamida (0,31 mmol)(**3**) en dioxano (1 mL) a una mezcla de terc-butoxido sódico (0,78 mmol) y 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (Xantphos) (0,02 mmol).78 mmol), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (Xantphos) (0,02 mmol) y tris(dibencilideneacetona)dipaladio(0) (Pd₂dba₃) (6,27 µmol) en dioxano (1 mL). La mezcla resultante se desgasificó con argón durante 15 min. A continuación se añadió la bencilamina necesaria (0,38 mmol), se selló el recipiente y se calentó a 100 °C durante 30 min en el reactor de microondas Biotage®. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de celita. Se añadió tiol ligado a sílice Silicycle® y se agitó durante la noche, se filtró de nuevo a través de una almohadilla de celita, se concentró y se purificó por pre-HPLC (gradiente 10-100 % acetonitrilo c/ 0,1 % TFA en agua c/ 0,1 % TFA) para dar el producto deseado.

55 (Esquema 1, Procedimiento C) 4-aminobenzesulfonamida(**4**) (1,00 g, 5,81 mmol), 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (1,00 g, 7,00 mmol) en EtOH (29 mL) se calentó a reflujo durante 4 h hasta que la reacción es una mezcla turbia anaranjada. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente antes de añadir borohidruro sódico (0,33 g, 8,71 mmol) y se agitó durante 30 min más. Después de 30 min se forma un sólido blanco que se recoge por filtración y se lava con cantidades copiosas de etanol, se seca al vacío y se utiliza tal cual en reacciones posteriores. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,60-7,27 (m, 2H), 6,75-6,40 (m, 4H), 6,06 (t, J = 7,63 Hz, 1H), 4,18 (s, 2H), y 3,65 (s, 3H); ¹³C RMN (101 MHz, DMSO) δ 40., 55,32, 108,91, 109,42, 109,55, 111,29, 111,40, 121,05, 125,05, 127,49, 129,92, 150,17,

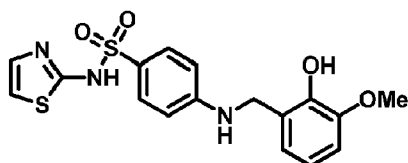
152,36, 152,36.37, 55,32, 108,91, 109,42, 109,55, 111,29, 111,40, 121,05, 125,05, 127,49, 129,92, 150,17, 152,36 y 156,94; Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 2.876 min. Procedimiento general: **(Paso iv) 4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)benzenosulfonamida (5)** (0,58 mmol), bromuro de arilo (0,70 mmol), K₂CO₃ (1,45 mmol), N,N'-dimetiletildiamina (0,29 mmol) y yoduro de cobre(I) (0,03 mmol) en 1,4-dioxano (1,5 mL) se colocaron bajo N₂ y se sellaron en un tubo sellado de 5 mL. La reacción se calentó a 70 °C durante 6 a 8 h y se monitorizó mediante análisis LC/MS. Una vez completada, la mezcla heterogénea se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y se lavó con dioxano. La solución se pasó por un cartucho tiol (barrido de metales), se diluyó con AcOEt y se lavó con NH₄Cl (2X), agua y salmuera. El material crudo se purificó mediante HPLC-prep. (gradiente 10-100 % acetonitrilo c/ 0,1 % TFA en agua c/ 0,1 % TFA) para dar el producto deseado.

(Esquema 1, Procedimiento D: *Ejemplo*) **N-(benzo[d]tiazol-2-il)-4-nitrobenzenosulfonamida (7)**: (Paso V) A una solución agitada de benzo[d]tiazol-2-amina (0,50 g, 3,35 mmol) en piridina (1,60 mL, 20,08 mmol) se añadió cloruro de 4-nitrobenzeno sulfonilo (6) (0,82 g, 3,68 mmol) en tres partes iguales. La mezcla de reacción se calentó durante 75 min a 100 °C, se enfrió a temperatura ambiente, tras lo cual se formó un precipitado amarillo. La mezcla de reacción se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 h y después el sólido amarillo se recogió por filtración, se lavó con etanol y se secó a presión reducida durante la noche para dar 1,10 del producto deseado. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,90 (ddt, J = 0,75, 1,63 y 5,59 Hz, 1H), 8,54, 8,41-8,28 (m, 1H), 8,13-7,96 (m, 2H), 7,82 (dq, J = 0,80, y 7,96 Hz, 1H), 7,45-7,34 (m, 1H), 7,31-7,19 (m, 1H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 3.272 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ = (Calculado para C₁₃H₁₀N₃O₄S₂, 336.0107) encontrado 336.0107.

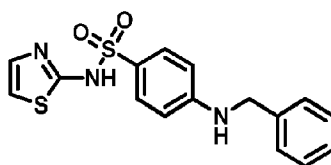
4-amino-N-(benzo[d]tiazol-2-il)benzenosulfonamida: (Paso VI) Se disolvió N-(benzo[d]tiazol-2-il)-4-nitrobenzenosulfonamida (0,20 g, 0,60 mmol), zinc (0,16 g, 2,39 mmol), ácido acético (0,14 mL, 2,39 mmol) en MeOH (3 mL), y la mezcla se calentó a 60 °C durante 2 h. La mezcla heterogénea se filtró a través de una almohadilla de celita, se lavó con metanol caliente, se concentró y se purificó usando HPLC-prep. (gradiente 10-100 % acetonitrilo c/ 0,1 % NH₄OH en agua c/ 0,1 % NH₄OH) para dar el producto deseado. Reducción alterna de nitro: La N-(benzo[d]tiazol-2-il)-4-nitrobenzenosulfonamida se disolvió en MeOH/EtOAc/THF (1:1:1) para dar una solución 0,05 M que se pasó por el reactor de flujo H-Cube Pro® utilizando un CatCart® al 10 % de Pd/C, 70 mm a 50 bar y 50 °C durante dos ciclos a 0,9 mL/min. La solución se concentró para dar un sólido amarillo pálido en un rendimiento cuantitativo. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,49-7,34 (m, 3H), 7,18 (ddd, J = 0,56, 1,21, y 8,00 Hz, 1H), 7,03 (ddd, J = 1,33, 7,24, y 7,97 Hz, 1H), 6,83 (ddd, J = 1,20, 7,25, y 7,68 Hz, 1H), 6,51-6,38 (m, 2H), 5,42 (s, 2H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 3.933 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ = (Calculado para C₁₃H₁₂N₃O₂S₂, 306.0365) encontrado 306.0360.

N-(benzo[d]tiazol-2-il)-4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)benzenosulfonamida (etapa VII, ejemplo representativo) **(35, ML355)**: la 4-amino-N-(benzo[d]tiazol-2-il)benzenosulfonamida (0,10 g, 0,33 mmol), el 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (0,075 g, 0,491 mmol) se calentaron en EtOH (1,5 mL) a 90 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de añadir NaBH₄ (0,04 g, 0,98 mmol), y se agitó durante 6 h más. 98 mmol), y se agitó durante 6 h adicionales. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se apagó con metanol y agua, después se agitó durante 20 min, los sólidos se filtraron a través de celita, se recogió el filtrado y se concentró a presión reducida para proporcionar un sólido amarillo. El material crudo se purificó mediante HPLC-prep. (gradiente 10-100 % acetonitrilo c/ 0,1 % TFA en agua c/ 0,1 % TFA) para dar el producto deseado. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12,86 (s, 1H), 8,73 (d, J = 0,5 Hz, 1H), 7,75 (ddd, J = 0,6, 1,2 y 7,9 Hz, 1H), 7,54-7,46 (m, 2H), 7,40-7,31 (m, 1H), 7,28-7,16 (m, 2H), 6,93-6,79 (m, 2H), 6,78-6,55 (m, 4H), 4,23 (d, J = 5,8 Hz, 2H) y 3,78 (s, 3H). ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ ppm 152,4, 147,7, 144,3, 128,2, 125,7, 122,9, 120,4, 119,0, 111,4, 110,9, 56,2 y 40,6; tiempo de retención LC-MS (procedimiento 1): 2.260 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ = (Calculado para C₂₁H₁₉N₃O₄S₂, 441.0817) encontrado 441.0819.

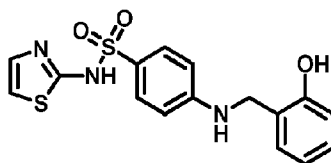
Procedimientos generales para la química. Todas las reacciones sensibles al aire o a la humedad se realizaron bajo presión positiva de nitrógeno con material de vidrio secado al horno. Los reactivos químicos y los disolventes anhidros se obtuvieron de fuentes comerciales y se utilizaron tal cual. La purificación preparativa se realizó en un HPLC semipreparativo de Waters. La columna utilizada fue una Phenomenex Luna C18 (5 micras, 30 x 75 mm) a un caudal de 45 mL/min. La fase móvil consistió en acetonitrilo y agua (cada uno con un 0,1 % de ácido trifluoroacético). Durante la purificación se utilizó un gradiente de 10 % a 50 % de acetonitrilo en 8 minutos. La recogida de fracciones se activó mediante detección UV (220 nm). El análisis analítico de la pureza se determinó mediante dos procedimientos diferentes denominados Procedimientos 1 y 2 de Control de Calidad Final. Procedimiento 1: Los análisis se realizaron en un HPLC Agilent 1290 Infinity Series. UUPLC Gradiente Largo Equivalente 4 % a 100 % acetonitrilo (0.05 % ácido trifluoroacético) en agua durante 3.5 minutos tiempo de ejecución de 4 minutos con un flujo de 0.8 mL/min. Se utilizó una columna C18 Phenomenex Kinetex de 1,7 micras (2,1 x 100 mm) a una temperatura de 50 °C. Procedimiento 2: el análisis se realizó en un Agilent 1260 con un gradiente de 7 minutos de 4 % a 100 % de acetonitrilo (que contiene 0,025 % de ácido trifluoroacético) en agua (que contiene 0,05 % de ácido trifluoroacético) durante 8 minutos de tiempo de ejecución a un caudal de 1 mL/min. Se utilizó una columna Phenomenex Luna C18 (3 micras, 3 x 75 mm) a una temperatura de 50 °C. La determinación de la pureza se realizó utilizando un detector de matriz de diodos Agilent tanto para el procedimiento 1 como para el procedimiento 2. La determinación de la masa se realizó utilizando un espectrómetro de masas Agilent 6130 con ionización por electrospray en modo positivo. Todos los análogos para ensayo tienen una pureza superior al 95 % según ambos procedimientos analíticos. los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se registraron en un espectrómetro Varian 400 (100) MHz. La espectrometría de masas de alta resolución se registró en el sistema LC/MS de tiempo de vuelo Agilent 6210.

Descripción de las realizaciones de la presente invención y divulgación:

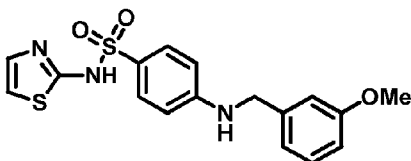
- 5 **4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-N-(tiazol-2-il)benzenosulfonamida (1):** Procedimiento A: utilizando 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,67 (s, 1H), 7,44-7,33 (m, 2H), 7,00 (d, J = 4.20 Hz, 1H), 6,85-6,62 (m, 3H), 6,60-6,45 (m, 4H), 4,19 (d, J = 5,91 Hz, 2H), y 3,77 (s, 3H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 4.394 min; HRMS: m/z ($M+H$) $^+$ = (Calculado para $C_{17}H_{18}N_3O_4S_2$ 392.0733) encontrado, 392.0726. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



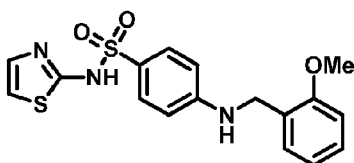
- 10 **4-(bencilamino)-N-(tiazol-2-il)benzeno sulfonamida TFA (8):** Procedimiento A: utilizando benzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,39 (s, 1H), 7,48-7,39 (m, 2H), 7,35-7,13 (m, 6H), 6,99 (t, J = 6.00 Hz, 1H), 6,71 (d, J = 4,60 Hz, 1H), 6,62-6,54 (m, 2H), y 4,29 (d, J = 5,61 Hz, 2H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 2): 4.780 min; HRMS: m/z ($M+H$) $^+$ = (Calculado para $C_{16}H_{16}N_3O_2S_2$ 346.0678) encontrado, 346.0672. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



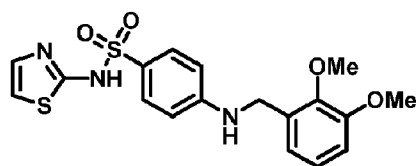
- 15 **4-(2-hidroxibencilamino)-N-(tiazol-2-il)benzeno sulfonamida (9):** Procedimiento A: utilizando 2-hidroxibenzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,49 (s, 1H), 7,44-7,35 (m, 2H), 7,13 (dd, J = 1,65, y 7,55 Hz, 1H), 7,03 (ddd, J = 1,75, 7,32, y 8,01 Hz, 1H), 6,92-6,67 (m, 4H), 6,52-6,41 (m, 2H), 6,38-6,29 (m, 2H), y 4,17 (d, J = 5,68 Hz, 2H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 4.213 min; HRMS: m/z ($M+H$) $^+$ = (Calculado para $C_{16}H_{16}N_3O_3S_2$ 362.0628) encontrado, 362.0620. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



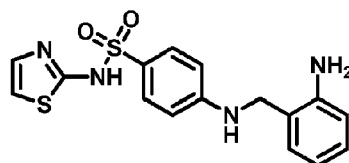
- 25 **4-(3-metoxibencilamino)-N-(tiazol-2-il)benzeno sulfonamida (10):** Procedimiento B: utilizando (3-dimetoxifenil)metanamina; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,48-7,41 (m, 2H), 7,27-7,19 (m, 1H), 7,18 (d, J = 4,63 Hz, 1H), 6,99 (t, J = 6,06 Hz, 1H), 6,93-6,85 (m, 2H), 6,79 (dd, J = 1,10, y 2,48 Hz, 1H), 6,73 (d, J = 4,60 Hz, 1H), 6,63-6,55 (m, 2H), 4,27 (d, J = 5,92 Hz, 2H), y 3,72 (s, 3H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 4.777 min; HRMS: m/z ($M+Na$) $^+$ = (Calculado para $C_{17}H_{17}N_3NaO_3S_2$ 398.0604) encontrado, 398.0584. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



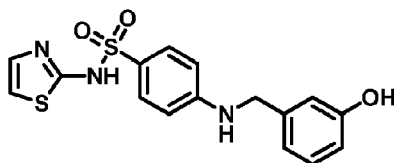
- 30 **4-(2-metoxibencilamino)-N-(tiazol-2-il)benzeno sulfonamida TFA (11):** Procedimiento B: utilizando 2-dimetoxifenil)metanamina; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,39 (s, 1H), 7,48-7,39 (m, 2H), 7,26-7,12 (m, 3H), 6,98 (dd, J = 1,03, y 8,26 Hz, 1H), 6,90-6,76 (m, 2H), 6,71 (d, J = 4,63 Hz, 1H), 6,59-6,50 (m, 2H), 4,23 (d, J = 5,89 Hz, 2H), y 3,81 (s, 3H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 2): 4.888 min; HRMS: m/z ($M+H$) $^+$ = (Calculado para $C_{17}H_{18}N_3O_3S_2$ 376.0784) encontrado, 376.0765. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



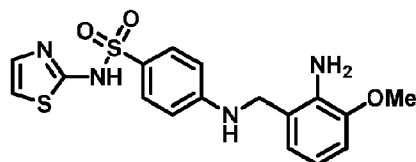
- 5 **4-(2,3-dimethoxybenzylamino)-N-(thiazol-2-yl)benzenesulfonamida (12):** Procedimiento B: utilizando 2,3-dimetoxifenil)metanamina; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,46 (d, J = 8,78 Hz, 2H), 7,18 (d, J = 4,63 Hz, 1H), 7,06-6,90 (m, 2H), 6,87-6,79 (m, 2H), 6,73 (d, J = 4,58 Hz, 1H), 6,59 (d, J = 8,84 Hz, 2H), 4,28 (d, J = 5,90 Hz, 2H), y 3,78 (d, J = 13,99 Hz, 6H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 4.756 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ = (Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$ 406.0890) encontrado, 406.0885. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



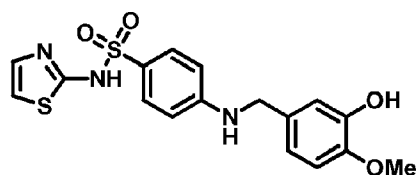
- 10 **4-(2-aminobenzylamino)-N-(thiazol-2-yl)benzenesulfonamida (13):** Procedimiento A: utilizando (2-formilfenil)carbamato de terc-butilo y eliminando el carbamato subsiguiente con HCl 4 M en dioxano durante 30 min. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,54-7,37 (m, 3H), 7,24-7,06 (m, 3H), 6,96 (d, J = 7,86 Hz, 1H), 6,86 (h, J = 7,06 Hz, 1H), 6,74 (d, J = 4,61 Hz, 1H), 6,65-6,50 (m, 3H), y 4,23 (s, 2H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 1): 1.863 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ = (Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$ 361.0787) encontrado, 361.0784. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



- 15 **4-(3-hidroxibencilamino)-N-(thiazol-2-yl)benzenosulfonamida (14):** Procedimiento A: utilizando 3-hidroxibenzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,31 (s, 1H), 7,51-7,37 (m, 2H), 7,18 (d, J = 4,62 Hz, 1H), 7,10 (t, J = 7,77 Hz, 1H), 6,97 (t, J = 5,90 Hz, 1H), 6,79-6,68 (m, 3H), 6,66-6,49 (m, 3H), y 4,31-4,14 (m, 2H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 1.775 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ = (Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2$ 362.0628) encontrado, 362.0614. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.

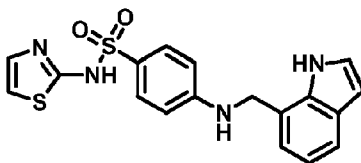


- 20 **4-(2-amino-3-metoxibencilamino)-N-(thiazol-2-yl)benzenosulfonamida TFA (15):** Procedimiento A: utilizando 3-metoxi-2-nitrobenzaldehído; Una solución heterogénea de 4-(3-metoxi-2-nitrobenzilamino)-N-(thiazol-2-yl)benzenosulfonamida (0,075 g, 0.178 mmol) en MeOH (1,8 mL), AcOH (0,102 mL, 1,784 mmol) y zinc (0,023 g, 0,357 mmol) se agitó durante 30 min, se filtró a través de celita y se lavó con MeOH. El filtrado se concentró y purificó mediante pre-HPLC (gradiente 10-100 % acetonitrilo c/ 0,1 % TFA en agua c/ 0,1 % TFA) para obtener el producto deseado; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,44 (d, J = 8,78 Hz, 2H), 7,17 (d, J = 4,61 Hz, 1H), 6,78 (dd, J = 1,23, y 7,81 Hz, 1H), 6,75-6,67 (m, 3H), 6,56 (d, J = 8,82 Hz, 2H), 4,16 (s, 2H), y 3,77 (s, 3H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 2.775 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ = (Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$ 391.0893) encontrado, 391.0874. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.

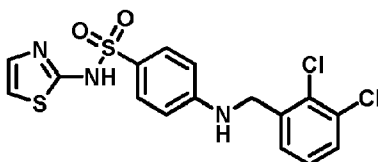


- 30 **4-(3-hidroxi-4-metoxibencilamino)-N-(thiazol-2-yl)benzenosulfonamida (16):** Procedimiento A: utilizando 3-hidroxi-4-metoxi-benzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,86 (s, 1H), 7,52-7,32 (m, 2H), 7,15 (d, J = 4,61 Hz, 1H), 6,95-6,74 (m, 2H), 6,77-6,62 (m, 4H), 6,62-6,49 (m, 2H), 4,13 (d, J = 5,92 Hz, 2H), y 3,70 (s, 3H); tiempo de retención

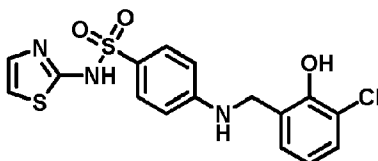
LC-MS (procedimiento 2): 4.123 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ = (Calculado para C₁₇H₁₈N₃O₄S₂ 392.0733) encontrado, 392.0719. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



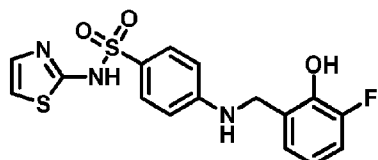
- 5 **4-((1H-indol-7-yl)metilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (17):** Procedimiento A: utilizando 1H-indol-7-carbaldehído; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,51-7,38 (m, 4H), 7,36-7,31 (m, 1H), 7,16 (t, J = 4,53 Hz, 1H), 6,95-6,85 (m, 2H), 6,70 (d, J = 4,62 Hz, 1H), 6,67-6,57 (m, 2H), 6,44 (dd, J = 1,83, y 3,08 Hz, 1H), y 4,53 (d, J = 5,67 Hz, 2H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 4.899 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ = (Calculado para C₁₈H₁₇N₄O₂S₂ 385.0787) encontrado, 385.0774. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



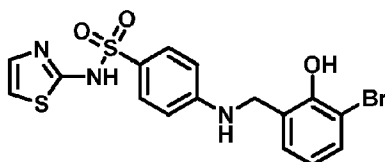
- 10 **4-(2,3-diclorobencilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (18):** Procedimiento A: utilizando 2,3-diclorobenzaldehído; tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 5.786 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ = (Calculado para C₁₈H₁₄Cl₂N₃O₂S₂ 413.9899) encontrado, 413.9907. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



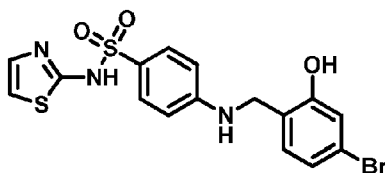
- 15 **4-(3-cloro-2-hidroxibencilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (19):** Procedimiento A: utilizando 3-cloro-2-hidroxibenzaldehído; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,48-7,35 (m, 2H), 7,21 (dd, J = 1,63, y 7,94 Hz, 1H), 7,13-7,02 (m, 1H), 6,87 (d, J = 3,82 Hz, 1H), 6,76 (t, J = 7,77 Hz, 1H), 6,51-6,43 (m, 2H), 6,35 (d, J = 3,82 Hz, 1H), y 4,25 (s, 2H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 2.076 min; HRMS: m/z (M+Na)⁺ = (Calculado para C₁₆H₁₄ClN₃NaO₃S₂ 419.0085) encontrado, 419.0047. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



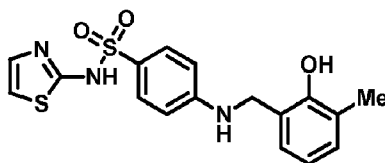
- 20 **4-(3-fluoro-2-hidroxibencilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (20):** Procedimiento A: utilizando 3-fluoro-2-hidroxibenzaldehído; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,63 (s, 1H), 7,49-7,33 (m, 2H), 7,08-6,93 (m, 2H), 6,91-6,80 (m, 1H), 6,72 (t, J = 7,94 Hz, 1H), 6,51-6,38 (m, 3H), 6,34 (d, J = 3,80 Hz, 1H), y 4,23 (d, J = 3,52 Hz, 2H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 1): 2.076 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ = (Calculado para C₁₆H₁₅FN₃O₃S₂ 380.0533) encontrado, 380.0521. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



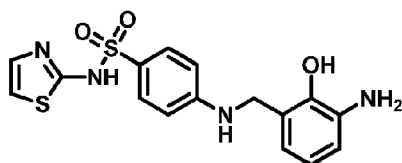
- 25 **4-(3-bromo-2-hidroxibencilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida, (21):** Procedimiento A: utilizando 3-bromo-2-hidroxibenzaldehído; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,64 (s, 1H), 8,16-8,02 (m, 1H), 7,86 (d, J = 8,75 Hz, 2H), 7,79 (dd, J = 1,59, y 7,90 Hz, 1H), 7,58 (d, J = 4,61 Hz, 1H), 7,52 (dd, J = 1,56, y 7,59 Hz, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,14 (t, J = 7,78 Hz, 1H), 6,96 (d, J = 8,89 Hz, 2H), y 4,69 (d, J = 5,79 Hz, 2H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 4.777 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ = (Calculado para C₁₆H₁₅BrN₃O₃S₂ 441.9712) encontrado, 441.9705. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.
- 30



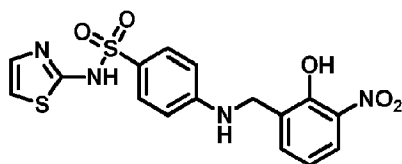
5 **4-(4-bromo-2-hidroxibencilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (22):** Procedimiento A: utilizando 4-bromo-2-hidroxibenzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,06 (s, 1H), 7,47-7,34 (m, 2H), 7,03 (d, J = 8,13 Hz, 1H), 6,99-6,92 (m, 2H), 6,88 (dd, J = 1,97, y 8,10 Hz, 1H), 6,65-6,31 (m, 4H), y 4,12 (d, J = 5,91 Hz, 2H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 2.938 min; HRMS: m/z ($M+H$) $^+$ = (Calculado para $C_{16}H_{15}BrN_3O_3S_2$ 441.9712) encontrado, 441.9704. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



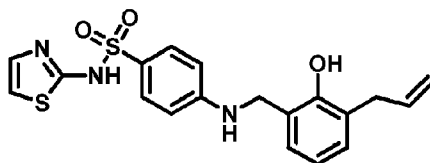
10 **4-(2-hidroxi-3-metilbencilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (23):** Procedimiento A: utilizando 2-hidroxi-3-metilbenzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,25 (s, 1H), 7,34-7,21 (m, 2H), 7,00 (d, J = 4,62 Hz, 1H), 6,84-6,75 (m, 2H), 6,64-6,48 (m, 3H), 6,44-6,31 (m, 2H), 4,08 (d, J = 5,76 Hz, 1H), 84-6,75 (m, 2H), 6,64-6,48 (m, 3H), 6,44-6,31 (m, 2H), 4,08 (d, J = 5,76 Hz, 2H), y 2,01 (s, 3H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 2.083 min; HRMS: m/z ($M+H$) $^+$ = (Calculado para $C_{17}H_{18}N_3O_3S_2$ 376.0784) encontrado, 376.0779. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



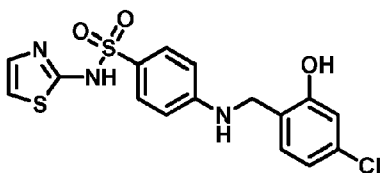
15 **4-(3-amino-2-hidroxibencilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (24):** Procedimiento A: utilizando 2-hidroxi-3-nitrobenzaldehído y reduciendo el nitrogrupo con zinc y en condiciones de ácido acético (véase el compuesto **15** para más detalles). ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,49-7,39 (m, 2H), 7,17 (d, J = 4,65 Hz, 1H), 6,92 (t, J = 8,63 Hz, 2H), 6,85-6,69 (m, 3H), 6,60-6,50 (m, 2H), y 4,28 (s, 2H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 2.263 min; HRMS: m/z ($M+H$) $^+$ = (Calculado para $C_{16}H_{17}N_4O_3S_2$ 377.0737) encontrado, 377.0730. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



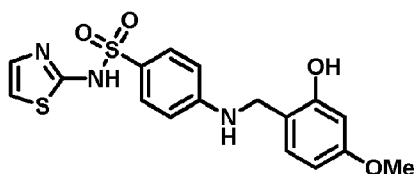
25 **4-(2-hidroxi-3-nitrobencilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (25):** Procedimiento 1A: utilizando 2-hidroxi-3-nitrobenzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,88 (dd, J = 1,65, y 8,43 Hz, 1H), 7,58-7,24 (m, 3H), 7,17 (d, J = 4,66 Hz, 1H), 7,05-6,88 (m, 2H), 6,72 (d, J = 4,61 Hz, 1H), 6,67-6,34 (m, 2H), y 4,33 (d, J = 4,46 Hz, 2H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 2): 4.742 min; HRMS: m/z ($M+H$) $^+$ = (Calculado para $C_{16}H_{15}N_4O_5S_2$ 407.0478) encontrado, 407.0465. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



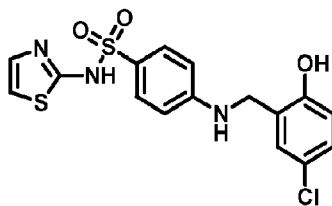
30 **4-(3-alil-2-hidroxibencilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida TFA (26):** Procedimiento A: utilizando 3-alil-2-hidroxibenzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,41 (s, 1H), 8,47 (s, 1H), 7,49-7,38 (m, 2H), 7,17 (d, J = 4,61 Hz, 1H), 6,96 (ddd, J = 1,73, 7,52, y 22,52 Hz, 2H), 6,80-6,65 (m, 3H), 6,61-6,50 (m, 2H), 5,93 (ddt, J = 6,63, 10,04, y 16,79 Hz, 1H), 5,08-4,95 (m, 2H), 4,25 (s, 2H), y 3,34 (dt, J = 1,44, y 6,58 Hz, 2H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 3.155 min; HRMS: m/z ($M+H$) $^+$ = (Calculado para $C_{19}H_{20}N_3O_3S_2$ 402.0941) encontrado, 402.0926. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



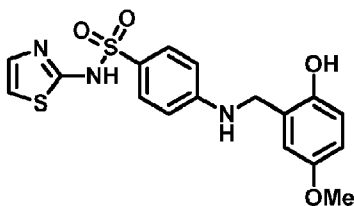
5 **4-(4-cloro-2-hidroxibencilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (27):** Procedimiento A: utilizando 4-cloro-2-hidroxibenzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,38 (d, J = 8,6 Hz, 2 H), 7,07 (d, J = 8,2 Hz, 1 H), 6,92-6,61 (m, 3 H), 6,49-6,20 (m, 4 H), y 4,12 (s, 2 H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 4.700 min; HRMS: m/z ($M+H$) $^+$ = (Calculado para $C_{16}H_{15}ClN_3O_3S_2$ 396.0238) encontrado, 396.0220. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



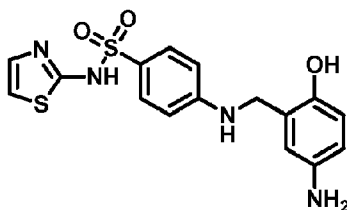
10 **4-(2-hidroxi-4-metoxibencilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (28):** Procedimiento A: utilizando 2-hidroxi-4-metoxi-benzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,51 (s, 1H), 7,41-7,32 (m, 2H), 7,00 (d, J = 8,37 Hz, 1H), 6,87-6,80 (m, 1H), 6,49-6,39 (m, 2H), 6,36 (d, J = 2,47 Hz, 1H), 6,34-6,26 (m, 2H), 6,21 (t, J = 5,86 Hz, 1H), 4,07 (d, J = 5,77 Hz, 2H), y 3,63 (s, 3H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 3.155 min; HRMS: m/z ($M+H$) $^+$ = (Calculado para $C_{17}H_{18}N_3O_4S_2$ 392.0733) encontrado, 392.0715. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



15 **4-(5-cloro-2-hidroxibencilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (29):** Procedimiento A: utilizando 5-cloro-2-hidroxibenzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,00 (s, 1H), 7,48-7,37 (m, 2H), 7,13-7,00 (m, 3H), 6,89-6,76 (m, 2H), 6,64 (d, J = 4,44 Hz, 1H), 6,58-6,48 (m, 2H), y 4,17 (d, J = 5,97 Hz, 2H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 2): 4.610 min; HRMS: m/z ($M+H$) $^+$ = (Calculado para $C_{16}H_{15}ClN_3O_3S_2$ 396.0238) encontrado, 396.0233. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.

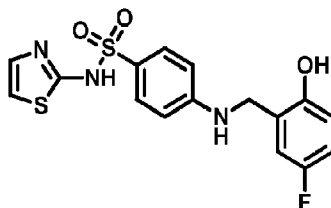


20 **4-(2-hidroxi-5-metoxibencilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (30):** Procedimiento A: utilizando 2-hidroxi-5-metoxibenzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,12 (s, 1H), 7,47-7,38 (m, 2H), 7,08 (d, J = 4,44 Hz, 1H), 6,77-6,65 (m, 3H), 6,65-6,48 (m, 4H), 4,15 (d, J = 5,91 Hz, 2H), y 3,56 (s, 3H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 4.137 min; HRMS: m/z ($M+H$) $^+$ = (Calculado para $C_{17}H_{18}N_3O_4S_2$ 392.0733) encontrado, 392.0725. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.

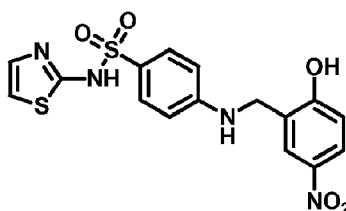


25 **4-(5-amino-2-hidroxibencilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (31):** Procedimiento A: utilizando 2-hidroxi-5-nitrobencilaldehído y reduciendo el nitrogrupo con zinc y en condiciones de ácido acético (véase el compuesto **15** para más detalles). ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,92 (s, 1H), 7,46 (d, J = 8,83 Hz, 2H), 7,18 (d, J = 4,64 Hz, 1H), 7,04-6,92 (m, 2H), 6,86 (d, J = 8,23 Hz, 1H), 6,73 (d, J = 4,66 Hz, 1H), 6,53 (d, J = 8,83 Hz, 2H), y 4,22 (d, J = 5,77 Hz, 2H);

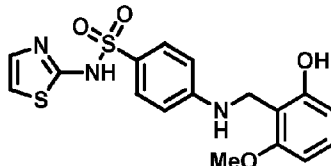
tiempo de retención LC-MS (procedimiento 1): 2.165 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ = (Calculado para C₁₆H₁₇N₄O₃S₂ 377.0737) encontrado, 377.0719. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



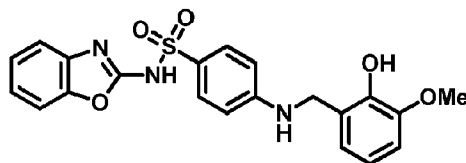
- 5 **4-(5-fluoro-2-hidroxibencilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (32):** Procedimiento A: utilizando 5-fluoro-2-hidroxibenzaldehído; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,63-9,54 (m, 1H), 7,44-7,33 (m, 2H), 6,92-6,73 (m, 4H), 6,51-6,36 (m, 3H), 6,36-6,29 (m, 1H), y 4,14 (d, J = 6,00 Hz, 2H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 3.017 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ = (Calculado para C₁₆H₁₅FN₃O₃S₂ 380.0533) encontrado, 380.0526. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



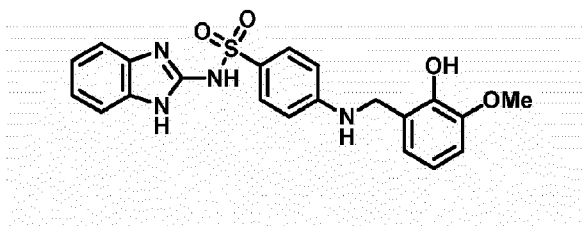
- 10 **4-(2-hidroxi-5-nitrobencilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (33):** Procedimiento A: utilizando 2-hidroxi-5-nitrobenzaldehído; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 7,92-7,76 (m, 2 H), 7,41 (d, J = 9,0 Hz, 2 H), 6,97 (d, J = 4,3 Hz, 1 H), 6,56-6,40 (m, 4 H), 5,74 (s, 1 H), y 4,10 (s, 2 H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 4.273 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ = (Calculado para C₁₆H₁₅N₄O₅S₂ 407.0478) encontrado, 407.0470. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



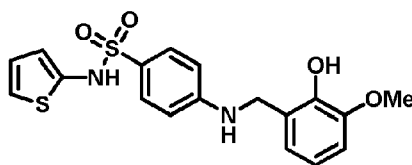
- 15 **4-(2-hidroxi-6-metoxibencilamino)-N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (34):** Procedimiento B: utilizando 2-hidroxi-6-metoxi-benzaldehído; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,59 (s, 1H), 7,74-7,54 (m, 1H), 7,42 (d, J = 8,79 Hz, 2H), 7,24-7,05 (m, 1H), 6,68 (d, J = 8,87 Hz, 2H), 6,46 (ddd, J = 0,93, 7,08 y 8,22 Hz, 2H), 6,22 (d, J = 5,51 Hz, 1H), 4,12 (d, J = 5,21 Hz, 2H) y 3,74 (s, 3H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 1): 2.960 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ = (Calculado para C₁₇H₁₈N₃O₄S₂ 392.0733) encontrado, 392.0716. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



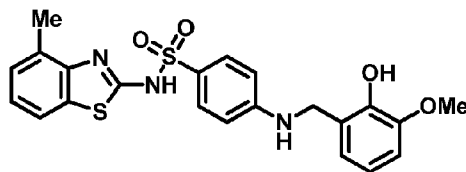
- 25 **N-(benzo[d]oxazol-2-il)-4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)bencenosulfonamida (36):** Procedimiento C: utilizando 2-bromobenzoxazol; ¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ 12,40 (s, 1H), 8,71 (s, 1H), 7,55 (dd, J = 2,60, y 9,29 Hz, 2H), 7,43 (d, J = 7,93 Hz, 1H), 7,31-7,25 (m, 1H), 7,26-7,20 (m, 1H), 7,16 (td, J = 1,42, y 7,82 Hz, 1H), 6,86 (t, J = 5,64 Hz, 1H), 6,81 (dd, J = 1,72, y 7,88 Hz, 1H), 6,75-6,69 (m, 1H), 6,66 (t, J = 7,85 Hz, 1H), 6,61-6,54 (m, 2H), 4,21 (d, J = 5,58 Hz, 2H), y 3,76 (d, J = 2,79 Hz, 3H); ¹³CNMR (151 MHz, DMSO-d₆) δ 156,01, 152,37, 147,74, 144,28, 128,27, 125,73, 125,45, 123,67, 120,40, 119,06, 112,19, 111,31, 110,88, 110,59, 56,23 y 41,15; tiempo de retención LC-MS (procedimiento 2): 4.848 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ = (Calculado para C₂₁H₂₀N₃O₅S₂ 426.1118) encontrado, 426.1098.



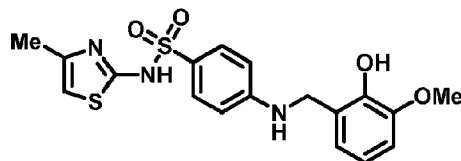
N-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)-4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)bencenosulfonamida (37): Procedimiento D: utilizando 2-aminobenzimidazol y 2-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído; ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11,68 (s, 2H), 7,56-7,49 (m, 2H), 7,22 (dt, J = 3,37, y 5,83 Hz, 2H), 7,06 (dt, J = 3,34, y 5,73 Hz, 2H), 6,79 (dd, J = 1,71, y 7,99 Hz, 1H), 6,71 (dd, J = 1,59, y 7,73 Hz, 1H), 6,65 (t, J = 7,83 Hz, 1H), 6,58-6,50 (m, 2H), 4,19 (s, 2H), y 3,75 (s, 3H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ 151,47, 150,22, 147,72, 144,26, 130,61, 129,89, 127,61, 125,79, 122,59, 120,44, 119,05, 111,46, 111,09, 110,86, 56,23 y 41,32; tiempo de retención LC-MS (procedimiento 2): 4.454min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$, 424.1205) encontrado 424.1202.



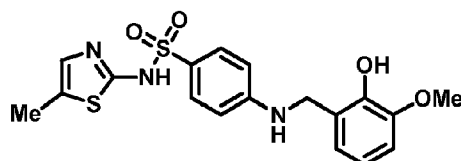
4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-N-(tiofen-2-il)bencenosulfonamida (38): Procedimiento C: utilizando 2-bromotiofeno; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,73 (s, 1 H), 7,38-7,28 (m, 1 H), 7,05-6,98 (m, 1 H), 6,91 (t, J = 6,1 Hz, 1 H), 6,83 (dd, J = 2,0 y 7,8 Hz, 1 H), 6,78-6,64 (m, 3 H), 6,61-6,52 (m, 2 H), 6,51-6,43 (m, 1 H), 4,25 (s, 2 H) y 3,80 (s, 3 H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 1): 2.435 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, 391.0781) encontrado 391.0773.



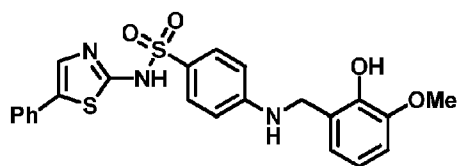
4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-N-(4-metilbenzo[d]tiazol-2-il)bencenosulfonamida TFA (39): Procedimiento D: utilizando 2-amino-4-metilbenztiazol y 2-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,76 (s, 1H), 8,71 (s, 1H), 7,58-7,45 (m, 3H), 7,18-7,05 (m, 2H), 6,81 (dd, J = 1,73, y 7,89 Hz, 1H), 6,76-6,54 (m, 4H), 4,21 (s, 2H), 3,76 (s, 3H), y 2,34 (s, 3H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 5.522 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$, 456.1046) encontrado 456.1037.



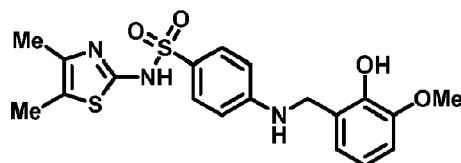
4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-N-(4-metiltiazol-2-il)bencenosulfonamida TFA (40): Procedimiento C: utilizando 2-bromo-4-metiltiazol; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,31 (s, 1 H), 8,70 (s, 1 H), 7,48-7,32 (m, 3 H), 6,89-6,72 (m, 6 H), 6,61-6,47 (m, 3 H), 6,27 (s, 1 H), 4,20 (d, J = 5,90 Hz, 2 H), 3,76 (s, 3 H), y 1,95 (s, 3 H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 1): 1.962 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$, 406.0890) encontrado 406.0875.



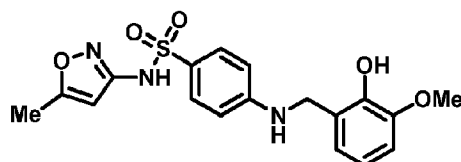
4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-N-(5-metiltiazol-2-il)bencenosulfonamida TFA (41): Procedimiento D: utilizando 2-amino-5-metiltiazol y 2-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,05 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 7,46-7,38 (m, 2H), 6,91-6,63 (m, 5H), 6,59-6,51 (m, 2H), 4,20 (d, J = 5,86 Hz, 2H), 3,77 (s, 3H), y 2,13 (d, J = 1,39 Hz, 3H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 1): 3.182 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$, 406.0890) encontrado 406.0889.



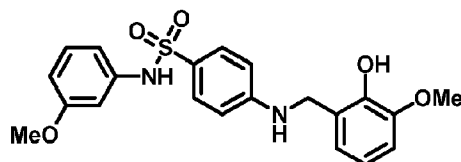
5 **4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(5-feniltiazol-2-il)bencenosulfonamida TFA (42):** Procedimiento D: utilizando 2-amino-5-feniltiazol y 2-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,59 (s, 1H), 8,70 (s, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,56-7,25 (m, 8H), 6,87-6,78 (m, 2H), 6,79-6,62 (m, 2H), 6,61-6,53 (m, 2H), 4,21 (d, J = 5,8 Hz, 2H), y 3,76 (s, 3H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 2): 5.417 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$, 468.1046) encontrado 468.1028.



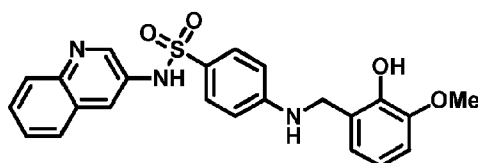
10 **N-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)bencenosulfonamida TFA (43):** Procedimiento C: utilizando 2-bromo-4,5-dimetiltiazol; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,25 (s, 1H), 8,94 (d, J = 0,71 Hz, 1H), 7,73-7,45 (m, 2H), 7,13-6,80 (m, 4H), 6,83-6,62 (m, 2H), 4,53-4,25 (m, 2H), 3,98 (d, J = 0,60 Hz, 3H), ad 2,35-1,95 (m, 6H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 4.859 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$, 420.1046) encontrado 420.1037.



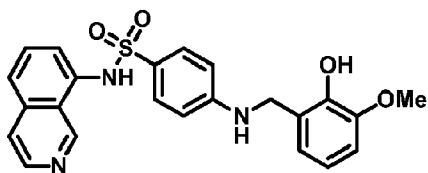
15 **4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-N-(5-metilisoxazol-3-il)bencenosulfonamida TFA (44):** Procedimiento D: utilizando 3-amino-5-metilisoxazol y 2-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,91 (d, J = 1,25 Hz, 1H), 8,76 (d, J = 3,84 Hz, 1H), 7,77-7,55 (m, 1H), 7,52-7,28 (m, 2H), 7,02 (t, J = 5,41 Hz, 1H), 6,77-6,64 (m, 2H), 6,63-6,51 (m, 2H), 6,11-6,02 (m, 1H), 4,27-4,14 (m, 2H), 3,77 (d, J = 1,18 Hz, 3H), y 2,26 (s, 3H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 4.804 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$, 390.1118) encontrado 390.1109.



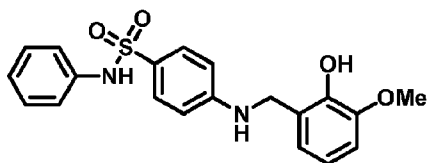
20 **4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(3-metoxifenil)bencenosulfonamida (45):** Procedimiento C: utilizando 1-bromo-3-metoxibenceno; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,87 (s, 1H), 8,73 (d, J = 0,5 Hz, 1H), 7,48-7,36 (m, 2H), 7,13-7,03 (m, 1H), 6,95-6,80 (m, 2H), 6,77-6,47 (m, 7H), 4,20 (d, J = 5,8 Hz, 2H), 3,78 (s, 3H) y 3,64 (s, 3H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 2): 5.437 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$, 415.1322) encontrado 415.1302.



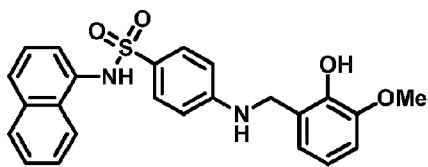
30 **4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-N-(quinolin-3-il)bencenosulfonamida TFA (46):** Procedimiento C: utilizando 3-bromoquinolina; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,99 (d, J = 1,27 Hz, 1H), 8,20 (dd, J = 0,78, y 2,71 Hz, 1H), 7,60-7,33 (m, 3H), 7,17 (dddd, J = 1,31, 6,90, 8,19, y 31,70 Hz, 2H), 7,09-7,04 (m, 2H), 6,41 (dd, J = 1,94, 7,69 Hz, 1H), 6,30-6,20 (m, 2H), 6,17-6,10 (m, 2H), 3,76 (s, 2H), y 3,36 (s, 3H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 2.304 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$, 436.1326) encontrado 436.1316.



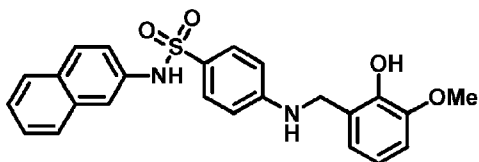
5 **4-((2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-N-(isoquinolin-8-il)bencenosulfonamida (47):** Procedimiento C: utilizando 8-bromoisoquinolina; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,34-10,24 (s, 1H), 9,56 (s, 1H), 8,74 (s, 1H), 8,54 (d, J = 5,95 Hz, 1H), 8,02 (d, J = 5,96 Hz, 1H), 7,91-7,73 (m, 2H), 7,44-7,29 (m, 3H), 6,85 (t, J = 4,80 Hz, 1H), 6,76-6,62 (m, 2H), 6,61-6,44 (m, 2H), 4,19 (s, 2H), y 3,79 (s, 3H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 1.914 min; HRMS: m/z ($M+\text{Na}$) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$, 458.1145) encontrado 458.1129.



10 **4-((2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-N-fenilbencenosulfonamidaTFA (48):** Procedimiento C: utilizando bromobenceno; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,85 (s, 1H), 8,73 (d, J = 2,23 Hz, 1H), 7,42-7,34 (m, 2H), 7,21-7,12 (m, 2H), 7,06-6,99 (m, 2H), 6,98-6,91 (m, 1H), 6,82 (dd, J = 1,86, y 7,72 Hz, 1H), 6,74-6,64 (m, 2H), 6,57-6,49 (m, 2H), 4,31-3,99 (m, 2H), y 3,76 (s, 3H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 2.750 min; HRMS: m/z ($M+\text{H}$) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, 385.1217) encontrado 385.1223.

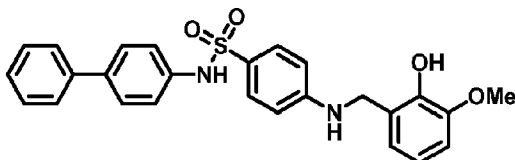


15 **4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(naftalen-1-il)bencenosulfonamida (49):** Procedimiento D: utilizando naftalen-1-amina y 2-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,74 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,06 (ddd, J = 0,74, 1,48, y 8,45 Hz, 1H), 7,89-7,82 (m, 1H), 7,72 (d, J = 8,15 Hz, 1H), 7,54-7,27 (m, 5H), 7,15 (dd, J = 1,05, y 7,45 Hz, 1H), 6,85 (q, J = 4,87 Hz, 2H), 6,75-6,66 (m, 2H), 6,57-6,47 (m, 2H), 4,19 (d, J = 5,65 Hz, 2H), y 3,79 (s, 3H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 2.744 min; HRMS: m/z ($M+\text{H}$) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, 435.1373) encontrado 435.1392.

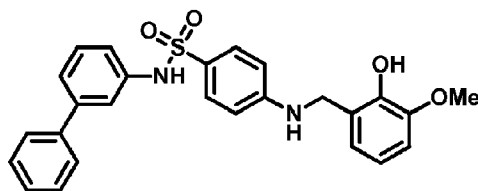


20 **4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(naftalen-2-il)bencenosulfonamida (50):**

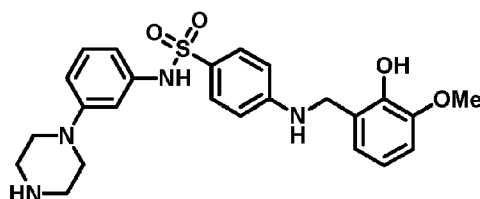
Procedimiento D: utilizando naftalen-2-amina y 2-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,11 (d, J = 1,4 Hz, 1H), 8,71 (s, 1H), 7,81-7,67 (m, 3H), 7,54-7,30 (m, 5H), 7,27 (dt, J = 1,9, y 8,8 Hz, 1H), 6,94-6,76 (m, 2H), 6,76-6,61 (m, 2H), 6,53 (dd, J = 8,8, 1,7 Hz, 2H), 4,16 (s, 2H), y 3,77 (s, 3H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 3.281 min; HRMS: m/z ($M+\text{H}$) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, 435.1373) encontrado 435.1373.



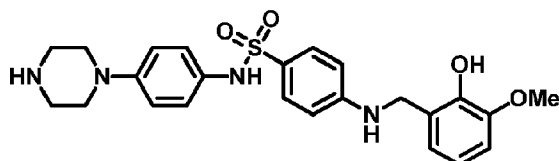
30 **N-([1,1'-bifenil]-4-il)-4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)bencenosulfonamida (51):** Procedimiento D: utilizando bifenil-4-amina y 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,99 (s, 1H), 8,72 (s, 1H), 7,60-7,35 (m, 8H), 7,34-7,24 (m, 1H), 7,18-7,09 (m, 2H), 6,90 (t, J = 5,9 Hz, 1H), 6,82 (dd, J = 1,7, y 7,8 Hz, 1H), 6,76-6,62 (m, 2H), 6,61-6,52 (m, 2H), 4,19 (d, J = 5,8 Hz, 2H), y 3,77 (s, 3H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 6.433 min; HRMS: m/z ($M+\text{H}$) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, 461.1530) encontrado 461.1529.



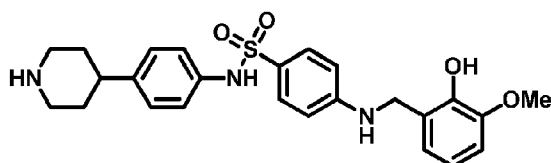
N-([1,1'-bifenil]-3-yl)-4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)benzenosulfonamida (52): Procedimiento C: utilizando 3-bromo-1,1'-bifenilo; ¹H RMN (400 MHz, DMSO.d6) δ 9,98 (s, 1H), 8,72 (s, 1H), 7,55-7,19 (m, 11H), 7,06 (ddd, *J* = 1,5, 2,2 y 7,6 Hz, 1H), 6,96-6,73 (m, 2H), 6,75-6,49 (m, 4H), 4,20 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H) y 3,78 (s, 3H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 2): 6.131 min; HRMS: *m/z* (M+H)⁺ (Calculado para C₂₆H₂₅N₂O₄S, 461.1530) encontrado 461.1521.



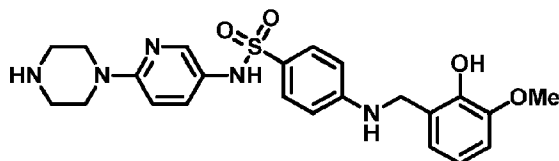
4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(3-(piperazin-1-il)fenil)benzenosulfonamida (53): Procedimiento 1C: se utilizó 4-(3-bromofenil)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo y se eliminó el grupo Boc tras la aminación reductora con HCl 4 M en dioxanos durante 30 min. ¹H RMN (400 MHz, DMSO.d6) δ 9,80 (s, 1H), 8,75 (s, 1H), 7,47-7,38 (m, 2H), 7,05 (t, *J* = 8,12 Hz, 1H), 6,95-6,81 (m, 2H), 6,77-6,65 (m, 3H), 6,64-6,51 (m, 4H), 4,20 (d, *J* = 5,58 Hz, 2H), 3,79 (s, 3H), 3,21 (s, 8H), y 0,88-0,76 (m, 1H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 1.660 min; HRMS: *m/z* (M+H)⁺ (Calculado para C₂₄H₂₉N₄O₄S, 469.1904) encontrado 469.1897.



4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(4-(piperazin-1-il)fenil)benzenosulfonamida (54): Procedimiento D: utilizando 4-(4-aminofenil)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo y 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído. El grupo Boc se eliminó tras la aminación reductora con HCl 4 M/dioxanos durante 1 h a rt. ¹H RMN (400 MHz, DMSO.d6) δ 9,50 (s, 1H), 8,74 (d, *J* = 0,47 Hz, 1H), 7,39-7,30 (m, 2H), 6,98-6,79 (m, 6H), 6,78-6,65 (m, 2H), 6,59-6,50 (m, 2H), 4,20 (d, *J* = 5,63 Hz, 2H), 3,79 (s, 3H), y 3,19 (s, 8H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 1.648 min; HRMS: *m/z* (M+H)⁺ (Calculado para C₂₄H₂₉N₄O₄S, 469.1904) encontrado 469.1900.

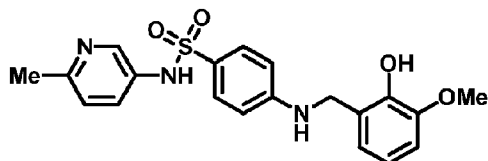


4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(4-(piperidin-4-il)fenil)benzenosulfonamida (55): Procedimiento D: utilizando 4-(4-aminofenil)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo y 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído. El grupo Boc se eliminó tras la aminación reductora con HCl 4 M en dioxano durante 1 h a rt. ¹H RMN (400 MHz, DMSO.d6) δ 10,03 (s, 1H), 8,92 (d, *J* = 0,5 Hz, 1H), 7,63-7,56 (m, 2H), 7,32-7,15 (m, 6H), 6,95-6,82 (m, 2H), 6,78-6,68 (m, 2H), 4,37 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,57-3,42 (m, 4H), 3,14-3,01 (m, 4H), 3,7 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,57-3,42 (m, 4H), 3,14-3,01 (m, 4H), y 2,90 (d, *J* = 11,4 Hz, 1H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 1): 1.710 min; HRMS: *m/z* (M+H)⁺ (Calculado para C₂₅H₃₀N₃O₄S, 468.1952) encontrado 468.1935.

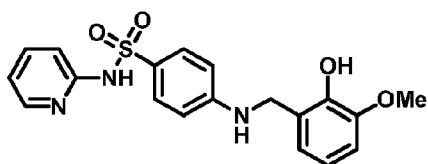


4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(6-(piperazin-1-il)piridin-3-il)benzenosulfonamida (56): Procedimiento C: utilizando 4-(5-bromopiridin-2-il)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo, y el grupo Boc se eliminó tras la aminación reductora con HCl 4 M/dioxanos durante 1 h. ¹H RMN (400 MHz, DMSO.d6) δ 9,57 (s, 1H), 9,12 (d, *J* = 7,21 Hz, 2H),

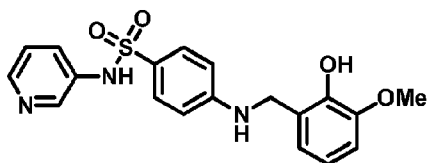
7,74 (d, $J = 2,65$ Hz, 1H), 7,31 (dd, $J = 4,87$, y $7,36$ Hz, 2H), 7,07 (s, 1H), 6,89-6,80 (m, 2H), 6,76-6,59 (m, 2H), 6,60-6,51 (m, 2H), 4,19 (s, 2H), 3,77 (s, 3H), 3,75-3,53 (m, 4H), y 3,17-3,07 (m, 4H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 1.993 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₂₃H₂₈N₅O₄S, 470.1857) encontrado 470.1848.



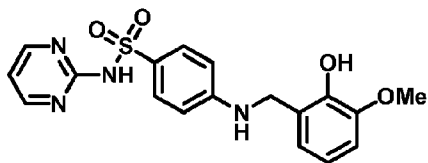
- 5 **4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-N-(6-metilpiridin-3-il)bencenosulfonamida (57):** Procedimiento C: utilizando 5-bromo-2-metilpiridina; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,10 (s, 1H), 8,61 (s, 1H), 8,02 (dd, $J = 0,68$, 2,63 Hz, 1H), 7,47-7,39 (m, 1H), 7,32-7,23 (m, 2H), 7,18 (dd, $J = 8,47$ Hz, 1H), 6,70 (dd, $J = 1,92$, y $7,68$ Hz, 1H), 6,63-6,50 (m, 2H), 6,48-6,40 (m, 2H), 4,06 (s, 2H), 3,64 (s, 3H), y 2,28 (s, 3H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 1.840 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₂₀H₂₂N₃O₄S, 400.1326) encontrado 400.1315. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



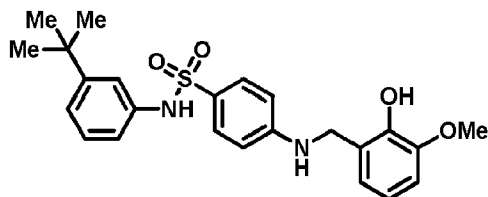
- 15 **4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-N-(piridin-2-il)bencenosulfonamida (58):** Procedimiento C: utilizando 2-bromopiridina; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,71 (d, $J = 0,54$ Hz, 1H), 8,11-7,96 (m, 1H), 7,65-7,58 (m, 1H), 7,52 (d, $J = 8,70$ Hz, 2H), 7,09-6,98 (m, 1H), 6,92-6,79 (m, 3H), 6,76-6,63 (m, 2H), 6,58-6,50 (m, 2H), 4,19 (d, $J = 5,83$ Hz, 2H), y 3,77 (s, 3H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 4.540 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₁₉H₂₀N₃O₄S, 386.1169) encontrado 386.1158.



- 20 **4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-N-(piridin-3-il)bencenosulfonamida (59):** Procedimiento C: utilizando 3-bromopiridina; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,30 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,31-8,21 (m, 2H), 7,57 (ddd, $J = 1,38$, 2,63, y $8,37$ Hz, 1H), 7,46-7,32 (m, 3H), 6,83 (dd, $J = 1,92$, y $7,71$ Hz, 1H), 6,75-6,62 (m, 2H), 6,61-6,51 (m, 2H), 4,19 (s, 2H), 3,77 (s, 3H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 1.804 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₁₉H₂₀N₃O₄S, 386.1169) encontrado 386.1166.

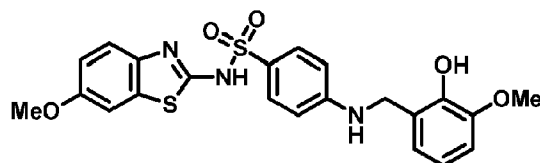


- 25 **4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-N-(pirimidin-2-il)bencenosulfonamida TFA (60):** Procedimiento C: utilizando 2-bromopirimidina; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11,25 (s, 1H), 8,77 (s, 1H), 8,48 (d, $J = 4,83$ Hz, 2H), 7,72-7,50 (m, 2H), 6,99 (dt, $J = 5,43$, y $15,84$ Hz, 2H), 6,85 (dd, $J = 1,69$, y $7,85$ Hz, 1H), 6,77-6,66 (m, 2H), 6,62-6,56 (m, 2H), 4,23 (d, $J = 5,65$ Hz, 2H), y 3,79 (s, 3H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 4.266 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₁₈H₁₉N₄O₄S, 387.1122) encontrado 387.1115.

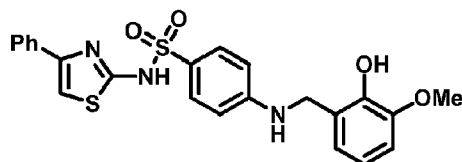


- 30 **N-(3-(terc-butil)fenil)-4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)bencenosulfonamida, TFA (61):** Procedimiento C: utilizando 1-bromo-3-(terc-butil)benceno; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,71 (s, 1H), 8,71 (s, 1H), 7,42-7,32 (m, 2H), 7,14-6,93 (m, 3H), 6,93-6,78 (m, 3H), 6,73-6,60 (m, 2H), 6,58-6,47 (m, 2H), 4,18 (s, 2H), 3,76 (s, 3H) y 1,14 (s, 9H);

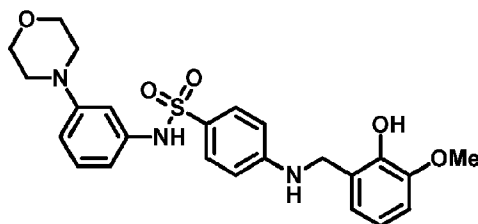
tiempo de retención LC-MS (procedimiento 2): 6.184 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₂₄H₂₉N₂O₄S, 441.0843) encontrado 441.1844.



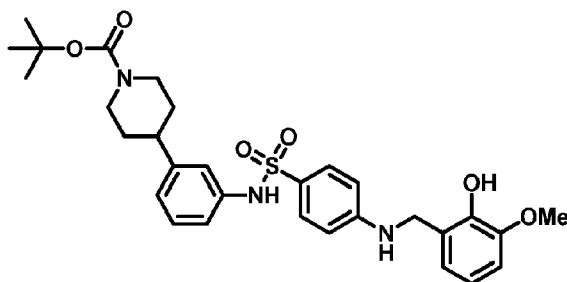
- 5 **4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(6-metoxibenzo[d]tiazol-2-il)benzenosulfonamida, TFA (62):** Procedimiento C: utilizando 2-bromo-6-metoxibenzo[d]tiazol; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12,70 (s, 1H), 8,71 (d, *J* = 0,47 Hz, 1H), 7,51-7,41 (m, 2H), 7,38 (d, *J* = 2,54 Hz, 1H), 7,14 (d, *J* = 8,76 Hz, 1H), 6,96-6,78 (m, 3H), 6,76-6,62 (m, 2H), 6,61-6,53 (m, 2H), 4,21 (d, *J* = 5,89 Hz, 2H), 3,75 (s, 3H), y 3,73 (s, 3H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 5.278 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₂₂H₂₂N₃O₅S₂, 472.0995) encontrado 472.0998.



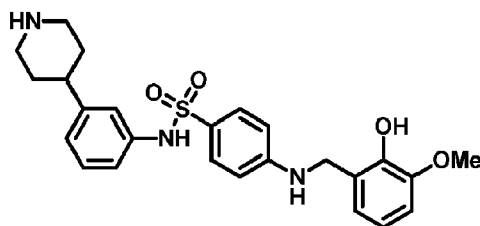
- 10 **4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(4-feniltiazol-2-il)benzenosulfonamida, TFA (63):** Procedimiento C: utilizando 2-bromo-4-feniltiazol; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,72 (s, 1H), 7,67 (d, *J* = 7,47 Hz, 2H), 7,53-7,24 (m, 6H), 7,08 (d, *J* = 19,97 Hz, 1H), 6,92-6,45 (m, 6H), 4,21 (d, *J* = 5,55 Hz, 2H) y 3,77 (s, 3H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 2): 5.200 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₂₃H₂₂N₃O₄S, 468.1046) encontrado 468.1066.



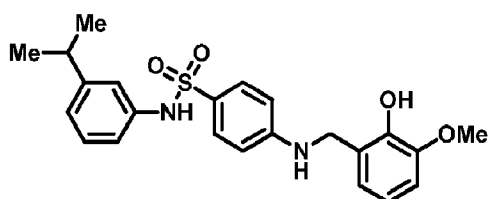
- 15 **4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(3-morfolinofenil)benzenosulfonamida, TFA (64):** Procedimiento C: utilizando 4-(3-bromofenil)morfolina; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,70 (s, 1H), 8,72 (s, 1H), 7,46-7,34 (m, 2H), 7,00 (t, *J* = 8,09 Hz, 1H), 6,82 (dd, *J* = 1,86, y 7,75 Hz, 2H), 6,76-6,43 (m, 7H), 4,19 (s, 2H), 3,77 (s, 3H), 3,71-3,59 (m, 4H), y 2,98-2,86 (m, 4H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 4.961 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₂₄H₂₈N₃O₅S, 470.1744) encontrado 470.1753.



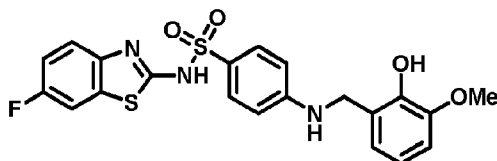
- 25 **tert-butyl 4-(3-(4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)fenilsulfonamido)fenil)piperidin-1-carboxilato (65):** Procedimiento C: utilizando tert-butyl 4-(3-bromofenil)piperidin-1-carboxilato; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,71 (s, 1H), 7,46-7,28 (m, 2H), 7,08 (t, *J* = 7,74 Hz, 1H), 6,94-6,75 (m, 6H), 6,75-6,59 (m, 2H), 6,59-6,44 (m, 2H), 4,18 (d, *J* = 5,82 Hz, 2H), 4,00 (d, *J* = 12,83 Hz, 2H), 3,76 (s, 3H), 2,59-2,50 (m, 1H), 1,62 (d, *J* = 12,87 Hz, 2H), 1,39 (s, 9H), y 1,31 (m, 4H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 6.322 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₃₀H₃₈N₃O₆S, 568.2476) encontrado 568.2461.



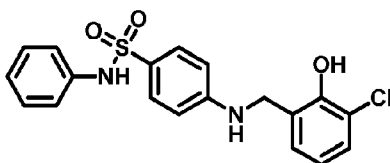
5 **4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(3-(piperidin-4-il)fenil)bencenosulfonamida, TFA (66):** Procedimiento 1C: utilizando terc-butil-4-(3-bromofenil)piperidin-1-carboxilato se eliminó el grupo Boc tras la aminación reductora con HCl 4 M/dioxanos durante un periodo de 30 min. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,73 (s, 1H), 7,53-7,24 (m, 2H), 7,12 (t, J = 7,85 Hz, 1H), 6,99 (t, J = 1,96 Hz, 1H), 6,93-6,77 (m, 4H), 6,73-6,61 (m, 2H), 6,57-6,48 (m, 2H), 4,33-4,01 (m, 2H), 3,77 (s, 3H), 3,33 (s, 1H), 2,95 (t, J = 12,62 Hz, 2H), 2,83-2,55 (m, 1H), y 1,94-1,43 (m, 4H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 4.079 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$, 468.1952) encontrado 468.1948.



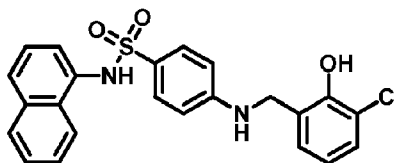
10 **4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(3-isopropilfenil)bencenosulfonamida, TFA (67):** Procedimiento C: utilizando 1-bromo-3-isopropilbenceno; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,73 (s, 1H), 8,70 (s, 1H), 7,42-7,32 (m, 2H), 7,07 (t, J = 7,77 Hz, 1H), 6,98-6,75 (m, 4H), 6,73-6,61 (m, 2H), 6,58-6,45 (m, 2H), 4,18 (s, 2H), 3,76 (d, J = 0,87 Hz, 3H), 2,72 (h, J = 6,82 Hz, 1H), y 1,07 (dd, J = 0,91, y 6,94 Hz, 6H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 6.040 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, 427.1686) encontrado 427.1680.



15 **N-(6-fluorobenzo[d]tiazol-2-il)-4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)bencenosulfonamida, TFA (68):** Procedimiento C: utilizando 2-bromo-6-fluorobenzo[d]tiazol; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,72 (s, 1H), 7,69 (dd, J = 2,43, y 8,51 Hz, 1H), 7,54-7,39 (m, 2H), 7,19 (qd, J = 3,40, 8,25, y 8,85 Hz, 3H), 6,88 (t, J = 5,68 Hz, 1H), 6,81 (dd, J = 1,71, y 7,87 Hz, 1H), 6,74-6,63 (m, 2H), 6,60-6,54 (m, 2H), 4,21 (d, J = 5,90 Hz, 2H), y 3,76 (s, 3H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 5.164 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{FN}_3\text{O}_4\text{S}_2$, 460.0796) encontrado 460.0797.

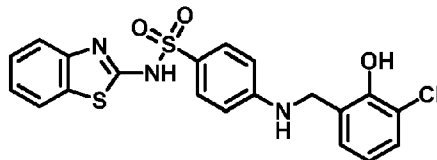


25 **4-(3-cloro-2-hidroxibencilamino)-N-fenilbencenosulfonamida, TFA (69):** Procedimiento C: utilizando 3-cloro-2-hidroxibenzaldehído y bromobenceno; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,88 (s, 1H), 9,38 (s, 1H), 7,47-7,34 (m, 2H), 7,28-7,14 (m, 3H), 7,11-7,01 (m, 3H), 7,01-6,88 (m, 2H), 6,79 (t, J = 7,78 Hz, 1H), 6,60-6,50 (m, 2H), y 4,29-4,23 (m, 2H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 2): 5.442 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}$, 389.0721) encontrado 389.0702. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



30 **4-(3-cloro-2-hidroxibencilamino)-N-(naftalen-1-il)bencenosulfonamida, TFA (70):** Procedimiento D: utilizando naftalen-1-amina y 3-cloro-2-hidroxibenzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,75 (s, 1H), 9,36 (s, 1H), 8,03 (dd, J = 1,20, y 8,53 Hz, 1H), 7,90-7,80 (m, 1H), 7,70 (d, J = 8,22 Hz, 1H), 7,54-7,28 (m, 3H), 7,23 (dd, J = 1,58, y 8,01 Hz,

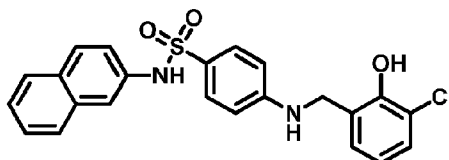
1H), 7,15 (dd, $J = 1,08$, y 7,40 Hz, 1H), 7,02 (dd, $J = 1,58$, y 7,65 Hz, 1H), 6,90 (t, $J = 5,82$ Hz, 1H), 6,78 (t, $J = 7,79$ Hz, 1H), 6,57-6,42 (m, 2H), y 4,24 (d, $J = 4,97$ Hz, 2H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 2.755 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₂₃H₂₀ClN₂O₃S, 439.0878) encontrado 439.0862. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



5

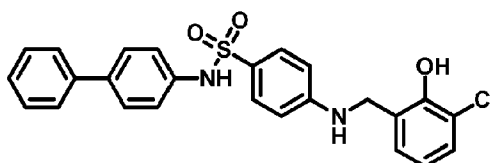
N-(benzo[d]thiazol-2-yl)-4-((3-cloro-2-hidroxiencilamino)benzenosulfonamida, TFA (71): Procedimiento C: utilizando 3-cloro-2-hidroxiencilalohido y 2-bromobenzotiazol; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,88 (s, 1H), 9,38 (s, 1H), 7,80-7,69 (m, 1H), 7,59-7,46 (m, 2H), 7,35 (ddd, $J = 1,24$, 7,44 y 8,26 Hz, 1H), 7,31-7,13 (m, 3H), 7,12-7,02 (m, 1H), 6,95 (t, $J = 5,93$ Hz, 1H), 6,78 (t, $J = 7,79$ Hz, 1H), 6,69-6,52 (m, 2H) y 4,28 (d, $J = 5,72$ Hz, 2H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 2): 5.258 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₂₀H₁₇ClN₃O₃S₂, 446.0390) encontrado 446.0379. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.

10



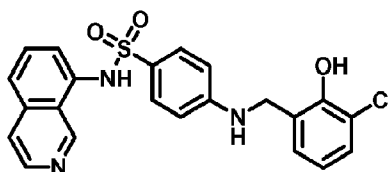
4-((3-cloro-2-hidroxiencilamino)-N-(naftalen-2-il)benzenosulfonamida, TFA (72): Procedimiento D: utilizando naftalen-2-amina y 3-cloro-2-hidroxiencilalohido; tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 2.637 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₂₃H₂₀ClN₂O₃S, 439.0878) encontrado 439.0867. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.

15



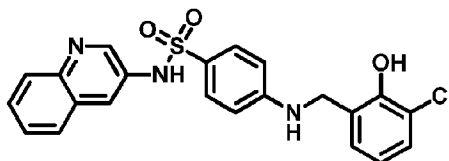
N-([1,1'-bifenil]-4-il)-4-((3-cloro-2-hidroxiencil)amino)benzenosulfonamida, TFA (73): Procedimiento D: utilizando bifenil-4-amina y 3-cloro-2-hidroxiencilalohido; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,03 (s, 1H), 9,37 (s, 1H), 7,61-7,36 (m, 9H), 7,35-7,04 (m, 5H), 6,97 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H), 6,78 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 6,62-6,52 (m, 2H), y 4,26 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 2): 6.592 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₂₅H₂₂ClN₂O₃S, 465.1034) encontrado 465.1021. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.

20



4-((3-cloro-2-hidroxiencilamino)-N-(isoquinolin-8-il)benzenosulfonamida, TFA (74): Procedimiento C: utilizando 3-cloro-2-hidroxiencilalohido y 8-bromoisoquinolina; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,60 (s, 1H), 8,55 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H), 8,09 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H), 7,99-7,71 (m, 2H), 7,46-7,29 (m, 3H), 7,23 (dd, $J = 1,6$, y 7,9 Hz, 1H), 7,11-6,93 (m, 1H), 6,78 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 6,64-6,39 (m, 2H), y 4,24 (s, 2H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 1.669 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₂₂H₁₉ClN₃O₃S, 440.0830) encontrado 440.0811. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.

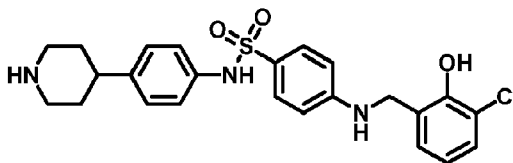
25



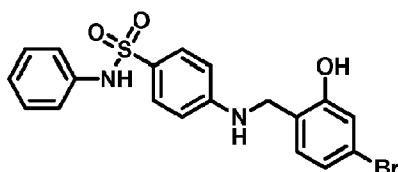
30

4-((3-cloro-2-hidroxiencilamino)-N-(quinolin-3-il)benzenosulfonamida, TFA (75): Procedimiento C: utilizando 3-cloro-2-hidroxiencilalohido y 3-bromoquinolina; tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 2.346 min; HRMS:

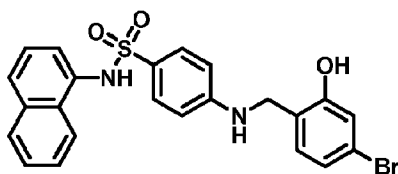
m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₂₂H₁₉ClN₃O₃S, 440.0830) encontrado 440.0824. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



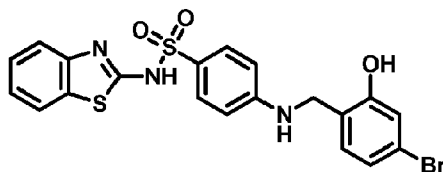
4-(3-cloro-2-hidroxibencilamino)-N-(4-(piperidin-4-il)fenil)bencenosulfonamida, TFA (76): Procedimiento D: utilizando *terc-butil-4-(4-aminofenil)piperidin-1-carboxilato* y 3-cloro-2-hidroxibenzaldehído. El grupo Boc se eliminó tras la aminación reductora con HCl 4 M en dioxano durante 30 min. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,20 (s, 1H), 9,71 (s, 1H), 7,87-7,59 (m, 2H), 7,57 (dd, *J* = 1,64, y 7,96 Hz, 1H), 7,48-7,15 (m, 6H), 7,21-7,02 (m, 1H), 6,96-6,69 (m, 2H), 4,59 (d, *J* = 5,77 Hz, 2H), 3,64 (s, 2H), 3,27 (t, *J* = 12,85 Hz, 3H), 3,10-2,93 (m, 1H), 2,18 (d, *J* = 13,73 Hz, 2H), y 1,98 (qd, *J* = 4,00, y 13,16 Hz, 2H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 2.884 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₂₃H₂₀ClN₂O₃S, 472.1456) encontrado 472.1442. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



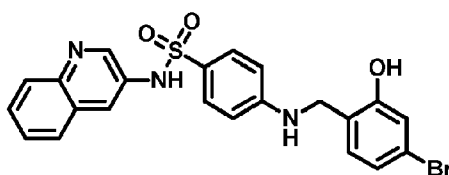
4-(4-bromo-2-hidroxibencilamino)-N-fenilbencenosulfonamida, TFA (77): Procedimiento D: utilizando 4-bromo-2-hidroxibenzaldehído y bencilamina; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,09 (s, 1H), 9,85 (s, 1H), 7,52-7,28 (m, 2H), 7,28-7,12 (m, 2H), 7,12-6,78 (m, 7H), 6,63-6,41 (m, 2H), 4,12 (d, *J* = 2,80 Hz, 2H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 2): 5.501 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₁₉H₁₆BrN₂O₃S, 434.0246) encontrado 434.0239. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



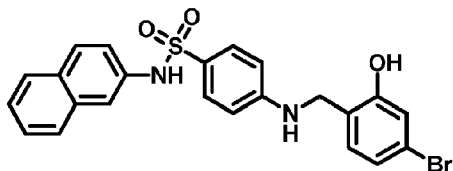
4-(4-bromo-2-hidroxibencilamino)-N-(naftalen-1-il)bencenosulfonamida (78): Procedimiento D: utilizando 1-amino-naftaleno y 4-bromo-2-hidroxibenzaldehído; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,09 (d, *J* = 1,50 Hz, 1H), 9,74 (s, 1H), 8,03 (dd, *J* = 1,23, y 8,56 Hz, 1H), 7,87-7,80 (m, 1H), 7,70 (dd, *J* = 8,24 Hz, 1H), 7,45 (ddd, *J* = 1,23, 6,81 y 8,11 Hz, 1H), 7,41-7,28 (m, 4H), 7,17-7,09 (m, 1H), 7,01-6,94 (m, 2H), 6,92-6,81 (m, 2H), 6,53-6,42 (m, 2H) y 4,12 (s, 2H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 2): 6.282 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₂₃H₂₀BrN₂O₃S, 483.0373) encontrado 483.0367. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



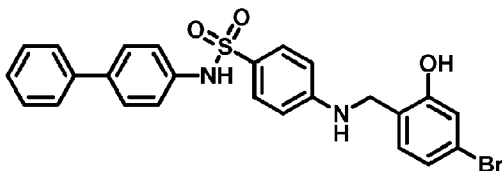
7V-(benzo[d]tiazol-2-il)-4-(4-bromo-2-hidroxibencilamino)bencenosulfonamida, TFA (79): Procedimiento D: utilizando 2-aminobenzotiazol y 4-bromo-2-hidroxibenzaldehído; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,15 (s, 1H), 10,38 (s, 1H), 8,07-7,95 (m, 1H), 7,85-7,68 (m, 2H), 7,62 (ddd, *J* = 1,22, 7,36 y 8,30 Hz, 1H), 7,54-7,40 (m, 2H), 7,37-7,04 (m, 5H), 6,93-6,67 (m, 2H) y 4,43 (d, *J* = 5,75 Hz, 2H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 1): 2.505 min; HRMS: m/z (M+H)⁺ (Calculado para C₂₀H₁₇BrN₃O₃S₂, 491.9869) encontrado 491.9855. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



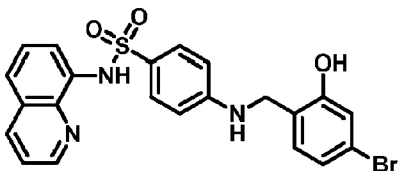
4-(4-bromo-2-hidroxibencilamino)-N-(quinolin-3-il)bencenosulfonamida, TFA (80): Procedimiento D: utilizando 3-amino-quinolina y 4-bromo-2-hidroxibenzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,41 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 10,08 (s, 1H), 8,59 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 7,94-7,83 (m, 3H), 7,61 (tt, J = 2,43, y 6,74 Hz, 1H), 7,59-7,41 (m, 3H), 7,01-6,88 (m, 2H), 6,85 (dt, J = 2,11, y 8,10 Hz, 1H), 6,53 (dd, J = 2,22, y 9,01 Hz, 2H), y 4,10 (s, 2H); tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 2.166 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{BrN}_3\text{O}_3\text{S}$, 485.0355) encontrado 485.0331. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



4-(4-bromo-2-hidroxibencilamino)-N-(naftalen-2-il)bencenosulfonamida, TFA (81): Procedimiento D: utilizando 2-amino-naftaleno y 4-bromo-2-hidroxibenzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,09 (s, 1H), 10,07 (s, 1H), 7,79-7,66 (m, 3H), 7,51-7,30 (m, 5H), 7,25 (dd, J = 2,19, y 8,81 Hz, 1H), 7,00-6,92 (m, 2H), 6,91-6,81 (m, 2H), 6,61-6,25 (m, 2H), y 4,09 (d, J = 2,95 Hz, 2H); Tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 2.856 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{BrN}_2\text{O}_3\text{S}$, 483.0373) encontrado 483.0372. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.



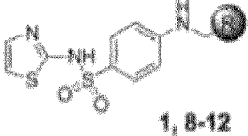
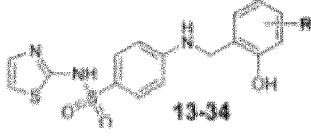
N-([1,1'-bifenil]-4-il)-4-((4-bromo-2-hidroxibencil)amino)bencenosulfonamida, TFA (82): Procedimiento D: utilizando 4-amino-bifenilo y 4-bromo-2-hidroxibenzaldehído; ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,03 (s, 1H), 9,37 (s, 1H), 7,61-7,36 (m, 8H), 7,35-7,04 (m, 5H), 6,97 (t, J = 5,8 Hz, 1H), 6,78 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 6,62-6,52 (m, 2H), 4,26 (d, J = 5,7 Hz, 2H); tiempo de retención LC-MS (procedimiento 2): 6.592 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{BrN}_2\text{O}_3\text{S}$, 510.0560) encontrado 510.0549. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.

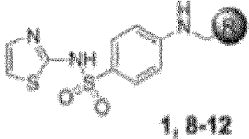
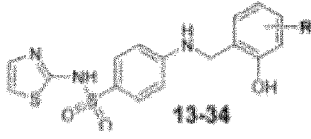


4-(4-bromo-2-hidroxibencilamino)-N-(quinolin-8-il)bencenosulfonamida, TFA (83): Procedimiento D: utilizando 8-amino-isoquinolina y 4-bromo-2-hidroxibenzaldehído; tiempo de retención LC-MS (Procedimiento 1): 2.524 min; HRMS: m/z (M+H) $^+$ (Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{BrN}_3\text{O}_3\text{S}$, 485.0355) encontrado 485.0345. Compuesto proporcionado con fines ilustrativos.

Se llevaron a cabo exploraciones sistemáticas de la Relación Estructura-Actividad (SAR) como se muestra en las Tablas 1-3. Como se muestra en la Tabla 1, la eliminación de los grupos fenólicos (**8**), del grupo 3-OMe (**9**) o del grupo 2-OH (**10**) provocó una pérdida completa de la actividad. La protección de la fracción 2-OH como éter metílico (compuestos **11-12**) o su sustitución por una amina (compuestos **13** y **15**) también anuló toda la actividad inhibidora de la 12-LOX. Una sustitución bioisostérica de la fracción de catecol por un indol(**17**) también resultó inactiva. El derivado 2,3-dicloro (**18**) tuvo una actividad comparable a la del compuesto **1**. Además, el 3-Cl (**19**, IC_{50} = 6,1 μM) tuvo una actividad comparable, mientras que el 3-Fluoro y el 3-Bromo (**20**, IC_{50} = 19 μM y **21**, IC_{50} = 13 μM) fueron ~4 a ~2,5 veces menos activos, respectivamente. Un resultado interesante e inesperado fue la actividad 2 veces superior observada para los derivados 4-bromo(**22**, IC_{50} = 2,2 μM) y 4-cloro (**27**). Otros derivados 4-sustituídos como el 4-metoxi (**28**) presentaron una actividad reducida en comparación con el compuesto **1**. El 2-OH era importante para la actividad y la posición 3 es la más óptima para el grupo metoxi. Este SAR preliminar sugirió que el 3-OMe podría sustituirse por un grupo cloro (**19**) y el 4-Bromo (**22**) manteniendo una actividad comparable, si no mejorada, al compuesto **1**.

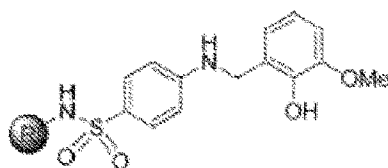
Tabla 1. inhibición de 12-LOX de los análogos 1, 8-34^a

 1, 8-12		 13-34	
compd	R	IC ₅₀ [± DE](μ M)	
1	2-OH, 3-OMe-Ph	5.1 [0.5]	
8	Ph	>40	
9	2-OH-Ph	>40	
10	3-OMe-Ph	>40	
11	2-OMe-Ph	>40	
12	2,3-OMe-Ph	>40	
13	2-NH ₂ -Ph	>40	
14	3-OH-Ph	>40	
15	2-NH ₂ , 3-OMe-Ph	>40	
16	3-OH, 4-OMe-Ph	>40	
17	7-indol	>40	
18	2,3-Cl-Ph	>40	
19	3-Cl	6.2 [2.0]	
20	3-F	19 [4]	
21	3-Br	13 [1]	
22	4-Br	2.2 [0.5]	
23	3-Me	>40	
24	3-NH ₂	>40	
25	3-NO ₂	>40	
26	3-alilo	>40	
27	4-Cl	6.3 [1.0]	
28	4-OMe	22 [11]	
29	S-Cl	>40	
30	S-OMe	>40	

 1, 8-12		 13-34
compd	R	IC ₅₀ [± DE](μM)
31	5-NH ₂	>40
32	5-F	>40
33	5-NO ₂	>40
34	6-OMe	>40
los valores de IC ₅₀ representan la concentración inhibitoria semimáxima (50 %) determinada en el ensayo con cubeta UV-vis por triplicado.		

El siguiente perfil SAR se centró en la modificación del grupo tiazol como se muestra en la Tabla 2. Los cambios introducidos en esta región de la molécula dieron lugar a análogos de mayor potencia. La sustitución de la molécula de tiazol por un 2-benzotiazol (**35**, **ML355**) dio lugar a una mejora de 18 veces en la actividad 12-LOX, manteniendo la selectividad. El benzoxazol (**36**) y el bencimidazol (**37**) poseían una actividad de buena a excelente, y la introducción de un grupo metilo en la posición 4 del anillo benzotiazol (**39**), mantenía una excelente actividad 12-LOX (IC₅₀ = 0,24 μM). La potencia contra la 12-LOX también mejoró más de 10 veces cuando el tiazol se sustituyó por un tiofeno (**38**), pero los derivados de tiazol/isoxazol sustituidos (**40-43**) no mostraron este aumento de potencia. Este fue también el caso del derivado fenílico (**48**), un conocido bioisóster de tiofeno, que tuvo una potente actividad contra la 12-LOX (IC₅₀ = 0,5 μM). En general, los compuestos aromáticos mayores [1-naftaleno (**49**) y 2-naftaleno (**50**)] y heteroaromáticos [3-quinolina (**46**), 8-isoquinolina (**47**), 2-piridina (**58**) y 3-piridina (**59**)] fueron bien tolerados y tuvieron mejor potencia que el derivado de tiazol (1). En un esfuerzo por mejorar la solubilidad añadiendo funcionalidad solubilizante, se sintetizaron algunos derivados fenílicos sustituidos con una fracción de piperazina en diferentes posiciones alrededor del anillo arilo (**53-55**). Aunque estos cambios fueron tolerados, tuvieron una actividad reducida en comparación con los mejores activos (por ejemplo, la entrada **35**, **ML355**).

Muchos de estos análogos también se probaron para actividad contra 15-LOX-1 para asegurar que se mantuviera la selectividad. Estos compuestos se probaron inicialmente frente a 15-LOX-1 a una única concentración (25 μM) y se determinó una IC₅₀ sólo para los compuestos de interés. Estos estudios demostraron que la sustitución del tiazol por un benzotiazol y sus derivados mantenían la selectividad con proporciones 15/12-LOX de 29 veces (**35**), 18-(**39**), 19-(**62**) y 20-(**68**). La relación de selectividad 15-LOX/12-LOX mejoró a más de 100 con la conversión del benzotiazol en un benzoxazol (**36**), un bencimidazol (**37**) y un fenilo sustituido por *m*-iPr (**67**). La sustitución fenílica (**48**) sólo tuvo una relación de selectividad de 15. Se observó una amplia gama de selectividad a pesar de que los compuestos tenían estructuras comparables, que iban desde la inhibición casi completa de 15-LOX-1 (por ejemplo, **38** y **62**) a la inhibición mínima (por ejemplo, **55**, **58** y **66**). El dramático efecto sobre la selectividad entre 12-LOX y 15-LOX-1 en esta porción de la molécula, sugiere que la parte inferior del sitio activo de la LOX está implicada en la unión, ya que se ha demostrado anteriormente que controla la especificidad del sustrato.

Tabla 2. inhibición de 12-LOX de los análogos 35, 68^a

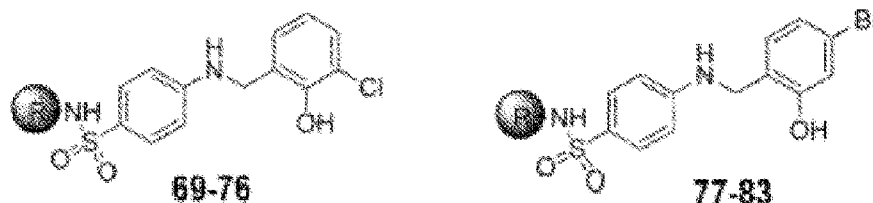
comp	R	12 - LOX	15 - LOX - 1	% inh ^b
		IC ₅₀ [+ SD] (μ M)	IC ₅₀ [+ SD] (μ M)	
35	2-benzotiazol	0.34 [0.04]	9.7 [0.1]	
36	2-benzoxazol	0.79 [0.1]	>100	
37	2-benzimidazol	0.57 [0.04]	>70	
38	2-tiofeno	0.35 [0.02]		100
39	4-Me-2-benzotiazol	0.24 [0.01]	0.69 [0.1]	
40	4-Me-2-tiazol	2.7 [0.2]		14
41	5-Me-2-tiazol	3.0 [0.4]		75
42	5-Ph-2-tiazol	91% ^b		77
43	4,5-Me-2-tiazol	1.4 [0.3]		37
44	5-Me-3-isoxazol	11 [1.2]		
45	3-OMe-Ph	85% ^b		73
46	3-quinolina	0.48 [0.1]		77
47	8-isoquinolina	0.70 [0.2]		70
48	Ph	0.50 [0.05]	7.6 [1.0]	
49	1-naftaleno	0.51 [0.06]		73
50	2-naftaleno	0.33 [0.05]		54
51	1,4-bi-Ph	1.3 [0.2]		60
52	1,3-bi-Ph	82% ^b		70
53	3-piperazin-Ph	3.5 [0.5]		31
54	4-piperazin-Ph	11 [2.7]		
55	4-piperidin-Ph	3.7 [0.6]		8
56	4-piperazin-3-pir	4.0 [0.6]		12
57	6-methyl-3-pir	5.0 [0.5]		18
58	2-pir	5.0 [0.5]		3
59	3-pir	7.0 [0.5]		
60	2-pirimidina	12 [1.0]		
61	3- ⁱ Bu-Ph	0.39 [0.8]		66
62	6-OMe-2-benzotiazol	0.26 [0.3]	5.1 [0.6]	
63	4-Ph-2-tiazol	0.18 [0.03]		87
64	3-morfolin-Ph	3.8 [0.3]		50
65	4 <i>N</i> -boc-piperidin-3-Ph	0.76 [0.05]		34
66	3-piperidin-Ph	1.1 [0.3]		4.7
67	3- ⁱ Pr-Ph	0.16 [0.02]	>100	
68	6-F-2-benzotiazol	0.22 [0.05]	4.5 [0.4]	

^aLos valores de IC₅₀ representan la concentración inhibitoria semimáxima (50 %) determinada en el ensayo con cubeta UV-vis por triplicado.

^bRepresenta la inhibición a 25 μ M.

Como se ha indicado anteriormente (Tabla 1), la sustitución de la porción "derecha" de la molécula por un 3-cloro-2-fenol (**19**) o un 4-bromo-2-fenol (**22**) dio lugar a una potencia comparable a la de **1** con valores de IC_{50} de 6,2 y 2,2 μM respectivamente. Estos grupos se combinaron con algunos de los derivados de sulfonamida descubiertos como parte de los esfuerzos iniciales de SAR (véase la Tabla 3, compuestos **69-83**). Ninguno de los compuestos había mejorado la potencia y, en casi todos los casos, habían reducido la actividad. En general, la molécula de 2-benzotiazol proporcionó la mejor actividad tanto con el 3-cloro-2-fenol (**71**; $IC_{50} = 1,6 \mu M$) como con el 4-bromo-2-fenol (**79**; $IC_{50} = 1,7 \mu M$), aunque el derivado de 1-naftaleno **78** tuvo una potencia comparable ($IC_{50} = 1,3 \mu M$).

Tabla 3. inhibición de 12-LOX de los análogos 69-83^a



comp	R	12 - LOX	15 - LOX - 1	% inh ^b
		$IC_{50} [+ SD]$ (μM)	$IC_{50} [+ SD]$ (μM)	
69	Ph	4.5 [0.4]		49
70	1-naftaleno	1.6 [0.2]		70
71	2-benzotiazol	1.3 [0.2]	1.3 [0.2]	
72	2-naftaleno	2.3 [0.3]		75
73	4-bi-Ph	4.2 [1.0]		73
74	8-isoquinolina	4.5 [0.8]		63
75	3-quinolina	5.3 [0.7]		58
76	4-piperidin-Ph	6.3 [3.0]		4
77	Ph	2.9 [0.4]		82
78	1-naftaleno	1.3 [0.3]		83
79	2-benzotiazole	1.7 [0.8]		100
80	3-quinolina	2.3 [0.5]		74
81	2-naftaleno	2.2 [0.3]		78
82	4-bi-Ph	2.5 [0.4]		80
83	8-quinolina	5.6 [2.0]		55

^aLos valores de IC_{50} representan la concentración inhibitoria semimáxima (50 %) determinada en el ensayo con cubeta UV-vis por triplicado.

^bRepresenta la inhibición a 25 μM .

Se realizaron estudios adicionales centrados en la selectividad de los análogos (**35**, **36** y **37**) contra otras isozimas LOX humanas (5-LOX y 15-LOX-2). Además, los compuestos se probaron contra la ciclooxygenasa-1 (COX-1) y/o la COX-2. Como se muestra en la Tabla 4, no hubo una inhibición significativa contra ninguna de estas enzimas relacionadas, con excepción del **ML355** que tiene una potencia modesta (29 veces menos activo) hacia la 15-LOX-1. Pocos compuestos descritos en la bibliografía han alcanzado tanto la potencia nM frente a la 12-LOX como la selectividad frente a otras isozimas.

Tabla 4. Selectividad y actividad redox de análogos representativos

analógico	12-LOX ^b	15-LOX-1 ^b	15-LOX-2 ^b	5-LOX ^b	COX-II-2 ^c	actividad redox ^d
1	5.1	>50	>40	>200	NT	NT
35	0.34	9.7	>100	>100	NI	NI
36	0.79	>100	>100	>100	NI	NI
37	0.57	>100	>100	>35	NI	NT

^aPerfil de selectividad de 1, 35, 36 y 37. ^bLos valores IC₅₀ se indican en μ M. ^cLos compuestos se probaron a 15 μ M y ninguno de ellos mostró una inhibición superior al 10 %. ^dSe realizó un ensayo de actividad pseudoperoxidasa UV-vis con 35 y 36, y no se observó degradación del producto hidroperóxido a 234 nm, lo que indica un mecanismo inhibitorio no reductor; NI = sin inhibición y NT = no probado.

Se sabe que los inhibidores de LOX exhiben una variedad de mecanismos inhibitorios; por lo tanto, el ensayo de pseudoperoxidasa UV se utiliza para investigar si la inhibición es de naturaleza reductora. El ensayo se realizó en **35** y **36** con 12-LOX y no se observó degradación del producto hidroperóxido a 234 nm, lo que indica un mecanismo inhibitorio no reductor (Tabla 4). Para investigar más a fondo el mecanismo de inhibición, se realizó una cinética en estado estacionario utilizando **35** y **36** mediante la monitorización de la formación de 12-HPETE en función de la concentración de sustrato e inhibidor en presencia de 0,01 % de Triton X-100. Las representaciones de K_m/V_{max} y $1/V_{max}$ frente a la concentración de inhibidor produjeron tendencias lineales tanto para **35** como para **36**. La K_i fue igual a $0,35 \pm 0,08 \mu$ M para **35** y $0,53 \pm 0,2 \mu$ M para **36**, a partir de los gráficos K_m/V_{max} (Figuras 4 y 6). El K_i fue igual a $0,72 \pm 0,1 \mu$ M para **35** y $0,62 \pm 0,1 \mu$ M para **36**, a partir de los gráficos $1/V_{max}$ (Figuras 5 y 7). Los datos tanto para **35** como para **36** se correlacionan con sus valores IC₅₀ (Tabla 2) e indican que ambas moléculas son inhibidores mixtos, que es una propiedad común de los inhibidores de 12-LOX y 15-LOX-1 en general.

Se exploró la actividad de **ML355** en sistemas celulares relevantes. Como se ha señalado anteriormente, la 12-LOX se ha relacionado con la activación plaquetaria, que desempeña un papel central en la regulación de la hemostasia primaria y la trombosis arterial. En consecuencia, si no se consigue atenuar la activación plaquetaria, se produce una formación excesiva de coágulos que conduce a acontecimientos cardiovasculares adversos como el infarto de miocardio y el ictus. Estudios anteriores han demostrado que la 12-LOX en las plaquetas humanas se activa en gran medida tras la estimulación del receptor activado por proteasa-4 (PAR4) por el péptido activador del PAR4 (PAR4-AP). Además, el metabolito bioactivo de la 12-LOX (12-HETE), resultante de la oxidación estereoespecífica del ácido araquidónico (AA) y la reducción por las peroxidases, demuestra efectos protrombóticos en las plaquetas humanas. Por lo tanto, el tratamiento de las plaquetas humanas inducidas por PAR4-AP con una pequeña molécula inhibidora de 12-LOX atenúa la agregación plaquetaria de forma dependiente de la dosis. Para confirmarlo, se estimularon plaquetas humanas lavadas (1×10^6 plaquetas/ml) con 200 μ M de PAR4-AP en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de **ML355** (Figura 2A). La movilización de calcio disminuyó al aumentar la concentración de **ML355**. El calcio se midió en tiempo real utilizando un citómetro de flujo C6 Accuri. Los experimentos se realizaron por triplicado. Además, la agregación plaquetaria de plaquetas humanas (3×10^6 plaquetas/ml) se midió en tiempo real utilizando un Chronolog Lumi-Aggregometer (modelo 700D) tras la adición de PAR4-AP (Figura 2B). Mientras que 10 μ M de **ML355** no inhibieron la agregación plaquetaria, 25 μ M de **ML355** inhibieron en un 80 % la agregación plaquetaria en plaquetas humanas lavadas. Los resultados de la Figura 2B muestran que, de hecho, el **ML355** reduce significativamente la agregación plaquetaria inducida por PAR4-AP. Además, se ha demostrado que la 12-LOX desempeña un papel en la movilización del calcio en las plaquetas humanas y la inhibición de la 12-LOX conduce a una reducción de la concentración de calcio libre en la plaqueta. Para estudiar esto, se estimularon plaquetas humanas con 200 μ M de PAR4-AP y se midió el calcio libre en la plaqueta, utilizando un citómetro de flujo C6 Accuri con varias concentraciones de **ML355** (Figura 2A). Estos datos demuestran que a concentraciones tan bajas como 250 nM de **ML355** la movilización de calcio se reduce significativamente (medido como cambio de pliegue), con una inhibición completa de la movilización de calcio que ocurre a $\sim 5 \mu$ M. Se obtuvieron resultados comparables con otro activo superior (compuesto **36**) mostrado en la Figura 8.

También se evaluó la capacidad del **ML355** para inhibir la 12-LOX en modelos celulares relevantes para la enfermedad diabética. Como se ha comentado anteriormente, la 12-LOX se expresa en las células β pancreáticas y su producto metabólico, el 12-HETE, está implicado en la muerte celular inducida por citocinas. En concreto, se ha demostrado que el 12(S)-HETE reduce la actividad metabólica, inhibe la secreción de insulina y, en última instancia, induce la muerte celular en los islotes humanos. El **ML355** se probó tanto en una línea de células β derivada de ratón (BTC3) como en islotes donantes primarios humanos para determinar su capacidad de inhibir la estimulación de 12-HETE inducida por AA/ionóforo de calcio. El **ML355** fue capaz de inhibir potentemente la 12-HETE en células BTC3 con un IC₅₀ aproximado de 1 μ M, medido por ELISA (Figura 3A). Dada la dificultad de obtener islotes humanos primarios a

partir de tejidos donados, la actividad en islotes humanos se realizó a una concentración única. Los datos presentados en la Figura 3B demuestran una inhibición significativa de la producción de 12-HETE inducida por AA/IONO, a 10 μ M de **ML355**. Se obtuvieron resultados comparables con otro activo superior (compuesto **36**) mostrado en la Figura 9.

Células beta de ratón (BTC3) fueron tratadas con ácido araquidónico e ionóforo de calcio (AA/IONO) solos o en presencia de **ML355** (Figura 3A). En el gráfico se muestran los niveles de 12-HETE expresados como porcentaje de los detectados en las células estimuladas únicamente con AA/IONO. En la Figura 3B, el gráfico representa el aumento (por encima del control/no estimulado) de 12-HETE en islotes humanos de donantes primarios estimulados con ácido araquidónico e ionóforo de calcio (AA/IONO) solos o en presencia de 10 μ M de **ML355**. el 12-HETE se midió mediante ELISA. En la Figura 3C, el gráfico representa los niveles de 12-HETE detectados cuando los islotes donantes humanos se trataron con ácido araquidónico e ionóforo de calcio (AA/IONO) solos o en presencia de diferentes concentraciones del compuesto **35** o **36**. Los datos graficados en la figura 3C son un experimento representativo con cada punto de datos graficado realizado por triplicado. Estos datos son representativos de tres determinaciones experimentales distintas, cada una de ellas realizada con preparaciones distintas de islotes de donantes humanos. Los datos graficados son la media \pm SEM, n=3. Las barras de error de algunos puntos están enmascaradas por el símbolo.

Las Figuras 3D y 3E muestran resultados de la secreción de insulina estimulada por glucosa en preparaciones de islotes de donantes humanos en respuesta a 3 mM de glucosa (Baja) o 18 mM de glucosa (Alta) para islotes de control (no tratados). Los islotes se incubaron con citoquinas (TNF α , IL-1 β , IFN γ) y los islotes se coincubaron con citoquinas y los compuestos **35** o **36**. Las figuras 3D y 3E representan los resultados obtenidos en diferentes preparaciones de islotes de donantes humanos. Los compuestos **35** o **36** inhiben el desacoplamiento de la secreción de insulina estimulada por glucosa mediante citocinas.

Aunque los datos anteriores demuestran actividad en modelos celulares relevantes para la enfermedad, para validar el uso potencial de **ML355** en modelos animales de prueba de concepto, se determinaron sus propiedades ADME *in vitro* y PK *in vivo*. Estos datos se resumen en las Tablas 5 y 6, respectivamente. El **ML355** demostró una excelente estabilidad microsomal tanto en rata ($T_{1/2}$ >30 minutos) como en ratón ($T_{1/2}$ >300 minutos) y resultó ser estable en plasma de ratón durante un periodo de 2 horas (100 % restante). Además, el **ML355** no mostró degradación en varios tampones acuosos (pH 2-9) y fue estable a 5 mM de glutatión, lo que sugiere una excelente estabilidad (Figura suplementaria S5). Se observa una mejor solubilidad en el tampón de ensayo (análisis cualitativo). Además, el derivado de benzoxazol (**36**) tiene una solubilidad mucho mejor en tampón (>10 veces), aunque con una potencia ligeramente menor frente a la 12-LOX.

Tabla 5. Perfil ADME in vitro para 35

comp	Estabilidad microsomal				relación de eflujo	estabilidad plasmática del ratón restante a las 2 h (%)	Tampón PBS (pH 7,4) estabilidad a 48 h (%)
	Tampón PBS (pH 7,4) solubilidad (μ g/mL)	$T_{1/2}$ (min)a,b	$T_{1/2}$ (min)a,b	permeabilidad (1×10^{-6} cm/s)			
35	<5	>30 (rata)	>300 ^a (ratón)	1.5 (A \rightarrow B)a ^{39d} c	1.8	100	100
36	>60	>30 (rata)	NT	168c	NT	100	100

^aEstos experimentos se realizaron en Pharmaron Inc. Todos los demás estudios se realizaron en NCATS. ^bRepresenta la estabilidad en presencia de NADPH. 35 y 36 no mostraron degradación sin la presencia de NADPH durante un período de 1 h. ^cRepresenta la permeabilidad en el Ensayo Paralelo de Permeabilidad de Membrana Artificial (PAMPA) a pH 7,4.

Tabla 6. In Vivo PK (Ratón) a 3 mpk (IV) y 30 mpk PO para^{35a}

comp	ruta ^b	$T_{1/2}$ (h)	$T_{\text{máx}}$ (h)	C_{max} (μ M)	AUC _{inf} (μ M-h)	Vd(L/kg)	Cl (ml/min/kg)	%F	MRT ^c
35	IV	3.4	NA	112	34	0.55	3.4	NA	2.44 h

Tabla 6. In Vivo PK (Ratón) a 3 mpk (IV) y 30 mpk PO para^{35a}

comp	ruta ^b	T _{1/2} (h)	T _{máx} (h)	C _{max} (μM)	AUC _{inf} (μM-h)	Vd(L/kg)	Cl (ml/min/kg)	%F	MRT ^c
	PO	2.9	0.25	38	67	NA	NA	19.8	NA

^aTodos los experimentos se realizaron en Pharmaron Inc. con ratones CD1 macho (6-8 semanas de edad). Los datos se recogieron por triplicado en 8 puntos temporales durante un periodo de 24 horas. ^bFormulado como solución (5 % DMSO, 10 % Solutol, 20 % PEG400, 65 % agua). ^cRepresenta el tiempo de eliminación del 63,2 % de la dosis IV.

EI ML355 mostró una permeabilidad celular moderada en el ensayo Caco-2 ($1,5 \times 10^{-6}$ cm/s) y no parece ser un sustrato para la Pgp dada la relación de eflujo de <2. También se exploraron las propiedades PK *in vivo* (ratón) de la molécula (Tabla 6). Los estudios exploratorios de formulación condujeron a un vehículo apropiado (DMSO:Solutol:PEG400:agua; 5/10/20/65 v/v/v/v) en el que **el ML355** se administró como solución por vía IV (3 mpk) y PO (30 mpk). Estos estudios demuestran que **el ML355** es biodisponible por vía oral (%F = ~20), con una semivida moderada (T_{1/2} = 2,9 horas). Con una dosis de 30 mpk, **el ML355** alcanza una C_{max} de más de 135 veces el IC₅₀ *in vitro* y se mantiene por encima del valor IC₅₀ durante más de 12 horas. El compuesto tiene un aclaramiento bajo (3,4 ml/min/kg) y una buena exposición global (AUC_{inf}) de 38 μM. El volumen de distribución (Vd) es de 0,55 L/kg, que es bajo pero sugiere una distribución razonable entre el tejido y la sangre. Dada la estabilidad microsómica favorable (metabolismo de fase I) y, sin embargo, la modesta T_{1/2} *in vivo*, se pensó que la fracción fenólica podría glucuronidarse (metabolismo de fase II), lo que daría lugar a un aclaramiento superior al previsto. De hecho, la incubación con el cofactor UDPGA en lugar de NADPH condujo a un T_{1/2} de ~8 minutos (frente a >30 minutos con NADPH). Se creía además que el entorno estéricamente obstaculizado del 2-OH posiblemente impediría que se produjera la glucuronidación, pero estos datos sugieren lo contrario. Otra estrategia que se ha utilizado para evitar la glucuronidación consiste en introducir grupos que retiren electrones junto a la fracción fenólica de interés. Utilizando esta estrategia se sintetizó el análogo **71** (2-OH, 3-Cl), sin embargo, esto no cambió la velocidad de glucuronidación. Además de introducir en el anillo otros grupos que retiren electrones, otro enfoque consiste en modificar el hidroxilo fenólico mediante un enfoque pro-fármaco. Lo ideal sería que el profármaco se hidrolizara lentamente hasta convertirse en fenol libre, después de haber superado el metabolismo de primer paso. Este enfoque se ha utilizado con éxito en varios medicamentos comercializados, que contienen grupos fenólicos. (Ettmayer, P.; Amidon, G. L.; Clement B.; Testa, B. Lecciones aprendidas de profármacos comercializados y en investigación. J. Med. Chem. 2004, 47, 2393-2404.)

Como se ha indicado anteriormente, los inhibidores de la 12-LOX previamente descritos, como la baicaleína y el ácido nor-dihidroguairético (NDGA), los "bromo-fenoles" o los "derivados de pirazol" (ver Figura 1) no sólo son menos potentes y selectivos, sino que tampoco son fácilmente modificables para una mayor optimización. Nuestro inhibidor de la 12-LOX descrito anteriormente (**ML127**) muestra una potente inhibición (<500 nM) y una excelente selectividad, pero se observó que presentaba un SAR plano estrecho, por lo que ofrecía pocas posibilidades de modificación posterior. Se descubrió un nuevo quimiotipo estructuralmente distinto de todos los inhibidores descritos anteriormente y que posee un andamiaje similar a un fármaco. **ML355**, y análogos superiores relacionados demuestran una potente (<500 nM) inhibición hacia 12-LOX y una excelente selectividad frente a enzimas relacionadas (15-LOX-1, 5-LOX, 15-LOX-2, COX 1/2). Esta serie se adapta fácilmente a modificaciones estructurales y muestra un SAR claro y manejable. **EI ML355** presenta un perfil ADME *in vitro* y PK *in vivo* favorable con actividad en sistemas celulares relevantes para enfermedades, como la trombosis (agregación plaquetaria y movilización de calcio) y la diabetes (reducción de 12-HETE en las células β).

Reactivos biológicos: Todos los ácidos grasos comerciales (Sigma-Aldrich Chemical Company) se purificaron de nuevo utilizando una columna C-18 Higgins HAlsil Semi-Preparative (5 μm, 250 × 10mm). La solución A era 99,9 % de MeOH y 0,1 % de ácido acético; la solución B era 99,9 % de H₂O y 0,1 % de ácido acético. Una elución isocrática de 85 % A: se utilizó 15 % B para purificar todos los ácidos grasos, que se almacenaron a -80 °C durante un máximo de 6 meses.

Plaquetas humanas: Se obtuvieron plaquetas humanas de voluntarios sanos de la comunidad de la Universidad Thomas Jefferson y del área de Filadelfia. Estos estudios fueron aprobados por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad Thomas Jefferson, y se obtuvo el consentimiento informado de todos los donantes antes de la extracción de sangre. La sangre se centrifugó a 200 g durante 13 min a temperatura ambiente. El plasma rico en plaquetas se transfirió a un tubo cónico que contenía una solución de citrato ácido y dextrosa al 10 % (39 mM de ácido cítrico, 75 mM de citrato sódico y 135 mM de glucosa, pH 7,4) y se centrifugó a 2000 g durante 15 min a temperatura ambiente. Las plaquetas se resuspendieron en tampón Tyrode (12 mM NaHCO₃, 127 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,5 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucosa y 10 mM HEPES), y la concentración final de plaquetas se ajustó a 3×10^8 plaquetas/mL tras el recuento con un contador de partículas ZI Coulter (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Los resultados comunicados

son los datos obtenidos utilizando plaquetas de al menos tres sujetos diferentes. Se utilizaron agonistas e inhibidores a las concentraciones indicadas en las figuras y en las leyendas de las figuras.

Sobreexpresión y purificación de la 12-lipoxigenasa humana, la 5-lipoxigenasa humana, la 12/15-lipoxigenasa de ratón y las 15-lipoxigenasas humanas: La 12-lipoxigenasa plaquetaria humana (12-LOX), la 15-lipoxigenasa-1 reticulocitaria humana (15-LOX-1) y la 15-lipoxigenasa-2 epitelial humana (15-LOX-2) se expresaron como proteínas marcadas N-terminalmente con His6 y se purificaron con una pureza superior al 90 %, evaluada mediante análisis SDS-PAGE. La 5-lipoxigenasa humana se expresó como una proteína no etiquetada y se utilizó como fracción proteica cruda de sulfato de amonio, tal y como se publicó anteriormente. El contenido en hierro de 12-LOX se determinó con un espectrómetro de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) Finnigan, utilizando cobalto-EDTA como patrón interno. Las concentraciones de hierro se compararon con soluciones de hierro normalizadas y se utilizaron para normalizar las concentraciones de enzimas.

Materiales de cribado de alto rendimiento: El dimetilsulfóxido (DMSO) de grado ACS procedía de Fisher, mientras que el sulfato amónico ferroso, el naranja de xilenol (XO), el ácido sulfúrico y el Tritón X-100 se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Ensayo qHTS de 12-lipoxigenasa (AID: 1452): Todas las operaciones de cribado se realizaron en un sistema robótico totalmente integrado (Kalypsys Inc, San Diego, CA). (Inglese, J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 2006, 103, 11473-11478.) Se dispensaron 3 µl de enzima (aproximadamente 80 nM de 12-LOX, concentración final) en placas de ensayo Greiner negras de fondo transparente de 1536 pocillos. Los compuestos y los controles (23 nL) se transfirieron mediante Kalypsys PinTool equipado con una matriz de 1536 pines. La placa se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se añadió una alícuota de 1 µl de solución de sustrato (50 µM de concentración final de ácido araquidónico) para iniciar la reacción. La reacción se detuvo tras 6,5 min añadiendo 4 µL de solución FeXO (concentraciones finales de 200 µM de naranja de xilenol (XO) y 300 µM de sulfato amónico ferroso en ácido sulfúrico 50 mM). Tras un centrifugado corto (1000 rpm, 15 s), la placa de ensayo se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las absorbancias a 405 y 573 nm se registraron con el generador de imágenes CCD de alto rendimiento ViewLux (Perkin-Elmer, Waltham, MA) utilizando los ajustes estándar del protocolo de absorbancia. Durante la dispensación, los frascos de enzima y sustrato se mantuvieron sumergidos en un baño refrigerante de recirculación a +4 °C para minimizar la degradación. Se incluyeron placas que contenían sólo DMSO (en lugar de soluciones de compuestos) aproximadamente cada 50 placas a lo largo de la pantalla para controlar cualquier tendencia sistemática en la señal del ensayo asociada con la variación del dispensador de reactivos o la disminución de la actividad específica de la enzima. Los datos se normalizaron con respecto a los controles y se aplicaron correcciones de datos basadas en placas para filtrar el ruido de fondo. En el presente documento se ofrecen más detalles sobre el análisis de los datos.

Ensayo UV-Vis de lipoxigenasa: Los compuestos inhibidores se analizaron inicialmente utilizando un punto de concentración a 25 µM en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 40 UV/Vis. El porcentaje de inhibición se determinó comparando las velocidades enzimáticas del control (disolvente DMSO) y de la muestra de inhibidor siguiendo la formación del producto dieno conjugado a 234 nm ($\epsilon = 25.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Las reacciones se iniciaron añadiendo 30 nM de 12-LOX, 40 nM de 15-LOX-1, 200 nM de 15-LOX-2 o 5-10 µL de extracto crudo de 5-LOX a una cubeta con 2 mL de tampón de reacción agitada constantemente mediante una barra de agitación magnética a temperatura ambiente (22 °C). Los tampones de reacción utilizados para las distintas lipoxigenasas fueron los siguientes: 25 mM HEPES (pH 7,3), 0,3 mM CaCl_2 , 0,1 mM EDTA, 0,2 mM ATP, 0,01 % Triton X-100, 10 µM AA para la 5-LOX cruda precipitada con sulfato de amonio; y 25 mM HEPES (pH 7,5), 0,01 % Triton X-100, 10 µM AA para 12-LOX, 15-LOX-1 y 15-LOX-2. La concentración de sustrato se determinó cuantitativamente dejando que la reacción enzimática se completara en presencia de 15-LOX-2. Para los inhibidores que mostraron más del 50 % de inhibición en las pruebas de un punto, los valores IC_{50} se obtuvieron determinando el % de inhibición, en relación con el vehículo disolvente solo, a varias concentraciones de inhibidor. A continuación, se trazaron los datos en función de la concentración de inhibidor y se realizó un ajuste hiperbólico de la curva de saturación (suponiendo que la concentración total de enzima $[E] \ll K_{\text{app}}$, por lo que $\text{IC}_{50} \sim K_{\text{app}}$). Cabe señalar que todos los inhibidores potentes mostraron una inhibición máxima superior al 80 %, salvo que se indique lo contrario en las tablas. Los inhibidores se almacenaron a -20 °C en DMSO.

Cinética de inhibición en estado estacionario: Se realizaron experimentos cinéticos en estado estacionario con ML355 para determinar el modo de inhibición. Se utilizaron concentraciones de inhibidor de 0, 0,1, 0,2 y 0,35 µM. Las reacciones se iniciaron añadiendo sustrato (intervalo 1 - 5 µM AA) a aproximadamente 30 nM 12-LOX en una cubeta de 2 mL en agitación constante que contenía tampón HEPES 25 mM (pH 7,5), en presencia de Triton X-100 al 0,01 %. Las tasas de lipoxigenasa se determinaron monitorizando la formación del producto conjugado, 12-HPETE, a 234 nm ($\epsilon = 25\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) con un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 45 UV/Vis. Cabe señalar que la 12-LOX muestra un mayor error en los valores de K_M a bajas concentraciones de sustrato ($< 1 \text{ µM}$) debido a los límites del espectrofotómetro. Para minimizar este error inherente, lo mejor es añadir primero 12-LOX y luego iniciar rápidamente la reacción con la adición de la cantidad adecuada de sustrato, lo que produjo resultados significativamente más reproducibles. La concentración de sustrato se determinó cuantitativamente permitiendo que la reacción enzimática procediera hasta su finalización, utilizando 15-LOX-2. Los datos cinéticos se obtuvieron registrando las velocidades enzimáticas iniciales, a distintas concentraciones de sustrato e inhibidor, y posteriormente se ajustaron a la ecuación de Henri-Michaelis-Menten, utilizando KaleidaGraph (Synergy) para determinar las constantes de velocidad

microscópica, V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) y V_{max}/K_M ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\mu\text{M}$). Las constantes cinéticas de velocidad se replantearon posteriormente con $1/V_{max}$, K_M/V_{max} y $1/K_M$ frente a la concentración de inhibidor, obteniéndose K_i .

Ensayo de pseudoperoxidasa: Los índices de actividad de la pseudoperoxidasa se determinaron con BWb70c como control positivo, 13-(S)-HPODE como producto oxidante y 12-LOX o 15-LOX-1 en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 40 UV/Vis, tal como se ha descrito anteriormente.²⁵ La actividad se determinó monitorizando la disminución a 234 nm (degradación del producto) en tampón (50 mM de fosfato sódico (pH 7,4), 0,3 mM de CaCl_2 , 0,1 mM de EDTA, 0,01 % de Triton X100 y 20 μM de 13-(S)-HPODE). Se añadieron unos 60 nM de 12-LOX a 2 mL de tampón que contenía 20 μM de 13-(S)-HPODE, agitando constantemente con una barra agitadora giratoria (22 °C). La reacción se inició con la adición de 20 μM de inhibidor (en proporción 1:1 respecto al producto). Se registró el porcentaje de consumo de 13-(S)-HPODE y la pérdida de producto inferior al 20 % no se consideró como actividad redox viable. Se realizaron controles individuales consistentes en enzima sola con producto y **ML355** solo con enzima. Estos controles negativos constituyeron la línea de base del ensayo, reflejando la descomposición del producto hidroperóxido no dependiente de la pseudoperoxidasa. Para descartar la autoinactivación de la enzima por el ciclado de la pseudoperoxidasa, se midió la actividad residual de 12-LOX una vez finalizado el ensayo, se añadieron 20 μM de AA a la mezcla de reacción y se determinó la actividad residual comparando las tasas iniciales con inhibidor y 13-(S)-HPODE frente al inhibidor solo, ya que el inhibidor por sí mismo disminuye intrínsecamente la tasa de oxigenación. La actividad se caracteriza por la medición directa de la formación de producto con el aumento de la absorbancia a 234 nm.

Ensayo de ciclooxigenasa: Se añadieron aproximadamente 2-5 μg de COX-1 o COX-2 a un tampón que contenía 0,1 M de tampón Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM de EDTA, 2 mM de fenol y 1 μM de hematina a 37 °C. Los inhibidores seleccionados se añadieron a la cubeta de reacción, seguida de una incubación de 5 minutos con cualquiera de las enzimas COX. A continuación, se inició la reacción añadiendo 100 μM de AA en la célula de reacción. Los datos se recogieron utilizando un electrodo de oxígeno Hansatech DW1 y se registró el consumo de oxígeno. La indometazina y el disolvente DMSO se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente, y el porcentaje de inhibición de la enzima se calculó comparando los índices de las muestras y los controles

Agregación plaquetaria: Las plaquetas lavadas se ajustaron a una concentración final de 3×10^8 plaquetas/mL. Donde se indica, las plaquetas se pretrataron con **ML355** durante 10 min a las concentraciones indicadas durante 1 min. La respuesta de agregación a PAR4-AP se midió utilizando un agregómetro con agitación a 1100 RPM a 37 °C.

Movilización de calcio: Las plaquetas se recalcificaron a una concentración final de 1 mM seguida de una preincubación con Fluo-4 AM durante 10 min. A continuación, las plaquetas se trataron con **ML355** durante 10 min a las concentraciones indicadas antes de la estimulación con el agonista indicado. La movilización de calcio se midió utilizando el citómetro de flujo Accuri C6.

Ensayo en células beta de ratón (inhibición de 12-HETE): Las células se sembraron hasta un 90 % de confluencia en placas de 24 pocillos en DMEM (Cat# 11885092, Life Technologies Grand Island, NY) +10 % FBS. Las células se pretrataron con **ML355** y se estimularon como en el caso de los islotes humanos. Transcurridas cuatro horas, se retiró el medio y se centrifugó a 1000 RPM durante 5 minutos. El sobrenadante aclarado se almacenó a -80 °C antes del análisis. Para el análisis, los sobrenadantes se extrajeron en una columna SPE SepPak c18 (Cat# WAT054945, Waters Corporation, Milford, MA) y se secaron bajo gas nitrógeno antes de reconstituílos en 500 μl de tampón ELISA 12-HETE y analizarlos siguiendo las recomendaciones del fabricante (Cat# 901-050, Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA).

Ensayo en islotes humanos (inhibición de 12-HETE): Los islotes de donantes humanos obtenidos del programa integrado de distribución de islotes (www.iidp.coh.org) se incubaron durante la noche en medio CMRL (Cat# 15-110-CV MediaTech, Inc. Manassas, VA) que contenía un 10 % de suero bovino fetal, 1U de penicilina y 1 μg de estreptomycin (pen/strep). Los islotes se equilibraron en un medio libre de suero (CMRL con pen/Strep y 1 % de albúmina de suero humano libre de ácidos grasos (Cat# A1887 Sigma, St. Louis, MO)) durante 1 hora antes del pretratamiento con 10 μM **ML355** durante 30 minutos. Para la inducción de 12-HETE, los islotes fueron tratados con 100 μM de ácido araquidónico (Cat# BMI,-FA003-0100, Enzo Life Sciences Plymouth Meeting, PA), y 5 μM de A23187 (Cat# C7522, Sigma, St. Louis, MO), durante 4 horas a 37 °C. Los islotes fueron cosechados y centrifugados a 1000 RPM durante 5 minutos. Los islotes fueron cosechados, centrifugados a 1000 RPM durante 5 minutos con el sobrenadante limpio y el pellet de islotes almacenados a -80 °C. Para la extracción de los sobrenadantes, las muestras se acidificaron a pH 3 con HCl 1N durante 30 minutos y se centrifugaron a 1000 RPM durante cinco minutos. Las muestras se añadieron a una columna preparada (prelavada con 3 mL de EtOH, seguidos de 3 mL de H_2O) y lavada con 3 mL de H_2O , seguidos de 3 mL de EtOH al 15 %, y 3 mL de Hexano. Las muestras se eluyeron con 3 mL de acetato de etilo y se secaron bajo gas nitrógeno antes de su reconstitución en 500 μl de tampón de muestra ELISA 12-HETE (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA). Los gránulos celulares se extrajeron utilizando CHCl_3 / MeOH y las muestras se secaron bajo gas nitrógeno antes de reconstituirlas en 250 μl de tampón de muestra ELISA. Los niveles de 12-HETE en las muestras se determinaron utilizando un kit ELISA 12-HETE (Cat# 901-050, Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA).

Ejemplos relacionados con el uso de inhibidores de la 12-lipoxigenasa en la activación plaquetaria y el tratamiento de la trombosis

Ejemplo: La 12-LOX plaquetaria es esencial para la activación plaquetaria mediada por FcγRIIIa

La inhibición farmacológica de 12-LOX en plaquetas humanas resultó en una atenuación significativa de la agregación mediada por FcγRIIIa. se demostró que la 12-LOX es esencial para la actividad PLCγ2 inducida por FcγRIIIa que conduce a la activación de la movilización del calcio, la activación de Rap1 y PKC, y la posterior activación de la integrina αIIbβ3. Además, las plaquetas de ratones transgénicos que expresan FcγRIIIa humano pero son deficientes en 12-LOX plaquetaria no formaron agregados plaquetarios normales y mostraron deficiencias en la activación de Rap1 y αIIbβ3 tras la estimulación del receptor FcγRIIIa. Estos resultados respaldan el papel esencial de la 12-LOX en la regulación de la función plaquetaria mediada por FcγRIIIa e identifican la 12-LOX como diana terapéutica para limitar la trombosis inmunomediada.

La 12(S)-lipoxigenasa plaquetaria (12-LOX), una oxigenasa altamente expresada en las plaquetas, ha demostrado potenciar la activación de vías de señalización selectas, incluyendo el receptor activado por proteasa 4 (PAR4) y un complejo receptor que contiene ITAM (GPVI-FcRγ). La función más conocida de la 12-LOX es la producción de oxilipinas, siendo la más notable la conversión de ácido araquidónico (AA) en ácido 12-hidroxicicosatetraenoico (12-HETE) tras la estimulación agonista de las plaquetas a través de vías mediadas tanto por GPCR como por no GPCR. el 12-HETE es una oxilipina que ha demostrado ser pro-trombótica en las plaquetas. En los pacientes sometidos a endarterectomía carotídea, la heparina intraoperatoria aumenta el nivel de 12-HETE plasmático, que se correlaciona con la reactividad plaquetaria del paciente al ADP ex vivo. Aunque el mecanismo por el que la 12-LOX regula la actividad plaquetaria aún no se ha dilucidado completamente, publicaciones anteriores han demostrado la capacidad de la actividad de la 12-LOX para aumentar los componentes clave de señalización de la activación plaquetaria, incluidos Rap1, la movilización de Ca²⁺, la activación de αIIbβ3 y la secreción de gránulos densos. Dado que recientemente se ha demostrado que la actividad 12-LOX es necesaria para la activación plaquetaria normal mediada por GPVI y que FcγRIIIa comparte componentes de señalización comunes con GPVI, los inventores trataron de identificar si 12-LOX es un componente vital de la vía de señalización de FcγRIIIa.

En este estudio las plaquetas humanas fueron tratadas con un inhibidor de 12-LOX, ML355, o control de vehículo antes de la estimulación de FcγRIIIa para determinar si 12-LOX juega un papel en la vía de señalización de FcγRIIIa. La inhibición farmacológica de la actividad 12-LOX en plaquetas humanas atenuó la agregación plaquetaria mediada por FcγRIIIa. En consonancia con los estudios en humanos, las plaquetas murinas aisladas de ratones transgénicos hFcR deficientes en 12-LOX presentaron una agregación atenuada en respuesta a la estimulación con FcγRIIIa en comparación con los ratones transgénicos hFcR de tipo salvaje. Se demostró además que la actividad de 12-LOX es esencial para la activación temprana de PLCγ2, así como para otros efectores posteriores, como la movilización de calcio, Rap1, PKC, activación de αIIbβ3 y secreción de gránulos densos, mientras que no afecta directamente a la fosforilación de la propia FcγRIIIa. Este estudio es el primero en identificar la actividad 12-LOX como un componente esencial de la señalización normal de FcγRIIIa en las plaquetas. Además, los resultados de este estudio sugieren por primera vez que la 12-LOX puede representar una nueva diana terapéutica para tratar la trombocitopenia inmunomediada y la trombosis.

12-LOX regula la agregación plaquetaria mediada por FcγRIIIa

Anteriormente se demostró que la 12-LOX regula la agregación plaquetaria mediada por GPVI. En las plaquetas, FcγRIIIa utiliza muchos de los mismos efectores de señalización que GPVI-FcRγ (4). Para determinar si la 12-LOX desempeña un papel en la agregación plaquetaria mediada por FcγRIIIa, se trataron plaquetas humanas lavadas con ML355, un inhibidor selectivo de la 12-LOX o DMSO (control del vehículo) seguido de agregación inducida por FcγRIIIa. La inhibición de la actividad 12-LOX plaquetaria atenuó la agregación plaquetaria mediada por FcγRIIIa a través de la estimulación anti-CD9 (Fig. 11A) o la reticulación con anticuerpos contra FcγRIIIa (Fig. 11B). Para confirmar que la disminución de la agregación plaquetaria mediada por FcγRIIIa se debía a la inhibición farmacológica de 12-LOX y no a un efecto no diana del ML355, se midió la agregación plaquetaria ex vivo tras la estimulación anti-CD9 en ratones transgénicos humanizados de FcγRIIIa (hFcR) que expresaban 12-LOX (ALOX^{12+/+}) o deficientes en 12-LOX (ALOX^{12-/-}). Las plaquetas de ratones deficientes en 12-LOX (hFcR/ALOX^{12-/-}) mostraron una agregación retardada (Fig. 12B) y atenuada (Fig. 12C) en respuesta a la estimulación anti-CD9 (.125 y .25 µg/mL) en comparación con las plaquetas de ratones que expresan 12-LOX funcional (hFcR/ALOX^{12+/+}). Estos datos sugieren que las plaquetas que carecen de actividad 12-LOX por ablación farmacológica o genética presentan una respuesta de agregación significativamente atenuada a la activación de FcγRIIIa.

12-LOX regula la actividad de αIIbβ3 y Rap1 en plaquetas estimuladas con FcγRIIIa

Las Figs. 11 y 12 sugieren que 12-LOX es esencial para la agregación plaquetaria normal mediada por FcγRIIIa; sin embargo, el componente o componentes de la vía de FcγRIIIa regulados por 12-LOX siguen sin estar claros. Dado que la activación de la integrina αIIbβ3 es necesaria para la agregación plaquetaria, se investigó el papel potencial de 12-LOX en la mediación de la activación de αIIbβ3 en plaquetas estimuladas con FcγRIIIa, midiéndose la activación de αIIbβ3 mediante citometría de flujo en plaquetas estimuladas con FcγRIIIa tratadas con ML355. Rap1 es una pequeña GTPasa cuya activación es esencial para la activación de αIIbβ3. Por lo tanto, se midió la activación de Rap1 tras la estimulación de FcγRIIIa en plaquetas después del tratamiento con o sin ML355. Como se muestra en la Fig. 13B, mientras que la estimulación de las plaquetas en ausencia de pretratamiento (control) produjo un aumento significativo

de Rap1-GTP, las plaquetas tratadas con ML355 no consiguieron activar Rap1. Las plaquetas tratadas con DMSO no mostraron atenuación en la Rap1 activa en comparación con el control.

12-LOX regula la secreción de gránulos densos pero no de gránulos alfa en plaquetas activadas por FcγR1a

La liberación de gránulos alfa y densos de las plaquetas activadas sirve para amplificar la agregación plaquetaria. La expresión superficial de la P-selectina se utilizó como marcador sustitutivo para medir la secreción de gránulos alfa en las plaquetas estimuladas con FcγR1a. El tratamiento con ML355 no atenuó la expresión superficial de P-selectina inducida por el agonista en comparación con las condiciones de control (Fig. 14A). Sin embargo, las plaquetas estimuladas con FcγR1a tratadas con ML355 mostraron una disminución significativa en la liberación de ATP en comparación con las plaquetas tratadas con DMSO (Fig. 14B). Estos datos sugieren que la 12-LOX es un regulador de la secreción densa corriente abajo de la estimulación FcγR1a en las plaquetas.

12-LOX modula los componentes de señalización proximal de la vía FcγR1a en plaquetas humanas

Como se muestra en la Fig. 13, la actividad 12-LOX es requerida para la activación normal de componentes de señalización distal (Rap1, αIIbβ3, y agregación plaquetaria) de la vía FcγR1a. El entrecruzamiento de FcγR1a con inmunoglobulinas también inicia la activación de los componentes de señalización proximales que finalmente conducen a la agregación plaquetaria. FcγR1a inicia la fosforilación de ITAM que resulta en la activación de Syk. La activación de Syk conduce a la activación de la fosfolipasa gamma 2 (PLCγ2), lo que da lugar a la liberación de calcio y a la activación de la PKC, ambas críticas para la activación plaquetaria. Para determinar en qué punto de este complejo entorno de señalización la 12-LOX desempeña un papel esencial en la señalización de FcγR1a en la plaqueta, se evaluaron los componentes individuales de señalización directamente aguas abajo de la iniciación de FcγR1a en presencia o ausencia de ML355.

Para investigar si 12-LOX regulaba directamente la fosforilación de FcγR1a, se inmunoprecipitó FcγR1a de plaquetas estimuladas con IV.3+GAM tratadas con ML355 o DMSO y se realizó inmunotransferencia para fosforilación de FcγR1a. No se detectaron diferencias en la fosforilación de FcγR1a en las plaquetas estimuladas con FcγR1a en condiciones de control o tratadas con ML355 (Fig. 15A). Estos datos sugieren que la actividad 12-LOX no es necesaria para la fosforilación de la propia FcγR1a.

La fosforilación de FcγR1a resulta en el reclutamiento y activación de la tirosina quinasa Syk que es crucial para la formación del signalosoma LAT. La fosforilación de Syk se midió tras la estimulación con FcγR1a de las plaquetas en presencia o ausencia de ML355. El grado de fosforilación de Syk en respuesta a la reticulación de FcγR1a en presencia de ML355 varió en los sujetos analizados y puede deberse a la variabilidad interindividual. Por lo tanto, aunque la atenuación observada de la fosforilación de Syk en presencia de ML355 fue menor, el número de sujetos analizados fue demasiado pequeño para identificar definitivamente a Syk como un nodo de regulación por 12-LOX (Fig. 15B). Para evaluar si 12-LOX regula la activación de PLCγ2 aguas abajo de FcγR1a, se midió la fosforilación de PLCγ2 en plaquetas humanas lavadas en presencia o ausencia de ML355. Las plaquetas estimuladas mediante la reticulación con el anticuerpo FcγR1a se fosforilaron en los 15 segundos siguientes a la estimulación. Sin embargo, las plaquetas tratadas con ML355 mostraron una fosforilación atenuada de PLCγ2 a los 15 y 30 segundos en comparación con las condiciones de control (Fig. 16A).

Dado que 12-LOX atenuó la activación de PLCγ2 mediada por FcγR1a, se midieron sus efectos sobre la liberación de calcio intracelular. Se estimularon plaquetas humanas lavadas mediante la reticulación de anticuerpos mediada por FcγR1a en presencia de ML355 o de un vehículo de control y se midió la liberación de calcio. Las plaquetas tratadas con ML355 mostraron una disminución del Ca^{2+} intracelular tras la estimulación plaquetaria en comparación con las plaquetas tratadas con DMSO (Fig. 16B). Dado que la activación de PLCγ2 conduce a la activación de PKC en las plaquetas en parte a través de la movilización de calcio, también se evaluó la posible regulación de la actividad de PKC mediada por FcγR1a por 12-LOX. Se observó una disminución significativa de la activación de la PKC en las plaquetas tratadas con ML355 a los 30 y 60 segundos en comparación con las plaquetas tratadas con el control vehicular (Fig. 16C). Se determinó que esta regulación de la PKC era indirecta, ya que la activación de la PKC por PMA, un activador directo de la PKC, no mostró diferencias en su capacidad para activar la PKC ni en las plaquetas control ni en las tratadas con ML355.

Debate

Recientemente se ha demostrado que 12-LOX es un regulador importante de la activación plaquetaria mediada por GPVI. Como se supone que FcγR1a y GPVI señalan a través de una vía conservada, 12-LOX puede desempeñar un papel esencial en la regulación de la señalización de FcγR1a en las plaquetas humanas. Este estudio es el primero en demostrar que la 12-LOX es un componente esencial de la activación plaquetaria mediada inmunológicamente por FcγR1a. Las plaquetas humanas tratadas con un inhibidor de 12-LOX, ML355, o las plaquetas de ratón transgénico FcγR1a deficientes en 12-LOX, mostraron una agregación significativamente atenuada en respuesta a la activación mediada por FcγR1a. Para investigar el mecanismo subyacente por el que 12-LOX regula la activación plaquetaria mediada por FcγR1a, se evaluó la actividad de múltiples intermediarios de señalización en la vía de FcγR1a en presencia del inhibidor de 12-LOX ML355. Tras la estimulación, las plaquetas tratadas con ML355 se atenuaron

significativamente a lo largo de múltiples pasos de señalización en la vía de activación de FcγRIIa mediada inmunológicamente, incluyendo αIIbβ3, Rap1, Ca²⁺, PLCy2, PKC y secreción de gránulos densos (Fig. 17).

La función primaria conocida de la 12-LOX es producir oxilipinas (como el 12(S)-HETE) a partir del sustrato ácido graso AA, el ácido graso predominante en la plaqueta, tras la activación plaquetaria. Publicaciones anteriores han demostrado que los inhibidores selectivos de la 12-LOX reducen significativamente la producción de 12-HETE. Aunque el bloqueo de la producción de 12-HETE se ha asociado a una reducción de la reactividad mediada por plaquetas, el papel directo del 12-HETE en la activación plaquetaria sigue sin estar claro. Las oxilipinas generadas a partir de la COX-1, otra oxigenasa de las plaquetas, actúan generalmente como mediadores de señalización a través de GPCR en la superficie plaquetaria. En el caso del 12-HETE, los trabajos publicados han demostrado que señala a través del GPR31, un GPCR; sin embargo, aunque los recientes cribados genéticos han demostrado la expresión del GPR31 en las plaquetas humanas, no existen pruebas directas de la expresión de la proteína GPR31 en la superficie de las plaquetas. Además de la posible señalización autocrina o paracrina a través de GPR31, las oxilipinas 12-LOX producidas en la plaqueta pueden incorporarse de nuevo a la membrana para inducir sus efectos reguladores. Existe un precedente de integración de la oxilipina en la membrana, ya que se ha demostrado que el 12-HETE se esterifica en los fosfolípidos de la membrana plasmática tras la activación plaquetaria. Una tercera explicación potencial del mecanismo por el que 12-LOX regula la señalización mediada por FcγRIIa puede ser a través del andamiaje directo o indirecto de 12-LOX dentro de la célula. la formación del complejo 12-LOX como medio para regular la señalización descendente se ha implicado previamente en la regulación del crecimiento celular y la tumorigénesis. Aunque todos estos mecanismos reguladores son plausibles, la rápida velocidad con la que 12-LOX incide en la vía FcγRIIa deja a favor la posibilidad de que 12-LOX y no una oxilipina 12-LOX pueda actuar como un componente regulador directo de la vía FcγRIIa.

Aunque la actividad 12-LOX es necesaria para la activación plaquetaria normal mediada por FcγRIIa, aún no se ha determinado el componente molecular directo por el cual se requiere la actividad 12-LOX. la 12-LOX no fue necesaria para la fosforilación de FcγRIIa y sólo afectó parcialmente a la fosforilación de Syk, lo que sugiere que la actividad de la 12-LOX no regula directamente la actividad de la quinasa de la familia Src. Sin embargo, se demostró que la actividad 12-LOX era importante para la activación temprana de PLCy2, lo que indica que 12-LOX puede ser un regulador importante en la cinética de la activación de PLCy2 que afecta a los efectores aguas abajo. El retraso en la activación de PLCy2 debido a la inhibición de 12-LOX puede atribuirse a la regulación directa de PLCy2 o a la regulación de efectores ascendentes como LAT o BTK. Los datos presentados aquí reducen el alcance de donde 12-LOX incide en la vía FcγRIIa a un punto proximal en la vía de señalización entre el receptor y PLCy2.

Procedimientos

Ratones y preparación de plaquetas: Los ratones transgénicos FcγRIIa (hFcR/ALOX^{12+/+}) se cruzaron con ratones con eliminación de la 12-lipoxigenasa plaquetaria (ALOX^{12-/-}) para generar ratones transgénicos FcγRIIa deficientes en la 12-lipoxigenasa plaquetaria (hFcR/ALOX^{12-/-}). Todos los ratones se alojaron en las instalaciones para ratones de la Universidad Thomas Jefferson (TJU). Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la TJU. Se extrajo sangre de la vena cava inferior de ratones anestesiados de 12 semanas de edad con una jeringa que contenía citrato de sodio. La preparación de plaquetas de ratón se realizó como se describe en (Yeung et al., 2012). Las plaquetas murinas se resuspendieron en tampón Tirodes que contenía fibrinógeno (75 µg/mL) y CaCl₂ (1 mM).

Preparación de plaquetas humanas lavadas: Antes de la extracción de sangre se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los voluntarios. Las plaquetas lavadas se aislaron de la sangre de voluntarios sanos como se ha descrito previamente (14). Las plaquetas lavadas se resuspendieron en tampón Tirodes a 3,0×10⁸ plaquetas/mL, a menos que se indicara lo contrario. Todos los estudios realizados con plaquetas humanas fueron aprobados por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad Thomas Jefferson.

Activación plaquetaria mediada por FcγRIIa: La activación plaquetaria mediada por FcγRIIa se inició mediante dos modelos distintos: 1) reticulación con anticuerpos FcγRIIa o 2) estimulación con anticuerpos monoclonales CD9. Para reticular FcγRIIa, las plaquetas lavadas se incubaron con IV.3, un anticuerpo monoclonal de ratón FcγRIIa, durante un minuto, seguido de la adición de un anticuerpo IgG de cabra anti-ratón (GAM) para reticular FcγRIIa. La concentración de anticuerpos reticulantes FcγRIIa utilizada para cada experimento se indica en el texto. Alternativamente, se estimularon plaquetas humanas lavadas con un anticuerpo monoclonal anti-CD9 para activar la señalización mediada por FcγRIIa. Debido a la variabilidad interindividual en la respuesta anti-CD9, se utilizó un intervalo de concentración de anti-CD9 (0,25 - 1 µg/ml) para alcanzar una agregación de EC80. En los estudios realizados con el inhibidor de 12-LOX (ML355), las plaquetas lavadas se incubaron con ML355 (20 µM) o DMSO (vehículo de control) durante 15 minutos antes de la estimulación con FcγRIIa.

Agregación plaquetaria: La agregación plaquetaria se midió con un lumioagregómetro (Chronolog Corp, Modelo 700D) en condiciones de agitación a 37°C.

Fosforilación de PLCy2: Las plaquetas humanas lavadas se ajustaron a 5×10⁸ plaquetas/mL y se estimularon en un agregómetro mediante la reticulación de anticuerpos de FcγRIIa y se lisaron a tiempos designados con tampón reductor 5X para detener la reacción. Las muestras se separaron en un gel SDS-PAGE al 7,5 %. Se utilizaron

anticuerpos contra PLCy2 y fosfo-Y759 PLCy2, un marcador de la activación de PLCy2, para evaluar los niveles relativos de PLCy2 total y activa, respectivamente.

Movilización del calcio: La liberación intracelular de calcio se midió como se ha descrito previamente. En resumen, las plaquetas humanas lavadas se resuspendieron a $1,0 \times 10^6$ plaquetas/mL en tampón de tiroides que contenía 1 mM de calcio. Las plaquetas se incubaron con Fluo-4 am, un colorante sensible al calcio permeable a las células, durante diez minutos antes de la estimulación. Las plaquetas se estimularon mediante la reticulación con el anticuerpo FcyRIIa y la intensidad de fluorescencia se midió en tiempo real mediante citometría de flujo. Los datos se presentan como el cambio de pliegue en la intensidad de fluorescencia comparando la intensidad de fluorescencia máxima en relación con la intensidad de fluorescencia antes de la estimulación plaquetaria.

Activación de Rap1: Las plaquetas humanas lavadas se estimularon mediante la reticulación del anticuerpo FcyRIIa durante 5 minutos y se detuvo la agregación con tampón de lisis plaquetaria 2X. Se utilizó RalGDS-RBD para precipitar selectivamente la conformación activa de Rap1 a partir del lisado plaquetario, tal y como se ha descrito previamente. El lisado total de plaquetas y las muestras de Rap1 pull-down se corrieron en un gel SDS-PAGE y se identificaron por transferencia Western con un anticuerpo Rap1. Los niveles de Rap1 activo se normalizaron con respecto a la cantidad de Rap1 total contenida en cada muestra.

Ensayo de activación de PKC: Las plaquetas lavadas se estimularon mediante la reticulación del anticuerpo FcyRIIa en condiciones de agitación (1100 rpm) en un agregómetro a 37°C. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de tampón de muestra Laemmli 5X a los tiempos indicados. Como control positivo, las plaquetas se trataron con PMA (1 mM), un agonista directo de la PKC, durante un minuto. Las muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE y se realizaron transferencias Western utilizando anticuerpos específicos para la fosforilación del sustrato PKC y pleckstrin.

Secreción de gránulos densos: Se midió la liberación de ATP de las plaquetas lavadas como sustituto de la secreción de gránulos densos. Antes de la activación, las plaquetas lavadas se incubaron con el reactivo Chronolume, un colorante sensible al ATP, durante un minuto. Las plaquetas se estimularon con la reticulación del anticuerpo FcyRII en condiciones de agitación y la fluorescencia se midió en tiempo real utilizando un lumioagregómetro.

Liberación de gránulos alfa y activación de $\alpha IIb\beta 3$: Antes de la estimulación, las plaquetas lavadas se preincubaron con un anticuerpo de P-selectina conjugado con FITC o con PAC-1 conjugado con FITC, un anticuerpo específico para la conformación activa de $\alpha IIb\beta 3$. Las plaquetas se estimularon con la reticulación del anticuerpo FcyRIIa y las reacciones se detuvieron mediante la adición de formaldehído al 2 % a los tiempos indicados. La intensidad de la fluorescencia se midió mediante citometría de flujo. Los resultados se presentan como intensidad media de fluorescencia.

Transferencia Western: Se utilizaron transferencias Western estándar para la activación de Rap1, sustratos de PKC y fosforilación de PLCy2, y la intensidad de las bandas se cuantificó con el Odyssey Infrared Imaging System (LIC-OR Biosystems).

Análisis estadístico: En su caso, los datos representan la media \pm E.S.M. La significación estadística se determinó mediante el programa GraphPad Prism. Se consideró significativo un valor P inferior a 0,05.

Referencias

1. Aharony, D.; Smith, J. B.; Silver, M. J. Regulation of arachidonate-induced platelet aggregation by the lipoxygenase product, 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1982, 718, 193-200.

2. Amagata, T.; Whitman, S.; Johnson, T.; Stessmann, C. C.; Carroll, J.; Loo, C.; Clardy, J.; Lobkovsky, E.; Crews, P.; Holman, T. R. Sponge Derived Terpenoids with Selectivity towards Human 15-Lipoxygenase versus Human 12-Lipoxygenase. *J. Nat. Prod.* 2003, 66, 230-235.

3. Arai M, Yamamoto N, Moroi M, Akamatsu N, Fukutake K, and Tanoue K. Platelets with 10 % of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. *British journal of haematology.* 1995;89(1): 124-30.

4. Asselin J, Gibbins JM, Achison M, Lee YH, Morton LF, Farndale RW, Barnes MJ y Watson SP. A collagen-like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase C gamma2 in platelets independent of the integrin $\alpha 2\beta 1$. *Blood.* 1997;89(4):1235-42.

5. Berger, W.; De Chandt, M. T.; Cairns, C. B. Zileuton: IClinical Implications of 5-Lipoxygenase Inhibition in Severe Airway Disease. *Int. J. Clin. Pract.* 2007, 61, 663-676.

6. Bergmeier W, y Stefanini L. Señalización ITAM plaquetaria. *Current opinion in hematology.* 2013;20(5):445-50.

7. Bertoni A, Tadokoro S, Eto K, Pampori N, Parise LV, White GC y Shattil SJ. Relationships between Rap1b, affinity modulation of integrin α IIb β 3, and the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(28):25715-21.
- 5 8. Blake RA, Schieven GL y Watson SP. Collagen stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 2 but not phospholipase C-gamma 1 in human platelets. *FEBS letters*. 1994;353(2):212-6.
9. Bledzka K, Smyth SS y Plow EF. Integrin α IIb β 3: from discovery to efficacious therapeutic target. *Circulation research*. 2013;112(8):1189-200.
10. Bleich, D.; Chen, S.; Zipser, B.; Sun, D.; Funk, C. D.; Nadler, J. L. Resistance to type 1 diabetes induction in 12-lipoxygenase knockout mice. *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 1431-1436.
11. Brash, A. R. A review of possible roles of the platelet 12-lipoxygenase. *Circulation* 1985, 72, 702-707.
12. Brass LF, Manning DR y Shattil SJ. GTP-binding proteins and platelet activation. *Progress in hemostasis and thrombosis*. 1991;10(127-174)
13. Catalano, A.; Procopio, A. New aspects on the role of lipoxygenases in cancer progression. *Histol. Histopathol.* 2005, 20, 969-975.
- 15 14. Chang, J.; Blazek, E.; Kreft, A. F.; Lewis, A. J. Inhibition of platelet and neutrophil phospholipase A2 by hydroxyeicosatetraenoic acids (HETES). A novel pharmacological mechanism for regulating free fatty acid release. *Biochem. Pharmacol.* 1985, 34, 1571-1575.
15. Chen, M.; Yang, Z. D.; Smith, K. M.; Carter, J. D.; Nadler, J. L. Activation of 12-Lipoxygenase in proinflammatory cytokine-mediated β -cell toxicity. *Diabetologia* 2005, 48, 486-495.
- 20 16. Chen, X.-S.; Brash, A.; y Funk, C. Purification and characterization of recombinant histidine-tagged human platelet 12-lipoxygenase expressed in a baculovirus/insect cell system. *Eur. J. Biochem.* 1993, 214, 845-852.
17. Chrzanowska-Wodnicka M, Smyth SS, Schoenwaelder SM, Fischer TH, y White GC, 2nd. Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(3):680-7.
- 25 18. Cichewicz, R. H.; Kenyon, V. A.; Whitman, S.; Morales, N. M.; Arguello, J. F.; Holman, T. R.; Crews, P. Redox inactivation of human 15-lipoxygenase by marine-derived meroditerpenes and synthetic chromanes: archetypes for a unique class of selective and recyclable inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 14910-14920.
19. Coffey MJ, Jarvis GE, Gibbins JM, Coles B, Barrett NE, Wylie OR y O'Donnell VB. Platelet 12-lipoxygenase activation via glycoprotein VI: involvement of multiple signaling pathways in agonist control of H(P)ETE synthesis. *Circulation research*. 2004;94(12):1598-605.
- 30 20. Cyrus, T.; Witztum, J. L.; Rader, D. J.; Tangirala, R.; Fazio, S.; Linton, M. F.; Funk, C.D. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 1597-1604.
21. Deschamps, J. D.; Gautschi, J. T.; Whitman, S.; Johnson, T. A.; Gassner, N. C.; Crews, P.; Holman, T. R. Discovery of platelet-type 12-human lipoxygenase selective inhibitors by high-throughput screening of structurally diverse libraries, *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 6900-6908.
- 35 22. Deschamps, J. D.; Kenyon, V. A.; Holman, T. R. Baicalein is a potent in vitro inhibitor against both reticulocyte 15-human and platelet 12-human lipoxygenases. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 4295-4301.
23. Ettmayer, P.; Amidon, G. L.; Clement B.; Testa, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 2393-2404.
- 40 24. Fukami MH, and Salganicoff L. Human platelet storage organelles. A review. *Thrombosis and haemostasis*. 1977;38(4):963-70.
25. Fulp, A. B.; Johnson, M. S.; Markworth, J.; Marron, B. E.; Seconi, D. C.; West, C. W.; Wang, X.; Zhou, S. Sodium Channel Blockers. Patente estadounidense WO/2009/012242, 14 de julio de 2008.
26. Gan, Q.-F.; Browner, M. F.; Sloane, D. L.; Sigal, E. Defining the arachidonic acid binding site of human 15-lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 25412-25418
- 45 27. Ghosh, J. Inhibition of Arachidonate 5-Lipoxygenase Triggers Prostate Cancer Cell Death through Rapid Activation of C-Jun N-Terminal Kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 307, 342-349.
28. Ghosh, J., Myers, C. E. Inhibition of Arachidonate 5-Lipoxygenase Triggers Massive Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998, 95, 13182-13187.

29. Gibbins J, Asselin J, Farndale R, Barnes M, Law CL y Watson SP. Tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain in collagen-stimulated platelets. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(30): 18095-9.
30. Greinacher A, Althaus K, Krauel K y Selleng S. Trombocitopenia inducida por heparina. *Hamostaseologie*. 2010;30(1):17-8, 20-8.
- 5 31. Guo Y, Zhang W, Giroux C, Cai Y, Ekambaram P, Dilly AK, Hsu A, Zhou S, Maddipati KR, Liu J, et al. Identification of the orphan G protein-coupled receptor GPR31 as a receptor for 12-(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(39):33832-40.
- 10 32. Harats, D.; Shaish, A.; George, J.; Mulkins, M.; Kurihara, H.; Levkovitz, H.; Sigal, E. Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.* 2000, 20, 2100-2105.
33. Holmsen H, y Weiss HJ. Secretable storage pools in platelets. *Annual review of medicine*. 1979;30(119-34).
34. Honn, K.V.; Timár, J.; Rozhin, J.; Bazaz, R.; Sameni, M.; Ziegler, G.; Sloane, B. A lipoxygenase metabolite, 12-(S)-HETE, stimulates protein kinase C-mediated release of cathepsin B from malignant cells. *Exp. Cell. Res.* 1994, 214, 120-130.
- 15 35. Hoobler, E. K.; Holz, C.; Holman, T. R. Pseudoperoxidase investigations of hydroperoxides and inhibitors with human lipoxygenases. *Bioorg. Med. Chem.* 2013, 21, 3894-3899.
36. Ikei, K. N.; Yeung, J.; Apopa, P. L.; Ceja, J.; Vesci, J.; Holman, T. R., Holinstat, M. Investigations of human platelet-type 12-Lipoxygenase:role of lipoxygenase products in platelet activation. *J. Lipid Res.* 2012, 53, 2546-2559.
- 20 37. Inglese, J.; Auld, D. S.; Jadhav, A.; Johnson, R. L.; Simeonov, A.; Yasgar, A.; Zheng, W.; Austin, C. P. Quantitative High-Throughput Screening: A Titration-Based Approach That Efficiently Identifies Biological Activities in Large Chemical Libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 2006, 103, 11473-11478.
38. Israels SJ, McNicol A, Robertson C y Gerrard JM. Platelet storage pool deficiency: diagnosis in patients with prolonged bleeding times and normal platelet aggregation. *British journal of haematology*. 1990;75(1):118-21.
- 25 39. Jankun J, Aleem AM, Malgorzewicz S, Szkudlarek M, Zawodszky MI, Dewitt DL, Feig M, Selman SH, and Skrzypczak-Jankun E. Synthetic curcuminoids modulate the arachidonic acid metabolism of human platelet 12-lipoxygenase and reduce sprout formation of human endothelial cells. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(5):1371-82.
- 30 40. Kamitani, H.; Geller, M.; Eling, T. The possible involvement of 15-lipoxygenase/leukocyte type 12-lipoxygenase in colorectal carcinogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999, 469, 593-598.
41. Kandouz M, Nie D, Pidgeon GP, Krishnamoorthy S, Maddipati KR y Honn KV. Platelet-type 12-lipoxygenase activates NF-kappaB in prostate cancer cells. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2003;71(3-4): 189-204.
42. Kasirer-Friede A, Kahn ML y Shattil SJ. Platelet integrins and immunoreceptors. *Immunological reviews*. 2007;218(247-64).
- 35 43. Katoh A, Ikeda H, Murohara T, Haramaki N, Ito H, and Imaizumi T. Platelet-derived 12-hydroxyeicosatetraenoic acid plays an important role in mediating canine coronary thrombosis by regulating platelet glycoprotein IIb/IIIa activation. *Circulación*. 1998;98(25):2891-8.
44. Kenyon, V.; Chorny, I.; Carvajal, W. J.; Holman, T. R.; Jacobson, M. P. Novel human lipoxygenase inhibitors discovered using virtual screening with homology models. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 1356-1363.
- 40 45. Kenyon, V.; Rai, G.; Jadhav, A.; Schultz, L.; Armstrong, M.; Jameson, B. J.; Perry, S.; Joshi, N.; Bougie, J. M.; Leister, W.; Taylor-Fishwick D. A.; Nadler, J. L.; Holinstat, M.; Simeonov, A.; Maloney, D. J.; Holman, T. R. Discovery of Potent and Selective Inhibitors of Human Platelet-Type 12-Lipoxygenase. *J. Med. Chem.* 2011, 54, 5485-5497.
46. Lee, Y. K.; Parks, D. J.; Lu, T.; Thieu, T. V.; Markotan, T.; Pan, W.; McComsey, D. F.; Milkiewicz, K. L.; Crysler, C. S.; Ninan, N.; Abad, M. C.; Giardino, E. C.; Maryanoff, B. E.; Damiano, B. P.; Player, M. R. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 282-297.
- 45 47. Luci DK, Jameson JB, 2nd, Yasgar A, Diaz G, Joshi N, Kantz A, Markham K, Perry S, Kuhn N, Yeung J, et al. Synthesis and structure-activity relationship studies of 4-((2-hydroxy-3-methoxybenzyl)amino)benzenesulfonamide derivatives as potent and selective inhibitors of 12-lipoxygenase. *Journal of medicinal chemistry*. 2014;57(2):495-506.

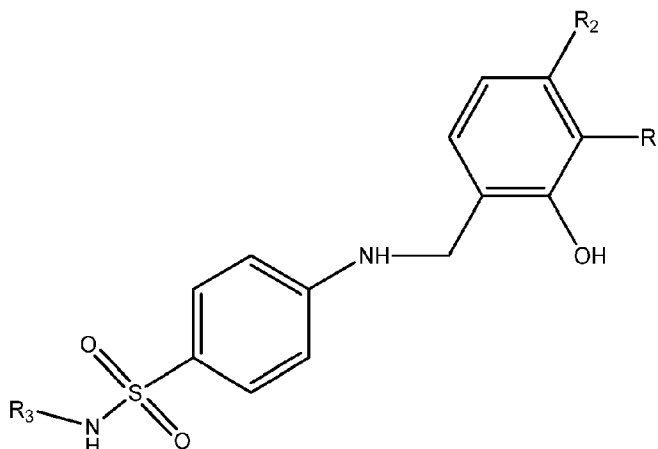
48. Ma, K.; Nunemaker, C. S.; Wu, R.; Chakrabarti, S. K.; Taylor-Fishwick, D. A.; Nadler, J. L. 12-Lipoxygenase Products Reduce Insulin Secretion and β -cell Viability in Human Islets. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010, 95, 887-893.
- 5 49. Madsen, P. et al. Optimization of Alkylidene Hydrazone Based Humna Glucagon Receptor Antagonists. Discovery of the Highly Potent and Orally Available 3-Cyano-4-hydroxybenzoic Acid [1-(2,3,5,6-Tetramethylbenzyl)-1H-indol-4-ylmethylene]hydrazide. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 5755-5775.
50. Malterud, K. E.; Rydland, K. M. Inhibitors of 15-lipoxygenase from orange peel. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 5576-5580. (c) Moreau, R. A.; Agnew, J.; Hicks, K. B.; Powell, M. J. Modulation of lipoxygenase activity by bacterial hopanoids *J. Nat. Prod.* 1997, 60, 397-398.
- 10 51. McDuffie, M.; Maybee, N. A.; Keller, S. R.; Stevens, B. K.; Garmey, J. C.; Morris, M. A.; Kropf, E.; Rival, C.; Ma, K.; Carter, J. D. Tersey, S. A.; Nunemaker, C. S.; Nadler, J. L. nunemaker, C. S.; Nadler, J. L. Nonobese diabetic (NOD) mice congenic for a targeted deletion of 12/15-Lipoxygenase are protected from autoimmune diabetes. *Diabetes* 2008, 57, 199-209.
- 15 52. McMahon GS, Jones CI, Hayes PD, Naylor AR y Goodall AH. Transient heparin-induced platelet activation linked to generation of platelet 12-lipoxygenase. Findings from a randomised controlled trial. *Thrombosis and haemostasis.* 2013;109(6):1099-107.
53. McNicol A, e Israels SJ. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis.*
- 20 *Thrombosis research.* 1999;95(1):1-18.
54. Morgan LT, Thomas CP, Kuhn H y O'Donnell VB. Thrombin-activated human platelets acutely generate oxidized docosahexaenoic-acid-containing phospholipids via 12-lipoxygenase. *Chem.* 2010;431(1): 141-8.
55. Moroi M, Jung SM, Okuma M, and Shinmyozu K. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *The Journal of clinical investigation.* 1989;84(5):1440-5.
- 25 56. Nakano, H., Inoue, T., Kawasaki, N., Miyataka, H., Matsumoto, H., Taguchi, T., Inagaki, N., Nagai, H., Satoh, T. Síntesis y actividades biológicas de nuevos agentes antialérgicos con acción inhibidora de la 5-lipoxigenasa. *Bioorg. Med. Chem.* 2000, 8, 373-280.
57. Nappez, C.; Liagre, B.; Beneytout, J. L. Changes in lipoxygenase activities in human erythroleukemia (HEL) cells during diosgenin-induced differentiation. *Cancer Lett.* 1995, 96, 133-140.
- 30 58. Natarajan, R.; Esworthy, R.; Bai, W.; Gu, J. L.; Wilczynski, S.; Nadler, J. L. Increase 12-lipoxygenase expression in breast cancer cells and tissues. Regulation by epidermal growth factor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997, 82, 1790-1798.
59. Nie D, Krishnamoorthy S, Jin R, Tang K, Chen Y, Qiao Y, Zacharek A, Guo Y, Milanini J, Pages G, et al. Mechanisms regulating tumor angiogenesis by 12-lipoxygenase in prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry.* 2006;281(27):18601-9.
- 35 60. Nie, D.; Hillman, G. G.; Geddes, T.; Tang, K.; Pierson, C.; Grignon, D. J.; Honn, K.V. Platelet-type 12-lipoxygenase in a human prostate carcinoma stimulates angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res.* 1998, 58, 4047-4051.
61. Nie, D.; Tang, K.; Diglio, C.; Honn, K. Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. *Sangre* 2000, 95, 2304-2311.
- 40 62. Nyby, M. D.; Sasaki, M.; Ideguchi, Y.; Wynne, H. E.; Hori, M. T.; Berger, M. E.; Golub, M. S.; Brickman, A. S.; Tuck, M. L. Platelet lipoxygenase inhibitors attenuate thrombin-and thromboxane mimetic-induced intracellular calcium mobilization and platelet aggregation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 278, 503-509.
63. Ohri, R. V.; Radosevich, A. T.; Hrovat, K. J.; Musich, C.; Huang, D.; Holman, T. R.; Toste, F. D. A Re(V)-catalyzed C-N bond-forming route to human lipoxygenase inhibitors, *Org. lett.* 2005, 7, 2501-2504.
- 45 64. Phillips DR, y Agin PP. Platelet membrane defects in Glanzmann's thrombasthenia. Evidence for decreased amounts of two major glycoproteins. *The Journal of clinical investigation.* 1977;60(3):535-45.
65. Pratico, D.; Zhukareva, V.; Yao, Y.; Uryu, K.; Funk, C. D.; Lawson, J. A.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. 12/15-Lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease: possible involvement in brain oxidative stress. *Am. J. Pathol.* 2004, 164, 1655-1662.
- 50

66. Radmark, O., Samuelsson, B. 5-Lipoxygenase: Regulation and Possible Involvement in Atherosclerosis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007, 83, 162-174.
67. Reilly MP, Sinha U, Andre P, Taylor SM, Pak Y, Deguzman FR, Nanda N, Pandey A, Stolla M, Bergmeier W, et al. PRT-060318, a novel Syk inhibitor, prevents heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis in a transgenic mouse model. *Blood.* 2011;117(7):2241-6.
68. Robinson, S. J.; Hoobler, E. K.; Riener, M.; Loveridge, S. T.; Tenney, K.; Valeriote, F. A.; Holman, T. R.; Crews, P. Using enzyme assays to evaluate the structure and bioactivity of sponge-derived meroterpenes. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 1857-1863.
69. Rosenfeld SI, Looney RJ, Leddy JP, Phipps DC, Abraham GN y Anderson CL. Human platelet Fc receptor for immunoglobulin G. Identification as a 40,000-molecular-weight membrane protein shared by monocytes. *The Journal of clinical investigation.* 1985;76(6):2317-22.
70. Sailer, E. R.; Schweizer, S.; Boden, S. E.; Ammon, H. P. T.; Safayhi, H. Characterization of an acetyl-11-keto-B-boswellic acid and arachidonate-binding regulatory site of 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling. *Eur. J. Biochem.* 1998, 256, 364-368.
71. Segraves, E. N.; Shah, R. R.; Segraves, N. L.; Johnson, T. A.; Whitman, S.; Sui, J. K.; Kenyon, V. A.; Cichewicz, R. H.; Crews, P.; Holman, T. R. Probing the activity differences of simple and complex brominated aryl compounds against 15-soybean, 15-human, and 12-human lipoxygenase. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 4060-4065.
72. Serhan, C. N.; Petasis, N. A. Resolvins and Protectins in Inflammation Resolution. *Chem. Rev.* 2011, 111, 5922-5943.
73. Solomon, E. I.; Zhou, J.; Neese, F.; Pavel, E. G. New insights from spectroscopy into the structure/function relationships of lipoxygenases. *Chem. Biol.* 1997, 4, 795-808. (b) Brash, A. R. Lipoxigenasas: Aparición, funciones, catálisis y adquisición de sustrato. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 23679-23682.
74. Soriano, A. F.; Helfrich, B.; Chan, D. C.; Heasley, L. E.; Bunn, P. A.; Chou, T. C. Synergistic effects of new chemopreventive agents and conventional cytotoxic agents against human lung cancer cell lines *Cancer Res.* 1999, 59, 6178-6184.
75. Strehl A, Munnix IC, Kuijpers MJ, van der Meijden PE, Cosemans JM, Feijge MA, Nieswandt B y Heemskerk JW. Dual role of platelet protein kinase C in thrombus formation: stimulation of pro-aggregatory and suppression of procoagulant activity in platelets. *The Journal of biological chemistry.* 2007;282(10):7046-55.
76. Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kanaji K, and Uchino H. A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood.* 1987;69(6):1712-20.
77. Suzuki-Inoue K, Fuller GL, Garcia A, Eble JA, Pohlmann S, Inoue O, Gartner TK, Hughan SC, Pearce AC, Laing GD, et al. A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood.* 2006;107(2):542-9.
78. Suzuki-Inoue K, Inoue O y Ozaki Y. Novel platelet activation receptor CLEC-2: from discovery to prospects. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2011;9 Suppl 1(44-55)
79. Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nature reviews Immunology.* 2002;2(8):580-92.
80. Thomas CP, Morgan LT, Maskrey BH, Murphy RC, Kuhn H, Hazen SL, Goodall AH, Hamali HA, Collins PW y O'Donnell VB. Phospholipid-esterified eicosanoids are generated in agonist-activated human platelets and enhance tissue factor-dependent thrombin generation. *The Journal of biological chemistry.* 2010;285(10):6891-903.
81. Thomas, C. P.; Morgan, L. T.; Maskrey, B. H.; Murphy, R. C.; Kuhn, H.; Hazen, S. L.; Goodall, A. H.; Hamali, H. A.; Collins, P. W.; O'Donnell, V. D. Phospholipid-esterified eicosanoids are generated in agonist-activated human platelets and enhance tissue factor-dependant thrombin generation. *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 6891-6903.
82. Timár, J.; Silletti, S.; Bazaz, R.; Raz, A.; Honn, K.V. Regulation of melanoma-cell motility by the lipoxygenase metabolite 12-(S)-HETE. *Int. J. Cancer,* 1993, 55, 1003-1010.
83. Tsuji M, Ezumi Y, Arai M, y Takayama H. A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *The Journal of biological chemistry.* 1997;272(38):23528-31.
84. van Leyen, K.; Arai, K.; Jin, G.; Kenyon, V.; Gerstner, B.; Rosenberg, P. A.; Holman, T. R.; Lo, E. H. Novel lipoxygenase inhibitors as neuroprotective reagents.. *J. Neurosci. Res.* 2008, 86, 904-909.

85. van Leyen, K.; Kim, H. Y.; Lee, S. R.; Jin, G.; Arai, K.; Lo, E. H. Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke*. 2006, 37, 3014-3018.
86. Vasquez-Martinez, Y.; Ohri, R. V.; Kenyon, V.; Holman, T. R.; Sepulveda-Boza, S. Structure-activity relationship studies of flavonoids as potent inhibitors of human platelet 12-hLO, reticulocyte 15-hLO-1, and prostate epithelial 15-hLO-2. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 7408-7425.
87. Wang, X.; Guram, A.; Ronk, M.; Milne, J. E.; Tedrow, J. S.; Faul, M. M. Copper-catalyzed N-arylation of sulfonamides with aryl bromides. *Tetrahedron Lett.* 2012, 53, 7-10.
88. Watanabe N, Bodin L, Pandey M, Krause M, Coughlin S, Boussiotis VA, Ginsberg MH y Shattil SJ. Mechanisms and consequences of agonist-induced talin recruitment to platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. *The Journal of cell biology*. 2008;181(7):1211-22.
89. Whitman, S.; Gezginci, M.; Timmermann, B. N.; Holman, T. R. Structure-activity relationship studies of nordihydroguaiaretic acid inhibitors toward soybean, 12-human, and 15-human lipoxygenase. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 2659-2661.
90. Yacoub D, Theoret JF, Villeneuve L, Abou-Saleh H, Mourad W, Allen BG y Merhi Y. Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activation, and thromboxane A2 release. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(40):30024-35.
91. Yamamoto, S. Mammalian lipoxygenases: Molecular Structures and functions. *Biochim. Biophys. Acta*. 1992, 1128, 117-131. (b) Funk, C.D.; Keeney, D.S.; Oliw, E. H.; Vogel, S.; Muller-Decker, K.; Mincheva, A.; Lichter, P.; Marks, F.; Krieg, P. Murine epidermal lipoxygenase (Aloxe) encodes a 12-lipoxygenase isoform.. *FEBS Lett.* 1997, 402, 162-166.
92. Yanaga F, Poole A, Asselin J, Blake R, Schieven GL, Clark EA, Law CL y Watson SP. Syk interacts with tyrosine-phosphorylated proteins in human platelets activated by collagen and cross-linking of the Fc gamma-IIA receptor.. *Chem.* 1995;311 (Pt 2):471-8.
93. Yeung J, Apopa PL, Vesci J, Stolla M, Rai G, Simeonov A, Jadhav A, Fernandez-Perez P, Maloney DJ, Boutaud O, et al. 12-lipoxygenase activity plays an important role in PAR4 and GPVI-mediated platelet reactivity.. *Thrombosis and haemostasis*. 2013;110(3):569-81.
94. Yeung, J.; Apopa, P. L.; Vesci, J.; Kenyon, V.; Rai, G.; Jadhav, A.; Simeonov, A.; Holman, T. R.; Maloney, D. J.; Boutaud, O.; Holinstat. Protein Kinase C Regulation of 12-Lipoxygenase-Mediated Human Platelet Activation. *Mol. Pharmacol.* 2012, 81, 420-430.
95. Zhi H, Rauova L, Hayes V, Gao C, Boylan B, Newman DK, McKenzie SE, Cooley BC, Poncz M y Newman PJ. Cooperative integrin/ITAM signaling in platelets enhances thrombus formation in vitro and in vivo. *Blood*. 2013;121(10):1858-67.

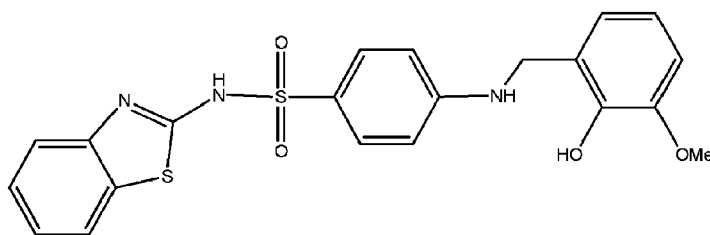
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



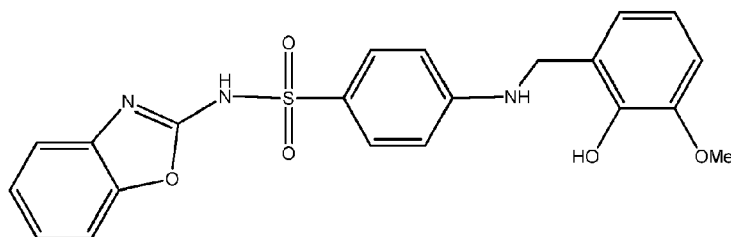
en el que R₁ es metoxi y R² es H; y

- 5 R³ se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-bencimidazol, 4-metil-2-benzotiazol, 2-tiofeno, 4-metil-2-tiazol, 5-metil-2-tiazol, 5-fenil-2-tiazol, 4,5-dimetil-2-tiazol, fenilo, 1-naftaleno, 2-naftaleno, 1,4-bi-fenilo, 3-piperazin-fenilo, 4-piperazin-fenilo, 4-piperidin-fenilo, 4-piperazin-3-piridina, 3-quinolina, 8-isoquinolina, 2-piridina, 3-piridina, 3-tercbutil-fenilo, 6-metoxi-2-benzotiazol, 6-fluoro-2-benzotiazol, 4-fenil-2-tiazol, 3-morfolina-fenil, 4N-boc-piperidin-3-fenil, 3-piperidin-fenil, 3-isopropil-fenil, 3-metoxi-fenil, 5-metil-3-isoxazol, 2-pirimidina y 1,3-bi-fenil;
- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo o diastereómeros del mismo.
- 15 2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₃ se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-bencimidazol, 4-metil-2-benzotiazol, 3-quinolina, 8-isoquinolina, fenilo y 3-isopropil-fenilo.
- 20 3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₃ se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-bencimidazol, 4-metil-2-benzotiazol, 2-tiofeno, fenilo, 1-naftaleno, 2-naftaleno, 3-quinolina, 8-isoquinolina, 3-terc-butil-fenilo, 6-metoxi-2-benzotiazol, 6-fluoro-2-benzotiazol, 4-fenil-2-tiazol, 4N-boc-piperidin-3-fenilo y 3-isopropil-fenilo.
- 25 4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₃ se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-bencimidazol, 4-metil-2-benzotiazol, 2-tiofeno, fenilo, 1-naftaleno, 2-naftaleno, 3-quinolina, 8-isoquinolina, 3-tercbutil-fenilo, 4N-boc-piperidin-3-fenilo y 3-isopropil-fenilo.
- 30 5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₃ se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-benzimidazol y 3-isopropil-fenil.
6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₃ se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-benzimidazol, 4-metil-2-benzotiazol, 2-tiofeno, fenilo, 6-metoxi-2-benzotiazol, 6-fluoro-2-benzotiazol y 4-fenil-2-tiazol.
7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₃ se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-bencimidazol, 4-metil-2-benzotiazol, 2-tiofeno y fenilo.
8. Un compuesto de la reivindicación 1, en el que R₃ se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-bencimidazol, 4-metil-2-benzotiazol, 2-tiofeno, fenilo, 1-naftaleno, 2-naftaleno, 3-quinolina, 8-isoquinolina, 2-piridina y 3-piridina.
9. Un compuesto de la reivindicación 1 que es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo o diastereómeros del mismo.

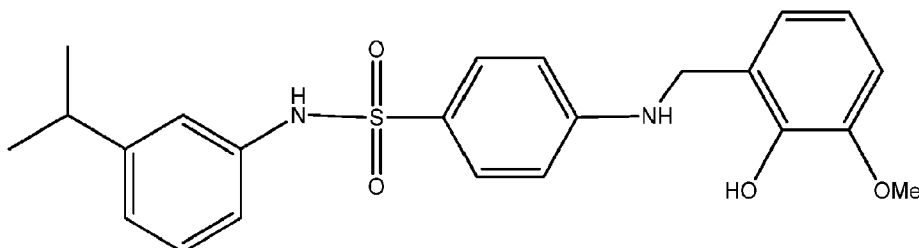
10. Un compuesto de la reivindicación 1 que es



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo o diastereómeros del mismo.

11. Un compuesto de la reivindicación 1 que es



10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo o diastereómeros del mismo.

12. Un compuesto de la reivindicación 1, sal del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo, o diastereómeros del mismo, para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno mediado por 12-lipoxigenasa, en el que el compuesto, sal del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo, o diastereómeros del mismo se administran a un mamífero en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz, en el que la enfermedad o trastorno mediado por la 12-lipoxigenasa se selecciona del grupo que consiste en diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, enfermedades cardiovasculares, esteatohepatitis no alcohólica, hemostasia plaquetaria, enfermedades cutáneas, trombocitopenia inducida por heparina, agregación plaquetaria inducida por PAR4-AP, trombosis, síndrome antifosfolípido; síndrome de sepsis; trombocitopenia asociada al receptor de la región Fc de la inmunoglobulina gamma (FcγRIIIa); y cáncer.

13. El compuesto para uso de la reivindicación 12, en el que R_3 se selecciona del grupo que consiste en 2-benzotiazol, 2-benzoxazol, 2-bencimidazol, 4-metil-2-benzotiazol, 2-tiofeno, fenilo, 1-naftaleno, 2-naftaleno, 3-quinolina, 8-isoquinolina, 3-terc-butil-fenilo, 6-metoxi-2-benzotiazol, 6-fluoro-2-benzotiazol, 4-fenil-2-tiazol, 4N-boc-piperidin-3-fenilo y 3-isopropil-fenilo.

14. El compuesto para uso de la reivindicación 12, en el que la 12-lipoxigenasa es 12-lipoxigenasa humana.

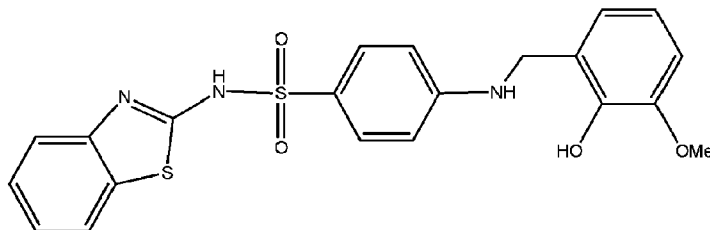
15. El compuesto para uso de la reivindicación 12, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de mama y cáncer de pulmón.

16. El compuesto para uso de la reivindicación 12, en el que la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en infarto de miocardio y accidente cerebrovascular.

17. El compuesto para uso de la reivindicación 12, en el que la enfermedad o trastorno mediado por 12-lipoxigenasa se selecciona del grupo que consiste en diabetes tipo 1 y tipo 2.

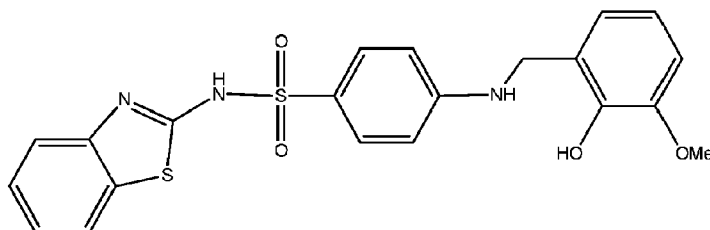
18. El compuesto para uso de la reivindicación 12, en el que la enfermedad o trastorno mediado por la 12-lipoxigenasa es la trombosis.

19. El compuesto para uso de la reivindicación 12, en el que el compuesto es



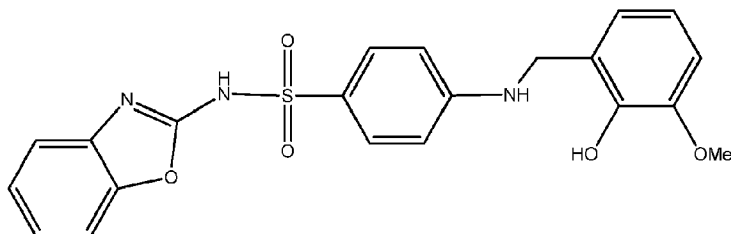
5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo o diastereómeros del mismo.

20. El compuesto para uso de la reivindicación 12, en el que el compuesto es



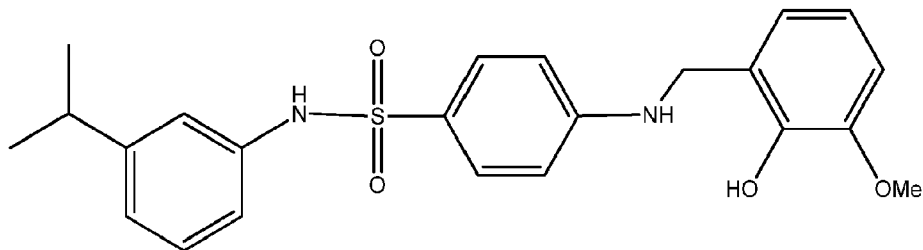
10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo o diastereómeros del mismo; o

en el que el compuesto es



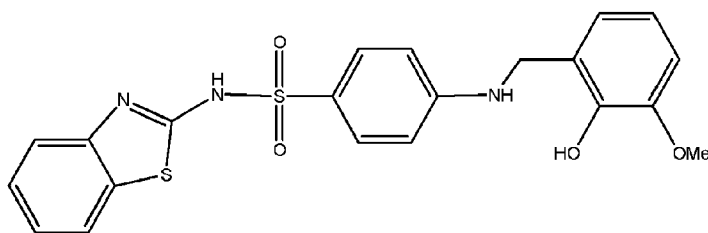
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo o diastereómeros del mismo; o

15 en el que el compuesto es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo o diastereómeros del mismo.

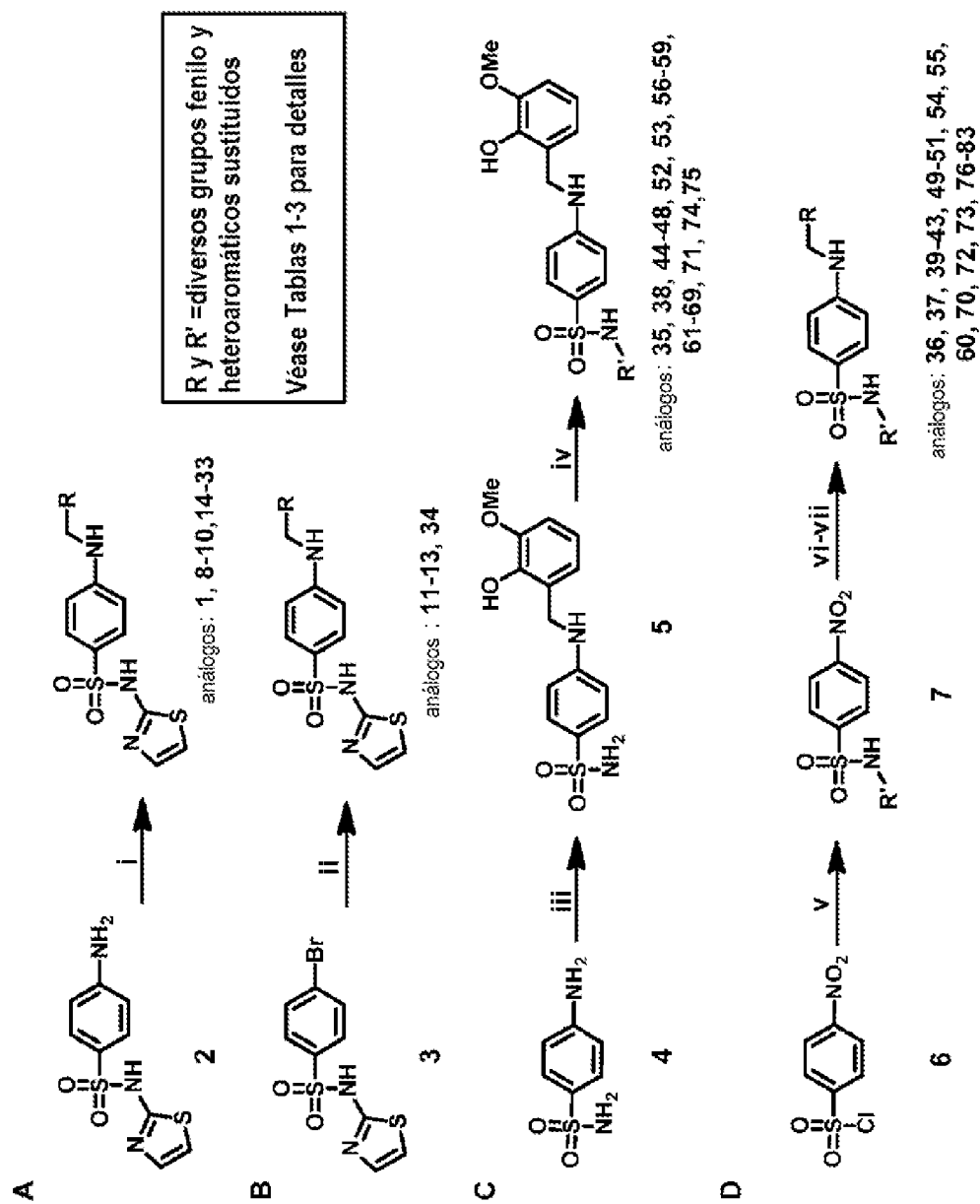
21. Un compuesto de la reivindicación 1 que es



para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, hemostasia plaquetaria, trombocitopenia inducida por heparina y trombosis.

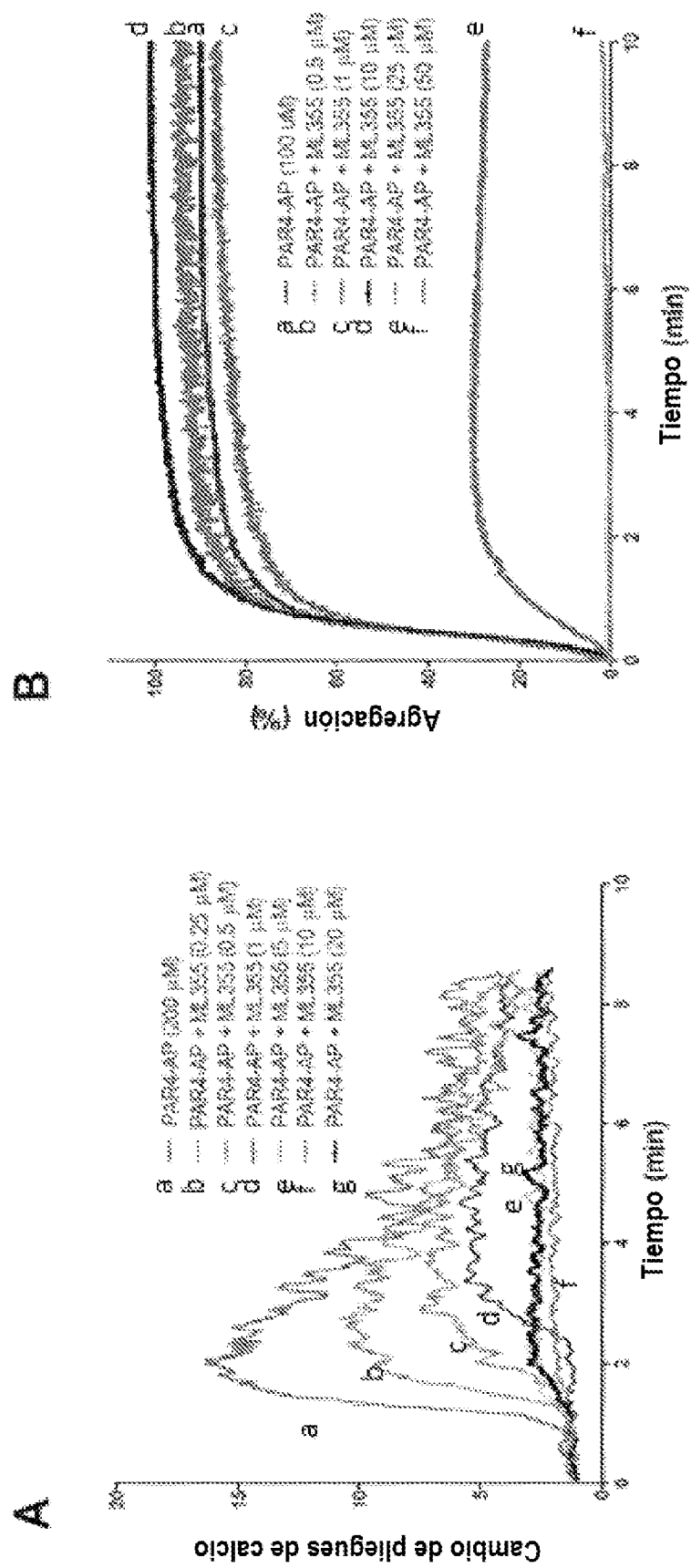
- 5 22. El compuesto para uso de la reivindicación 21, en el que el trastorno es diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y trombocitopenia inducida por heparina.
23. El compuesto para uso de la reivindicación 22, en el que el trastorno es trombocitopenia inducida por heparina.
24. Un compuesto de la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en
- 10 N (benzo[d]tiazol-2-il)-4-[(2-hidroxi-3-metoxibencil)amino]bencenosulfonamida;
 N (benzo[d]oxazol-2-il)-4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)bencenosulfonamida;
 N-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)-4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)bencenosulfonamida;
 4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-N-(tiofen-2-il)bencenosulfonamida;
 4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(5-feniltiazol-2-il)bencenosulfonamida;
 4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(3-metoxifenil)bencenosulfonamida;
- 15 4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-N-(isoquinolin-8-il)bencenosulfonamida;
 4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-N-fenilbencenosulfonamida;
 4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(naftalen-1-il)bencenosulfonamida;
 4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(naftalen-2-il)bencenosulfonamida;
 N-([1,1'-bifenil]-4-il)-4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)bencenosulfonamida;
- 20 N-([1,1'-bifenil]-3-il)-4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)bencenosulfonamida;
 N (3-(terc-butil)fenil)-4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)bencenosulfonamida,
 4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(6-metoxibenzo[d]tiazol-2-il)bencenosulfonamida,
 4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(4-feniltiazol-2-il)bencenosulfonamida,
 terc-butil4-(3-(4-((2-hidroxi-3-metoxibencil) amino) fenilsulfonamido) fenil)piperidin-1 -carboxilato;
- 25 4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(3-isopropilfenil)bencenosulfonamida;
 N-(6-fluorobenzo[d]tiazol-2-il)-4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino) bencenosulfonamida;
 4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(3-(piperazin-1-il)fenil)bencenosulfonamida;
 4-(2-hidroxi-3-metoxibencilamino)-N-(4-(piperazin-1-il)fenil)bencenosulfonamida; y
 4-((2-hidroxi-3-metoxibencil)amino)-N-(4-(piperidin-4-il)fenil)bencenosulfonamida,
- 30 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, enantiómeros del mismo, una mezcla de enantiómeros del mismo o diastereómeros del mismo.
25. Una composición que comprende cualquiera de los compuestos de la reivindicación 24.

Esquema 1. Síntesis de análogos 1-83.

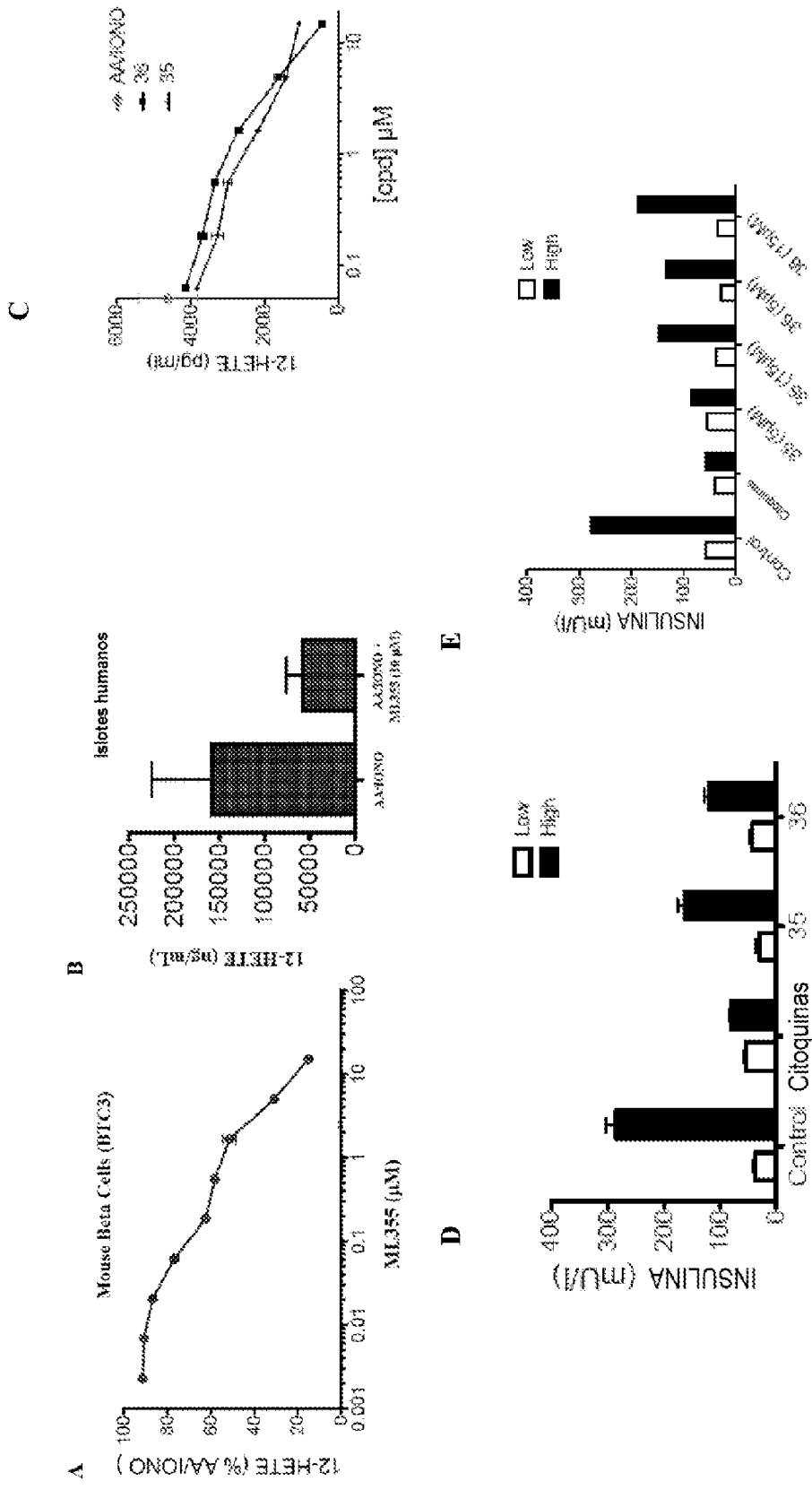


R y R' = diversos grupos fenilo y heteroaromáticos sustituidos
Véase Tablas 1-3 para detalles

Figuras 1A – 1D



Figuras 2A – 2B



Figuras 3A – 3E

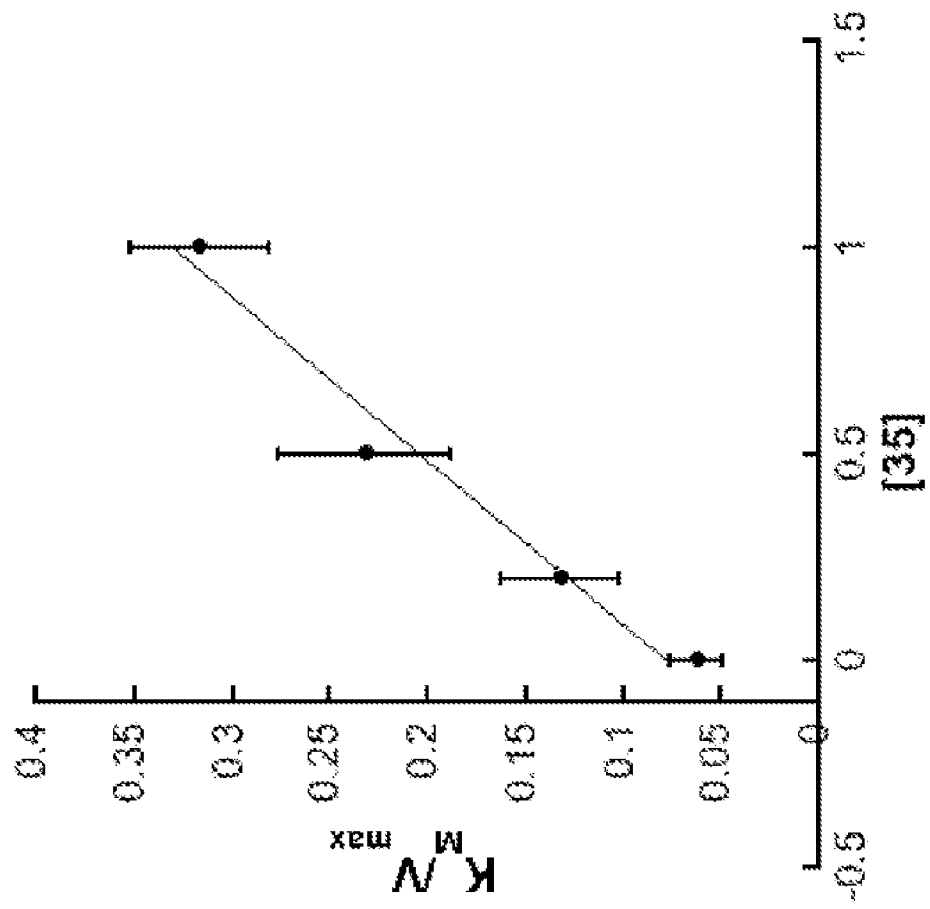


Figura 4

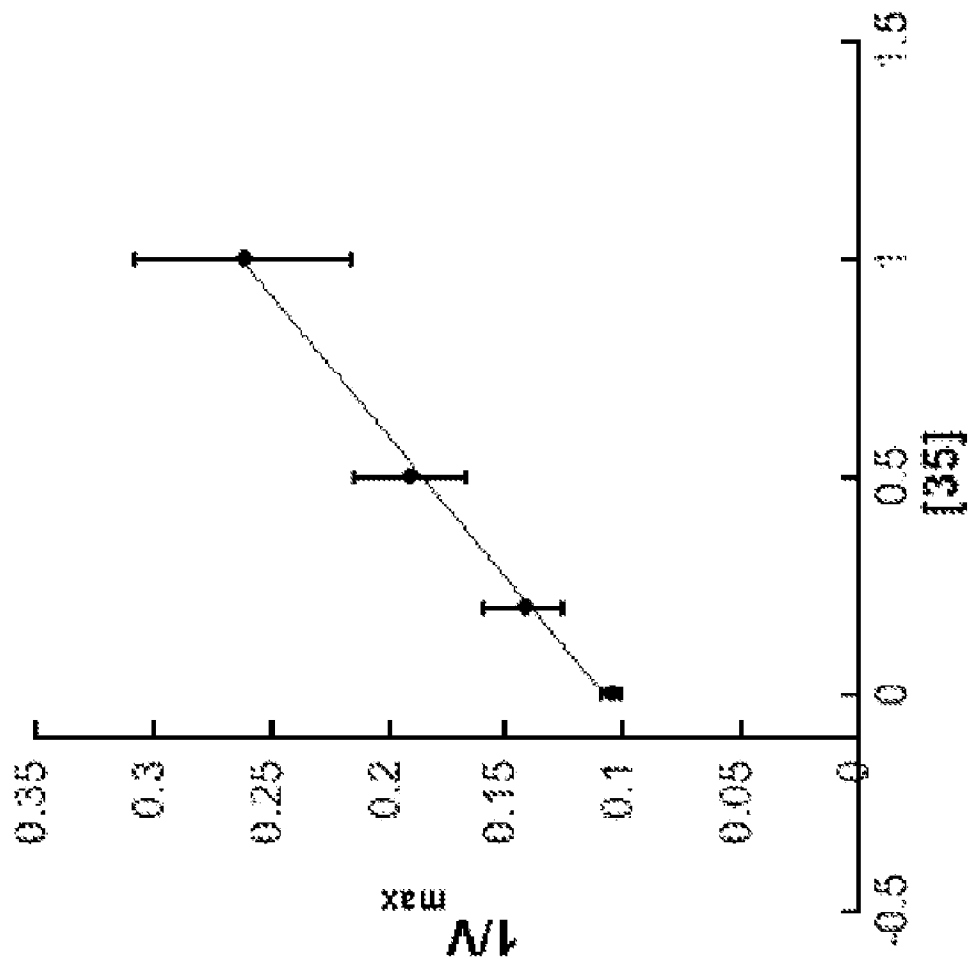


Figure 5

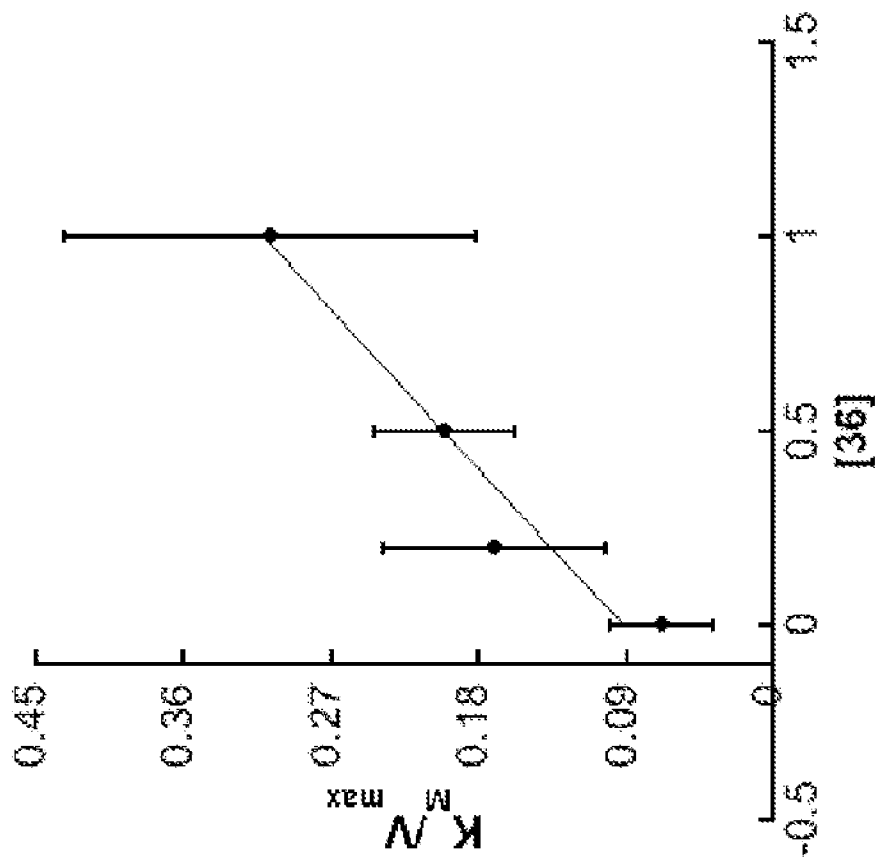


Figura 6

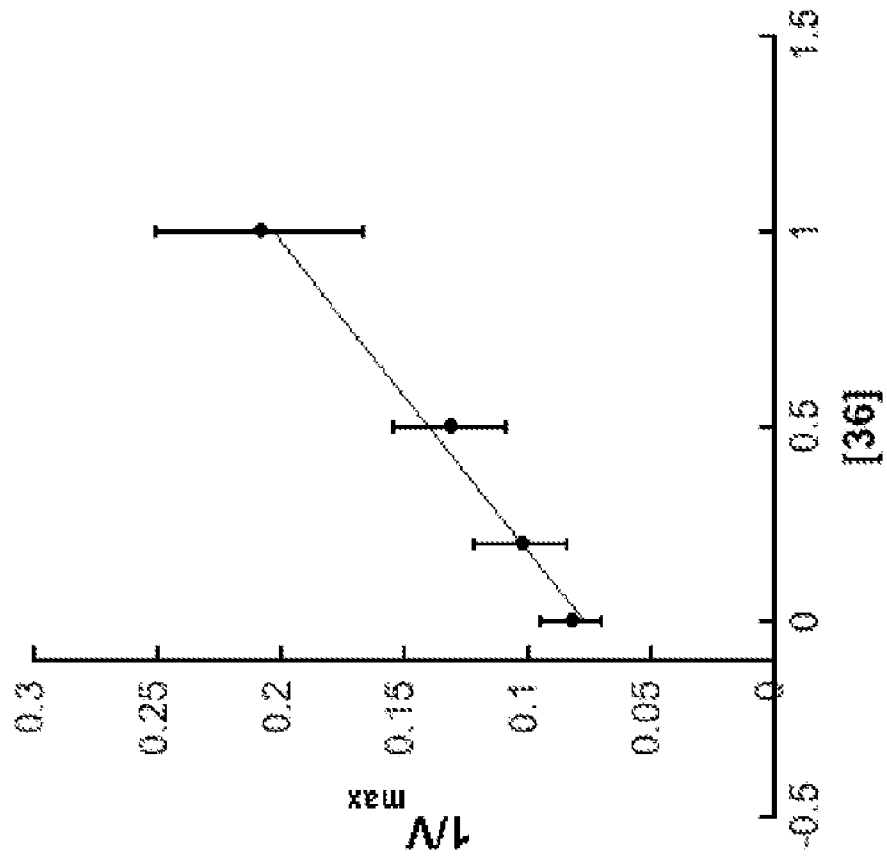


Figura 7

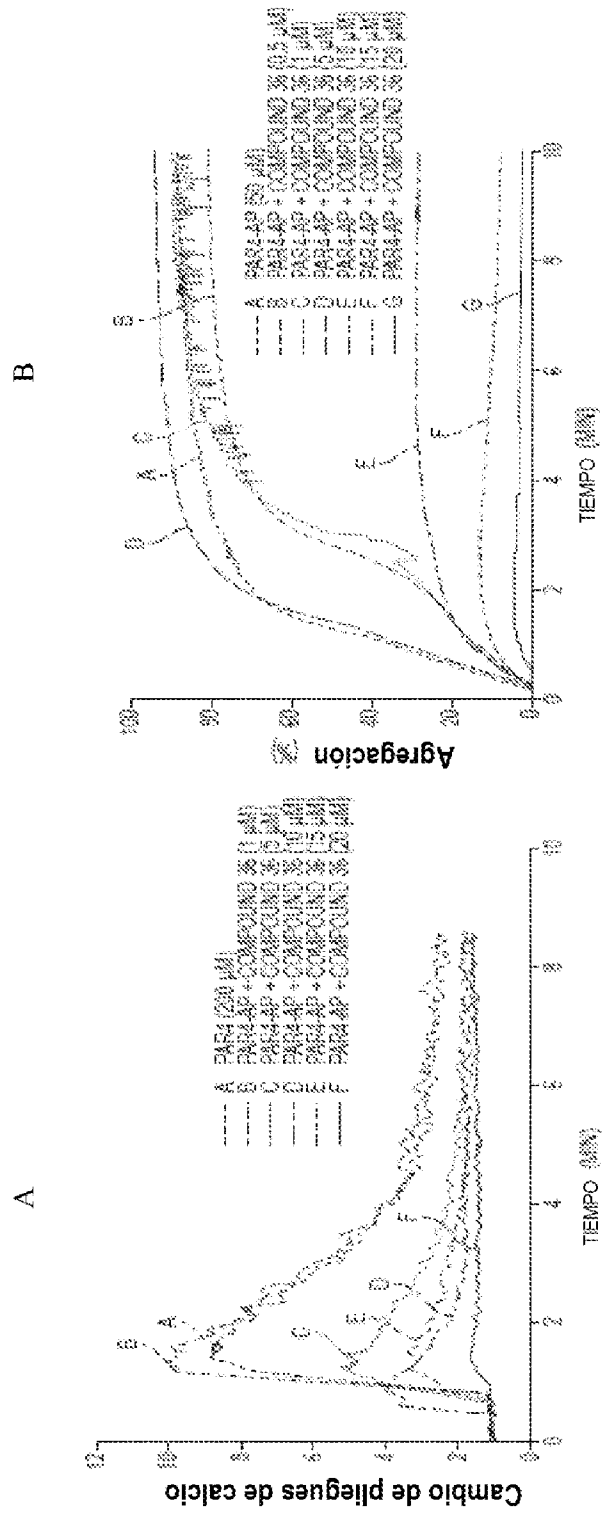


Figura 8

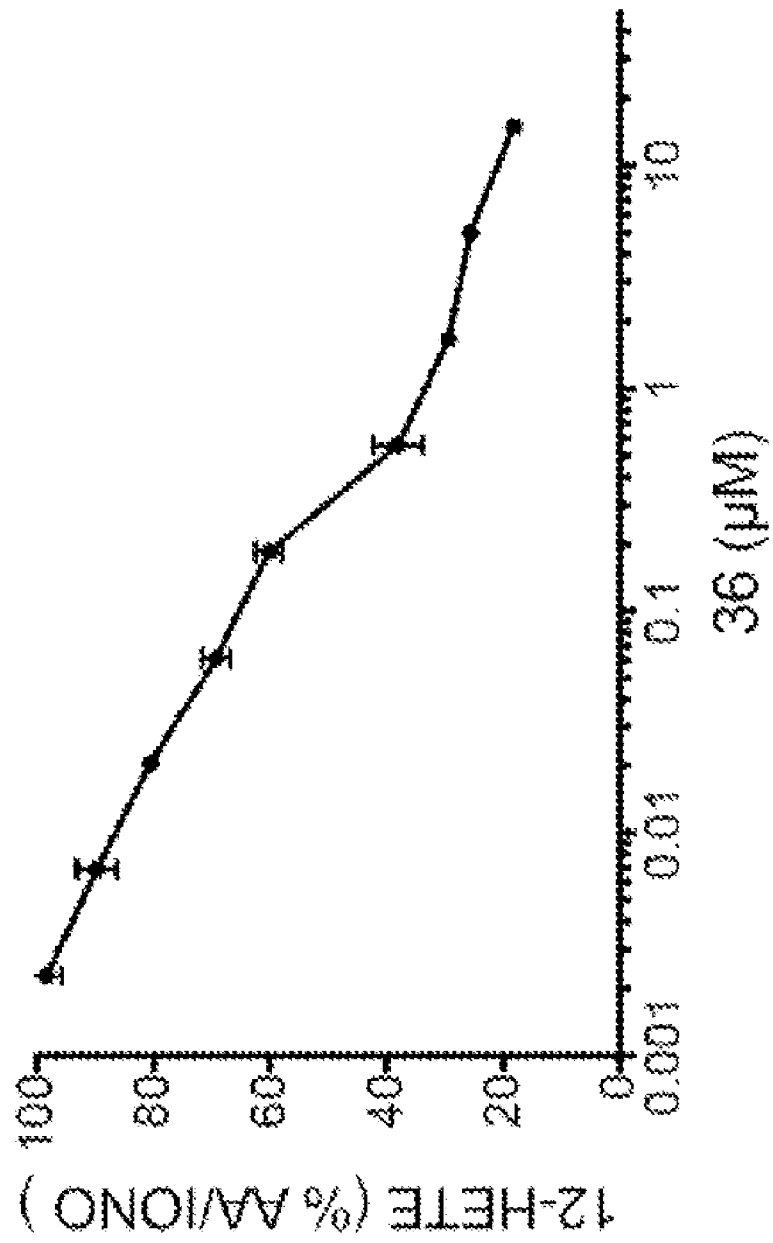
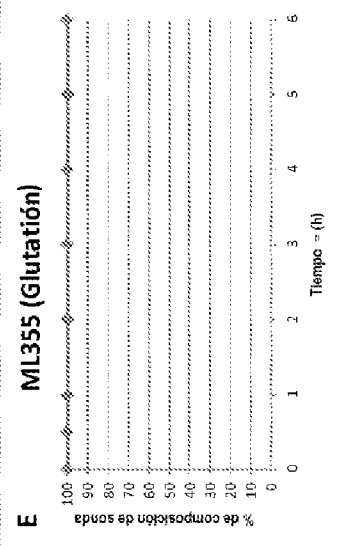
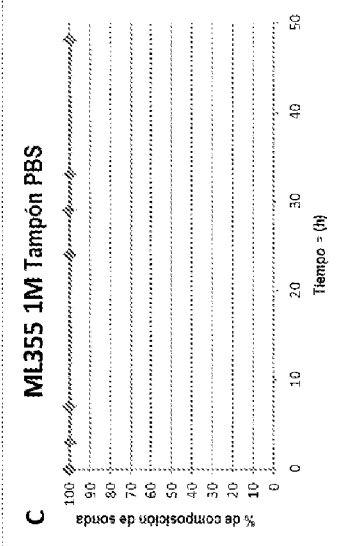
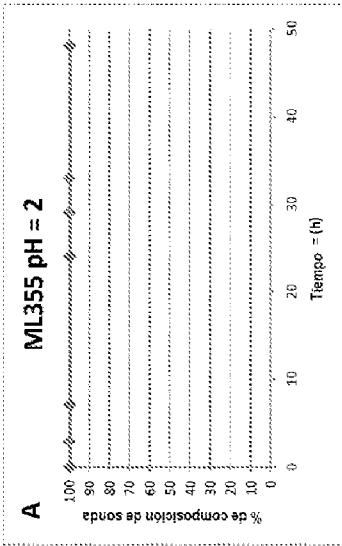
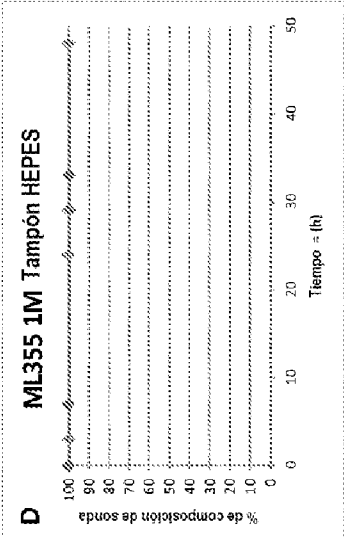
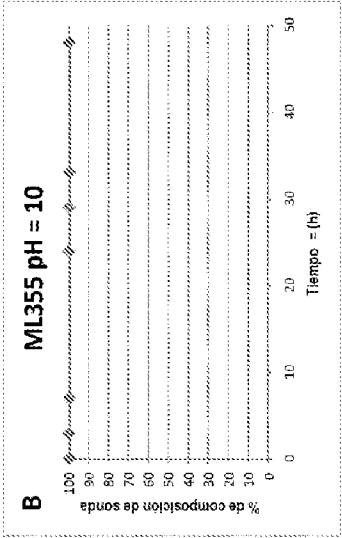
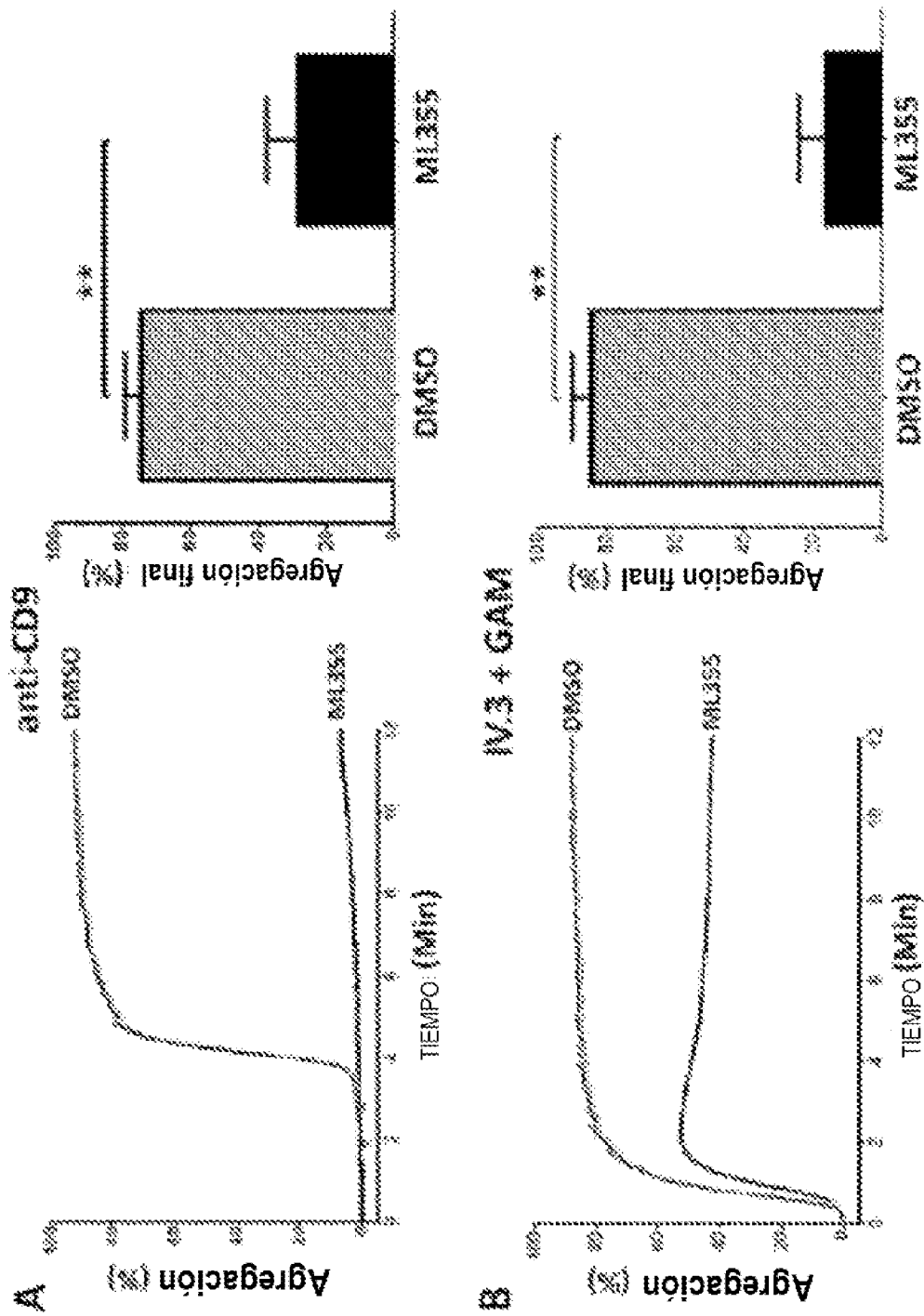
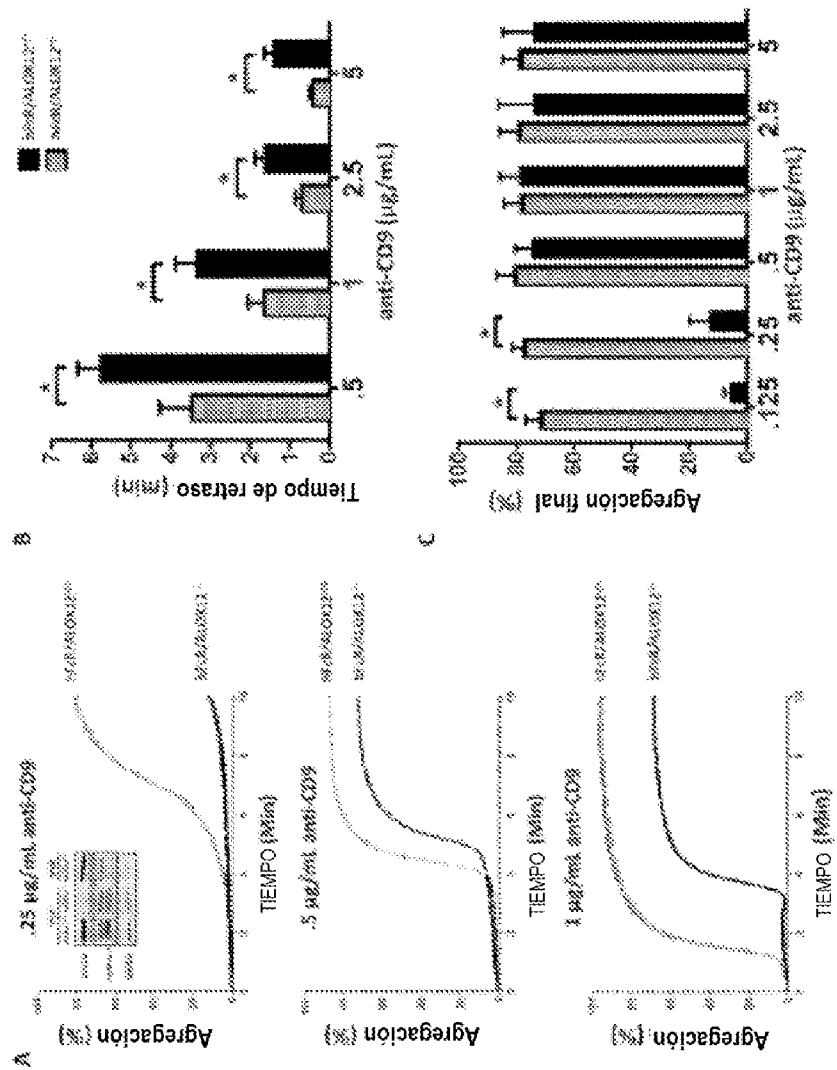


Figura 9

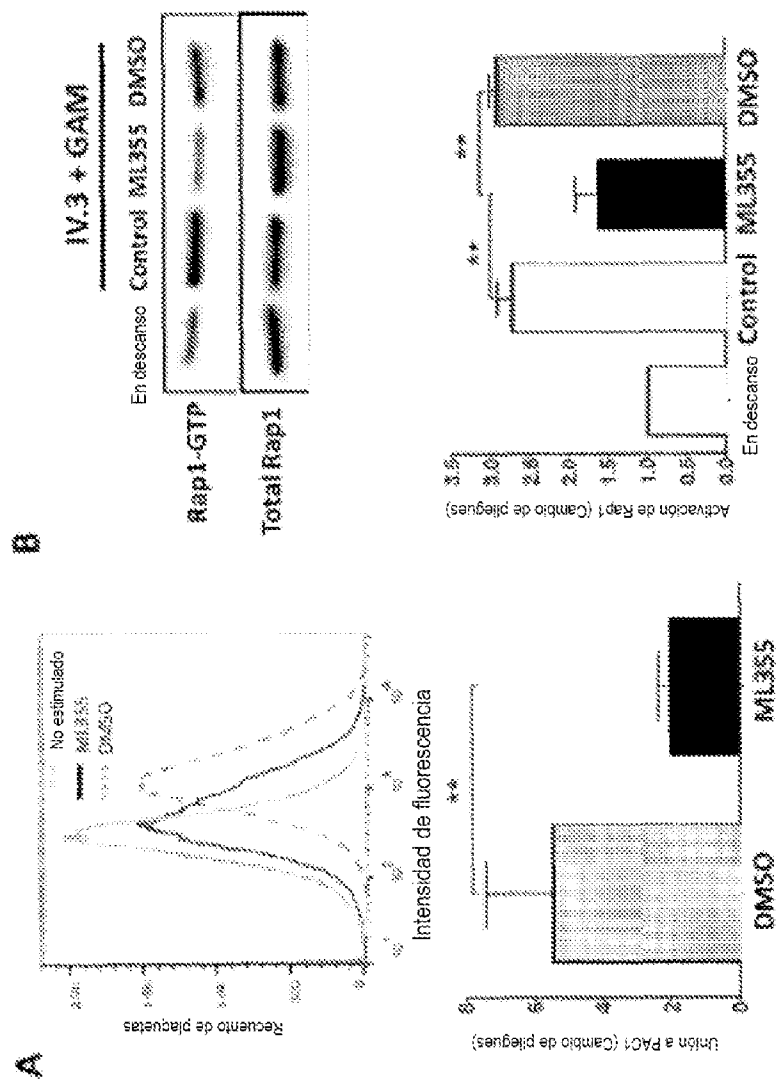
Figuras 10A ~ 10E



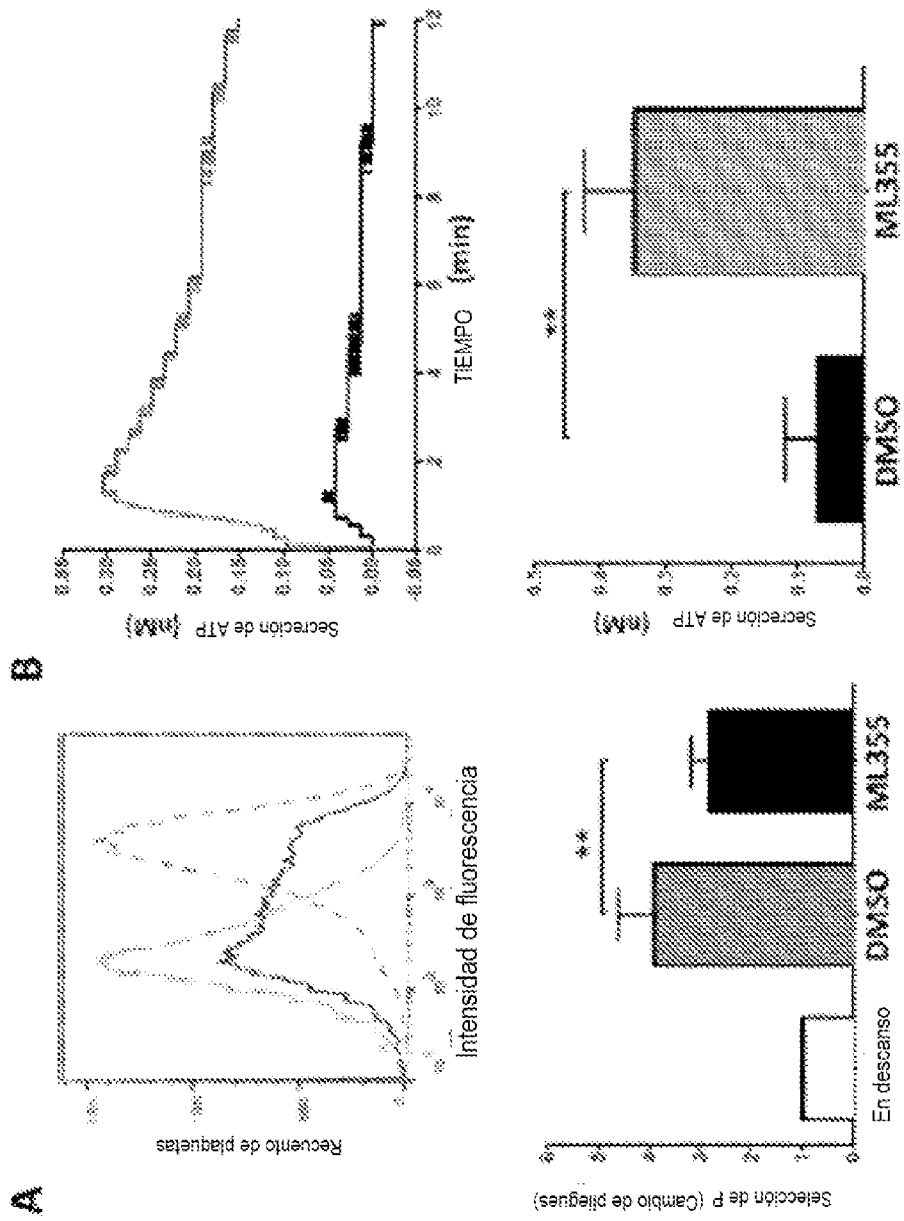




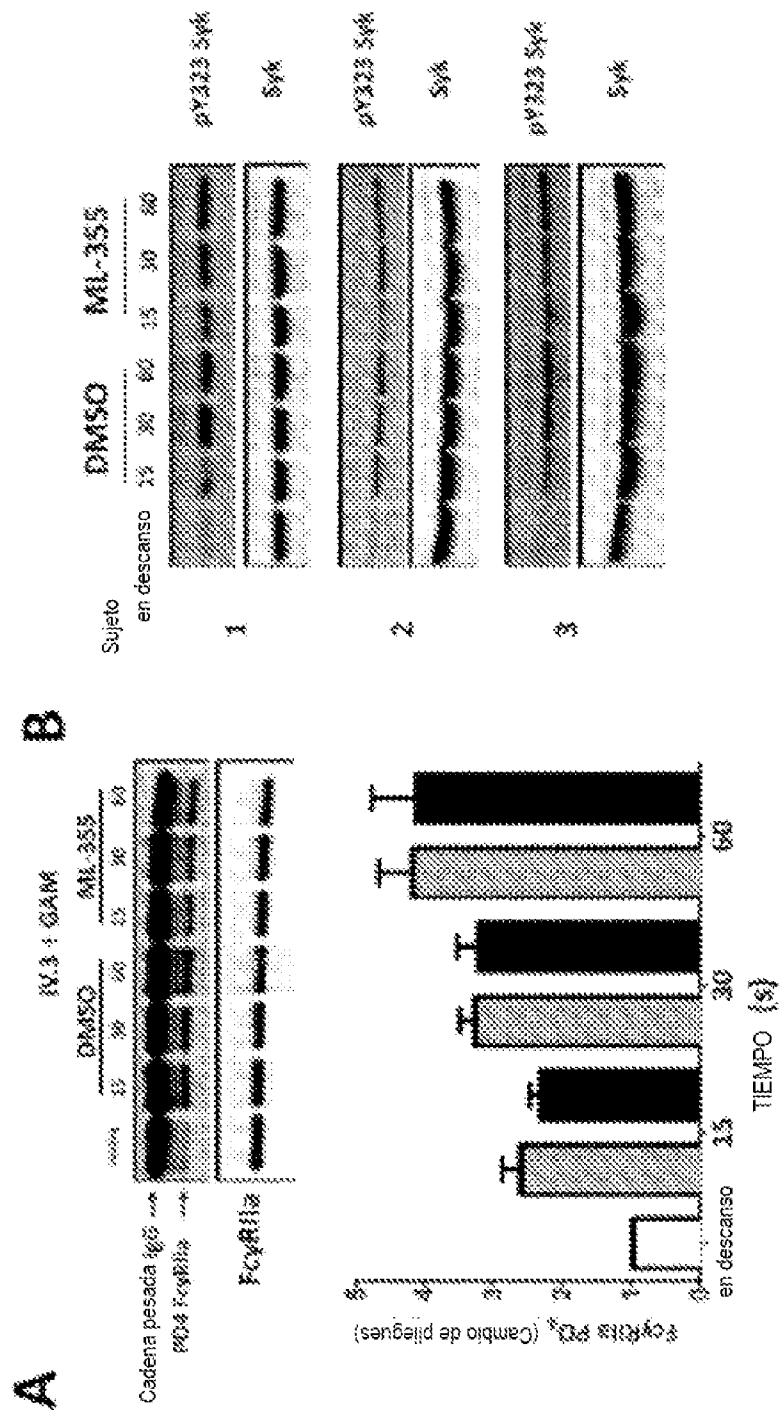
Figuras 12A-12C



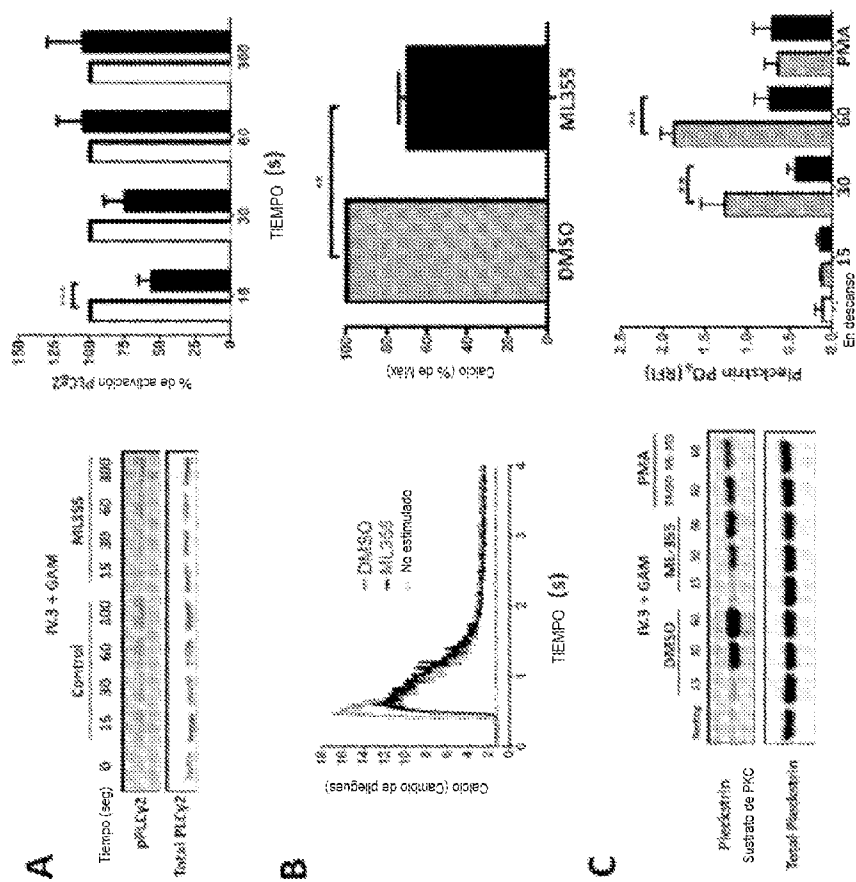
Figuras 13A-13B



Figuras 14A-14B



Figuras 15A-15B



Figuras 16A-16C

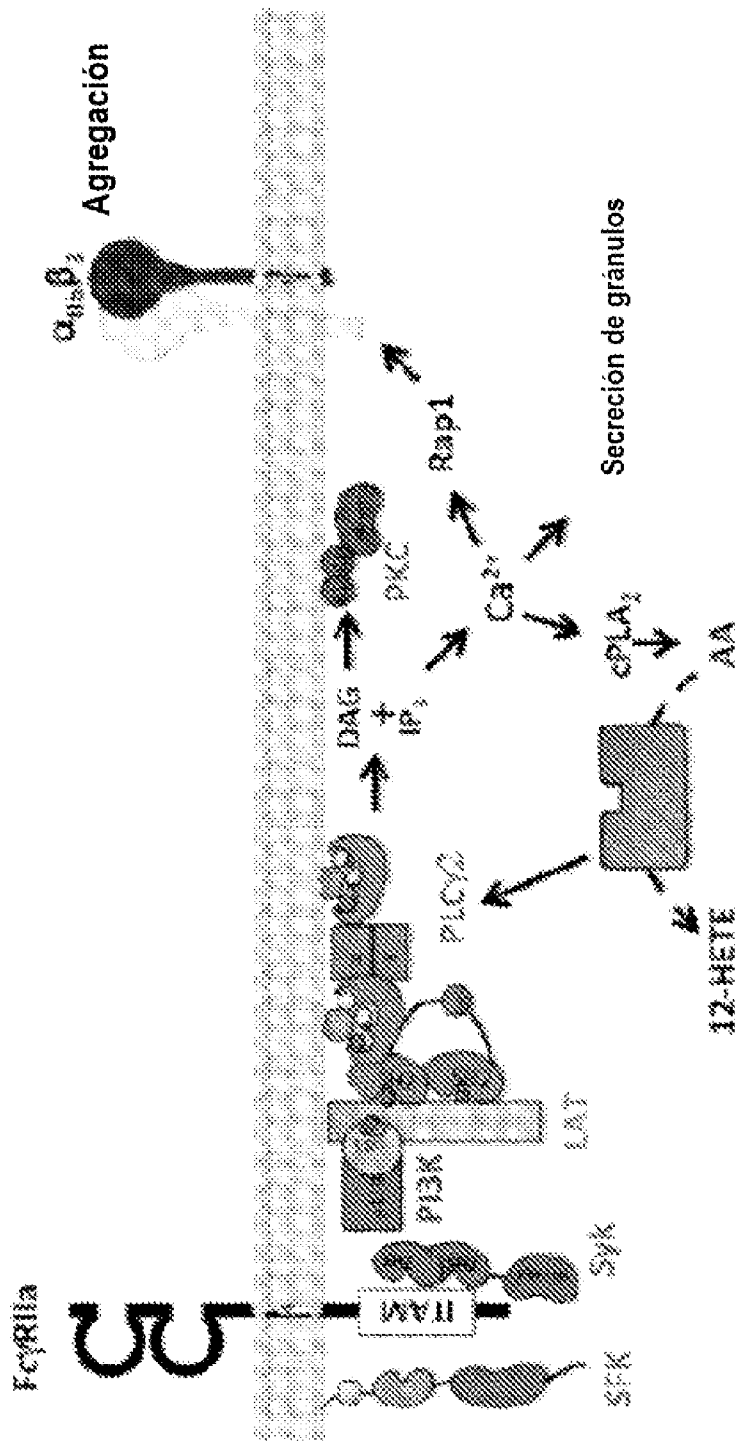
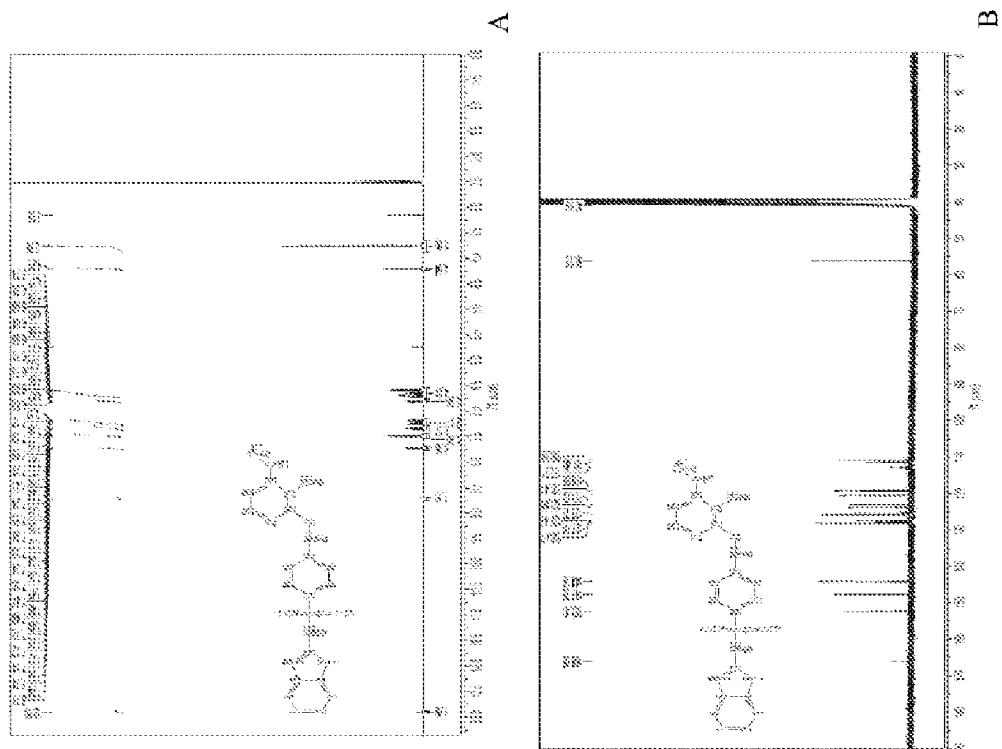


Figura 17



Figuras 18A – 18B

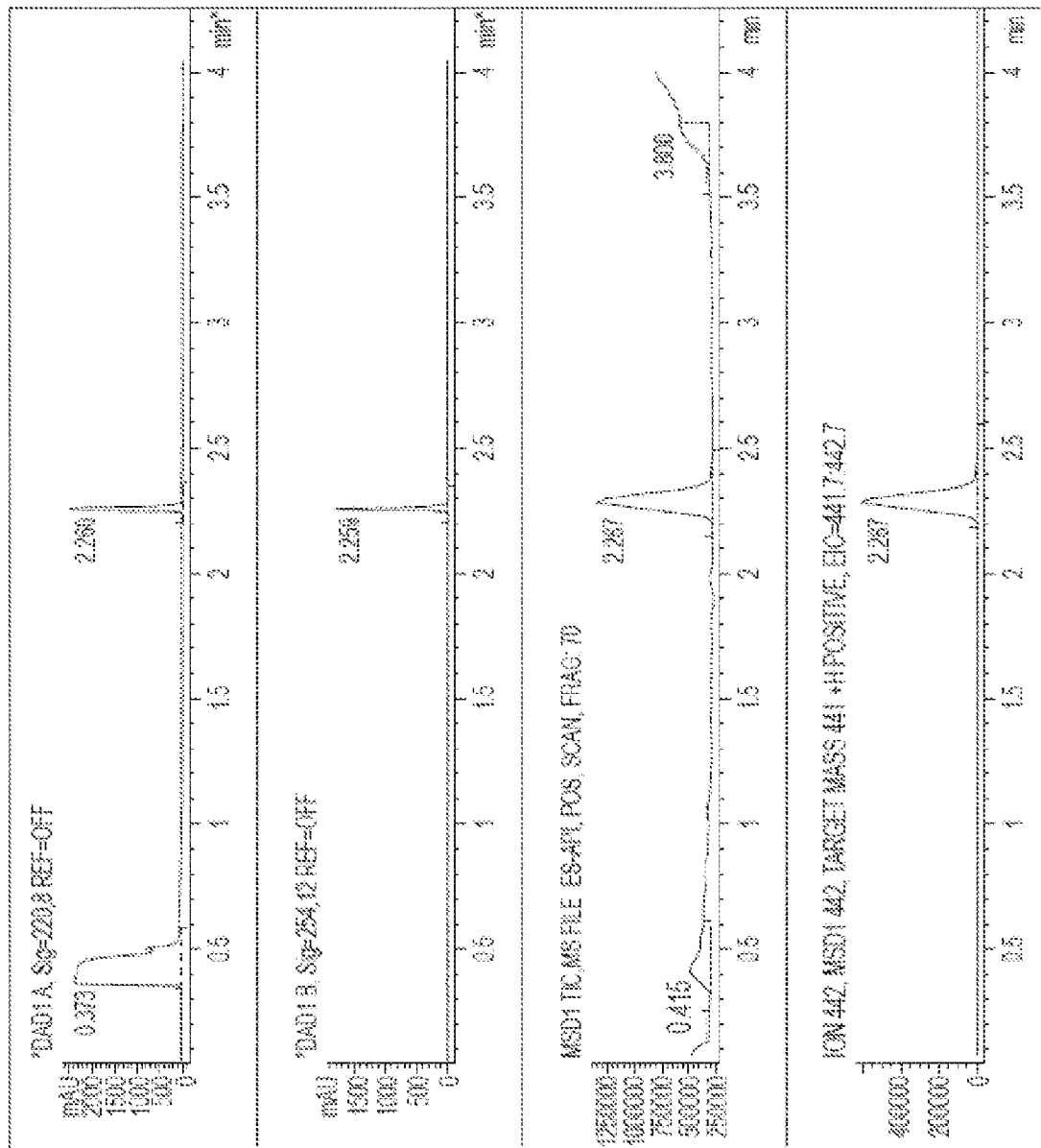
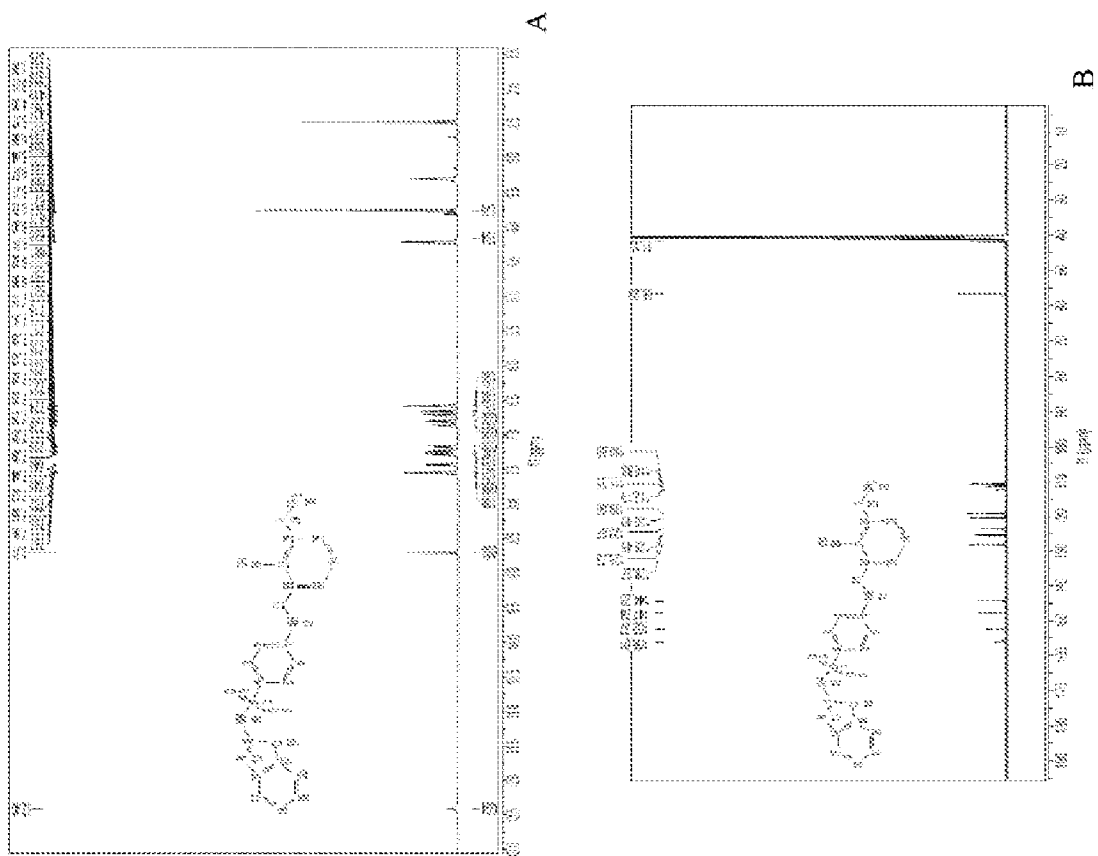


Figure 19



Figuras 20A-20B

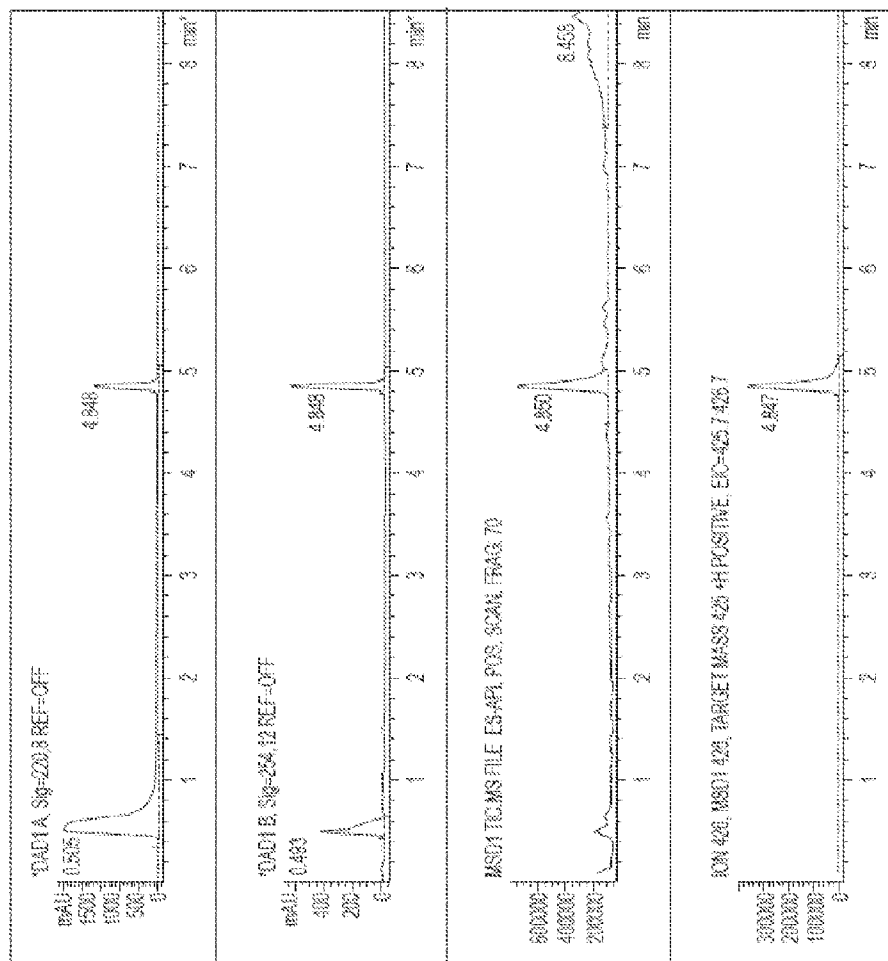
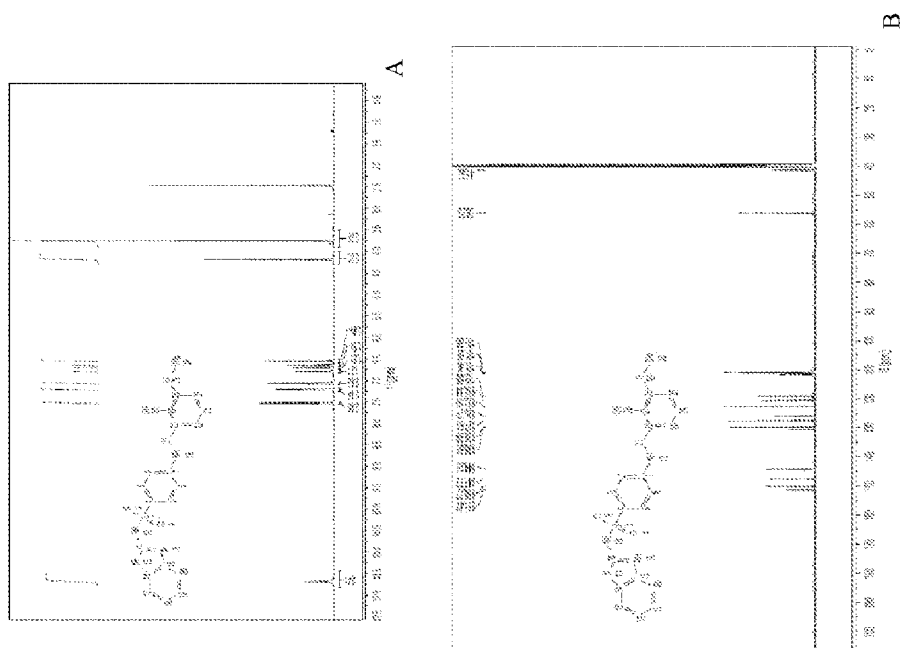


Figure 21



Figuras 22A-22B

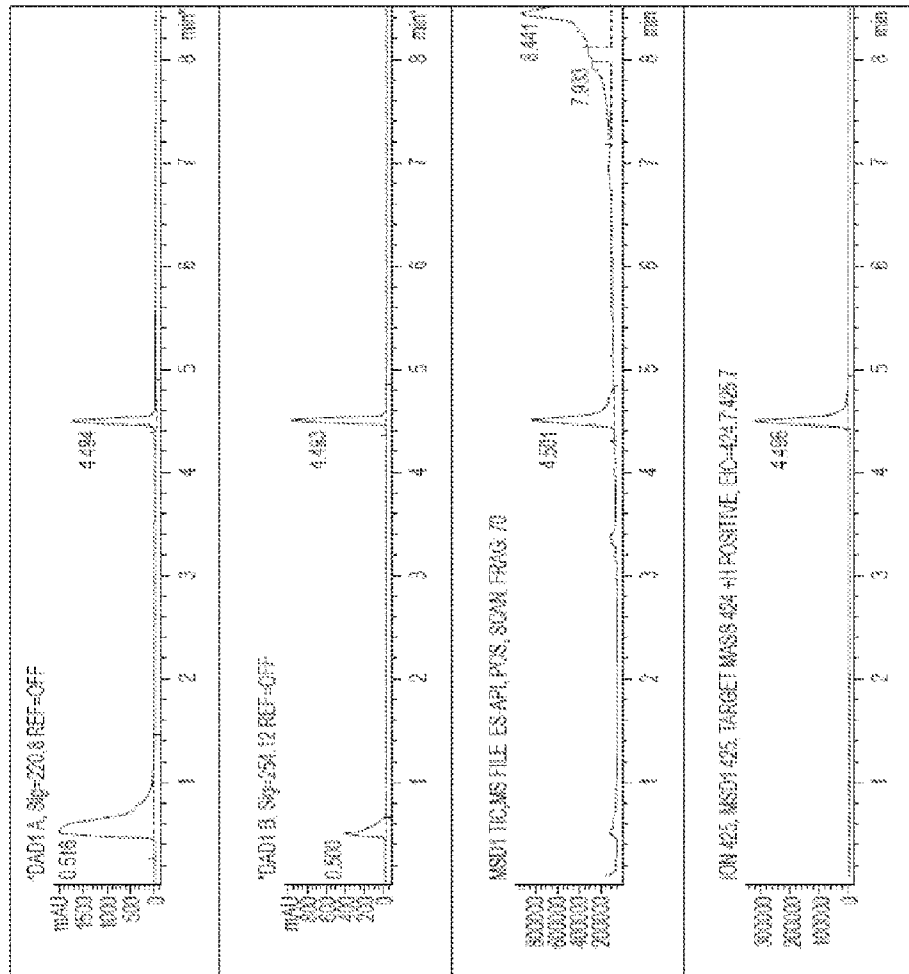


Figura 23