

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 113**

51 Int. Cl.:

A61K 31/47 (2006.01)

A61P 39/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

C07D 215/38 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.08.2016 PCT/US2016/048054**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.03.2017 WO17035077**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2016 E 16839942 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024 EP 3337486**

54 Título: **Compuestos deuterados y usos de los mismos**

30 Prioridad:

21.08.2015 US 201562208223 P

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

25.11.2024

73 Titular/es:

**ALDEYRA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
131 Hartwell Avenue Suite 320
Lexington, MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**BRADY, TODD;
YOUNG, SCOTT;
KINNEY, WILLIAM, A. y
MACDONALD, SUSAN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 989 113 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

Compuestos deuterados y usos de los mismos

5 **Antecedentes de la invención**

Los procesos metabólicos e inflamatorios en células generan aldehídos tóxicos, tal como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-2-nonenal (HNE o 4HNE). Estos aldehídos son muy reactivos hacia proteínas, hidratos de carbono, lípidos y ADN, produciendo moléculas biológicas químicamente modificadas, activación de mediadores inflamatorios tal como NF-kappaB, y daños en diversos órganos. Por ejemplo, el retinaldehído puede reaccionar con fosfatidiletanolamina (PE) para formar un compuesto muy tóxico llamado A2E, que es un componente de lipofuscina que se cree está implicada en el desarrollo y evolución de degeneración macular senil (AMD). Muchos mecanismos de defensa corporal funcionan para eliminar o disminuir los niveles de aldehídos tóxicos. Se pueden usar agentes terapéuticos de molécula pequeña novedosos para captar retinaldehído "escapado" en la retina, reduciendo de esta manera la formación de A2E y disminuyendo el riesgo de AMD (Jordan *et al.* (2006)).

Los aldehídos están implicados en diversas afecciones patológicas tal como ojo seco, cataratas, queratocono, distrofia endotelial de Fuch en la córnea, uveítis, conjuntivitis alérgica, penfigoide cicatricial ocular, afecciones asociadas con cicatrización de queratectomía fotorreactiva (PKR) u otra cicatrización corneal, afecciones asociadas con degradación de lípido de las lágrimas o disfunción de la glándula lacrimal, afecciones oculares inflamatorias tal como rosácea ocular (con o sin disfunción de la glándula meibomiana) y trastornos o afecciones no oculares tal como cáncer de piel, psoriasis, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, acné vulgar, síndrome de Sjogren-Larsson, lesión isquémica-reperfusion, inflamación, diabetes, neurodegeneración (por ejemplo, enfermedad de Parkinson), esclerodermia, esclerosis lateral amiotrófica, trastornos autoinmunitarios (por ejemplo, lupus), trastornos cardiovasculares (por ejemplo, aterosclerosis) y afecciones asociadas con los efectos lesivos de agentes vesicantes (Negre-Salvagre *et al.* (2008), Nakamura *et al.* (2007), Batista *et al.* (2012), Kenney *et al.* (2003), *Int J Dermatol* 43: 494 (2004), *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 1552 (2007), *Graefe's Clin Exp Ophthalmol* 233: 694 (1994), *Molecular Vision* 18: 194 (2012)). Disminuir o eliminar los aldehídos debe, por tanto, mejorar los síntomas y ralentizar la evolución de estos estados patológicos.

MDA, HNE y otros aldehídos tóxicos se generan por una miríada de mecanismos metabólicos que implican alcoholes grasos, esfingolípidos, glucolípidos, fitol, ácidos grasos, metabolismo del ácido araquidónico (Rizzo (2007)), metabolismo de poliaminas (Wood *et al.* (2006)), peroxidación de lípidos, metabolismo oxidativo (Buddi *et al.* (2002), Zhou *et al.* (2005)), y metabolismo de glucosa (Pozzi *et al.* (2009)). Los aldehídos se pueden entrecruzar con grupos amino primarios y otras fracciones químicas en proteínas, fosfolípidos, hidratos de carbono, y ADN, produciendo en muchos casos consecuencias tóxicas, tal como mutagénesis y carcinogénesis (Marnett (2002)). MDA se asocia con córneas enfermas en afecciones tales como, queratocono, queratopatía bullosa y otras, y distrofia endotelial de Fuch (Buddi *et al.* (2002)). Además, trastornos de la piel, por ejemplo, síndrome de Sjogren-Larsson, probablemente están conectados con la acumulación de aldehídos grasos tal como octadecanal y hexadecanal (Rizzo *et al.* (2010)). Además, la peroxidación de lípidos aumentada y la generación de aldehídos resultante están asociadas con los efectos tóxicos de agentes vesicantes (Sciuto *et al.* (2004) y Pal *et al.* (2009)).

El documento WO 2017/035082 describe compuestos y métodos de uso de los mismos para el tratamiento, prevención y/o reducción de un riesgo de una enfermedad, trastorno, o afección en la que la toxicidad de aldehídos está implicada en la patogénesis, incluyendo trastornos oculares, trastornos de la piel, afecciones asociadas con efectos lesivos de agentes vesicantes, y enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias, neurológicas y cardiovasculares mediante el uso de una amina primaria para captar aldehídos tóxicos, tal como MDA y HNE.

El documento WO 2014/116836 describe el tratamiento, prevención y/o reducción de un riesgo de una enfermedad, trastornos o afección en la que la toxicidad de aldehídos está implicada en la patogénesis, incluyendo trastornos oculares, trastornos de la piel, afecciones asociadas con efectos lesivos de agentes vesicantes, y enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias, neurológicas y cardiovasculares mediante el uso de una amina primaria para captar aldehídos tóxicos tal como MDA y HNE.

LoPachin et al., 2014, *Chem. Res. Toxicol.* 27:1081-1091 describe mecanismos moleculares de toxicidad de aldehídos.

El documento WO 2006/127945 describe composiciones y métodos para tratar degeneración macular y otras formas de enfermedad retiniana cuya etiología implica la acumulación de A2E y/o lipofuscina, y, más específicamente, para prevenir la formación y/o acumulación de A2E.

No ha habido sugerencias en la técnica para tratar las varias afecciones asociadas con aldehídos tóxicos mediante la administración de agentes terapéuticos de molécula pequeña que actúan como un captador para aldehídos, tal como MDA y/o HNE. Por tanto, hay una necesidad para tratar, prevenir, y/o reducir un riesgo de una enfermedad o trastorno en el que la toxicidad de aldehídos está implicada en la patogénesis. La presente invención aborda tal necesidad.

65

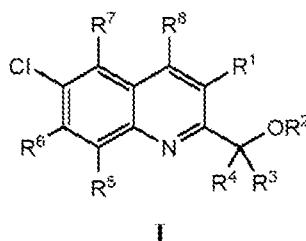
Según esto, permanece una necesidad para tratar, prevenir, y/o reducir un riesgo de una enfermedad, trastorno, o afección en la que la toxicidad de aldehídos está implicada en la patogénesis.

Compendio de la invención

Todas las formas de realización en los párrafos posteriores que no están dentro del ámbito de las reivindicaciones se proporcionan para contexto/referencia. La invención se expone en el conjunto adjunto de reivindicaciones.

Las referencias a métodos de tratamiento en los párrafos posteriores de esta descripción se deben interpretar como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

Se ha encontrado ahora que los compuestos de la presente invención, y composiciones de los mismos, son útiles para tratar, prevenir, y/o reducir un riesgo de una enfermedad, trastorno, o afección en la que la toxicidad de aldehídos está implicada en la patogénesis. Tales compuestos tienen la fórmula general I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde cada uno de R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , y R^8 es como se reivindica.

Los compuestos de la presente invención, y composiciones farmacéuticamente aceptables de los mismos, son útiles para tratar una variedad de enfermedades, trastornos o afecciones, asociadas con aldehídos tóxicos. Tales enfermedades, trastornos o afecciones incluyen las descritas en el presente documento.

Los compuestos proporcionados por esta invención también son útiles para el estudio de ciertos aldehídos en biología y fenómenos patológicos.

Los compuestos que se divulgan en el presente documento, pero no están cubiertos por las reivindicaciones son compuestos de referencia y sirven para ilustrar la presente invención.

Breve descripción de las figuras

La **figura 1** muestra superposiciones de EIC (cromatogramas iónicos extraídos) de los perfiles de metabolitos de NS2 a 0 min y 120 min en hepatocitos humanos comparados con una referencia (hepatocitos blanco). Como muestran las superposiciones, después de 120 min NS2 se metaboliza a M1, M7, M8, y una baja cantidad de M9, permaneciendo algo de NS2 sin cambiar.

La **figura 2** muestra superposiciones de EIC de los perfiles de metabolitos de NS2 a 0 min y 120 min en hepatocitos de mono comparados con una referencia (hepatocitos blanco). Como muestran las superposiciones, después de 120 min NS2 se metaboliza a M1, M3, M4, M7, M8, y una baja cantidad de M9, permaneciendo algo de NS2 sin cambiar.

La **figura 3** muestra superposiciones de EIC de los perfiles de metabolitos de NS2 a 0 min y 120 min en hepatocitos de perro comparados con una referencia (hepatocitos blanco). Como muestran las superposiciones, después de 120 min NS2 se metaboliza a M1, M2, M5, y M6, permaneciendo algo de NS2 sin cambiar.

La **figura 4** muestra superposiciones de EIC de los perfiles de metabolitos de NS2 a 0 min y 120 min en hepatocitos de rata comparados con una referencia (hepatocitos blanco). Como muestran las superposiciones, después de 120 min NS2 se metaboliza a M1, M7, y M8, permaneciendo algo de NS2 sin cambiar.

La **figura 5** muestra superposiciones de EIC de los perfiles de metabolitos de NS2 deuterado (NS2-D6; compuesto I-1) a 0 min y 120 min en hepatocitos humanos comparados con una referencia (hepatocitos blanco). Como muestran las superposiciones, después de 120 min NS2-D6 se metaboliza a una pequeña cantidad de M1, permaneciendo la mayoría de NS2-D6 sin cambiar.

La **figura 6** muestra un análisis espectral de masa de NS2 ($m/z = 237$).

La **figura 7** muestra un análisis espectral de masa del metabolito M1 ($m/z = 253$; RT = 2,1 min).

- La **figura 8** muestra un análisis espectral de masa del metabolito M2 ($m/z = 253$; RT = 2,9 min).
- 5 La **figura 9** muestra un análisis espectral de masa del metabolito M3 ($m/z = 429$; RT = 3,0 min).
- La **figura 10** muestra un análisis espectral de masa del metabolito M4 ($m/z = 429$; RT = 3,2 min).
- La **figura 11** muestra un análisis espectral de masa del metabolito M5 ($m/z = 542$; RT = 3,5 min).
- 10 La **figura 12** muestra un análisis espectral de masa del metabolito M6 ($m/z = 542$; RT = 3,7 min). Nota: m/z de 413 representa una pérdida neutra (NL) de 129, indicativo de patrón de fragmentación de GSH.
- La **figura 13** muestra un análisis espectral de masa del metabolito M7 ($m/z = 429$; RT = 3,7 min).
- 15 La **figura 14** muestra un análisis espectral de masa del metabolito M8 ($m/z = 413$; RT = 3,9 min).
- La **figura 15** muestra un análisis espectral de masa del metabolito M9 ($m/z = 429$; RT = 3,9 min).
- 20 La **figura 16** muestra un análisis espectral de masa de NS2-D6 (compuesto I-1; $m/z = 243$).
- La **figura 17** muestra un análisis espectral de masa del metabolito 1 de NS2-D6 ($m/z = 259$).
- La **figura 18** muestra el efecto de NS2 (CoreRx) sobre la viabilidad neuronal después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM durante 5 horas.
- 25 La **figura 19** muestra un gráfico que ajusta los datos de CFDA (en unidades de fluorescencia relativa) a concentraciones variables de NS2 (CoreRx; en Captisol®) a una curva de la que se deriva el valor de CE_{50} .
- La **figura 20** muestra el efecto de NS2 (CoreRx) sobre la muerte celular en cultivos de hipocampo después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM durante 5 horas. * indica puntos de datos que son significativamente diferentes del tratamiento de HP solo.
- 30 La **figura 21** muestra un gráfico que ajusta los datos de yoduro de propidio (en unidades de fluorescencia relativa) a concentraciones variables de NS2 (CoreRx; en Captisol®) a una curva de la que se deriva el valor de CE_{50} .
- 35 La **figura 22** muestra el efecto de NS2 (CoreRx; en DMSO) sobre la viabilidad neuronal después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 mM durante 5 horas. * indica puntos de datos que son significativamente diferentes del tratamiento de HP solo.
- 40 La **figura 23** muestra un gráfico que ajusta los datos de CFDA (en unidades de fluorescencia relativa) a concentraciones variables de NS2 (CoreRx; en DMSO) a una curva de la que se deriva el valor de CE_{50} .
- La **figura 24** muestra el efecto de NS2 (CoreRx; en DMSO) sobre la muerte celular en cultivos de hipocampo después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM . * indica puntos de datos que son significativamente diferentes del tratamiento de HP solo.
- 45 La **figura 25** muestra un gráfico que ajusta los datos de yoduro de propidio (en unidades de fluorescencia relativa) a concentraciones variables de NS2 (CoreRx; en DMSO) a una curva de la que se deriva el valor de CE_{50} .
- 50 La **figura 26** muestra datos de respuesta a la dosis para NS2 no molido (J-Star) en Captisol® que demuestra el efecto sobre la viabilidad neuronal después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM . * indica puntos de datos que son significativamente diferentes del tratamiento de HP solo.
- La **figura 27** muestra un gráfico que ajusta los datos de CFDA (en unidades de fluorescencia relativa) a concentraciones variables de NS2 (J-Star; en DMSO) a una curva de la que se deriva el valor de CE_{50} .
- 55 La **figura 28** muestra datos de respuesta a la dosis para NS2 no molido (J-Star) en Captisol® que demuestra el efecto sobre la muerte celular en cultivos de hipocampo después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM . * indica puntos de datos que son significativamente diferentes del tratamiento de HP solo.
- 60 La **figura 29** muestra un gráfico que ajusta los datos de yoduro de propidio (en unidades de fluorescencia relativa) a concentraciones variables de NS2 (no molido (J-Star) en Captisol®) a una curva de la que se deriva el valor de CE_{50} .
- 65 La **figura 30** muestra datos de respuesta a la dosis para NS2 no molido (J-Star) en DMSO que demuestra el efecto sobre la viabilidad neuronal después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM . * indica puntos de datos que son significativamente diferentes del tratamiento de HP solo.

La **figura 31** muestra un gráfico que ajusta los datos de CFDA (en unidades de fluorescencia relativa) a concentraciones variables de NS2 no molido ((J-Star) en DMSO) a una curva de la que se deriva el valor de CE_{50} .

5 La **figura 32** muestra datos de respuesta a la dosis para NS2 no molido (J-Star) en DMSO que demuestra el efecto sobre la muerte celular en cultivos de hipocampo después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM . * indica puntos de datos que son significativamente diferentes del tratamiento de HP solo.

10 La **figura 33** muestra un gráfico que ajusta los datos de yoduro de propidio (en unidades de fluorescencia relativa) a concentraciones variables de NS2 no molido ((J-Star) en DMSO) a una curva de la que se deriva el valor de CE_{50} .

La **figura 34** muestra datos de respuesta a la dosis para los vehículos de formulación sobre la viabilidad celular neuronal después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM .

15 La **figura 35** muestra datos de respuesta a la dosis para los vehículos de formulación sobre la muerte celular después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM .

20 La **figura 36** muestra el efecto de ALD-6 (compuesto I-1) sobre viabilidad neuronal en cultivos de hipocampo tratados con peróxido de hidrógeno 10 μM . * indica puntos de datos que son significativamente diferentes del tratamiento de HP solo.

La **figura 37** muestra la curva logística calculada y el valor de CE_{50} para el ensayo de viabilidad neuronal usando cultivos de hipocampo tratados con ALD-6.

25 La **figura 38** muestra el efecto de respuesta a la dosis de ALD-6 sobre la muerte celular después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM . * indica puntos de datos que son significativamente diferentes del tratamiento de HP solo.

30 La **figura 39** muestra la curva logística calculada y el valor de CE_{50} para el ensayo de muerte celular usando cultivos de hipocampo tratados con ALD-6.

La **figura 40** muestra el efecto de respuesta a la dosis de ALD-5 sobre la viabilidad neuronal después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM .

35 La **figura 41** muestra el efecto de respuesta a la dosis de ALD-5 sobre la muerte celular después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM .

La **figura 42** muestra el efecto de respuesta a la dosis de ALD-2 sobre la viabilidad neuronal después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM .

40 La **figura 43** muestra el efecto de respuesta a la dosis de ALD-2 sobre la muerte celular después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM .

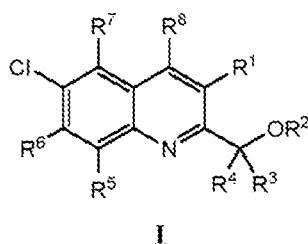
45 Las **figuras 44-46** muestran un histograma de resultados de unión específica para NS2-D6 expresado como un porcentaje de la unión específica de cada compuesto control.

La **figura 47** muestra un histograma de resultados de farmacología *in vitro* en ensayos enzimáticos y de absorción para NS2-D6.

50 Descripción detallada de la invención

1. Descripción general de ciertos aspectos de la invención

55 En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona compuestos, composiciones, y métodos para el tratamiento, prevención y/o reducción de un riesgo de enfermedades, trastornos o afecciones en las que la toxicidad de aldehídos está implicada en la patogénesis. En algunas formas de realización, tales compuestos incluyen esos de las fórmulas reivindicadas, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde cada variable es como se reivindica. También se describe un compuesto de fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R¹ se selecciona de -NH₂, -NHD, o -ND₂;

R² se selecciona de hidrógeno o deuterio;

R³ y R⁴ se seleccionan independientemente de -CH₃, -CH₂D, -CHD₂, o -CD₃; y

R⁵, R⁶, R⁷, y R⁸ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno o deuterio; siempre que al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ sea o contenga deuterio.

2. Definiciones

Los compuestos de esta invención incluyen los reivindicados, y se ilustran además por las clases, subclases y especies divulgadas en el presente documento. Como se usa en el presente documento, las siguientes definiciones aplicarán a menos que se indique otra cosa. Para los fines de esta invención, los elementos químicos se identifican según la tabla periódica de los elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75^a Ed. Además, los principios generales de química orgánica se describen en "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, y "March's Advanced Organic Chemistry", 5^a Ed., Ed.: Smith, M.B. y March, J., John Wiley & Sons, Nueva York: 2001.

Como se usa en el presente documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a esas sales que son, dentro de ámbito de juicio médico racional, adecuadas para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, y similares, y son proporcionales con una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge et al., describen sales farmacéuticamente aceptables en detalle en J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen las derivadas de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos adecuados. Los ejemplos de sales de adición de ácidos no tóxicos, farmacéuticamente aceptables son sales de un grupo amino formadas con ácidos inorgánicos tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico o con ácidos orgánicos tal como ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico o usando otros métodos usados en la técnica tal como intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenesulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, undecanoato, valerato, y similares.

Las sales derivadas de bases apropiadas incluyen sales de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, amonio y N⁺(alquilo de C₁₋₄). Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen, cuando sea apropiado, amonio no tóxico, amonio cuaternario, y cationes de aminas formadas usando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, alquilo inferior sulfonato y aril sulfonato.

A menos que se indique otra cosa, las estructuras representadas en el presente documento también se pretende que incluyan todas las formas isoméricas (por ejemplo, enantioméricas, diastereoméricas, y geométricas (o conformacionales)) de la estructura; por ejemplo, las configuraciones R y S para cada centro asimétrico, isómeros de doble enlace Z y E, e isómeros conformacionales Z y E. Por tanto, los isómeros estereoquímicos individuales, así como las mezclas enantioméricas, diastereoméricas y geométricas (o conformacionales) de los presentes compuestos están dentro del ámbito de la invención. A menos que se indique otra cosa, todas las formas tautoméricas de los compuestos de la invención están dentro del ámbito de la invención.

La "retina" es una región del sistema nervioso central con aproximadamente 150 millones de neuronas. Está localizada al fondo del ojo donde reposa sobre un tejido epitelial especializado llamado epitelio pigmentario retinal (RPE). La retina inicia la primera fase del procesamiento visual transduciendo estímulos visuales a neuronas especializadas llamadas "fotorreceptores". Sus salidas sinápticas se procesan por redes neurales elaboradas en la retina y después se transmiten al cerebro. La retina ha evolucionado dos clases especializadas de fotorreceptores para operar en una amplia gama de condiciones de luz. Los fotorreceptores "bastones" transducen imágenes visuales en condiciones de

baja luz y median la visión acromática. Los fotorreceptores “conos” transducen imágenes visuales en condiciones de luz de oscura a brillante y median tanto visión de color como visión de alta agudeza.

Cada fotorreceptor está compartimentalizado en dos regiones llamadas el segmento “externo” e “interno”. El segmento interno es el cuerpo celular neuronal que contiene el núcleo celular. El segmento interno sobrevive durante una vida en ausencia de enfermedad retinal. El segmento externo es la región donde las moléculas de pigmento visuales sensibles a la luz están concentradas en una formación densa de estructuras de membranas apiladas. Parte del segmento externo se desprende rutinariamente y vuelve a crecer en un proceso diario llamado renovación del segmento externo. Los segmentos externos desprendidos son ingeridos y metabolizados por células RPE.

La “mácula” es la región central de la retina que contiene la fovea donde las imágenes visuales se procesan por conos delgados largos en alto detalle espacial (“agudeza visual”). La “degeneración macular” es una forma de neurodegeneración retinal que ataca la mácula y destruye la visión de alta agudeza en el centro del campo visual. La degeneración macular senil (AMD) empieza en una “forma seca” caracterizada por gránulos lisosómicos residuales llamados lipofuscina en células RPE, y por depósitos extracelulares llamados “drusas”. Las drusas contienen productos de desecho celulares excretados por las células RPE. Se pueden detectar “lipofuscina” y drusas clínicamente por oftalmólogos y cuantificar usando técnicas fluorescentes. Pueden ser los primeros signos clínicos de la degeneración macular.

La lipofuscina contiene agregaciones de A2E. La lipofuscina se acumula en células RPE y las envenena por múltiples mecanismos conocidos. Según se envenenan las células RPE, sus actividades bioquímicas declinan y los fotorreceptores empiezan a degenerar. Las drusas extracelulares pueden además comprometer las células RPE interfiriendo con su suministro de nutrientes vasculares. Las drusas también desencadenan procesos inflamatorios, que producen invasiones neovasculares coroideas de la mácula en un paciente en diez que evolucionan a la forma húmeda de AMD. Tanto la forma seca como la húmeda evolucionan a ceguera.

“ERG” es un acrónimo para electroretinograma, que es la medida del potencial de campo eléctrico emitido por las neuronas de la retina durante su respuesta a un estímulo de luz experimentalmente definido. ERG es una medida no invasora que se puede realizar o bien en sujetos vivos (ser humano o animal) o un ojo hemiseccionado en solución que se ha retirado quirúrgicamente de un animal vivo.

Como se usa en el presente documento, el término “RAL” significa retinaldehído. El término “RAL-trap” significa un compuesto terapéutico que se une a RAL libre y mediante ello previene a RAL de una condensación con base de Schiff con fosfatidiletanolamina (PE) de membrana. “RAL libre” se define como RAL que no está unido a una proteína del ciclo visual. Los términos “*trans*-RAL” y “*all-trans*-RAL” se usan de forma intercambiable y significan todo *trans*-retinaldehído.

A2E es un subproducto de reacción de una ruta bioquímica compleja llamada el “ciclo visual” que opera colaborativamente tanto en células RPE como segmentos externos de fotorreceptores. El ciclo visual recicla un cromóforo aldehído fotorreactivo llamado “retinaldehído” que deriva de la vitamina A y es esencial para la visión. En términos simplificados, el ciclo visual tiene cuatro etapas principales: 1) convierte la vitamina A en las RPE en un cromóforo aldehído con un doble enlace forzado fotorreactivo (11-*cis*-RAL); 2) transporta 11-*cis*-RAL a la retina donde se une a una proteína fotorreceptora especializada llamada opsina; 3) la luz fotoisomeriza el 11-*cis*-RAL unido a *trans*-RAL, que inicia la liberación de RAL unido del sitio de unión de la opsina; y 4) convierte *trans*-RAL (un aldehído) a vitamina A (un alcohol) y transporta la vitamina A de vuelta a las RPE donde el ciclo comienza de nuevo.

El grupo aldehído de RAL ayuda a unir la molécula a opsina formando un enlace químico reversible con una cadena lateral de aminoácido en el sitio de unión de la opsina. Mientras el grupo aldehído de RAL es esencial para anclar la molécula al sitio de unión de opsina, es de otra forma peligroso debido a su propensión a formar bases de Schiff con otras aminos biológicas. Las primeras tres reacciones tienen lugar en los segmentos externos de fotorreceptores y producen un producto intermedio llamado A2PE. Una vez formado, A2PE se reparte en la fase lipídica y se acumula en las membranas de segmentos externos de fotorreceptores. Cuando las células RPE ingieren segmentos externos descartados, su A2PE acumulado se dirige a sus lisosomas.

Como se ha descrito anteriormente, la degeneración macular y otras formas de enfermedad retinal cuya etiología implica la acumulación de A2E y/o lipofuscina se pueden tratar o prevenir disminuyendo la cantidad de A2E formado. Los compuestos útiles para hacerlo incluyen RAL-traps. Los RAL-traps disminuyen la cantidad de A2E formado, por ejemplo, formando un enlace covalente con RAL que ha escapado el secuestro. RAL que ha reaccionado con el compuesto RAL-trap está por tanto indisponible para reaccionar con fosfatidiletanolamina.

La presente invención también se dirige al uso de un compuesto descrito en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención y/o reducción de un riesgo de una enfermedad, trastorno o afección en la que la toxicidad de aldehídos está implicada en la patogénesis. Más específicamente, este aspecto de la invención se dirige al uso de un compuesto descrito en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención y/o reducción de un riesgo de (1) una enfermedad, trastorno o afección ocular, incluyendo, pero no limitado a, una enfermedad corneal (por ejemplo, síndrome de ojo seco, cataratas, queratocono,

queratopatía bullosa y otras, y distrofia endotelial de Fuch), otros trastornos o afecciones oculares (por ejemplo, conjuntivitis alérgica, penfigoide cicatricial ocular, afecciones asociadas con cicatrización de PRK y otras cicatrizaciones corneales, y afecciones asociadas con degradación de los lípidos de las lágrimas o disfunción de la glándula lacrimal), y otras afecciones oculares asociadas con altos niveles de aldehídos como resultado de inflamación (por ejemplo, uveítis, escleritis, síndrome de Stevens-Johnson ocular y rosácea ocular (con o sin disfunción de la glándula meibomiana)), (2) un trastorno o afección de la piel o una indicación cosmética. Por ejemplo, el trastorno o afección de la piel incluye, pero no está limitado a, psoriasis, lupus tóxico (discoide), dermatitis de contacto, dermatitis atópica, dermatitis alérgica, dermatitis de radiación, acné vulgar, y síndrome de Sjogren-Larsson y otras ictiosis, elastosis solar/arrugas, firmeza del tono de la piel, hinchazón, eccema, cambios en la piel inducidos por tabaco o irritantes, incisión dérmica, una afección de la piel asociada a quemadura y/o herida, (3) una afección asociada con los efectos tóxicos de agentes vesicantes o quemaduras de agentes alcalinos, o (4) una enfermedad autoinmunitaria, mediada por inmunidad, inflamatoria, cardiovascular o neurológica (por ejemplo, lupus, esclerodermia, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, septicemia, aterosclerosis, lesión isquémica-reperusión, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiples, esclerosis lateral amiotrófica, diabetes, síndrome metabólico, y enfermedades fibróticas).

La presente invención también se dirige al uso de un compuesto descrito en el presente documento en tratar, prevenir y/o reducir un riesgo de una enfermedad, trastorno o afección en la que la toxicidad de aldehídos está implicada en la patogénesis. Más específicamente, este aspecto de la invención se dirige al uso de un compuesto descrito en el presente documento en tratar, prevenir y/o reducir un riesgo de (1) una enfermedad, trastorno o afección ocular, incluyendo, pero no limitado a, una enfermedad corneal (por ejemplo, síndrome de ojo seco, cataratas, queratocono, queratopatía bullosa y otras, y distrofia endotelial de Fuch), otros trastornos o afecciones oculares (por ejemplo, conjuntivitis alérgica, penfigoide cicatricial ocular, afecciones asociadas con cicatrización de PRK y otras cicatrizaciones corneales, y afecciones asociadas con degradación de los lípidos de las lágrimas o disfunción de la glándula lacrimal), y otras afecciones oculares asociadas con altos niveles de aldehídos como resultado de inflamación (por ejemplo, uveítis, escleritis, síndrome de Stevens-Johnson ocular, rosácea ocular (con o sin disfunción de la glándula meibomiana)), (2) un trastorno o afección de la piel o una indicación cosmética. Por ejemplo, la enfermedad, trastorno o afección incluye, pero no está limitado a, psoriasis, lupus tóxico (discoide), dermatitis de contacto, dermatitis atópica, dermatitis alérgica, dermatitis de radiación, acné vulgar, y síndrome de Sjogren-Larsson y otras ictiosis, elastosis solar/arrugas, firmeza del tono de la piel, hinchazón, eccema, cambios en la piel inducidos por tabaco o irritantes, incisión dérmica, una afección de la piel asociada a quemadura y herida, (3) una afección asociada con los efectos tóxicos de agentes vesicantes o quemaduras de agentes alcalinos, o (4) una enfermedad autoinmunitaria, mediada por inmunidad, inflamatoria, cardiovascular o neurológica (por ejemplo, lupus, esclerodermia, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, septicemia, aterosclerosis, lesión isquémica-reperusión, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiples, esclerosis lateral amiotrófica, diabetes, síndrome metabólico, y enfermedades fibróticas).

Los compuestos descritos en el presente documento también se pueden administrar por vía tópica, tal como directamente al ojo, por ejemplo, como un colirio o pomada oftálmica. Las gotas para los ojos típicamente comprenden una cantidad eficaz de al menos un compuesto descrito en el presente documento y un soporte capaz de ser aplicado de forma segura a un ojo. Por ejemplo, las gotas para los ojos están en forma de una solución isotónica, y el pH de la solución se ajusta de modo que no haya irritación del ojo. En muchos casos, la barrera epitelial interfiere con la penetración de moléculas en el ojo. Por tanto, los fármacos oftálmicos más actualmente usados se suplementan con alguna forma de potenciador de penetración. Estos potenciadores de penetración funcionan aflojando las uniones estrechas de las células epiteliales más superiores (Burstein, *Trans Ophthalmol Soc UK* 104: 402 (1985); Ashton *et al.*, *J Pharmacol Exp Ther* 259: 719 (1991); Green *et al.*, *Am J Ophthalmol* 72: 897 (1971)). El potenciador de penetración más comúnmente usado es cloruro de benzalconio (Tang *et al.*, *J Pharm Sci* 83: 85 (1994); Burstein *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 308 (1980)), que también funciona como un conservante contra contaminación microbiana.

La administración tópica puede ser en forma de una crema, suspensión, emulsión, pomada, gotas, aceite, loción, parche, cinta, inhalante, espray, o formulaciones tópicas de liberación controlada incluyendo geles, películas, parches, y adhesivos. La administración intraocular puede tomar la forma de inyecciones, depósitos o implantes subconjuntivos, en la cápsula subtenón, retrobulbar o intravítrea. Los compuestos administrados por estas rutas pueden estar en forma de solución o suspensión. La administración de compuestos por inyección de depósito puede contener soportes o excipientes farmacéuticamente aceptables; estos pueden ser naturales o sintéticos y pueden ser biodegradables o no biodegradables y facilitar la liberación de fármaco de una manera controlada. Los implantes usados para la liberación controlada de un compuesto pueden estar compuestos de materiales naturales o sintéticos, biodegradables o no biodegradables. El soporte es aceptable en que es compatible con los otros componentes de la composición y no el lesivo para el paciente. Algunos ejemplos de soportes incluyen (1) azúcares tal como lactosa, glucosa y sacarosa, (2) almidones tal como almidón de maíz y fécula de patata, (3) celulosa y (4) ciclodextrinas. Una formulación tópica útil se describe en la publicación PCT WO 2011/072141.

Las formulaciones para la administración tópica a la piel pueden incluir, por ejemplo, pomadas, cremas, geles y pastas que comprenden el compuesto de amina primaria en un soporte farmacéuticamente aceptable. La formulación del compuesto de amina primaria para uso tópico incluye la preparación de bases de pomada oleaginosas o solubles en

agua, como saben bien los expertos en la materia. Por ejemplo, estas formulaciones pueden incluir aceites vegetales, grasas animales, y, por ejemplo, hidrocarburos semisólidos obtenidos de petróleo. Los componentes particulares usados pueden incluir pomada blanca, pomada amarilla, cera de ésteres cetílicos, ácido oleico, aceite de oliva, parafina, vaselina, vaselina blanca, espermaceti, glicerito de almidón, cera blanca, cera amarilla, lanolina, lanolina anhidra y monoestearato de glicerilo. También se pueden usar varias bases de pomada solubles en agua, incluyendo éteres de glicol y derivados, polietilenglicoles, estearato de polioxil 40 y polisorbatos.

Las formulaciones para la administración tópica pueden contener el compuesto usado en la presente solicitud a una concentración en el intervalo del 0,001-10%, 0,05-10%, 0,1-10%, 0,2-10%, 0,5-10%, 1-10%, 2-10%, 3-10%, 4-10%, 5-10%, o 7-10% (peso/peso), o en el intervalo del 0,001-2,0%, 0,001-1,5%, o 0,001-1,0%, (peso/volumen), o en el intervalo del 0,05-2,0%, 0,05-1,5%, o 0,05-1,0%, (peso/volumen), o en el intervalo del 0,1-5,0%, 0,1-2,0%, 0,1-1,5%, o 0,1-1,0% (peso/volumen), o en el intervalo del 0,5-5,0%, 0,5-2,0%, 0,5-1,5%, o 0,5-1,0% (peso/volumen), o en el intervalo del 1-5,0%, 1-2,0%, o 1-1,5% (peso/volumen). Las formulaciones para la administración tópica también pueden contener el compuesto usado en la presente solicitud a una concentración en el intervalo del 0,001-2,5%, 0,01-2,5%, 0,05-2,0%, 0,1-2,0%, 0,2-2,0%, 0,5-2,0%, o 1-2,0% (peso/peso), o en el intervalo del 0,001-2,0%, 0,001-1,5%, 0,001-1,0%, o 0,001-5% (peso/peso).

En una formulación de colirio la composición puede contener el compuesto activo a una concentración del 0,01-20%, 0,02-15%, 0,04-10%, 0,06-5%, 0,08-1%, o 0,09-0,5% (peso/volumen) con o sin ajuste de pH y/u osmótico a la solución. Más en particular, la formulación de colirio puede contener un compuesto descrito en el presente documento a una concentración del 0,09-0,5% (peso/volumen), tal como el 0,1%.

En una ejemplificación, las composiciones farmacéuticas abarcan una composición hecha mezclando una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito en el presente documento con un soporte oligomérico o polimérico tal como una ciclodextrina, o ciclodextrina químicamente modificada, incluyendo trimetil- β -ciclodextrina, 2-hidroxiethyl- β -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, 3-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, y éter sulfobutílico de β -ciclodextrina sal sódica (o sal de potasio). Ejemplificando un soporte oligomérico o polimérico es una sal sódica de éter sulfobutílico de β -ciclodextrina. La cantidad de sal sódica de éter sulfobutílico de β -ciclodextrina en la composición puede variar desde aproximadamente el 0,01% al 30% peso/volumen. En una ilustración, la concentración de sal sódica de éter sulfobutílico de β -ciclodextrina es el 5-25% peso/volumen. Ilustración adicional de la concentración de sal sódica de éter sulfobutílico de β -ciclodextrina es el 6-20% peso/volumen. En una ejemplificación, la concentración de sal sódica de éter sulfobutílico de β -ciclodextrina es el 6-12% peso/volumen. Ejemplificación adicional de la concentración de sal sódica de éter sulfobutílico de β -ciclodextrina es el 9-10% peso/volumen, incluyendo el 9,5% peso/volumen. La cantidad del compuesto descrito en el presente documento puede variar del 0,01-20%, 0,02-15%, 0,04-10%, 0,06-5%, 0,08-1%, o 0,09-0,5% (peso/volumen). Más en particular, la composición puede contener un compuesto descrito en el presente documento a una concentración del 0,09-0,5% (peso/volumen), tal como el 0,1%.

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden administrar por vía oral y como tal las composiciones farmacéuticas que contienen el ingrediente activo pueden estar en forma adecuada para uso oral, por ejemplo, como comprimidos, pastillas, grajeas, suspensiones acuosas u oleaginosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones destinadas para uso oral se pueden preparar según cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes con el fin de proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y sabrosas.

Para la administración oral en forma de un comprimido o cápsula (por ejemplo, cápsula de gelatina), el componente de fármaco activo se puede combinar con un soporte oral, no tóxico farmacéuticamente aceptable inerte tal como etanol, glicerol, agua y similares. Además, cuando se deseada o es necesario, también se pueden incorporar aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados a la mezcla. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona, azúcares naturales tal como glucosa, beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tal como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas posológicas incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, almidones de goma xantana, agar, ácido alginico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes, croscarmelosa o su sal de sodio, y similares. Los diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina.

Los comprimidos contienen el ingrediente activo en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tal como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes granuladores y disgregantes, por ejemplo, almidón de maíz, o ácido alginico; agentes aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina o goma arábiga, y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos

pueden estar sin recubrir o pueden estar recubiertos por técnicas conocidas para retrasar la disgregación y absorción en el aparato digestivo y mediante ello proporcionar una acción sostenida durante un periodo más largo.

5 Una dosis terapéuticamente eficaz, de un compuesto descrito en el presente documento en una formulación oral, puede variar de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg de peso corporal de paciente al día, más en particular de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg, que se puede administrar en una dosis única o múltiples al día. Para la administración oral el fármaco se puede administrar en forma de comprimidos o cápsulas que contienen de 1 mg a 500 mg del ingrediente activo específicamente 1 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 50 mg, 100 mg, 250 mg y 500 mg, o en formas de comprimidos o cápsulas que contienen al menos el 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% (p/p) del ingrediente activo. Por ejemplo, las cápsulas pueden contener 50 mg del ingrediente activo, o el 5-10% (p/p) del ingrediente activo. Por ejemplo, los comprimidos pueden comprender 100 mg del ingrediente activo, o el 20-50% (p/p) del ingrediente activo. Por ejemplo, el comprimido puede contener, además del ingrediente activo, un disgregante (por ejemplo, croscarmelosa o su sal de sodio y metilcelulosa), un diluyente (por ejemplo, celulosa microcristalina), y un lubricante (por ejemplo, estearato de sodio y estearato de magnesio). El fármaco se puede administrar en una base diaria ya sea una vez, dos veces o más al día.

Para la administración por inhalación, los compuestos se administran en forma de un spray aerosol de un envase o dispensador presurizado, que contiene un propelante adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan penetrantes adecuados para la barrera que se va a permear en la formulación. Tales penetrantes en general se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa se puede lograr mediante el uso de espráis nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles o cremas como se sabe en general en la técnica.

Las formulaciones parenterales que comprenden un compuesto descrito en el presente documento se pueden preparar en soluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y los supositorios se preparan ventajosamente de emulsiones o suspensiones grasas. Las formulaciones se pueden esterilizar y/o contener adyuvantes, tal como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan según métodos convencionales, y pueden contener aproximadamente del 0,1 al 75%, preferiblemente aproximadamente del 1 al 50% de un compuesto descrito en el presente documento.

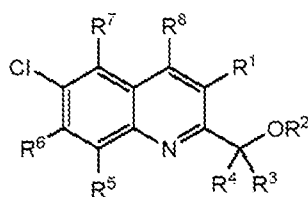
Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" son términos reconocidos en la técnica, e incluyen modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, tal como inyecciones, e incluyen, sin limitación inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intrapleural, intravascular, intrapericárdica, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, suncuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intracisternal.

3. Descripción de compuestos ejemplares

El deuterio (D o ^2H) es un isótopo estable no radioactivo de hidrógeno y tiene un peso atómico de 2,0144. El hidrógeno se produce de forma natural como una mezcla de isótopos ^1H (hidrógeno o protio), D (^2H o deuterio), y T (^3H o tritio). Un experto en la materia aprecia que la designación "hidrógeno" en compuestos químicos que contienen hidrógeno realmente representa una mezcla de hidrógeno y aproximadamente el 0,015% de deuterio.

La deuteración completa, o deuteración al 100%, en cualquier sitio puede ser difícil de alcanzar en el laboratorio. Cuando se indica un átomo de deuterio en un sitio determinado en cualquier compuesto descrito en el presente documento, se entiende que un pequeño porcentaje de hidrógeno puede aun estar presente. Se dice que tales compuestos están enriquecidos con deuterio. Los compuestos enriquecidos con deuterio se preparan mediante síntesis utilizando materiales de partida apropiadamente enriquecidos. Como se usa en el presente documento, los términos "enriquecido con deuterio" o "enriquecimiento con deuterio" se refieren a un compuesto, o un sitio particular de dicho compuesto, que comprende deuterio en una cantidad que es mayor que su abundancia isotópica natural (0,015%). Según esto, en algunas formas de realización, la presente invención proporciona compuestos que comprenden deuterio en un sitio determinado, en donde el porcentaje o nivel de incorporación de deuterio es mayor que su abundancia isotópica natural.

Según un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I como se reivindica. También se describe un compuesto de fórmula I:

**I**

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

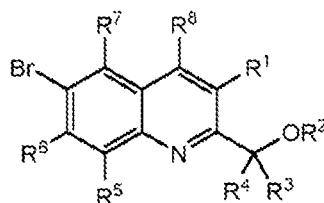
R¹ se selecciona de -NH₂, -NHD, o -ND₂;

5 R² se selecciona de hidrógeno o deuterio;

R³ y R⁴ se seleccionan independientemente de -CH₃, -CH₂D, -CHD₂, o -CD₃; y

R⁵, R⁶, R⁷, y R⁸ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno o deuterio; siempre que al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ sea o contenga deuterio.

10 También se describe un compuesto de fórmula I-A:

**I-A**

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

R¹ se selecciona de -NH₂, -NHD, o -ND₂;

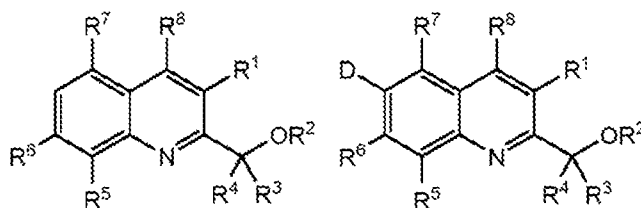
15 R² se selecciona de hidrógeno o deuterio;

R³ y R⁴ se seleccionan independientemente de -CH₃, -CH₂D, -CHD₂, o -CD₃; y

R⁵, R⁶, R⁷, y R⁸ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno o deuterio; siempre que al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ sea o contenga deuterio.

20

También se describe un compuesto de fórmula II-A o II-B:

**II-A****II-B**

25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

R¹ se selecciona de -NH₂, -NHD, o -ND₂;

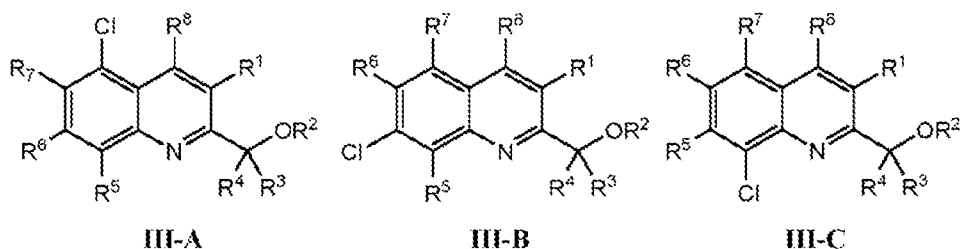
R² se selecciona de hidrógeno o deuterio;

R³ y R⁴ se seleccionan independientemente de -CH₃, -CH₂D, -CHD₂, o -CD₃; y

R⁵, R⁶, R⁷, y R⁸ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno o deuterio;

30 siempre que al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ en la fórmula II-A sea o contenga deuterio.

También se describe un compuesto de fórmula III-A, III-B o III-C:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

R¹ se selecciona de -NH₂, -NHD, o -ND₂;

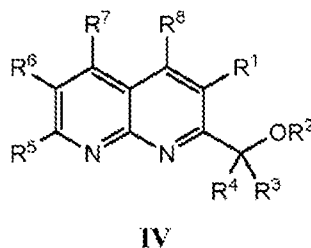
5 R² se selecciona de hidrógeno o deuterio;

R³ y R⁴ se seleccionan independientemente de -CH₃, -CH₂D, -CHD₂, o -CD₃; y

R⁵, R⁶, R⁷, y R⁸ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno o deuterio;

siempre que al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ sea o contenga deuterio.

10 También se describe un compuesto de fórmula IV:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

15 R¹ se selecciona de -NH₂, -NHD, o -ND₂;

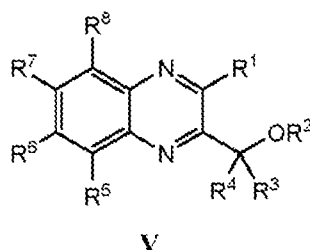
R² se selecciona de hidrógeno o deuterio;

R³ y R⁴ se seleccionan independientemente de -CH₃, -CH₂D, -CHD₂, o -CD₃; y

R⁵, R⁶, R⁷, y R⁸ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno o deuterio;

siempre que al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ sea o contenga deuterio.

20 También se describe un compuesto de fórmula V:



25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

R¹ se selecciona de -NH₂, -NHD, o -ND₂;

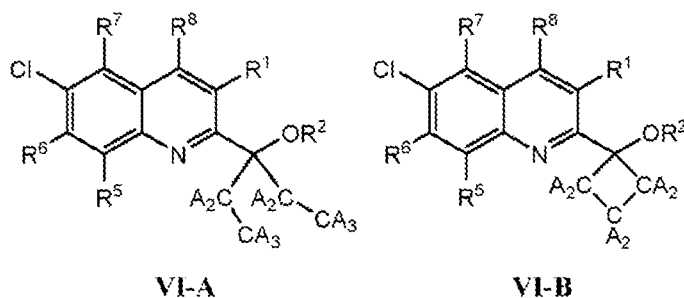
R² se selecciona de hidrógeno o deuterio;

R³ y R⁴ se seleccionan independientemente de -CH₃, -CH₂D, -CHD₂, o -CD₃; y

R⁵, R⁶, R⁷, y R⁸ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno o deuterio;

30 siempre que al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ sea o contenga deuterio.

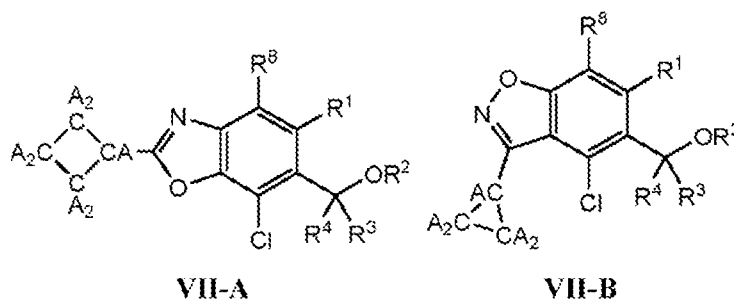
También se describe un compuesto de fórmula VI-A o VI-B:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

- 5 R¹ se selecciona de -NH₂, -NHD, o -ND₂;
 R² se selecciona de hidrógeno o deuterio; y
 R⁵, R⁶, R⁷, y R⁸ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno o deuterio;
 siempre que al menos uno de A, R¹, R², R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ sea o contenga deuterio.

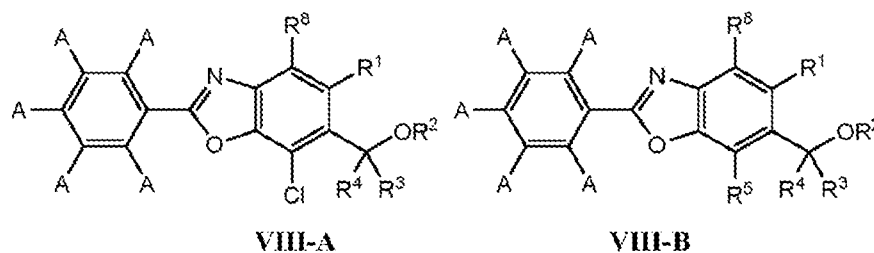
- 10 También se describe un compuesto de fórmula VII-A o VII-B:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

- 15 cada A es independientemente hidrógeno o deuterio;
 R¹ se selecciona de -NH₂, -NHD, o -ND₂;
 R² se selecciona de hidrógeno o deuterio;
 R³ y R⁴ se seleccionan independientemente de -CH₃, -CH₂D, -CHD₂, o -CD₃; y
 R⁸ se selecciona de hidrógeno o deuterio;
 20 siempre que al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, A, o R⁸ sea o contenga deuterio.

También se describe un compuesto de fórmula VIII-A o VIII-B:

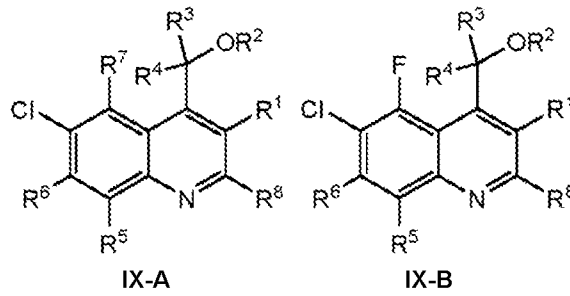


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

- 25 cada A es independientemente hidrógeno o deuterio;
 R¹ se selecciona de -NH₂, -NHD, o -ND₂;
 R² se selecciona de hidrógeno o deuterio;
 30 R³ y R⁴ se seleccionan independientemente de -CH₃, -CH₂D, -CHD₂, o -CD₃; y
 R⁵ y R⁸ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno o deuterio;
 siempre que al menos uno de A, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, o R⁸ sea o contenga deuterio.

También se describe un compuesto de fórmula IX-A o IX-B:

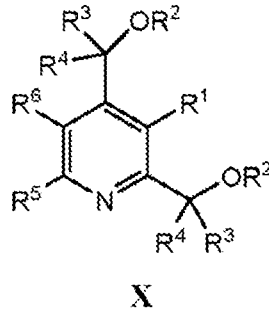
- 35



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

- 5 R¹ se selecciona de -NH₂, -NHD, o -ND₂;
 R² se selecciona de hidrógeno o deuterio;
 R³ y R⁴ se seleccionan independientemente de -CH₃, -CH₂D, -CHD₂, o -CD₃; y
 R⁵, R⁶, R⁷, y R⁸ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno o deuterio;
 siempre que al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ sea o contenga deuterio.

También se describe un compuesto de fórmula X:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

- 15 R¹ se selecciona de -NH₂, -NHD, o -ND₂;
 R² se selecciona de hidrógeno o deuterio;
 R³ y R⁴ se seleccionan independientemente de -CH₃, -CH₂D, -CHD₂, o -CD₃; y
 R⁵ y R⁶ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno o deuterio;
 siempre que al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, o R⁶ sea o contenga deuterio.

Las siguientes formas de realización son aplicables a cada una de las fórmulas precedentes.

Como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento, R¹ se selecciona de -NH₂, -NHD, o -ND₂.

En algunas formas de realización, R¹ es -NH₂. En algunas formas de realización, R¹ es -NH₂ y al menos uno de R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio.

En algunas formas de realización, R¹ es -NHD. En algunas formas de realización, R¹ es -NHD y al menos uno de R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio.

En algunas formas de realización, R¹ es -ND₂. En algunas formas de realización, R¹ es -ND₂ y al menos uno de R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio.

Como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento, A se selecciona de hidrógeno o deuterio.

En algunos casos, A es hidrógeno. En algunos casos, A es hidrógeno y al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio. En algunos casos, A es deuterio. En algunos casos, A es deuterio y al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio.

Como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento, R² se selecciona de hidrógeno o deuterio.

En algunas formas de realización, R² es hidrógeno. En algunas formas de realización, R² es hidrógeno y al menos uno de R¹, R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio. En algunas formas de realización, R² es deuterio. En algunas formas de realización, R² es deuterio y al menos uno de R¹, R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio.

Como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento, R³ se selecciona de -CH₃, -CH₂D, -CHD₂, o -CD₃.

5 En algunos casos R³ es -CH₃. En algunos casos R³ es -CH₃ y al menos uno de R¹, R², R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio.

En algunos casos R³ es -CH₂D. En algunos casos R³ es -CH₂D y al menos uno de R¹, R², R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio.

10 En algunos casos R³ es -CHD₂. En algunos casos R³ es -CHD₂ y al menos uno de R¹, R², R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio.

15 En algunas formas de realización R³ es -CD₃. En algunos casos R³ es -CD₃ y al menos uno de R¹, R², R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio.

Como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento, R⁴ se selecciona de -CH₃, -CH₂D, -CHD₂, o -CD₃.

20 En algunos casos R⁴ es -CH₃. En algunos casos R⁴ es -CH₃ y al menos uno de R¹, R², R³, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio.

En algunos casos R⁴ es -CH₂D. En algunos casos R⁴ es -CH₂D y al menos uno de R¹, R², R³, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio.

25 En algunos casos R⁴ es -CHD₂. En algunos casos R⁴ es -CHD₂ y al menos uno de R¹, R², R³, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio.

30 En algunas formas de realización R⁴ es -CD₃. En algunos casos R⁴ es -CD₃ y al menos uno de R¹, R², R³, R⁵, R⁶, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio.

Como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento, R⁵ se selecciona de hidrógeno o deuterio.

35 En algunas formas de realización, R⁵ es hidrógeno. En algunas formas de realización, R⁵ es hidrógeno y al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁶, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio. En algunas formas de realización, R⁵ es deuterio. En algunas formas de realización, R⁵ es deuterio y al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁶, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio.

Como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento, R⁶ se selecciona de hidrógeno o deuterio.

40 En algunas formas de realización, R⁶ es hidrógeno. En algunas formas de realización, R⁶ es hidrógeno y al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio. En algunas formas de realización, R⁶ es deuterio. En algunas formas de realización, R⁶ es deuterio y al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁷, o R⁸ es o contiene deuterio.

Como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento, R⁷ se selecciona de hidrógeno o deuterio.

45 En algunas formas de realización, R⁷ es hidrógeno. En algunas formas de realización, R⁷ es hidrógeno y al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, o R⁸ es o contiene deuterio. En algunas formas de realización, R⁷ es deuterio. En algunas formas de realización, R⁷ es deuterio y al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, o R⁸ es o contiene deuterio.

50 Como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento, R⁸ se selecciona de hidrógeno o deuterio.

En algunas formas de realización, R⁸ es hidrógeno. En algunas formas de realización, R⁸ es hidrógeno y al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, o R⁷ es o contiene deuterio. En algunas formas de realización, R⁸ es deuterio. En algunas formas de realización, R⁸ es deuterio y al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, o R⁷ es o contiene deuterio.

55 En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un compuestos de fórmulas **I, I-A, II-A, II-B, III-A, III-B, III-C, IV o V** como se reivindica, en donde cada uno de R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ es como se han definido anteriormente y se describe en el presente documento, y en donde cada uno de R¹ y R² es como se define en una entrada mostrada en la tabla 1a, a continuación

60 Tabla 1a.

Entrada	R ¹	R ²
<i>i</i>	-NH ₂	H
<i>ii</i>	-NH ₂	D
<i>iii</i>	-NHD	H

Entrada	R ¹	R ²
<i>iv</i>	-NHD	D
<i>v</i>	-ND ₂	H
<i>vi</i>	-ND ₂	D

- 5 En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un compuestos de fórmulas I, I-A, II-A, II-B, III-A, III-B, III-C, IV o V como se reivindica, en donde cada uno de R¹, R², R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ es como se han definido anteriormente y se describe en el presente documento, y en donde cada uno de R³ y R⁴ es como se define en una entrada mostrada en la tabla 1b, a continuación

Tabla 1b.

Entrada	R ³	R ⁴
<i>i</i>	-CH ₃	-CH ₃
<i>ii</i>	-CH ₃	-CH ₂ D
<i>iii</i>	-CH ₃	-CHD ₂
<i>iv</i>	-CH ₃	-CD ₃
<i>v</i>	-CH ₂ D	-CH ₃
<i>vi</i>	-CH ₂ D	-CH ₂ D
<i>vii</i>	-CH ₂ D	-CHD ₂
<i>viii</i>	-CH ₂ D	-CD ₃
<i>ix</i>	-CHD ₂	-CH ₃
<i>x</i>	-CHD ₂	-CH ₂ D
<i>xi</i>	-CHD ₂	-CHD ₂
<i>xii</i>	-CHD ₂	-CD ₃
<i>xiii</i>	-CD ₃	-CH ₃
<i>xiv</i>	-CD ₃	-CH ₂ D
<i>xv</i>	-CD ₃	-CHD ₂
<i>xvi</i>	-CD ₃	-CD ₃

- 10 En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un compuestos de fórmulas I, I-A, II-A, II-B, III-A, III-B, III-C, IV o V como se reivindica, en donde cada uno de R¹, R², R³ y R⁴ es como se han definido anteriormente y se describe en el presente documento, y en donde cada uno de R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ es como se define en una entrada mostrada en la tabla 1c, a continuación

15 Tabla 1c.

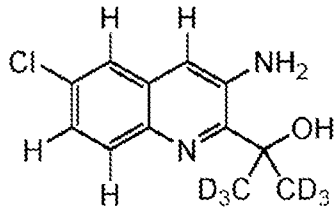
Entrada	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸
<i>i</i>	H	H	H	H
<i>ii</i>	H	H	H	D
<i>iii</i>	H	H	D	H
<i>iv</i>	H	D	H	H
<i>v</i>	D	H	H	H
<i>vi</i>	H	H	D	D
<i>vii</i>	H	D	H	D
<i>viii</i>	D	H	H	D
<i>ix</i>	H	D	D	H
<i>x</i>	D	H	D	H
<i>xi</i>	D	D	H	H
<i>xii</i>	H	D	D	D
<i>xiii</i>	D	H	D	D
<i>xiv</i>	D	D	H	D
<i>xv</i>	D	D	D	H
<i>xvi</i>	D	D	D	D

- 20 En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un compuestos de fórmulas I, I-A, II-A, II-B, III-A, III-B, III-C, IV o V como se reivindica, en donde cada uno de R¹ y R² es como se ha definido en una entrada mostrada en la tabla 1a, anteriormente, cada uno de R³ y R⁴ es como se define en una entrada mostrada en la tabla 1b, anteriormente, y donde cada uno de R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ es como se define en una entrada mostrada en la tabla 1c, anteriormente.

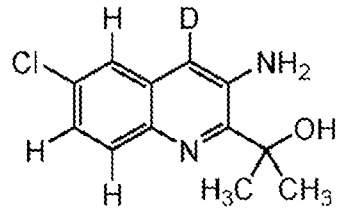
- 25 En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un compuesto como se reivindica seleccionado de los enumerados en cualquiera de la tabla 1a, tabla 1b, o tabla 1c, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I como se reivindica y seleccionado de los representados en la tabla 2, a continuación.

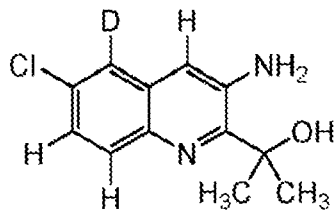
5 **Tabla 2.** Compuestos representativos de fórmula I



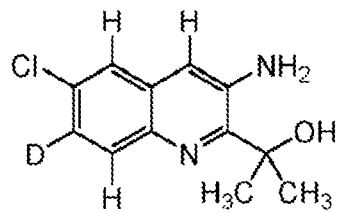
I-1



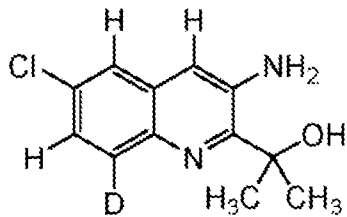
I-2



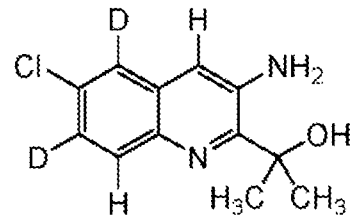
I-3



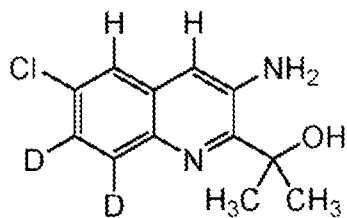
I-4



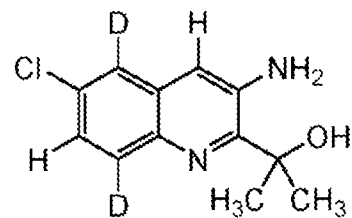
I-5



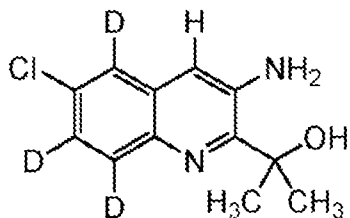
I-6



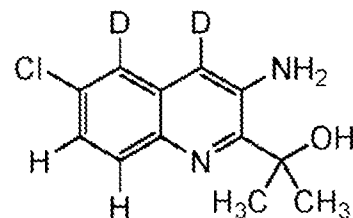
I-7



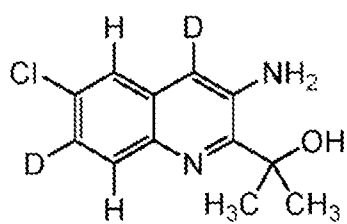
I-8



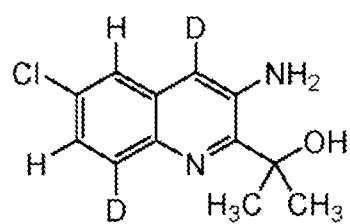
I-9



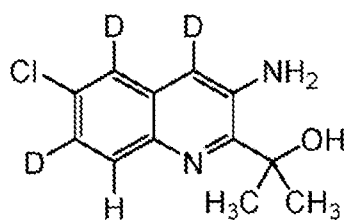
I-10



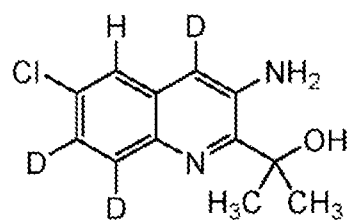
I-11



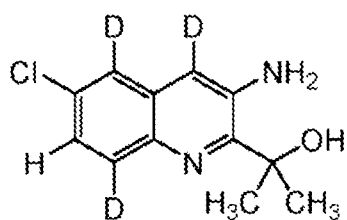
I-12



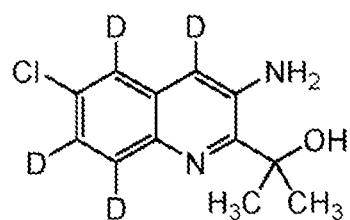
I-13



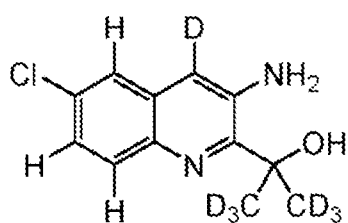
I-14



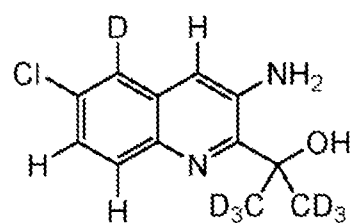
I-15



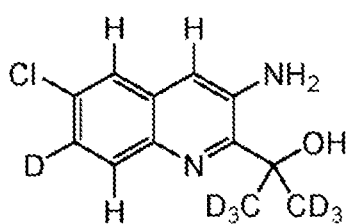
I-16



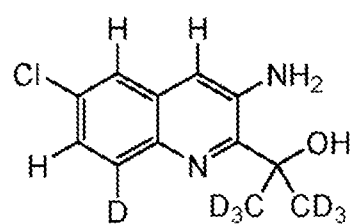
I-17



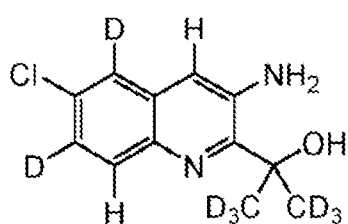
I-18



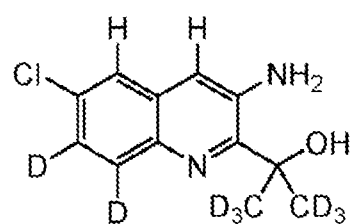
I-19



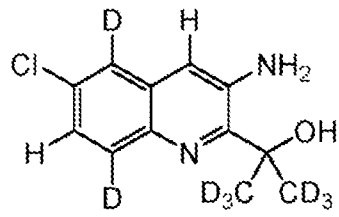
I-20



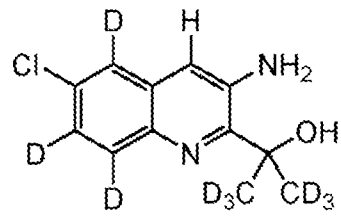
I-21



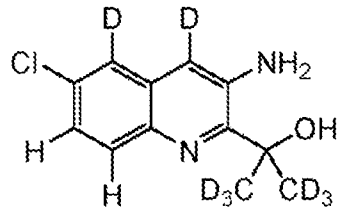
I-22



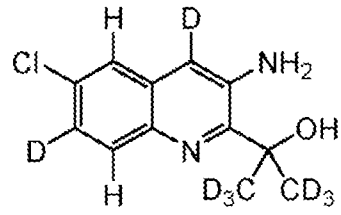
I-23



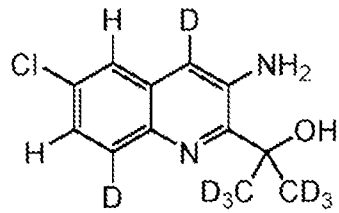
I-24



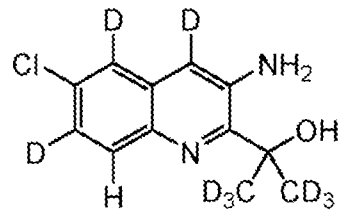
I-25



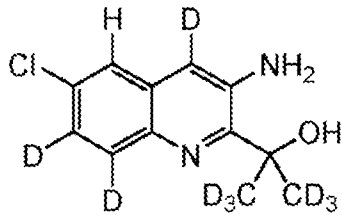
I-26



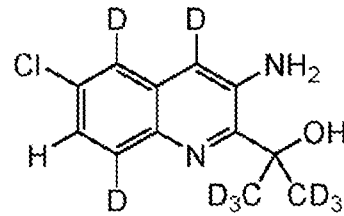
I-27



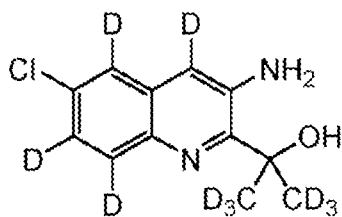
I-28



I-29



I-30



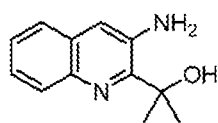
I-31

5 En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un compuesto representado en la tabla 2, anteriormente, y como se reivindica o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

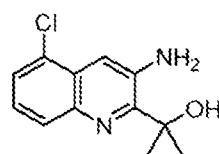
También se describe un análogo enriquecido con deuterio de un compuesto representado en la tabla 2A, a continuación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que deuterio está enriquecido en cualquier hidrógeno disponible.

10

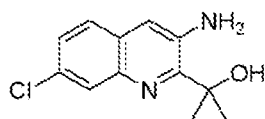
Tabla 2A.



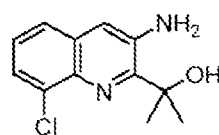
I-32



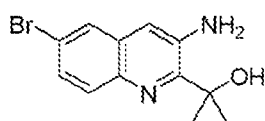
I-33



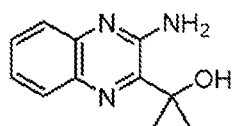
I-34



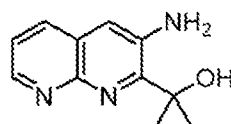
I-35



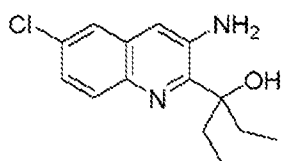
I-36



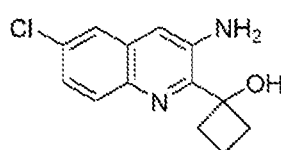
I-37



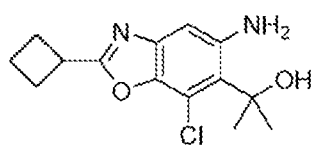
I-38



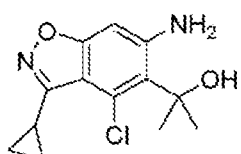
I-39



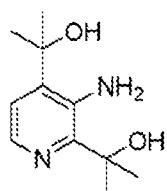
I-40



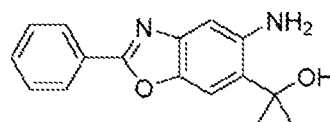
I-41



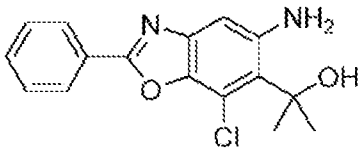
I-42



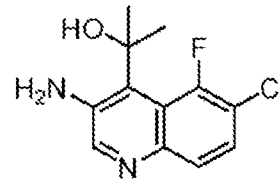
I-43



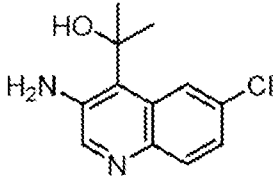
I-44



I-45



I-46



I-47

En algunas formas de realización, la presente invención proporciona cualquier compuesto según se reivindica que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, o trece átomos de deuterio.

En algunas formas de realización, los compuestos proporcionados comprenden deuterio en una cantidad de aproximadamente el 5%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, o aproximadamente el 100%. Como se usa en el presente documento en el contexto de enriquecimiento con deuterio, el término "aproximadamente" significa $\pm 2\%$.

En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona cualquier compuesto como se reivindica, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona cualquier compuesto como se reivindica en forma aislada.

4. *Usos de compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables de los mismos*

Se encuentra que ciertos compuestos descritos en el presente documento son útiles en captar aldehídos tóxicos, tales como MDA y HNE. Los compuestos descritos en el presente documento experimentan una condensación de base de Schiff con MDA, HNE u otros aldehídos tóxicos, y forman un complejo con los aldehídos en una reacción energéticamente favorable, disminuyendo o eliminando de esta manera aldehídos disponibles para reacción con una proteína, lípido, hidrato de carbono o ADN. De forma importante, los compuestos descritos en el presente documento pueden reaccionar con aldehídos para formar un compuesto que tiene una estructura de anillo cerrado que contiene los aldehídos, atrapando así los aldehídos y previniendo que los aldehídos se liberen de vuelta al medio celular.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar", y "que trata" se refieren a revertir, aliviar, retrasar el inicio de, o inhibir la evolución de una enfermedad o trastorno, o uno o más síntomas de la misma, como se describe en el presente documento. En algunas formas de realización, el tratamiento se administra después de que uno o más síntomas se hayan desarrollado. En otras formas de realización, el tratamiento se administra en ausencia de síntomas. Por ejemplo, el tratamiento se administra a un individuo susceptible antes del inicio de los síntomas (por ejemplo, a la luz de unos antecedentes de síntomas y/o a la luz de factores de susceptibilidad genéticos u otros). El tratamiento también sigue después de que los síntomas se hayan resuelto, por ejemplo, para prevenir, retrasar o minimizar la gravedad de su recurrencia.

La invención se refiere a compuestos descritos en el presente documento para el tratamiento, prevención, y/o reducción de un riesgo de enfermedades, trastornos, o afecciones en las que la toxicidad de aldehídos está implicada en la patogénesis.

Los ejemplos de las enfermedades, trastornos, o afecciones en las que la toxicidad de aldehídos está implicada incluyen una enfermedad, trastorno o afección ocular, incluyendo, pero no limitado a, una enfermedad corneal (por ejemplo, síndrome de ojo seco, cataratas, queratocono, queratopatía bullosa y otras, y distrofia endotelial de Fuch), otros trastornos o afecciones oculares (por ejemplo, conjuntivitis alérgica, penfigoide cicatricial ocular, afecciones asociadas con cicatrización de PRK y otras cicatrizaciones corneales, y afecciones asociadas con degradación de los lípidos de las lágrimas o disfunción de la glándula lacrimal), y otras afecciones oculares asociadas con altos niveles

de aldehídos como resultado de inflamación (por ejemplo, uveítis, escleritis, síndrome de Stevens-Johnson ocular, rosácea ocular (con o sin disfunción de la glándula meibomiana)). En un ejemplo, la enfermedad, trastorno o afección ocular no es degeneración macular, tal como degeneración macular senil ("AMD"), o enfermedad de Stargardt. En un ejemplo adicional, la enfermedad, trastorno o afección ocular es síndrome de ojo seco, rosácea ocular o uveítis.

Los ejemplos de las enfermedades, trastornos, afecciones o indicaciones en las que la toxicidad de aldehídos está implicada también incluyen trastornos no oculares, incluyendo psoriasis, lupus tóxico (discoide), dermatitis de contacto, dermatitis atópica, dermatitis alérgica, dermatitis de radiación, acné vulgar, síndrome de Sjogren-Larsson y otras ictiosis, elastosis solar/arrugas, firmeza del tono de la piel, hinchazón, eccema, cambios en la piel inducidos por tabaco o irritantes, incisión dérmica, una afección de la piel asociada a quemadura y/o herida, lupus, esclerodermia, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, septicemia, aterosclerosis, lesión isquémica-reperusión, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, deficiencia en semialdehído succínico deshidrogenasa, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, diabetes, síndrome metabólico, trastornos seniles, y enfermedades fibróticas. En un ejemplo adicional, el trastorno no ocular es una enfermedad, trastorno, o afección de la piel seleccionada de dermatitis de contacto, dermatitis atópica, dermatitis alérgica, y dermatitis de radiación. En otro ejemplo, el trastorno no ocular es una enfermedad, trastorno, o afección de la piel seleccionada de síndrome de Sjogren-Larsson y una indicación cosmética asociada con quemadura y/o herida.

En un ejemplo adicional, las enfermedades, trastornos, o afecciones en las que la toxicidad de aldehídos está implicada es un trastorno senil. Los ejemplos de enfermedades, trastornos o afecciones seniles incluyen arrugas, sequedad y pigmentación de la piel.

Los ejemplos de las enfermedades, trastornos o afecciones en las que la toxicidad de aldehídos está implicada además incluyen afecciones asociadas con los ejemplos tóxicos de agentes vesicantes, o quemaduras de agentes alcalinos. Los compuestos descritos en el presente documento disminuyen o eliminan los aldehídos tóxicos y de esta manera tratan, previenen y/o reducen un riesgo de estas enfermedades o trastornos.

En una forma de realización, la invención se refiere al tratamiento, prevención y/o reducción de un riesgo de una enfermedad, trastorno o afección ocular en la que la toxicidad de aldehídos está implicada en la patogénesis, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de ello un compuesto descrito en el presente documento. La enfermedad, trastorno, o afección ocular incluye, pero no está limitada a, una enfermedad corneal (por ejemplo, síndrome de ojo seco, cataratas, queratocono, queratopatía bullosa y otras, y distrofia endotelial de Fuch), otros trastornos o afecciones oculares (por ejemplo, conjuntivitis alérgica, penfigoide cicatricial ocular, afecciones asociadas con cicatrización de PRK y otras cicatrizaciones corneales, y afecciones asociadas con degradación de los lípidos de las lágrimas o disfunción de la glándula lacrimal), y otras afecciones oculares donde la inflamación produce altos niveles de aldehídos (por ejemplo, uveítis, escleritis, síndrome de Stevens-Johnson ocular, rosácea ocular (con o sin disfunción de la glándula meibomiana)). La enfermedad, trastorno o afección ocular no incluye degeneración macular, tal como AMD, o enfermedad de Stargardt. En una ilustración, en la enfermedad, trastorno o afección ocular la cantidad o concentración de MDA o HNE está aumentada en los tejidos o células oculares. Por ejemplo, la cantidad o concentración de aldehídos (por ejemplo, MDA o HNE) está aumentada en al menos 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 5 veces, 10 veces comparada con esa en tejidos o células oculares normales. Los compuestos descritos en el presente documento, tal como el compuesto 9, disminuyen la concentración de aldehídos (por ejemplo, MDA y HNE) de una manera dependiente del tiempo. La cantidad o concentración de aldehídos (por ejemplo, MDA o HNE) se puede medir por método o técnicas conocidos en la materia, tal como las descritas en Tukožkan *et al.*, *Furat Tip Dergisi* 11: 88-92 (2006).

En una clase, la enfermedad, trastorno o afección ocular es síndrome de ojo seco. En una segunda clase, la enfermedad, trastorno o afección ocular es una afección asociada con cicatrización de PRK y otra cicatrización corneal. Por ejemplo, la invención se dirige a avanzar la cicatrización de PRK u otra cicatrización corneal, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de ello un compuesto descrito en el presente documento. En una tercera clase, la enfermedad, trastorno o afección ocular es una afección ocular asociada con altos niveles de aldehídos como resultado de inflamación (por ejemplo, uveítis, escleritis, síndrome de Stevens-Johnson ocular, y rosácea ocular (con o sin disfunción de la glándula meibomiana)). En una cuarta clase, la enfermedad, trastorno o afección ocular es queratocono, cataratas, queratopatía bullosa y otra, distrofia endotelial de Fuch, penfigoide cicatricial ocular o conjuntivitis alérgica. El compuesto descrito en el presente documento se puede administrar por vía tópica o sistémica, como se describe en el presente documento posteriormente.

En una segunda forma de realización, la invención se refiere al tratamiento, prevención, y/o reducción de un riesgo de un trastorno o afección de la piel o una indicación cosmética, en la que la toxicidad de aldehídos está implicada en la patogénesis, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de ello un compuesto descrito en el presente documento. El trastorno o afección de la piel incluye, pero no está limitado a, psoriasis, esclerodermia, lupus tóxico (discoide), dermatitis de contacto, dermatitis atópica, dermatitis alérgica, dermatitis de radiación, acné vulgar, y síndrome de Sjogren-Larsson y otras ictiosis, y la indicación cosmética es elastosis solar/arrugas, firmeza del tono de la piel, hinchazón, eccema, cambios en la piel inducidos por tabaco o irritantes, incisión dérmica, o una afección de la piel asociada a quemadura y/o herida. En algunas formas de realización, la invención se refiere a enfermedades, trastornos, o afecciones seniles de la piel, como se describe en el presente documento.

Varios trastornos o afecciones de la piel, tal como dermatitis atópica, lupus tónico (discoide), psoriasis y esclerodermia, se caracterizan por altos niveles de MDA y HNE (Br J Dermatol 149: 248 (2003); JEADV 26: 833 (2012); Clin Rheumatol 25: 320 (2006)). Además, la ictiosis característica del síndrome de Sjogren-Larsson (SLS) se origina de la acumulación de aldehydos grasos, que perturba la función normal y la secreción de cuerpos lamelares (LB), y produce depósitos de lípidos intercelulares en el estrato córneo (SC) y una barrera de agua defectuosa en la capa de la piel (W.B. Rizzo *et al.* (2010)). La enzima, aldehydo graso deshidrogenasa, que metaboliza los aldehydos es disfuncional en pacientes de SLS. Por tanto, los compuestos que reducen o eliminan los aldehydos, tal como los compuestos descritos en el presente documento, se pueden usar para tratar, prevenir, y/o reducir un riesgo de trastornos o afecciones de la piel en las que la toxicidad de los aldehydos está implicada en la patogénesis, tal como las descritas en el presente documento. Además, con una mejora respecto a la barrera de agua y la prevención de inflamación mediada por aldehydos (incluyendo fibrosis y elastosis (Chairpotto *et al.* (2005)), muchas indicaciones cosméticas, tal como elastosis solar/arrugas, tono de piel, firmeza (hinchazón), eccema, cambios en la piel inducidos por tabaco o irritantes y cosmesis de incisión dérmica, y afecciones de la piel asociadas con quemadura y/o herida se pueden tratar usando el método de la invención.

En una clase, la enfermedad, trastorno o afección de la piel es psoriasis, esclerodermia, lupus tónico (discoide), dermatitis de contacto, dermatitis atópica, dermatitis alérgica, dermatitis de radiación, acné vulgar, o síndrome de Sjogren-Larsson y otras ictiosis. En una ejemplificación, la enfermedad, trastorno o afección de la piel es dermatitis de contacto, dermatitis atópica, dermatitis alérgica, dermatitis de radiación, o síndrome de Sjogren-Larsson y otras ictiosis. En una segunda clase, la indicación cosmética es elastosis solar/arrugas, firmeza del tono de la piel, hinchazón, eccema, cambios en la piel inducidos por tabaco o irritantes, incisión dérmica, o una afección de la piel asociada a quemadura y/o herida.

En una tercera forma de realización, la invención se refiere al tratamiento, prevención, y/o reducción de un riesgo de una afección asociada con los efectos tóxicos de agentes vesicantes o quemaduras de agentes alcalinos en las que la toxicidad de aldehydos está implicada en la patogénesis, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de ello un compuesto descrito en el presente documento.

Los agentes vesicantes incluyen, pero no están limitados a, mostaza de azufre, mostaza de nitrógeno, y oxima de fosgeno. Los efectos tóxicos o lesivos de agentes vesicantes incluyen dolor, irritación, y/o desgarro en la piel, ojo y/o mucosa, y conjuntivitis y/o daño corneal al ojo. La mostaza de azufre es el compuesto sulfuro de bis(2-cloroetilo). La mostaza de nitrógeno incluye los compuestos bis(2-cloroetil)etilamina, bis(2-cloroetil)metilamina, y tris(2-cloroetil)amina. La mostaza de azufre o sus análogos pueden causar un aumento en el estrés oxidativo, y en particular los niveles de HNE, y al agotar el sistema de defensa antioxidante y por tanto aumentar la peroxidación de lípidos, puede inducir una respuesta de estrés oxidativo y por tanto aumentar los niveles de aldehydo (Jafari *et al.* (2010); Pal *et al.* (2009)). Los antioxidantes, tal como silibinina, cuando se aplican por vía tónica, atenúan la lesión en la piel inducida de la exposición a mostaza de azufre o sus análogos, y las actividades aumentadas de las enzimas antioxidantes pueden ser una respuesta compensatoria a especies de oxígeno reactivo generadas por la mostaza de azufre. (Jafari *et al.* (2010); Tewari-Singh *et al.* (2012)). Además, la intervención para reducir las especies de radicales libres era un tratamiento eficaz, post-exposición, para lesión pulmonar inducida por fosgeno (Sciuto *et al.* (2004)). Por tanto, los compuestos que disminuyen o eliminan aldehydos, tal como los compuestos descritos en el presente documento, se pueden usar para tratar, prevenir, y/o reducir el riesgo de una afección asociada con los efectos tóxicos de agentes vesicantes, tal como mostaza de azufre, mostaza de nitrógeno, y oxima de fosgeno.

Los agentes alcalinos incluyen, pero no están limitados a, cal, lejía, amoníaco, y desatascadores. Los compuestos que reducen o eliminan aldehydos, tal como los compuestos descritos en el presente documento, se pueden usar para tratar, prevenir, y/o reducir el riesgo de una afección asociada con quemaduras de un agente alcalino.

En una cuarta forma de realización, la invención se refiere al tratamiento, prevención, y/o reducción de un riesgo de una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria, mediada por inmunidad, inflamatoria, cardiovascular o neurológica, o síndrome metabólico, o diabetes, en la que la toxicidad de aldehydos está implicada en la patogénesis, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de ello un compuesto descrito en el presente documento. La enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria o mediada por inmunidad incluye, pero no está limitada a, lupus, esclerodermia, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), y artritis reumatoide. La enfermedad, trastorno o afección inflamatoria incluye, pero no está limitada a, artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), septicemia, y fibrosis (por ejemplo, fibrosis renal, hepática, pulmonar y cardíaca). La enfermedad, trastorno o afección cardiovascular incluye, pero no está limitada a, aterosclerosis y lesión isquémica-reperusión. La enfermedad, trastorno o afección neurológica incluye, pero no está limitada a, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, deficiencia en semialdehydo succínico deshidrogenasa, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, y los aspectos neurológicos del síndrome de Sjogren-Larsson (retraso cognitivo y espasticidad).

Un experto en la materia entendería que la enfermedad, trastorno o afección enumerada en el presente documento puede implicar más de un mecanismo patológico. Por ejemplo, una enfermedad, trastorno o afección enumerada en el presente documento puede implicar disregulación en la respuesta inmunológica y respuesta inflamatoria. Por tanto,

la categorización anterior de una enfermedad, trastorno o afección no es absoluta, y la enfermedad, trastorno o afección se puede considerar una enfermedad, trastorno o afección inmunológica, inflamatoria, cardiovascular, neurológica, y/o metabólica.

5 Se encontró que los individuos con deficiencias en la aldehído deshidrogenasa tienen altos niveles de aldehídos y riesgo aumentado de enfermedad de Parkinson (PNAS 110:636 (2013)) y enfermedad de Alzheimer (BioChem Biophys Res Commun. 273:192 (2000)). En la enfermedad de Parkinson, los aldehídos específicamente interfieren con la fisiología de la dopamina (Free Radic Biol Med, 51: 1302 (2011); Mol Aspects Med, 24: 293 (2003); Brain Res, 1145: 150 (2007)). Además, los niveles de aldehídos están elevados en esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades autoinmunitarias tales como lupus, artritis reumatoide, lupus, psoriasis, esclerodermia, y enfermedades fibróticas, y niveles aumentados de HNE y MDA están implicados en la evolución de aterosclerosis y diabetes (J. Cell. Mol. Med., 15: 1339 (2011); Arthritis Rheum 62: 2064 (2010); Clin Exp Immunol, 101: 233 (1995); Int J Rheum Dis, 14: 325 (2011); JEADV 26: 833 (2012); Clin Rheumatol 25: 320 (2006); Gut 54: 987 (2005); J Am Soc Nephrol 20: 2119 (2009)). MDA además está implicado en la formación aumentada de células de espuma que producen aterosclerosis (Leibundgut *et al.*, Current Opinion in Pharmacology 13: 168 (2013)). Además, la toxicidad relacionada con aldehídos desempeña un papel importante en la patogénesis de muchas enfermedades pulmonares inflamatorias, tal como asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Bartoli *et al.*, Mediators of Inflammation 2011, Artículo 891752). Por tanto, los compuestos que disminuyen o eliminan aldehídos, tal como los compuestos descritos en el presente documento, se pueden usar para tratar, prevenir y/o reducir un riesgo de una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria, mediada por inmunidad, inflamatoria, cardiovascular o neurológica, o síndrome metabólico, o diabetes. Por ejemplo, los compuestos descritos en el presente documento previenen la muerte celular mediada por aldehídos en neuronas. Además, los compuestos descritos en el presente documento disminuyen un amplio espectro de citoquinas proinflamatorias y/o aumentan las citoquinas antiinflamatorias, que indica que los compuestos descritos en el presente documento son útiles en tratar enfermedades inflamatorias, tal como esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica.

Como se ha discutido anteriormente, una composición divulgada se puede administrar a un sujeto con el fin de tratar o prevenir degeneración macular y otras formas de enfermedad retiniana cuya etiología implica la acumulación de A2E y/o lipofuscina. Otras enfermedades, trastornos, o afecciones caracterizadas por la acumulación de A2E se pueden tratar de forma similar.

En una forma de realización, un compuesto que reduce la formación de A2E se administra a un sujeto. Por ejemplo, el compuesto puede competir con PE para la reacción con *trans*-RAL, reduciendo de esta manera la cantidad de A2E formado. En otra forma de realización, un compuesto que previene la acumulación de A2E se administra a un sujeto. Por ejemplo, el compuesto compite con tanto éxito con PE para la reacción con *trans*-RAL, no se forma A2E.

Los individuos que se van a tratar están en tres grupos: (1) los que están clínicamente diagnosticados con degeneración macular u otras formas de enfermedad retiniana, cuya etiología implica la acumulación de A2E y/o lipofuscina en la base de deficiencias visuales (incluyendo, pero no limitado a, adaptación a la oscuridad, sensibilidad de contraste y agudeza) determinado por examen visual y/o electroretinografía, y/o salud retiniana indicada por examen fundoscópico del tejido retiniano y RPE para acumulaciones de drusas, atrofia de tejido y/o fluorescencia de lipofuscina; (2) los que son presintomáticos para enfermedad degenerativa macular, pero se piensa que están en riesgo basado en resultados anómalos de cualquiera o todas de las mismas medidas; y (3) los que son presintomáticos, pero se piensa que están en riesgo genéticamente basado en antecedentes familiares de enfermedad degenerativa macular y/o resultados de genotipado que muestran uno o más alelos o polimorfismos asociados con la enfermedad. Las composiciones se administran por vía tópica o sistémica una o más veces al mes, semana o día. Las dosis se pueden seleccionar para evitar efectos secundarios, si hay alguno, sobre el rendimiento visual en la adaptación a la oscuridad. El tratamiento se sigue durante un periodo de al menos uno, tres, seis, o doce o más meses. Los pacientes se pueden ensayar a intervalos de uno, tres, seis, o doce meses o más largos para evaluar la seguridad y eficacia. La eficacia se mide por examen de rendimiento visual y salud retiniana como se ha descrito anteriormente.

En una forma de realización, un sujeto se diagnostica como que tiene síntomas de degeneración macular, y después se administra un compuesto divulgado. En otra forma de realización, se puede identificar un sujeto como que está en riesgo de desarrollar degeneración macular (los factores de riesgo incluyen antecedentes de fumar, edad, género femenino, y antecedentes familiares), y después se administra un compuesto divulgado. En otra forma de realización, un sujeto puede tener AMD seca en ambos ojos, y después se administra un compuesto divulgado. En otra forma de realización, un sujeto puede tener AMD húmeda en un ojo, pero AMD seca en el otro ojo, y después se administra un compuesto divulgado. En aun otra forma de realización, un sujeto se puede diagnosticar como que tiene enfermedad de Stargardt y después se administra un compuesto divulgado. En otra forma de realización, un sujeto se diagnostica como que tiene síntomas de otras formas de enfermedad retiniana en la que la etiología implica la acumulación de A2E y/o lipofuscina, y después se administra el compuesto. En otra forma de realización, un sujeto se puede identificar como que está en riesgo para desarrollar otras formas de enfermedad retiniana en la que la etiología implica la acumulación de A2E y/o lipofuscina, y después se administra el compuesto divulgado. En algunas formas de realización, un compuesto se administra profilácticamente. En algunas formas de realización, un sujeto ha sido diagnosticado como que tiene la enfermedad antes de que el daño retiniano sea aparente. Por ejemplo, se encuentra que un sujeto porta una mutación génica para ABCA4 y se diagnostica que está en riesgo para enfermedad de

Stargardt antes de que se manifieste cualquier signo oftalmológico, o se encuentra que un sujeto tiene cambios maculares tempranos indicativos de degeneración macular antes de que el sujeto sea consciente de cualquier efecto sobre la visión. En algunas formas de realización, un sujeto humano puede saber que está en necesidad de tratamiento o prevención de degeneración macular.

5 En algunas formas de realización, un sujeto se puede seguir durante la duración de la degeneración macular. Un sujeto se puede seguir en una variedad de maneras, tal como examen ocular, examen del ojo dilatado, examen fundoscópico, prueba de agudeza visual, y/o biopsia. El seguimiento se puede realizar en una variedad de momentos. Por ejemplo, un sujeto se puede seguir después de que se administre un compuesto. El seguimiento se puede producir, por ejemplo, un día, una semana, dos semanas, un mes, dos meses, seis meses, un año, dos años, cinco años o cualquier otro periodo de tiempo después de la primera administración del compuesto. Un sujeto se puede seguir repetidamente. En algunas formas de realización, la dosis de un compuesto se puede alterar en respuesta al seguimiento.

15 En algunas formas de realización, los métodos divulgados se pueden combinar con otros métodos para tratar o prevenir la degeneración macular u otras formas de enfermedad retiniana en la que la etiología implica la acumulación de A2E y/o lipofuscina, tal como terapia fotodinámica. Por ejemplo, un paciente se puede tratar con más de una terapia para una o más enfermedades o trastornos. Por ejemplo, un paciente puede tener un ojo afectado con una forma seca de DME, que se trata con un compuesto de la invención, y el otro ojo afectado con una forma húmeda de DME, que se trata con, por ejemplo, terapia fotodinámica.

20 En algunas formas de realización, un compuesto para tratar o prevenir la degeneración macular u otras formas de enfermedad retiniana cuya etiología implica la acumulación de A2E y/o lipofuscina se puede administrar crónicamente. El compuesto se puede administrar a diario, más de una vez al día, dos veces a la semana, tres veces a la semana, semanalmente, bisemanalmente, mensualmente, bimensualmente, semianualmente, anualmente, y/o bianualmente.

25 La esfingosina 1-fosfato, una molécula de señalización bioactiva con diversas funciones celulares, es degradada irreversiblemente por la enzima del retículo endoplásmico esfingosina 1-fosfato liasa, generando trans-2-hexadecenal y fosfoetanolamina. Se ha demostrado que el trans-2-hexadecenal produce reorganización del citoesqueleto, separación y apoptosis en múltiples tipos celulares a través de la ruta dependiente de JNK. Véase, *Biochem Biophys Res Commun.* 20 Jul 2012;424(1):1821. Estos hallazgos y la química conocida de aldehídos α,β -insaturados relacionados aumenta la posibilidad de que trans-2-hexadecenal interaccione con componentes celulares adicionales. Se mostró que reacciona fácilmente con desoxiguanosina y ADN para producir los aductos de 1,N(2)-desoxiguanosina diastereoméricos cíclicos 3-(2-desoxi- β -d-eritro-pentofuranosil)-5,6,7,8-tetrahidro-8R-hidroxi-6R-tridecilpirimido[1,2-a]purina-10(3H)ona y 3-(2-desoxi- β -d-eritro-pentofuranosil)-5,6,7,8-tetrahidro-8S-hidroxi-6S-tridecilpirimido[1,2-a]purina-10(3H)ona. Estos hallazgos demuestran que el trans-2-hexadecenal producido endógenamente por esfingosina 1-fosfato liasa reacciona directamente con ADN, formando aductos de ADN derivados de aldehído con consecuencias potencialmente mutagénicas.

30 La deficiencia en semialdehído succínico deshidrogenasa (SSADHD), también conocida como aciduria 4-hidroxi-butírica o aciduria gamma-hidroxi-butírica, es el trastorno autosómico recesivamente heredado más prevalente del metabolismo de GABA (Vogel *et al.* 2013), manifiesta un fenotipo de retraso del desarrollo e hipotonía en la primera infancia, y deterioro del lenguaje expresivo grave y trastorno obsesivo-compulsivo en la adolescencia y edad adulta. Se produce epilepsia en la mitad de los pacientes, habitualmente como convulsiones tónicas-clónicas generalizadas, aunque algunas veces se producen convulsiones de ausencia y mioclónicas (Pearl *et al.* 2014). Más de dos tercios de los pacientes manifiestan problemas neuropsiquiátricos (es decir, TDAH, TOC y agresión) en la adolescencia y edad adulta, que puede ser discapacitante. Metabólicamente, hay una acumulación del neurotransmisor inhibitor principal, GABA, y gamma-hidroxi-butirato (GHB), un ácido monocarboxílico neuromodulador (Snead y Gibson 2005). Además, varios otros intermedios específicos a este trastorno se han detectado tanto en pacientes como en el modelo murino correspondiente. La vigabatrina (VGB, γ -vinil-GABA), un inhibidor irreversible de GABA-transaminasa, es una elección lógica para el tratamiento de la deficiencia en SSADH porque prevendrá la conversión de GABA a GHB. Los resultados han sido mixtos, y en pacientes seleccionados el tratamiento ha producido deterioro (Good 2011; Pellock 2011; Escalera *et al.* 2010; Casarano *et al.* 2011; Matern *et al.* 1996; Al-Essa *et al.* 2000). La terapia dirigida para la deficiencia en SSADH permanece elusiva y las intervenciones paliativas.

55 5. Composiciones farmacéuticamente aceptables

Los compuestos y composiciones, según el método de la presente invención, se administran usando cualquier cantidad y cualquier ruta de administración eficaz para tratar o disminuir la gravedad de un trastorno proporcionado anteriormente. La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad, y estado general del sujeto, la gravedad de la infección, el agente particular, su modo de administración, y similares. Los compuestos de la invención, preferiblemente se formulan en una forma posológica unitaria para facilidad de administración y uniformidad de la dosis. La expresión "forma posológica unitaria" como se usa en el presente documento se refiere a una unidad físicamente discreta de agente apropiado para el paciente que se va a tratar. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención los decidirá el médico dentro del ámbito del juicio médico racional. El nivel de dosis eficaz específico para cualquier

paciente u organismo particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno que se trata y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, ruta de administración, y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención se pueden administrar a seres humanos u otros animales por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, pomadas o gotas), yugal, como un espray oral o nasal, o similares, dependiendo de la gravedad de la infección que se trata. En ciertas formas de realización, los compuestos de la invención se administran por vía oral o parenteral a niveles posológicos desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg y preferiblemente desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg, de peso corporal de sujeto al día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado.

Las formas posológicas líquidas para la administración oral incluyen, pero no están limitadas a, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas posológicas líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica tal como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tal como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencilico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino, y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tal como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes y perfumantes.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles se pueden formular según la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o solvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer, solución de cloruro de sodio U.S.P. e isotónica. Además, aceites no volátiles estériles se emplean convencionalmente como un solvente o medio de suspensión. Para este fin, cualquier aceite no volátil blando se puede emplear incluyendo mono- y diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tal como ácido oleico se usan en la preparación de inyectables.

Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro que retiene bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes del uso.

Con el fin de prolongar el efecto de un compuesto de la presente invención, con frecuencia es deseable ralentizar la absorción del compuesto de inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de un material cristalino o amorfo con mala solubilidad en agua. La velocidad de absorción del compuesto después depende de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retrasada de una forma compuesta administrado por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el compuesto en un vehículo oleaginoso. Las formas de depósito inyectables se hacen formando matrices de microcápsulas del compuesto en polímeros biodegradables tal como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la proporción de compuesto respecto a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, la velocidad de liberación del compuesto se puede controlar. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables en depósito también se preparan atrapando el compuesto en liposomas o microemulsiones que son compatibles con tejidos corporales.

Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que se pueden preparar mezclando los compuestos de esta invención con excipientes o soportes no irritantes adecuados tal como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio que son sólidos a temperatura ambiente, pero líquidos a la temperatura corporal y por tanto se funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan el compuesto activo.

Las formas posológicas sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas posológicas sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o soporte inerte, farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o a) rellenos o extensores tal como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico, b) aglutinantes tal como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa, y goma arábiga, c) humectantes tal como glicerol, d) agentes disgregantes tal como agar-agar, carbonato de calcio, fécula de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato de sodio, e) agentes retardantes de solución tal como parafina, f) aceleradores de absorción tal como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humidificadores tal como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tal como caolín y arcilla bentonita, e i) lubricantes tal como talco,

estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma posológica también puede contener agentes tamponantes.

5 También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina blandas y duras rellenas que usan tales excipientes como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas posológicas sólidas de comprimidos, grajeas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y revestimientos tal como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en el arte de la formulación farmacéutica. Opcionalmente pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una composición que liberan el/los principio(s) activo(s) solo, o preferentemente, en una cierta parte del aparato digestivo, opcionalmente, de una manera retrasada. Los ejemplos de composiciones que embeben que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina blandas y duras rellenas que usan tales excipientes como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

15 Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes indicados anteriormente. Las formas posológicas sólidas de comprimidos, grajeas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y revestimientos tal como recubrimientos entéricos, recubrimientos que controlan la liberación y otros recubrimientos bien conocidos en el arte de la formulación farmacéutica. En tales formas posológicas sólidas el compuesto activo se puede mezclar con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Tales formas posológicas también pueden comprender, como es práctica normal, sustancias adicionales diferentes de diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes de compresión y otras ayudas de compresión tal como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas posológicas también pueden contener agentes tamponantes. Opcionalmente pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una composición que liberan el/los principio(s) activo(s) solo, o preferentemente, en una cierta parte del aparato digestivo, opcionalmente, de una manera retrasada. Los ejemplos de composiciones que embeben que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Las formas posológicas para la administración tópica o transdérmica de un compuesto de esta invención incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, espráis, inhalantes o parches. El componente activo se mezcla en condiciones estériles con un soporte farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o tampón necesario como se pueda requerir. También se contempla que una formulación oftálmica, gotas para los oídos, gotas para los ojos están dentro del ámbito de esta invención. Además, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, que tienen la ventaja añadida de proporcionar administración controlada de un compuesto al cuerpo. Tales formas posológicas se pueden hacer disolviendo o dispensando el compuesto en el medio apropiado. También se pueden usar potenciadores de absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad se puede controlar o bien proporcionando una membrana de control de la velocidad o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel.

40 Los compuestos de la invención también se pueden administrar por vía tópica, tal como directamente al ojo, por ejemplo, como un colirio o pomada oftálmica. Las gotas para los ojos típicamente comprenden una cantidad eficaz de al menos un compuesto de la invención y un soporte capaz de aplicarse con seguridad a un ojo. Por ejemplo, las gotas para los ojos están en forma de una solución isotónica, y el pH de la solución se ajusta de modo que no hay irritación del ojo. En muchos casos, la barrera epitelial interfiere con la penetración de moléculas en el ojo. Por tanto, los fármacos oftálmicos más actualmente usados se suplementan con alguna forma de potenciador de penetración. Estos potenciadores de penetración funcionan aflojando las uniones estrechas de las células endoteliales más superiores (Burstein, 1985, Trans Ophthalmol Soc U K 104(Pt 4): 402-9; Ashton *et al.*, 1991, J Pharmacol Exp Ther 259(2): 719-24; Green *et al.*, 1971, Am J Ophthalmol 72(5): 897-905). El potenciador de penetración más comúnmente usado es cloruro de benzalconio (Tang *et al.*, 1994, J Pharm Sci 83(1): 85-90; Burstein *et al.*, 1980, Invest Ophthalmol Vis Sci 19(3): 308-13), que también funciona como conservante contra la contaminación microbiana. Típicamente se añade a una concentración final del 0,01-0,05%.

El término "muestra biológica", como se usa en el presente documento incluye, sin limitación, cultivos celulares o extractos de los mismos; material de biopsia obtenido de un mamífero o extractos del mismo; y sangre, saliva, orina, heces, semen, lágrimas, u otros fluidos corporales o extractos de los mismos.

55 Todas las características de cada uno de los aspectos de la invención aplican a todos los otros aspectos *mutatis mutandis*.

60 Con el fin de que la invención descrita en el presente documento se entienda más completamente, se exponen los siguientes ejemplos.

Ejemplificación

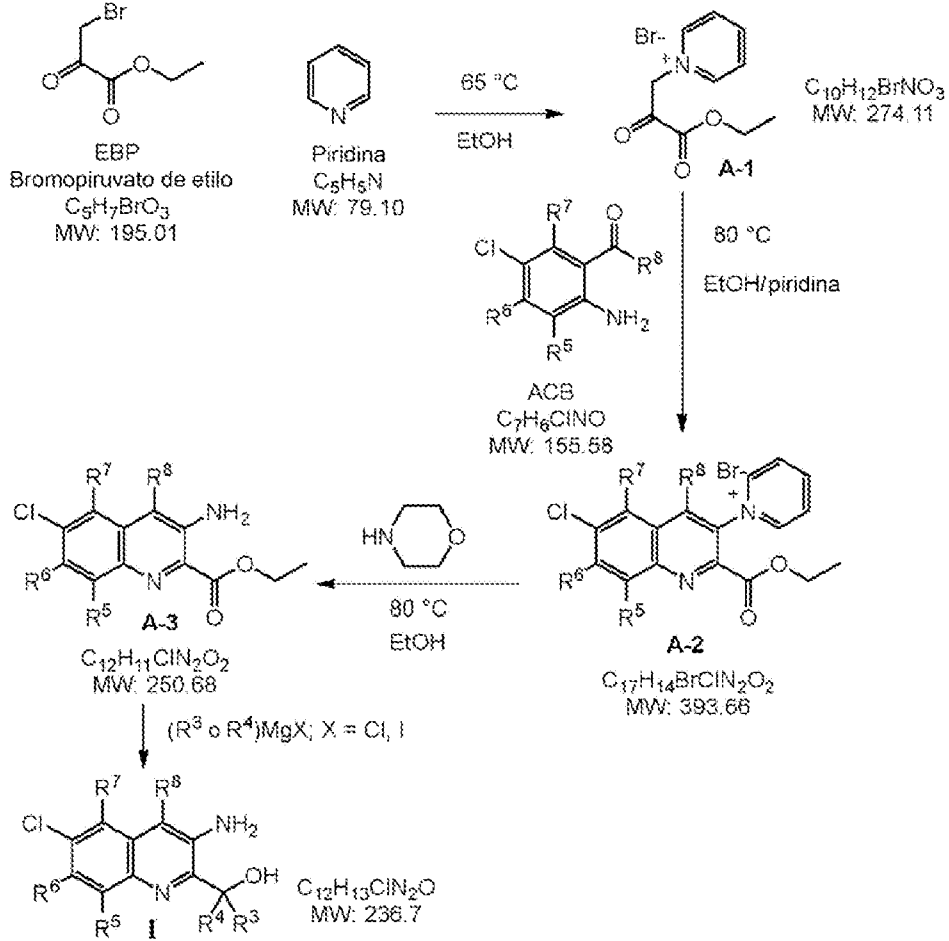
65 Como se representa en los ejemplos posteriores, en ciertas formas de realización ejemplares, los compuestos se preparan según los siguientes procedimientos generales. Se apreciará que, aunque los métodos generales representan la síntesis de ciertos compuestos de la presente invención, los siguientes métodos generales, y otros

métodos que conoce el experto en la materia, se pueden aplicar a todos los compuestos y subclases y especies de cada uno de estos compuestos, como se describe en el presente documento.

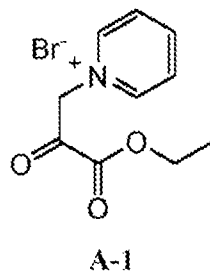
Ejemplo 1. Secuencia de reacción general para compuestos

5 Los agentes de captura de aldehídos marcados con deuterio se hicieron como se describe en la publicación de la solicitud de patente en EE UU US 2013/0190500, publicada el 23 de julio, 2013, opcionalmente usando intermediarios marcados con deuterio en los sitios indicados en el esquema 1. Los métodos ejemplares se describen más adelante.

10 Esquema 1

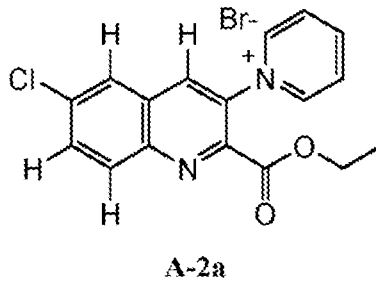


15 Ejemplo 2: Síntesis de A-1



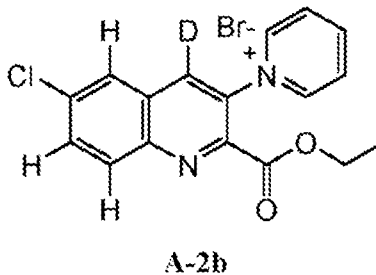
20 Bromuro de 1-(3-etoxi-2,3-dioxopropil)piridin-1-io. A un matraz de 2 l de fondo redondo se cargó etanol (220 ml) y piridina (31 g, 392 mmol), y la solución resultante se agitó a velocidad moderada de agitación en nitrógeno. A esta solución se añadió bromopiruvato de etilo (76,6 g, 354 mmol) en una corriente lenta, continua. La mezcla de reacción se dejó agitar a 65 ± 5°C durante 2 horas.

Ejemplo 3: Síntesis de A-2a



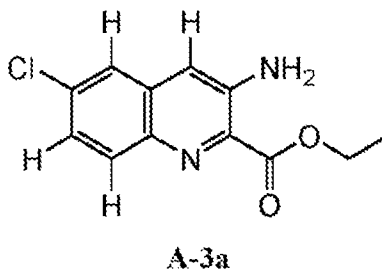
- 5 Bromuro de 1-(6-cloro-2-etoxicarbonil)quinolin-3-il)piridin-1-io. Tras la terminación del tiempo de agitación de 2 horas en el ejemplo 2, la mezcla de reacción se enfrió lentamente a 18-22°C. El matraz se purgó con vacío tres veces momento en el que se añadió 2-amino-5-cloro-benzaldehído (ACB) (50,0 g, 321 mmol) directamente al matraz de reacción como un sólido usando un embudo de plástico largo. Se añadió piridina (64,0 g, 809 mmol) seguido por un enjuague de EtOH (10 ml) y la mezcla de reacción se calentó a 80 ± 3°C en nitrógeno durante aproximadamente 16
- 10 horas (durante la noche) momento en que el análisis de HPLC indicado en la reacción se completó de forma eficaz.

Ejemplo 4: Síntesis de A-2b



- 15 Bromuro de 1-(6-cloro-2-etoxicarbonil)quinolin-3-il-4-d)piridin-1-io. El compuesto A-2b se prepara de una manera similar a A-2a (véase el ejemplo 3), sustituyendo 2-amino-5-cloro-benzaldehído (ACB) por 2-amino-5-cloro-benzaldehído-d.

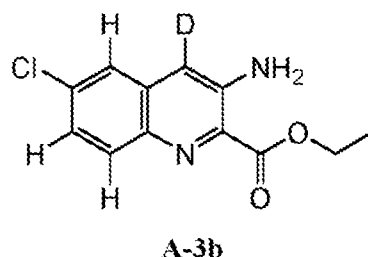
Ejemplo 5: Síntesis de A-3a



- 25 3-Amino-6-cloroquinolina-2-carboxilato de etilo. La mezcla de reacción del ejemplo 3 se enfrió a aproximadamente 70°C y se añadió morfolina (76,0 g, 873 mmol) al matraz de reacción de 2 l usando un embudo de adición. La mezcla de reacción se calentó a 80 ± 2°C durante aproximadamente 2,5 horas momento en el que la reacción se consideró completa por análisis de HPLC (el % de área de A-3a deja de aumentar). La mezcla de reacción se enfrió a 10-15°C para la extinción, finalización y aislamiento.

- 30 Al matraz de reacción de 2 l se cargó agua (600 g) usando el embudo de adición durante 30-60 minutos, manteniendo la temperatura por debajo de 15°C ajustando la velocidad de adición y usando un baño refrigerador. La mezcla de reacción se agitó durante 45 minutos adicionales a 10-15°C después A-3a crudo se aisló por filtración usando un embudo Buchner. La torta se lavó con agua (100 ml x 4) dejando cada vez percolar el agua a través de la torta antes de aplicar un vacío. La torta se secó al aire para proporcionar A-3a crudo como un sólido marrón casi seco. La torta se devolvió al matraz de reacción de 2 l y se añadieron heptano (350 ml) y EtOH (170 ml), y la mezcla se calentó a 70 ± 3°C durante 30-60 minutos. La suspensión se enfrió a 0-5°C y se aisló por filtración a vacío. El A-3a se secó en un
- 35 horno de secado de vacío al vacío y 35 ± 3°C durante la noche (16-18 horas) para proporcionar A-3a como un sólido verde oscuro.

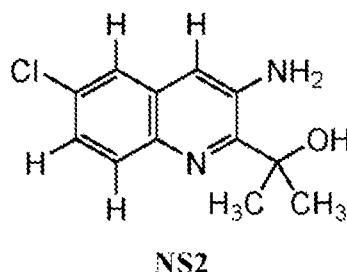
Ejemplo 6: Síntesis de A-3b



5 3-Amino-6-cloroquinolina-2-carboxilato-4-d de etilo. El compuesto A-3b se prepara de una manera similar al compuesto A-3a (véase el ejemplo 5), sustituyendo la mezcla de reacción de A-2a por la de A-2b.

Ejemplo 7: Síntesis de NS2

10



15 2-(3-Amino-6-cloroquinolin-2-il)propan-2-ol. A un matraz de fondo redondo de 2 l se cargó cloruro de magnesio (200 ml de una solución 3,0 M en THF, 600 mmol). La solución se enfrió a 0-5°C usando un baño de hielo.

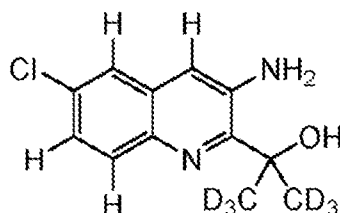
20 Un matraz de 500 ml (agitación magnética) se cargó con 22,8 gramos de A-3a del ejemplo 5 y THF (365 ml), se agitó para disolver, y después se transfirió a un embudo de adición en el matraz de reacción de 2 l. La solución de A-3a se añadió gota a gota al matraz de reacción durante 5,75 horas, manteniendo la temperatura del matraz de reacción entre 0-5°C a lo largo de la adición. Al final de la adición los contenidos del matraz se agitaron durante 15 minutos adicionales a 0-5°C después el baño refrigerador se retiró y la reacción se dejó agitar durante la noche a temperatura ambiente.

25 El matraz se enfrió en un baño de hielo y la mezcla de reacción se extinguió cuidadosamente añadiendo EtOH (39,5 g, 857 mmol) gota a gota a la mezcla de reacción, manteniendo la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de 15°C durante el curso de la adición. Una solución acuosa de NH₄Cl (84,7 g de NH₄Cl en 415 ml de agua) se añadió después cuidadosamente y la mezcla se agitó con agitación moderada durante aproximadamente 30 minutos después se transfirió a un embudo separador para dejar que las fases se separaran. Los sólidos estaban presentes en la fase acuosa por tanto se añadió HOAc (12,5 g) y los contenidos se dieron vueltas suavemente para obtener una fase acuosa inferior casi homogénea. La fase acuosa inferior se transfirió de vuelta al matraz de reacción de 2 l y se agitó con agitación moderada con 2-metilTHF (50 ml) durante aproximadamente 15 minutos. La fase orgánica superior original se redujo en volumen a aproximadamente 40 ml usando un evaporador giratorio a ≤ 40°C y vacío según fuera necesario. Las fases en el embudo separador se separaron y la fase de 2-metilTHF superior combinada con el residuo del producto, se transfirió a un matraz de 500 ml, y se destiló al vacío a un volumen aproximado de 25 ml. A este residuo se añadió 2-MeTHF (50 ml) y se destiló a un volumen aproximado de 50 ml. La solución del compuesto crudo NS2 se diluyó con 2-MeTHF (125 ml), se enfrió a 5-10°C, y se añadió lentamente H₂SO₄ 2 M (250 ml) y la mezcla se agitó durante 30 minutos según se dejaba que la temperatura volviera a ambiente. Se cargó heptano (40 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos adicionales después se transfirió a un embudo separador, y las fases se dejaron separar. La fase de producto acuosa inferior se extrajo con heptano adicional (35 ml), después la fase acuosa inferior se transfirió a un matraz de reacción de 1 l equipado con un agitador mecánico, y la mezcla se enfrió a 5-10°C. Las fases orgánicas combinadas se desecharon. Una solución de NaOH (ac.) al 25% se preparó (NaOH, 47 g, agua, 200 ml) y se añadió lentamente al matraz de reacción de 1 l para llevar el pH a un intervalo de 6,5-8,5.

45 Se añadió EtOAc (250 ml) y la mezcla se agitó durante la noche. La mezcla se transfirió a un embudo separador y la fase inferior se desechó. La fase orgánica superior se lavó con salmuera (25 ml), después la fase de producto orgánico superior se redujo en volumen en un evaporador rotatorio para obtener el compuesto crudo NS2 como un aceite oscuro que solidificó en unos pocos minutos. El compuesto crudo NS2 se disolvió en EtOAc (20 ml) y se filtró a través de un tapón de gel de sílice (23 g) eluyendo con heptano/EtOAc 3/1 hasta que todo el compuesto NS2 se eluyó (aproximadamente 420 ml requeridos) para retirar la mayoría del color oscuro del compuesto NS2. El solvente se eliminó al vacío para proporcionar 14,7 g de compuesto NS2 como un sólido oscuro. El compuesto NS2 se absorbió

en EtOAc (25 ml) y se eluyó a través de una columna de gel de sílice (72 g) usando un gradiente de fase móvil de heptano/EtOAc 7/1 a heptano/EtOAc 3/1 (1400 ml en total). Las fracciones de solvente que contenían compuesto NS2 se lavaron. El compuesto NS2 se diluyó con EtOAc (120 ml) y se agitó en un matraz con carbono decolorizante Darco G-60 (4,0 g) durante aproximadamente 1 hora. La mezcla se filtró a través de celite usando un embudo encajado, enjuagando la torta con EtOAc (3 x 15 ml). Los filtrados combinados se lavaron en un evaporador rotatorio y el compuesto NS2 se disolvió en heptano (160 ml)/EtOAc (16 ml) a 76°C. La solución homogénea se enfrió lentamente a 0-5°C, se mantuvo durante 2 horas, después el compuesto NS2 se aisló por filtración. Después de secar en un horno de vacío durante 5 horas a 35°C al mejor vacío, el compuesto NS2 se obtuvo como un sólido blanco. Pureza por HPLC: 100% (AUC); HPLC (usando condiciones estándar): A-2: 7,2 min; A-3: 11,6 min.

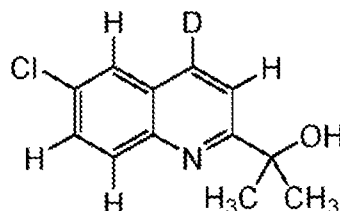
Ejemplo 8: Síntesis de I-1



I-1

2-(6-cloroquinolin-2-il)propan-1,1,1,3,3,3- d_6 -2-ol. El compuesto I-1 se preparó de una manera similar al compuesto NS2 (véase el ejemplo 7), sustituyendo el cloruro de metilmagnesio con yoduro de metil- d_3 -magnesio (99% atom de D). La reacción de A-3a con 5,3 mol equiv de yoduro de metil- d_3 -magnesio (99% atom de D) en éter/THF dio un rendimiento del 20% de I-1. MS (ESI): m/z 242,9 (M+1). ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7,80 (d, J = 6 Hz, 1H), 7,51 (d, J = 2 Hz, 1H), 7,33 (dd, J = 2 y 2 Hz, 1H), 7,07 (s, 1H), 4,68 (br s, 2H), 3,83 (br s, 1H); ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 154,3, 139,5, 139,1, 132,4, 130,6, 130,0, 126,3, 123,7, 116,4, 76,8, 74,9.

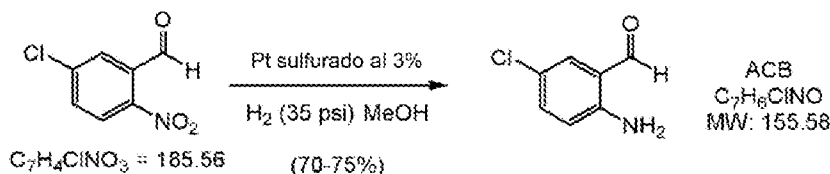
Ejemplo 9: Síntesis de I-2



I-2

2-(6-cloroquinolin-2-il-4-d)propan-2-ol. El compuesto I-2 se prepara de una manera similar al compuesto NS2 (véase el ejemplo 7), sustituyendo A-3a por A-3b.

Preparación de ACB



Después de establecer una atmósfera de N_2 y que una ligera corriente de N_2 fluyera a través del recipiente, platino, sulfurado, al 5% en peso sobre carbono, reducido, seco (9,04 g, 3,0% en peso frente al sustrato nitro) se añadió a un recipiente de presión con paredes pesadas de 5 l equipado con un gran agitador magnético de barra y un termopar. Se añadieron MeOH (1,50 l), 5-cloro-2-nitrobenzaldehído (302,1 g, 1,63 mol), más MeOH (1,50 l) y Na_2CO_3 (2,42 g, 22,8 mmol, 0,014 equiv). El matraz se selló y se inició la agitación a 450 rpm. La solución se evacuó y represurizó con N_2 (35 psi) 2x. El matraz se evacuó y represurizó con H_2 hasta 35 psi. La temperatura de la solución alcanzó 30°C en 20 min. La solución se enfrió después con un baño de agua. Se añadió hielo al baño de agua para mantener una temperatura por debajo de 35°C. Cada 2 h, la reacción se siguió evacuando y represurizando con N_2 (35 psi), 2x antes de abrir. El progreso de la reacción se pudo seguir por TLC: 5-cloro-2-nitrobenzaldehído (R_f = 0,60, CH_2Cl_2 , UV) y los

intermedios ($R_f = 0,51$, CH_2Cl_2 , UV y $R_f = 0,14$, CH_2Cl_2 , UV) se consumieron para dar ACB ($R_f = 0,43$, CH_2Cl_2 , UV). A las 5 h, la reacción había llegado al 98% de compleción (GC), y se consideró completa. A un embudo sinterizado medio de 3 l se añadió celite (aprox. 80 g). Esto se asentó con MeOH (aprox. 200 ml) y se secó con vacío. La solución reducida se transfirió a través de una cánula al embudo mientras se usaba vacío suave para arrastrar la solución a través del tapón de celite. Esto fue seguido con MeOH (150 ml x4). La solución se transfirió a un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 5 l. A 30°C en un rotavapor, el solvente (aprox. 2 l) se eliminó a presión reducida. Se aplicó una manta de N_2 . La solución se transfirió a un matraz de fondo redondo de cuatro cuellos de 5 l equipado con agitación mecánica y un embudo adicional. Se añadió agua (2,5 l) gota a gota a la solución en agitación vigorosa durante 4 h. La suspensión se filtró con una cantidad mínima de vacío. El sólido recogido se lavó con agua (1,5 l 2x), 2-propanol (160 ml) después hexanos (450 ml 2x). El sólido recogido (un sólido granular amarillo canario) se transfirió a una placa de recristalización de 150 X 75. El sólido se secó después a presión reducida (26-28 en Hg) a 40°C durante la noche en un horno de vacío. ACB (> 99% A por HPLC) se almacenó en una atmósfera de N_2 a 5°C.

Ejemplo 10: Ensayos *in vitro*

Ensayo de citotoxicidad de LDH

Se colocaron cultivos corticales de rata primarios en un incubador durante 24 o 48 horas y se trataron con varias concentraciones de los compuestos divulgados. Después 20 μl del medio de cultivo se retiran para un ensayo de LDH como se describe en Bergmeyer *et al.*, *Methods of Enzymatic Analysis*, 3ª ed. (1983).

Ensayo ELISA para determinar la cantidad de citoquinas circulantes

Ratones C57Bl/6 macho se dosifican con compuestos divulgados 30 minutos antes de que se expongan a LPS (20 mg/kg). Dos horas después de la exposición a LPS, se recoge sangre de los ratones y se realiza un ELISA para determinar la cantidad de citoquinas circulantes. El tratamiento con los compuestos divulgados produce una reducción en citoquinas proinflamatorias, tal como IL-5 e IL-1 β , IL-17 y TNF. Además, el tratamiento con los compuestos divulgados produjo citoquinas antiinflamatorias elevadas, tal como IL-10. Además, varias otras quimioquinas, tal como eotaxina, IL-12, IP-10, LIF, MCP-1, MIG, MIP y RANTES, también disminuyen por el tratamiento con los compuestos divulgados.

Ensayo para evaluar la eficacia en tratar dermatitis de contacto

Para determinar la eficacia de los compuestos divulgados en tratar dermatitis de contacto, miristato acetato de forbol ("PMA") se aplica por vía tópica (2,5 μg en 20 μl) tanto a las porciones anteriores como posteriores del pabellón auricular derecho de ratones (N = 10 por grupo). Como control, el pabellón auricular izquierdo recibe 20 μl de etanol (excipiente de PMA) tanto en las porciones anteriores como posteriores. Seis horas después de la aplicación de PMA, se determina el espesor del pabellón auricular tanto derecho como izquierdo. Las medidas se determinan al menos dos veces de la misma región de ambas orejas, teniendo cuidado de no incluir pelo o pabellón auricular plegado.

Ensayo para evaluar la eficacia en tratar dermatitis alérgica

Para medir la eficacia compuestos divulgados en tratar dermatitis alérgica, se aplica oxazolona ("OXL") (1,5%, 100 μl en acetona) a los abdómenes afeitados de ratones. Siete días después, el espesor del pabellón auricular de los ratones tratados con OXL se determina. Después los compuestos divulgados (100 mg/kg) o el vehículo (es decir, Captisol) se administra por vía intraperitoneal a ratones seguido por aplicación tópica de OXL (1%, 20 μl) 30 min después tanto a las pociones anterior como posterior del pabellón auricular derecho. Como control, el pabellón auricular izquierdo recibe 20 μl de acetona (excipiente de OXL) a las porciones tanto anterior como posterior. El espesor del pabellón auricular de ambas orejas se mide otra vez 24 horas después. N = 10 por grupo.

Ensayo para medir la captura de aldehído

A viales de reacción separados se añade cada compuesto divulgado (0,064 mmol), sal MDA (22,7% de MDA, 0,064 mmol), y trioleato de glicerilo (600 mg). A la mezcla se añade Captisol al 20% en peso en PBS acuoso (~2,5 ml), seguido por ácido linoleico (600 mg). La mezcla de reacción se agita vigorosamente a temperatura ambiente y se sigue por LC/MS. Los compuestos divulgados rápidamente reaccionan con MDA para formar aductos de MDA.

Confirmación de base de Schiff

Se usa espectroscopía UV/VIS para seguir la condensación de base de Schiff de RAL con la amina primaria de un compuesto de la invención. El análisis *in vitro* del producto de condensación de base de Schiff con RAL se realiza para los compuestos divulgados.

En el análisis en fase solución, el valor de λ_{max} tanto del compuesto libre como del producto de condensación de RAL base de Schiff (RAL-SBC) se mide junto con el valor para tau de RAL-SBC. Como se usa en el presente documento, "RAL-SBC" significa el producto de condensación de la base de Schiff de RAL y un compuesto RAL. El análisis en fase

solución se realiza usando una mezcla 100:1 del compuesto y RAL usando protocolos conocidos en la técnica. Se ensayaron varios sistemas solventes incluyendo acuoso, etanol, octanol y cloroformo:metanol (varios, por ejemplo 2:1). La cinética de la solución se mide y se encuentra que es muy dependiente de las condiciones del solvente.

5 El análisis en fase sólida de la condensación de base de Schiff también se realiza usando una mezcla 1:1 del compuesto respecto a RAL. El análisis en fase sólida se realizam usando protocolos conocidos en la técnica. La mezcla se seca en nitrógeno y la reacción de condensación se produce a terminación.

10 El análisis de fase lipídica se realiza usando protocolos conocidos en la técnica y se miden λ_{max} , tau (RAL-SBC frente a APE/A2PE), e inhibición competitiva. Las condiciones de los liposomas son más cercanas a las condiciones *in situ*.

Análisis por ERG de adaptación a la oscuridad

15 La adaptación a la oscuridad es la recuperación de sensibilidad visual después de exposición a la luz. La adaptación a la oscuridad tiene múltiples componentes incluyendo tanto procesos rápidos (neuronales) como un proceso lento (fotoquímico). La regeneración del pigmento visual está relacionada con el proceso fotoquímico lento. Las velocidades de adaptación a la oscuridad se miden por varias razones. La ceguera nocturna resulta de un fallo a adaptarse a la oscuridad (pérdida de sensibilidad visual a la luz). Es posible encontrar una dosis segura para la visión nocturna midiendo el efecto del fármaco en la sensibilidad a la luz visual adaptada a la oscuridad.

20 Un electrórretinograma (ERG) se usa para medir la adaptación a la oscuridad en condiciones normales frente a fármaco. El ERG es la medida del potencial de campo eléctrico emitido por las neuronas retinales durante si respuesta a un estímulo de luz experimentalmente definido. Más específicamente, ERG mide los potenciales de campo retinales en la córnea después de un flash de luz (por ejemplo, 50 ms). Las intensidades de campo son de 102 a 103 microvoltios, originándose en las células de la retina.

25 ERG es una medida no invasiva que se puede realizar o bien en sujetos vivos (humano o animal) o un ojo hemisectado en solución que se ha retirado quirúrgicamente de un animal vivo. El ERG requiere anestesia general que disminuye la adaptación a la oscuridad y debe ser considerado en el diseño experimental.

30 En un análisis de ERG típico de un experimento de adaptación a la oscuridad, cada rata se adapta a la oscuridad durante horas hasta alcanzar un estado consistente de sensibilidad a la luz. La rata después se "fotoblanquea", es decir, se expone brevemente a luz lo suficientemente fuerte para agotar transitoriamente la retina de 11-cis-RAL libre (por ejemplo, 2 min a 300 lux). La rata después se devuelve a la oscuridad inmediatamente para iniciar la adaptación a la oscuridad, es decir, la recuperación de la sensibilidad a la luz debido a la regeneración del pigmento visual. Se usa ERG para medir cómo de rápidamente se adapta la rata a la oscuridad y recupera la sensibilidad a la luz. Específicamente, se define una variable de respuesta de criterio para la sensibilidad a la luz.

40 La medida de ERG se toma después de una duración específica de recuperación a la oscuridad postblanqueo (por ejemplo, 30 min) determinada previamente por análisis cinético. Se usa un ajuste de curva para calcular el valor para la variable de sensibilidad y muestra recuperación con anestesia en la misma rata incluyendo cinética de adaptación a la oscuridad para Y_{50} y σ . La adaptación más lenta se observa con menos sensibilidad a la luz donde Y_{50} alcanza -4,0 y tau = 22,6 min. La adaptación más rápida se observa con más sensibilidad a la luz donde Y_{50} alcanza -5,5 y tau = 9,2 min.

45 Se sigue el mismo paradigma que se ha descrito anteriormente para variación de dosis. En el protocolo de variación de dosis de ERG, los compuestos i.p. disminuyen la sensibilidad a la luz de ratas adaptadas a la oscuridad de una manera dependiente de la dosis. El efecto sobre la visión disminuye después de 3 horas.

50 Análisis de RMN de reacción de RAL

Se usa espectroscopía de RMN para seguir la condensación de base Schiff y formación de anillo de RAL con la amina primaria de un compuesto de la invención.

55 Inhibición de la formación de A2E

Este experimento se diseña para establecer prueba de concepto que la inyección i.p. crónica de un compuesto RAL-trap disminuye la velocidad de acumulación de A2E en ratas Sprague Dawley de tipo salvaje. Estos experimentos comparan la eficacia de tratamiento de compuestos RAL-trap a la de los compuestos control y la falta de tratamiento.

60 Materiales y métodos

El estudio se realiza con ratas Sprague Dawley de tipo salvaje. Los grupos de tratamiento de las ratas incluyen, por ejemplo, 8 ratas de género mezclado por condición de tratamiento. Cada animal se trata con una de las siguientes condiciones:

65

- Controles: (1) ácido 13-cis retinoico para inhibir los sitios de unión a retinoide de las proteínas del ciclo visual como un control de protocolo, en que tal tratamiento reduce la cantidad de trans-RAL libre que se libera y por tanto está disponible para formar A2E, pero con efectos secundarios indeseable de ceguera nocturna, y (2) un compuesto comercialmente disponible que se sabe que modula clínicamente la función retiniana en seres humanos y se sabe experimentalmente que forma un aducto de base de Schiff con RAL libre, tanto *in vitro* como en modelos animales *in vivo*.
- Vehículo
- Compuesto
- Sin tratar

Los compuestos divulgados se ensayan a través de un intervalo de dosis que incluye 1, 5, 15, y 50 mg/kg. El tratamiento se administra a diario durante 8 semanas por inyección i.p.

Química:

Los experimentos usan una variedad de servicios químicos. Por ejemplo, estos experimentos usan compuestos comercialmente disponibles con hojas de especificación analítica para caracterizar impurezas. También se sintetizan compuestos. Los compuestos se preparan en cantidades suficientes para la dosificación requerida. Las formulaciones del compuesto son adecuadas para uso en estudios de seguridad animal iniciales que implican inyección intraperitoneal (i.p.). Se determinan los siguientes tres atributos del producto de reacción de base de Schiff de trans-RAL con compuestos de la invención:

- estabilidad con respecto a velocidades de reacción
- propiedades de absorción, específicamente máximos de absorción de uv-vis y coeficientes de extinción (véase, por ejemplo, la figura 5 en Rapp y Basinger, *Vision Res.* 22:1097, 1982) o análisis espectral de RMN de cinética de reacciones
- valores de solubilidad log P y log D, por ejemplo, calculados

Biología y bioquímica:

Los experimentos descritos en el presente documento usan una variedad de servicios de biología y bioquímica. Una dosis de "nivel de no efecto" (NOEL) de compuestos de la invención para tratamiento diario con una formación de colirio se establece, por ejemplo, en conejo con un protocolo de irritación ocular y en roedores con medida ERG de adaptación a la oscuridad en respuestas visuales a la estimulación lumínica. Después del tratamiento y antes de la enucleación del ojo, se realizan los siguientes ensayos no invasivos en animales, por ejemplo, conejos:

- Degeneración de células del RPE y fotorreceptoras, evidente por retinografía (Karan, *et al.* 2005, PNAS 102:4164)
- Drusas extracelulares y lipofuscina intracelular medida por retinografía fluorescente (Karan, *et al.* 2005)

Las respuestas a la luz se caracterizan por ERG (Weng, *et al.*, *Cell* 98:13, 1999). La concentración de A2E intracelular de extractos de células del RPE retinal se mide en todos los animales tratados tras la conclusión del protocolo de tratamiento usando un método analítico tal como los descritos por Karan *et al.*, 2005; Radu *et al.*, 2003; and Parish *et al.*, PNAS 95:14609, 1998. Por ejemplo, en una muestra de animales tratados, un ojo se ensaya, y el otro ojo se salva para análisis histológico (como se describe posteriormente). En los animales restantes, ambos ojos se ensayan por separado para la formación de A2E.

En los ojos postratamiento reservados para histología (como se describe anteriormente), la morfología de tejido retinal y de RPE se ensaya con técnicas de histología de microscopía óptica (Karan, *et al.* 2005, con la excepción de que no se usa microscopía electrónica en los experimentos descritos en el presente documento).

La seguridad de la pauta de tratamiento se evalúa, por ejemplo, usando una combinación de:

- Observación documentada diaria del comportamiento animal y hábitos de alimentación a lo largo del periodo de tratamiento
- Resultados visuales medidos por ERG al final del periodo de tratamiento
 - a. Histología ocular al final del tratamiento

Ejemplo 11: Prueba de perfil de metabolito entre especies de NS2 deuterado (NS2-D6; compuesto I-1)

Fin:

Una vez administradas a un animal, las moléculas pequeñas pueden experimentar una variedad de reacciones para producir un conjunto de metabolitos. Los metabolitos exactos producidos dependen de muchos factores tal como el animal, la estructura molecular, y la distribución tisular de la molécula. El metabolismo de las moléculas pequeñas puede servir el fin de aumentar la solubilidad en agua para ayudar en la excreción de la molécula en la orina o heces,

o puede simplemente ser el resultado de reacciones catalizadas por enzimas accidentales. Los metabolitos ejemplares incluyen productos de oxidación y glucuronidación. Con frecuencia es imposible predecir la distribución y cantidad de metabolitos producidos. Un fin de este estudio era realizar un perfil de metabolitos en especies cruzadas del artículo de prueba NS2 en hepatocitos primarios crioconservados. Como se describe posteriormente, una variedad de metabolitos de NS2 se produjeron y la distribución de metabolitos varió significativamente a través de diferentes especies. Con frecuencia es deseable disminuir el número y cantidad de metabolitos de fármacos de molécula pequeña, por ejemplo, para aumentar la semivida del fármaco en el cuerpo y/o prevenir la conversión a metabolitos tóxicos o inactivos. Con este conocimiento, la deuteración de NS2 se exploró como una posible ruta para disminuir el número y cantidad de metabolitos. La deuteración de una molécula (es decir, la sustitución de uno o más átomos de hidrógeno con deuterio) con frecuencia tiene efectos significativos en las velocidades de producción de metabolitos; sin embargo, los efectos de la deuteración en una molécula determinada son casi imposibles de predecir en la mayoría de los casos. Por tanto, se realizó el perfil de metabolitos para NS2 deuterado en hepatocitos humanos.

Condiciones del estudio:

Este estudio se realizó en condiciones no GLP. Todo el trabajo se realizó con aprobación de las regulaciones de salud locales y éticas apropiadas.

Diseño experimental:

Análisis de muestras

Las muestras se analizaron por LC-MS/MS usando un espectrómetro de masas SCIEX QTrap 5500 acoplado con un HPLC Agilent 1290 serie Infinity, un automuestreador enfriado CTC PAL, todos controlados por software Analyst. Después de la separación en una columna de HPLC de fase inversa C18 (Acquity UPLC HSS T3, 1,8, 2,1 x 50 mm) usando un sistema en gradiente de acetonitrilo-agua, los picos se analizaron por espectrometría de masas (MS) usando ionización ESI en modo barrido Q1. Las condiciones de la LC se muestran en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Gradiente de LC

Tiempo (min)	Velocidad de flujo (ml/min)	% de fase móvil A	% de fase móvil B
0,05	0,6	100	2
5,0	0,6	60	40
6,0	0,6	5	95
6,4	0,6	5	95
6,41	0,6	100	0
6,8	0,6	100	0

Solución A: H₂O con ácido fórmico al 0,1%; Solución B: acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1%

La tabla 4 muestra los parámetros experimentales para realización del perfil de metabolitos

Tabla 4: Determinación del perfil de metabolitos en hepatocitos: condiciones experimentales

Artículo de prueba	Conc. prueba	Fuente de hepatocitos	Conteo de células	Puntos de tiempos de perfil	Método analítico
NS2 (todas las 4 especies) D-NS2 (solo humano)	3 µM	Rata, perro, mono (cino) y humano	1 x 10 ⁶ células viables/ml	0 y 120 min	LC-MS/MS

Procedimiento experimental

El artículo de prueba se incubó en duplicado con hepatocitos primarios, crioconservados a 37°C. Las células se descongelaron, se contaron las células viables, y se equilibraron según las direcciones del suministrador. Después de 30 min de equilibración a 37°C con agitación suave, el compuesto de prueba se añadió a las células para dar la concentración final deseada de 3 µM. La suspensión celular se incubó a 37°C como se describe anteriormente. En los tiempos indicados, se retiraron muestras y se mezclaron con un volumen igual de solución de parada (metanol) helada.

En paralelo, una muestra de hepatocitos blanco en ausencia de agente de prueba se incubó durante 120 min y se usó como control para mostrar la presencia de picos derivados de los hepatocitos. Las reacciones paradas se incubaron al menos diez minutos en hielo, y se añadió un volumen adicional de agua. Las muestras se centrifugación para eliminar proteína precipitada, y los sobrenadantes se analizaron por LC-MS/MS.

Un espectro de masa de barrido completo (100-800 m/z) en modos de ionización tanto positivo como negativo se corrió a través del gradiente para buscar la presencia de potenciales metabolitos (masas novedosas y metabolitos de fase I y II conocidos tal como: oxidación, sulfatación, dioxidación, deshidrogenación, sulfatación + oxidación,

glucuronidación, oxidación + glucuronidación, y conjugación con glutatión). El método de espectrometría de masas se muestra a continuación en la tabla 5.

Tabla 5: Desarrollo del método de espectrometría de masas

Artículo de prueba	MW	Polarización ESI	Intervalo de masa de barrido total
CoreRX micronizado Lote 093 (Origin Lot BR-NS2-11-01)	236,7	Positivo	100-800
D-NS2 (Lote 1509342002)	242,7	Positivo	100-800
D-NS2: NS2 deuterado (C ₁₂ H ₇ CIN ₂ O ₆)			

5

Resultados

Se encontró sorprendentemente que la deuteración de NS2 redujo mucho el número y cantidades de metabolitos en hepatocitos humanos. Como se resume en las tablas 6A y 6B a continuación, la proteo- (no enriquecida con deuterio) forma de NS2 se metabolizaba significativamente durante el curso de solo 120 min por hepatocitos de rata, perro, mono y humanos. Por ejemplo, los hepatocitos de perro metabolizaron NS2 a dos productos de monooxidación diferentes (M1 y M2) y dos conjugados de glutatión (GSH) diferentes (M5 y M6), evaluado por tiempos de retención de LC y datos de espectrometría de masas (véase la figura 3). Los hepatocitos de mono cino metabolizaron NS2 a un metabolito de monooxidación (M1), cuatro metabolitos de oxidación + glucuronidación (M3, M4, M7 y M9), y un metabolito de glucuronidación (M8) (véase la figura 2). Los hepatocitos humanos metabolizaron NS2 a un metabolito de monooxidación (M1), dos metabolitos de oxidación + glucuronidación (M7 y M9), y un metabolito de glucuronidación (M8) (véase la figura 1).

10

15

Tabla 6A: Perfil de metabolitos de NS2 en hepatocitos: Resumen de datos

Analito	Tiempo de retención (min)	m/z	Cambio m/z	Posible biotransformación	Metabolitos observados (T-120 min)			
					Rata	Perro	Mono cino	Humano
NS2	4,4	237	--	Parental	NA	NA	NA	NA
M1	2,1	253	+16	mono-oxidación	++++	++++	++++	++++
M2	2,9	253	+16	mono-oxidación		+		
M3	3,0	429	+192	oxidación + glucuronidación			+	
M4	3,2	429	+192	oxidación + glucuronidación			++	
M5	3,5	542	+305	conjugación con GSH		+		
M6	3,7	542	+305	conjugación con GSH		++		
M7	3,7	429	+192	oxidación + glucuronidación	traza		++	+
M8	3,98	413	+176	glucuronidación	traza		++	++
M9	3,9	429	+192	oxidación + glucuronidación			+	+

20

m/z: proporción masa a carga del analito

NA = no aplicable

El grado relativo de formación de metabolito observada se indica por "+" siendo ++++ el metabolito más abundante (asumiendo que el potencial de ionización del parental es similar al de los metabolitos).

25

Tabla 6B: Áreas de pico de metabolitos observados

Analito	Áreas de pico			
	Metabolitos observados (T-120 min)			
	Rata	Perro	Mono cino	Humano
NS2	3,14E+08	4,79E+07	1,74E+08	4,41E+08
M1	4,25E+08	2,83E+08	4,47E+08	2,57E+08
M2		1,58E+07		
M3			7,50E+06	
M4			1,92E+07	
M5		1,69E+07		
M6		7,67E+07		
M7	traza		1,35E+07	1,62E+07
M8	traza		3,15E+07	4,47E+07
M9			1,22E+07	1,51E+07

El análisis espectral de masas de NS2, cada metabolito M1-M9, NS2 deuterado, y el metabolito producido en hepatocitos humanos de NS2 deuterado se muestra en las figuras 6-17.

5 En contraste a NS2 no enriquecido con deuterio, la exposición de NS2 enriquecido con deuterio (es decir, el compuesto I-1, o NS2-D6 en la tabla 7) a hepatocitos humanos durante 120 min produjo el metabolito de monooxidación M1 como el único metabolito detectable (véase la tabla 7 y las figuras 5 y 17). La cantidad de M1 producido también se redujo mucho relativo al del producido cuando NS2 no deuterado se expuso a hepatocitos humanos (compárese las figuras 1 y 5). Tal reducción drástica en la producción de metabolitos no se podría haber predicho con antelación.

10 Tabla 7: Perfil de metabolitos de NS2 deuterado en hepatocitos humanos: resumen de datos

Analito	Tiempo de retención (min)	m/z	Cambio de m/z	Posible biotransformación	Metabolitos observados (T-120 min)
					Humano
NS2-D6	4,4	243	--	parental	NA
M1	2,1	259	+16	monooxidación	++

m/z: proporción de masa carga del analito

NA = no aplicable

El grado relativo de formación de metabolito observada se indica por "+" siendo ++++ el metabolito más abundante (asumiendo que el potencial de ionización del parental es similar al de los metabolitos).

15 Nota. Basado en el número de metabolitos observados, el NS2 deuterado mostró menos metabolismo sobre el curso de 2 horas relativo a la molécula de NS2 no deuterado.

20 Los resultados mostrados en la tabla 7 también son sorprendentes en que la reducción en el número y cantidad de metabolitos puede no ser debida simplemente a la incorporación de deuterio que hace una etapa determinante de velocidad enzimáticamente catalizada más difícil. Más bien, la m/z observada de 259 es consistente con que los seis átomos de deuterio se retengan en el producto de monooxidación. Sin querer estar vinculado por la teoría, esto puede indicar que el enriquecimiento con deuterio influye el metabolismo en una localización remota en la molécula, y tal vez no simplemente a través, por ejemplo, de un efecto de isotipo en cinética primaria.

25 Referencias: 1) McGinnity, D.F. et al. (2004). "Evaluation of fresh and cryopreserved hepatocytes as in vitro drug metabolism tools for the prediction of metabolic clearance." *Drug Metab. Dispos.* 32(11):1247-1253. 2) Sahi, J. et al. (2010). "Hepatocytes as a tool in drug metabolism, transport and safety evaluations in drug discovery." *Current Drug Discov. Technol.* 7(3):188-198.

30 Ejemplo 12: Evaluación de las respuestas a la dosis para actividad fotoprotectora de la toxicidad de peróxido de hidrógeno en cultivos de hipocampo disociados para NS2 (es decir, NS2 no deuterado)

Plan experimental para evaluación de la respuesta a la dosis de NS2 para protección de toxicidad de peróxido de hidrógeno:

35 A. Agente de prueba: NS2 FW: 236

1. Fuente 1: CoreRx lote 093-FOR CNS2; cantidad usada; 6,4 mg; muestra micromolida (el tamaño de partícula medio es aproximadamente 16 micrómetros); derivado de J-Star Lote BR-NS2-11-01

40 2. Fuente 2: J-Star lote BR-NS2-1; cantidad usada; 6 mg; muestra no molida

B. Formulaciones y preparación de soluciones madre

45 Se compararon dos tipos de formulaciones; dimetilsulfóxido (DMSO) y Captisol®.

1. Formulación de Captisol®: se disolvió Captisol® a 5 mg/ml (es decir, al 0,5%) en solución tamponada en fosfato de Dulbecco (DPBS). Se preparó una solución madre de NS2 de 10 mM (solución madre A) disolviendo 1 mg (4,24 µmol) en 0,42 ml de la solución de Captisol® para dar una solución madre inicial de 10 µmol/ml o 10 mM (es decir, 2,38 mg/ml). La solución madre era transparente después de mezclar con el vortex.

50 2. Formulación de DMSO: Se usó DMSO como un comparador para Captisol®. Se disolvieron cinco mg (21,12 µmol) de NS2 en 0,2 ml de DMSO para una solución madre de 100 mM (es decir, 23,8 mg/ml). La formulación en DMSO de NS2 100 mM era transparente. Se hicieron diluciones logarítmicas con DPBS. Tras la dilución 1:10 a 10 mM con DPBS, la solución se volvió turbia, pero se aclaró después de mezclado con el vortex extenso. En general, nuestro fin de concentración de referencia para DMSO en cultivos neuronales primarios es menos del 0,1% para evitar acciones farmacológicas de DMSO. Nótese que se usó DMSO al 1% para la concentración de prueba 1 mM de NS2. No se observó toxicidad aparente en el ensayo en la prueba de 5 h (véase los resultados del experimento 9 posteriormente).

60 C. Detalles sobre la preparación de las soluciones madre

NS2 en Captisol®

1. La solución madre A era NS2 10 mM en Captisol® al 0,5%. Añadir 10 µl en 100 µl para una concentración final de NS2 1 mM, en Captisol® al 0,05%, en cada pocillo.
2. La solución madre B se preparó añadiendo 50 µl de la solución madre A a 450 µl de DPBS para dar una solución 1 mM de NS2. Añadir 10 µl en 100 µl de DPBS para una concentración final de NS2 100 µM en Captisol® al 0,005%.
3. La solución madre C se preparó añadiendo 50 µl de la solución madre B a 450 µl de DPBS para dar una solución 100 µM de NS2. Añadir 10 µl en 100 µl de DPBS para una concentración final de NS2 10 µM en Captisol® al 0,0005%.
4. La solución madre D se preparó añadiendo 50 µl de la solución madre C a 450 µl de DPBS para dar una solución 10 µM de NS2. Añadir 10 µl en 100 µl de DPBS para una concentración final de NS2 1 µM en Captisol® al 0,00005%.
5. La solución madre E se preparó añadiendo 50 µl de la solución madre D a 450 µl de DPBS para dar una solución 1 µM de NS2. Añadir 10 µl en 100 µl de DPBS para una concentración final de NS2 0,1 µM en Captisol® al 0,000005%.

NS2 en DMSO

1. La solución madre A era NS2 10 mM en DMSO al 100%.
2. La solución madre B se preparó añadiendo 50 µl de la solución madre A a 450 µl de DPBS para una concentración final de NS2 10 mM. Añadir 10 µl en 100 µl de DPBS para una concentración final de NS2 1 mM en DMSO al 1%.
3. La solución madre C se preparó añadiendo 50 µl de la solución madre B a 450 µl de DPBS para una concentración final de NS2 1 mM. Añadir 10 µl en 100 µl de DPBS para una concentración final de NS2 100 µM en DMSO al 0,1%.
4. La solución madre D se preparó añadiendo 50 µl de la solución madre C a 450 µl de DPBS para una concentración final de NS2 100 µM. Añadir 10 µl en 100 µl de DPBS para una concentración final de NS2 10 µM en DMSO al 0,01%.
5. La solución madre E se preparó añadiendo 50 µl de la solución madre D a 450 µl de DPBS para una concentración final de NS2 10 µM. Añadir 10 µl en 100 µl de DPBS para una concentración final de NS2 1 µM en DMSO al 0,001%.
6. La solución madre F se preparó añadiendo 50 µl de la solución madre E a 450 µl de DPBS para una concentración final de NS2 1 µM. Añadir 10 µl en 100 µl de DPBS para una concentración final de NS2 0,1 µM en DMSO al 0,0001%.

En todos los casos, 10 µl de la dilución apropiada se añadieron a 100 µl para un volumen total de 110 µl en el pocillo.

D. Condiciones de cultivo diseñadas para detectar neuroprotección mediada por NS2 de estrés oxidativo asociado con peróxido de hidrógeno

1. Se prepararon cultivos de hipocampo de ratas como se ha descrito previamente (Brenneman DE, Smith GR, Zhang Y, Du Y, Kondaveeti SK, Zdilla MJ, Reitz AB. (2012) *J. Molecular Neuroscience*, 47:368-379). En estas condiciones, los cultivos son al menos el 90% neuronales. Las células no neuronales más abundantes son astrocitos.
2. Todos los cultivos se prepararon en un formato de 96 pocillos a una densidad de siembra de 10K células por pocillo. Los cultivos se trataron entre el día 10 y el día 21 después de la disociación de tejido de hipocampo E18. Para estos experimentos, todas las placas se trataron el día 13. En todos los experimentos, el peróxido de hidrógeno se añadió a los cultivos 10 minutos después del tratamiento con NS2 o cannabidiol (CBD). Para cada condición de tratamiento, el número de replicados fue cinco.
3. Todos los cultivos se sembraron en medio B27/basal neural. El día del tratamiento, a todos los cultivos se les dio un cambio completo de medio a medio B27/basal neural sin antioxidantes.
4. Como se ha determinado previamente (Brenneman et al., 2012) se usó peróxido de hidrógeno 10 µM para producir toxicidad y estrés oxidativo. Como se ha descrito previamente [Jarrett, SG, Liang, L-P, Hellier, JL, Staley, KJ y Patel, M. (2008) *Neurobiol. Dis* 30(1): 130-138], se ha observado que el peróxido de hidrógeno 10 µM en el hipocampo de ratas con un modelo kainato de estado epiléptico.
5. El control positivo usado en todos los estudios fue cannabidiol (CBD) 10 µM, un agente antioxidante conocido [Hampson et al. (1998), *Proc.Nat.Acad. Sci* 95:8268-8273] que es protector contra el estrés oxidativo en neuronas primarias [Brenneman, DE, Petkanas, D y Kinney, W.A. (2014) *Annual Symposium on the Cannabinoids*, página 129].
6. Ni los pocillos de control negativo, ni los pocillos de peróxido de hidrógeno, ni los pocillos de control positivo contenían ningún vehículo de fármaco.

E. Ensayos

Ambos ensayos usados en este estudio se han descrito en detalle [Brenneman DE, Smith GR, Zhang Y, Du Y, Kondaveeti SK, Zdilla MJ, Reitz AB. (2012) J. Molecular Neuroscience, 47:368-379].

1. El ensayo de viabilidad neuronal CFDA. En este ensayo, el colorante CFDA es absorbido por todas las células vivas, y cortado por esterasas para liberar fluoresceína. La especificidad neuronal se alcanza porque las neuronas no pueden eliminar este colorante, mientras la salida del colorante de células neuronales se puede producir a lo largo del tiempo. Después de lavar el colorante extracelular, los cultivos se leyeron en un fluorímetro, la intensidad de colorante intracelular es proporcional a la población neuronal viva. Referencia original: Petroski, RE y Geller HM. (1994) Selective labeling of embryonic neurons cultures on astrocyte monolayers with 5(6)-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) J. Neurosci. Methods 52:23.32. El nivel control medio para cada experimento se muestra como una línea de referencia discontinua de trazo largo.

2. Un ensayo de muerte celular, usando yoduro de propidio, se realizó simultáneamente con el ensayo de CFDA en el mismo pocillo. Este colorante es excluido de células vivas y se une al ADN de células muertas. El ensayo detecta muerte celular tanto necrótica como apoptótica; no distingue entre muerte celular neuronal y muerte celular no neuronal. Véase, Sarafian TA, Kouyoumjian S, Tashkin D, Roth MD. (2002) Tox. Letters. 133: 171-179. El nivel control medio para cada experimento se muestra como una línea de referencia discontinua de trazo medio.

3. Reactivos usados:

- a. Solución de peróxido de hidrógeno, 30% en peso; Sigma-Aldrich (216736-100 ml, lote MKBV382V)
- b. Captisol® (lote 17CX01-HQ-00088) proporcionado por Alderya Therapeutics
- c. Dimetilsulfóxido; Sigma-Aldrich (472301-100 ml) lote 21096JK
- d. Yoduro de propidio Sigma-Aldrich (P4864-10 ml; solución 1 mg/ml en agua)
- e. CFDA [diacetato de 5-(6)-carboxifluoresceína] Sigma-Aldrich número de producto: 21879-100 mg-F
- f. Solución de cannabidiol, 10 mg/ml en etanol; Sigma-Aldrich número de producto: 90899-1 ml
- g. Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco. Gibco (14190-144) lote 1165767

4. Análisis de datos

- a. Adquisición de datos: Los datos se almacenaron en ordenadores Advanced Neural Dynamics para análisis. La adquisición de datos se realizó en un fluorímetro Cytofluor y se transfirió a una hoja de cálculo Excel para análisis con Sigma Plot 11.
- b. Análisis estadístico: Todos los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza con el método de comparaciones múltiples frente a grupo control (Holm-Sidak). Se tomó la significancia estadística al nivel $P < 0,05$. En todos los casos, las comparaciones se hicieron al control negativo (tratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM).
- c. Metodología para la determinación de CE_{50} :
 - i. Se eligió un amplio intervalo de concentración para cribar NS2 en un análisis de potencia de CE_{50} . Se usó una serie de concentraciones logarítmicas desde 0,1 μM a 1 mM, reconociendo que análisis adicional que implica concentración semilogarítmica puede ser necesario para evaluar CE_{50} .
 - ii. Se usó un análisis de regresión no lineal para determinar la ecuación de la línea que ajusta mejor los datos (curva logística de cuatro parámetros)
 - iii. Basado en la ecuación logística siguiente, las CE_{50} para neuroprotección se calcularon y representaron por SigmaPlot 11 para determinar la concentración requerida para producir respuestas semimáximas para ambos ensayos. Se usaron líneas verticales para mostrar las intersecciones de los ejes que determinan la CE_{50} .

Ecuación logística de cuatro parámetros

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{x}{CE_{50}}\right)^{-\text{pendiente de Hill}}}$$

Esto produce una curva de dosis y respuesta típica con un parámetro de pendiente variable. Algunas veces se abrevia como 4PL. Los cuatro parámetros son: min (parte inferior de la curva), max (parte superior de la curva), CE_{50} = concentración de ligando que produjo el 50% de la respuesta eficaz máxima.

5. Resumen de resultados

La tabla 8 muestra un resumen de los estudios de protección para NS2 (es decir, NS2 no deuterado) en cultivos de hipocampo de rata.

Tabla 8: Resumen de los estudios de protección para NS2 en cultivos de hipocampo de rata

ES 2 989 113 T3

Ensayo	Compuesto	Formulación	Concentración de eficacia completa**	Concentración de no efecto	CE50 ± EE
CFDA	NS2 CoreRx	Captisol®	100 µM	1 µM	6,8 ± 3,6 µM
CFDA	NS2 CoreRx	DMSO	100 µM	1 µM	9,8 µM*
CFDA	NS2 J-Star	Captisol®	100 µM	1 µM	9,1 ± 2,8 µM
CFDA	NS2 J-Star	DMSO	100 µM	1 µM	2,6 µM*
PI	NS2 CoreRx	Captisol®	10 µM	1 µM	1,3 µM*
PI	NS2 CoreRx	DMSO	10 µM	1 µM	1,3 µM*
PI	NS2 J-Star	Captisol®	10 µM	1 µM	2,8 µM*
PI	NS2 J-Star	DMSO	10 µM	1 µM	1,1 µM*
CFDA	Ninguno	Captisol®			No activo
PI	Ninguno	DMSO			No activo

* Debido a la naturaleza inclinada de la curva logística observada para estos conjuntos de datos, puede ser necesario análisis adicional usando concentraciones semilogarítmicas para determinar la CE₅₀ en estas condiciones. Los valores expuestos se deben considerar estimaciones.

** La concentración del agente de prueba que muestra niveles de respuesta en el ensayo no significativamente diferente de la de los controles sin tratamiento.

6. Análisis gráficos de los hallazgos experimentales de datos sin procesar

a. Experimento 1: Respuesta a la dosis a NS2 micromolido (CoreRx) en Captisol®. Efecto sobre la viabilidad neuronal después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM.

- i. Fuente de NS2: CoreRx, micromolido
- ii. Formulación: la solución madre inicial se formuló en Captisol® al 0,5%
- iii. Ensayo: CFDA
- iv. Toxina: peróxido de hidrógeno 10 µM
- v. Duración del tratamiento: 5 horas
- vi. Medio de crecimiento: medio B27/neurobasal sin antioxidantes
- vii. Matriz de cultivo: poli-L-lisina
- viii. Conclusiones: la CE₅₀ se observó a 6,8 µM; la eficacia completa relativa a los controles (CBD + HP y control sin tratamiento) se observó a 100 µM de NS2.

NS2 es completamente neuroprotector contra toxicidad de peróxido de hidrógeno a 10 µM en este ensayo. Los resultados se muestran en la tabla 9 y las figuras 18 y 19.

Tabla 9. Efectos sobre la viabilidad neuronal después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM

Análisis		CBD + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	HP
Estadístico	Control	10 µM	1 mM	100 µM	10 µM	1 µM	0,1 µM	10 µM
	45216	45216	45216	55866	41262	31538	31107	24829
	42919	53439	45216	47620	27827	24829	29842	27827
	47620	50134	35167	45216	48549	30050	27827	29430
	47620	52763	53439	45216	39139	23428	19585	25008
	48706	42919	35405	38622	31107	38622	26294	28320
Media	46416*	48894*	42889*	46508*	37577*	29693	26931	27083
Error Std.	1044	2078	3448	2778	3697	2703	2014	921
Valor p*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,002	N.S.	N.S.	N.S.
% del control	100 ± 2	105 ± 4	92 ± 7	100 ± 6	80 ± 8	64 ± 6	58 ± 4	58 ± 2

* Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo

N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo

b. Experimento 2: Respuesta a la dosis a NS2 micromolido (CoreRx) en Captisol®. Efecto sobre la muerte celular después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM.

- i. Fuente de NS2: CoreRx (micromolido)
- ii. Formulación: la solución madre inicial se formuló en Captisol® al 0,5%
- iii. Ensayo: Yoduro de propidio
- iv. Toxina: peróxido de hidrógeno 10 µM
- v. Duración del tratamiento: 5 horas
- vi. Medio de crecimiento: medio B27/neurobasal sin antioxidantes
- vii. Matriz de cultivo: poli-L-lisina
- viii. Conclusiones: la CE₅₀ se observó a 1,3 µM; la eficacia completa relativa a los controles (CBD + HP y control sin tratamiento) se observó a 10 µM de NS2.

NS2 es completamente neuroprotector contra toxicidad de peróxido de hidrógeno con este ensayo. Estos datos sugieren que el efecto protector contra la muerte celular puede ser ligeramente más potente que el observado para la viabilidad neuronal. Los resultados se muestran en la tabla 10 y las figuras 20 y 21.

5 Tabla 10. Efecto de NS2 (CoreRx) sobre la muerte celular en cultivos de hipocampo después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM durante 5 horas

Análisis		CBD + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	HP
Estadístico	Control	10 µM	1 mM	100 µM	10 µM	1 µM	0.1 µM	10 µM
	140	144	246	144	180	319	246	315
	180	121	184	180	57	246	246	306
	137	192	180	192	246	254	246	209
	144	117	188	246	180	246	246	346
	180	180	217	137	180	267	323	267
Media	156*	151*	203*	180*	168*	266	261	289
Error Std.	10	15	13	20	31	14	15	24
Valor p*	<0,001	<0,001	<0,003	<0,001	<0,001	N.S.	N.S.	N.S.
% del control	100 ± 6	97 ± 9	130 ± 8	115 ± 13	108 ± 20	171 ± 9	167 ± 10	185 ± 15

* Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo

N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

10 c. Experimento 3: Respuesta a la dosis a NS2 micromolido (CoreRx) en DMSO. Efecto sobre la viabilidad neuronal después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM.

- i. Fuente de NS2: CoreRx (micromolido)
- ii. Formulación: la solución madre inicial se formuló en DMSO al 100%
- 15 iii. Ensayo: CFDA
- iv. Toxina: peróxido de hidrógeno 10 µM
- v. Duración del tratamiento: 5 horas
- vi. Medio de crecimiento: medio B27/neurobasal sin antioxidantes
- vii. Matriz de cultivo: poli-L-lisina
- 20 viii. Conclusiones: la CE₅₀ se observó a 9,8 µM; la eficacia completa relativa a los controles (CBD + HP y control sin tratamiento) se observó a 100 µM de NS2.

25 El uso de DMSO como una formulación produjo una CE₅₀ que era muy similar a la observada con Captisol®. NS2 es completamente neuroprotector contra toxicidad de peróxido de hidrógeno a 10 µM en este ensayo. Los resultados se muestran en la tabla 11 y las figuras 22 y 23.

Tabla 11: Efecto de NS2 (CoreRx; en DMSO) sobre la viabilidad neuronal después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM durante 5 horas

Análisis		CBD + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	HP
Estadístico	Control	10 µM	1 mM	100 µM	10 µM	1 µM	0.1 µM	10 µM
	47420	49934	38422	42719	38422	20765	23428	20844
	38939	48038	36415	40792	32661	32886	26094	31447
	40792	42719	42439	42439	32661	32886	27627	31338
	39199	42719	53580	53580	32661	23228	25189	24899
	48706	38422	37108	37108	34496	23400	29230	23228
Media	43011*	44366*	38662*	43328*	34180*	26633	26314	26351
Error Std.	2097	2064	1158	2751	1118	2595	997	2157
Valor p*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,009	N.S.	N.S.	N.S.
% del control	100 ± 5	103 ± 5	90 ± 3	101 ± 6	79 ± 3	62 ± 6	61 ± 2	61 ± 5

* Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

30 N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

d. Experimento 4: Respuesta a la dosis a NS2 micromolido (CoreRx) en DMSO. Efecto sobre la muerte celular después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM.

- i. Fuente de NS2: CoreRx (micromolido)
- 35 ii. Formulación: la solución madre inicial se formuló en DMSO al 100%
- iii. Ensayo: Yoduro de propidio
- iv. Toxina: peróxido de hidrógeno 10 µM
- v. Duración del tratamiento: 5 horas
- vi. Medio de crecimiento: medio B27/neurobasal sin antioxidantes
- 40 vii. Matriz de cultivo: poli-L-lisina
- viii. Conclusiones: la CE₅₀ se observó a 1,3 µM; la eficacia completa relativa a los controles (CBD + HP y control sin tratamiento) se observó a 10 µM de NS2.

NS2 es completamente neuroprotector contra toxicidad de peróxido de hidrógeno con este ensayo. Estos datos sugieren que el efecto protector contra la muerte celular puede ser ligeramente más potente que el observado para la viabilidad neuronal. Los resultados se muestran en la tabla 12 y las figuras 24 y 25.

5 Tabla 12. Efecto de NS2 (CoreRx en DMSO) sobre la muerte celular en cultivos de hipocampo después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM

Análisis		CBD + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	HP
Estadístico	Control	10 µM	1 mM	100 µM	10 µM	1 µM	0.1 µM	10 µM
	117	180	204	125	180	254	246	315
	133	180	180	180	188	263	263	246
	144	117	221	180	192	254	254	346
	180	125	188	192	117	254	315	246
	129	117	180	117	137	315	259	259
Media	141*	144*	195*	159*	163*	268	267	282
Error Std.	11	15	8	16	15	12	12	20
Valor p*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	N.S.	N.S.	N.S.
% del control	100 ± 8	102 ± 11	138 ± 6	113 ± 11	115 ± 11	190 ± 9	189 ± 9	200 ± 14

* Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo

N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

- 10 e. Experimento 5: Respuesta a la dosis a NS2 no molido (J-Star) en Captisol®. Efecto sobre la viabilidad neuronal después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM.
- i. Fuente de NS2: J-Star (no molido)
 - ii. Formulación: la solución madre inicial se formuló en Captisol® al 0,5%
 - iii. Ensayo: CFDA
 - 15 iv. Toxina: peróxido de hidrógeno 10 µM
 - v. Duración del tratamiento: 5 horas
 - vi. Medio de crecimiento: medio B27/neurobasal sin antioxidantes
 - vii. Matriz de cultivo: poli-L-lisina
 - 20 viii. Conclusiones: la CE₅₀ se observó a 9,1 µM; la eficacia completa relativa a los controles (CBD + HP y control sin tratamiento) se observó a 100 µM de NS2.

NS2 es completamente neuroprotector contra toxicidad de peróxido de hidrógeno en este ensayo. Los resultados se muestran en la tabla 13 y las figuras 26 y 27.

25 Tabla 13. Datos de respuesta a la dosis para NS2 no molido (J-Star) en Captisol® que muestran efecto sobre la viabilidad neuronal después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM

Análisis		CBD + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	HP
Estadístico	Control	10 µM	1 mM	100 µM	10 µM	1 µM	0.1 µM	10 µM
	40722	36415	38422	36415	37407	22135	21242	25171
	41535	38422	40722	31538	36861	24829	26094	21889
	41198	41884	38622	29230	32861	26094	22053	23428
	40992	43711	43200	42919	26756	28021	22089	19885
	36415	38809	36615	47620	25171	20609	29230	21162
Media	40172*	40858*	39516*	37544*	31811*	24338	24142	22307
Error Std.	949	5136	1128	3442	2525	1335	1528	917
Valor p*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	N.S.	N.S.	N.S.
% del control	100 ± 2	102 ± 12	98 ± 3	93 ± 9	79 ± 6	61 ± 3	60 ± 4	56 ± 2

* Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo

N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

- 30 f. Experimento 6: Respuesta a la dosis a NS2 no molido (J-Star) en Captisol®. Efecto sobre la muerte celular después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM.
- i. Fuente de NS2: J-Star (no molido)
 - ii. Formulación: la solución madre inicial se formuló en Captisol® al 0,5%
 - iii. Ensayo: Yoduro de propidio
 - 35 iv. Toxina: peróxido de hidrógeno 10 µM
 - v. Duración del tratamiento: 5 horas
 - vi. Medio de crecimiento: medio B27/neurobasal sin antioxidantes
 - vii. Matriz de cultivo: poli-L-lisina
 - 40 viii. Conclusiones: la CE₅₀ se observó a 2,8 µM; la eficacia completa relativa a los controles (CBD + HP y control sin tratamiento) se observó a 10 µM de NS2.

NS2 es completamente neuroprotector contra toxicidad de peróxido de hidrógeno con este ensayo. Estos datos sugieren que el efecto protector contra la muerte celular puede ser ligeramente más potente que el observado para la viabilidad neuronal. Los resultados se muestran en la tabla 14 y las figuras 28 y 29.

45

Tabla 14. Datos de respuesta a la dosis para NS2 no molido (J-Star) en Captisol® que muestran efecto sobre la muerte celular después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM

Análisis		CBD + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	HP
Estadístico	Control	10 µM	1 mM	100 µM	10 µM	1 µM	0.1 µM	10 µM
	140	180	180	129	117	184	204	271
	144	144	133	129	196	315	180	323
	140	117	172	125	117	337	246	246
	117	121	180	180	180	180	350	246
	164	200	180	133	188	192	180	263
Media	141*	152*	169*	139*	160*	242	232	270
Error Std.	7	16	9	10	18	35	32	14
Valor p*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	N.S.	N.S.	N.S.
% del control	100 ± 5	108 ± 11	120 ± 6	99 ± 7	113 ± 12	172 ± 24	165 ± 22	191 ± 10

* Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo

N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

5 g. Experimento 7: Respuesta a la dosis a NS2 no molido (J-Star) en DMSO. Efecto sobre la viabilidad neuronal después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM.

- i. Fuente de NS2: J-Star (no molido)
- ii. Formulación: la solución madre inicial se formuló en DMSO al 100%
- 10 iii. Ensayo: CFDA
- iv. Toxina: peróxido de hidrógeno 10 µM
- v. Duración del tratamiento: 5 horas
- vi. Medio de crecimiento: medio B27/neurobasal sin antioxidantes
- vii. Matriz de cultivo: poli-L-lisina
- 15 viii. Conclusiones: la CE₅₀ se observó a 2,6 µM; la eficacia completa relativa a los controles (CBD + HP y control sin tratamiento) se observó a 100 µM de NS2.

20 NS2 es completamente neuroprotector contra toxicidad de peróxido de hidrógeno en este ensayo. Los resultados se muestran en la tabla 15 y las figuras 30 y 31.

Tabla 15. Datos de respuesta a la dosis para NS2 no molido (J-Star) en Captisol® que muestran efecto sobre la viabilidad neuronal después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM

Análisis		CBD + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	HP
Estadístico	Control	10 µM	1 mM	100 µM	10 µM	1 µM	0.1 µM	10 µM
	40722	47620	45216	42919	31214	20809	23600	19585
	42919	34696	39269	38622	33768	29430	25371	24829
	42919	48238	26576	38622	33425	23257	31107	25462
	43342	41535	26294	26294	32194	34696	22089	22089
	38622	36615	45807	52763	46105	29430	21926	23772
Media	41705*	41741*	36632*	39844*	35341*	27524	24819	23147
Error Std.	897	2763	4318	4260	2729	2470	1690	1058
Valor p*	<0,001	<0,001	<0,002	<0,001	<0,004	N.S.	N.S.	N.S.
% del control	100 ± 2	100 ± 7	88 ± 10	96 ± 10	85 ± 7	66 ± 6	60 ± 4	56 ± 3

* Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo

N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

25 h. Experimento 8: Respuesta a la dosis a NS2 no molido (J-Star) en DMSO. Efecto sobre la muerte celular después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM.

- i. Fuente de NS2: J-Star (no molido)
- ii. Formulación: la solución madre inicial se formuló en DMSO al 100%
- 30 iii. Ensayo: Yoduro de propidio
- iv. Toxina: peróxido de hidrógeno 10 µM
- v. Duración del tratamiento: 5 horas
- vi. Medio de crecimiento: medio B27/neurobasal sin antioxidantes
- vii. Matriz de cultivo: poli-L-lisina
- 35 viii. Conclusiones: la CE₅₀ se observó a 1,1 µM; la eficacia completa relativa a los controles (CBD + HP y control sin tratamiento) se observó a 10 µM de NS2.

40 NS2 es completamente neuroprotector contra toxicidad de peróxido de hidrógeno con este ensayo. Estos datos sugieren que el efecto protector contra la muerte celular puede ser ligeramente más potente que el observado para la viabilidad neuronal. Los resultados se muestran en la tabla 16 y las figuras 32 y 33.

Tabla 16. Datos de respuesta a la dosis para NS2 no molido (J-Star) en DMSO que muestran efecto sobre la muerte celular después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM

Análisis		CBD + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	NS2 + HP	HP
Estadístico	Control	10 µM	1 mM	100 µM	10 µM	1 µM	0.1 µM	10 µM
	180	180	180	125	180	246	246	254

ES 2 989 113 T3

	117	133	204	125	180	196	315	246
	180	117	133	246	172	246	204	319
	164	129	117	246	180	188	350	246
	144	184	250	133	192	250	259	259
Media	157*	161*	177*	175*	181*	225	275	265
Error Std.	12	12	24	29	3	14	26	14
Valor p*	<0,001	<0,001	<0,002	<0,002	<0,003	N.S.	N.S.	N.S.
% del control	100 ± 8	103 ± 8	113 ± 15	111 ± 18	115 ± 2	143 ± 9	175 ± 17	169 ± 9

* Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo

N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

- 5 i. Experimento 9: Respuesta a la dosis a vehículos de formulación. Efecto sobre la viabilidad neuronal después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM.
- i. Agentes de prueba: Captisol® [Cap; (5 mg/ml, es decir, el 0,5%)] y DMSO al 1% (abreviado a DM; el 1% fue la concentración más alta usada). Las cantidades usadas para las formulaciones se igualaron a las usadas en los estudios de NS2.
- 10 ii. Ensayo: CFDA
- iii. Toxina: peróxido de hidrógeno 10 µM
- iv. Duración del tratamiento: 5 horas
- v. Medio de crecimiento: medio B27/neurobasal sin antioxidantes
- vi. Matriz de cultivo: poli-L-lisina
- 15 vii. Conclusiones: No hubo efecto detectable sobre la viabilidad neuronal de Captisol® o DMSO cuando se ensayaron en las mismas condiciones que para NS2. Los resultados se muestran en las tablas 17 y 18 y la figura 34.

Tabla 17. Datos de respuesta a la dosis para vehículos de formulación que muestran efecto sobre la viabilidad neuronal después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM

Análisis		CBD + HP	Cap + HP	Cap + HP	Cap + HP	Cap + HP	Cap + HP	HP
Estadístico	Control	10 µM	500 µg/ml	50 µg/ml	5 µg/ml	500 pg/ml	50 pg/ml	10 µM
	52563	52563	24629	26471	23833	23228	27627	24629
	34496	34496	29230	24629	25171	28219	23833	26094
	49934	42719	20687	27627	23833	25171	24718	23228
	38422	42719	31107	26188	27627	26471	26094	21889
	45016	45216	29746	23228	29230	23572	26094	27627
Media	44086*	43543*	27080	25629	25939	25332	25673	24693
Error Std.	3398	2893	1934	767	1076	927	651	1014
Valor p*	<0,001	<0,001	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
% del control	100 ± 8	99 ± 7	61 ± 4	58 ± 2	59 ± 2	57 ± 2	58 ± 2	56 ± 2

20 * Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo

N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

Tabla 18. Datos de respuesta a la dosis para vehículos de formulación que muestran efecto sobre la viabilidad neuronal después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM

Análisis		CBD + HP	DM + HP	DM + HP	DM + HP	DM + HP	DM + HP	HP
Estadístico	Control	10 µM	1%	0.1%	0.01%	0.001%	0.001%	10 µM
	52563	52563	24629	31665	24629	21003	23228	22218
	34496	34496	24629	25171	26094	32661	28219	23428
	49934	42719	24629	32886	24629	29230	19685	24899
	38422	42719	27627	22089	26094	18215	19385	21889
	45016	45216	27627	29333	24629	18215	21971	26482
Media	44086*	43543*	25828	28229	25215	23865	22498	23783
Error Std.	3398	2893	734	2022	359	2985	1599	857
Valor p*	<0,001	<0,001	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
% del control	100 ± 8	99 ± 7	59 ± 2	64 ± 5	57 ± 1	54 ± 7	51 ± 4	54 ± 2

25 * Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo

N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

- j. Experimento 10: Respuesta a la dosis a vehículos de formulación. Efecto sobre la muerte celular después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM.
- 30 i. Agentes de prueba: Captisol® [Cap; (5 mg/ml, es decir, el 0,5%)] y DMSO al 1% (abreviado a DM; el 1% fue la concentración más alta usada).
- ii. Ensayo: Yoduro de propidio
- iii. Toxina: peróxido de hidrógeno 10 µM
- 35 iv. Duración del tratamiento: 5 horas
- v. Medio de crecimiento: medio B27/neurobasal sin antioxidantes
- vi. Matriz de cultivo: poli-L-lisina
- vii. Conclusiones: No hubo efecto detectable sobre la muerte celular de Captisol® o DMSO cuando se ensayaron en las mismas condiciones que para NS2. Los resultados se muestran en las tablas 19 y 20 y la figura 35.

Tabla 19. Datos de respuesta a la dosis para vehículos de formulación que muestran efecto sobre la muerte celular después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM

Análisis		CBD + HP	Cap + HP	Cap + HP	Cap + HP	Cap + HP	Cap + HP	HP
Estadístico	Control	10 µM	500 µg/ml	50 µg/ml	5 µg/ml	500 pg/ml	50 pg/ml	10 µM
	124	140	246	246	246	246	229	263
	144	133	246	254	250	246	229	188
	117	180	263	180	140	180	246	246
	180	184	250	350	246	315	246	246
	144	156	250	315	288	319	246	250
Media	142*	159*	251	269	234	261	239	239
Error Std.	11	10	3	29	25	26	4	13
Valor p*	<0,001	<0,003	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
% del control	100 ± 8	112 ± 7	177 ± 2	189 ± 20	165 ± 18	184 ± 18	168 ± 3	168 ± 9

Cap = vehículo Captisol®

5 * Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo

N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

Tabla 20. Datos de respuesta a la dosis para vehículos de formulación que muestran efecto sobre la muerte después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM

Análisis		CBD + HP	DM + HP	DM + HP	DM + HP	DM + HP	DM + HP	HP
Estadístico	Control	10 µM	1%	0.1%	0.01%	0.001%	0.001%	10 µM
	125	140	250	297	276	267	246	267
	144	133	246	297	267	259	246	254
	117	180	315	276	246	246	184	246
	180	184	230	192	250	246	267	246
	144	156	267	276	246	246	225	246
Media	142*	159*	262	268	257	253	234	252
Error Std.	11	10	15	19	6	4	14	4
Valor p*	<0,001	<0,003	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
% del control	100 ± 8	112 ± 7	185 ± 11	189 ± 13	181 ± 4	178 ± 3	165 ± 10	177 ± 3

10 DM = vehículo DMSO

* Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo

N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

7. Resumen de las observaciones y conclusiones

15 A. NS2 mostró actividad neuroprotectora contra la toxicidad de peróxido de hidrógeno en el ensayo de CFDA, con ambas formulaciones (DMSO y Captisol®) y con ambos lotes de compuesto (CoreRx y J-Star, molido y no molido, respectivamente).

20 B. El efecto neuroprotector de NS2 en el ensayo de CFDA fue igual al control (sin tratamiento de HP) y control positivo (CBD), lo que indica protección completa.

25 C. La protección completa relativa a los controles se observó con ambas formulaciones de NS2 y lotes de NS2 a 100 µM de NS2 en el ensayo de viabilidad neuronal de CFDA, mientras la concentración de no efecto para ambas formulaciones y lotes fue 1 µM.

30 D. La curva no lineal que ajusta los análisis logísticos indica que las CE₅₀ de NS2 en el ensayo de viabilidad neuronal de CFDA variaban de 3 a 10 µM. La mejor estimación de CE₅₀ disponible es del NS2 CoreRx (molido) formulado en Captisol®, que mostró una CE₅₀ de 7 ± 4 µM. Todas las CE₅₀ de las diferentes formulaciones de NS2 para el ensayo de CFDA están en este intervalo. Nuestra conclusión es que los dos lotes del compuesto y las dos formulaciones se caracterizan por su sustancial similitud.

35 E. NS2 mostró efecto protector contra la toxicidad de peróxido de hidrógeno en el ensayo de yoduro de propidio (PI). Esto se observó con ambas formulaciones y con ambos lotes de compuesto.

F. El efecto protector de NS2 en el ensayo de PI fue igual al control (sin tratamiento de HP) y control positivo (CBD), lo que indica protección completa.

40 G. La protección completa relativa a los controles sin tratamiento se observó con ambas formulaciones de NS2 y lotes de NS2 a 10 µM de NS2 en el ensayo de PI, mientras la concentración de no efecto para ambas formulaciones y lotes fue 1 µM. Era un hallazgo consistente que la respuesta de NS2 en el ensayo de muerte celular mostrara mayor potencia para la protección completa que en el ensayo de CFDA. Se debe reconocer que el ensayo de muerte celular no es específico para neuronas y puede implicar células no neuronales que están presentes en este modelo del SNC.

H. El ajuste de curva logística no lineal indica que las CE_{50} de NS2 en el ensayo de viabilidad neuronal de PI variaba de 1,1 a 2,8 μM . Sin embargo, la naturaleza inclinada de la curva logística hace las estimaciones difíciles sin la medida de respuestas a concentraciones semilogarítmicas para ayudar a definir el punto de inflexión de las curvas. La mejor estimación disponible es el valor medio para todos los datos de PI, que es $2 \pm 1 \mu\text{M}$. Nuestra conclusión es que los dos lotes de compuestos y las dos formulaciones se caracterizaban por su sustancial similitud. Debido a los estrechos intervalos de respuesta en el ensayo de PI, se pueden requerir análisis adicionales para refinar la estimación de la CE_{50} . Estos datos sugieren que NS2 puede ser más potente en prevenir la muerte celular que en aumentar la viabilidad neuronal contra la toxicidad de peróxido de hidrógeno.

I. La señal tóxica producida por peróxido de hidrógeno 10 μM era típica de una amplia variedad de estresantes oxidativos (etanol, metales pesados, acetato de amonio, y glutamato) que se han ensayado en el pasado, con disminuciones del control que varían desde el 30 al 50%.

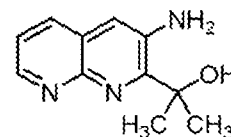
J. El control positivo (cannabidiol 10 μM) era activo en cada placa de prueba, lo que indica que el sistema modelo respondía de una manera típica.

Ejemplo 13: Respuestas a la dosis para tres compuestos deuterados que evalúan la actividad protectora de toxicidad de peróxido de hidrógeno en cultivos de hipocampo dissociado

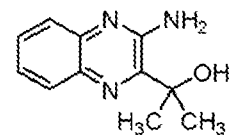
A. Plan experimental para la evaluación de respuesta a la dosis para protección de toxicidad de peróxido de hidrógeno

1. Agentes de prueba:

a. ALD-6 lote 1 (Legacy ID: NS2-D6 o compuesto I-1); cantidad usada: 5,0 mg; MW = 242,734.



b. ALD-5 – lote 1 (Legacy ID: D3); cantidad usada: 6,1 mg; MW = 203,34; estructura:



c. ALD-2 – lote 1 (Legacy ID: D2); cantidad usada: 5,6 mg; MW = 203,24; estructura:

2. Formulación y preparación de solución madre

a. Se usó dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% para todas las muestras.

b. Observaciones:

i. ALD-6: (5 mg, 20,6 μmol) de ALD-6 se disolvió en 0,206 ml de DMSO para una solución madre 100 mM. La solución ALD-6/DMSO 100 mM era transparente. Se hicieron diluciones logarítmicas con DPBS. Tras la dilución de 1:10 a 10 mM con DPBS, la solución se volvió turbia, pero se volvió transparente después de mezclar con el vortex. En general, el objetivo de concentración de referencia para DMSO en cultivos neuronales primarios es menos del 0,1%, para evitar efectos farmacológicos del DMSO. Nótese que se usó DMSO al 0,3% para la concentración de prueba 300 μM de todas las muestras. No se observó toxicidad aparente en los ensayos después de 5 h de prueba.

ii. ALD-5: la solución madre 100 mM de ALD-5 se preparó disolviendo 6,1 mg (30 μmol) en 0,3 ml de DMSO. La mezcla ALD-5/DMSO era una solución amarilla transparente. Se hicieron diluciones logarítmicas con DPBS. Tras la dilución de 1:10 a 10 mM con DPBS, la solución permaneció una solución amarilla transparente.

iii. ALD-2: la solución madre 100 mM de ALD-2 se preparó disolviendo 5,6 mg (27,55 μmol) en 0,275 ml de DMSO. La mezcla ALD-2/DMSO era una solución ámbar transparente. Se hicieron diluciones logarítmicas con DPBS. Tras la dilución de 1:10 a 10 mM con DPBS, la solución permaneció una solución ámbar transparente.

c. Detalles sobre la preparación de soluciones madre: Dilución del compuesto en DMSO/DPBS

i. La solución madre A era 100 mM de compuesto en DMSO al 100%.

ii. La solución madre B se preparó añadiendo 50 μl de solución madre A a 450 μl de DPBS para una concentración final de 10 mM. Añadir 3,3 μl en 100 μl de DPBS para dar una concentración final de 3100 μM en DMSO al 0,3%.

- iii. La solución madre C se preparó añadiendo 50 µl de solución madre B a 450 µl de DPBS para una concentración final de 1 mM. Añadir 10 µl en 100 µl de DPBS para dar una concentración final de 100 µM en DMSO al 0,1%.
- 5 iv. La solución madre D se preparó añadiendo 50 µl de solución madre C a 450 µl de DPBS para una concentración final de 100 µM. Añadir 10 µl en 100 µl de DPBS para dar una concentración final de 10 µM en DMSO al 0,01%.
- v. La solución madre E se preparó añadiendo 50 µl de solución madre D a 450 µl de DPBS para una concentración final de 10 µM. Añadir 10 µl en 100 µl de DPBS para dar una concentración final de 1 µM en DMSO al 0,001%.
- 10 vi. La solución madre F se preparó añadiendo 50 µl de solución madre E a 450 µl de DPBS para una concentración final de 1 µM. Añadir 10 µl en 100 µl de DPBS para dar una concentración final de 0,1 µM en DMSO al 0,0001%.
- vii. Se añadieron 10 µl de la dilución apropiada a 90 µl para un volumen total de 100 µl en el pocillo.
- 15 3. Condiciones de cultivo diseñadas para detectar neuroprotección de estrés oxidativo asociado con peróxido de hidrógeno:
- a. Los cultivos de hipocampo de rata se prepararon como se ha descrito previamente (Brenneman DE, Smith GR, Zhang Y, Du Y, Kondaveeti SK, Zdilla MJ, Reitz AB. (2012) *J. Molecular Neuroscience*, 47:368-379). En estas condiciones, los cultivos son al menos el 90% neuronales. Las células no neuronales más abundantes son astrocitos. Se compró tejido de hipocampo de rata E18 se compró de Brain Bits, LLC (Springfield IL). El tejido se almacenó en medio Hibernate E para transporte.
- 20 b. Todos los cultivos se prepararon en un formato de 96 pocillos a una densidad de siembra de 10K células por pocillo. Los cultivos se trataron entre el día 10 y el día 21 después de la disociación de tejido de hipocampo E18. Para estos experimentos, todas las placas se trataron el día 13. En todos los experimentos, el peróxido de hidrógeno se añadió a los cultivos 10 minutos después del tratamiento con el agente de prueba o control positivo (cannabidiol). Para cada condición de tratamiento, el número de replicados fue cinco.
- 25 c. Todos los cultivos se sembraron en medio B27/basal neural. El día del tratamiento, a todos los cultivos se les dio un cambio completo de medio a B27/medio basal neural sin antioxidantes.
- d. Como se ha determinado previamente (Brenneman et al., 2012) se usó peróxido de hidrógeno 10 µM para producir toxicidad y estrés oxidativo. Como se ha descrito previamente (Jarrett, SG, Liang, L-P, Hellier, JL, Staley, KJ y Patel, M. (2008) *Neurobiol. Dis* 30(1): 130-138), se ha observado que el peróxido de hidrógeno 10 µM en el hipocampo de ratas con un modelo kainato de estado epiléptico.
- 30 e. El control positivo usado en todos los estudios fue cannabidiol 10 µM, un agente antioxidante conocido (Hampson et al. (1998), *Proc.Nat.Acad. Sci* 95:8268-8273) que es protector contra el estrés oxidativo en neuronas primarias (Brenneman, DE, Petkanas, D y Kinney, W.A. (2014) *Annual Symposium on the Cannabinoids*, página 129).
- 35 f. Ni los pocillos de control negativo, ni los pocillos de peróxido de hidrógeno, ni los pocillos de control positivo contenían ningún vehículo de fármaco.
- 45 4. Ensayos
- Ambos ensayos usados en este estudio se han descrito en detalle (Brenneman DE, Smith GR, Zhang Y, Du Y, Kondaveeti SK, Zdilla MJ, Reitz AB. (2012) *J. Molecular Neuroscience*, 47:368-379).
- 50 a. El ensayo de viabilidad neuronal CFDA: En este ensayo, el colorante CFDA es absorbido por todas las células vivas, y cortado por esterasas para liberar fluoresceína. La especificidad neuronal se alcanza porque las neuronas no pueden eliminar este colorante, mientras la salida del colorante de células neuronales se puede producir a lo largo del tiempo. Después de lavar el colorante extracelular, los cultivos se leyeron en un fluorímetro, la intensidad de colorante intracelular es proporcional a la población neuronal viva. Referencia original: Petroski, RE y Geller HM. (1994) *Selective labeling of embryonic neurons cultures on astrocyte monolayers with 5(6)-carboxyfluorescein diacetate (CFDA)* *J. Neurosci. Methods* 52:23-32. El nivel control medio para cada experimento se muestra como una línea de referencia discontinua de trazo largo.
- 55 b. Un ensayo de muerte celular, usando yoduro de propidio, se realizó simultáneamente con el ensayo de CFDA en el mismo pocillo. Este colorante es excluido de células vivas y se une al ADN de células muertas. El ensayo detecta muerte celular tanto necrótica como apoptótica; no distingue entre muerte celular neuronal y muerte celular no neuronal. Véase, Sarafian TA, Kouyoumjian S, Tashkin D, Roth MD. (2002) *Tox. Letters*. 133: 171-179. El nivel control medio para cada experimento se muestra como una línea de referencia discontinua de trazo medio.
- 60 c. Reactivos usados:
- 65

- i. Solución de peróxido de hidrógeno, 30% en peso; Sigma-Aldrich (216736-100 ml, lote MKBV382V)
- ii. Dimetilsulfóxido; Sigma-Aldrich (472301-100 ml) lote 21096JK
- iii. Yoduro de propidio; Sigma-Aldrich (P4864-10 ml; solución 1 mg/ml en agua)
- iv. CFDA [diacetato de 5-(6)-carboxifluoresceína] Sigma-Aldrich número de producto: 21879-100 mg-F
- v. Solución de cannabidiol, 10 mg/ml en etanol; Sigma-Aldrich número de producto: 90899-1 ml
- vi. Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco. Gibco (14190-144) lote 1165767

5. Análisis de datos

10 a. Adquisición de datos: Los datos se almacenaron en ordenadores Advanced Neural Dynamics para análisis. La adquisición de datos se realizó en un fluorímetro Cytofluor y se transfirió a una hoja de cálculo Excel para análisis con Sigma PLOT 11.

15 b. Análisis estadístico: Todos los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza con el método de comparaciones múltiples frente a grupo control (Holm-Sidak). Se tomó la significancia estadística al nivel $P < 0,05$. En todos los casos, las comparaciones se hicieron al control negativo (tratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM).

c. Metodología para la determinación de CE_{50}

20 i. Se eligió un amplio intervalo de concentración para cribar los compuestos en un análisis de potencia de CE_{50} . Se usó una serie de concentraciones logarítmicas desde 0,1 μM a 300 μM .

ii. Se usó un análisis de regresión no lineal para determinar la ecuación de la línea que ajusta mejor los datos (curva logística de cuatro parámetros)

25 iii. Basado en la ecuación logística siguiente, las CE_{50} para neuroprotección se calcularon y representaron por SigmaPlot 11 para determinar la concentración requerida para producir respuestas semimáximas para ambos ensayos. Se usaron líneas verticales para mostrar las intersecciones de los ejes que determinan la CE_{50} .

30 B. Resumen de los estudios de protección para compuestos de Aldeyra en cultivos de hipocampo de rata.

Tabla 21: Resumen de datos de los estudios de protección para

Ensayo	Compuesto	Formulación	Concentración de eficacia completa*	Concentración de no efecto	$CE_{50} \pm EE$
CFDA	ALD-6	DMSO	100 μM	1 μM	$6,8 \pm 1,2 \mu\text{M}$
CFDA	ALD-5	DMSO	Inactivo	Inactivo	Inactivo
CFDA	ALD-2	DMSO	Inactivo	Inactivo	Inactivo
PI	ALD-6	DMSO	10 μM	0,1 μM	$0,32 \pm 0,03 \mu\text{M}$
PI	ALD-5	DMSO	Inactivo	Inactivo	Inactivo
PI	ALD-2	DMSO	Inactivo	Inactivo	Inactivo

35 * La concentración del agente de prueba que muestra niveles de respuesta en el ensayo no significativamente diferente de la de los controles sin tratamiento.

C. Análisis gráficos de los hallazgos experimentales de datos sin procesar

40 1. Experimento 1: Respuesta a la dosis de ALD-6. Efecto sobre la viabilidad neuronal después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM .

- a. Formulación: DMSO
- b. Ensayo: CFDA
- c. Toxina: peróxido de hidrógeno 10 μM
- d. Duración del tratamiento: 5 horas
- 45 e. Medio de crecimiento: medio B27/neurobasal sin antioxidantes
- f. Matriz de cultivo: poli-L-lisina
- g. Conclusiones: la CE_{50} se observó a $6,8 \pm 1,2 \mu\text{M}$; la eficacia completa relativa a los controles (CBD + HP y control sin tratamiento) se observó a 100 μM de ALD-6. ALD-6 es completamente neuroprotector contra la toxicidad de peróxido de hidrógeno a 100 μM en este ensayo. Los resultados se muestran en la tabla 22 y las figuras 36 y 37.

50 Tabla 22: Datos de respuesta a la dosis para ALD-6 que muestra efecto sobre la viabilidad neuronal después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μM

Análisis		CBD + HP	ALD6 + HP	ALD6 + HP	ALD6 + HP	ALD6 + HP	ALD6 + HP	HP

ES 2 989 113 T3

Estadístico	Control	10 μ M	300 μ M	100 μ M	10 μ M	1 μ M	0.1 μ M	10 μ M
	59551	67121	65778	61821	47737	43459	41244	31224
	55935	52880	53184	50555	53184	40839	36732	32978
	61821	55631	53184	57177	45333	33090	31224	43036
	59247	64665	53184	52880	53184	43340	31224	34419
	54201	67958	59551	63181	40839	29547	31547	30376
Media	58151*	57221*	56976*	57123*	48055*	38055	34394	34407
Error Std.	1363	1977	2522	2449	2368	2845	2007	2268
Valor p*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	N.S.	N.S.	N.S.
% del control	100 + 2	98 + 3	98 + 4	98 + 4	83 + 4	65 + 5	59 + 3	59 + 4

* Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 μ M solo.

N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 μ M solo.

2. Experimento 2: Efecto de respuesta a la dosis de ALD-6 sobre la muerte celular después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μ M.

a. Formulación: DMSO

b. Ensayo: Yoduro de propidio

c. Toxina: peróxido de hidrógeno 10 μ M

d. Duración del tratamiento: 5 horas

e. Medio de crecimiento: medio B27/neurobasal sin antioxidantes

f. Matriz de cultivo: poli-L-lisina

g. Conclusiones: la CE₅₀ se observó a 0,32 \pm 0,03 μ M; la eficacia completa relativa a los controles (CBD + HP y control sin tratamiento) se observó a 10 μ M de ALD-6. ALD-6 es completamente neuroprotector contra la toxicidad de peróxido de hidrógeno en este ensayo. Estos datos sugieren que el efecto protector contra la muerte celular es más potente que el observado para la viabilidad neuronal. Los resultados se muestran en la tabla 23 y las figuras 38 y 39.

Tabla 23: Datos de respuesta a la dosis para ALD-6 que muestra efecto sobre la viabilidad neuronal después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μ M

Análisis		CBD + HP	ALD6 + HP	ALD6 + HP	ALD6 + HP	ALD6 + HP	ALD6 + HP	HP
Estadístico	Control	10 μ M	300 μ M	100 μ M	10 μ M	1 μ M	0.1 μ M	10 μ M
	159	119	159	167	179	214	225	225
	159	159	189	193	183	183	250	366
	171	171	189	206	189	223	294	294
	163	123	147	189	189	183	242	255
	171	197	197	135	139	189	356	329
Media	165*	154*	176*	178*	176*	198*	273	294
Error Std.	3	15	10	12	9	8	24	25
Valor p*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	N.S.	N.S.
% del control	100 + 2	93 + 9	107 + 6	108 + 7	107 + 5	120 + 5	165 + 15	178 + 15

* Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 μ M solo.

N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 μ M solo.

3. Experimento 3: Respuesta a la dosis de ALD-5 en DMSO. Efecto sobre la viabilidad neuronal después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μ M.

a. Formulación: DMSO

b. Ensayo: CFDA

c. Toxina: peróxido de hidrógeno 10 μ M

d. Duración del tratamiento: 5 horas

e. Medio de crecimiento: medio B27/neurobasal sin antioxidantes

f. Matriz de cultivo: poli-L-lisina

g. Conclusiones: No hubo actividad neuroprotectora estadísticamente significativa de ALD-5 contra la toxicidad de peróxido de hidrógeno desde 0,1 a 300 μ M. Los resultados se muestran en la tabla 24 y la figura 40.

Tabla 24: Datos de respuesta a la dosis para ALD-5 que muestra efecto sobre la viabilidad neuronal después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 μ M

Análisis		CBD + HP	ALD5 + HP	ALD5 + HP	ALD5 + HP	ALD5 + HP	ALD5 + HP	HP
Estadístico	Control	10 μ M	300 μ M	100 μ M	10 μ M	1 μ M	0.1 μ M	10 μ M
	55631	58812	40839	41143	39126	42756	39043	34930
	58508	51551	43036	43743	37102	35588	38739	41244
	58508	58812	41143	32978	41379	34189	40839	41925
	57357	55983	44028	36732	34115	38997	38739	33203
	54068	62790	42201	33429	32978	35707	37350	35588
Media	56814*	57590*	42249	37605	36940	37447	38942	37378
Error Std.	865	1858	592	2119	1552	1544	558	1764
Valor p*	< 0,001	<0,001	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

ES 2 989 113 T3

% del control	100 + 2	101 + 3	74 + 1	66 + 4	65 + 3	66 + 3	69 + 1	66 + 3
---------------	---------	---------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

* Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

4. Experimento 4: Respuesta a la dosis de ALD-5. Efecto sobre la muerte celular después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM.
- a. Formulación: DMSO
 - b. Ensayo: Yoduro de propidio
 - c. Toxina: peróxido de hidrógeno 10 µM
 - d. Duración del tratamiento: 5 horas
 - e. Medio de crecimiento: medio B27/neurobasal sin antioxidantes
 - f. Matriz de cultivo: poli-L-lisina
 - g. Conclusiones: No hubo actividad estadísticamente significativa de protección de la muerte celular desde 0,1 a 300 µM de ALD-5. Los resultados se muestran en la tabla 25 y la figura 41.

Tabla 25: Datos de respuesta a la dosis para ALD-5 que muestra efecto sobre la muerte celular después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM

Análisis		CBD + HP	ALD5 + HP	ALD5 + HP	ALD5 + HP	ALD5 + HP	ALD5 + HP	HP
Estadístico	Control	10 µM	300 µM	100 µM	10 µM	1 µM	0,1 µM	10 µM
	159	147	294	294	225	294	294	258
	123	164	293	255	294	294	294	294
	159	164	352	250	294	294	366	255
	179	83	294	250	294	285	225	330
	127	123	294	294	320	294	325	294
Media	149*	136*	305	269	285	292	301	286
Error Std.	11	15	12	10	16	2	23	14
Valor p*	<0,001	<0,001	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
% del control	100 ± 7	91 ± 10	205 ± 8	181 ± 7	191 ± 11	196 ± 1	202 ± 15	192 ± 9

* Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

5. Experimento 5: Respuesta a la dosis de ALD-2. Efecto sobre la viabilidad neuronal después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM.
- a. Formulación: DMSO
 - b. Ensayo: CFDA
 - c. Toxina: peróxido de hidrógeno 10 µM
 - d. Duración del tratamiento: 5 horas
 - e. Medio de crecimiento: medio B27/neurobasal sin antioxidantes
 - f. Matriz de cultivo: poli-L-lisina
 - g. Conclusiones: ALD-2 no tuvo neuroprotección estadísticamente significativa de descensos en la viabilidad neuronal en cultivos tratados con peróxido de hidrógeno. Los resultados se muestran en la tabla 26 y la figura 42.

Tabla 26: Datos de respuesta a la dosis para ALD-2 que muestran efecto sobre la viabilidad neuronal después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM

Análisis		CBD + HP	ALD2 + HP	ALD2 + HP	ALD2 + HP	ALD2 + HP	ALD2 + HP	HP
Estadístico	Control	10 µM	300 µM	100 µM	10 µM	1 µM	0,1 µM	10 µM
	58877	55631	43036	45628	43601	43743	40839	34813
	58508	54240	45924	35522	38997	36732	33885	40839
	56160	50251	45628	36732	50251	43036	40839	43036
	55631	62291	36732	43176	36732	35522	40839	31224
	55807	52880	35048	32311	32978	31331	34813	41244
Media	56997*	55059*	41274	38674	40512	38073	38243	38231
Error Std.	700	2015	2270	2478	2981	2351	1596	2233
Valor p*	<0,001	<0,001	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
% del control	100 ± 1	97 ± 4	72 ± 4	68 ± 4	71 ± 5	67 ± 4	67 ± 3	67 ± 4

* Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

6. Experimento 6: Respuesta a la dosis de ALD-2. Efecto sobre la muerte celular después del cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM.
- a. Formulación: DMSO
 - b. Ensayo: Yoduro de propidio
 - c. Toxina: peróxido de hidrógeno 10 µM
 - d. Duración del tratamiento: 5 horas
 - e. Medio de crecimiento: medio B27/neurobasal sin antioxidantes

- f. Matriz de cultivo: poli-L-lisina
- g. Conclusiones: No hubo protección estadísticamente significativa de la muerte celular por peróxido de hidrógeno después del tratamiento con ALD-2. Los resultados se muestran en la tabla 27 y la figura 43.

5 Tabla 27: Datos de respuesta a la dosis para ALD-2 que muestran efecto sobre la muerte celular después de cotratamiento con peróxido de hidrógeno 10 µM

Análisis		CBD + HP	ALD2 + HP	ALD2 + HP	ALD2 + HP	ALD2 + HP	ALD2 + HP	HP
Estadístico	Control	10 µM	300 µM	100 µM	10 µM	1 µM	0,1 µM	10 µM
	143	104	294	294	225	242	266	398
	159	175	242	225	225	298	294	255
	159	139	302	225	293	229	258	242
	159	159	294	258	329	294	294	294
	175	147	320	242	258	258	259	259
Media	159*	145*	290	249	266	264	274	290
Error Std.	5	12	13	13	20	14	8	28
Valor p*	< 0,001	<0,001	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
% del control	100 ± 3	91 ± 8	182 ± 8	157 ± 8	167 ± 13	166 ± 9	172 ± 5	182 ± 18

* Significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

N.S.: No significativamente diferente del tratamiento con peróxido de hidrógeno a 10 µM solo.

10 7. Resumen de observaciones y conclusiones.

a. ALD-6 mostró actividad neuroprotectora contra la toxicidad de peróxido de hidrógeno en el ensayo de CFDA.

15 b. El efecto neuroprotector de ALD-6 en el ensayo de CFDA no era estadísticamente diferente de los valores del control (sin tratamiento con HP) y control positivo (CBD), lo que indica protección completa.

c. La protección completa relativa a los controles se observó a 100 µM de ALD-6 en el ensayo de viabilidad neuronal de CFDA. La concentración de no efecto para ALD-6 en el ensayo de CFDA fue 1 µM.

20 d. Los análisis logísticos de ajuste de curva no lineal indicaron que la CE₅₀ de ALD-6 en el ensayo de viabilidad neuronal de CFDA era 6,8 ± 1,2 µM.

25 e. ALD-6 mostró actividad protectora de la muerte celular del tratamiento con peróxido de hidrógeno en el ensayo de yoduro de propidio (PI).

f. El efecto protector de ALD-6 de la muerte celular en el ensayo de PI no era estadísticamente diferente de los valores del control (sin tratamiento con HP) y control positivo (CBD), lo que indica protección completa.

30 g. La protección completa relativa a los valores de control sin tratamiento se observó con ALD-6 a 10 µM en el ensayo de PI, mientras la concentración de no efecto fue 0,1 µM. La respuesta a ALD-6 en el ensayo de muerte celular mostró mayor potencia que en el ensayo de CFDA. Se debe reconocer que el ensayo de muerte celular no es específico para neuronas y puede implicar células no neuronales que están presentes en este sistema de SNC modelo.

35 h. El ajuste de curva logística no lineal indicaba que la la CE₅₀ para ALD-6 en el ensayo de PI era 0,32 ± 0,03 µM.

i. El tratamiento con ALD-5 o ALD-2 desde 0,1 a 300 µM no produjo neuroprotección estadísticamente significativa del tratamiento con peróxido de hidrógeno solo como se evalúa por el ensayo de CFDA.

40 j. El tratamiento con ALD-5 o ALD-2 desde 0,1 a 300 µM no produjo protección estadísticamente significativa de muerte celular producida por tratamiento con peróxido de hidrógeno como se evalúa por el ensayo de PI.

45 k. La señal tóxica producida por peróxido de hidrógeno 10 µM era típica de una amplia variedad de estresantes oxidativos (etanol, metales pesados, acetato de amonio, y glutamato) que se han ensayado en el pasado, con disminuciones desde el control que varían desde el 30 al 50%.

l. El control positivo (cannabidiol 10 µM) era activo en cada placa de prueba, lo que indica que el sistema modelo respondía de una manera protectora típica.

Ejemplo 14: Farmacología *in vivo* de NS2-D6 (compuesto I-1)

50 Se ensayó NS2-D6 (compuesto ID 100029054-1; número de lote 1603356191) en ensayos de unión y absorción de enzimas. La unión del compuesto se calculó como un % de inhibición de la unión de un ligando marcado con radioactividad específico para cada diana. El efecto de inhibición enzimática del compuesto se calculó como un % de inhibición de una actividad enzimática control. Se considera que los resultados que muestran una inhibición o

estimulación mayor del 50% representan efectos significativos de los compuestos de prueba. Tales efectos se observaron aquí y se enumeran en las siguientes tablas.

Compuestos de referencia.

5 En cada experimento y si es aplicable, el compuesto de referencia respectivo se ensayó al mismo tiempo que NS2-D6, y los datos se compararon con valores históricos determinados en la misma instalación de investigación. El experimento se realizó según procedimientos de operación estándar en la industria.

10 Resultados

La tabla 28 resume los resultados de inhibición enzimática

Tabla 28: Resumen de los resultados de inhibición enzimática

Ensayo	1,0E-05 M
5-HT _{2B} (<i>h</i>) (radioligando agonista)	62,5%
acetilcolinesterasa (<i>h</i>)	52,9%
MAO-A (radioligando antagonista)	68,5%
MT ₃ (ML ₂) (radioligando agonista)	71,1%
PR (<i>h</i>) (radioligando agonista)	60,9%

15 Los resultados de los compuestos de prueba se muestran en las figuras 44-46. La Tabla 29 muestra resultados de unión específica para NS-2-D6

Tabla 29: Resultados de compuestos de prueba

Compuesto I.D.	Compuesto cliente I.D.	Concentración de prueba	% de inhibición de unión específica control		
			1 ^a	2 ^a	Media
A₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	3,5	5,3	4,4
A_{2A} (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-11,2	-15,0	-13,1
A_{2B} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	13,2	4,3	8,7
A₃ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	17,3	15,1	16,2
α_{1A} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	6,1	-3,3	1,4
α_{1B} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-1,8	1,0	-0,4
α_{2A} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	3,2	10,0	6,6
α_{2B} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	15,9	20,8	18,4
α_{2C} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-8,0	6,2	-0,9
β₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	9,7	11,0	10,3
β₂ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-0,6	5,8	2,6
Adrenérgico beta3					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	16,2	3,0	9,6
AT₁ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	10,7	-3,3	3,7
AT₂ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-3,5	-5,6	-4,6
APJ (apelina) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	0,8	2,2	1,5
BZD (central) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-17,2	-16,6	-16,9
BB₃ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-17,1	4,6	-6,3
B₂ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-4,5	0,1	-2,2
CB₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	21,9	20,7	21,3
CB₂ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	16,6	5,0	10,8

ES 2 989 113 T3

CCK ₁ (CCK _A) (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-10,0	11,9	0,9
CCK ₂ (CCK _B) (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-3,6	-14,6	-9,1
CRF ₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	6,7	5,7	6,2
D ₁ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	0,8	6,6	3,7
D _{2S} (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	15,2	14,4	14,8
D ₃ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	6,2	-4,1	1,1
ET _A (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-0,8	-5,8	-3,3
ET _B (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	7,6	-5,4	1,1
GABA _{A1} (<i>h</i>) (α , β 2, γ 2) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-45,9	-21,1	-33,5
GABA _{B(1b)}} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-7,2	5,2	-1,0
glucagón (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-4,2	-6,9	-5,6
AMPA (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-5,9	5,1	-0,4
kainato (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	17,5	12,1	14,8
NMDA (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	5,5	14,6	10,1
Glicina (insensible a estriquina) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-7,7	16,2	4,2
TNF- α (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-6,5	-0,9	-3,7
CCR2 (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-12,4	6,2	-3,1
H ₁ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-8,6	19,9	5,6
H ₂ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	1,1	-0,5	0,3
H ₃ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	15,3	13,9	14,6
H ₄ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	9,8	-3,3	3,2
BLT ₁ (LTB ₄) (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	9,6	7,0	8,3
CysLT ₁ (LTD ₄) (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-3,6	-17,1	-10,4
MCH ₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-3,7	-9,3	-6,5
MC ₁ (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-10,5	-5,7	-8,1
MC ₃ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-1,4	0,6	-0,4
MC ₄ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-2,8	-3,0	-2,9
MT ₁ (ML _{1A}) (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	30,0	37,7	33,9
MT ₃ (ML ₂) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	69,0	73,3	71,1
MAO-A (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	66,4	70,7	68,5
motilina (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-12,2	-3,9	-8,0
M ₁ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-2,6	0,5	-1,1
M ₂ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-4,2	-0,4	-2,3
M ₃ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	4,6	13,6	9,1
M ₄ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-1,0	9,2	4,1

ES 2 989 113 T3

NK ₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	4,2	4,1	4,2
NK ₂ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	18,6	-4,5	7,0
Y ₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-8,7	7,5	-0,6
N neuronal $\alpha 4\beta 2$ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-5,7	-6,7	-6,2
N de tipo muscular (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-16,8	0,7	-8,1
δ (DOP) (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	3,8	-1,4	1,2
κ (KOP) (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	13,3	16,2	14,8
μ (MOP) (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	3,0	6,8	4,9
NOP (ORL1) (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	10,8	18,7	14,8
PPAR γ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	13,1	23,6	18,3
PAF (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-10,1	7,4	-1,3
PCP (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	2,1	6,5	4,3
EP ₂ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	18,1	41,5	29,8
FP (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	10,7	-4,5	3,1
IP (PGI ₂) (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	5,0	-9,1	-2,0
LXR β (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-10,5	-3,9	-7,2
5-HT _{1A} (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	5,4	-1,8	1,8
5-HT _{1B} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-16,3	0,5	-7,9
5-HT _{1D} (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-3,4	-5,1	-4,2
5-HT _{2A} (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	5,4	17,8	11,6
5-HT _{2B} (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	60,8	64,2	62,5
5-HT _{2c} (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-3,1	10,0	3,4
5-HT ₃ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-3,0	2,2	-0,4
5-HT _{4e} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-5,5	-2,6	-4,1
5-HT _{5a} (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	3,8	17,3	10,6
5-HT ₆ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	1,1	17,7	9,4
5-HT ₇ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	2,3	-5,6	-1,7
sigma (no selectivo) (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	16,3	13,5	14,9
sst ₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-5,1	5,0	-0,1
sst ₄ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	3,1	-5,9	-1,4
GR (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-6,7	4,1	-1,3
Estrógeno ER alfa (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	15,8	4,3	10,1
PR (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	58,7	63,1	60,9
AR (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	41,4	44,3	42,8
Hormona tiroidea					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-7,9	-5,9	-6,9

ES 2 989 113 T3

UT (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	3,1	4,9	4,0
VPAC ₁ (VIP ₁) (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	0,2	1,9	1,1
V _{1a} (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	2,1	-1,2	0,5
V ₂ (<i>h</i>) (radioligando agonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	0,4	2,9	1,7
Canal de Ca ²⁺ (L, sitio de dihidropiridina) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	5,9	3,8	4,9
Canal de Ca ²⁺ (L, sitio de diltiazem) (benzotiazepinas) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	14,8	13,3	14,0
Canal de Ca ²⁺ (L, sitio de verapamil) (fenilalquilamina) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-6,5	-11,8	-9,1
Canal de Ca ²⁺ (N) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	4,6	8,1	6,3
Canal de potasio hERG (humano-[3H] Dofetilida)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	8,0	-2,8	2,6
Canal SK _{Ca} (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-10,8	-4,5	-7,7
Canal de Na ⁺ (sitio 2) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-2,7	6,2	1,8
Canal de Cl ⁻ (operado por GABA) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	33,9	42,6	38,2
transportador de norepinefrina (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	33,9	29,1	31,5
transportador de dopamina (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	19,9	27,3	23,6
transportador de GABA (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-6,1	-4,5	-5,3
transportador de colina (CHT1) (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-17,9	-13,1	-15,5
transportador de 5-HT (<i>h</i>) (radioligando antagonista)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	2,9	5,2	4,0

La tabla 30 muestra valores de CI₅₀, K_i y nH para varios compuesto de referencia que se compararon con NS2-D6.

Tabla 30: Resultados de compuestos de referencia

Compuesto I.D.	CI ₅₀ (M)	K _i (M)	nH
A ₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
CPA	3,3E-09 M	1,3E-09 M	1,2
A _{2A} (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
NECA	3,7E-08 M	3,1E-08 M	0,8
A _{2B} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)			
NECA	5,5E-07 M	5,1E-07 M	0,9
A ₃ (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
IB-MECA	2,8E-10 M	1,6E-10 M	0,8
α _{1A} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)			
WB 4101	2,5E-10 M	1,2E-10 M	1,1
α _{1B} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)			
prazosina	2,5E-10 M	6,7E-11 M	1,2
α _{2A} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)			
yohimbina	7,5E-09 M	3,3E-09 M	1,3
α _{2B} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)			
yohimbina	7,6E-09 M	5,0E-09 M	1,0
α _{2c} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)			
yohimbina	4,3E-09 M	1,4E-09 M	1,3
β ₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
atenolol	3,1E-07 M	1,7E-07 M	0,9
β ₂ (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
ICI 118551	1,3E-09 M	4,5E-10 M	1,8
Adrenérgico beta3			
alprenolol	1,4E-07 M	1,0E-07 M	0,6
AT ₁ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)			
saralasin	1,4E-09 M	6,9E-10 M	1,1
AT ₂ (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
angiotensina-II	1,2E-10 M	5,9E-11 M	0,8
APJ (apelina) (radioligando agonista)			
apelina-13, TFA	2,7E-10 M	2,5E-10 M	1,0
BZD (central) (radioligando agonista)			

ES 2 989 113 T3

diazepam	7,4E-09 M	6,2E-09 M	0,9
BB ₃ (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
Bn(6-14)	9,8E-09 M	6,0E-09 M	1,0
B ₂ (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
NPC 567	2,4E-08 M	1,2E-08 M	1,0
CB ₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
CP 55940	1,1E-09 M	9,5E-10 M	1,2
CB ₂ (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
WIN 55212-2	2,1E-09 M	1,4E-09 M	1,0
CCK ₁ (CCK _A) (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
CCK-8s	1,1E-10 M	8,3E-11 M	0,9
CCK ₂ (CCK _B) (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
CCK-8s	1,1E-10 M	4,6E-11 M	1,0
CRF ₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
sauvagina	5,5E-10 M	3,4E-10 M	1,0
D ₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
SCH 23390	2,1E-10 M	8,4E-11 M	0,7
D _{2S} (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
7-OH-DPAT	1,2E-09 M	4,8E-10 M	0,7
D ₃ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)			
(+)butaclamol	1,5E-09 M	3,2E-10 M	1,0
ET _A (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
endotelina-1	5,4E-11 M	2,7E-11 M	1,0
ET _B (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
endotelina-3	2,5E-11 M	1,4E-11 M	0,9
GABA _{A1} (<i>h</i>) (α, β2, γ2) (radioligando agonista)			
muscinol	7,0E-08 M	4,7E-08 M	0,8
GABA _{B(1B)} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)			
CGP 54626	2,9E-09 M	1,5E-09 M	0,7
glucagón (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
glucagón	1,5E-09 M	1,1E-09 M	0,6
AMPA (radioligando agonista)			
L-glutamato	2,8E-07 M	2,6E-07 M	0,9
kainato (radioligando agonista)			
ácido kainico	2,3E-08 M	1,8E-08 M	0,9
NMDA (radioligando antagonista)			
CGS 19755	2,1E-07 M	1,7E-07 M	0,9
glicina (insensible a estricnina) (radioligando antagonista)			
glicina	1,4E-07 M	1,3E-07 M	1,0
TNF-α (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
TNF-alfa	6,9E-11 M	2,3E-11 M	1,3
CCR2 (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
MCP-1	2,9E-11 M	1,2E-11 M	1,6
H ₁ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)			
pirilamina	2,5E-09 M	1,6E-09 M	1,3
H ₂ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)			
cimetidina	6,5E-07 M	6,3E-07 M	0,8
H ₃ (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
(R)α-Me-histamina	1,9E-09 M	4,7E-10 M	1,4
H ₄ (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
imetita	4,4E-09 M	1,9E-09 M	0,9
BLT ₁ (LTB ₄) (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
LTB ₄	4,2E-10 M	2,1E-10 M	0,8
CysLT ₁ (LTD ₄) (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
LTD ₄	7,0E-10 M	3,1E-10 M	1,0
MCH ₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
MCH humano	4,9E-11 M	4,5E-11 M	1,0
MC ₁ (radioligando agonista)			
NDP-α-MSH	1,8E-10 M	8,9E-11 M	1,0
MC ₃ (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
NDP-α-MSH	2,0E-10 M	1,7E-10 M	1,2
MC ₄ (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
NDP-α-MSH	4,8E-10 M	4,4E-10 M	0,7
MT ₁ (ML _{1A}) (<i>h</i>) (radioligando agonista)			
melatonina	2,0E-10 M	1,6E-10 M	1,6
MT ₃ (ML ₂) (radioligando agonista)			
melatonina	7,2E-08 M	7,1E-08 M	0,8
MAO-A (radioligando antagonista)			
clorgilina	1,7E-09 M	1,0E-09 M	1,7
motilina (<i>h</i>) (radioligando agonista)			

ES 2 989 113 T3

[Nleu ¹³]-motilina	2,0E-09 M	1,7E-09 M	1,1
M ₁ (h) (radioligando antagonista)			
pirencepina	2,2E-08 M	1,9E-08 M	1,0
M ₂ (h) (radioligando antagonista)			
metocramina	4,9E-08 M	3,4E-08 M	0,8
M ₃ (h) (radioligando antagonista)			
4-DAMP	1,8E-09 M	1,3E-09 M	1,3
M ₄ (h) (radioligando antagonista)			
4-DAMP	1,5E-09 M	9,5E-10 M	1,2
NK ₁ (h) (radioligando agonista)			
[Sar ⁹ , Met(O) ₂ ¹¹]-SP	4,9E-10 M	2,2E-10 M	1,6
NK ₂ (h) (radioligando agonista)			
[Nleu ¹⁰]-NKA (4-10)	3,1E-09 M	1,7E-09 M	0,8
Y ₁ (h) (radioligando agonista)			
NPY	9,4E-11 M	6,7E-11 M	1,3
N neuronal α2β4 (h) (radioligando agonista)			
nicotina	4,5E-09 M	1,5E-09 M	0,9
N tipo muscular (h) (radioligando antagonista)			
α-bungarotoxina	2,3E-09 M	2,1E-09 M	1,2
δ (DOP) (h) (radioligando agonista)			
DPDPE	2,7E-09 M	1,6E-09 M	0,9
κ (KOP) (h) (radioligando agonista)			
U 50488	9,3E-10 M	6,2E-10 M	1,0
μ (MOP) (h) (radioligando agonista)			
DAMGO	2,8E-10 M	1,2E-10 M	0,7
NOP (ORL1) (h) (radioligando agonista)			
nociceptina	8,4E-10 M	1,1E-10 M	1,1
PPARγ (h) (radioligando agonista)			
rosiglitazona	1,2E-08 M	6,1E-09 M	0,9
PAF (h) (radioligando agonista)			
C ₁₆ -PAF	5,8E-09 M	2,9E-09 M	1,8
PCP (h) (radioligando antagonista)			
MK 801	9,2E-09 M	5,2E-09 M	1,3
EP ₂ (h) (radioligando agonista)			
PGE ₂	3,4E-09 M	1,7E-09 M	1,1
FP (h) (radioligando agonista)			
PGE ₂ alfa	1,9E-09 M	1,2E-09 M	0,9
IP (PGI ₂) (h) (radioligando agonista)			
iloprost	1,8E-08 M	1,0E-08 M	0,9
LXRβ (h) (radioligando agonista)			
22-(R)-hidroxicolesterol	4,0E-06 M	2,7E-06 M	1,1
5-HT _{1A} (h) (radioligando agonista)			
8-OH-DPAT	5,8E-10 M	3,6E-10 M	0,8
5-HT _{1B} (h) (radioligando antagonista)			
serotonina	4,9E-09 M	3,0E-09 M	0,9
5-HT _{1D} (h) (radioligando agonista)			
serotonina	2,4E-09 M	8,1E-10 M	1,2
5-HT _{2A} (h) (radioligando agonista)			
(±)DOI	3,4E-10 M	2,5E-10 M	0,7
5-HT _{2B} (h) (radioligando agonista)			
(±)DOI	6,9E-09 M	3,4E-09 M	0,9
5-HT _{2C} (h) (radioligando agonista)			
(±)DOI	5,3E-10 M	4,7E-10 M	1,1
5-HT ₃ (h) (radioligando antagonista)			
MDL 72222	6,9E-09 M	4,8E-09 M	0,9
5-HT _{4e} (h) (radioligando antagonista)			
serotonina	2,7E-07 M	8,9E-08 M	0,7
5-HT _{5a} (h) (radioligando agonista)			
serotonina	1,5E-07 M	7,5E-08 M	1,0
5-HT ₆ (h) (radioligando agonista)			
serotonina	2,0E-07 M	9,3E-08 M	1,1
5-HT ₇ (h) (radioligando agonista)			
serotonina	3,4E-10 M	1,3E-10 M	1,0
sigma (no selectivo) (h) (radioligando agonista)			
haloperidol	6,3E-08 M	5,1E-08 M	0,7
sst ₁ (h) (radioligando agonista)			
somatostantina-28	2,0E-10 M	1,9E-10 M	0,8
sst ₄ (h) (radioligando agonista)			
somatostantina-14	9,1E-10 M	8,9E-10 M	0,9
GR (h) (radioligando agonista)			

ES 2 989 113 T3

dexametasona	4,9E-09 M	2,4E-09 M	1,2
Estrógeno ER alfa (h) (radioligando agonista)			
dimetilestilbestrol	3,7E-10 M	1,0E-10 M	1,9
PR (h) (radioligando agonista)			
progesterona	4,7E-10 M	3,8E-10 M	1,6
AR (h) (radioligando agonista)			
mibolerona	1,6E-09 M	6,9E-10 M	1,2
Hormona tiroidea			
triyodotironina	4,2E-11 M	2,3E-11 M	1,1
UT (h) (radioligando agonista)			
urotensina-II	7,7E-10 M	5,8E-10 M	1,1
VPAC ₁ (VIP ₁) (h) (radioligando agonista)			
VIP	3,5E-10 M	1,9E-10 M	1,9
V _{1a} (h) (radioligando agonista)			
[d(CH ₂) ₅ ¹ , Tyr(Me) ₂]-AVP	1,4E-09 M	8,8E-10 M	1,0
V ₂ (h) (radioligando agonista)			
AVP	4,3E-10 M	3,1E-10 M	0,7
Canal de Ca ²⁺ (L, sitio de dihidropiridina) (radioligando antagonista)			
dintrendipina	3,0E-10 M	1,9E-10 M	1,1
Canal de Ca ²⁺ (L, sitio de diltiazem) (benzotiazepinas) (radioligando antagonista)			
diltiazem	6,8E-08 M	5,3E-08 M	1,1
Canal de Ca ²⁺ (L, sitio de verapamil) (fenilalquilamina) (radioligando antagonista)			
D 600	2,7E-08 M	1,3E-08 M	0,5
Canal de Ca ²⁺ (N) (radioligando antagonista)			
ω-conotoxina GVIA	1,7E-12 M	6,8E-13 M	0,8
Canal de potasio hERG (humano-[3H] Dofetilida)			
Terfenadina	3,4E-08 M	2,3E-08 M	0,8
Canal SK _{Ca} (radioligando antagonista)			
apamina	8,8E-12 M	4,4E-12 M	1,0
Canal de Na ⁺ (sitio 2) (radioligando antagonista)			
veratridina	3,9E-06 M	3,5E-06 M	0,8
Canal de Cl ⁻ (operado por GABA) (radioligando antagonista)			
picrotoxina	2,8E-07 M	2,4E-07 M	1,0
transportador de norepinefrina (h) (radioligando antagonista)			
protriptilina	2,8E-09 M	2,1E-09 M	1,0
transportador de dopamina (h) (radioligando antagonista)			
BTCP	9,5E-09 M	5,0E-09 M	1,1
transportador de GABA (radioligando antagonista)			
ácido nipecótico	2,5E-06 M	2,5E-06 M	0,8
transportador de colina (CHT1) (h) (radioligando antagonista)			
hemicolinio-3	7,5E-09 M	4,2E-09 M	1,0
transportador de 5-HT (h) (radioligando antagonista)			
imipramina	2,7E-09 M	1,3E-09 M	1,3

La figura 47 muestra un histograma de los resultados de farmacología *in vitro* en ensayos de unión y absorción de enzimas para NS2-D6.

5 La tabla 31 muestra el % de inhibición de valores control para NS2-D6.

Tabla 31: Resultados de compuestos de prueba

Compuesto I.D.	Compuesto cliente I.D.	Concentración de prueba	% de inhibición de valores control			Indicadores	
			1°	2°	media	1°	2°
COX1 (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	20,1	-2,6	8,8		
COX2 (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	12,8	3,0	7,9		
5-lipoxigenasa (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	23,5	24,8	24,2		
12-lipoxigenasa (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-9,4	-4,1	-6,7		
NOS inducible							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	2,8	-2,0	0,4		
PDE2A1 (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	17,1	-24,5	-3,7		
PDE3B (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	0,9	-4,5	-1,8		
PDE4D2 (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	15,9	16,9	16,4		
PDE5 (h) (no selectivo)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-8,6	-2,9	-5,7		

PDE6 (no selectivo)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	4,1	18,9	11,5		
ACE (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	127,6	131,0	129,3	INTER	INTER
ACE-2 (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	23,8	26,2	25,0	INTER	INTER
BACE-1 (h) (β -secretasa)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-4,1	-5,7	-4,9	INTER	INTER
caspasa-3 (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-2,0	2,5	0,2		
caspasa-8 (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	14,7	16,4	15,6		
Proteasa de VIH-1							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	16,6	4,8	10,7		
MMP-1 (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	45,3	10,7	28,0	INTER	INTER
MMP-2 (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	4,9	-2,4	1,3		
MMP-9 (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	4,5	4,4	4,4	INTER	INTER
Quinasa Abl (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-4,8	-11,6	-8,2		
CaMK2 α (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	0,2	-6,5	-3,1		
CDK2 (h) (cicA)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	1,2	-5,1	-1,9		
ERK ₂ (h) (P42 ^{mapk})							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-6,3	-1,3	-3,8		
Quinasa FLT-1 (h) (VEGFR1)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-15,5	-18,8	-17,2		
Quinasa Fyn (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-8,6	-0,3	-4,5		
IRK (h) (InsR)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-15,1	-7,9	-11,5		
Quinasa Lyn A (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-17,7	-35,7	-26,7		
Quinasa p38 α (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-3,2	-3,1	-3,2		
Quinasa ZAP70 (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	0,4	1,5	1,0		
acetilcolinesterasa (h)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	45,8	60,1	52,9		
COMT (catecol-O-metil transferasa)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	5,8	14,7	10,3	INTER	INTER
MAO-B (h) enzima recombinante							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-3,1	-3,7	-3,4		
xantina oxidasa/captador de O ₂ superóxido							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	-3,1	15,6	6,3		
ATPasa (Na ⁺ /K ⁺)							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	5,2	-0,4	2,4		
Peptidasa, metaloproteínasa, endopeptidasa neutra							
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	0,3	3,0	1,7		

INTER: el compuesto de prueba interfiere con el método de detección del ensayo.

La tabla 32 muestra los valores de Cl₅₀ y nH para compuestos de referencia.

5

Tabla 32: Valores de Cl₅₀ y nH de compuestos de referencia

Compuesto I.D.	Cl ₅₀ (M)	nH
COX1 (h)		
Diclofenaco	5,7E-09 M	1,6
COX2 (h)		
NS398	6,8E-08 M	1,3
5-lipoxigenasa (h)		
NDGA	2,3E-07 M	1,6
12-lipoxigenasa (h)		
NDGA	5,1E-07 M	1,2
NOS inducible		
1400W	4,0E-08 M	1,4
PDE2A1 (h)		
EHNA	1,1E-06 M	0,8

PDE3B (<i>h</i>)		
milrinona	1,0E-06 M	0,9
PDE4D2 (<i>h</i>)		
Ro 20-1724	8,2E-07 M	1,0
PDE5 (<i>h</i>) (no selectivo)		
dipiridamol	1,8E-06 M	1,1
PDE6 (no selectivo)		
zaprinast	1,8E-07 M	1,0
ACE (<i>h</i>)		
captopril	5,7E-10 M	1,2
ACE-2 (<i>h</i>)		
Ac-GG-26NH ₂	2,9E-07 M	2,4
BACE-1 (<i>h</i>) (β-secretasa)		
OM 99-2	1,2E-07 M	1,4
caspara-3 (<i>h</i>)		
Ac-DEVD-CHO	2,0E-09 M	1,1
caspara-8 (<i>h</i>)		
Ac-IETD-CHO	2,8E-08 M	0,8
Proteasa de VIH-1		
pepstatina A	2,2E-06 M	1,9
MMP-1 (<i>h</i>)		
GM6001	1,6E-09 M	1,3
MMP-2 (<i>h</i>)		
GM6001	1,5E-09 M	1,3
MMP-9 (<i>h</i>)		
GM6001	5,4E-10 M	0,9
Quinasa Abl (<i>h</i>)		
estaurosporina	2,6E-07 M	1,4
CAMK2α (<i>h</i>)		
AIP	2,6E-07 M	1,1
CDK2 (<i>h</i>) (cicA)		
estaurosporina	6,9E-09 M	1,0
ERK ₂ (<i>h</i>) (P42 ^{mapk})		
estaurosporina	6,9E-07 M	1,0
Quinasa FLT-1 (<i>h</i>) (VEGFR1)		
estaurosporina	7,0E-09 M	0,7
Quinasa Fyn (<i>h</i>)		
PP1	1,0E-07 M	>3
IRK (<i>h</i>) (InsR)		
estaurosporina	1,6E-08 M	0,9
Quinasa Lyn A (<i>h</i>)		
estaurosporina	1,2E-08 M	1,9
Quinasa p38α (<i>h</i>)		
SB202190	3,0E-08 M	1,0
Quinasa ZAP70 (<i>h</i>)		
estaurosporina	1,1E-07 M	1,4
acetilcolinesterasa (<i>h</i>)		
galantamina	7,6E-07 M	1,0
COMT (catecol-O-metil transferasa)		
Ro 41-0960	3,0E-08 M	1,7
MAO-B (<i>h</i>) enzima recombinante		
deprenilo	3,5E-08 M	1,4
xantina oxidasa/captador de O ₂ ⁻ superóxido		
alopurinol	2,0E-06 M	1,3
ATPasa (Na ⁺ /K ⁺)		
ouabaina	1,0E-06 M	1,3
Peptidasa, metaloproteínasa, endopeptidasa neutra		
fosforamidón	1,6E-08 M	0,9

La tabla 33 muestra resultados de compuestos de prueba de NS2-D6 en guanilil ciclasa

Tabla 33: Resultados de resultados de compuestos de prueba con guanilil ciclasa

Compuesto I.D.	Compuesto cliente I.D.	Concentración de prueba	% de valores control		Media
			1 ^a	2 ^a	
guanilil ciclasa (<i>h</i>) (efecto activador)					
100029054-1	NS2-d6	1,0E-05 M	0,2	0,3	0,2

5

La tabla 34 muestra los resultados de CE₅₀ de compuesto de referencia sobre guanilil ciclasa.

Tabla 34: Resultados de resultados de compuestos de referencia con guanilil ciclasa

Compuesto I.D.	CE ₅₀ (M)	nH
guanilil ciclasa (h) (efecto activador)		
nitroprusiato de sodio	3,5E-06 M	2,2

Se considera que los resultados que muestran una inhibición (o estimulación para ensayos corridos en condiciones basales) mayor que el 50% representan efectos significativos de los compuestos de prueba. El 50% es el valor límite más común para investigación adicional (determinación de los valores CI₅₀ o CE₅₀ de curvas de concentración y respuesta). Los resultados que muestran una inhibición (o estimulación) entre el 25% y el 50% son indicativos de efectos débiles o moderados (en la mayoría de los ensayos, se deben confirmar por pruebas adicionales ya que están en el intervalo donde se puede producir más variabilidad interexperimental). Los resultados que muestran una inhibición (o estimulación) menor del 25% se no consideran significativos y en la mayor parte atribuible a variabilidad de la señal alrededor del nivel control.

Los valores negativos de bajos a moderados no tienen significado real y son atribuibles a la variabilidad de la señal alrededor del nivel control. Los valores negativos altos (≥50%) que algunas veces se obtienen con altas concentraciones de los compuestos de prueba en general son atribuibles a efectos no específicos de los compuestos de prueba en los ensayos. En raras ocasiones podrían sugerir un efecto alostérico de los compuestos de prueba.

Condiciones experimentales

La tabla 35 resume las condiciones del ensayo de unión

Tabla 35: Condiciones del ensayo de unión

Ensayo	Fuente	Ligando	Conc.	Kd	No específico	Incubación	Método de detección	Bibl.
Receptores								
A ₁ (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]CCPA	1 nM	0,7 nM	CPA (10 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	198
A _{2A} (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[³ H]CGS 21680	6 nM	27 nM	NECA (10 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	141
A _{2B} (h) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[³ H]CPX	5 nM	65 nM	NECA (100 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	229
A ₃ (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[¹²⁵ I]AB-MECA	0,15 nM	0,22 nM	IB-MECA (1 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	206
α _{1A} (h) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]prazosina	0,1 nM	0,1 nM	epinefrina (0,1 mM)	60 min RT	Conteo de centelleo	897
α _{1B} (h) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]prazosina	0,15 nM	0,055 nM	fentolamina (10 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	701
α _{2A} (h) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]RX 821002	1 nM	0,8 nM	(-) epinefrina (100 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	542
α _{2B} (h) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]RX 821002	2,5 nM	5 nM	(-) epinefrina (100 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	56
α _{2c} (h) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]RX 821002	2 nM	0,95 nM	(-) epinefrina (100 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	56
β ₁ (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[³ H]CGP 12177	0,3 nM	0,39 nM	alprenolol (50 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	548
β ₂ (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]CGP 12177	0,3 nM	0,15 nM	alprenolol (50 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	794
Adrenérgico beta3	Humano recombinante (células HEK-293)	[¹²⁵ I] cianopindolol	0,5 nM	1,5 nM	alprenolol (1000,0 μM)	90 min 25°C	Conteo de centelleo	1277
AT ₁ (h) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[¹²⁵ I][Sar ¹ -Ile ⁸]-AT-II	0,05 nM	0,05 nM	angiotensina-II (10 μM)	120 min 37°C	Conteo de centelleo	776
AT ₂ (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[¹²⁵ I]CGP 42112A	0,01 nM	0,01 nM	angiotensina-II (1 μM)	4 h 37°C	Conteo de centelleo	248

ES 2 989 113 T3

APJ (apelina) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I](Glp ⁶⁵ ,Nle ⁷ ⁵ ,Tyr ⁷⁷)- apelina-13	0,03 nM	0,06 nM	apelina-13 (1 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	846
BB ₃ (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I]Bn(6-14)	0,1 nM	0,16 nM	Bn(6-14) (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	287
B ₂ (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H] bradiquinina	0,3 nM	0,32 nM	Bradiquinina (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	346
CB ₁ (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]CP 55940	0,5 nM	3,5 nM	WIN 55212-2 (10 μM)	120 min 37°C	Conteo de centelleo	657
CB ₂ (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]WIN 55212-2	0,8 nM	1,5 nM	WIN 55212-2 (5 μM)	120 min 37°C	Conteo de centelleo	165
CCK ₁ (CCK _A) (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]CCK-8s	0,08 nM	0,24 nM	CCK-8s (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	562
CCK ₂ (CCB _A) (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]CCK-8s	0,08 nM	0,054 nM	CCK-8s (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	134
CRF ₁ (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I]sauvagina	0,075 nM	0,12 nM	Sauvagina (0,5 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	557
D ₁ (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]SCH 23390	0,3 nM	0,2 nM	SCH 23390 (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	281
D _{2S} (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[³ H]7-OH- DPAT	1 nM	0,68 nM	butaclamol (10 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	87
D ₃ (h) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]metil- espiperona	0,3 nM	0,085 nM	(+)butaclamol (10 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	145
ET _A (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I]endotelina -1	0,03 nM	0,03 nM	endotelina-1 (100 nM)	120 min 37°C	Conteo de centelleo	30
ET _B (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I]endotelina -1	0,03 nM	0,04 nM	endotelina-1 (0,1 μM)	120 min 37°C	Conteo de centelleo	541
GABA _{A1} (h) (α, β ₂ , γ ₂) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]muscinol	15 nM	30 nM	muscinol (10 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	109
GABA _{B(1B)} (h) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I]CGP 54626	1 nM	1 nM	CGP 54632 (100 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	508
glucagón (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I]glucagón	0,025 nM	0,069 nM	glucagón (1 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	624
TNF-α (h) (radioligando agonista)	células U-937	[¹²⁵ I]TNF-α	0,1 nM	0,05 nM	TNF-α (10 nM)	120 min 4°C	Conteo de centelleo	26
CCR2 (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[¹²⁵ I]MCP-1	0,01 nM	0,007 nM	MCP-1 (10 nM)	60 min RT	Conteo de centelleo	13
H ₁ (h) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[³ H]pirilamina	1 nM	1,7 nM	pirilamina (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	492
H ₂ (h) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I]APT	0,075 nM	2,9 nM	tiotidina (100 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	540
H ₃ (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]N ^α -Me- histamina	1 nM	0,32 nM	(R)-α-Me- histamina (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	563
H ₄ (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[³ H]histamina	10 nM	7,6 nM	imetita (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	631
BLT ₁ (LTB ₄) (h) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]LTB ₄	0,2 nM	0,2 nM	LTB ₄ (0,2 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	616

ES 2 989 113 T3

CysLT ₁ (LTD ₄) (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]LTD ₄	0,3 nM	0,24 nM	LTD ₄ (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	618
MCH ₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I][Phe ¹³ , Tyr ¹⁹]-MCH	0,1 nM	1 nM	MCH humana (0,1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	526
MC ₁ (radioligando agonista)	células B16-F1 (endógeno)	[¹²⁵ I]NDP-α-MSH	0,05 nM	0,05 nM	NDP-α-MSH (1 μM)	90 min RT	Conteo de centelleo	390
MC ₃ (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I]NDP-α-MSH	0,075 nM	0,4 nM	NDP-α-MSH (1 μM)	60 min 37°C	Conteo de centelleo	211
MC ₄ (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I]NDP-α-MSH	0,05 nM	0,54 nM	NDP-α-MSH (1 μM)	120 min 37°C	Conteo de centelleo	211
MT ₁ (ML _{1A}) (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I]2-yodomelatonina	0,01 nM	0,04 nM	melatonina (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	639
MT ₃ (ML ₂) (radioligando agonista)	cerebro de hámster	[¹²⁵ I]2-yodomelatonina	0,1 nM	4,8 nM	melatonina (30 μM)	60 min 4°C	Conteo de centelleo	186
motilina (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I]motilina	0,05 nM	0,26 nM	[Nleu ¹³]-motilina (1 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	285
M ₁ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]pirencepina	2 nM	13 nM	atropina (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	59
M ₂ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]AF-DX 384	2 nM	4,6 nM	atropina (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	59
M ₃ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]4-DMAP	0,2 nM	0,5 nM	atropina (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	546
M ₄ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]4-DMAP	0,2 nM	0,32 nM	atropina (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	59
NK ₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)	U373MG uppsala	[¹²⁵ I]-sustancia P LYS3	0,05 nM	0,04 nM	[Sar ⁹ , Met(O) ₂ ¹¹]SP (1 μM)	30 min RT	Conteo de centelleo	104
NK ₂ (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I]NKA	0,1 nM	0,12 nM	[Nleu ¹⁰]-NKA (4-10) (300 nM)	60 min RT	Conteo de centelleo	3
Y ₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)	células SK-N-MC (endógeno)	[¹²⁵ I]péptido YY	0,025 nM	0,06 nM	NPY (1 μM)	120 min 37°C	Conteo de centelleo	391
N neuronal α4β2 (<i>h</i>) (radioligando agonista)	células SH-SY5Y (humano recombinante)	[³ H]citisina	0,6 nM	0,3 nM	nicotina (10 μM)	120 min 4°C	Conteo de centelleo	1084
N de tipo muscular (<i>h</i>) (radioligando antagonista)	células TE671 (endógeno)	[¹²⁵ I]α-bungarotoxina	0,5 nM	5 nM	α-bungarotoxina (5 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	524
δ (DOP) (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]DADLE	0,5 nM	0,73 nM	naltrexona (10 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	501
κ (KOP) (<i>h</i>) (radioligando agonista)	recombinante de rata (células CHO)	[³ H]U 69593	1 nM	2 nM	naloxona (10 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	771
μ (MOP) (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[³ H]DAMGO	0,5 nM	0,35 nM	naloxona (10 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	260
NOP (ORL1) (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[³ H]nociceptina	0,2 nM	0,4 nM	nociceptina (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	7
PPARγ (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (<i>E. coli</i>)	[³ H]rosiglitazona	5 nM	5,7 nM	rosiglitazona (10 μM)	120 min 4°C	Conteo de centelleo	567

ES 2 989 113 T3

PAF (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]C ₁₆ -PAF	1,5 nM	1,5 nM	WEB 2086 (10 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	531
EP ₂ (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[³ H]PGE ₂	3 nM	3 nM	PGE ₂ (10 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	781
FP (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[³ H]PGE _{2α}	2 nM	3,83 nM	cicloprostenol (10 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	781
IP (PGI ₂) (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[³ H]iloprost	6 nM	8 nM	iloprost (10 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	781
LXRβ (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células BL31/DE3)	[³ H]hidroxicolesterol	25 nM	55 nM	22(R)-hidroxicolesterol (30 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	856
5-HT _{1A} (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]8-OH-DPAT	0,3 nM	0,5 nM	8-OH-DPAT (10 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	164
5-HT _{1B} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)	corteza cerebral de rata	[¹²⁵ I]CYP (+ isproterenol 30 μM)	0,1 nM	0,16 nM	serotonina (10 μM)	120 min 37°C	Conteo de centelleo	111
5-HT _{1D} (<i>h</i>) (radioligando agonista)	recombinante de rata (células CHO)	[³ H]serotonina	1 nM	0,5 nM	serotonina (10 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	777
5-HT _{2A} (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[¹²⁵ I](±)DOI	0,1 nM	0,3 nM	(±)DOI (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	288
5-HT _{2B} (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I](±)DOI	0,2 nM	0,2 nM	(±)DOI (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	571
5-HT _{2C} (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[¹²⁵ I](±)DOI	0,1 nM	0,9 nM	(±)DOI (10 μM)	60 min 37°C	Conteo de centelleo	288
5-HT _{4e} (<i>h</i>) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]GR 113808	0,3 nM	0,15 nM	serotonina (100 μM)	60 min 37°C	Conteo de centelleo	309
5-HT _{5a} (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células HEK-293)	[³ H]LSD	1,5 nM	1,5 nM	serotonina (100 μM)	120 min 37°C	Conteo de centelleo	193
5-HT ₆ (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]LSD	2 nM	1,8 nM	serotonina (100 μM)	120 min 37°C	Conteo de centelleo	161
5-HT ₇ (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]LSD	4 nM	2,3 nM	serotonina (10 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	217
sigma (no selectivo) (<i>h</i>) (radioligando agonista)	células Jurkat (endógeno)	[³ H]DTG	10 nM	41 nM	Haloperidol (10 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	1136
sst ₁ (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I]Tyr ¹¹ -somatostatina-14	0,1 nM	1 nM	somatostatina-28 (1 μM)	180 min 37°C	Conteo de centelleo	761
sst ₄ (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I]Tyr ¹¹ -somatostatina-14	0,1 nM	5,9 nM	somatostatina-14 (1 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	296
GR (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Células IM-9 (citósol)	[³ H]dexametasona	1,5 nM	1,5 nM	triamcinolona (10 μM)	6 h 4°C	Conteo de centelleo	283
Estrógeno ER alfa (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células sf9)	[³ H]estradiol	0,5 nM	0,20 nM	Dimetilestilbestrol (1 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	1280
PR (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Células T47D (citósol)	[³ H]progesterona	0,5 nM	2 nM	progesterona (1 μM)	20 h 4°C	Conteo de centelleo	930
AR (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Células LNCaP (citósol)	[³ H]metiltienolona	1 nM	0,8 nM	mibolerona (1 μM)	24 h 4°C	Conteo de centelleo	498
Hormona tiroidea	Hígado de rata	[¹²⁵ I]triyodotironina	0,03 nM	0,034 nM	Triyodotironina (1,0 μM)	1080 min 4°C	Conteo de centelleo	1289

ES 2 989 113 T3

UT (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I]urotensina-II	0,1 nM	0,29 nM	urotensina-II (3 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	622
VPAC ₁ (VIP ₁) (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[¹²⁵ I]VIP	0,04 nM	0,05 nM	VIP (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	50
V _{1a} (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]AVP	0,3 nM	0,5 nM	AVP (1 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	343
V ₂ (<i>h</i>) (radioligando agonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]AVP	0,3 nM	0,76 nM	AVP (1 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	343
Canales iónicos								
BZD (central) (radioligando agonista)	corteza cerebral de rata	[³ H]flunitrazepam	0,4 nM	2,1 nM	diazepam (3 μM)	60 min 4°C	Conteo de centelleo	227
AMPA (radioligando agonista)	corteza cerebral de rata	[³ H]AMPA	8 nM	82 nM	L-glutamato (1 mM)	60 min 4°C	Conteo de centelleo	166
kainato (radioligando agonista)	corteza cerebral de rata	[³ H]ácido kainico	5 nM	19 nM	L-glutamato (1 mM)	60 min 4°C	Conteo de centelleo	160
NMDA (radioligando antagonista)	corteza cerebral de rata	[³ H]CGP 39553	5 nM	23 nM	L-glutamato (100 μM)	60 min 4°C	Conteo de centelleo	221
glicina (insensible a estriquina) (radioligando antagonista)	corteza cerebral de rata	[³ H]MDL 105,519	0,5 nM	5 nM	glicina (1 mM)	45 min 0°C	Conteo de centelleo	219
PCP (<i>h</i>) (radioligando antagonista)	corteza cerebral de rata	[³ H]TCP	10 nM	13 nM	MK 801 (10 μM)	120 min 37°C	Conteo de centelleo	257
5-HT ₃ (<i>h</i>) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]BRL 43694	0,5 nM	1,15 nM	MDL 72222 (10 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	109
Canal de Ca ²⁺ (L, sitio de dihidropiridina) (radioligando antagonista)	corteza cerebral de rata	[³ H]nitrendipina	0,1 nM	0,18 nM	nitrendipina (1 μM)	90 min RT	Conteo de centelleo	996
Canal de Ca ²⁺ (L, sitio de diltiazem) (benzotiazepinas) (radioligando antagonista)	corteza cerebral de rata	[³ H]diltiazem	15 nM	52 nM	diltiazem (10 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	212
Canal de Ca ²⁺ (L, sitio de verapamil) (fenilalquilamina) (radioligando antagonista)	corteza cerebral de rata	[³ H]D888	3 nM	3 nM	D 600 (10 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	194
Canal de Ca ²⁺ (N) (radioligando antagonista)	corteza cerebral de rata	[¹²⁵ I]ω-conotoxina GVIA	0,001 nM	0,0007 nM	ω-conotoxina GVIA (10 nM)	30 min RT	Conteo de centelleo	259
Canal de potasio hERG (humano-[³ H] Dofetilida)	Humano recombinante (células HEK-293)	[³ H]dofetilida	3 nM	6,6 nM	Terfenadina (25 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	1398
Canal SK _{Ca} (radioligando antagonista)	corteza cerebral de rata	[¹²⁵ I]apamina	0,007 nM	0,007 nM	apamina (100 nM)	60 min 4°C	Conteo de centelleo	112
Canal de Na ⁺ (sitio 2) (radioligando antagonista)	corteza cerebral de rata	[³ H]batrachotoxina	10 nM	91 nM	veratridina (300 μM)	60 min 37°C	Conteo de centelleo	28
Canal de Cl ⁻ (operado por)	corteza cerebral de rata	[³⁵ S]TBPS	3 nM	14,6 nM	picrotoxina (20 μM)	120 min RT	Conteo de centelleo	136

GABA (radioligando antagonista)								
Transportadores								
transportador de norepinefrina (<i>h</i>) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]nisoxetina	1 nM	2,9 nM	desipramina (1 μM)	120 min 4°C	Conteo de centelleo	180
transportador de dopamina (<i>h</i>) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]BTCP	4 nM	4,5 nM	BTCP (10 μM)	120 min 4°C	Conteo de centelleo	190
transportador de GABA (radioligando antagonista)	corteza cerebral de rata	[³ H]GABA (+ isoguvacina 10 μM) (+ baclofeno 10 μM)	10 nM	4600 nM	GABA (1 mM)	30 min RT	Conteo de centelleo	214
transportador de colina (CHT1) (<i>h</i>) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]hemicolinio-3	3 nM	3,9 nM	hemicolinio-3 (10 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	648
transportador de 5-HT (<i>h</i>) (radioligando antagonista)	Humano recombinante (células CHO)	[³ H]imipramina	2 nM	1,7 nM	imipramina (10 μM)	60 min RT	Conteo de centelleo	566
Otras enzimas								
MAO-A (radioligando antagonista)	corteza cerebral de rata	[³ H]Ro 41-1049	10 nM	14 nM	clorgilina (1 μM)	60 min 37°C	Conteo de centelleo	36

La tabla 36 muestra las condiciones de ensayo enzimático y de absorción

Tabla 36: Condiciones de ensayo enzimático y de absorción

Ensayo	Fuente	Sustrato/ estímulo/trazador	Incubación	Componente medido	Método de detección	Bibl.
Quinasas						
Quinasa Abl (<i>h</i>)	Humano recombinante (células de insecto)	ATP + péptido Ulight-TK (100 nM)	60 min RT	fosfo-péptido Ulight-TK	LANCE	556
CAMK2α (<i>h</i>)	Humano recombinante	ATP + Ulight-CGSGSGRPRTSS AEG (50 nM)	30 min RT	fosfo- Ulight-CGSGSGRPRTSS AEG	LANCE	647
CDK2 (<i>h</i>) (cicA)	Humano recombinante	ATP + Ulight-CFFKNIVTPRTPPP SQGK-amida (50 nM)	30 min RT	fosfo- Ulight-CFFKNIVTPRTPPP SQGK-amida	LANCE	469
ERK ₂ (<i>h</i>) (P42 ^{mapk})	Humano recombinante (<i>E. coli</i>)	ATP + Ulight-CFFKNIVTPRTPPP SQGK-amida (100 nM)	15 min RT	fosfo- Ulight-CFFKNIVTPRTPPP SQGK-amida	LANCE	671
Quinasa FLT-1 (<i>h</i>) (VEGFR1)	Humano recombinante (células Sf9)	ATP + péptido Ulight-TK (100 nM)	15 min RT	fosfo-péptido Ulight-TK	LANCE	650
Quinasa Fyn (<i>h</i>)	Humano recombinante (células de insecto)	ATP + biotiniil-βAβAβ AYQAEENTYDEYEN (2 μM)	60 min RT	fosfo-biotiniil-βAβAβ AYQAEENTYDEYEN	HTRF	626
IRK (<i>h</i>) (InsR)	Humano recombinante	ATP + Ulight-poli GAT[EAY (1:1:1)]n (50 nM)	10 min RT	fosfo- Ulight-Poli GAT[EAY (1:1:1)]n	LANCE	467
Quinasa Lyn A (<i>h</i>)	Humano recombinante (células de insecto)	ATP + biotiniil-βAβAβ AKVEKIGEGTYGVV YK (400 nM)	120 min RT	fosfo-biotiniil-βAβAβ AKVEKIGEGTYGVV YK	HTRF	41
Quinasa p38α (<i>h</i>)	Humano recombinante (<i>E. coli</i>)	ATP + Ulight-CFFKNIVTPRTPPP	60 min RT	fosfo- Ulight-CFFKNIVTPRTPPP SQGK-amida	LANCE	620

ES 2 989 113 T3

		SQGK-amida (100 nM)				
Quinasa ZAP70 (h)	Humano recombinante (células de insecto)	ATP + biotilil-βAβAβ ADEEEYFIPP (2 μM)	15 min RT	fosfo-biotilil-βAβAβ ADEEEYFIPP	HTRF	556
Otras enzimas						
COX1 (h)	Humano recombinante	Ácido araquidónico (3 μM) + ADHP (25 μM)	3 min RT	Resofurina (ADPH oxidado)	fluorimetría	1480
COX2 (h)	Humano recombinante (células Sf9)	Ácido araquidónico (2 μM) + ADHP (25 μM)	5 min RT	Resofurina (ADPH oxidado)	fluorimetría	1480
5-lipoxigenasa (h)	Humano recombinante (células Sf9) (citósol)	Ácido araquidónico (25 μM)	20 min RT	Rodamina 123	fluorimetría	1068
12-lipoxigenasa (h)	Plaquetas humanas	Ácido araquidónico (4 μM)	5 min RT	Oxidación férrica de naranja xilenol	Fotometría	472
NOS inducible	recombinante de ratón (<i>E. coli</i>)	L-arginina (100 μM)	120 min 37°C	NO ₂ ⁻	Fotometría	236
PDE2A1 (h)	Humano recombinante (células Sf9)	[3H]-AMPc + AMPc (2 μM)	20 min RT	[3H]5'AMP	Conteo de centelleo	1399
PDE3B (h)	Humano recombinante (células Sf9)	[3H]-AMPc + AMPc (0,5 μM)	20 min RT	[3H]5'AMP	Conteo de centelleo	1399
PDE4D2 (h)	Humano recombinante (células Sf9)	[3H]-AMPc + AMPc (0,5 μM)	20 min RT	[3H]5'AMP	Conteo de centelleo	1399
PDE5 (h) (no selectivo)	Plaquetas humanas	[3H]GMPc + GMPc (1 μM)	60 min RT	[3H]5'-GMP	Conteo de centelleo	263
PDE6 (h) (no selectivo)	Retina bovina	[3H]GMPc + GMPc (2 μM)	60 min RT	[3H]5'-GMP	Conteo de centelleo	306
ACE (h)	Humano recombinante	Abz-FRK(Dnp)-P-OH (15 μM)	30 min 37°C	Abz-Phe-Arg	fluorimetría	1128
ACE-2 (h)	Humano recombinante (células murinas)	Mca-Tyr-Val-Ala-Asp-Pro-Ala-Lys-(DNP)-OH (10 μM)	20 min RT	Péptidos Mca	fluorimetría	802
BACE-1 (h) (β-secretasa)	Humano recombinante (células murinas)	Mca-S-E-V-N-L-D-A-E-F-R-K(Dnp)-R-R-NH ₂ (6 μM)	60 min RT	Mca-S-E-V-N-L-NH ₂	fluorimetría	462
caspara-3 (h)	Humano recombinante (<i>E. coli</i>)	benzoilcarbonil-Asp-Glu-Val-Asp-AFC (3,6 μM)	60 min RT	AFC	fluorimetría	476
caspara-8 (h)	Humano recombinante (<i>E. coli</i>)	benzoilcarbonil-Ile-Glu-Thr-Asp-AFC (10 μM)	45 min 37°C	AFC	fluorimetría	408
Proteasa de VIH-1	Proteína vírica recombinante (<i>E. coli</i>)	Antranilil-VIH (75 μM)	40 min 37°C	Tripéptido N-terminal	fluorimetría	244
MMP-1 (h)	Humano recombinante (<i>E. coli</i>)	DNP-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(n-Me-Abz)-NH ₂ (10 μM)	40 min 37°C	Cys(Me)-His-Ala-Lys(n-Me-Abz)-NH ₂	fluorimetría	342
MMP-2 (h)	Humano recombinante	NFF-2 (10 μM)	90 min 37°C	Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala	fluorimetría	297
MMP-9 (h)	Humano recombinante	NFF-2 (10 μM)	90 min 37°C	Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala	fluorimetría	297
Guanilil ciclase (h) (efecto activador)	Humano recombinante	GTP (10 μM) (SNP 100 μM para control)	10 min RT	GMPc	HTRF	1076
acetilcolinesterasa (h)	Humano recombinante (células HEK-293)	Acetilcolina (400 μM)	30 min RT	ácido 5-tio-2-nitrobenzoico	fotometría	63
COMT (catecol-O-metil transferasa)	Hígado porcino	Esculetina (1 μM)	30 min 37°C	escopoletina	fluorimetría	519
MAO-B (h) enzima recombinante	Humano recombinante	Derivado de D-luciferina (4 μM)	60 min 37°C	éster metílico de luciferina	luminiscencia	1134

xantina oxidasa/captador de O ₂ ⁻ superóxido	xantina oxidasa purificada de leche bovina	Hipoxantina (10 µM)	10 min RT	O ₂ ⁻ + ácido úrico	fotometría	153
ATPasa (Na ⁺ /K ⁺)	corteza cerebral porcina	ATP (2 mM)	60 min 37°C	Pi	fotometría	71
Peptidasa, metaloproteínasa, endopeptidasa neutra	Células Raji humanas	Glutaril-Ala-Ala-Phe-4-metoxi-2-naftilamida	30 min 37°C	Glutaril-Ala-Ala-Phe-4-metoxi-2-naftilamida → 4-metoxi-2-naftilamida	fotometría	1352, 1353

Análisis y expresión de los resultados

Farmacología *in vitro*: Ensayos de unión

5 Los resultados se expresan como un porcentaje de la unión específica control: (unión específica medida/unión específica control) x 100; y como un porcentaje de inhibición de la unión específica control: 100 – ((unión específica medida/unión específica control) x 100) obtenido en presencia de NS2-D6.

10 Los valores CI₅₀ (concentración que produce una inhibición semimáxima de unión específica control) y los coeficientes de Hill (nH) se determinaron por análisis de regresión no lineal de las curvas de competición generadas con valores replicados medios usando el ajuste de la curva de la ecuación de Hill:

$$Y = D + \left[\frac{A - D}{1 + (C/C_{50})^{nH}} \right]$$

15 donde Y = unión específica, A = asíntota izquierda de la curva, D = asíntota derecha de la curva, C = concentración del compuesto, C₅₀ = CI₅₀, y nH = factor de pendiente. Este análisis se realizó usando software desarrollado en Cerep (software Hill) y validado por comparación con datos generados por el software comercial SigmaPlot® 4.0 para Windows® (© 1997 by SPSS Inc.). Las constantes de inhibición (K_i) se calcularon usando la ecuación de Cheng Prusoff.

20

$$K_i = \frac{CI_{50}}{\left(1 + L/K_D\right)}$$

25 donde L = concentración de radioligando en el ensayo, y KD = afinidad del radioligando por el receptor. Se usa un gráfico de scatchard para determinar la KD.

Farmacología *in vitro*: Ensayos enzimáticos y de absorción

30 Los resultados se expresan como un porcentaje de la actividad específica control: (actividad específica medida/actividad específica control) x 100; y como un porcentaje de inhibición de la actividad específica control: 100 – ((actividad específica medida/actividad específica control) x 100) obtenido en presencia de NS2-D6.

35 Los valores CI₅₀ (concentración que produce una inhibición semimáxima de actividad específica control), los valores CE₅₀ (concentración que produce un aumento semimáximo en la actividad basal control) y los coeficientes de Hill (nH) se determinaron por análisis de regresión no lineal de las curvas de competición generadas con valores replicados medios usando el ajuste de la curva de la ecuación de Hill:

$$Y = D + \left[\frac{A - D}{1 + (C/C_{50})^{nH}} \right]$$

40 donde Y = actividad específica, A = asíntota izquierda de la curva, D = asíntota derecha de la curva, C = concentración del compuesto, C₅₀ = CI₅₀ o CE₅₀, y nH = factor de pendiente. Este análisis se realizó usando software desarrollado en Cerep (software Hill) y validado por comparación con datos generados por el software comercial SigmaPlot® 4.0 para Windows® (© 1997 by SPSS Inc.).

45 **Bibliografía**

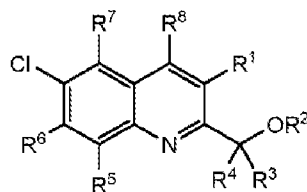
3. Aharony, D. et al. (1993), Mol. Pharmacol., 44 : 356-363.
 7. Ardati, A. et al. (1997), Mol. Pharmacol., 51 : 816-824.
 13. Berkhout, T.A. et al. (1997), J. Biol. Chem., 272 : 16404-16413.

26. Brockhaus, M. et al. (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87 : 3127-3131.
28. Brown, G.B. (1986), *J. Neurosci.*, 6 : 2064-2070.
30. Buchan, K.W. et al. (1994), *Brit. J. Pharmacol.*, 112 : 1251-1257.
36. Cesura, A.M. et al. (1990), *Mol. Pharmacol.*, 37 : 358-366.
- 5 41. Cheng, H.C. et al. (1992), *J. Biol. Chem.*, 267 : 9248-9256.
50. Couvineau, A. et al. (1985), *Biochem. J.*, 231 : 139-143.
56. Devedjian, J.C. et al. (1994), *Eur. J. Pharmacol.*, 252 : 43-49.
59. Dorje, F. et al. (1991), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 256 : 727-733.
63. Ellman, G.L. et al. (1961), *Biochem. Pharmacol.*, 7 : 88-95.
- 10 71. Fiske, C.M. y Subbarow, Y. (1925), *J. Biol. Chem.*, 66 : 375-400.
87. Grandy, D.K. et al. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86 : 9762-9766.
104. Heuillet, E. et al. (1993), *J. Neurochem.*, 60 : 868-876.
109. Hope, A.G. et al. (1996), *Brit. J. Pharmacol.*, 118 : 1237-1245.
111. Hoyer, D. et al. (1985), *Eur. J. Pharmacol.*, 118 : 1-12.
- 15 112. Hugues, M. et al. (1982), *J. Biol. Chem.*, 257 : 2762-2769.
134. Lee, Y.M. et al. (1993), *J. Biol. Chem.*, 268 : 8164-8169.
136. Lewin, A.H. et al. (1989), *Mol. Pharmacol.*, 35 : 189-194.
141. Luthin, D.R. et al. (1995), *Mol. Pharmacol.*, 47 : 307-313.
145. Mackenzie, R.G. et al. (1994), *Eur. J. Pharmacol.*, 266 : 79-85.
- 20 153. McCord, J.K. y Fridovich, I. (1969), *J. Biol. Chem.*, 244 : 6049-6055.
160. Monaghan, D.T. y Cotman, C.W. (1982), *Brain Res.*, 252 : 91-100.
161. Monsma, F.J. et al. (1993), *Mol. Pharmacol.*, 43 : 320-327.
164. Mulheron, J.G. et al. (1994), *J. Biol. Chem.*, 269 : 12954-12962.
165. Munro, S. et al. (1993), *Nature*, 365 : 61-65.
- 25 166. Murphy, D.E. et al. (1987), *Neurochem. Res.*, 12 : 775-781.
180. Pacholczyk, T. et al. (1991), *Nature*, 350 : 350-354.
186. Pickering, D.S. y Niles, L.P. (1990), *Eur. J. Pharmacol.*, 175 : 71-77.
190. Pristupa, Z.B. et al. (1994), *Mol. Pharmacol.*, 45 : 125-135.
193. Rees, S. et al. (1994), *FEBS Lett.*, 355 : 242-246.
- 30 194. Reynolds, I.J. et al. (1986), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 237 : 731-738.
198. Rivkees, S.A. et al. (1995), *J. Biol. Chem.*, 270 : 20485-20490.
206. Salvatore, C.A. et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90 : 10365-10369.
211. Schioth, H.B. et al. (1997), *Neuropeptides*, 31 : 565-571.
212. Schoemaker, H. y Langer, S.Z. (1985), *Eur. J. Pharmacol.*, 111 : 273-277.
- 35 214. Shank, R.P. et al. (1990), *J. Neurochem.*, 54 : 2007-2015.
217. Shen, Y. et al. (1993), *J. Biol. Chem.*, 268 : 18200-18204.
219. Baron, B.M. et al. (1996), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 279 : 62-68.
221. Sills, M.A. et al. (1991), *Eur. J. Pharmacol.*, 192 : 19-24.
227. Speth, R.C. et al. (1979), *Life Sci.*, 24 : 351-358.
- 40 229. Stehle, J.H. et al. (1992), *Mol. Endocrinol.*, 6 : 384-393.
236. Tayeh, M. A. y Marletta, M.A. (1989), *J. Biol. Chem.*, 264 : 19654-19658.
244. Toth, M.V. y Marshall, G.R. (1990), *Int. J. Protein Res.*, 36 : 544-550.
248. Tsuzuki, S. et al. (1994), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 200 : 1449-1454.
257. Vignon, J. et al. (1986), *Brain Res.*, 378 : 133-141.
- 45 259. Wagner, J.A. et al. (1988), *J. Neurosci.*, 8 : 3354-3359.
260. Wang, J.B. et al. (1994), *FEBS Lett.*, 338 : 217-222.
263. Weishaar, R.E. et al. (1986), *Biochem. Pharmacol.*, 35 : 787-800.
281. Zhou, Q.Y. et al. (1990), *Nature*, 347 : 76-80.
283. Clark, A.F. et al. (1996), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37 : 805-813.
- 50 285. Feighner, S.D. et al. (1999), *Science*, 284 : 2184-2188.
287. Mantey, S.A. et al. (1997), *J. Biol. Chem.*, 272 : 26062-26071.
288. Bryant, H.U. et al. (1996), *Life Sci.*, 15 : 1259-1268.
296. Rohrer, L. et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90 : 4196-4200.
297. Nagase, N. et al. (1994), *J. Biol. Chem.*, 269 : 20952-20957.
- 55 306. Ballard, A.S. et al. (1998), *J. Urol.*, 159 : 2164-2171.
309. Mialet, J. et al. (2000), *Brit. J. Pharmacol.*, 129 : 771-781.
342. Bickett, D.A. et al. (1993), *Anal. Biochem.*, 212 : 58-64.
343. Tahara, A. et al. (1998), *Brit. J. Pharmacol.*, 125 : 1463-1470.
346. Pruneau, D. et al. (1998), *Brit. J. Pharmacol.*, 125 : 365-372.
- 60 390. Siegrist, W. et al. (1988), *J. Recep. Res.*, 8 : 323-343.
391. Wieland, H. A. et al. (1995), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275 : 143-149.
408. Karahashi, H. y Amano, F. (2000), *Biol. Pharm. Bull.*, 23 : 140-144.
462. Ermolieff, J. et al. (2000), *Biochemistry*, 39 : 12450-12456.
467. Al-Hasani, H. et al. (1994), *FEBS Lett.*, 349 : 17-22.
- 65 469. Meijer, L. et al. (1997), *Eur. J. Biochem.*, 243 : 527-536.
472. Waslidge, N.B. y Hayes, D.J. (1995), *Anal. biochem.*, 231 : 354-358.

476. Mittl, P.R.E. et al. (1997), *J. Biol. Chem.*, 272 : 6539-6547.
492. Smit, M.J. et al. (1996), *Brit. J. Pharmacol.*, 117 : 1071-1080.
498. Zava, D.T. et al. (1979), *Endocrinology*, 104 : 1007-1012.
501. Simonin, F. et al. (1994), *Mol. Pharmacol.*, 46 : 1015-1021.
- 5 508. Green, A. et al. (2000), *Brit. J. Pharmacol.*, 131 : 1766-1774.
519. Muller-Enoch, D. et al. (1976), *Z. Naturforsch.*, 31 : 280-284.
524. Lukas, R.J. (1986), *J. Neurochem.*, 46 : 1936-1941.
526. Mac Donald, D. et al. (2000), *Mol. Pharmacol.*, 58 : 217-225.
531. Fukunaga, K. et al. (2001), *J. Biol. Chem.*, 276 : 43025-43030.
- 10 540. Leurs, R. et al. (1994), *Brit. J. Pharmacol.*, 112 : 847-854.
541. Fuchs, S. et al. (2001), *Mol. Med.*, 7 : 115-124.
542. Langin, D. et al. (1989), *Eur. J. Pharmacol.*, 167 : 95-104.
546. Peralta, E. G. et al. (1987), *Embo. J.*, 6 : 3923-3929.
548. Levin, M.C. et al. (2002), *J. Biol. Chem.*, 277 : 30429-30435.
- 15 556. Park, Y.M. et al. (1999), *Anal. Biochem.*, 269 : 94-104.
557. Palchadhuri, M.R. et al. (1998), *Eur. J. Biochem.*, 258 : 78-84.
562. Bignon, E. et al. (1999), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289 : 742-751.
563. Lovenberg, T.W. et al. (1999), *Mol. Pharmacol.*, 55 : 1101-1107.
566. Tatsumi, M. et al. (1999), *Eur. J. Pharmacol.*, 368 : 277-283.
- 20 567. Ferry, G. et al. (2001), *Eur. J. Pharmacol.*, 417 : 77-89.
571. Choi, D.S. et al. (1994), *FEBS Lett.*, 352 : 393-399.
616. Yokomizo, T. et al. (2001), *J. Biol. Chem.*, 276 : 12454-12459.
618. Martin, V. et al. (2001), *Biochem. Pharmacol.*, 62 : 1193-1200.
620. Frantz, B. et al. (1998), *Biochemistry*, 37 : 13846-13853.
- 25 622. Maguire, J.J. et al. (2000), *Brit. J. Pharmacol.*, 131 : 441-446.
624. Chicchi, G.G. et al. (1997), *J. Biol. Chem.*, 272 : 7765-7769.
626. Dente, L. et al. (1997), *J. Mol. Biol.*, 269 : 694-703.
631. Liu, C. et al. (2001), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 299 : 121-130.
639. Witt-Enderby, P.A. y Dubocovich, M.L. (1996), *Mol. Pharmacol.*, 50 : 166-174.
- 30 647. Ichida, A. y Fujisawa, H. (1995), *J. Biol. Chem.*, 270 : 2163-2170.
648. Apparsundaram, S. et al. (2000), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276 : 862-867.
650. Itokawa, T. et al. (2002), *Mol. Cancer Ther.*, 1 : 295-302.
657. Rinaldi-Carmona, M. et al. (1996), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 278 : 871-878.
671. Bardwell, A.J. et al. (2003), *Biochem. J.*, 370 : 1077-1085.
- 35 701. Ford, A.P.D.W. et al. (1997), *Brit. J. Pharmacol.*, 121 : 1127-1135.
761. Patel, C.Y. y Srikant, C.B. (1994), *Endocrinology*, 135 : 2814-2817.
771. Meng, F. et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90 : 9954-9958.
776. Le, M.T. et al. (2005), *Eur. J. Pharmacol.*, 513 : 35-45.
777. Wurch, T. et al. (1997), *J. Neurochem.*, 68 : 410-418.
- 40 781. Abramovitz, M. et al. (2000), *Biochem. Biophys. Acta.*, 1483 : 285-293.
794. Joseph, S.S. et al. (2004), *Naun.-Sch. Arch. Pharm.*, 369 : 525-532.
802. Huang, L. et al. (2003), *J. Biol. Chem.*, 278 : 15532-15540.
846. Katugampola, S.D. et al. (2001), *Brit. J. Pharmacol.*, 132 : 1255-1260.
856. Janowski, B.A. et al. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 : 266-271.
- 45 897. Schwinn, D.A. et al. (1990), *J. Biol. Chem.*, 265 : 8183-8189.
930. Sarup, J.C. et al. (1988), *J. Biol. Chem.*, 263 : 5624-5633.
996. Gould, R.J. et al. (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 79 : 3656-3660.
1068. Pufahl, R.A. et al. (2007), *Anal. Biochem.*, 364 : 204-212.
1076. Lee, Y.C. et al. (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 20 : 10763-10768.
- 50 1084. Gopalakrishnan, M. et al. (1996), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 276 : 289-297.
1096. Wang, X.K. (2001), *Acta. Pharmacol. Sin.*, 22 : 521-523.
1128. Fernandes, T. et al. (2010), *Braz J Med Biol Res.*, 43 : 837-842.
1134. Tsugeno, Y. et al. (1995), *J. Biochem.*, 1995; 118 (5) 974-80.
1136. GANAPATHY ME. et al. (1999), *JPET*, 289 : 251-260.
- 55 1277. Feve B, Elhadri K, Quignard-Boulangue A y Pairault J (1994), Feve B et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:5677, 1994.
1280. Obourn JD, Koszewski NJ y Notides AC (1993), Obourn JD et al. *Biochemistry* 32(24):6229, 1993.
1289. Inoue A, Yamakawa J, Yukioka M y Morisawa S (1983), Inoue A et al. *Anal Biochem*. 134(1):176, 1983.
1352. Shipp MA, Vijayaraghavan J, Schmidt EV, Masteller EL, D'Adamo L, Hersh LB y Reinherz EL (1989), Shipp MA et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:297, 1989.
- 60 1353. Erdos EG y Skidgel RA (1989), Erdos EG and Skidgel RA. *FASEB J*. 3:145, 1989.
1398. Huang XP1, Mangano T, Hufeisen S, Setola V, Roth BL., *Assay Drug Dev Technol*. 2010 Dec;8(6):727-42.
1399. Maurice D.H. et al. (2014), *Nat Rev Drug Discov.*, 13: 290-314.
1480. Pattaraporn Vanachayangkul y William H. Tolleson (2012), Hindawi Publishing Corporation, *Enzyme Research*, Volumen 2012, artículo ID 416062, 7.
- 65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



I

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R¹ se selecciona de -NH₂, -NHD, o -ND₂;

R² se selecciona de hidrógeno o deuterio;

R³ y R⁴ son -CD₃; y

R⁵, R⁶, R⁷, y R⁸ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno o deuterio.

2. El compuesto según la reivindicación 1, en donde R¹ es -NH₂, o:

en donde R¹ es -NHD; o:

en donde R¹ es -ND₂.

3. El compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde R² es hidrógeno; o:

en donde R² es deuterio.

4. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde cada uno de R⁵, R⁶, R⁷, y R⁸ es hidrógeno; o:

en donde uno de R⁵, R⁶, R⁷, y R⁸ es deuterio; o:

en donde dos de R⁵, R⁶, R⁷, y R⁸ es deuterio; o:

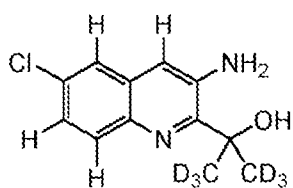
en donde tres de R⁵, R⁶, R⁷, y R⁸ es deuterio; o:

en donde cada uno de R⁵, R⁶, R⁷, y R⁸ es deuterio.

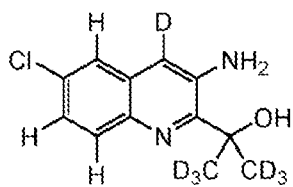
5. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde cada uno de R⁵, R⁶, R⁷, y R⁸ son como se definen en una de las siguientes entradas:

Entrada	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸
<i>i</i>	H	H	H	H
<i>ii</i>	H	H	H	D
<i>iii</i>	H	H	D	H
<i>iv</i>	H	D	H	H
<i>v</i>	D	H	H	H
<i>vi</i>	H	H	D	D
<i>vii</i>	H	D	H	D
<i>viii</i>	D	H	H	D
<i>ix</i>	H	D	D	H
<i>x</i>	D	H	D	H
<i>xi</i>	D	D	H	H
<i>xii</i>	H	D	D	D
<i>xiii</i>	D	H	D	D
<i>xiv</i>	D	D	H	D
<i>xv</i>	D	D	D	H
<i>xvi</i>	D	D	D	D

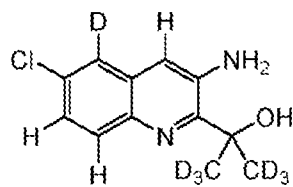
6. El compuesto de la reivindicación 1, seleccionado de cualquiera de las siguientes estructuras:



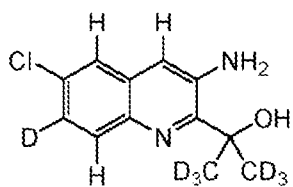
I-1



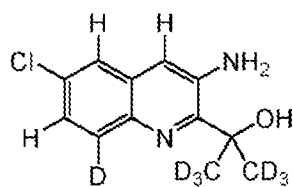
I-17



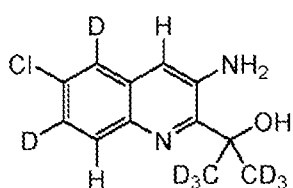
I-18



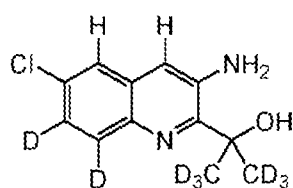
I-19



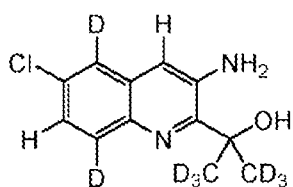
I-20



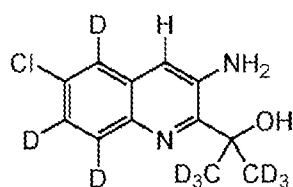
I-21



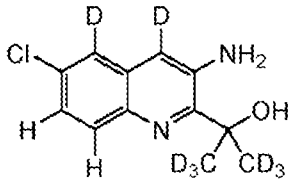
I-22



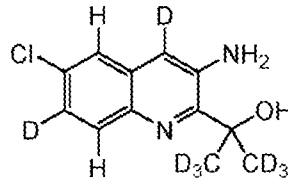
I-23



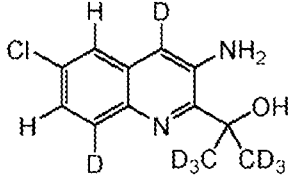
I-24



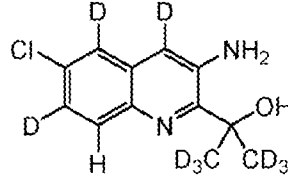
I-25



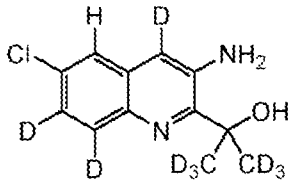
I-26



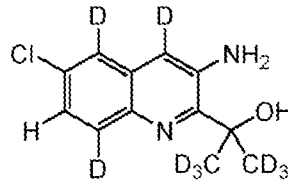
I-27



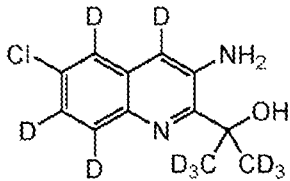
I-28



I-29



I-30



I-31

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 7. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el compuesto comprende deuterio en una cantidad del 50% ± 2%, 55% ± 2%, 60% ± 2%, 65% ± 2%, 70% ± 2%, 75% ± 2%, 80% ± 2%, 85% ± 2%, 90% ± 2%, 95% ± 2%, o del 98% al 100%.

10 8. Una composición que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un adyuvante, soporte o vehículo farmacéuticamente aceptable; opcionalmente en combinación con un agente terapéutico adicional.

15 9. Una composición que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en tratar, prevenir, o reducir un riesgo de una enfermedad, trastorno o afección en que la toxicidad de aldehídos está implicada, en donde la enfermedad, trastorno o afección es un trastorno ocular; opcionalmente:

en donde (i) la composición se administra por vía tópica o sistémica y la enfermedad, trastorno o afección se selecciona de degeneración macular o enfermedad de Stargardt; o:

20 en donde (ii) el trastorno ocular se selecciona del grupo que consiste en síndrome de ojo seco, cataratas, queratocono, queratopatía bullosa y otras, distrofia endotelial de Fuch, conjuntivitis alérgica, penfigoide cicatricial ocular, afecciones asociadas con cicatrización de PRK y otras cicatrizaciones corneales, afecciones asociadas con degradación de los lípidos de las lágrimas o disfunción de la glándula lacrimal, uveítis, escleritis, síndrome de Stevens Johnson ocular, y rosácea ocular; opcionalmente al mismo:

25 en donde (a) el trastorno ocular es síndrome de ojo seco; o:
en donde (b) el trastorno ocular es una afección asociado con cicatrización de PRK y otra cicatrización croneana; o:

30 en donde (c) el trastorno ocular se selecciona del síndrome de Stevens Johnson ocular, y rosácea ocular; opcionalmente al mismo en donde el trastorno ocular es rosácea ocular o uveítis; o:
en donde (d) el trastorno ocular se selecciona del grupo que consiste en queratocono, cataratas, queratopatía bullosa y otras, distrofia endotelial de Fuch, penfigoide cicatricial ocular y conjuntivitis alérgica.

10. Una composición que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en tratar, prevenir, o reducir un riesgo de una enfermedad, trastorno o afección en donde la enfermedad, trastorno o afección es una enfermedad, trastorno o afección de la piel seleccionada del grupo que consiste en psoriasis, lupus tópico (discoide), dermatitis de contacto, dermatitis atópica, dermatitis alérgica, dermatitis de radiación, acné vulgar, síndrome de Sjogren-Larsson, eccema y otras ictiosis; opcionalmente:
- 5
- en donde la enfermedad, trastorno o afección de la piel se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, esclerodermia, lupus tópico (discoide), dermatitis de contacto, dermatitis atópica, dermatitis alérgica, dermatitis de radiación, acné vulgar, y síndrome de Sjogren-Larsson y otras ictiosis; opcionalmetne al mismo:
- 10
- en donde (a) la enfermedad, trastorno o afección de la piel es dermatitis de contacto, dermatitis atópica, dermatitis alérgica, o dermatitis de radiación; o:
en donde (b) la enfermedad, trastorno o afección de la piel es síndrome de Sjogren-Larsson.
- 15
11. Una composición que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en tratar, prevenir, o reducir un riesgo de una enfermedad, trastorno o afección en donde la enfermedad, trastorno o afección es una afección asociada con los efectos tóxicos de agentes vesicantes o quemaduras de agentes alcalinos en la que la toxicidad de aldehídos está implicada; opcionalmente:
- 20
- en donde (i) el agente vesicante es mostaza de azufre, mostaza de nitrógeno, u oxima de fosgeno; o:
en donde (ii) el agente alcalino es cal, lejía, amoniaco, o un desatascador.
- 25
12. Una composición que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en tratar, prevenir, o reducir un riesgo de una enfermedad, trastorno o afección,
- 30
- en donde (i) la enfermedad, trastorno o afección es una enfermedad autoinmunitaria, mediada por inmunidad, inflamatoria, cardiovascular, o neurológica, o diabetes, síndrome metabólico, o una enfermeda fibrótica; opcionalmente:
- 35
- en donde (a) la enfermedad, trastorno o afección se selecciona del grupo que consiste en lupus, esclerodermia, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, septicemia, aterosclerosis, lesión isquémica-reperfusion, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, deficiencia en semialdehído succínico deshidrogenasa, esclerosis múltiple, y esclerosis lateral amiotrófica; o:
en donde (b) la enfermedad fibrótica es una fibrosis renal, hepática, pulmionar o cardiaca; o:
- 40
- en donde (ii) la enfermedad, trastorno o afección es una enfermedad, trastorno o afección de la edad.
- 45
13. Un método de uso cosmético para tratar una indicación cosmética en la que la toxicidad de aldehídos está implicada en un sujeto en necesidad de ello, que comprende administrar por vía tópica o sistémica al sujeto una composición que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la indicación cosmética se selecciona del grupo que consiste en elastosis solar/arrugas, firmeza del tono de la piel, hinchazón, cambios en piel inducidos por tabaco o irritantes, incisión dérmica, y una afección de la piel asociada con una quemadura o herida.

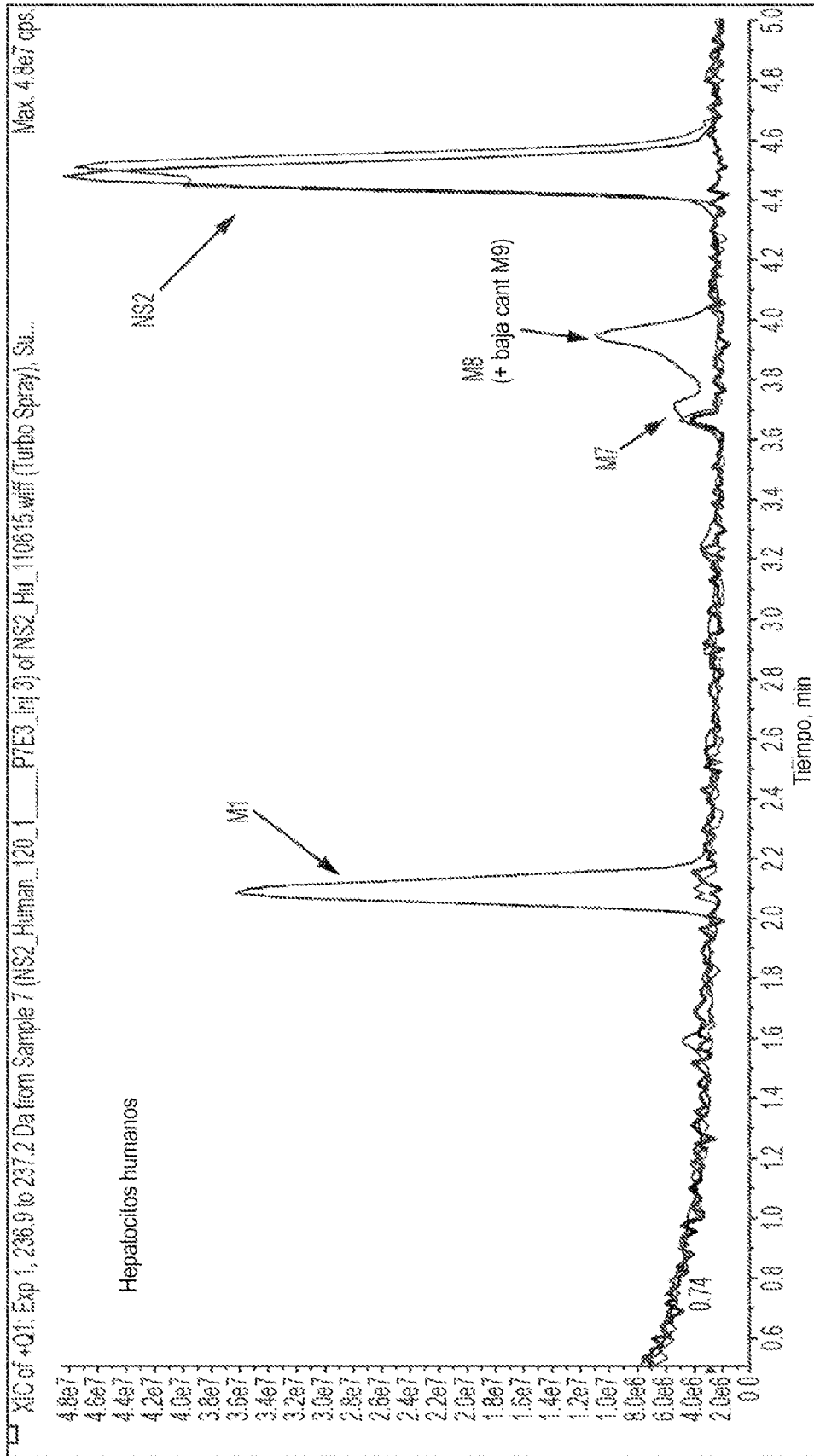


Figura 1

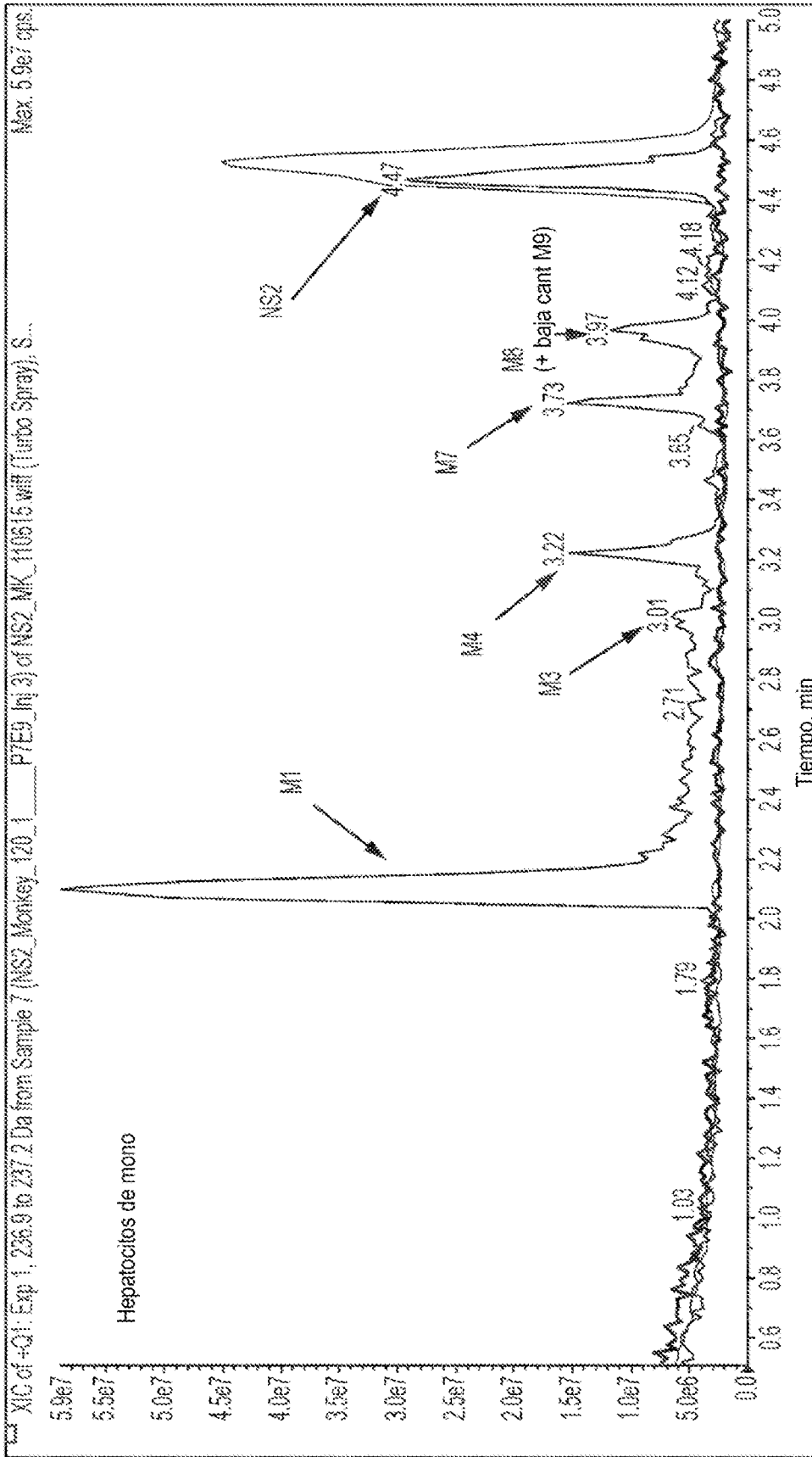


Figura 2

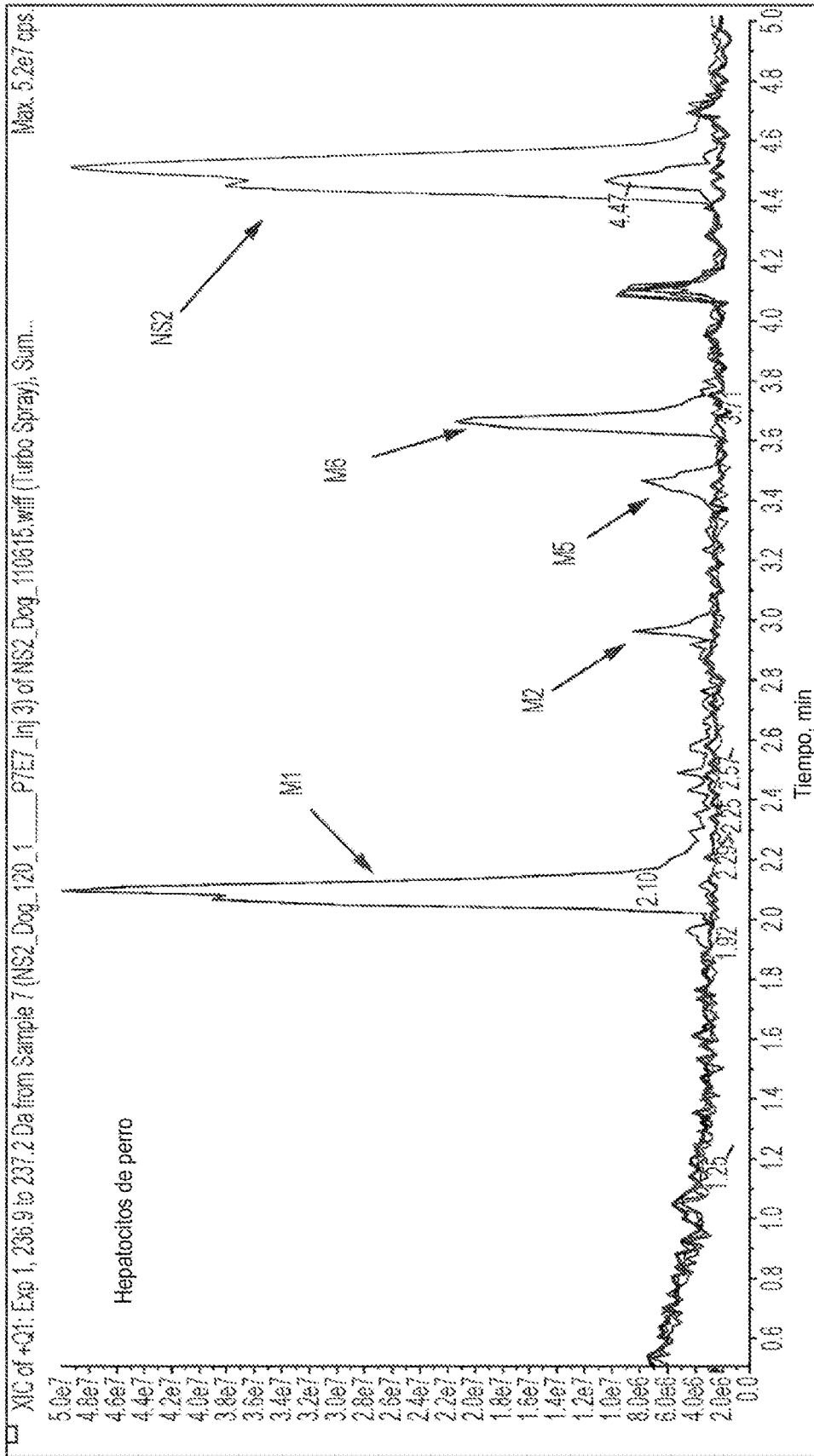


Figura 3

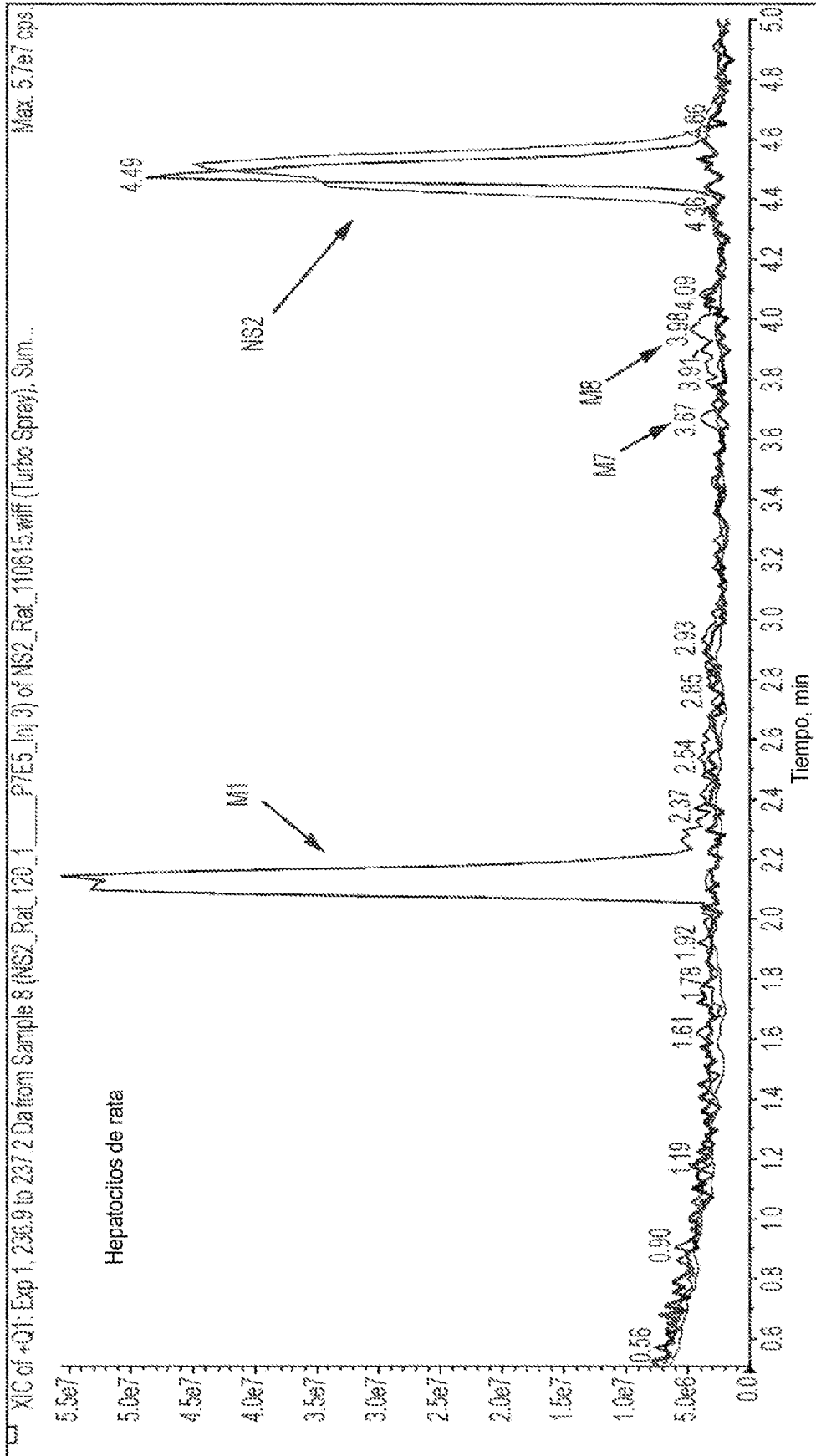


Figura 4

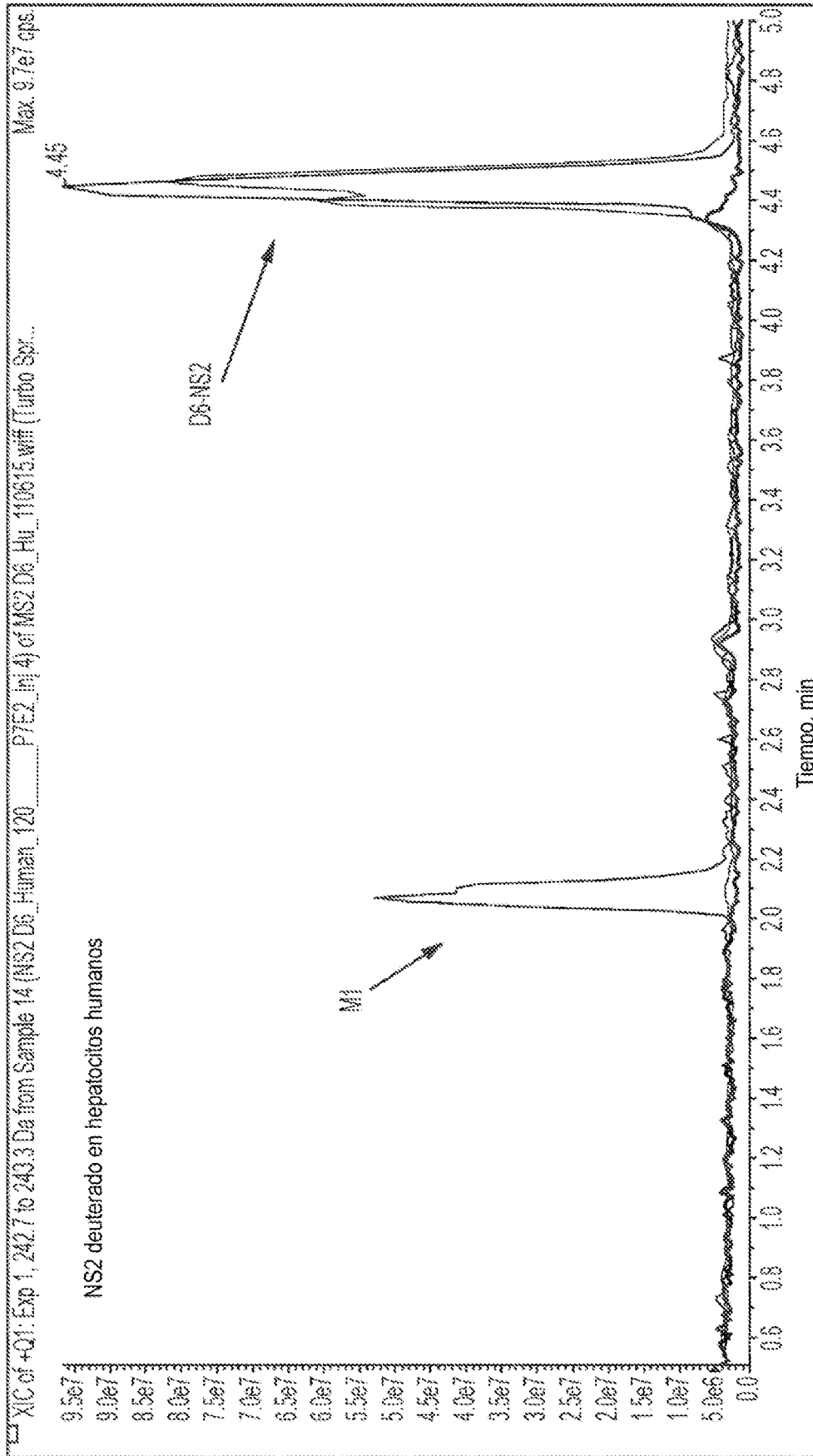


Figura 5

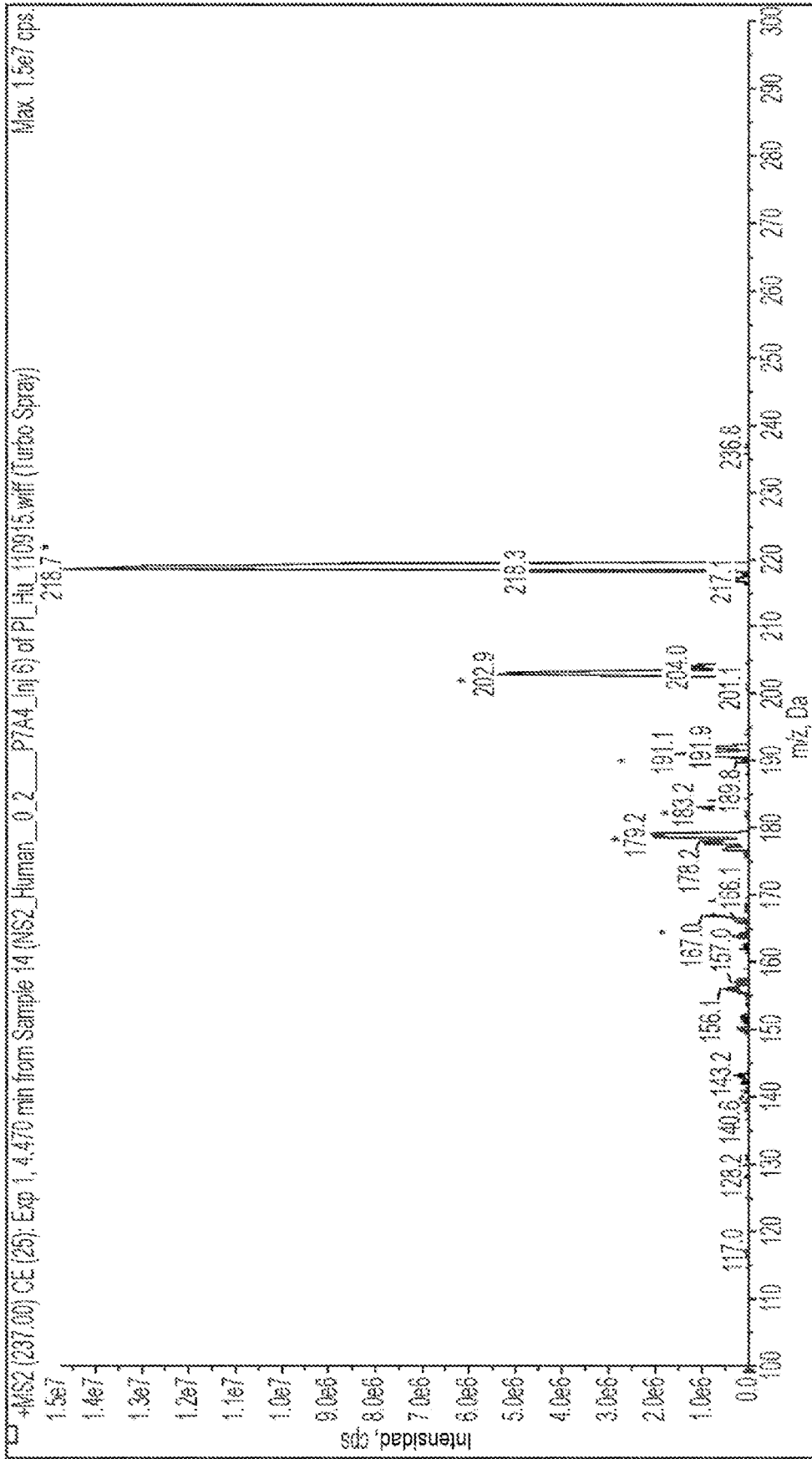


Figura 6

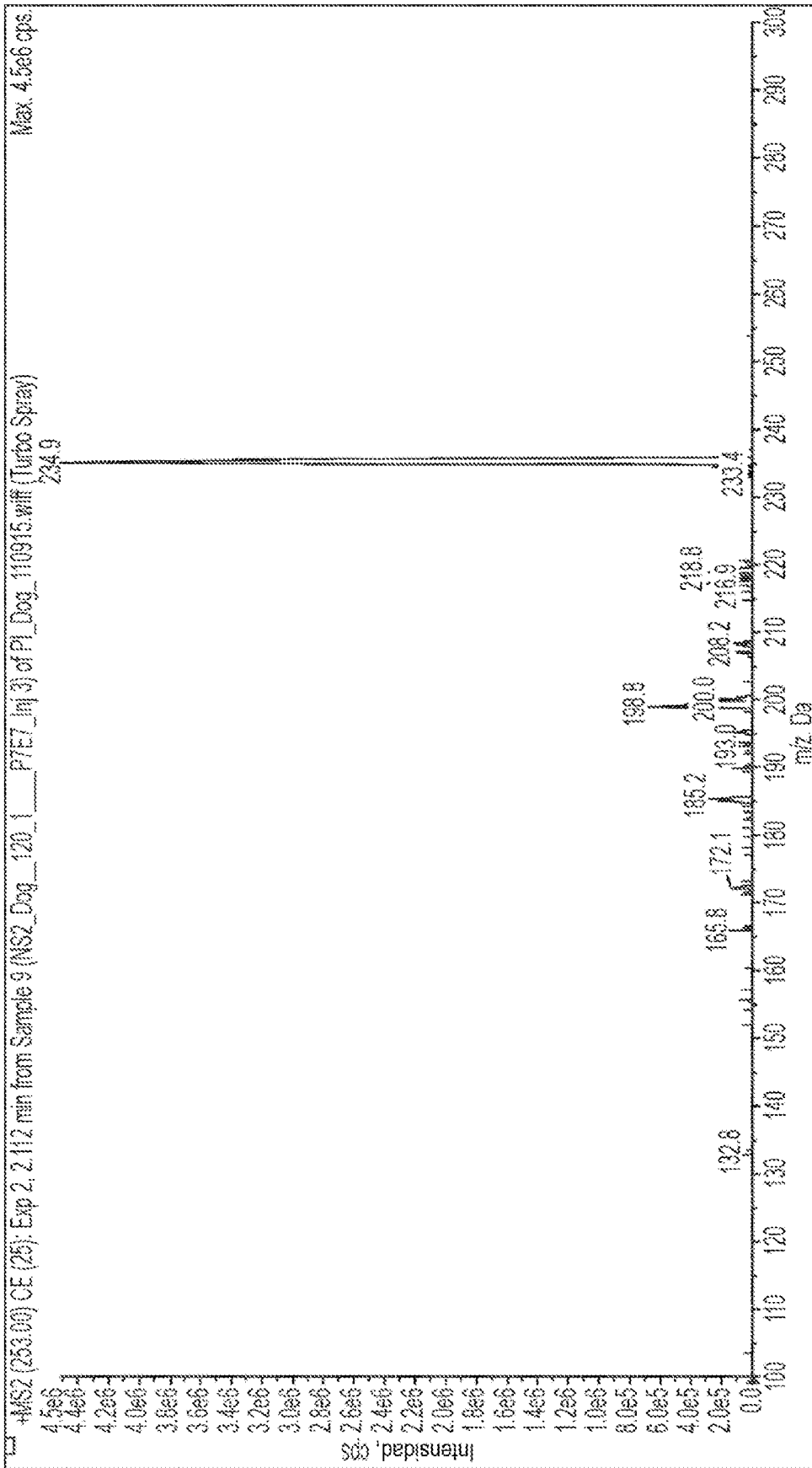


Figura 7

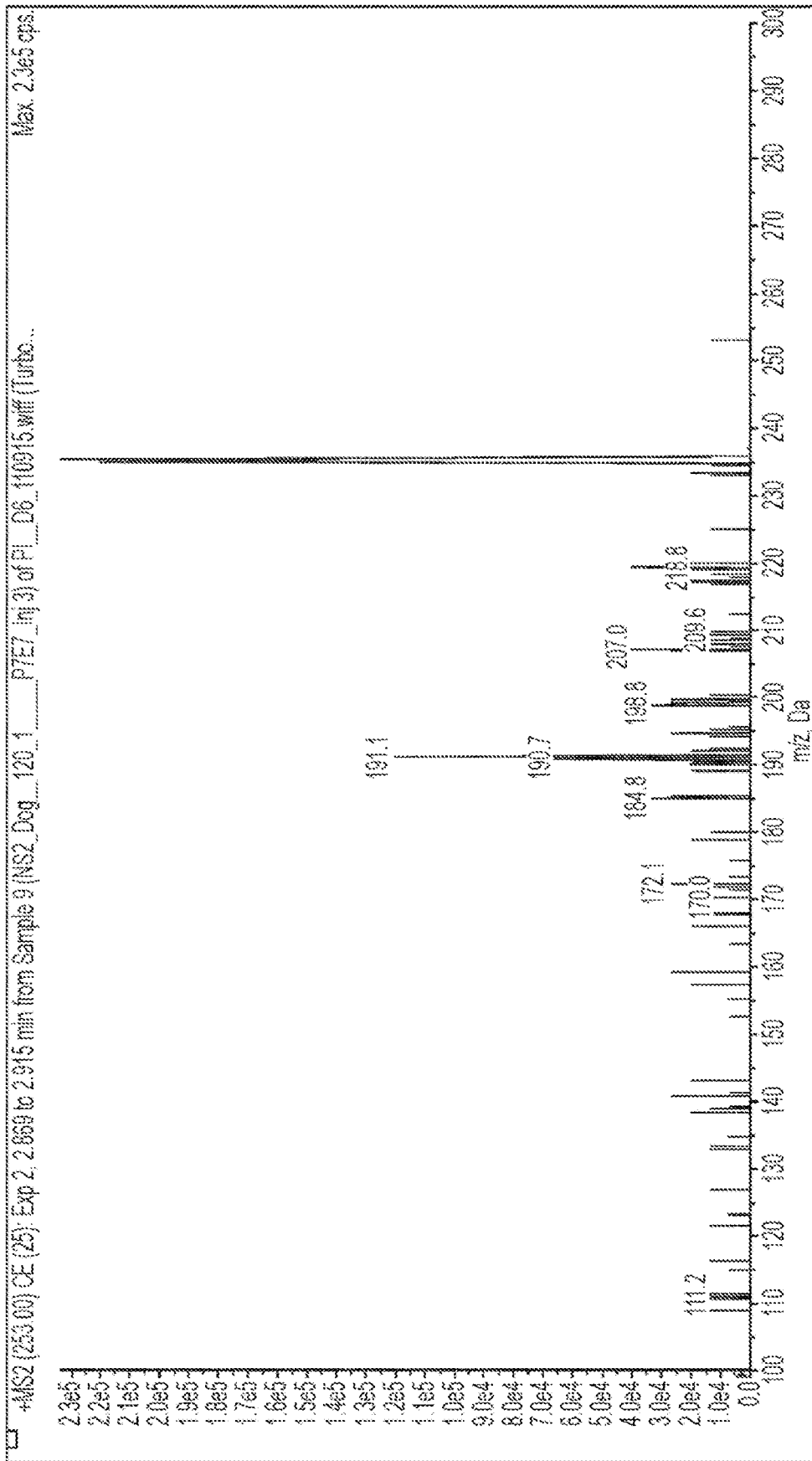


Figura 8

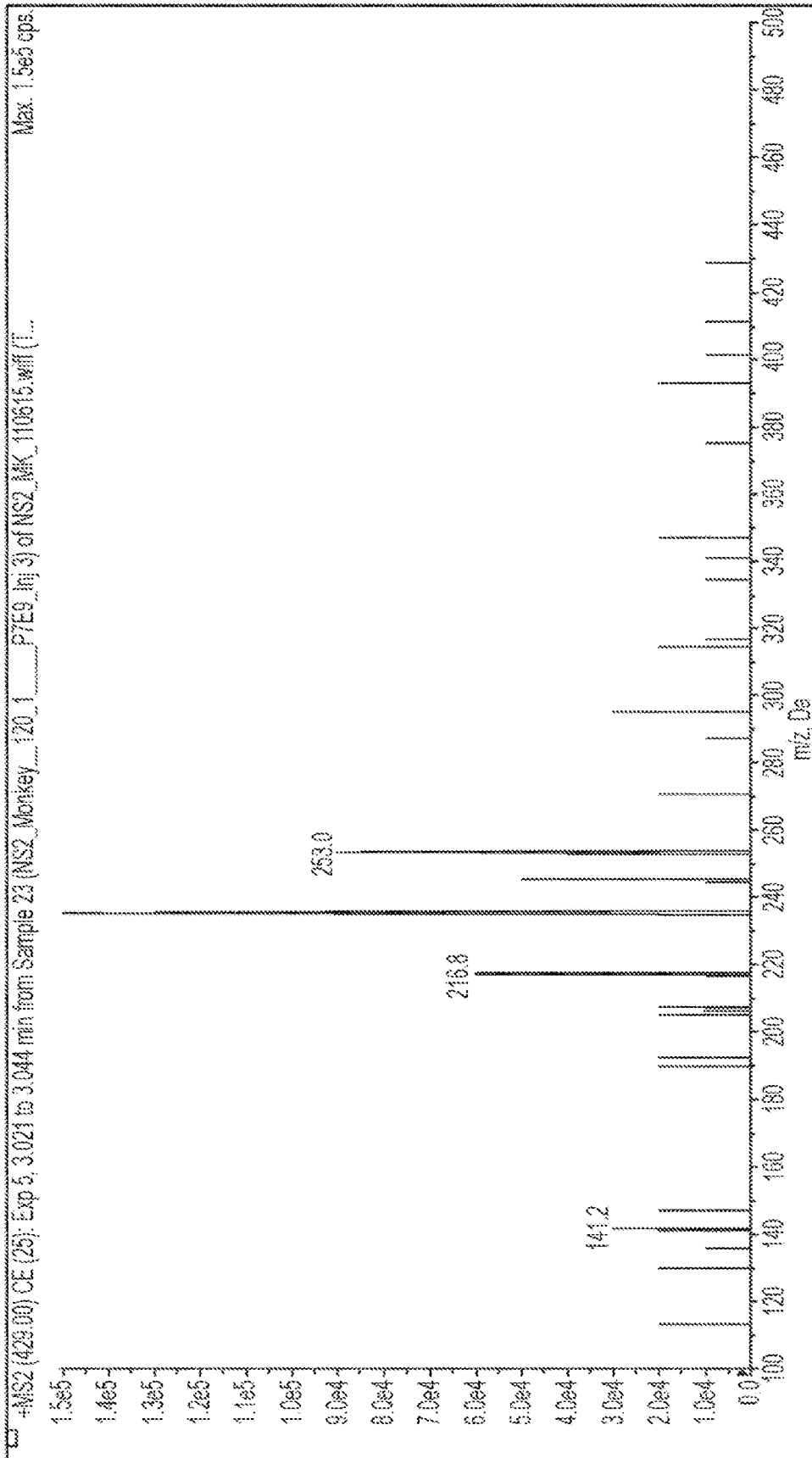


Figura 9

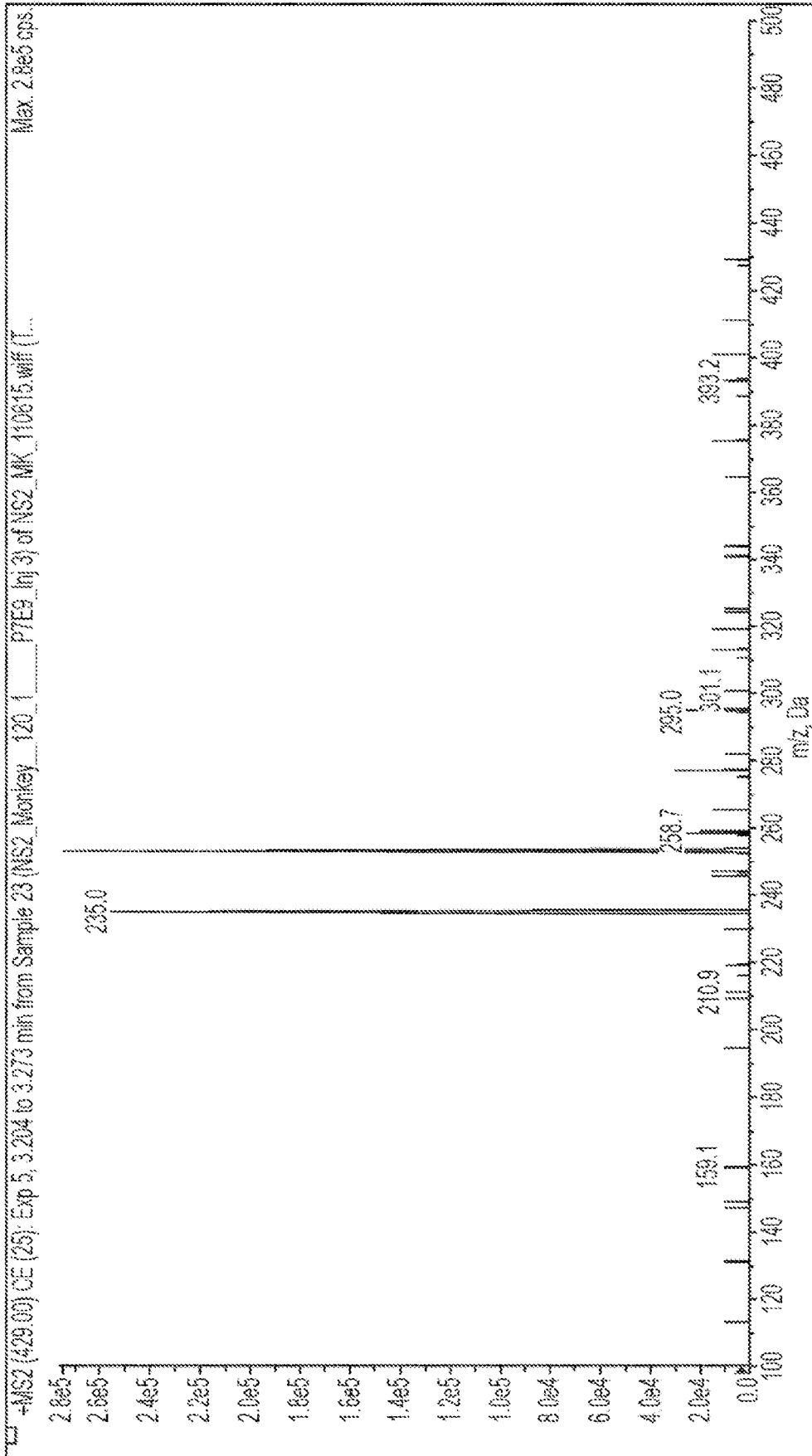


Figura 10

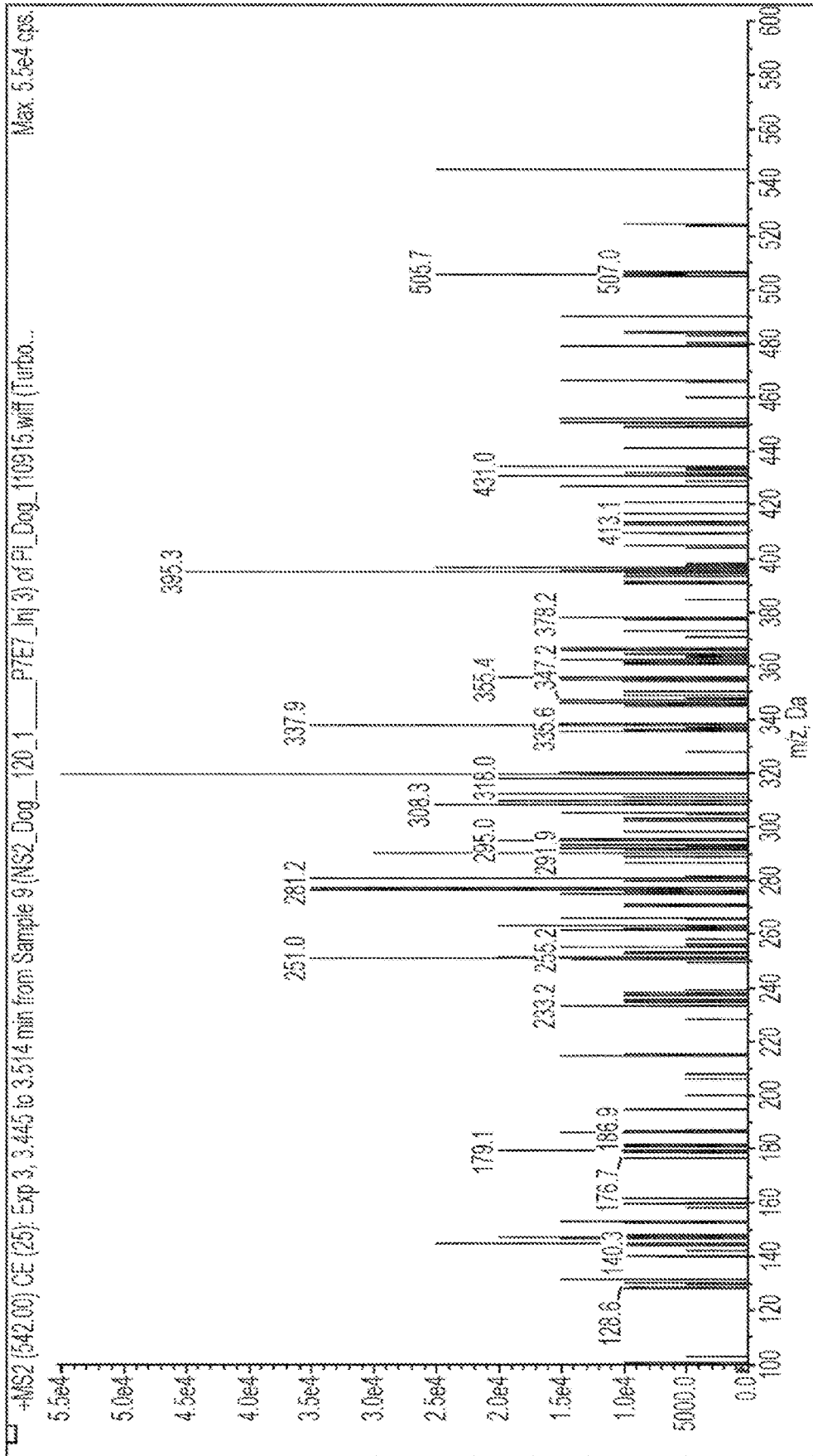


Figura 11

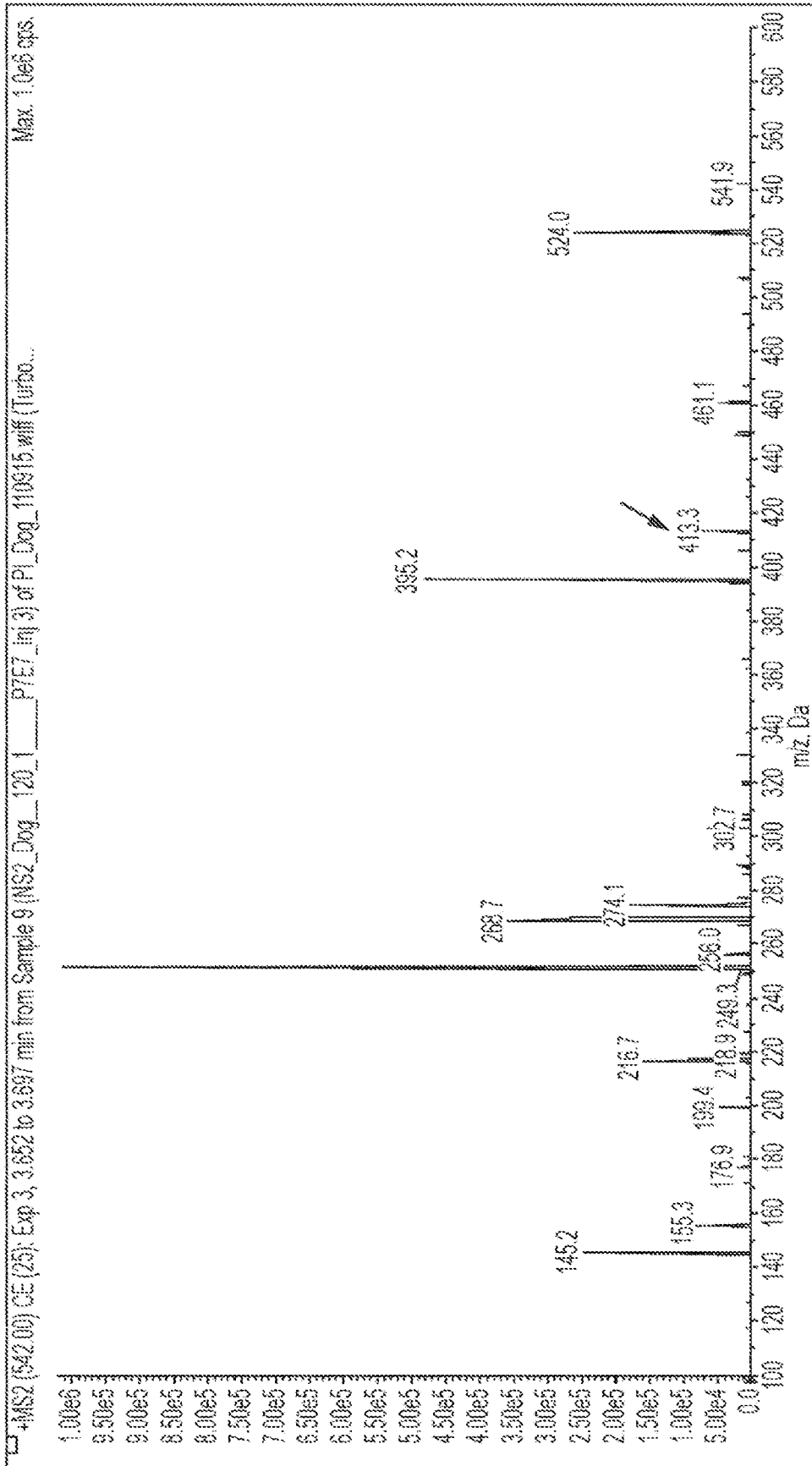


Figura 12

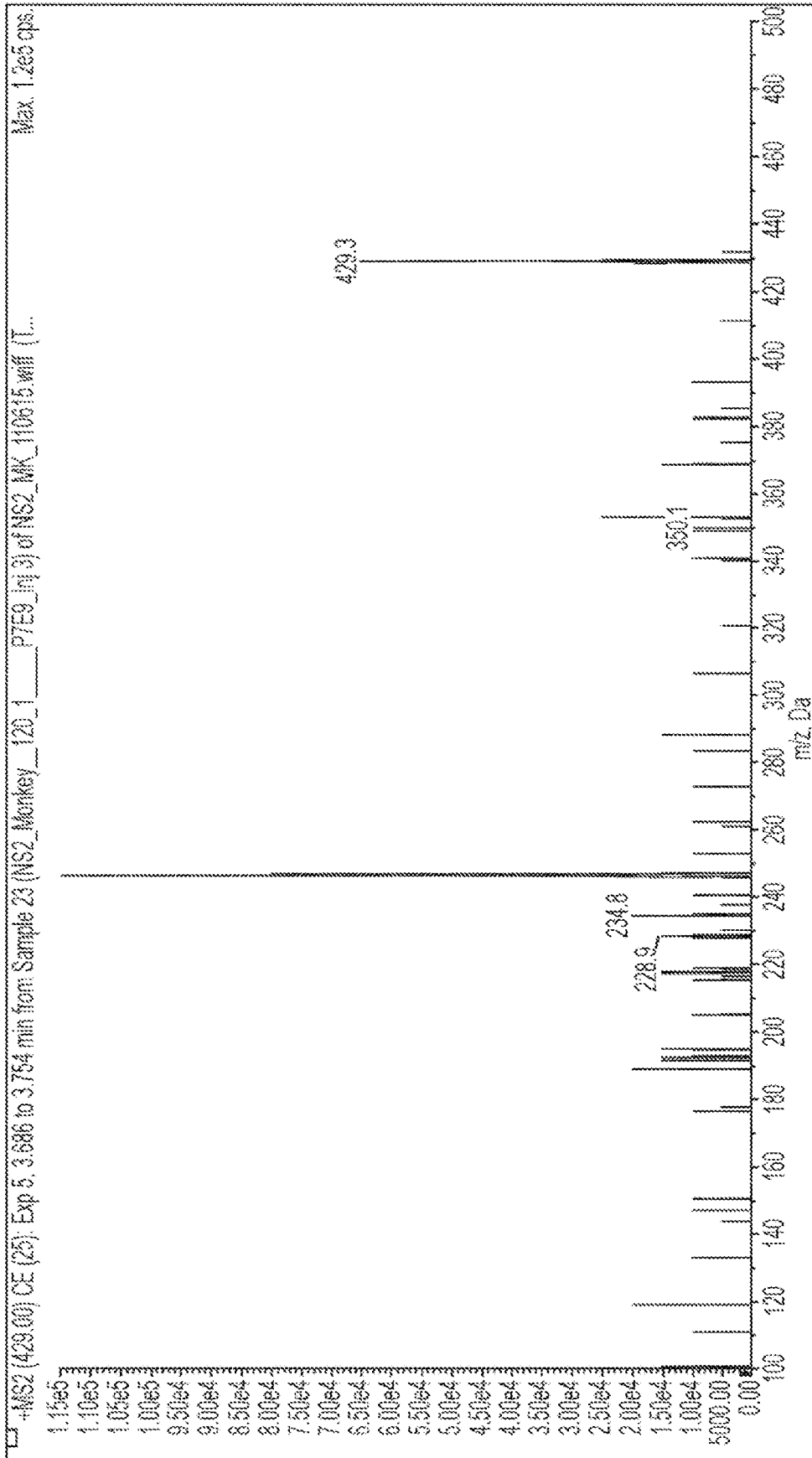


Figura 13

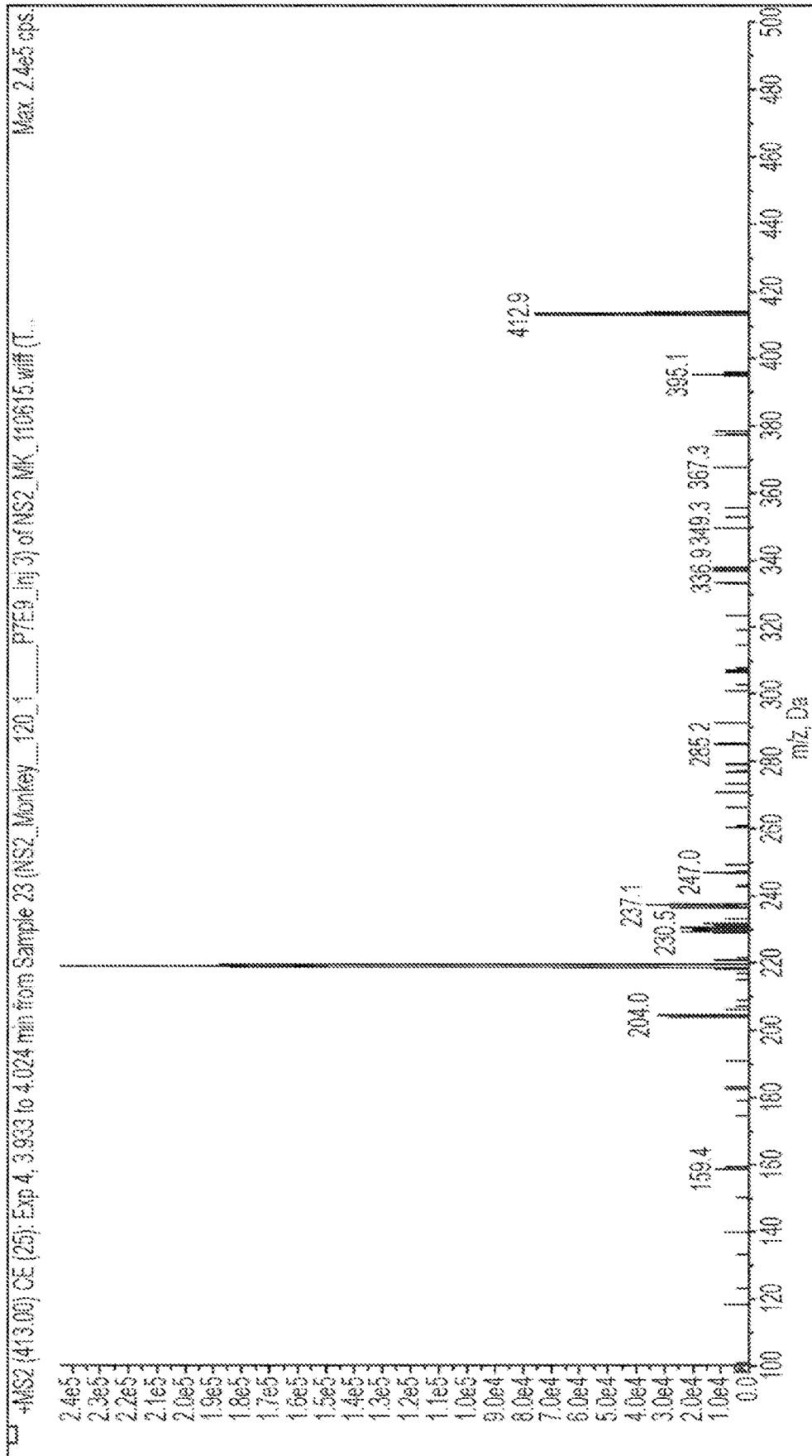


Figura 14

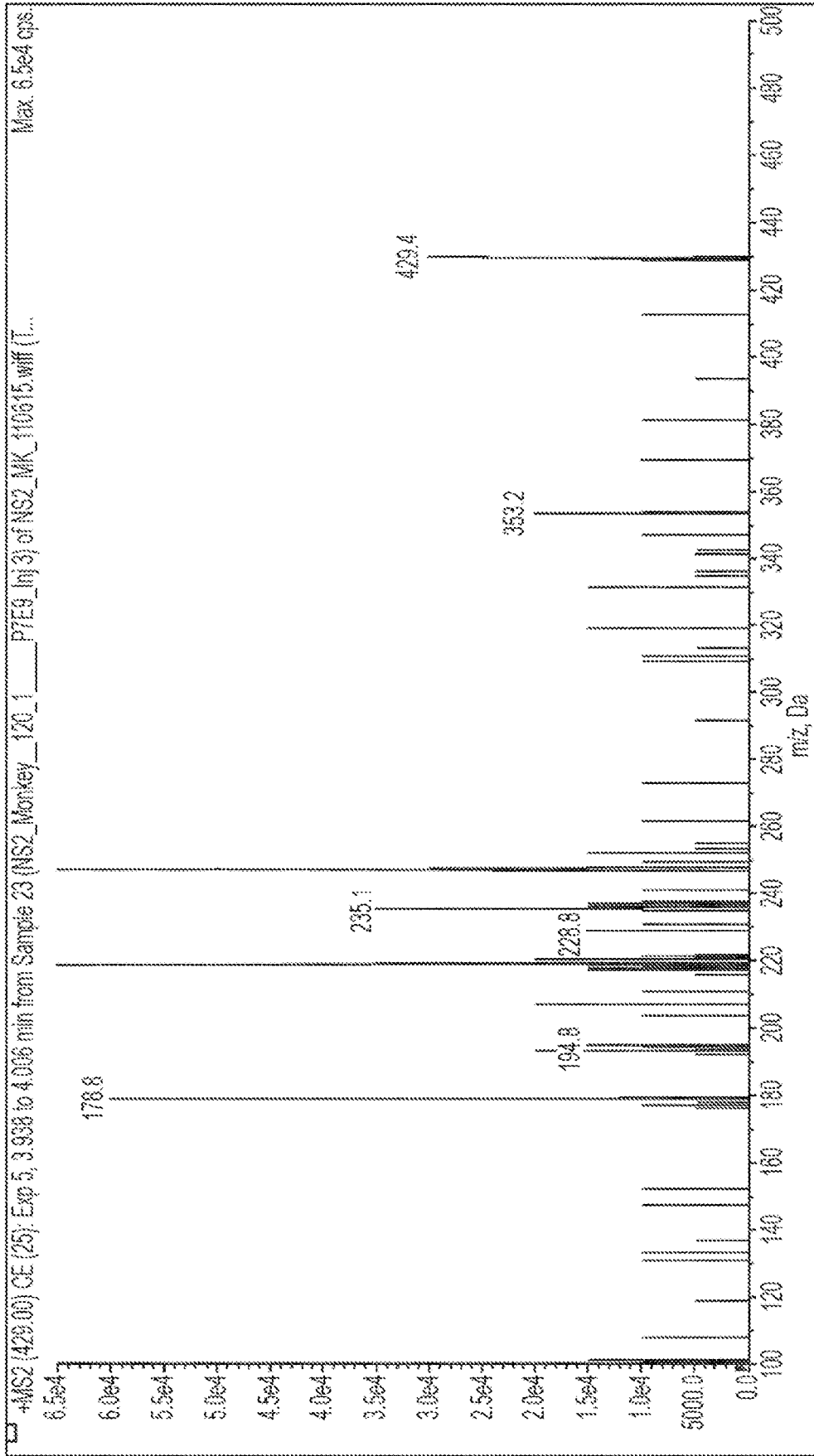


Figure 15

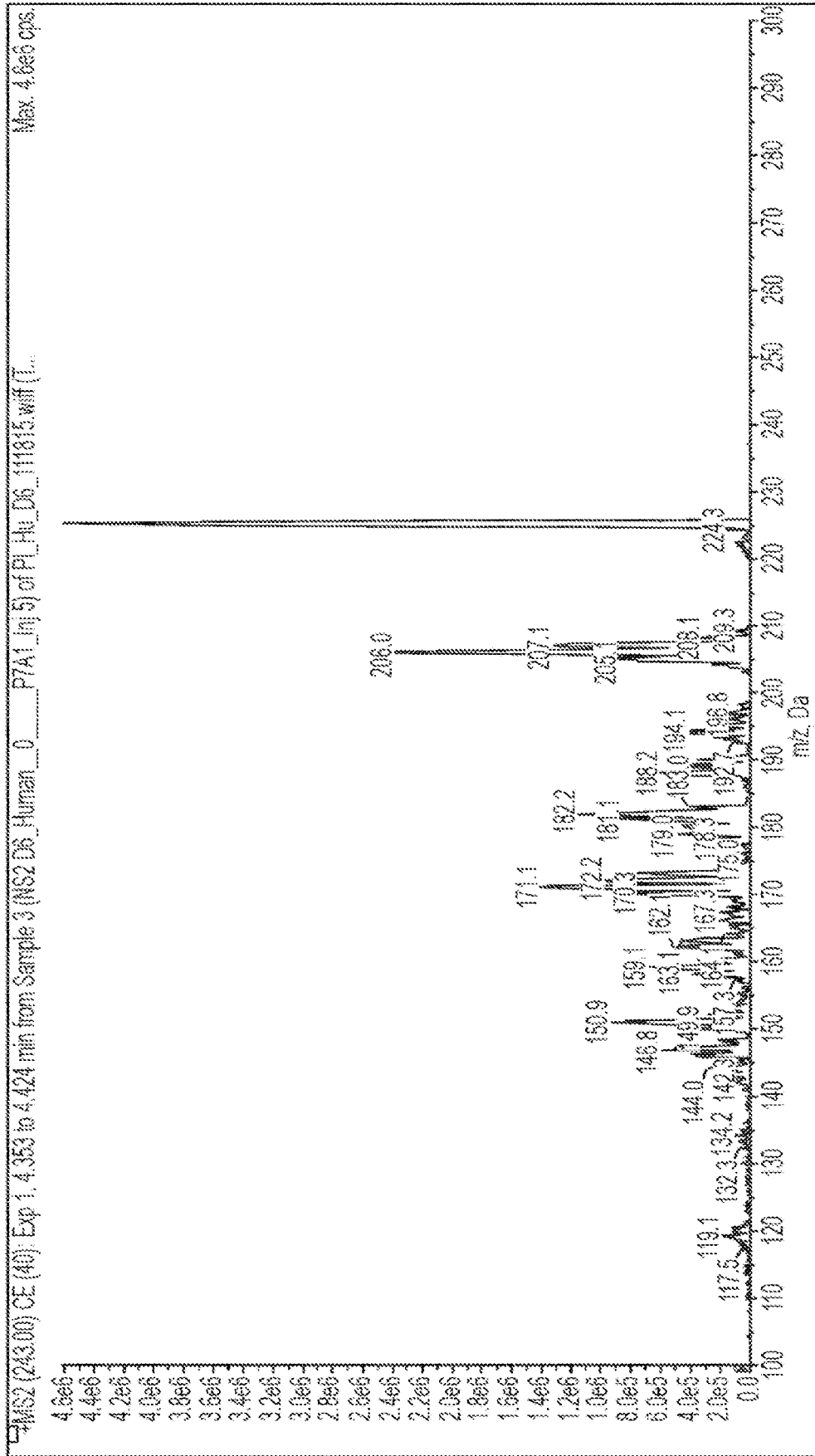


Figura 16

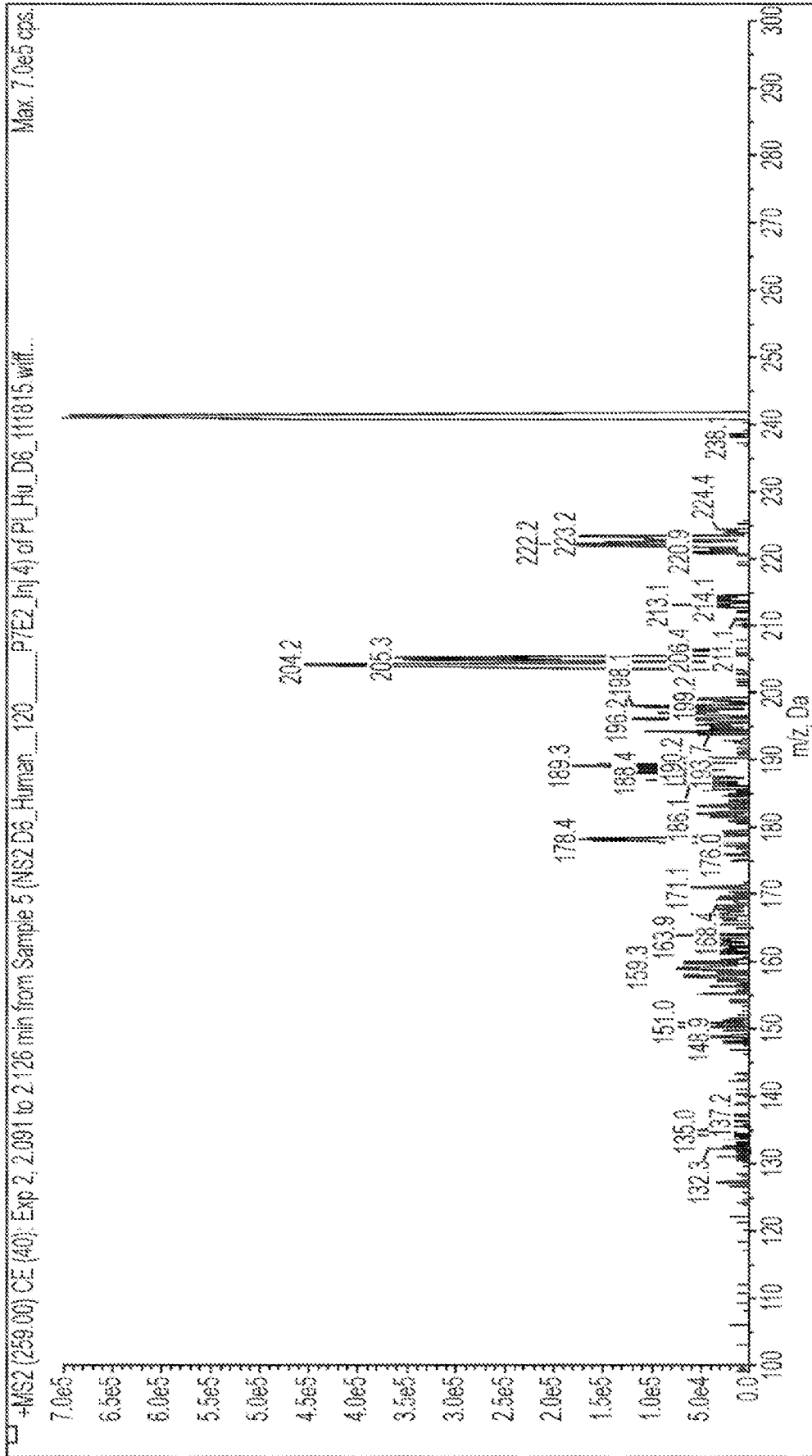
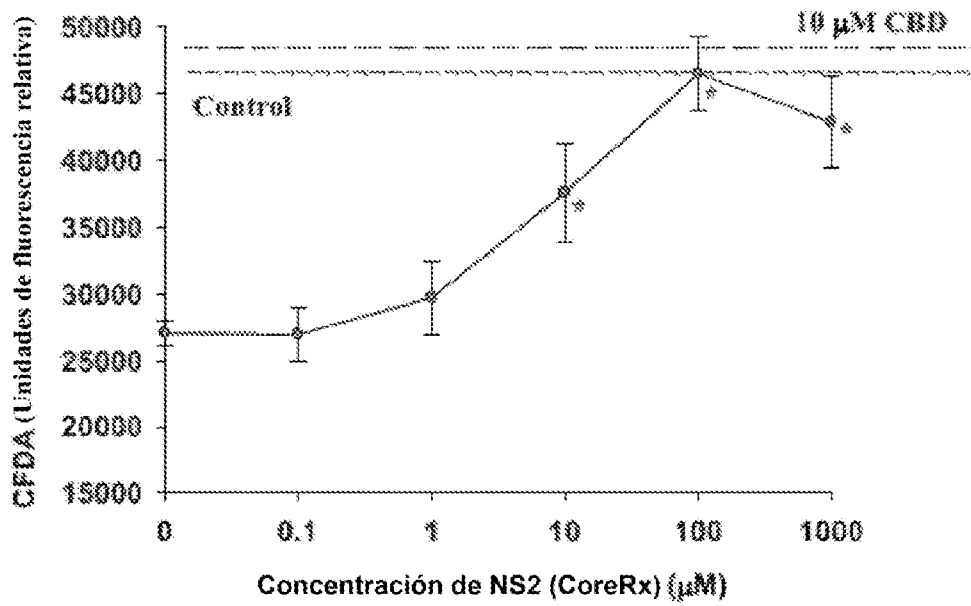


Figura 17

Figura 18



* Significativamente diferente del tratamiento con HP solo

Figura 19

Ajuste de curva logística y CE50

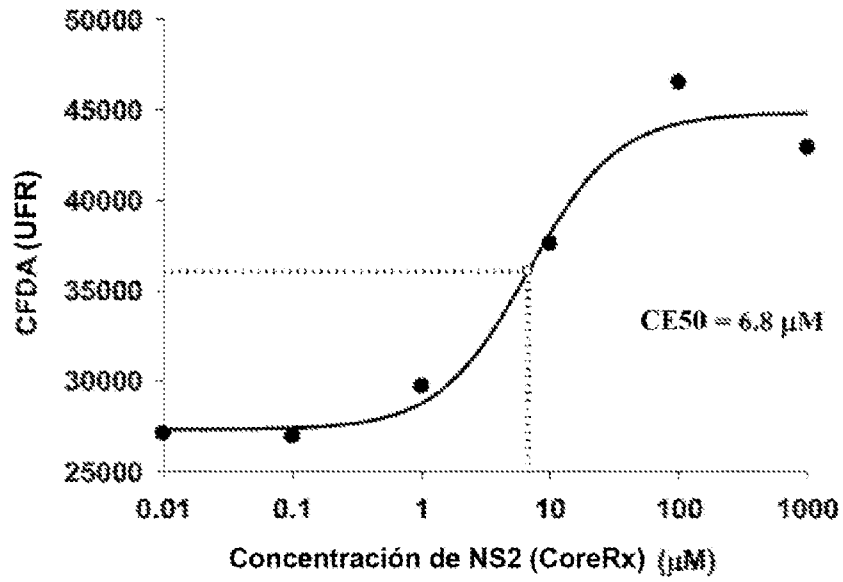


Figura 20

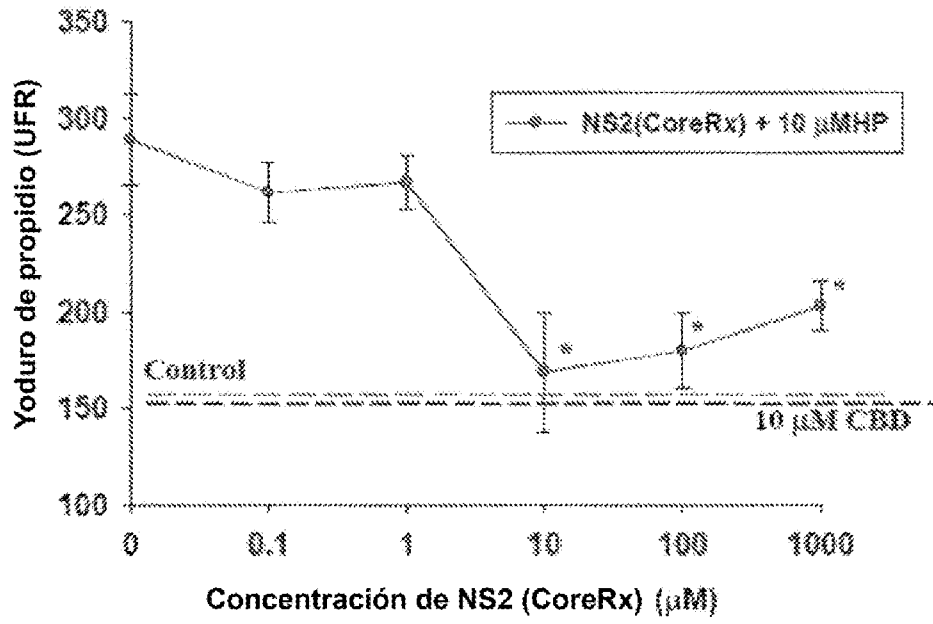


Figura 21

Ajuste de curva logístico y CE50

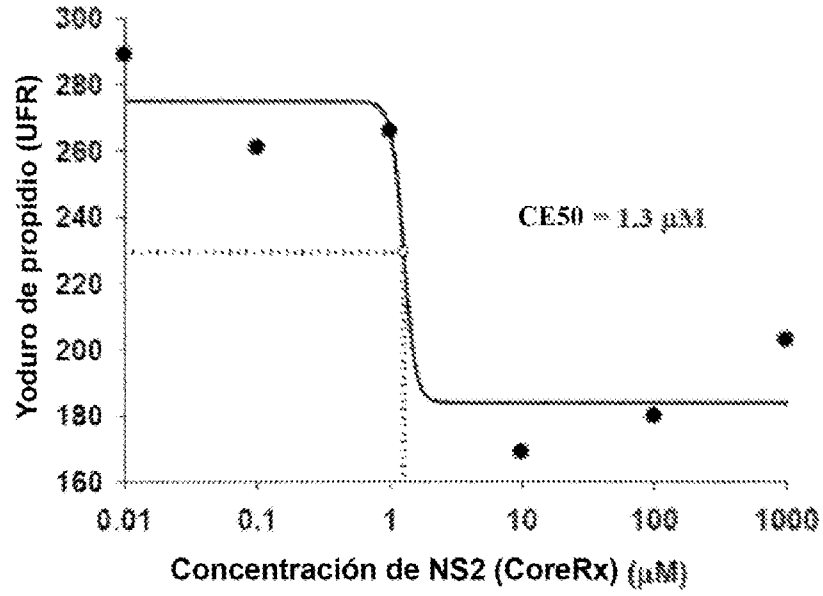


Figura 22

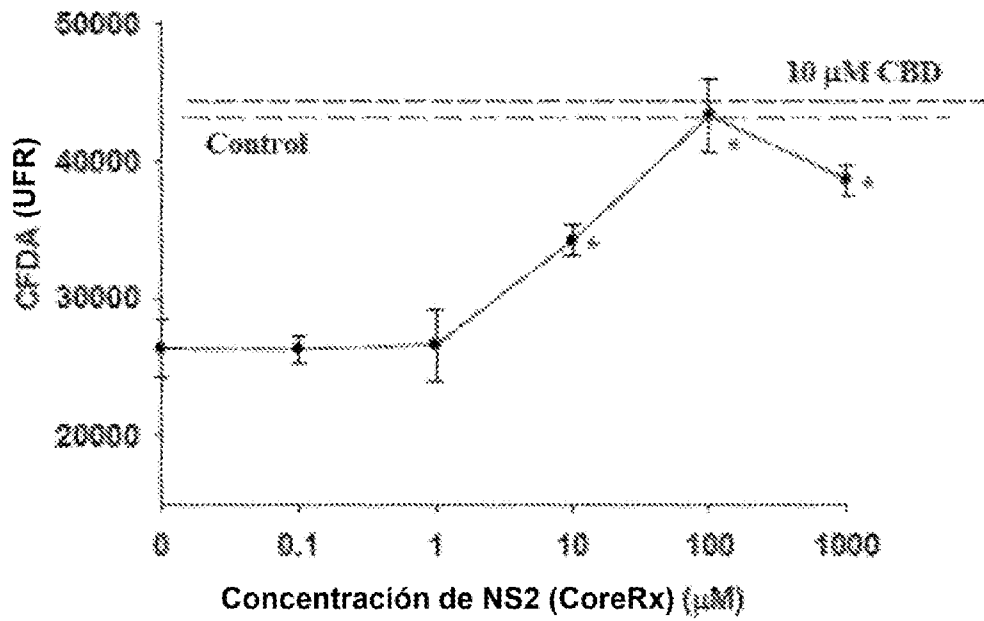


Figura 23

Ajuste de curva logístico y CE50

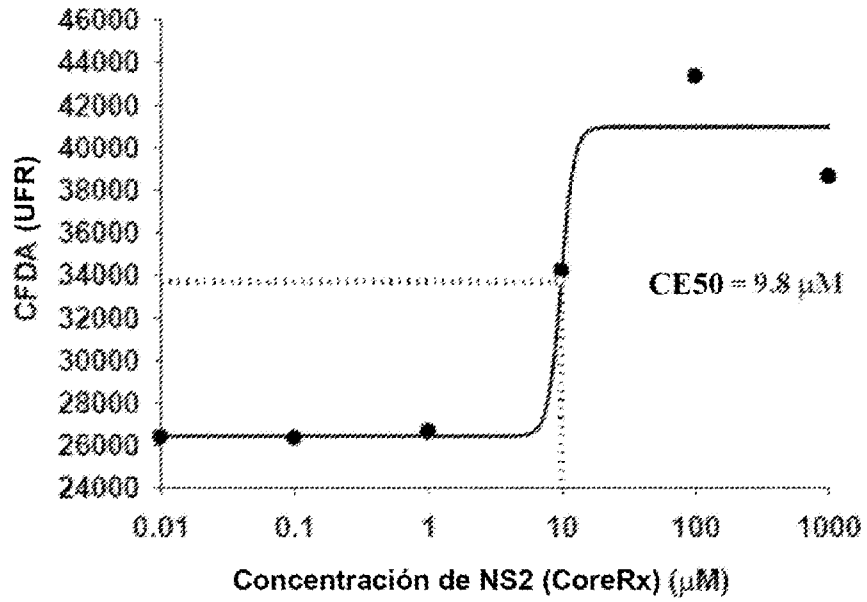


Figura 24

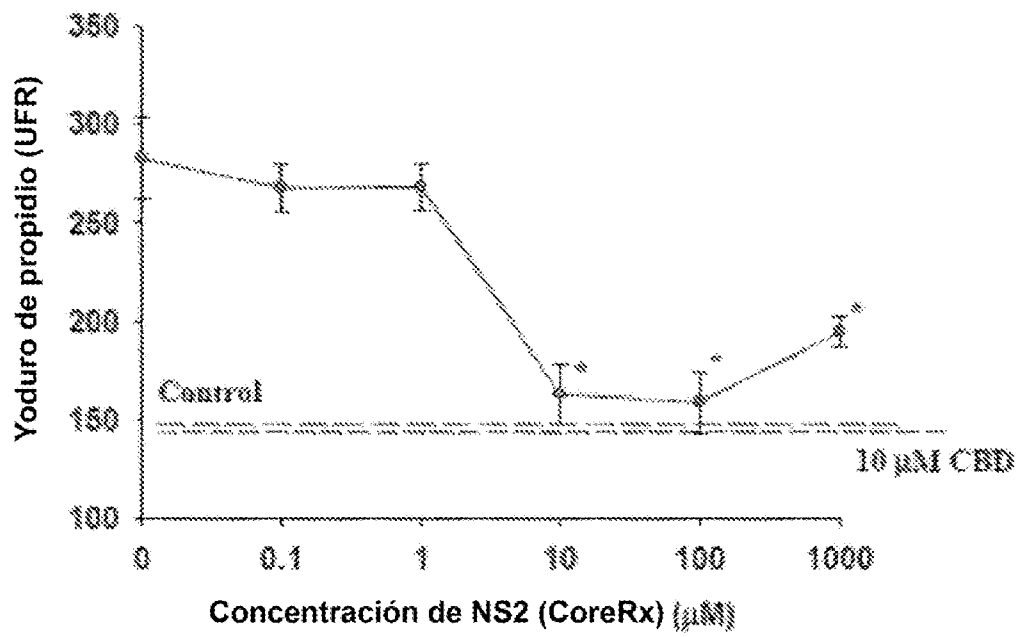


Figura 25
Ajuste de curva logístico y CE50

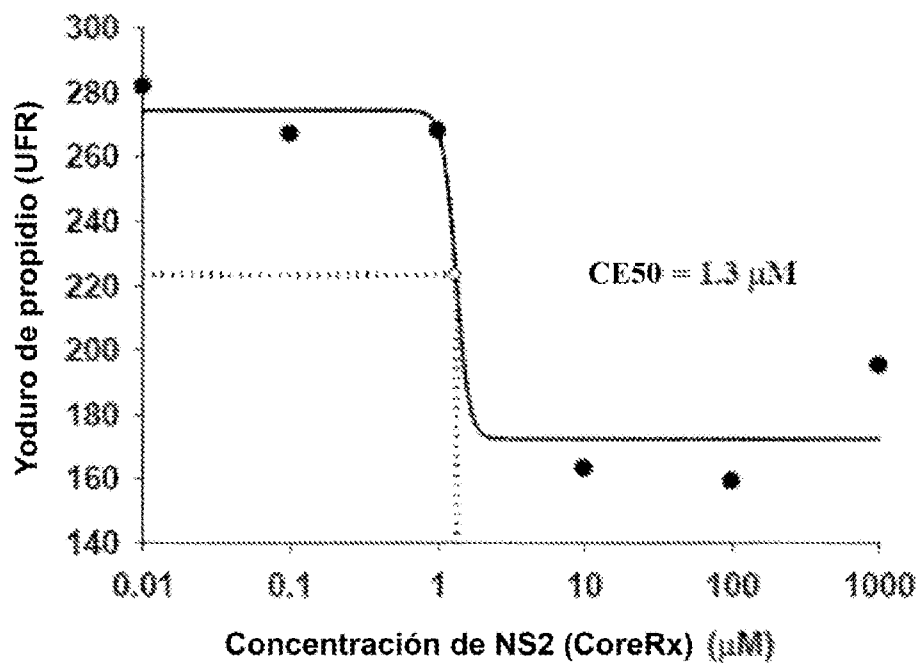


Figura 26

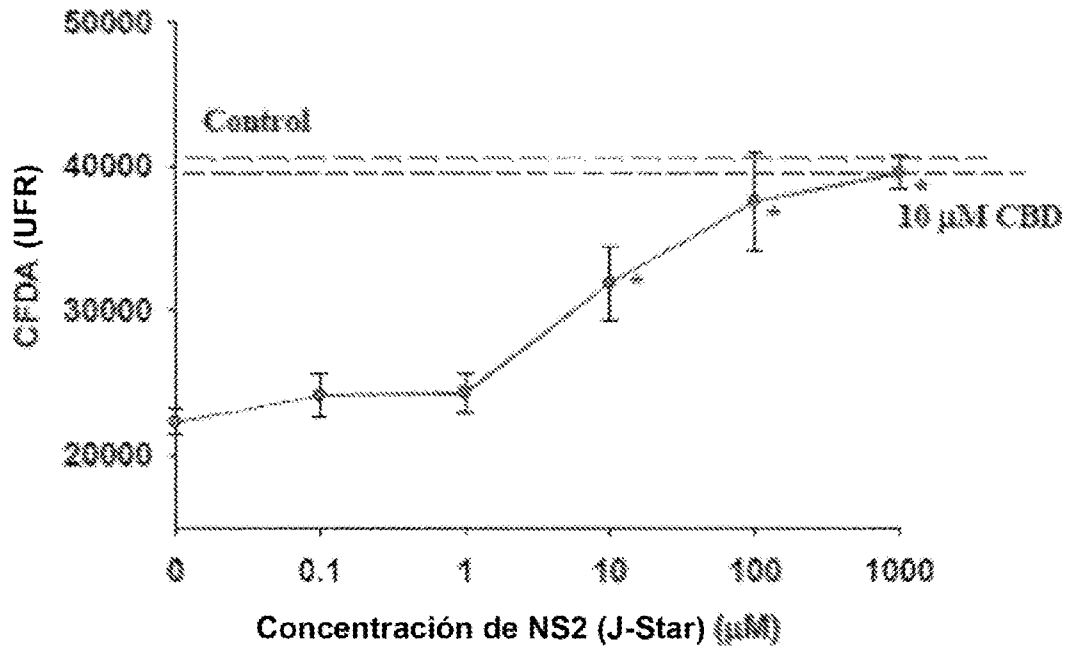


Figura 27

Ajuste de curva logístico y CE50

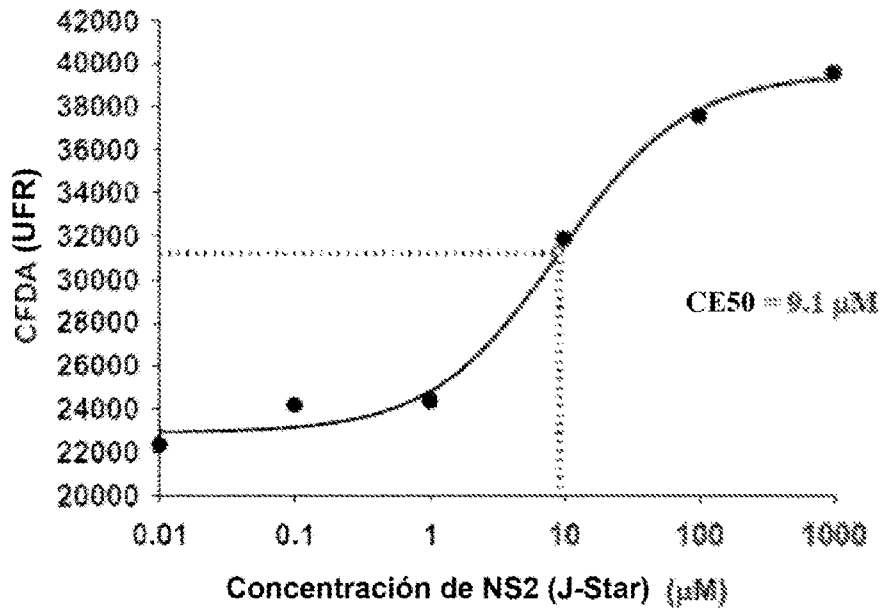


Figura 28

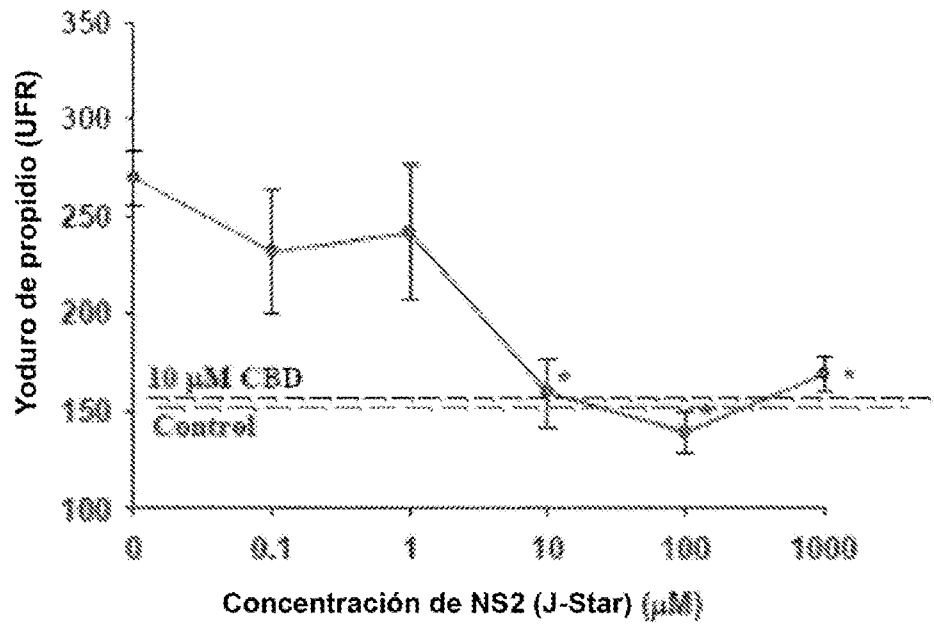


Figura 29
Ajuste de curva logístico y CE50

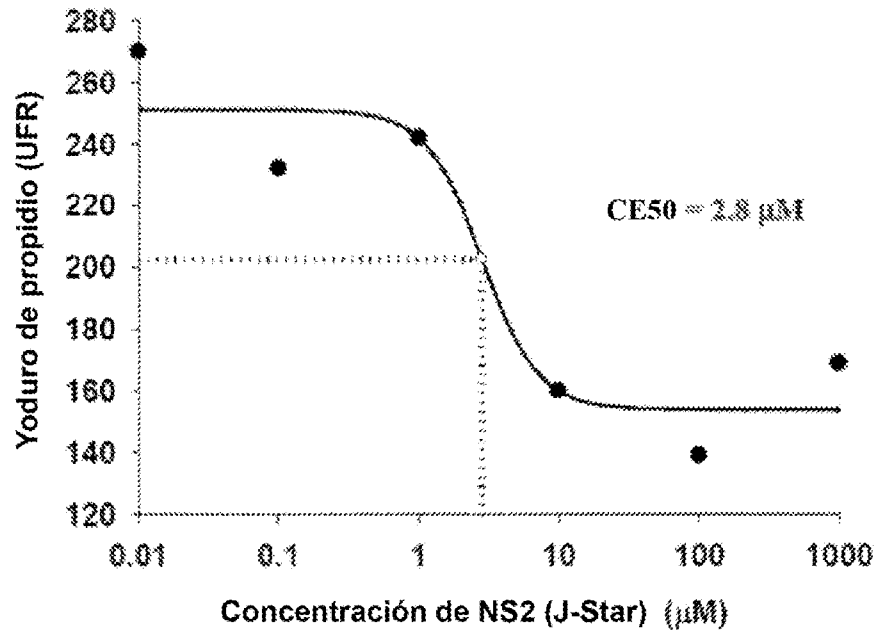


Figura 30

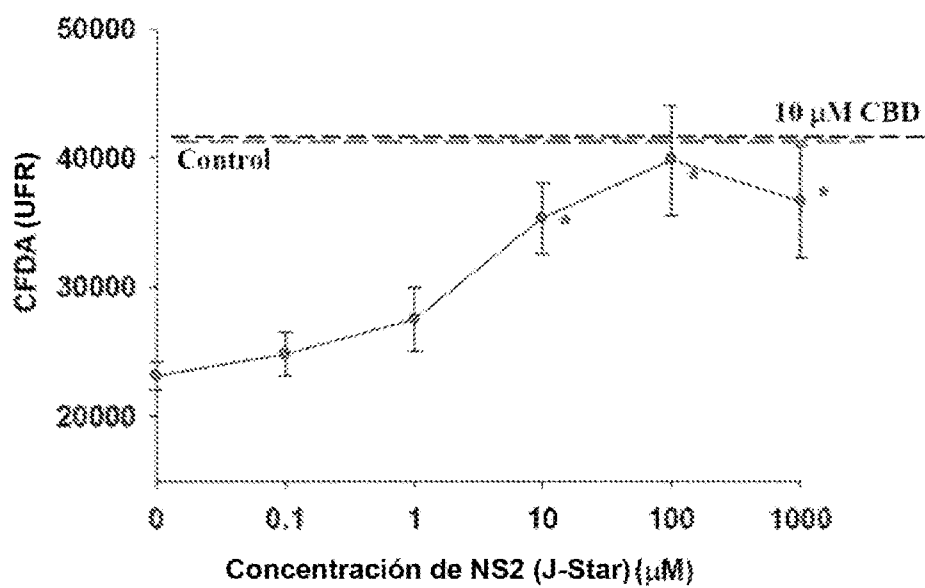


Figura 31
Ajuste de curva logístico y CE50

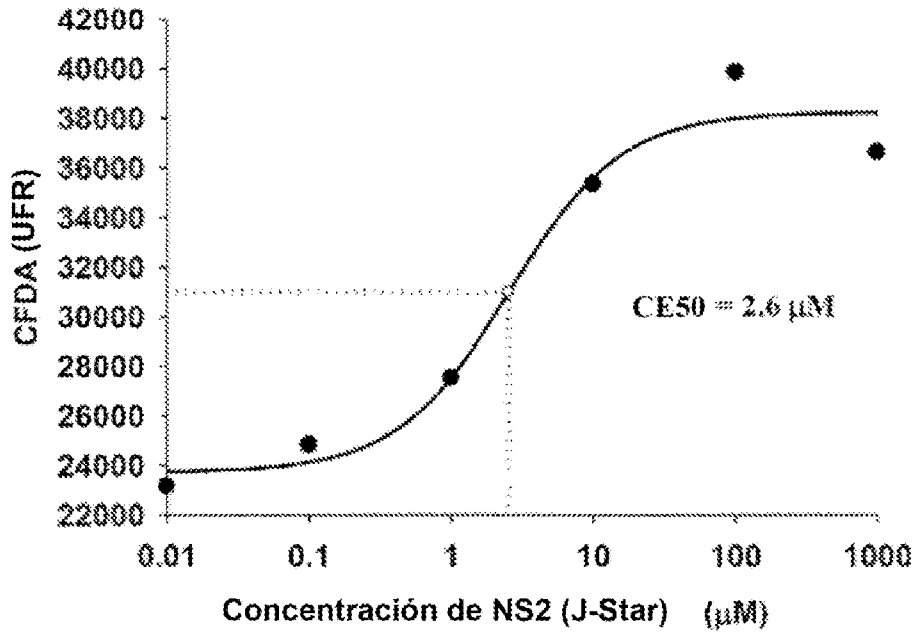


Figura 32

Efecto de NS2 (J-Sar) sobre muerte celular en cultivos de hipocampo cotratados con peróxido de hidrógeno 10 μM durante 5 horas

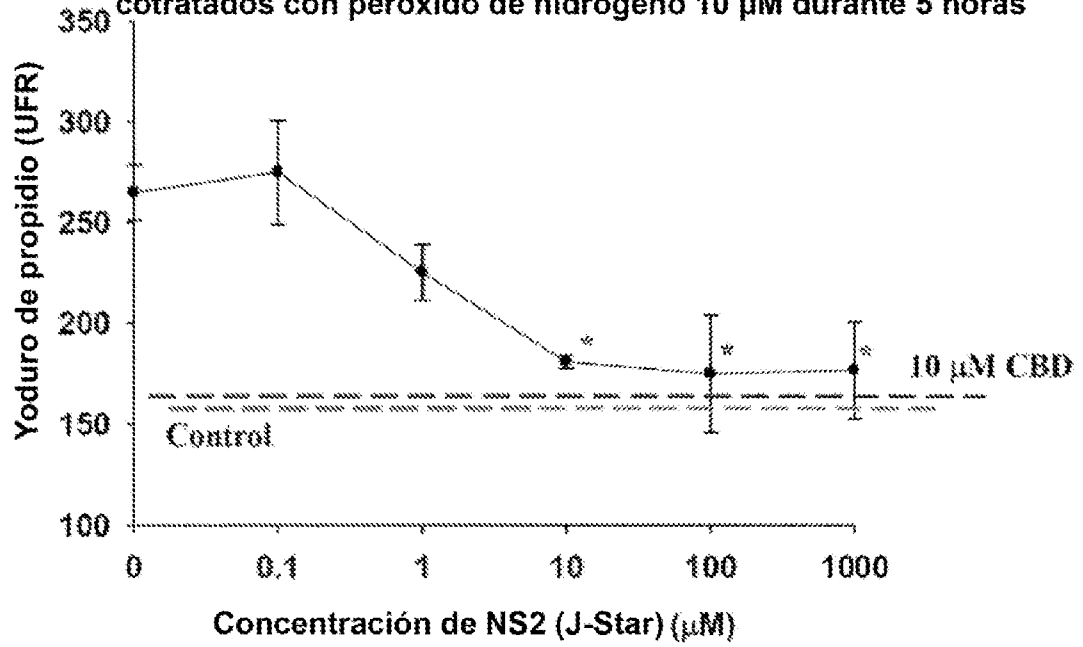


Figura 33

Ajuste de curva logístico y CE50

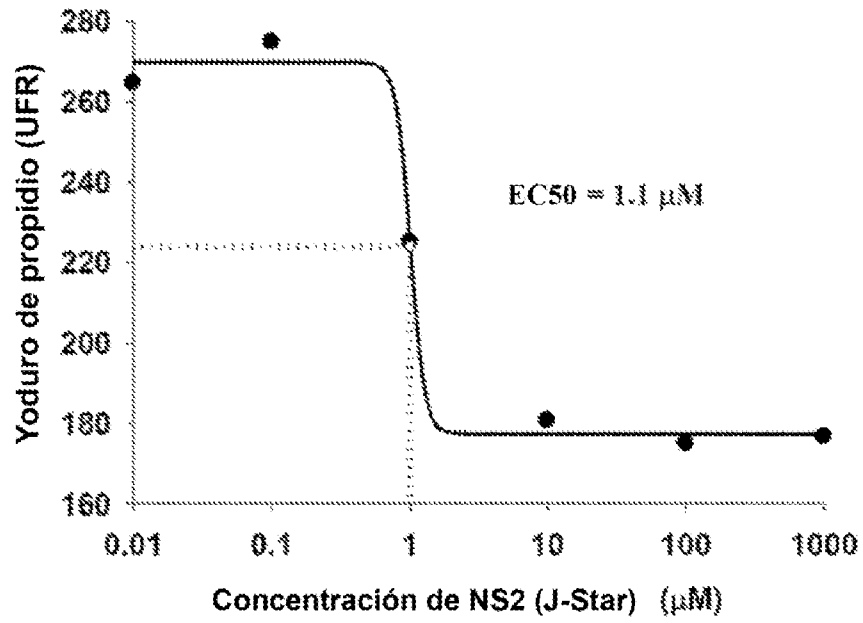


Figura 34

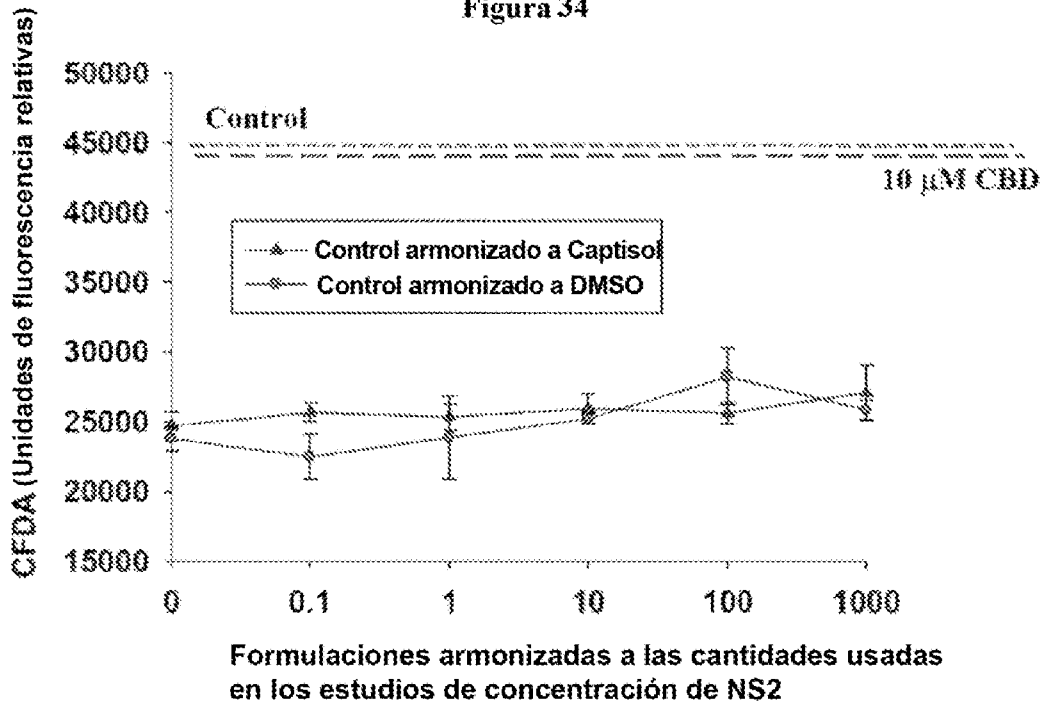


Figura 35

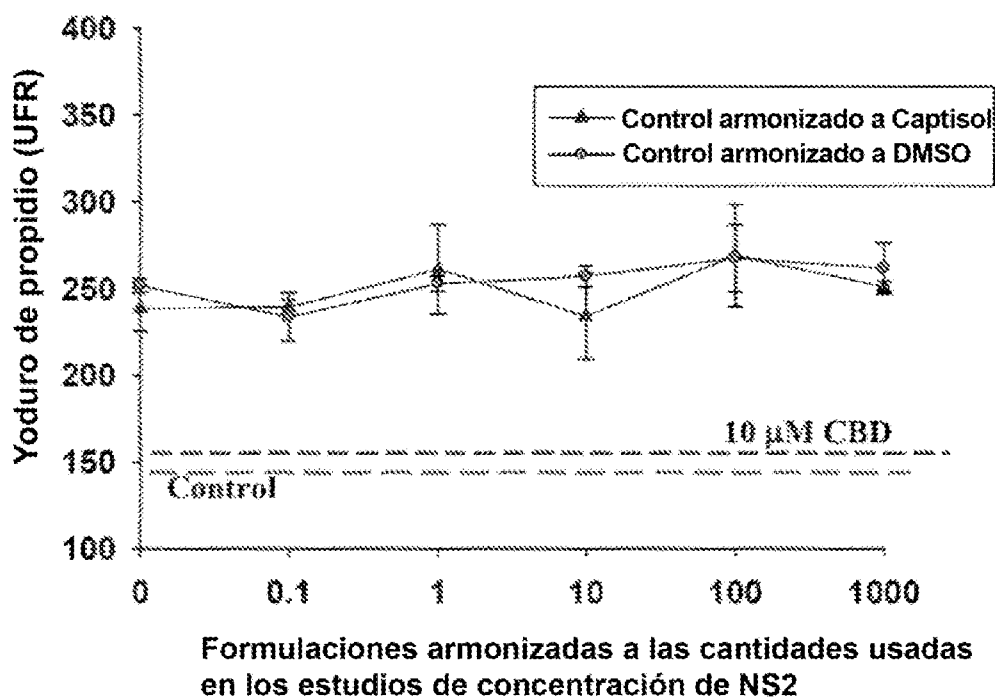


Figura 36

Efecto de ALD-6 en viabilidad neuronal en cultivos de hipocampo tratados con peróxido de hidrógeno 10 μM

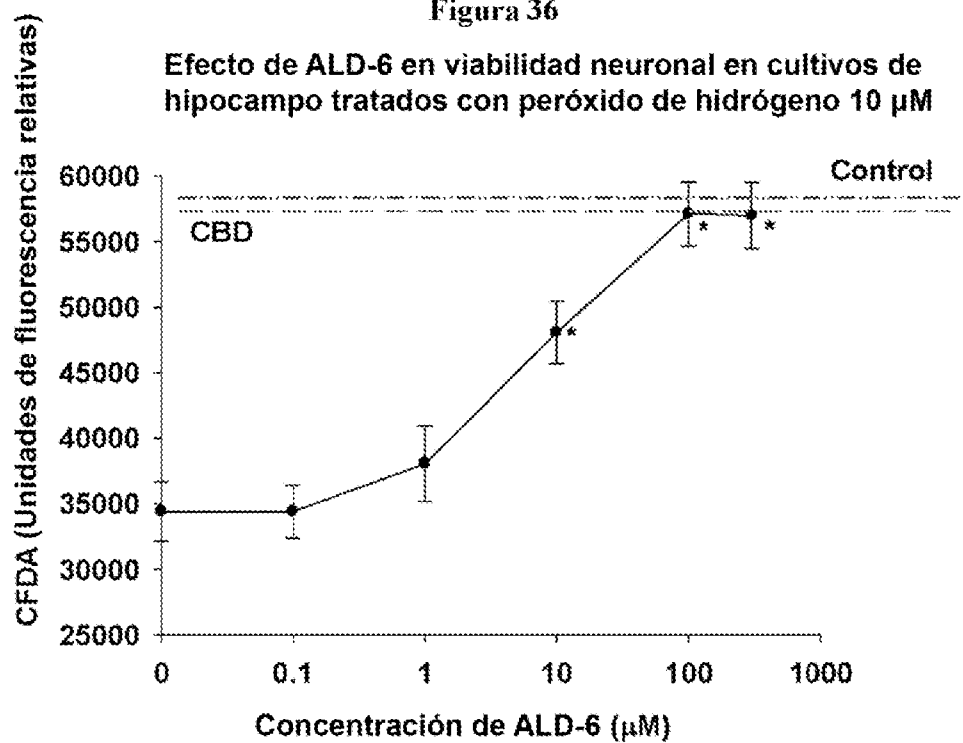


Figura 37

Ajuste de curva logístico y CE50

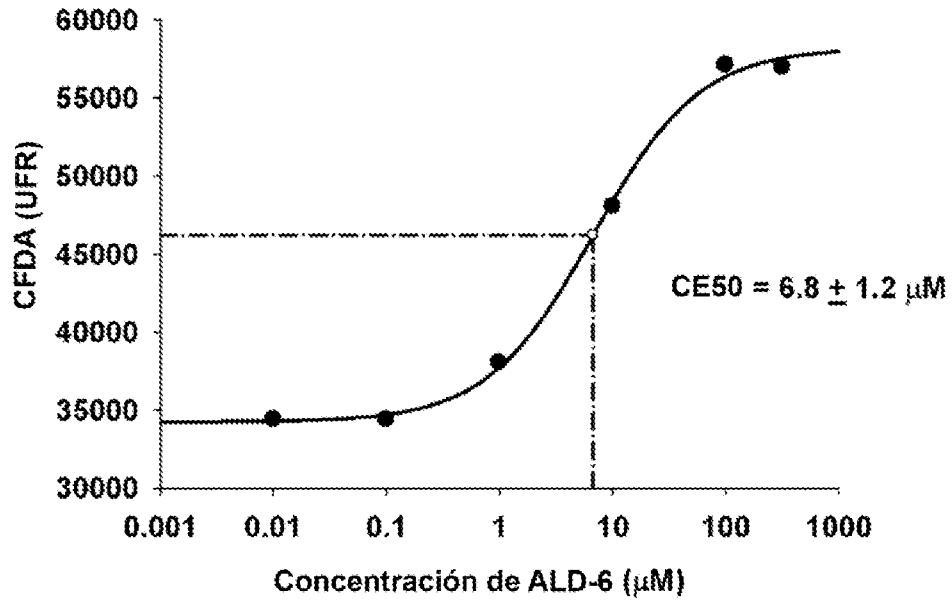


Figura 38

Efecto de ALD-6 en muerte celular en cultivos de hipocampo tratados con peróxido de hidrógeno 10 μM

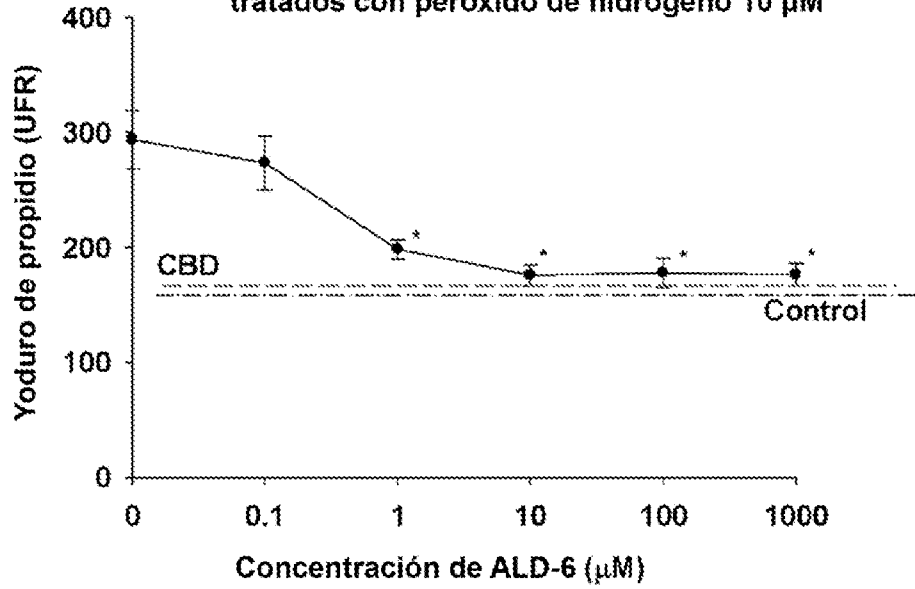


Figura 39

Análisis logístico para CE50

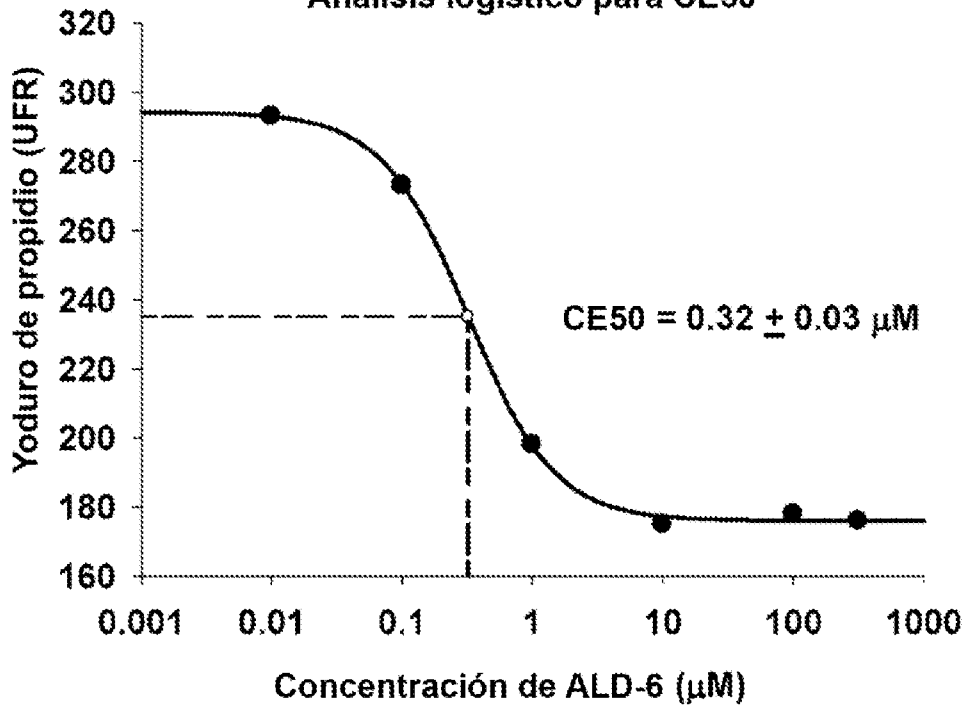


Figura 40

Efecto de ALD-5 en viabilidad neuronal en cultivos de hipocampo tratados con peróxido de hidrógeno 10 μM

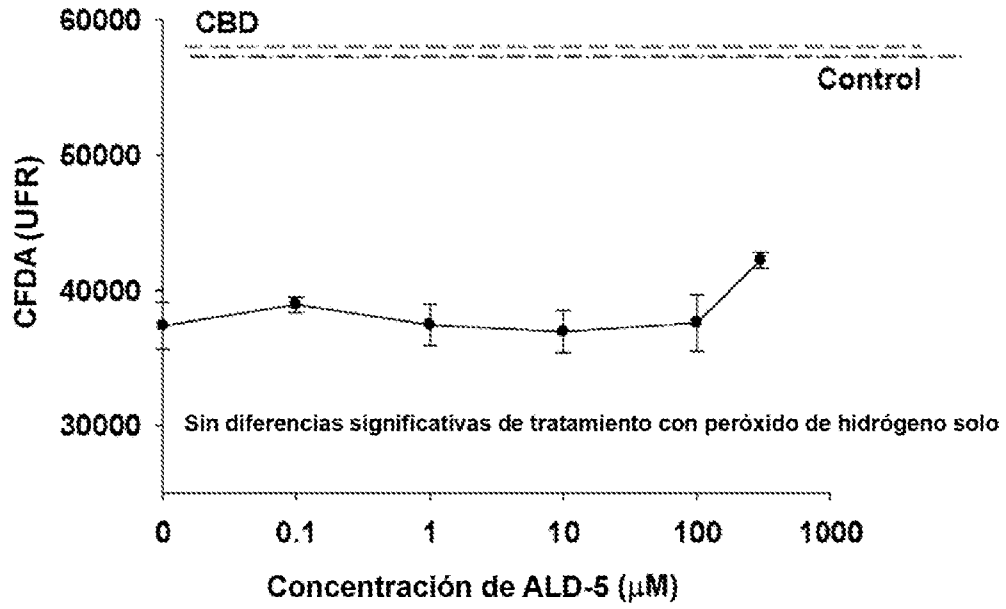


Figura 41

Efecto de ALD-5 en muerte celular en cultivos de hipocampo tratados con peróxido de hidrógeno 10 μM

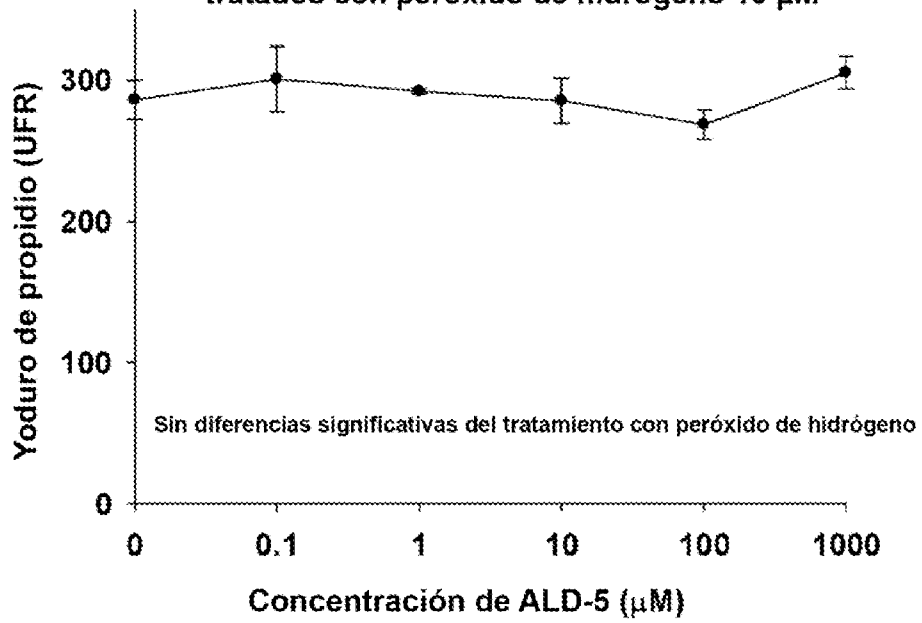


Figura 42

Efecto de ALD-2 en viabilidad neuronal en cultivos de hipocampo tratados con peróxido de hidrógeno 10 μM

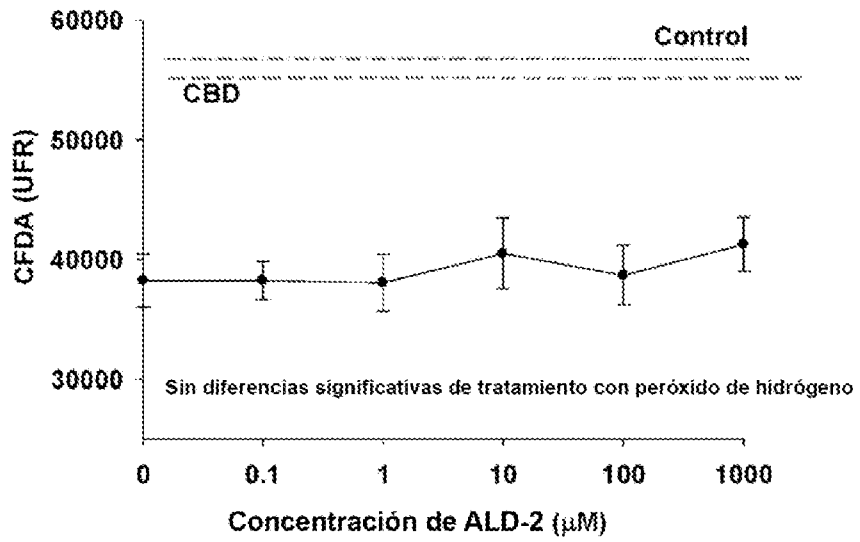
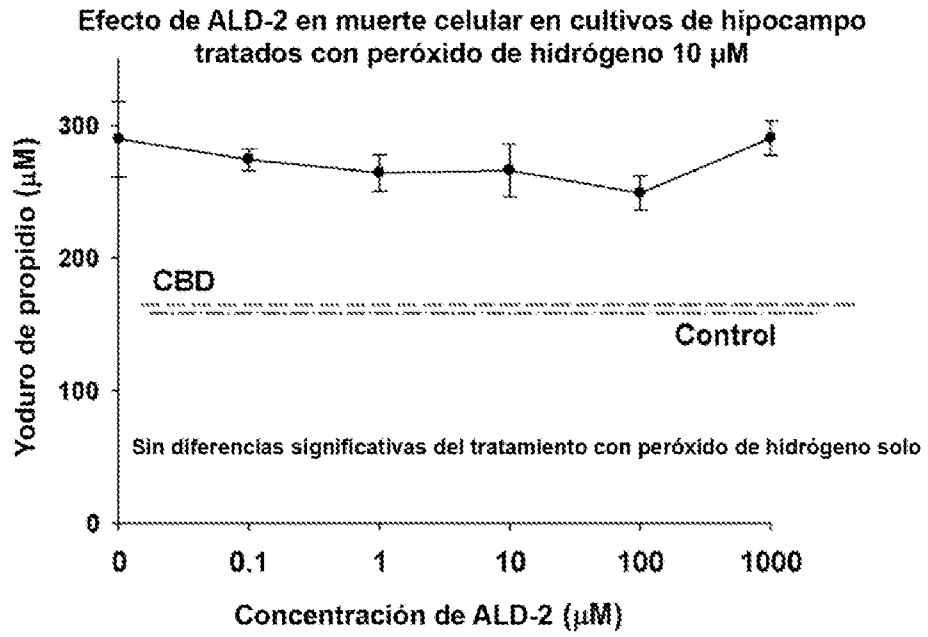


Figura 43



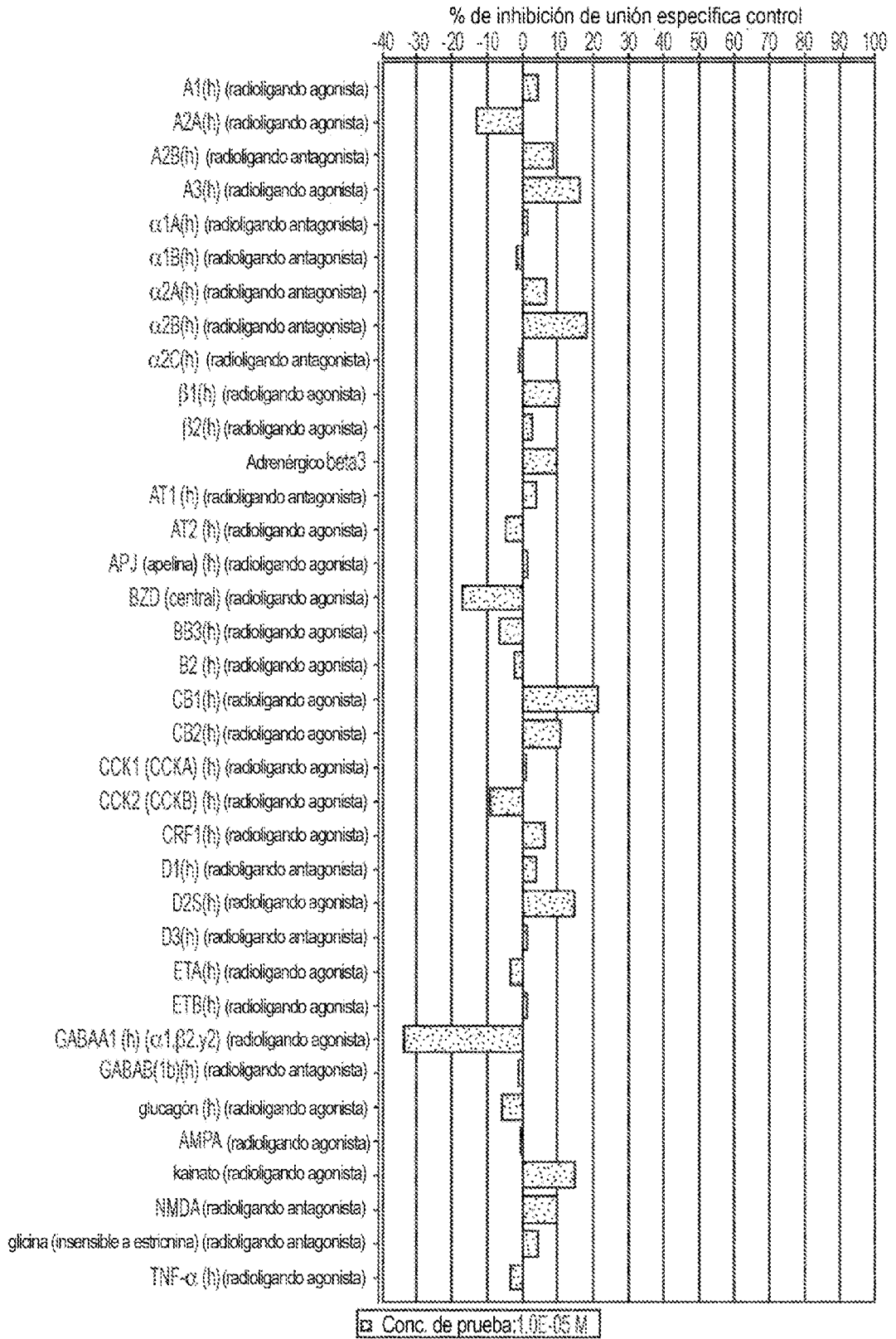


Figura 44

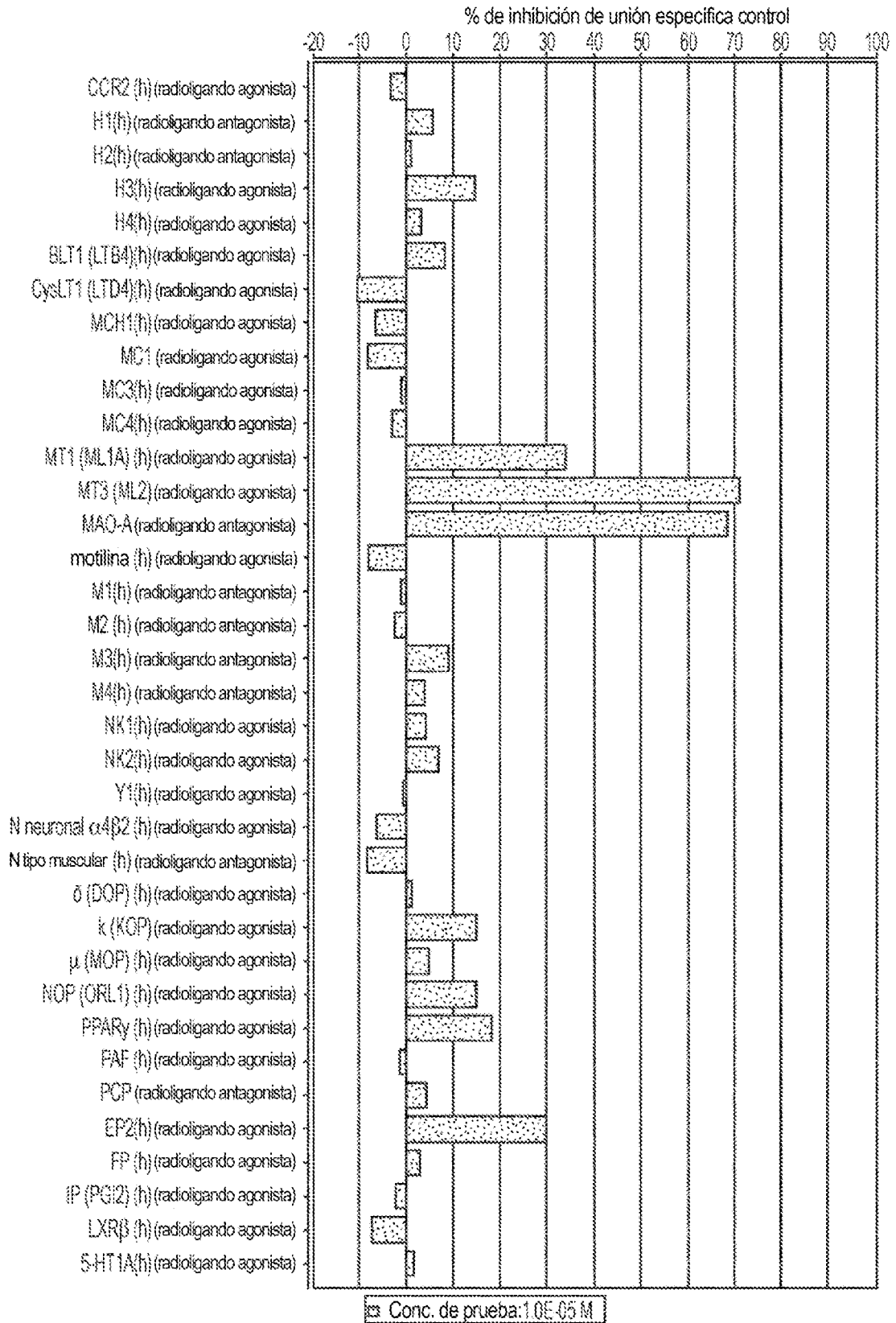


Figura 45

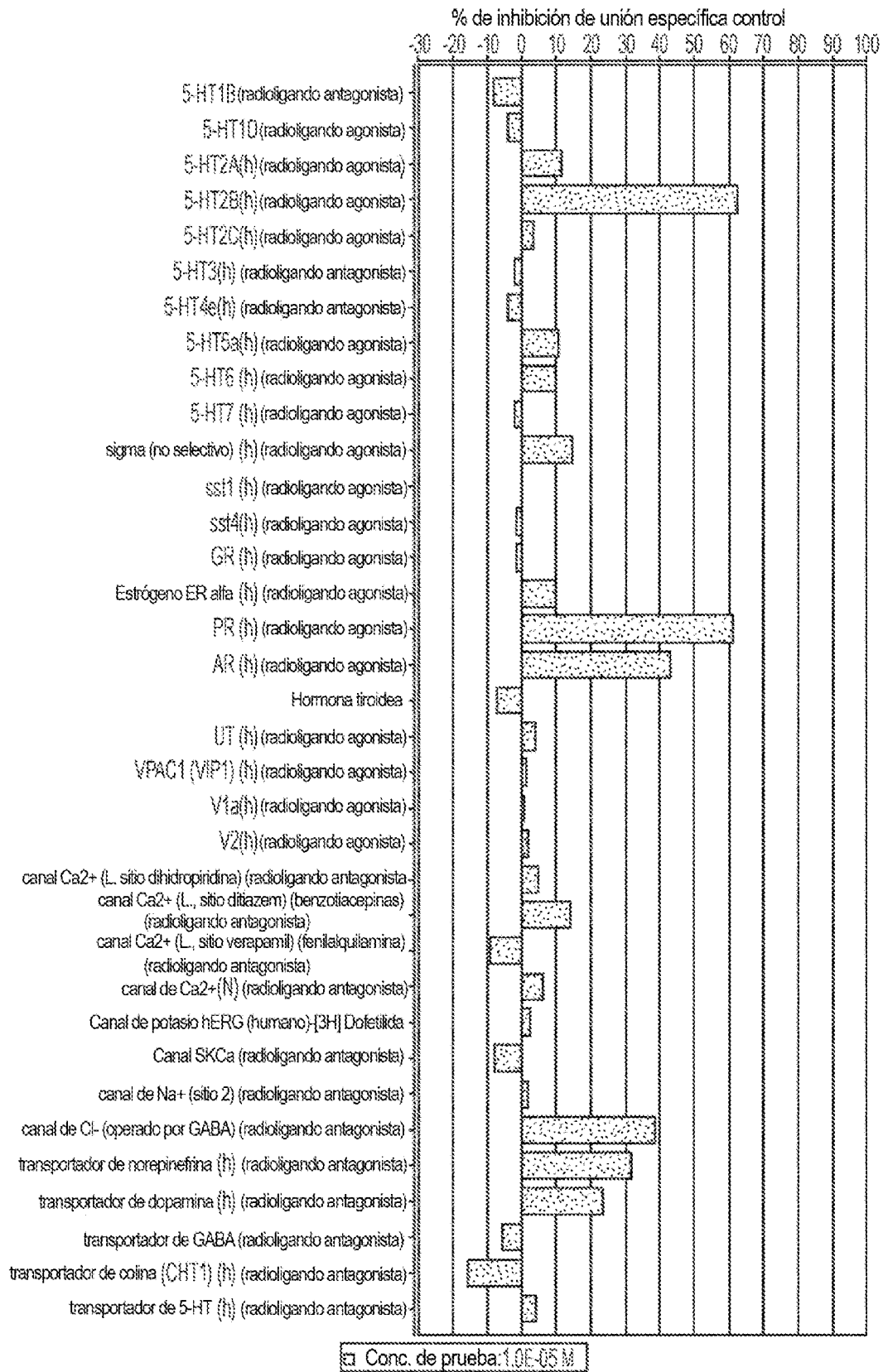


Figura 46

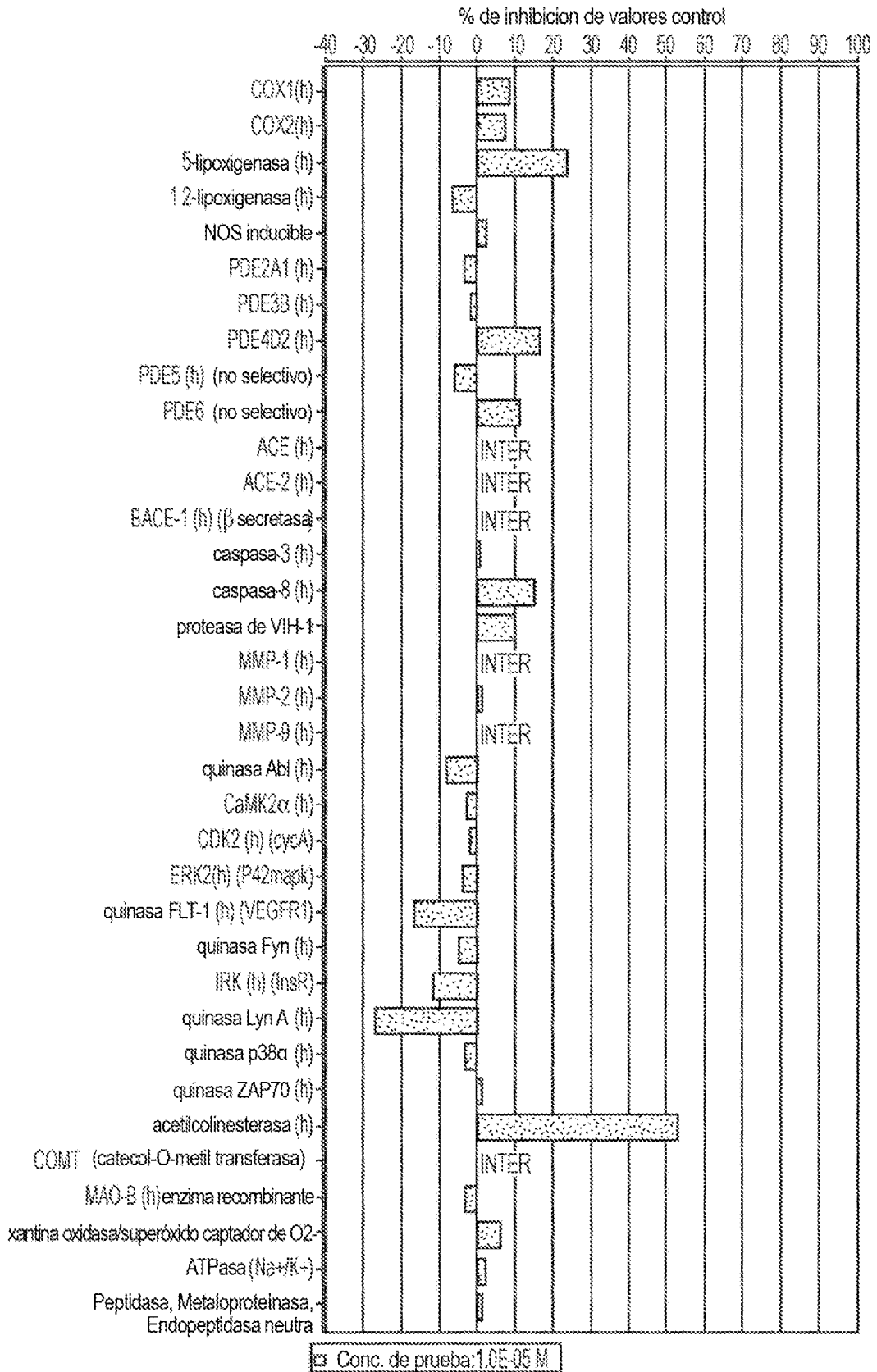


Figura 47