

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 015 717**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4439 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2017** **PCT/US2017/050331**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2018** **WO18048942**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2017** **E 17849478 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2025** **EP 3509594**

54 Título: **Un inhibidor de homólogo 2 de lisil oxidasa para su uso en el tratamiento de la mielofibrosis**

30 Prioridad:

07.09.2016 US 201662384542 P

22.05.2017 US 201762509460 P

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

07.05.2025

73 Titular/es:

PHARMAKEA, INC. (100.00%)
3030 Bunker Hill Street Suite 300
San Diego, California 92109, US

72 Inventor/es:

BAIN, GRETCHEN;
EVANS, JILLIAN FRANCES;
MACKENNA, DEIDRE A. y
HUTCHINSON, JOHN HOWARD

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 3 015 717 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

Un inhibidor de homólogo 2 de lisil oxidasa para su uso en el tratamiento de la mielofibrosis

Campo de la invención

- 5 En el presente documento se describen procedimientos de uso de un inhibidor de homólogo 2 de lisil oxidasa (LOXL2) en el tratamiento o la prevención de afecciones, enfermedades o trastornos asociados con la actividad de LOXL2.

Antecedentes de la invención

- 10 El homólogo 2 de lisil oxidasa (LOXL2) es una enzima amina oxidasa que cataliza el entrecruzamiento de las proteínas de la matriz extracelular. LOXL2 también participa en procesos intracelulares como la mediación de la transición epitelial a mesenquimal de las células. La señalización LOXL2 está implicada, por ejemplo, en enfermedades fibróticas y cáncer. Existe una necesidad médica no satisfecha de terapias que podrían brindar beneficio a los pacientes con enfermedades fibróticas y cáncer.

- 15 Resumen de la invención Se describe en el presente documento el uso de un inhibidor de LOXL2 de molécula pequeña en el tratamiento de una enfermedad o afección en un mamífero que se beneficiaría de la inhibición o reducción de la actividad de LOXL2, en donde el inhibidor de LOXL2 de molécula pequeña es más selectivo para inhibir o unirse a LOXL2 que a LOX.

- 20 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad o afección en un mamífero que se beneficiaría de la inhibición o reducción de la actividad de LOXL2, en donde el compuesto es un inhibidor de LOXL2 de molécula pequeña que es al menos 100 veces más selectivo para inhibir o unirse a LOXL2 que para LOX;

en donde el inhibidor de LOXL2 de molécula pequeña es:

(*R,R*)-*trans*-3-((4-(aminometil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il)oxi)fenil)(3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y

- 25 en donde la enfermedad o afección es mielofibrosis secundaria.

En una realización (*R,R*)-*trans*-3-((4-(aminometil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il)oxi)fenil)(3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona se administra al mamífero como sal de mesilato.

En otra realización, la mielofibrosis es post policitemia vera o post mielofibrosis trombocitemia esencial.

En otra realización, el mamífero es un ser humano.

- 30 En algunas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable de (*R,R*)-*trans*-3-((4-(aminometil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il)oxi)fenil)(3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona se forma a partir de (*R,R*)-*trans*-3-((4-(aminometil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il)oxi)fenil)(3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona y un ácido seleccionado del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido metafosfórico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico; ácido 2,2-dicloroacético; ácido 2-hidroxietanosulfónico; ácido 2-oxoglutarico; ácido 4-acetamidobenzoico; ácido 4-aminosalicílico; ácido acético; ácido adípico; ácido (L) ascórbico; ácido (L) aspártico; ácido bencenosulfónico; ácido benzoico; ácido (+) alcanfórico; ácido (+) alcanfor-10-sulfónico; ácido cáprico (ácido decanoico); ácido caproico (ácido hexanoico); ácido caprílico (ácido octanoico); ácido carbónico; ácido cinámico; ácido cítrico; ácido ciclámico; ácido dodecilsulfónico; ácido etano-1,2-disulfónico; ácido etanosulfónico; ácido fórmico; ácido fumárico; ácido galactárico; ácido gentísico; ácido (D) glucoheptónico; ácido (D) glucónico; ácido (D) glucurónico; ácido glutámico; ácido glutárico; ácido glicerofosfórico; ácido glicólico; ácido hipúrico; ácido isobutírico; ácido (DL) láctico; ácido lactobiónico; ácido láurico; ácido maleico; ácido (- L) málico; ácido malónico; ácido (DL) mandélico; ácido metanosulfónico; fumarato de monometilo, ácido naftaleno-1,5-disulfónico; ácido naftaleno-2-sulfónico; ácido nicotínico; ácido oleico; ácido oxálico; ácido palmítico; ácido pamoico; ácido fosfórico; ácido propiónico; ácido (- L) piroglutámico; ácido salicílico; ácido sebáico; ácido esteárico; ácido succínico; ácido sulfúrico; ácido (+ L) tartárico; ácido tiocianico; ácido (p) toluenosulfónico; y ácido undecilénico. En algunas realizaciones, la (*R,R*)-*trans*-3-((4-(aminometil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il)oxi)fenil)(3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona se utiliza como sal de mesilato, sal de clorhidrato, sal de sulfato, sal de maleato, sal de fosfato, sal de L-tartrato, sal de fumarato, sal de succinato, sal de citrato o sal de acetato. En algunas realizaciones, la (*R,R*)-*trans*-3-((4-(aminometil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il)oxi)fenil)(3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona se utiliza como sal de mesilato.
- 50

En algunas realizaciones, se utiliza la sal de clorhidrato de (*R,R*)-*trans*-3-((4-(aminometil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il)oxi)fenil)(3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona. En algunas realizaciones, se utiliza

la sal de mesilato de (*R,R*)-*trans*-3-((4-(aminometil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il)oxi)fenil(3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona.

En el presente documento se describe el compuesto (*R,R*)-*trans*-3-((4-(aminometil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il)oxi)fenil(3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona (Compuesto I), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones se utiliza la sal de clorhidrato del Compuesto I (es decir, el Compuesto 1). En algunas realizaciones, se utiliza la sal de mesilato del Compuesto I (es decir, el Compuesto 2). Otros objetivos, rasgos y ventajas de los compuestos, procedimientos y composiciones descritos en el presente documento se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra las puntuaciones de Ashcroft derivadas de los análisis de histopatología de secciones de pulmón teñidas con tricromo, y que reflejan la fibrosis pulmonar en un estudio de respuesta a la dosis profiláctica de 14 días de Rac-1, en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratón (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001). Los datos muestran que Rac-1 redujo la fibrosis de manera relacionada con la dosis y que 30 mg/kg una vez al día es la dosis mínima para lograr la máxima eficacia antifibrótica. (No es parte de la presente invención).

La Figura 2 muestra las puntuaciones de Ashcroft derivadas de los análisis de histopatología de secciones de pulmón teñidas con tricromo en un modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratón. Los compuestos 1, Rac-1, y Ent-1 fueron dosificados a 60 mpk QD una vez al día tanto en modo profiláctico (Pro) como terapéutico (Ther) (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.0001). (No es parte de la presente invención).

La Figura 3 muestra las puntuaciones de Ashcroft de los análisis de histopatología que reflejan fibrosis pulmonar en un estudio de recuperación de 28 días donde se administró el Compuesto 1 a 60 mg/kg una vez al día a partir del Día 14 después de la administración de bleomicina. (No es parte de la presente invención).

La Figura 4 muestra la puntuación de Ashcroft a partir de los análisis de histopatología que reflejan fibrosis pulmonar en un estudio profiláctico de 14 días que compara dosificaciones de 60 mg/kg una vez al día, 60 mg/kg cada 2 días y 60 mg/kg cada 3 días del compuesto Rac-1, en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones (**p* < 0.01; *****p* < 0.0001). (No es parte de la presente invención).

La Figura 5 muestra la puntuación de Ashcroft a partir de los análisis de histopatología que reflejan fibrosis pulmonar en un estudio profiláctico de 14 días que compara 60 mg/kg una vez al día del Compuesto 1 con 30 mg/kg de rAB0023, un anticuerpo contra LOXL2. (No es parte de la presente invención).

La Figura 6a muestra puntuaciones de esclerosis glomerular (izquierda) y fibrosis intersticial (derecha) que reflejan fibrosis renal en el modelo de ratón deficiente en Col4A3 del síndrome de Alport y enfermedad renal crónica. Las muestras se extrajeron a las 7 semanas de edad, después de la administración oral del Compuesto 1 a 30 mg/kg una vez al día a partir de las 2 semanas o 5 semanas de edad (***p* < 0.01). (No es parte de la presente invención).

La Figura 6b muestra el volumen del tumor en un modelo de cáncer de mama humano ortotópico con células MDA-MB-435-GFP implantadas en almohadillas de grasa mamaria de ratones desnudos. Los volúmenes tumorales se midieron semanalmente durante el estudio de 4 semanas (****p* < 0.001, *****p* < 0.0001). (No es parte de la presente invención).

La Figura 7 muestra la fracción del área de colágeno en ratones Mdr2KO medida por el porcentaje de tinción hepática positiva con rojo picosirio. Los ratones fueron tratados por vía oral con el Compuesto 1 a 30 o 60 mg/kg una vez al día a partir de las 6 semanas de edad. Las muestras se extrajeron a las 12 semanas de edad. (No es parte de la presente invención).

La Figura 8 muestra la fracción del área de colágeno en el modelo de fibrosis hepática inducida por tioacetimida (TAA) en ratones. Los ratones fueron tratados por vía oral con el Compuesto 1 a 30 mg/kg una vez al día comenzando 3 o 6 semanas después del inicio del TAA. Las muestras se extrajeron 12 semanas después del inicio del TAA. (No es parte de la presente invención).

Figura 9 muestra concentraciones plasmáticas de LOXL2 medidas en sujetos masculinos y femeninos sanos y pacientes con esclerodermia (n=10 cada uno) medidas utilizando un inhibidor de LOXL2 marcado con biotina y un ensayo de propietario basado en Erenna® (**p*=0.04 prueba t no emparejada de SSc (femenino) frente a Sanas (femenino)).

Descripción detallada de la invención

El homólogo 2 de lisil oxidasa (LOXL2) es un miembro de la familia de la lisil oxidasa (LOX), que comprende Cu²⁺ y amina oxidasas dependientes de lisina tirosilquinona (LTQ). La familia comprende cinco genes: *lox* (LOX), *lox1* (homólogo 1 de lisil oxidasa, LOXL1), *lox2* (LOXL2), *lox3* (homólogo 3 de lisil oxidasa, LOXL3), y

lox14 (homólogo 4 de lisil oxidasa, LOXL4). La familia LOX es conocida por catalizar la desaminación oxidativa del grupo ε-amino de las lisinas e hidroxilisinas en el colágeno y la elastina para promover el entrecruzamiento de estas moléculas. El entrecruzamiento del colágeno y la elastina es esencial para mantener la fuerza de tracción de la matriz extracelular.

- 5 El desarrollo del estroma patológico juega un papel importante en la enfermedad. El estroma patológico está compuesto de células estromales activadas, matriz colágena, factores de crecimiento y estructuras angiogénicas. Durante afecciones patológicas como la fibrogénesis, los fibroblastos se reclutan y activan, lo que da como resultado la generación de un microambiente que fomenta una mayor síntesis y deposición de proteínas de la matriz extracelular, lo que conduce al desarrollo de fibrosis.
- 10 La activación de fibroblasto asociada a la enfermedad en la enfermedad fibrótica y el cáncer, da como resultado una remodelación de la matriz extracelular, que en última instancia conduce a una deposición excesiva de proteínas de la matriz extracelular, incluyendo el colágeno I y III, un aumento del entrecruzamiento del colágeno recién depositado y una mayor rigidez del tejido. Además, los fibroblastos activados expresan numerosos factores de crecimiento y citoquinas proangiogénicas, provascurológicas y proproliferativas, tales como el factor beta (TGF-β) de crecimiento transformante, el factor (CTGF) de crecimiento del tejido conectivo, el factor 1 (SDF-1) derivado de células del estroma y el factor (VEGF) de crecimiento endotelial vascular, desempeñando así papeles importantes en la señalización paracrina en la progresión de la enfermedad. Interrumpir el desarrollo de este estroma patológico mediante la inhibición de la activación y el reclutamiento de fibroblasto y/o sus vías de señalización, representa una nueva estrategia terapéutica en la enfermedad fibrótica.
- 20 A pesar de tener una actividad catalítica similar, se ha reportado que cada enzima lisil oxidasa tiene una expresión y actividades funcionales únicas. La LOXL2 juega un papel central en el desarrollo del estroma patológico en enfermedades fibróticas, al activar y reclutar fibroblastos al sitio patológico.

- Se ha demostrado que LOXL2 tiene funciones intracelulares, además de su papel en la remodelación de la matriz extracelular. El LOXL2 regula positivamente el transductor de transición (EMT) epitelial a mesenquimal, Snail1, al promover la estabilidad y la actividad funcional de Snail1. El LOXL2 contribuye positivamente a la activación de la vía de señalización de la quinasa (FAK) de adhesión focal y participa en la organización de complejos de adhesión focal. El silenciamiento del gen *LOXL2* conduce a la readquisición de la polaridad de la célula epitelial y disminuye la capacidad migratoria e invasiva de las líneas celulares mamarias. Se ha reportado que la modulación de la adhesión celular y la polaridad celular están mediadas por LOXL2 intracelular. El LOXL2 reprime transcripcionalmente la E-cadherina, así como los genes de unión estrecha y de polaridad celular, mediante mecanismos dependientes de Snail 1 e independientes de Snail 1. Más recientemente se ha descrito que LOXL2 está asociado con la cromatina y se ha informado que está involucrado en la desaminación del trimetil histona H3, una función que depende del dominio catalítico de LOXL2.

Mielofibrosis

- 35 En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es o está asociada con mielofibrosis. Los procesos patogénicos en la mielofibrosis primaria implican una mieloproliferación clonal primaria, ponderada por megacariocitos y una reacción estromal paraneoplásica que incluye fibrosis de la médula ósea, osteosclerosis, angiogénesis y hematopoyesis extramedular. La reacción de la médula ósea incluye un depósito excesivo de proteínas de la matriz extracelular como el colágeno fibrilar, hipocelularidad, activación y reclutamiento de fibroblastos de la médula ósea, producción excesiva de citoquinas y factor de crecimiento y otros cambios que resultan en una reducción de la capacidad hematopoyética. La mielofibrosis secundaria puede ser resultado de policitemia rubra vera o trombocitosis esencial.
- 40

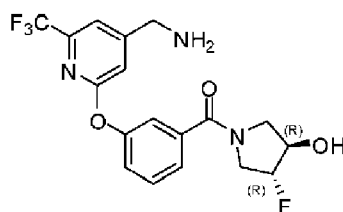
En algunas realizaciones, se divulga en el presente documento el uso del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el tratamiento de la mielofibrosis.

- 45 En algunas realizaciones, se describe en el presente documento el uso del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el tratamiento de la mielofibrosis primaria, posterior a policitemia vera o posterior a trombocitemia esencial. En algunas realizaciones, el tratamiento incluye reducción en la puntuación de fibrosis de la médula ósea, mejoría clínica, remisión parcial o remisión completa.

- 50 En algunas realizaciones, el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se usa solo o en combinación con ruxolitinib.

(*R,R*)-*trans*-(3-((4-(Aminometil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il)oxi)fenil)(3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona (Compuesto I)

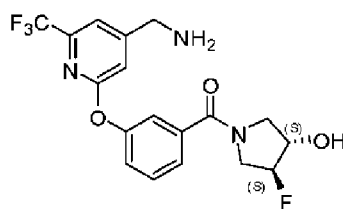
- El "Compuesto I" o "(*R,R*)-*trans*-(3-((4-(aminometil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il)oxi)fenil)(3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona" o "(3-((4-(aminometil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il)oxi)fenil)(3*R*,4*R*)-3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona", o cualquier otro nombre similar se refiere al compuesto con la siguiente estructura:
- 55



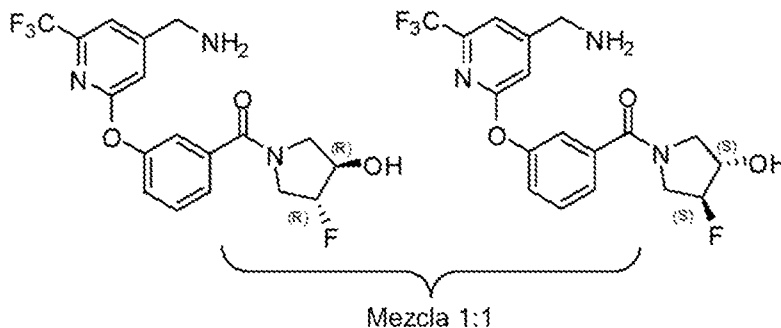
El Compuesto I está sustancialmente libre del isómero (S,S) (es decir, el Compuesto I está sustancialmente libre de "(S,S)-*trans*-3-((4-(aminometil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il)oxi)fenil)(3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona" o "(3-((4-(aminometil)-6-(trifluorometil)-piridin-2-il)oxi)fenil)(3S,4S)-3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona", o cualquier otro nombre similar).

"Sustancialmente libre" respecto a un enantiómero, significa que el enantiómero referenciado no está presente o hay menos del 5%, menos del 4%, menos del 3%, menos del 2% o menos del 1% del enantiómero referenciado.

El "Compuesto Ent-I" o "(S,S)-*trans*-3-((4-(aminometil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il)oxi)fenil)(3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona" o "(3-((4-(aminometil)-6-(trifluorometil)-piridin-2-il)oxi)fenil)(3S,4S)-3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona", o cualquier otro nombre similar se refiere al compuesto con la siguiente estructura:



El Compuesto I racémico (Compuesto Rac-I) se representa como sigue:



El Compuesto I es un potente inhibidor de LOXL2 basado en el mecanismo. El Compuesto I es un inhibidor de LOXL2 de molécula pequeña, irreversible, selectivo y de alta afinidad.

Típicamente, el Compuesto I inhibe y/o se une específicamente a LOXL2. Típicamente, el Compuesto I no inhibe y/o se une sustancialmente a ninguna otra lisil oxidasa. Otras lisil oxidasas incluyen LOX, LOXL1, LOXL3 y LOXL4. Típicamente, el Compuesto I es específico para LOXL2. Típicamente, el Compuesto I inhibe la actividad de LOXL2 y no inhibe sustancialmente la actividad de LOX. Típicamente, el Compuesto I inhibe la actividad de LOXL2 y no inhibe sustancialmente la actividad de otra proteína similar a la lisil oxidasa.

Como se utiliza en el presente documento, "inhibidor selectivo de LOXL2" se refiere a un inhibidor de molécula pequeña de LOXL2 que no inhibe y/o se une sustancialmente a ninguna otra lisil oxidasa. Otras lisil oxidasas incluyen LOX, LOXL1, LOXL3 y LOXL4. Típicamente, un inhibidor selectivo de LOXL2 no inhibe y/o se une sustancialmente a LOX o LOXL3.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" en referencia al Compuesto I se refiere a una sal del Compuesto I, que no causa irritación significativa a un mamífero al que se administra y no anula sustancialmente la actividad biológica y las propiedades del compuesto. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use. International Union of Pure and Applied Chemistry, Wiley-VCH 2002. S.M. Berge, L.D. Bighley, D.C. Monkhouse, J. Pharm. Sci. 1977, 66, 1-19. P. H. Stahl and C. G. Wermuth, editores, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, Weinheim/Zürich:Wiley-VCH/VHCA, 2002. Las sales

farmacéuticas son típicamente más solubles y se disuelven más rápidamente en los jugos estomacales e intestinales que las especies no iónicas y, por lo tanto, son útiles en formas de dosificación sólidas. Además, debido a que su solubilidad frecuentemente es una función del pH, es posible la disolución selectiva en una u otra parte del tracto digestivo y esta capacidad puede manipularse como un aspecto de los comportamientos de liberación retardada y sostenida. Además, debido a que la molécula formadora de sal puede estar en equilibrio con una forma neutra, se puede ajustar el paso a través de las membranas biológicas.

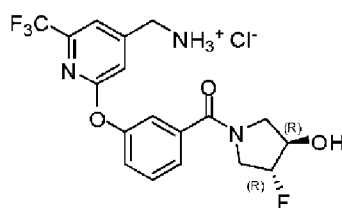
Debería entenderse que una referencia a una sal farmacéuticamente aceptable incluye las formas de adición de solvente (solvatos). Los solvatos contienen cantidades estequiométricas o no estequiométricas de un solvente y se forman durante el proceso de formación o aislamiento del producto con solventes farmacéuticamente aceptables como agua, etanol, metil terc-butil éter, isopropanol, acetonitrilo, heptano y similares. Los solvatos pueden formarse utilizando, pero sin limitarse a, solvente(s) de Clase 3. Las categorías de solventes se definen, por ejemplo, en la International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), "Impurities: Guidelines for Residual Solvents, Q3C(R3), (noviembre de 2005)). Los hidratos se forman cuando el solvente es agua, o los alcoholatos se forman cuando el solvente es alcohol. Típicamente, los solvatos del Compuesto I, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, se preparan o forman convenientemente durante los procesos de preparación del Compuesto I, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Además, el Compuesto I, o sus sales farmacéuticamente aceptables, existen en forma no solvatada. En algunas realizaciones, el Compuesto I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, está hidratado.

Se forma una amplia variedad de sales farmacéuticamente aceptables a partir del Compuesto I, e incluyen:

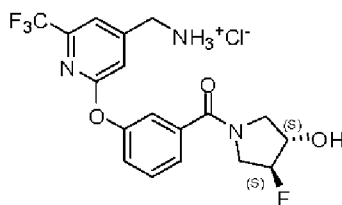
- sales formadas cuando el Compuesto I (es decir, la forma de base libre) se trata con un ácido inorgánico. Los ácidos inorgánicos incluyen, pero no se limitan a, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y ácido metafosfórico;

- sales formadas cuando el Compuesto I (es decir, la forma de base libre) se trata con un ácido orgánico. Los ácidos orgánicos incluyen, pero no se limitan a, ácido 1-hidroxi-2-naftoico; ácido 2,2-dicloroacético; ácido 2-hidroxietanosulfónico; ácido 2-oxoglutarico; ácido 4-acetamidobenzoico; ácido 4-aminosalicílico; ácido acético; ácido adípico; ácido (L) ascórbico; ácido (L) aspártico; ácido benenosulfónico; ácido benzoico; ácido (+) alcanfórico; ácido (+) alcanfor-10-sulfónico; ácido cáprico (ácido decanoico); ácido caproico (ácido hexanoico); ácido caprílico (ácido octanoico); ácido carbónico; ácido cinámico; ácido cítrico; ácido ciclámico; ácido dodecilsulfónico; ácido etano-1,2-disulfónico; ácido etanosulfónico; ácido fórmico; ácido fumárico; ácido galactárico; ácido gentísico; ácido (D) glucoheptónico; ácido (D) glucónico; ácido (D) glucurónico; ácido glutámico; ácido glutárico; ácido glicerofosfórico; ácido glicólico; ácido hipúrico; ácido isobutírico; ácido(DL) láctico; ácido lactobiónico; ácido láurico; ácido maleico; ácido (- L) málico; ácido malónico; ácido (DL) mandélico; ácido metanosulfónico; fumarato de monometilo; ácido naftaleno-1,5-disulfónico; ácido naftaleno-2-sulfónico; ácido nicotínico; ácido oleico; ácido oxálico; ácido palmítico; ácido pamoico; ácido fosfórico; ácido propiónico; ácido (- L) piroglutámico; ácido salicílico; ácido sebácico; ácido esteárico; ácido succínico; ácido sulfúrico; ácido (+ L) tartárico; ácido tiocianico; ácido (p) toluenosulfónico; y ácido undecilénico.

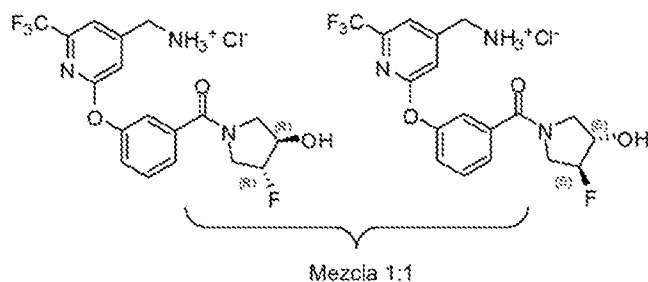
En cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, se utiliza la sal de clorhidrato del Compuesto I, o su solvato. El Compuesto I, sal de clorhidrato (es decir, Compuesto 1), tiene la siguiente estructura:



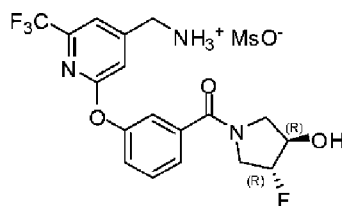
El enantiómero (S,S) del Compuesto 1 (Compuesto Ent-1) tiene la siguiente estructura:



El compuesto racémico 1 (compuesto Rac-1) se representa como sigue:

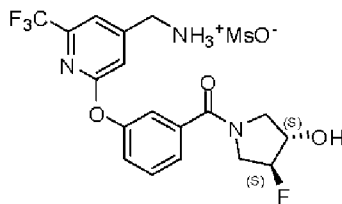


En cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, se utiliza la sal de ácido metanosulfónico del Compuesto I, o solvato del mismo. El metanosulfonato del Compuesto I (Compuesto 2), o sal de mesilato del Compuesto I, o cualquier otro nombre similar, tiene la siguiente estructura:

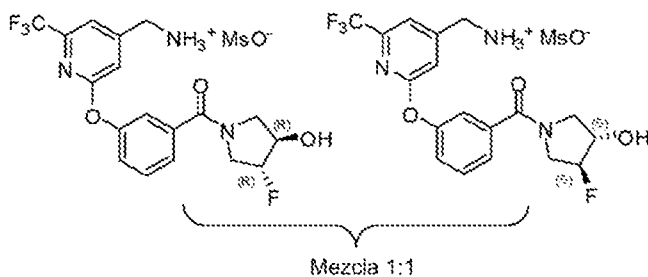


5

El enantiómero (S,S) del Compuesto 2 (compuesto Ent-2) tiene la siguiente estructura:



El Compuesto racémico 2 (Compuesto Rac-2) se representa como sigue:



10 El Compuesto I descrito en el presente documento puede prepararse como una sal de cloruro, sal de sulfato, sal de bromuro, sal de mesilato, sal de maleato, sal de citrato o sal de fosfato. El Compuesto I descrito en el presente documento puede prepararse como una sal de clorhidrato. Típicamente, un Compuesto I descrito en el presente documento se prepara como una sal de mesilato.

15 Debería entenderse que una referencia a una sal farmacéuticamente aceptable incluye las formas de adición de solvente. En algunas realizaciones, los solvatos contienen cantidades estequiométricas o no estequiométricas de un solvente y se forman durante el proceso de cristalización con solventes farmacéuticamente aceptables como agua, etanol y similares. Los hidratos se forman cuando el solvente es agua, o los alcoholatos se forman cuando el solvente es alcohol. Los solvatos de los compuestos descritos en el presente documento se preparan o forman convenientemente durante los procesos descritos en el presente documento. Además, los compuestos proporcionados en el presente documento existen opcionalmente en formas no solvatadas y solvatadas.

25 En cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, se utiliza el Compuesto I amorfo. En cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, se utiliza el Compuesto I cristalino. En cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, se utiliza el Compuesto I parcialmente cristalino.

En algunas realizaciones, en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, el Compuesto I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se reemplaza con un análogo deuterado del Compuesto I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, el Compuesto I está marcado isotópicamente, donde uno o más átomos son reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o un número de masa diferente de la masa atómica o el número de masa que usualmente se encuentran en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar a los presentes compuestos incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor y cloro, tales como, por ejemplo, ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl .

Un "metabolito" de un compuesto divulgado en el presente documento (dicho metabolito no es parte de la invención) es un derivado de ese compuesto que se forma cuando el compuesto se metaboliza. El término "metabolito activo" se refiere a un derivado biológicamente activo de un compuesto, que se forma cuando el compuesto se metaboliza. El término "metabolizado", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la suma de los procesos (incluyendo, pero sin limitarse a, las reacciones de hidrólisis y las reacciones catalizadas por enzimas) mediante los cuales un organismo modifica una sustancia particular. Por tanto, las enzimas pueden producir alteraciones estructurales específicas en un compuesto. Por ejemplo, el citocromo P450 cataliza una variedad de reacciones oxidativas y reductoras, mientras que las uridina difosfato glucuroniltransferasas catalizan la transferencia de una molécula de ácido glucurónico activado a alcoholes aromáticos, alcoholes alifáticos, ácidos carboxílicos, aminas y grupos sulfhidrilo libres. Los metabolitos de los compuestos divulgados en el presente documento se identifican opcionalmente mediante la administración de los compuestos a un anfitrión y el análisis de muestras de tejido del anfitrión, o mediante la incubación de los compuestos con células hepáticas in vitro y el análisis de los compuestos resultantes.

Cierta Terminología

A menos que se indique de otro modo, los siguientes términos utilizados en esta solicitud tienen las definiciones que se dan a continuación. El uso del término "incluyendo", así como otras formas, como "incluir", "incluye" e "incluyendo", no es limitante. Los títulos de las secciones utilizadas en el presente documento son sólo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes del tema descrito.

El término "aceptable" respecto a una formulación, composición o ingrediente, como se utiliza en el presente documento, significa que no tiene ningún efecto perjudicial persistente sobre la salud general del sujeto que está siendo tratado.

El término "modular", como se utiliza en el presente documento, significa interactuar con un objetivo, ya sea directa o indirectamente, para alterar la actividad del objetivo, incluyendo, sólo a modo de ejemplo, mejorar la actividad del objetivo, inhibir la actividad del objetivo, limitar la actividad del objetivo o extender la actividad del objetivo.

El término "modulador", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula que interactúa con un objetivo ya sea directa o indirectamente. Las interacciones incluyen, pero no se limitan a, las interacciones de un agonista, agonista parcial, un agonista inverso, antagonista, degradador o combinaciones de los mismos. Un modulador puede ser un antagonista. Un modulador puede ser un degradador.

Los términos "administrar", "administrando", "administración" y similares, como se utilizan en el presente documento, se refieren a los procedimientos que pueden utilizarse para permitir la entrega de compuestos o composiciones al sitio deseado de acción biológica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, vías orales, vías intraduodenales, inyección parenteral (incluyendo intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravascular o infusión), administración tópica y rectal. Los expertos en la técnica están familiarizados con las técnicas de administración que pueden emplearse con los compuestos y procedimientos descritos en el presente documento.

Los términos "coadministración" o similares, como se utilizan en el presente documento, pretenden abarcar la administración de los agentes terapéuticos seleccionados a un solo paciente, y pretenden incluir regímenes de tratamiento en los que los agentes se administran por la misma o diferente vía de administración o al mismo tiempo o en momentos diferentes.

Los términos "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva", como se utilizan en el presente documento, se refieren a una cantidad suficiente de un agente o un compuesto que se está administrando, que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad o afección que se está tratando. El resultado incluye la reducción y/o alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Por ejemplo, una "cantidad efectiva" para usos terapéuticos es la cantidad de la composición que comprende un compuesto como se describe en el presente documento necesaria para proporcionar una disminución clínicamente significativa de los síntomas de la enfermedad. Una cantidad "efectiva" apropiada para cualquier caso individual se determina opcionalmente utilizando técnicas como un estudio de aumento de dosis.

Los términos "aumentar" o "aumentando", como se utilizan en el presente documento, significan incrementar o prolongar, ya sea en potencia o duración, un efecto deseado. Así, en relación con el aumento del efecto de los agentes terapéuticos, el término "aumentar" se refiere a la capacidad de incrementar o prolongar, ya sea en potencia o duración, el efecto de otros agentes terapéuticos en un sistema. Una "cantidad efectiva de aumento", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una cantidad adecuada para aumentar el efecto de otro agente terapéutico en un sistema deseado.

El término "combinación farmacéutica", tal como se utiliza en el presente documento, significa un producto que resulta de la mezcla o combinación de más de un ingrediente activo, e incluye combinaciones fijas y no fijas de los ingredientes activos. El término "combinación fija" significa que los ingredientes activos, por ejemplo, un compuesto descrito en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un coagente, se administran ambos a un paciente simultáneamente en forma de una entidad o dosificación únicas. El término "combinación no fija" significa que los ingredientes activos, por ejemplo, un compuesto descrito en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un coagente, se administran a un paciente como entidades separadas, ya sea de manera simultánea, concurrente o secuencial sin límites de tiempo intermedios específicos, en donde dicha administración proporciona niveles efectivos de los dos compuestos en el cuerpo del paciente. Esto último también se aplica a la terapia de cóctel, es decir, la administración de tres o más ingredientes activos.

Los términos "kit" y "artículo de fabricación" se utilizan como sinónimos.

El término "sujeto" o "paciente" engloba a los mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, cualquier miembro de la clase Mamíferos: humanos, primates no humanos como chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja como ganado, caballos, ovejas, cabras, cerdos; animales domésticos como conejos, perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores, como ratas, ratones y conejillos de indias, y similares. En un aspecto, el mamífero es un humano.

Los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento", como se utilizan en el presente documento, incluyen aliviar, disminuir o mejorar al menos un síntoma de una enfermedad o afección, prevenir síntomas adicionales, inhibir la enfermedad o afección, por ejemplo, detener el desarrollo de la enfermedad o afección, aliviar la enfermedad o afección, causar la regresión de la enfermedad o afección, aliviar una condición causada por la enfermedad o afección, o detener los síntomas de la enfermedad o afección ya sea de manera profiláctica y/o terapéutica.

Composiciones farmacéuticas

Los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse en composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas se formulan de manera convencional utilizando uno o más ingredientes inactivos farmacéuticamente aceptables que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se utilizan farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida. Un resumen de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se encuentra, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Décimo novena Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania 1975; Liberman, H.A. y Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York, N.Y., 1980; y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, séptima ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999), incorporados en el presente documento como referencia para dicha divulgación.

Típicamente, los compuestos descritos en el presente documento se administran solos o en combinación con vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables, en una composición farmacéutica. La administración de los compuestos y composiciones descritos en el presente documento se puede efectuar mediante cualquier procedimiento que permita la entrega de los compuestos al sitio de acción. Estos procedimientos incluyen, aunque no se limitan a, la entrega por vías enterales (incluyendo sonda de alimentación oral, gástrica o duodenal, supositorio rectal y enema rectal), vías parenterales (inyección o infusión, incluyendo intraarterial, intracardiaca, intradérmica, intraduodenal, intramedular, intramuscular, intraósea, intraperitoneal, intratecal, intravascular, intravenosa, intravítrea, epidural y subcutánea), administración por inhalación, transdérmica, transmucosa, sublingual, bucal y tópica (incluyendo epicutánea, dérmica, enema, gotas para los ojos, gotas para los oídos, intranasal, vaginal), aunque la vía más adecuada puede depender, por ejemplo, de la afección y el trastorno del receptor. Sólo a modo de ejemplo, los compuestos descritos en el presente documento se pueden administrar localmente en el área que necesita tratamiento, por ejemplo, mediante infusión local durante una cirugía, aplicación tópica como cremas o ungüentos, inyección, catéter o implante. La administración también puede realizarse mediante inyección directa en el sitio de un tejido u órgano enfermo.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, sobres o comprimidos, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite-en-agua o una emulsión líquida de agua-en-aceite. Algunas veces, el principio activo se presenta en forma de bolo, electuario o pasta.

Las composiciones farmacéuticas que se pueden utilizar por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un plastificante, como glicerol o sorbitol. Los comprimidos pueden fabricarse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos que están comprimidos se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada el ingrediente activo en una forma de flujo libre, tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con aglutinantes, diluyentes inertes o agentes lubricantes, tensioactivos o dispersantes. Los comprimidos moldeados se pueden fabricar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo, humedecido con un diluyente líquido inerte. Típicamente, los comprimidos están recubiertos o ranurados y están formulados de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del ingrediente activo que contienen. Todas las formulaciones para administración oral deberían estar en dosificaciones adecuadas para dicha administración. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los ingredientes activos mezclados con relleno tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Algunas veces se añaden estabilizantes. Los núcleos de grageas están provistos de recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden utilizar soluciones concentradas de azúcar, que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes o mezclas de solventes orgánicos adecuados. Se pueden añadir tintes o pigmentos a los recubrimientos de los comprimidos o Grageas, para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

Algunas veces, las composiciones farmacéuticas se formulan para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Las composiciones pueden presentarse en envases de dosis unitarias o multidosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en forma de polvo o en estado seco por congelación (liofilizado) requiriendo únicamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, solución salina o agua estéril libre de pirógenos, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas (oleosas) de los compuestos activos, que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Los solventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos tales como el aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumenten la solubilidad de los compuestos, para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Las composiciones farmacéuticas también pueden formularse como una preparación de depósito. Estas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

Para administración bucal o sublingual, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos, pastillas, grageas o geles formulados de manera convencional. Dichas composiciones pueden comprender el ingrediente activo en una base saborizada tal como sacarosa y acacia o tragacanto.

Las composiciones farmacéuticas también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao, polietilenglicol u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía tópica, es decir, mediante administración no sistémica. Esto incluye la aplicación de un compuesto de la presente invención externamente a la epidermis o la cavidad bucal y la instilación de dicho compuesto en el oído, el ojo y la nariz, de modo que el compuesto no entre significativamente en el torrente sanguíneo. Por el contrario, la administración sistémica se refiere a la administración oral, intravenosa, intraperitoneal e intramuscular.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semilíquidas adecuadas para la penetración a través de la piel hasta el sitio de la inflamación, tales como geles,

linimentos, lociones, cremas, ungüentos o pastas, y gotas adecuadas para la administración en el ojo, el oído o la nariz. El ingrediente activo puede comprender, para administración tópica, de 0.001% a 10% p/p, por ejemplo de 1% a 2% en peso de la formulación.

5 Las composiciones farmacéuticas para administración por inhalación son entregada convenientemente desde un insuflador, un nebulizador paquetes a presión u otros medios convenientes para administrar un atomizado en aerosol. Los paquetes a presión pueden comprender un propelente adecuado tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para entregar una cantidad medida. Alternativamente, para la administración por inhalación o insuflación, las preparaciones farmacéuticas pueden tomar la forma de una composición de polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada, tal como lactosa o almidón. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, cápsulas, cartuchos, gelatina o paquetes de ampollas, desde los cuales se puede administrar el polvo con la ayuda de un inhalador o insuflador.

15 Se debería entender que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, los compuestos y composiciones descritos en el presente documento pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, aquellos adecuados para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

Procedimientos de dosificación y regímenes de tratamiento

20 En una realización, el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se utiliza en la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades o afecciones en un mamífero que se beneficiaría de la inhibición o reducción de la actividad de LOXL2, en donde la enfermedad o afección es mielofibrosis secundaria. Los procedimientos para tratar la mielofibrosis secundaria descritos en el presente documento en un mamífero que necesita dicho tratamiento, implican la administración a dicho mamífero de composiciones farmacéuticas que incluyen el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en cantidades terapéuticamente efectivas.

25 En ciertas aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que ya padece una enfermedad o afección, en una cantidad suficiente para curar o detener al menos parcialmente al menos uno de los síntomas de la enfermedad o afección. Las cantidades efectivas para este uso dependen de la gravedad y el curso de la enfermedad o afección, la terapia previa, el estado de salud del paciente, el peso y la respuesta a los fármacos, y el criterio del médico tratante. Las cantidades terapéuticamente efectivas se determinan opcionalmente mediante procedimientos que incluyen, pero sin limitarse a, un ensayo clínico de aumento de dosis y/o de intervalo de dosis.

30 En aplicaciones profilácticas, se administran composiciones que contienen el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente susceptible o en riesgo de padecer una enfermedad, trastorno o afección particular. Esta cantidad se define como una "cantidad o dosis profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades precisas también dependen del estado de salud del paciente, su peso, y similares. Cuando se utiliza en pacientes, las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad y el curso de la enfermedad, trastorno o afección, la terapia previa, el estado de salud del paciente y la respuesta a los fármacos, y el criterio del médico tratante. Los tratamientos profilácticos pueden incluir la administración a un mamífero, que previamente experimentó al menos un síntoma de la enfermedad que se está tratando y actualmente está en remisión, de una composición farmacéutica que comprende el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para prevenir un regreso de los síntomas de la enfermedad o afección.

35 Algunas veces, cuando la condición del paciente no mejora, a discreción del médico, la administración del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, es administrada de forma crónica, es decir, durante un período prolongado de tiempo, incluso durante toda la vida del paciente, con el fin de mejorar o, de otro modo, controlar o limitar los síntomas de la enfermedad o afección del paciente.

40 Algunas veces, en donde el estado de un paciente mejora, la dosis del fármaco que se está administrando se reduce temporalmente o se suspende temporalmente durante un período de tiempo determinado (*es decir*, "unas vacaciones de fármaco"). Algunas veces, la duración de las vacaciones del medicamento es de entre 2 días y 1 año, incluyendo solo a modo de ejemplo, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 10 días, 12 días, 15 días, 20 días, 28 días o más de 28 días. La reducción de la dosis durante una vacación de fármaco es, a modo de ejemplo, del 10%-100%, incluyendo, a modo de ejemplo, solo 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, y 100%.

55 Una vez ocurrida la mejoría del estado del paciente, se administra una dosis de mantenimiento, si es necesario. Posteriormente, se reduce la dosificación o la frecuencia de administración, o ambas, en función de los síntomas, hasta un nivel en el que se mantenga la enfermedad, trastorno o afección mejoradas. Sin embargo,

algunas veces el paciente requiere un tratamiento intermitente a largo plazo, ante la recurrencia de los síntomas.

Algunas veces, el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra diariamente a humanos que necesitan terapia con el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. Algunas veces, el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra una vez al día. Algunas veces, el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra dos veces al día. Algunas veces, el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra tres veces al día. Algunas veces, el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra cada dos días. Algunas veces, el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra dos veces por semana.

En general, las dosis del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, empleadas para el tratamiento en seres humanos de las enfermedades o afecciones descritas en el presente documento, están típicamente en el intervalo de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por dosis. Algunas veces, la dosis deseada se presenta convenientemente en una dosis única o en dosis divididas administradas simultáneamente (o durante un corto período de tiempo) o a intervalos apropiados, por ejemplo como dos, tres, cuatro o más subdosis por día. Algunas veces, el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se presenta convenientemente en dosis divididas que se administran simultáneamente (o durante un corto período de tiempo) una vez al día. Algunas veces, el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se presenta convenientemente en dosis divididas que se administran en porciones iguales dos veces al día.

Algunas veces, el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra por vía oral al ser humano en una dosis de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por dosis. Algunas veces, el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra al ser humano según un programa de dosificación diaria continua.

El término "programa de dosificación continua" se refiere a la administración de un agente terapéutico particular a intervalos regulares. Algunas veces, el programa de dosificación continua se refiere a la administración de un agente terapéutico particular a intervalos regulares sin vacación de fármaco del agente terapéutico particular. Algunas veces, el programa de dosificación continua se refiere a la administración de un agente terapéutico particular en ciclos. Algunas veces, el programa de dosificación continua se refiere a la administración de un agente terapéutico particular en ciclos de administración del fármaco seguidos de una vacación del fármaco (por ejemplo, un período de limpieza u otro período de tiempo similar en el que no se administra el fármaco) del agente terapéutico particular. Por ejemplo, algunas veces el agente terapéutico se administra una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana, cinco veces a la semana, seis veces a la semana, siete veces a la semana, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, diariamente durante una semana seguida de una semana sin administración del agente terapéutico, diariamente durante dos semanas seguidas de una o dos semanas sin administración del agente terapéutico, diariamente durante tres semanas seguidas de una, dos o tres semanas sin administración del agente terapéutico, diariamente durante cuatro semanas seguidas de una, dos, tres o cuatro semanas sin administración del agente terapéutico, administración semanal del agente terapéutico seguida de una semana sin administración del agente terapéutico, o administración quincenal del agente terapéutico seguida de dos semanas sin administración del agente terapéutico. Algunas veces la administración diaria es una vez al día. Algunas veces la administración diaria es dos veces al día. Algunas veces, la administración diaria es tres veces al día. Algunas veces, la administración diaria es más de tres veces al día.

El término "programa de dosificación diaria continua" se refiere a la administración de un agente terapéutico particular todos los días aproximadamente a la misma hora cada día. Algunas veces la administración diaria es una vez al día. Algunas veces la administración diaria es dos veces al día. Algunas veces, la administración diaria es tres veces al día. Algunas veces, la administración diaria es más de tres veces al día.

Algunas veces, la cantidad del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra una vez al día. Algunas veces, la cantidad del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra dos veces al día. Algunas veces, la cantidad del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra tres veces al día.

Algunas veces, cuando no se observa una mejora en el estado de la enfermedad o afección en el ser humano, se aumenta la dosis diaria del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. Algunas veces, un programa de dosificación de una vez al día se cambia a un programa de dosificación de dos veces al día. Algunas veces, se emplea un programa de dosificación de tres veces al día para aumentar la cantidad que se administra de Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. Algunas veces, se aumenta la frecuencia de administración por inhalación, para proporcionar niveles C_{max} altos repetidos de forma más regular. Algunas veces, se aumenta la frecuencia de administración para proporcionar una exposición mantenida o más regular al Compuesto I, o a una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. Algunas veces, se aumenta la frecuencia de administración para proporcionar niveles

Comax altos repetidos de forma más regular y proporcionar una exposición mantenida o más regular al Compuesto I, o a una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En general, las dosis empleadas para el tratamiento de humano adulto están típicamente en el intervalo de 1 mg-5000 mg por día. Algunas veces, las dosis empleadas para el tratamiento de humanos adultos son de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 4000 mg por día, aproximadamente 150mg a aproximadamente 4000mg por día, aproximadamente 50mg a aproximadamente 2000mg por día, aproximadamente 100mg a aproximadamente 2000mg por día, o aproximadamente 150mg a aproximadamente 2000mg por día. Algunas veces se administran 50mg, 150mg, 200mg, 250mg, 300mg, 350mg, 400mg, 450mg, 500mg, 550mg, 600mg, 650mg, 700mg, 750mg, 800mg, 850mg, 900mg, 950mg, 1000mg, 1050mg, 1100mg, 1150mg, 1200mg, 1250mg, 1300mg, 1350mg, 1400mg, 1450mg, 1500mg, 1550mg, 1600mg, 1650mg, 1700mg, 1750mg, 1800mg, 1850mg, 1900mg, 1950mg, o 2000mg del Compuesto I al humano adulto. Algunas veces, la dosis deseada se presenta convenientemente en una dosis única o en dosis divididas administradas simultáneamente o a intervalos apropiados, por ejemplo como dos, tres, cuatro o más subdosis por día.

La toxicidad y eficacia terapéutica de dichos regímenes terapéuticos se determinan mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, incluyendo, pero no limitado a, la determinación de la LD₅₀ y el ED₅₀. La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se expresa como la relación entre LD₅₀ y ED₅₀. Algunas veces, los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios con animales se utilizan para formular el intervalo de dosis diaria terapéuticamente efectiva y/o la cantidad de dosificación unitaria terapéuticamente efectiva para su uso en mamíferos, incluyendo los humanos. Algunas veces, la cantidad de dosificación diaria del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, se encuentra dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con mínima toxicidad. Algunas veces, el intervalo de dosificación diaria y/o la cantidad de dosificación unitaria varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

Algunas veces, después de la administración a un sujeto de una dosis terapéuticamente efectiva del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, el nivel sin efecto adverso observado (NOAEL) es de al menos 1, 10, 20, 50, 100, 500 o 1000 miligramos del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, por kilogramo de peso corporal (mpk). En algunos ejemplos, el NOAEL de 7 días para una rata a la que se le administró el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, es al menos aproximadamente 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 o 2000 mpk. En algunos ejemplos, el NOAEL de 7 días para un perro al que se le administró el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, es de al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500 mpk.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan sólo con fines ilustrativos y no para limitar el alcance de las reivindicaciones presentadas en el presente documento. El Compuesto I se preparó como se describe en el documento WO2016/144703 (es decir, solicitud de Patente Internacional

No. PCT/US2016/020732 presentada el 3 de marzo de 2016).

La sal de mesilato se preparó tratando el Compuesto I con ácido metanosulfónico en acetonitrilo.

Ejemplo A-1: Formulación en cápsula del Compuesto 1

El Compuesto 1 se añadió directamente a una cápsula de tamaño 9 (Torpac, Inc., Nueva Jersey).

Ejemplo A-2: Formulaciones en comprimidos

Se fabricaron dos formulaciones de comprimidos diferentes en fuerzas de 50 mg y 250 mg (basado en la cantidad de Compuesto I). Los comprimidos se fabrican acuerdo con técnicas de fabricación de comprimidos estándar.

Tabla 1: Formulación A

Dosis de 250 mg (Compuesto I)			
	% en peso	Peso por comprimido (mg)	Peso por lote de 50 g (g)
Compuesto 2	35.27%	317.42	17.634
Prosolv HD90	55.73%	501.58	27.866
Ac-Di-Sol	5.00%	45.00	2.500

ES 3 015 717 T3

HPC Klucel EXF	3.00%	27.00	1.500
Aerosil 200	0.50%	4.50	0.250
Estearato de magnesio	0.50%	4.50	0.250
Total	100.00%	900.00	50.000

Tabla 2: Formulación B

Dosis de 250 mg (Compuesto I)			
	% en peso	Peso por comprimido (mg)	Peso por lote de 50 g (g)
Compuesto 2	35.27%	317.42	17.634
Avicel PH102	14.06%	126.52	7.029
Parteck M200 (Manitol)	42.17%	379.56	21.087
Explotab	5.00%	45.00	2.500
PVP VA 64	3.00%	27.00	1.500
PRUV	0.50%	4.50	0.250
Total	100.00%	900.00	50.000

- 5 Se fabricaron dos formulaciones de comprimido con diferente fuerza, con fuerzas de 50 mg y 250 mg (basado en la cantidad de Compuesto I). Los comprimidos se fabrican según técnicas de preparación de comprimidos estándar y se almacenan a 20°C a 25°C. Los comprimidos se formulan como una mezcla directa y se comprimen en comprimidos con forma de cápsula de 900 mg.

Tabla 3. Composición de Comprimidos de Compuesto 2, 50 mg (Compuesto I)

Componente	Cantidad por comprimido - (% en peso)
Compuesto 2	62.46 mg (6.94 %)
Celulosa microcristalina silicificada	756.5 mg (84.1%)
Croscarmelosa sódica	45.00 mg (5.0%)
Hidroxipropilcelulosa	27.00 mg (3.0%)
Dióxido de silicio coloidal	4.50 mg (0.5%)
Estearato de magnesio	4.50 mg (0.5%)
Total	900 mg

10

Tabla 4: Composición de Comprimidos de Compuesto 2, 250 mg (Compuesto I)

Componente	Cantidad por comprimido - (% en peso)
Compuesto 2	312.3 mg (34.7%)
Prosolv HD90	506.7 mg (56.3%)
Ac-Di-Sol®	45.00 mg (5.0%)
HPC Klucel EXF	27.00 mg (3.0%)

Aerosil 200	4.50 mg (0.5%)
Estearato de magnesio	4.50 mg (0.5%)
Total	900 mg

Ejemplo A-3: Solución oral

Se prepararon soluciones orales del Compuesto 2 que tenían una concentración de 5 mg/mL a 50 mg/mL del Compuesto 2 en un diluyente acuoso que contenía citrato de sodio deshidratado, ácido cítrico anhidro, Sabores Enmascaradores de Amargor FONA y sucralosa en una solución acuosa.

Las soluciones se prepararon como sigue. Añada la cantidad de agua necesaria al recipiente (ver Tabla 3 para cantidades). Pese la cantidad necesaria de citrato de sodio y ácido cítrico, añada al recipiente y mezcle hasta disolver. Pese la cantidad necesaria del agente aromatizante (Sabores Enmascaradores de Amargor FONA) y añádala a la solución y mezcle hasta que quede homogéneo. Pese la cantidad necesaria de sucralosa y añádala a la solución y mezcle hasta que se disuelva. Mida la apariencia (incoloro a ligeramente amarillo) y el pH (pH dentro del intervalo de 3 a 5) para asegurarse de que el diluyente cumpla con la especificación. Pese la cantidad necesaria del compuesto 2 y añádala lentamente al diluyente. Mezcle hasta que todo el compuesto 2 se haya disuelto (aplique ultrasonido, caliente y agite si es necesario). El pH está en el intervalo de 3 a 5 y la apariencia es incolora a ligeramente amarilla. Dispense hasta 80 mL de la solución de dosificación a granel en un recipiente de vidrio.

No hubo cambios significativos en la apariencia física, la potencia, la pureza o el pH de la solución oral cuando se almacenó a 2°C a 8°C o 25°C/60% de HR durante hasta 7 días en recipientes de vidrio. El almacenamiento recomendado de la solución oral es a 2° a 8°C o a 20°C a 25°C en un recipiente de vidrio durante hasta 7 días.

Tabla 5. Composición de la Solución Oral del Compuesto 2

Componente	Cantidad por unidad Concentración (mg/mL)
Compuesto 2	6.3 mg/mL a 63 mg/mL
Citrato de sodio dihidrato	9.50
Ácido cítrico anhidro	10.50
Sucralosa	2.00
Sabor Enmascarador de Amargor Fona - Líquido (936.0504U)	0.50
Sabor Enmascarador de Amargor Fona - Sólido (936.0592U)	0.50
Agua, purificada	q.s hasta 1 mL

Ejemplo A-4: Estudio farmacocinético del compuesto 1 o 2 en ratas

El Compuesto 1 o 2 se administró PO en solución a 30 mg/kg o 15 mg/kg del compuesto 1 en una cápsula [el Compuesto 1 se añadió directamente a una cápsula de tamaño 9 (Torpac, Inc., Nueva Jersey)].

Se tomaron muestras de sangre de cada rata (aproximadamente 0.3 mL de sangre total por punto de tiempo) antes de la dosis, a los 5 o 15 min y luego en varios puntos de tiempo hasta 24 horas después de la dosis. Las muestras se recogieron en hielo húmedo en tubos que contenían EDTA de potasio (p/v en solución salina normal; BD Biosciences, Franklin Lakes, Nueva Jersey). Las muestras de plasma, preparadas mediante centrifugación de sangre entera, se almacenaron congeladas (-80°C) antes del análisis. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

El análisis se realizó en un sistema LC-MS/MS compuesto por un espectrómetro de masas en tándem Sciex API-4000Qt (AB Sciex, Foster City, CA) interconectado a un sistema HPLC compuesto por una única bomba de sistema Cuaternario Agilent Serie 1200 (Santa Clara, CA) y un autoinyector LEAP PAL (Greenville, SC). Los análisis se realizaron utilizando una columna Agilent Zorbax SB-C8 (2.1 X 50 mm; 5 µm) para separaciones cromatográficas a temperatura ambiente. Los datos se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Farmacocinética en Rata del Compuesto 1 o 2 Utilizando Diversas Formas de Dosificación.

Especie	Rata			
Compuesto	1	1	2	1
Vía	IV	PO	PO	PO
Vehículo	Solución salina	MC 0.5%	MC 0.5%	Cápsula
Dosis (mg/kg)	2	30	30	15
Ayuno/Alimentado	Alimentado	Ayuno	Ayuno	Ayuno
Sexo	M	M	M	M
AUC _(0-t hr) (µg·hr/mL)	0.14	1.4	2.0	0.74
AUC _{0-t hr} /Dosis	0.07	0.05	0.07	0.05
C _{máx} (µg/mL)	0.63	1.7	2.6	1.2
T _{máx} (hr)	0.083	0.25	0.42	0.6
F(%)	100	71	95	69
IV - intravenoso; PO - oral; MC - metilcelulosa; M = macho; AUC - área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo; C _{máx} - concentración máxima en plasma; T _{máx} - tiempo hasta la concentración máxima en plasma; %F - biodisponibilidad calculada a partir de AUC _{0-t} PO/AUC _{0-t} IV.				

Ejemplo A-5: Estudio farmacocinético del compuesto 1 o 2 en Perro

5 El Compuesto 1 o 2 se administró PO en solución a 100 o 300 mg/kg. El Compuesto 2 se administró PO en una cápsula y en dos formulaciones de comprimido diferentes (Formulación A o B). Los datos se describen en la Tabla 5. La emesis fue prevalente en todos los grupos de dosis, pero las observaciones clínicas concluyeron que la cápsula oral y potencialmente el comprimido fueron mejor tolerados que las soluciones orales.

10 Se tomaron muestras de sangre de cada perro (aproximadamente 1 mL de sangre total por punto de tiempo) antes de la dosis, a los 5 o 15 min y luego en varios puntos de tiempo hasta 24 horas después de la dosis. Las muestras se recogieron en hielo húmedo en tubos que contenían EDTA de potasio (p/v en solución salina normal; BD Biosciences, Franklin Lakes, Nueva Jersey). Las muestras de plasma, preparadas mediante centrifugación de sangre entera, se almacenaron congeladas (-80°C) antes del análisis. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

15 El análisis se realizó en un sistema LC-MS/MS compuesto por un espectrómetro de masas en tándem Sciex API-4000Qt (AB Sciex, Foster City, CA) interconectado a un sistema HPLC compuesto por una única bomba de sistema Cuaternario Agilent Serie 1200 (Santa Clara, CA) y un autoinyector LEAP PAL (Greenville, SC). Los análisis se realizaron utilizando una columna Agilent Zorbax SB-C8 (2.1 X 50 mm; 5 µm) para separaciones cromatográficas a temperatura ambiente.

Tabla 7. Farmacocinética en Perro del Compuesto 1 o 2 Utilizando Diversas Formas de Dosificación.

Especie	Perro					
Compuesto	1	1	2	2	2	2
Vía	IV	PO	PO	PO	PO	PO
Vehículo	Solución salina	MC 0.5 %	Citrato	Cápsula	Formulación A de comprimido	Formulación B de comprimido
Dosis (mg/kg)	5	100	300	300	100	100
Ayuno/alimentado	Alimentado	Ayuno	Ayuno	Ayuno	Ayuno	Ayuno

Sexo	M	M	M	M	M	M
AUC _(0-t hr) ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	1.4	85	286	100	75.6	63.9
AUC _{0-t hr} /Dosis	0.28	0.85	0.95	0.33	0.76	0.64
C _{máx} ($\mu\text{g/mL}$)	2.5	27	143	80	33.7	25.1
T _{máx} (hr)	0.083	1.3	0.3	0.5	0.4	0.8
F(%)	100	283	339	100	253	210
IV - intravenoso; PO - oral; MC - metilcelulosa; M = perro beagle macho; AUC - área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo; C _{máx} - concentración máxima en plasma; T _{máx} - tiempo hasta la concentración máxima en plasma; %F - biodisponibilidad calculada a partir del AUC _{0-t} PO/AUC _{0-t} IV.						

Ejemplo A-6: Composición Farmacéutica Parenteral

Para preparar una composición farmacéutica parenteral adecuada para administración por inyección (subcutánea, intravenosa), se disuelven 1-1000 mg del Compuesto (I), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en agua estéril y luego se mezcla con 10 mL de solución salina estéril al 0.9%. Opcionalmente se añade un amortiguador adecuado, así como un ácido o una base opcionales para ajustar el pH. La mezcla se incorpora a una forma unitaria de dosificación adecuada para su administración mediante inyección.

Ejemplo A-7: Composición Tópica de Gel

Para preparar una composición farmacéutica tópica de gel, el Compuesto (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se mezcla con hidroxipropilcelulosa, propilenglicol, miristato de isopropilo y alcohol purificado USP. La mezcla de gel resultante se incorpora luego a recipientes, como tubos, que son adecuados para la administración tópica.

Ejemplo B-1: Preparación de Medios Concentrados Acondicionados (CCM)

Las líneas celulares estables LOXL2/CHO humanas y LOX/HEK humanas se cultivaron en condiciones de crecimiento normales en placas de cultivo de tejidos de 15 cm hasta que las células alcanzaron una confluencia de ~80%. Luego, las células se lavaron con PBS antes de agregar 25-30 mL de medio libre de suero (mezcla DMEM/F12 libre de Rojo de fenol con glutamax que contiene pen/estrep, 10-100 μM de $\text{CuCl}_2 \pm 0.1\%$ de BSA). Las células se incubaron a 37°C, 5% de CO_2 en un medio libre de suero durante 40-48 horas antes de retirar el medio acondicionado y se sometieron a centrifugación a 2000 rpm durante 5 min a 4°C para formar pellas con las células/residuos. El medio se concentró 10-20X utilizando columnas centriprep 10-30 MWCO de acuerdo con las instrucciones del fabricante (EMD Millipore, Billerica, MA) antes de dividirlo en alícuotas y almacenarlo a -80°C.

Ejemplo B-2: Ensayo CCM de LOXL2 humana

La actividad de la amina oxidasa LOXL2 se evaluó midiendo la fluorescencia de Amplex Red utilizando medio acondicionado concentrado 10-20X (que no contiene BSA) de células CHO que expresan de forma estable LOXL2 humana. Para analizar la actividad de la amina oxidasa, se incubaron 10 μL del medio acondicionado concentrado con 2 μL del compuesto de prueba en DMSO y 73 μL de Amortiguador de Ensayo (Amortiguador de Borato 50 mM, pH8) durante 2h a 37 °C. Después de la incubación de 2h, se añadieron 5 μL de 1,5-Diaminopentano (DAP) 10 mM diluido en Amortiguador de Ensayo y 10 μL de Amplex Red Mix (8.5 μL de Amortiguador de Ensayo + 0.5 μL de Amplex Red 10 mM + 1 μL de Peroxidasa de Rábano picante 500 U/ml) y se mezcló la placa y se colocó inmediatamente en la FlexStation para las mediciones de fluorescencia. La fluorescencia se leyó en modo cinético cada 2 min durante 0.5 a 1 hora con excitación = 544 y emisión = 590. La actividad de la amina oxidasa se calculó a partir de la pendiente de la porción lineal de la curva. Los pocillos que contenían vehículo (DMSO) representaban la actividad máxima y se establecieron en 0% de inhibición y los pocillos que contenían βAPN (3-aminopropionitrilo) 100 μM no representaban actividad y se establecieron en 100% de inhibición.

Tabla 8.

Compuesto	IC ₅₀
Rac-1	A

Ent-1	A
1	A
2	A
A es <300nM.	

Ejemplo B-3: Ensayo CCM de LOX Humana

La actividad de la amina oxidasa LOX humana se evaluó midiendo la fluorescencia de Amplex Red utilizando medio acondicionado concentrado 10-20X (que contiene BSA) de células HEK que expresan de forma estable LOX humana. Para analizar la actividad de la amina oxidasa, se incubaron 10 μ L del medio acondicionado concentrado con 2 μ L del compuesto de prueba en DMSO y 73 μ L de Amortiguador de Ensayo (Amortiguador de Borato 50 mM, pH8) durante 2h a 37 °C. Después de la incubación de 2h, se añadieron 5 μ L de 1,5-Diaminopentano (DAP) 10 mM diluido en Amortiguador de Ensayo y 10 μ L de Amplex Red Mix (8.5 μ L de Amortiguador de Ensayo + 0.5 μ L de Amplex Red 10 mM + 1 μ L de Peroxidasa de Rábano picante 500 U/mL) y se mezcló la placa y se colocó inmediatamente en la FlexStation para las mediciones de fluorescencia. La fluorescencia se leyó en modo cinético cada 2 min durante 1 hora con excitación = 544 y emisión = 590. La actividad de la amina oxidasa se calculó a partir de la pendiente de la porción lineal de la curva. Los pocillos que contenían vehículo (DMSO) representaban la actividad máxima y se establecieron en 0% de inhibición y los pocillos que contenían β APN (3-aminopropionitrilo) 100 μ M no representaban actividad y se establecieron en 100% de inhibición.

Ejemplo B-4: Ensayo de Proteína Recombinante Purificada LOXL2 Humana

La actividad de la amina oxidasa se evaluó midiendo la fluorescencia de Amplex Red utilizando LOXL2 humano recombinante purificado disponible comercialmente (Sino Biologicals, Beijing, China). Para analizar la actividad de la amina oxidasa, se incubaron 10 μ L de LOXL2 recombinante purificado 0.025 μ g/ μ L diluido en Amortiguador de Ensayo (Amortiguador de Borato 50 mM, pH8) con 2 μ L del compuesto de prueba en DMSO y 73 μ L de Amortiguador de Ensayo durante 2h a 37 °C. Después de la incubación de 2h, se añadieron 5 μ L de 1,5-Diaminopentano (DAP) 10 mM diluido en Amortiguador de Ensayo y 10 μ L de Amplex Red Mix (8.5 μ L de Amortiguador de Ensayo + 0.5 μ L de Amplex Red 10 mM + 1 μ L de Peroxidasa de Rábano picante 500 U/mL) y se mezcló la placa y se colocó inmediatamente en la FlexStation para las mediciones de fluorescencia. La fluorescencia se leyó en modo cinético cada 2 min durante 0.5-1 hora con excitación = 544 y emisión = 590. La actividad de la amina oxidasa se calcula a partir de la pendiente de la porción lineal de la curva. Los pocillos que contenían vehículo (DMSO) representaban la actividad máxima y se establecieron en 0% de inhibición y los pocillos que contenían β APN (3-aminopropionitrilo) 100 μ M no representaban actividad y se establecieron en 100% de inhibición.

Ejemplo B-5: Ensayo de Proteína Recombinante Purificada LOXL3 Humana

La actividad de la amina oxidasa se evaluó midiendo la fluorescencia de Amplex Red utilizando LOXL3 humano recombinante purificado disponible comercialmente (R&D Systems, Minneapolis, MN). Para analizar la actividad de la amina oxidasa, se incubaron 10 μ L de LOXL3 recombinante purificado 0.075 μ g/ μ L diluido en Amortiguador de Ensayo (Amortiguador de Borato 50 mM, pH8) con 2 μ L del compuesto de prueba en DMSO y 73 μ L de Amortiguador de Ensayo durante 2h a 37 °C. Después de la incubación de 2h, se añadieron 5 μ L de 1,5-Diaminopentano (DAP) 10 mM diluido en Amortiguador de Ensayo y 10 μ L de Amplex Red Mix (8.5 μ L de Amortiguador de Ensayo + 0.5 μ L de Amplex Red 10 mM + 1 μ L de Peroxidasa de Rábano picante 500 U/mL) y se mezcló la placa y se colocó inmediatamente en la FlexStation para las mediciones de fluorescencia. La fluorescencia se leyó en modo cinético cada 2 min durante 0.5-1 hora con excitación = 544 y emisión = 590. La actividad de la amina oxidasa se calculó a partir de la pendiente de la porción lineal de la curva. Los pocillos que contenían vehículo (DMSO) representaban la actividad máxima y se establecieron en 0% de inhibición y los pocillos que contenían BAPN (3-aminopropionitrilo) 100 μ M no representaban actividad y se establecieron en 100% de inhibición.

Tabla 9. Valores IC₅₀ para el Compuesto 1 en los ensayos LOX, LOXL2 y LOXL3.

Ensayo de actividad	IC ₅₀ (μ M)
LOXL2 (CCM)	0.0751
LOXL2 (CCM que contiene BSA)	0.116
LOXL2 (purificada, recombinante)	0.209

LOX (CCM que contiene BSA)	47.0
LOXL3 (purificada, recombinante)	1.21

Ejemplo B-6: Ensayo de Sangre Humana LOXL2

La actividad de la amina oxidasa de LOXL2 humana en el contexto de sangre completa humana se midió utilizando un ensayo Amplex Red. La LOXL2 recombinante humana purificada (Sino Biologicals, Pekín, China) se resuspendió a 0.25 µg/mL usando agua estéril, luego se agregaron 16 µL de LOXL2 a 182 µL de sangre humana fresca recolectada en tubos vacutainer con heparina. Se agregaron 2 µL del compuesto de prueba en DMSO (o DMSO solo) y se incubaron a 37°C durante 2h. Después de la incubación de 2h, la sangre fue sometida a centrifugación a 2000 x g durante 15 min a temperatura ambiente para aislar el plasma. Se retiraron 50 µL de plasma y se mezclaron con 25 µL de DAP (diluido en agua) 40 mM y 25 µL de Amplex Red Mix (23.5 µL de Amortiguador de Borato 50 mM, pH 8 + 0.5 µL de Amplex Red 10 mM + 1 µL de Peroxidasa de Rábano picante 500 U/ml). Las muestras se mezclaron y se colocaron inmediatamente en la FlexStation para realizar mediciones de fluorescencia. La fluorescencia se leyó en modo cinético cada 2 min durante 1 hora con excitación = 544 y emisión = 590. La actividad de la amina oxidasa se calculó a partir de la pendiente de la porción lineal de la curva. Los pocillos que contenían vehículo (DMSO) representaban la actividad máxima y se configuraron con un 0% de inhibición y los pocillos que contenían sangre no enriquecida con LOXL2 no representaban actividad y se configuraron con un 100% de inhibición.

Ejemplo B-7: Modelo de Bleomicina Orofaringea de Ratón de Fibrosis Pulmonar (no es parte de la presente invención)

Se indujo fibrosis pulmonar en ratones C57Bl/6 machos mediante la administración de bleomicina (0.1-4 U/kg) mediante instilación orofaríngea. Los ratones fueron tratados previamente con el vehículo o el compuesto de prueba por vía oral, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea, ya sea de manera profiláctica (1 día a 1 hora antes de la instilación de bleomicina) o terapéuticamente (7-14 días después de la instilación de bleomicina). La vía y la frecuencia de dosificación se basaron en las propiedades farmacocinéticas previamente determinadas para el inhibidor de LOXL2 en ratón. Después de la instilación de bleomicina, los animales fueron monitoreados diariamente para detectar pérdida de peso y signos clínicos durante 14-28 días antes del sacrificio. Los animales fueron sometidos a eutanasia al finalizar el estudio y pesados. Se recogieron sangre (para aislamiento de plasma) y fluido de lavado broncoalveolar y se congelaron para análisis posteriores. Se retiraron los pulmones, se pesaron, luego se inflaron y se fijaron mediante instilación de formol al 10% y se prepararon para el examen histológico o se homogeneizaron en 1 mL de PBS para la determinación de colágeno, utilizando un ensayo de hidroxiprolina. Para el examen histológico, se tiñeron cortes de pulmón con tricromo de Masson o rojo picrosirio, para medir el colágeno fibrilar como indicador de fibrosis y se determinó una puntuación de Ashcroft de fibrosis pulmonar y daño inflamatorio. Para determinar el contenido de hidroxiprolina pulmonar, se retiran 0.5 ml del homogeneizado pulmonar y se añaden a 0.5 mL de HCl 12 N y las muestras se calientan a 120°C durante la noche. Después de la hidrólisis ácida, se secan 25-100 µL del sobrenadante, se resuspende en 25 µL de agua y se determina el contenido de hidroxiprolina mediante la adición de 0.5 mL de solución de Cloramina T (140 mg de Cloramina T en 6.5 ml de ddH₂O + 1 ml de n-propanol + 2.5 mL de acetato de sodio 1 M) e incubación a temperatura ambiente durante 20 min. Después de la incubación, se añaden 0.5 mL de solución de Erlich (1.48 g de 4-(dimetilamino) (benzaldehído) en 7 mL de n-propanol + 2.88 ml de ácido perclórico al 60% y 0.12 mL de ddH₂O) y se incuba a 65°C durante 15 min, antes de leer la absorbancia a 550 nm.

Ejemplo B-8: Eficacia Dependiente de la Dosis en la Fibrosis Pulmonar (no es parte de la presente invención)

Se administró el Compuesto Rac-1 por vía oral de forma profiláctica a ratones a los que se les había instilado bleomicina a dosis de 3, 10, 30 o 60 mg/kg/día, y se les extrajeron los pulmones para evaluación histológica el Día 14. La Figura 1 muestra la puntuación de Ashcroft a partir de los análisis de histopatología, que reflejan fibrosis pulmonar en un estudio de respuesta a la dosis profiláctica de 14 días de Rac-1, en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones (*p < 0.05; **p < 0.01; *** p < 0.001). El Rac-1 redujo la fibrosis de manera relacionada con la dosis, lo que sugiere que 30 mg/kg es la dosis mínima para lograr la máxima eficacia antifibrótica.

Ejemplo B-9: Eficacia Profiláctica frente a Eficacia Terapéutica en la Fibrosis Pulmonar (no es parte de la presente invención)

Se administraron Compuesto 1, Compuesto Rac-1, y compuesto Ent-1 por vía oral a 60 mg/kg/día a ratones a los que se había instilado bleomicina, bajo dos paradigmas: profiláctico (dosis que comienza el Día -1) y terapéutico (dosis que comienza el Día 7). La Figura 2 muestra la puntuación de Ashcroft a partir de los análisis de histopatología que reflejan la fibrosis pulmonar comparando la eficacia de los Compuestos 1, Rac-1, y Ent-

1, tanto en modo profiláctico (Pro) como terapéutico (Ther) en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones (*p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001)

El estado fibrótico se evaluó histológicamente el Día 21 utilizando la puntuación de Ashcroft, como medida primaria de fibrosis pulmonar. Los tres compuestos redujeron significativamente la fibrosis en el modelo de

Ejemplo B-10: Reversión de la Fibrosis Pulmonar Establecida (no es parte de la presente invención):

Se sabe que el modelo de pulmón inducido por bleomicina en ratones desarrolla fibrosis gradualmente durante los primeros 14 a 21 días, pero luego se resolverá espontáneamente en ratones más jóvenes durante las siguientes semanas (Hecker et al., 2014). Para determinar si los inhibidores de LOXL2 pueden acelerar la resolución de la fibrosis establecida, se administró Compuesto 1 por vía oral a partir del Día 14 después de la bleomicina y se extrajeron los pulmones para análisis histológico el Día 28. La extensión de la fibrosis permaneció constante desde el Día 14 hasta el Día 28 en los ratones tratados con el vehículo. El Compuesto 1 disminuyó la fibrosis con una normalización del 73% de la puntuación de Ashcroft (Figura 3). La Figura 3 muestra la puntuación de Ashcroft a partir de los análisis de histopatología que reflejan fibrosis pulmonar en un estudio de recuperación de 28 días, en el que se administró el Compuesto 1 a 60 mg/kg a partir del Día 14.

Ejemplo B-11: Efectos de la Frecuencia de Dosis en la Fibrosis Pulmonar (no es parte de la presente invención):

Se administró Compuesto Rac-1 por vía oral a una dosis de 60 mg/kg a ratones inducidos con bleomicina de forma profiláctica, utilizando diferentes paradigmas de dosificación. Se comparó la eficacia de la dosificación diaria (QD) con la de la dosificación cada dos días (Q2D) y cada tres días (Q3D), con pulmones extraídos para evaluación histológica el Día 14. Independientemente de la frecuencia de dosificación, el Compuesto Rac-1 redujo la fibrosis pulmonar, siendo una vez al día ligeramente más efectivo que cada dos días o cada tres días (Figura 4).

La Figura 4 muestra la puntuación de Ashcroft a partir de los análisis de histopatología que reflejan fibrosis pulmonar en un estudio profiláctico de 14 días que compara la dosificación una vez al día, cada dos días y cada tres días del Compuesto Rac-1 en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones (**p < 0.01; **** p < 0.0001).

Ejemplo B-12: Comparación de la eficacia con el anticuerpo anti-LOXL2 en la Fibrosis Pulmonar (no es parte de la presente invención):

Se comparó la eficacia del Compuesto 1 directamente en un estudio con rAB0023. El rAB0023 es un anticuerpo híbrido de ratón recombinante que tiene la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-LOXL2, AB0023, clonada en una columna vertebral de IgG2a murina y la región variable de la cadena ligera de AB0023 clonada en una columna vertebral de IgG2 murina. El rAB0023 se une a LOXL2 con igual afinidad que AB0023, un anticuerpo que ha demostrado eficacia en diversos modelos in vivo, incluyendo el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones (Barry-Hamilton et. al., Nat Med. septiembre de 2010;16(9):1009-17). Se administró el Compuesto 1 por vía oral de forma profiláctica a una dosis de 60 mg/kg/día a partir del Día -1; el rAB0023 se administró a 30 mg/kg por vía intraperitoneal (IP) el Día -4, -1, 1, 4, 8 y 11 (quincenalmente) y se extrajeron pulmones para análisis histológico el Día 14. El Compuesto 1 redujo significativamente la fibrosis pulmonar en el modelo de bleomicina de ratón, como lo demuestra una reducción en la puntuación de Ashcroft de un valor medio de 3.1 a 0.8 (Figura 5). El anticuerpo rAB0023 mostró tendencias hacia la reducción de la puntuación de Ashcroft (3.1 a 1.7), pero las tendencias no fueron estadísticamente significativas. Los resultados demuestran que el Compuesto 1 tiene una eficacia mejor que el rAB0023 en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones.

La Figura 5 muestra la puntuación de Ashcroft a partir de los análisis de histopatología que reflejan fibrosis pulmonar en un estudio profiláctico de 14 días, que compara 60 mg/kg de Compuesto 1 con 30 mg/kg de rAB0023, un anticuerpo contra LOXL2.

Ejemplo B-13: Combinación con otros Agentes Antifibróticos para la Fibrosis Pulmonar (no es parte de la presente invención)

Los inhibidores de LOXL2 se pueden utilizar en combinación con otros fármacos antifibróticos para la fibrosis pulmonar. Actualmente, la pirfenidona y el nintedanib están aprobados para el tratamiento de la fibrosis pulmonar en pacientes con IPF. Los inhibidores de LOXL2 se prueban solos y en combinación con pirfenidona en modalidades de dosificación profilácticas o terapéuticas durante 14-28 días. Los inhibidores de LOXL2 también se prueban solos y en combinación con nintedanib en modalidades de dosificación profiláctica o terapéutica durante 14-28 días. La fibrosis se mide utilizando la puntuación de Ashcroft o la concentración de hidroxiprolina, como se describió anteriormente. La terapia de combinación es ventajosa cuando la eficacia es

mayor que la de cada agente solo o cuando se reduce la dosis requerida para cualquiera de los fármacos, mejorando así el perfil de efecto secundario.

Ejemplo B-14: Modelo de Alport de Ratón de Fibrosis de Riñón (no es parte de la presente invención)

Los ratones con mutaciones en uno de los genes del colágeno IV de colágeno de la membrana basal glomerular, el Colágeno IV- $\alpha 3(\alpha 4)/\alpha 5$, presentan defectos en la función glomerular con desarrollo de fibrosis de riñón. Estos ratones desarrollan disfunción renal y mueren prematuramente por insuficiencia renal en un momento específico, que depende de la cepa base en la que está presente la mutación. Se administró el Compuesto 1 por vía oral a ratones deficientes en Col4A3 con una base de 129/Sv, ya sea de forma profiláctica (aproximadamente en las semanas 2-3 de edad) o terapéuticamente (aproximadamente en las semanas 4-6 de edad). Los ratones fueron sacrificados en un momento predefinido (7-9 semanas de edad) o se les administró dosis continuamente hasta que perdieron >15% de su peso corporal, lo que precede a la muerte en 1-3 días. Si se terminaba específicamente, los ratones fueron perfundidos transcardíacamente con PBS, y un riñón fue sujetado con pinzas en la arteria renal y el otro perfundido con Dynabeads para el aislamiento magnético de los glomérulos. El otro riñón se partió a la mitad y se fijó una pequeña muestra de corteza renal, para análisis mediante microscopio (TEM) electrónico de transmisión, y una segunda muestra de corteza renal se utilizó para el aislamiento de ARN. La otra mitad del riñón bisecado se incrustó en OCT para análisis inmunohistoquímico. Se analizó el ARN de los glomérulos y la corteza renal mediante RT-PCR en tiempo real para genes de interés, incluyendo MMP-10, MMP-12, IL6, MCP-1, TGF- β 1, CTGF, MMP-2 y MMP-9. El análisis inmunohistoquímico incluyó tinción para colágeno 1, CD45, fibronectina, actina de músculo liso, WT-1 e integrina α 8/laminina α 5. La tinción de colágeno 1 fue analizada a ciegas para la puntuación de fibrosis, y la tinción de fibronectina se analizó a ciegas para la puntuación de glomerulosclerosis. En todos los estudios se evaluó la albuminuria semanalmente y el BUN en el momento de la extracción de tejido.

El Compuesto 1 mejoró tanto la fibrosis glomerular como la intersticial en el ratón deficiente en Col4A3 cuando se administró por vía oral en una dosis de 30 mg/kg/día a partir de las 2 semanas de edad (Figura 6a), un momento en el que los riñones son bastante normales en este modelo. La fibrosis se evaluó a las 7 semanas de edad mediante una evaluación ciega de la inmunohistoquímica de colágeno y fibronectina. El Compuesto 1 también mejoró la fibrosis cuando la dosificación se inició a las 5 semanas de edad, lo que puede considerarse una intervención terapéutica.

La figura 6a muestra las puntuaciones de Esclerosis glomerular (izquierda) y fibrosis intersticial (derecha) que reflejan fibrosis renal en el modelo de ratón deficiente en Col4A3 del síndrome de Alport y enfermedad renal crónica. Las muestras se extrajeron a las 7 semanas de edad después de la administración oral del Compuesto 1 a 30 mg/kg a partir de las 2 o 5 semanas de edad (** $p < 0.01$).

Ejemplo B-15: Combinación con otros Agentes Antifibróticos para la Fibrosis Renal (no es parte de la presente invención)

Los inhibidores de LOXL2 se pueden utilizar en combinación con otros fármacos para enfermedades crónicas del riñón, incluyendo el síndrome de Alport. Los inhibidores de la enzima (ACE) convertidora de Angiotensina II y los bloqueadores (ARBs) de receptor de angiotensina se utilizan con frecuencia en pacientes con enfermedad renal. Los inhibidores de LOXL2 se prueban solos y en combinación con ramipril (inhibidor de la ACE) o candesartán (ARB) en profilaxis a partir de las 2-3 semanas de edad. Si es eficaz después de una dosificación profiláctica, se realizarán estudios de combinación en modalidad de dosificación terapéutica (comenzando a las 4-6 semanas de edad). La fibrosis se mide histológicamente como se describió anteriormente y la función renal se mide utilizando proteinuria y/o BUN sérico. Los efectos de la terapia de combinación sobre la supervivencia también se miden como se describió anteriormente. La terapia de combinación es ventajosa cuando la eficacia es mayor que la de cada agente solo, o cuando se reduce la dosis requerida para cualquiera de los fármacos, mejorando así el perfil de efectos secundarios.

Ejemplo B-16: Modelo de Cáncer de Mama Ortotópico de Ratón (no es parte de la presente invención)

Se evaluó el Compuesto 1 en un modelo de ratón ortotópico de cáncer de mama humano. Las reservas tumorales se prepararon inyectando por vía subcutánea (s.c.) células MDA-MB-435-GFP a una concentración de 5×10^6 células/100 μ L en el flanco del ratón desnudo. Cuando los tumores s.c. alcanzaron 50-100 mm³ se extrajeron los tumores y se cortaron en trozos de 1 mm³. Se trasplantaron dos fragmentos de tumor a la almohadilla de grasa mamaria de cada ratón. El Compuesto 1 se administró por vía oral a una dosis de 60 mg/kg/día, una vez que el volumen promedio del tumor primario alcanzó los 100 mm³. Se administró docetaxel a 10 mg/kg por vía intravenosa una vez por semana durante 4 semanas como control positivo. El tamaño del tumor se calculó a partir de una medición de la dimensión (W) menor y la dimensión (L) mayor perpendiculares utilizando la fórmula $(W^2 \times L) \times \frac{1}{2}$, con W y L medidos utilizando un calibrador digital. Los ratones fueron sacrificados después de 4 semanas. El Compuesto 1 atenuó el crecimiento tumoral con una reducción estadísticamente significativa del 35% en el volumen a las 4 semanas.

La Figura 6b muestra el volumen del tumor en un modelo de cáncer de mama humano ortotópico con células MDA-MB-435-GFP implantadas en almohadillas de grasa mamaria de ratones desnudos. Los volúmenes tumorales se midieron semanalmente durante el estudio de 4 semanas (** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Ejemplo B-17: Modelo de Fibrosis de Piel y Pulmón con Bleomicina Subcutánea para Ratón (no es parte de la presente invención)

La fibrosis de la piel y los pulmones se induce en ratones C57Bl/6 hembra, administrando bleomicina mediante inyección subcutánea en uno (50-100 μg de bleo/sitio) o dos sitios (50 μg de bleo/sitio) en la espalda de los ratones. Para el modelo de dos sitios, los animales se anestesian con isoflurano y se inyecta bleomicina (100 μl o control PBS) en el mismo sitio diariamente durante 28 días, para inducir fibrosis de la piel y los pulmones. En el modelo de sitio único, los ratones son inmovilizados y se les inyecta en el mismo lugar identificado mediante un marcador indeleble. Los ratones reciben un tratamiento previo con el vehículo o el compuesto de prueba (1 día a 1 hora) por vía oral, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea antes de la inyección de bleomicina (dosificación profiláctica) o 7-14 días después de la inyección de bleomicina (dosificación terapéutica). Los animales son sometidos a eutanasia al finalizar el estudio y se pesan, y se recolectan sangre (para aislar el plasma) y lavado broncoalveolar, que se congelan para análisis posteriores. Los pulmones se extraen, se pesan y luego se homogeneizan en PBS para determinar el contenido de colágeno utilizando un ensayo de hidroxiprolina, o se inflan y se fijan mediante instilación de formol al 10% y se preparan para el examen histológico mediante tinción con tricromo o rojo picosirio. Se toman biopsias de piel de cada sitio de inyección, utilizando una biopsia por punción dérmica de 6 mm (Acuderm). Una biopsia por punción se coloca en sándwich en un casete con una esponja, se coloca en formol y se prepara para el examen histológico mediante tinción histológica con H&E, tricromo y/o rojo picosirio. La otra biopsia por punción se coloca en 0.5 ml de PBS y se pica con tijeras finas. Luego se añaden 500 μL de HCl 12 N y las muestras se calientan a 120°C durante la noche. Después de la hidrólisis ácida, se secan 25-100 μl del sobrenadante, se resuspende en 25 μL de agua y se determina el contenido de hidroxiprolina mediante la adición de 0.5 ml de solución de Cloramina T (140 mg de Cloramina T en 6.5 mL de ddH_2O + 1 mL de n-propanol + 2.5 mL de acetato de sodio 1 M) e incubación a temperatura ambiente durante 20 min. Después de la incubación, se añaden 0.5 ml de solución de Erlich (1.48 g de 4-(dimetilamino) (benzaldehído) en 7 ml de n-propanol + 2.88 mL de ácido perclórico al 60 % y 0.12 mL de ddH_2O) y se incuba a 65°C durante 15 min antes de leer la absorbancia a 550 nm. La concentración de hidroxiprolina en cada biopsia de piel se determina a partir de una curva estándar de hidroxiprolina (comprada a Sigma).

Ejemplo B-18: Modelo de Fibrosis de Hígado de Rata/Ratón por CCl_4 (no es parte de la presente invención)

La fibrosis de hígado se induce en ratones (Balb/c o C57Bl/6) mediante la administración intraperitoneal de CCl_4 (0.5-2 ml/kg de peso corporal) diluido en aceite de maíz, dos veces por semana durante 4-8 semanas o por administración oral dos o tres veces por semana utilizando un protocolo de dosis creciente (Popov et al. 2011 Gastroenterology; 140(5): 1642-1652.). La fibrosis de hígado se induce en ratas mediante administración intraperitoneal (1-2.5 ml/kg) o mediante administración oral en aceite (mineral, de oliva o de maíz) dos veces por semana durante 6-12 semanas. Los inhibidores de LOXL2 se administran por vía oral, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea entre 1 día y 1 hora antes de la dosificación inicial de CCl_4 (dosis profiláctica) o 1-4 semanas después de la dosificación inicial de CCl_4 (dosificación terapéutica). Al final del estudio, los ratones se sacrifican abriendo la cavidad torácica bajo isoflurano, se extrae sangre mediante punción cardíaca en tubos vacutainer con EDTA y se extrae el hígado. Se fija parte del hígado en formol amortiguado neutro al 10%, para su posterior análisis histopatológico de inflamación y fibrosis mediante tinción con H&E y tinción con Rojo picosirio. El tejido restante se congela rápidamente a -80 °C para el posterior análisis con hidroxiprolina del contenido total de colágeno.

Ejemplo B-19: Modelo de Fibrosis Biliar en Ratón con inactivación de *Mdr2* (no es parte de la presente invención)

La enfermedad de hígado se desarrolla en el modelo de ratón BALB/c.*Mdr2*^{-/-} con fibrosis en puente/cirrosis temprana entre 8 y 12 semanas de edad (Ikenaga et al. 2015 Am J Pathology, 185: 325-334). El Compuesto 1 se administró por vía oral en dosis de 30 y 60 mg/kg/día, en ratones BALB/c.*Mdr2*^{-/-} una vez al día durante 6 semanas a partir de la semana 6 después del nacimiento. Al final del estudio, los ratones fueron anestesiados con isoflurano (1.5% v/v) mediante un vaporizador de precisión. Después de la laparotomía, se midió la presión portal directamente insertando un catéter de presión de alta fidelidad en la vena porta y midiendo las señales de presión durante 5 minutos. Se recogió suero para analizar la bioquímica del hígado (ALT, AST, ALP y bilirrubina) y del riñón (creatinina). Parte del hígado se fijó en formol amortiguado neutro al 10% para el análisis histopatológico de inflamación, necrosis y fibrosis, mediante tinción con tinción H&E y rojo picosirio. La fracción del área de colágeno se midió a partir de imágenes teñidas con rojo picosirio, utilizando un algoritmo que separa el colágeno teñido de rojo de la tinción no específica, mediante la sustracción de color y definición del umbral de la imagen procesada. Las secciones se analizaron en orden aleatorio utilizando el mismo valor umbral para cada conjunto. Los datos fueron desconvolucionados después del análisis para identificar la

asignación de grupo. El contenido de colágeno se determinó a partir de una porción del tejido del hígado mediante análisis de hidroxiprolina.

El Compuesto 1 redujo la fibrosis hepática, medida por cambios en la tinción con rojo picosirio, cuando se administró en dosis de 30 o 60 mg/kg una vez al día a partir de las 6 semanas de edad y hasta las 12 semanas de edad. Ambos niveles de dosis demostraron una reducción similar en el área fibrótica del hígado. El tratamiento con rAB0023, si bien mostró tendencias hacia la reducción de la fibrosis, no produjo una mejora estadísticamente significativa. La Figura 7 muestra la cuantificación del área de fibrosis teñida con tinción de rojo picosirio (** $p < 0.01$ utilizando un ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett frente a ratones tratados con vehículo).

Ejemplo B-20: Modelo de Fibrosis de Hígado en ratones, con tioacetamida (TAA) (no es parte de la presente invención)

Se indujo fibrosis de hígado en ratones C57Bl/6 machos mediante inyección intraperitoneal de tioacetamida (TAA) en una dosis de 200 mg/kg 3x/semana. Se administró el Compuesto 1 por vía oral en una dosis de 30 mg/kg una vez al día y el tratamiento comenzó 3 o 6 semanas después del inicio de la administración de TAA. Se estudió la fibrosis de hígado 12 semanas después del inicio del TAA. Al final del estudio, los ratones fueron sacrificados realizando una laparotomía bajo isoflurano, se extrajo sangre mediante punción cardíaca en tubos vacutainer con EDTA y se extrajo el hígado. Parte del hígado se fijó en formol amortiguado neutro al 10% para el posterior análisis histopatológico de inflamación y fibrosis, mediante tinción con H&E y tinción con rojo picosirio. El tejido restante se congeló rápidamente a -80°C para el posterior análisis con hidroxiprolina del contenido total de colágeno o análisis de ARNm. Se recogió suero para analizar la bioquímica del hígado (ALT, AST, ALP y bilirrubina) como medida de la función hepática.

El Compuesto 1 redujo la fibrosis de hígado, medida por cambios en la tinción con rojo picosirio, cuando se administró una dosis de 30 mg/kg/día a partir de las 3 o 6 semanas posteriores al inicio del TAA. La reducción de la fibrosis a las 12 semanas de tratamiento con TAA fue mayor cuando la dosificación se inició a las 3 semanas, lo que sugiere que puede ser mejor tratar la fibrosis en una etapa más temprana. La figura 8 muestra la cuantificación del área de fibrosis teñida con tinción de rojo picosirio. (**, *** $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectivamente, utilizando un ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett frente a ratones tratados con vehículo TAA).

Ejemplo B-21: Modelo de Esteatohepatitis no Alcohólica (NASH) inducida por la dieta (no es parte de la presente invención)

Se induce un fenotipo de esteatohepatitis (NASH) no alcohólica alimentando a ratones C57Bl/6J machos con la dieta AMLN (D09100301, Research Diet, EE. UU.) (40% de grasa (18% de grasas trans), 40% de carbohidratos (20% de fructosa) y 2% de colesterol) durante 26-35 semanas, antes del inicio del estudio y durante el periodo del estudio. Los ratones se someten a una biopsia de hígado bajo anestesia y los ratones con esteatosis y fibrosis notables se reclutan a un estudio de eficacia. Los inhibidores de LOXL2 se administran por vía oral, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea a 30-100 mg/kg/día durante 12 semanas. Al finalizar el estudio o antes, se toma una muestra de sangre de la vena de la cola para medir ALT, triglicéridos, colesterol total, glucosa en sangre e insulina, como medida del estado metabólico. Al final del estudio, los ratones se sacrifican abriendo la cavidad torácica bajo isoflurano, se extrae sangre mediante punción cardíaca en tubos vacutainer con EDTA y se extrae el hígado. Se fija parte del hígado en formol amortiguado neutro al 10% para su posterior análisis histopatológico de inflamación y fibrosis, mediante tinción con H&E, tricromo o rojo picosirio. El tejido restante se congela rápidamente a -80°C para el posterior análisis de hidroxiprolina del contenido total de colágeno, colesterol total, triglicéridos de hígado y análisis de ARNm.

Ejemplo B-22: Modelo de ratón de NASH inducida a través de una dieta deficiente en colina, definida por aminoácidos (CDAA) suplementada con un alto contenido de grasa (no es parte de la presente invención)

La fibrosis de hígado se induce alimentando a ratones C57Bl/6 con una dieta alta en grasas definida por L-aminoácidos deficiente en colina (CDAHFD) que contiene 60% kcal% de grasa y 0.1% de metionina (Research Diets C/N A06071302) a partir de las 6 semanas de edad. Una vez que los ratones están a dieta durante 4-6 semanas de edad, se discriminan aquellos con deterioro de la función del hígado y se excluyen aquellos con niveles elevados de bilirrubina. Los ratones restantes se asignan a grupos y se inicia la dosificación. Los inhibidores de LOXL2 se administran por vía oral, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea a 30-100 mg/kg/día durante 8-12 semanas adicionales. Al final del estudio, los ratones se sacrifican abriendo la cavidad torácica bajo isoflurano, se extrae sangre mediante punción cardíaca en tubos vacutainer con EDTA y se extrae el hígado. Se fija parte del hígado en formol amortiguado neutro al 10% para su posterior análisis histopatológico de inflamación y fibrosis mediante tinción con H&E, tricromo y/o Rojo picosirio. El tejido restante se congela rápidamente a -80°C para el posterior análisis con hidroxiprolina del contenido total de colágeno, colesterol total, triglicéridos de hígado y/o análisis de ARNm.

Ejemplo B-23: Estudios de Combinación en Fibrosis del Hígado y NASH (no es parte de la presente invención)

Los inhibidores de LOXL2 se pueden utilizar en combinación con otros fármacos para la fibrosis de hígado y la NASH. Los inhibidores de ASK1 se encuentran actualmente bajo investigación en la clínica en múltiples indicaciones fibróticas y demuestran eficacia en modelos de fibrosis de hígado en roedores. Los inhibidores de LOXL2 se prueban solos y en combinación con inhibidores de ASK1 en los modelos de fibrosis de hígado descritos anteriormente, incluyendo los modelos TAA y CDAA-HFD. La JNK1 es una quinasa profibrótica corriente abajo de ASK1, con inhibidores que demuestran eficacia antifibrótica en modelos de roedores. Los inhibidores de JNK1 se están investigando clínicamente para la IPF. Los inhibidores de LOXL2 se prueban solos y en combinación con inhibidores de JNK1, en los modelos de fibrosis de hígado descritos anteriormente, incluyendo los modelos TAA y CDAA-HFD. Las combinaciones adicionales incluyen inhibidores de LOXL2 con agonistas de FXR (OCA), agonistas (GFT505) y antagonistas de PPAR $\alpha/\delta/\gamma$; antagonista dual CCR2/5 (Cenicriviroc); fármacos que se dirigen a la Galectina-3 (GR-MD-02), inhibidores de ACC (NDI-010976). La eficacia se evalúa utilizando una modalidad de dosificación profiláctica o de dosificación terapéutica (comenzando a las 4-6 semanas de edad). La fibrosis se mide usando histológicamente como se describió anteriormente, y la función del hígado se mide utilizando enzimas del hígado. La terapia de combinación es ventajosa cuando la eficacia es mayor que la de cada agente solo o cuando se reduce la dosis requerida para cada fármaco, mejorando así el perfil de efectos secundarios.

Ejemplo B-24: Neovascularización coroidea inducida por láser en los ojos de ratones (no es parte de la presente invención)

La neovascularización (CNV) coroidea inducida por láser es un modelo semiagudo de fibrosis asociada con la degeneración macular relacionada con la edad. Los ratones C57Bl/6 se anestesian con un cóctel de ketamina/xilazina y se les dilatan las pupilas con tropicamida. Se inducen quemaduras con láser en múltiples ubicaciones alrededor del disco óptico, utilizando un láser verde en un sistema de entrega de lámpara de rendija. Se aplican gotas lubricantes para los ojos entre cada punto y se monitorea a los animales para detectar signos de dolor y angustia. Se somete un ojo de cada animal al tratamiento con láser y el ojo contralateral sirve como control no lesionado. Al final del estudio (14-42 días después del tratamiento con láser), los ratones se someten a asfixia con CO₂ y dislocación cervical. Los ojos se enuclean y se fijan durante la noche en paraformaldehído al 1% o formol al 10% y se incrustan en parafina. Las secciones histológicas se tiñen para múltiples parámetros, incluyendo las tinciones estándar con H&E, la tinción con tricromo o rojo picrosirio y varias tinciones de inmunohistoquímica: es decir, anti-CD31 para vasos sanguíneos, proteína ácida antifibrilar para células gliales, anti-CD45 para infiltrado de células inflamatorias. En algunos estudios, la angiogénesis y la integridad vascular se evalúan mediante perfusión retrobulbar con dextrano marcado con FITC durante 2 min; los complejos RPE-coiroides/esclerótica se diseccionan y se montan en un portaobjetos para analizar las fluorescencias y el área vascular. Los inhibidores de LOXL2 se administran por vía oral, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea a 30-100 mg/kg/día o se inyectan por vía intravítrea o tópica en el ojo en solución.

Ejemplo B-25: El Efecto del Inhibidor de LOXL2 en la Invasión de Sinoviocitos (FLS) similares a Fibroblastos (no es parte de la presente invención)

Se examinarán los efectos del compuesto inhibidor de LOXL2 en un estudio de invasión de FLS. El estudio de invasión FLS es un modelo de dos cámaras donde las células invaden a través de Matrigel. Este ensayo *in vitro* se correlaciona con el daño articular *in vivo* (TC Tolboom, *et al.* Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is an individual patient characteristic associated with the rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 52: 1999-2002 (2005)).

Brevemente, las líneas celulares FLS (líneas celulares RA y FLS de roedores) se colocan en la cámara superior. Durante un período de 24 horas, las células invaden la capa de Matrigel y luego pasan a través de los poros en la base de la cámara superior. Se tiñe el fondo de la cámara superior y se cuentan las células.

Se repite el experimento pero ahora las líneas celulares FLS se tratan previamente con concentraciones crecientes del compuesto inhibidor de LOXL2. Por ejemplo, las líneas celulares se tratan previamente con un compuesto inhibidor de LOXL2 durante aproximadamente 1-2 horas para permitir una unión eficiente del compuesto y luego se colocan en la cámara superior sobre la capa de Matrigel.

Ejemplo B-26: Sistema modelo de artritis (CIA) inducida por colágeno (no es parte de la presente invención)

A continuación se describe un ejemplo no limitante de los efectos de los compuestos inhibidores de LOXL2.

En este ejemplo, se evalúa el efecto de los inhibidores de LOXL2 en el desarrollo de la artritis inducida por colágeno, en un sistema modelo de ratón. Se utiliza la cepa de ratón DBA/1, ya que es muy susceptible a la CIA. El día 0 y el día 21, todos los animales son sometidos a una inyección intradérmica en la cola de 200 μ g de colágeno, en 0.1 ml de una emulsión de colágeno Tipo II/Adyuvante Completo de Freund (CFA). La ubicación de la inyección es a una distancia caudal aproximada de 1 cm de la base de la cola.

Los ratones DBA/1 machos, de 6-7 semanas de edad, todos dentro del +20% del peso medio, son asignados aleatoriamente a uno de tres grupos de tratamiento. El Grupo 1 es un grupo de control del vehículo. Los animales de este grupo reciben 10 ml/kg de vehículo (0.5% de metilcelulosa), por vía oral (PO), una vez al día, a partir del Día 16. Los animales del Grupo 2, un grupo de control positivo, reciben 0.05 mg/kg de dexametasona a 10 ml/kg, PO, una vez al día a partir del Día 16. Los animales del Grupo 3 reciben 0.5-60 mg/kg de compuesto inhibidor de LOXL2, una o dos veces al día a partir del Día 16. El estudio finaliza el Día 35 y todos los animales restantes son desangrados con isoflurano seguido de dislocación cervical.

Se examinan los ratones para detectar signos de respuestas artritogénicas en las articulaciones periféricas los Días 0 y 16, y luego diariamente hasta la conclusión del estudio. Las reacciones artríticas se clasifican, para cada pata, en una escala ascendente de gravedad, como sigue:

Grado 0: Ninguna reacción, normal.

Grado 1: Dos articulaciones de las patas traseras o delanteras afectadas o eritema difuso leve e hinchazón.

Grado 2: Tres articulaciones de las patas traseras o delanteras afectadas o eritema difuso moderado e hinchazón

Grado 3: Cuatro articulaciones de las patas traseras o delanteras afectadas o con eritema difuso marcado e hinchazón.

Grado 4: Pata entera afectada, eritema difuso severo e hinchazón intensa, incapaz de flexionar los dedos.

Los exámenes clínicos se realizan el Día 0, el Día 16 y diariamente a partir de entonces. Las observaciones incluyen cambios en la piel, el pelaje, los ojos, las membranas mucosas, aparición de secreciones y excreciones (p. ej., diarrea) y actividad autónoma (p. ej., lagrimeo, salivación, piloerección, tamaño de la pupila y patrón respiratorio inusual). También se observan cambios en la marcha, la postura y la respuesta a la manipulación, así como comportamientos extraños, temblores, convulsiones, sueño y coma.

Los animales se pesan poco antes de la inyección en la cola el Día 0, nuevamente el Día 16 y luego tres veces por semana hasta la finalización del estudio.

Como indicación de artritis experimental, se miden los grosores de ambas patas traseras el Día 0, el Día 16 y todos los días siguientes. Las patas izquierda y derecha se miden dorsoventralmente justo por encima de los dedos y debajo del calcáneo, utilizando un calibrador de cuadrante (Kroeplin, Munich, Alemania).

Al finalizar el estudio, el Día 35, se retiran las patas de todos los animales restantes, se les quita la piel y se fijan en formol amortiguado neutro al 10%. Las secciones delgadas se analizan histológicamente mediante tinción H&E para detectar inflamación, formación de pannus, daño del cartílago y reabsorción ósea.

La evaluación de los datos, para determinar la importancia de cualquier efecto observado, se basa principalmente en la comparación de los valores medios del grupo para las puntuaciones de artritis, el peso corporal y las mediciones del grosor de la pata (todo como se describió anteriormente) mediante ANOVA seguido de un análisis post-hoc de Tukey (Winsat 2005.1 para Excel).

Ejemplo B-27: Ensayo Clínico para la Fibrosis Pulmonar (no es parte de la presente invención)

A continuación se describe un ejemplo no limitativo de un ensayo clínico de fibrosis pulmonar en humanos.

Propósito: Los propósitos de este estudio son evaluar la eficacia del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, como agente único o en combinación, en el tratamiento de pacientes con fibrosis pulmonar, recopilar información sobre cualquier efecto secundario que el compuesto pueda causar como agente único o en combinación y evaluar las propiedades farmacocinéticas del compuesto como agente único o en combinación.

Intervención: A los pacientes se les administran 100-2000 mg del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, por día como agente único o en combinación.

Descripción detallada: A los pacientes se les administrará el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, por vía oral una o dos veces al día como agente único o en combinación. Antes de cada ciclo de dosificación, se realizará un examen físico, análisis de sangre y evaluación de cualquier efecto secundario.

Medidas de resultados primarios: Supervivencia libre de progresión, definida como libre de muerte o una disminución desde la línea base en la FVC de al menos 10%.

Medidas de resultados secundarios: Número de exacerbaciones agudas de la IPF; calidad de vida relacionada con la salud; PO₂ en reposo y en ejercicio desde la línea base; P(A-a)O₂ en reposo y en ejercicio desde la línea

base; FEV1 Predicho desde la línea base; volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV1) a FVC desde la línea base; volúmenes pulmonares pletismográficos desde la línea base; capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLco) desde la línea base; prueba de Caminata de Seis Minutos, desde la línea base: SpO2 en reposo y a los 6 minutos, presencia o ausencia de desaturación al 88% o menos al final de la caminata de seis minutos, distancia recorrida; puntuaciones de disnea de Borg modificadas previas y posteriores; puntuación de la extensión de la fibrosis pulmonar en la HCRT, según dos radiólogos torácicos independientes, desde la línea base; número y gravedad de los efectos adversos.

Elegibilidad: Sujetos masculinos y femeninos de 40 años a 80 años.

Criterios de inclusión: Síntomas clínicos de IPF durante al menos 3 meses; capacidad (FVC) vital forzada entre 50 a 90% del valor predicho; DLco al menos 35% del valor predicho; PaO2 > 55 mm Hg al respirar aire ambiente en reposo; Tomografía (HCRT) computarizada de alta resolución que muestra criterios definitivos o probables de IPF.

Criterios de exclusión: Exposición clínicamente significativa a agentes fibrogénicos conocidos (aves, mohos, asbesto, radiación y fármacos que se sabe que causan fibrosis pulmonar (amiodarona, nitrofurantoína, bleomicina, etc.)); antecedentes de neurofibromatosis, síndrome de Hermansky-Pudlak, trastornos metabólicos de almacenamiento, etc.; antecedentes de fiebre, pérdida de peso, mialgias, artralgias, erupción cutánea, artritis; infección activa dentro de una semana antes del reclutamiento; causa alternativa de enfermedad pulmonar intersticial; relación entre el volumen espiratorio forzado en un segundo (VEF1) y la FVC de menos de 0.6 después del uso de un broncodilatador; volumen residual superior al 120% del valor predicho (cuando esté disponible); más del 20% de linfocitos o eosinófilos en el lavado (BAL) broncoalveolar (cuando esté disponible); granulomas, infección o malignidad en la biopsia transbronquial o quirúrgica (cuando esté disponible); terapia previa con azatioprina, prednisolona (>0.5 mg/kg/día o más durante al menos 3 meses), ciclofosfamida o nuevos fármacos biotecnológicos; enfermedad cardiovascular o neurológica inestable; diabetes no controlada; embarazo; lactancia; probabilidad de muerte, según lo predicho por el investigador, dentro del próximo año; recuento de glóbulos blancos < 4000/mm3; recuento de plaquetas < 100000/mm3; Hematocrito < 30% o > 59%; enzimas del hígado más de 3 veces el límite superior del intervalo normal; nivel de creatinina > 1.5 mg/dL; nivel de albúmina < 3 g/dL; negativa a firmar el consentimiento informado por parte del paciente o tutor.

Ejemplo B-28: Ensayo Clínico para la Fibrosis Hepática (no es parte de la presente invención)

A continuación se describe un ejemplo no limitante de un ensayo clínico de fibrosis del hígado en humanos.

Propósito: Los propósitos de este estudio son evaluar la eficacia del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, como agente único o en combinación, en el tratamiento de pacientes con fibrosis de hígado, recopilar información sobre cualquier efecto secundario que el compuesto pueda causar como agente único o en combinación, y evaluar las propiedades farmacocinéticas del compuesto como agente único o en combinación.

Intervención: A los pacientes se les administran 100-2000 mg del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, por día como agente único o en combinación.

Descripción detallada: A los pacientes se les administrará el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, por vía oral una o dos veces al día como agente único o en combinación. Antes de cada ciclo de dosificación, se realizará un examen físico, análisis de sangre y evaluación de cualquier efecto secundario.

Medidas de resultados primarios: Enzimas del hígado (ALT, AST, ALP), biopsia de hígado

Medidas de resultados secundarios: Los marcadores farmacodinámicos pueden incluir: Marcadores de PD tisulares a través de la expresión de ARNm, autotaxina, LOXL2, LOX, Otros LOXl, proteínas, αSMA, Colágeno 1A1, NF-κB1, Caspasa 1, SMAD y NOD; los marcadores de PD de suero y de plasma incluyen: índice (APRI) de relación AST-plaquetas, actividad de autotaxina, concentraciones de LOXL2, Osteopontina, Ácido hialurónico, CXCL 9, 10 y 11, MMP1, MMP3, MMP9, TIMP1, CD40L, TGF-β1, ET-1, VEGF, GAL3, IL-6 / IL-8 / TNFα / IFNγ, α2-macroglobulina, Apolipoproteína A1, PINP, PIIINP, PVCP-1230, PDGF; Evaluación de los efectos de la dosificación crónica sobre la estructura del hígado y los marcadores fibróticos; incidencia de eventos adversos resultantes de la administración de dosis múltiples del compuesto.

Elegibilidad: Sujetos masculinos y femeninos de 18 a 60 años de edad.

Criterios de inclusión: Fibrosis etapa 1-3 según puntuación Metavir en biopsia de hígado; índice de masa corporal <36 kg/m2.

Criterios de Exclusión: Cualquier evidencia de descompensación hepática pasada o presente; sujetos que actualmente abusan de anfetaminas, cocaína, opiáceos o alcohol; enfermedad cardíaca clínicamente

significativa; antecedentes de cáncer, excepto cáncer de piel no melanomatoso, dentro de los 5 años anteriores a la selección; infección sistémica fúngica, bacteriana, viral u otra infección que no esté controlada; uso de inmunosupresores sistémicos dentro de los 28 días de la Fase de Pretratamiento; uso de terapia aprobada para el virus de la hepatitis C o la hepatitis B dentro de los 28 días de la Fase de Pretratamiento; embarazada o lactante; antecedentes de diátesis hemorrágica dentro de los últimos 6 meses del Día 1 del estudio.

Ejemplo B-29: Ensayo Clínico para la Enfermedad del Hígado Graso/Esteatosis (NAFLD, NASH) (no es parte de la presente invención)

A continuación se describe un ejemplo no limitativo de un ensayo clínico de enfermedad del hígado graso/esteatosis en humanos.

Propósito: Los propósitos de este estudio son evaluar la eficacia del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, como agente único o en combinación, en el tratamiento de pacientes con carcinoma hepatocelular, recopilar información sobre cualquier efecto secundario que el compuesto pueda causar como agente único o en combinación y evaluar las propiedades farmacocinéticas del compuesto como agente único o en combinación.

Intervención: A los pacientes se les administran 10-2000 mg del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, por día como agente único o en combinación.

Descripción detallada: A los pacientes se les administrará el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, por vía oral una o dos veces al día como agente único o en combinación. Antes de cada ciclo de dosificación, se realizará un examen físico, análisis de sangre y evaluación de cualquier efecto secundario.

Elegibilidad: Sujetos masculinos y femeninos de 21 a 80 años de edad.

Criterios de inclusión: Pacientes con diagnóstico clínicamente confirmado de enfermedad del hígado graso no alcohólico o esteatohepatitis no alcohólica; evidencia histológica de esteatohepatitis (NASH) no alcohólica definitiva o probable, basada en una biopsia de hígado obtenida no más de 90 días antes de la aleatorización, y una puntuación (NAS) de actividad de la enfermedad del hígado graso no alcohólico de 4 o más.

Criterios de exclusión: Consumo actual o antecedentes de consumo significativo de alcohol, uso de fármacos históricamente asociados con enfermedad (NAFLD) del hígado graso no alcohólico (amiodarona, metotrexato, glucocorticoides sistémicos, tetraciclinas, tamoxifeno, estrógenos en dosis mayores que las utilizadas para el reemplazo hormonal, esteroides anabólicos, ácido valproico y otras hepatotoxinas conocidas) durante más de 2 semanas en el año anterior a la aleatorización, cirugía bariátrica previa o planificada (durante el período del estudio) (p. ej., gastroplastia, bypass gástrico de roux-en-Y), diabetes no controlada definida como Hemoglobina A1c 9.5% o más dentro de los 60 días previos al reclutamiento, presencia de cirrosis en la biopsia del hígado, recuento de plaquetas por debajo de 100,000/mm³; Evidencia clínica de descompensación hepática definida por la presencia de cualquiera de las siguientes anomalías: albúmina sérica menor a 3.2 gramos/decilitro (g/dL), INR(relación internacional normalizada) mayor a 1.3, bilirrubina directa mayor a 1.3 miligramos por decilitro (mg/dL), antecedentes de varices esofágicas, ascitis o encefalopatía hepática; Evidencia de otras formas de enfermedad crónica del hígado: hepatitis B definida por la presencia del antígeno (HBsAg) de superficie de la hepatitis B, hepatitis C definida por la presencia de ácido ribonucleico (ARN) del virus (VHC) de la hepatitis C o anticuerpo (anti-VHC) positivo de la hepatitis C, evidencia de enfermedad autoinmune del hígado en curso definida por histología de hígado compatible, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, enfermedad de Wilson, deficiencia de Alfa-1-antitripsina (A1AT), antecedentes de hemocromatosis o sobrecarga de hierro, enfermedad del hígado inducida por fármacos definida sobre la base de la exposición y la historia típicas, obstrucción conocida del conducto biliar, cáncer de hígado sospechado o comprobado, cualquier otro tipo de enfermedad del hígado distinta de la esteatohepatitis (NASH) no alcohólica; alanina aminotransferasa (ALT) sérica mayor a 300 unidades por litro (U/L); creatinina del suero de 2.0 mg/dL o mayor; uso de ácido ursodesoxicólico (Ursodiol, Urso) dentro de los 90 días anteriores al reclutamiento, incapacidad para obtener de forma segura una biopsia de hígado, antecedentes de derivación biliar, positividad conocida para la infección por el virus (HIV) de la inmunodeficiencia humana; embarazo, embarazo planificado, posibilidad de embarazo y falta de voluntad para usar un control natal efectivo durante el ensayo, lactancia materna.

Medidas de resultados primarios: Pruebas de función del hígado, biopsia del hígado, puntuación NAS

Medidas de resultados secundarios: biomarcadores fibróticos, imágenes del hígado (ultrasonido, MRI), resistencia a la insulina medida por HOMA-IR, panel lipídico.

Ejemplo B-30: Ensayo Clínico para Cáncer Pancreático (no es parte de la presente invención)

A continuación se describe un ejemplo no limitante de un ensayo clínico de cáncer pancreático en humanos.

Propósito: Los propósitos de este estudio son evaluar la eficacia del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, como agente único o en combinación, en el tratamiento de pacientes con cáncer pancreático, recopilar información sobre cualquier efecto secundario que el compuesto pueda causar como agente único o en combinación y evaluar las propiedades farmacocinéticas del compuesto como agente único o en combinación.

Intervención: A los pacientes se les administran 100-2000 mg del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, por día como agente único o en combinación.

Descripción detallada: A los pacientes se les administrará el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, por vía oral una o dos veces al día como agente único o en combinación. Antes de cada ciclo de dosificación, se realizará un examen físico, análisis de sangre y evaluación de cualquier efecto secundario.

Elegibilidad: Sujetos masculinos y femeninos de 21 a 80 años de edad con cáncer de páncreas avanzado.

Criterios de inclusión: Evidencia radiográfica o clínica de carcinoma pancreático avanzado medible (Etapa II, III, IV). Los sujetos deben tener una enfermedad medible de al menos 2 cm de diámetro. Estado de desempeño ECOG de 0 o 1

Criterios de exclusión: Historia previa de malignidad (excepto carcinoma de célula basal o de célula escamosa o carcinoma in situ de mama) a menos que el sujeto haya estado libre de enfermedad durante > o = a 1 año. Enfermedad cardíaca moderada o grave; Infección activa; No estar embarazada ni amamantando; Prueba de embarazo negativa; Los pacientes fértiles deben usar un procedimiento anticonceptivo efectivo durante y por ≥ 3 meses después de completar el tratamiento del estudio; Ser capaz de tragar medicamentos orales; Ninguna otra neoplasia maligna en los últimos 5 años, excepto cánceres in situ o carcinoma de célula basal o de célula escamosa de la piel; No tener hipersensibilidad o intolerancia a las estatinas; ninguna otra enfermedad sistémica no maligna que impediría la administración de rosuvastatina o un seguimiento prolongado.

Medidas de resultados primarios: Supervivencia libre de progresión, supervivencia general, empeoramiento del dolor, aparición del dolor

Medidas de resultados secundarios: tamaño del tumor / respuesta (RECIST)

Ejemplo B-31: Ensayo Clínico para Carcinoma Hepatocelular (HCC) (no es parte de la presente invención)

A continuación se describe un ejemplo no limitativo de un ensayo clínico de carcinoma hepatocelular en humanos.

Propósito: Los propósitos de este estudio son evaluar la eficacia del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, como agente único o en combinación, en el tratamiento de pacientes con carcinoma hepatocelular, recopilar información sobre cualquier efecto secundario que el compuesto pueda causar como agente único o en combinación y evaluar las propiedades farmacocinéticas del compuesto como agente único o en combinación.

Intervención: A los pacientes se les administran 100-2000 mg del Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, por día como agente único o en combinación.

Descripción detallada: A los pacientes se les administrará el Compuesto I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, por vía oral una o dos veces al día como agente único o en combinación. Antes de cada ciclo de dosificación, se realizará un examen físico, análisis de sangre y evaluación de cualquier efecto secundario.

Elegibilidad: Sujetos masculinos y femeninos de 21 a 80 años de edad.

Criterios de inclusión: Pacientes con diagnóstico confirmado histopatológica o clínicamente de carcinoma hepatocelular; que no responden a la terapia estándar o para quienes la terapia estándar es intolerable, o para quienes no existe una terapia adecuada; puntuación del estado y de desempeño ECOG de 0-2.

Criterios de exclusión: Pacientes con un tumor maligno primario; antecedentes de trasplante de hígado; metástasis cerebral; trastorno psiquiátrico que pueda causar dificultad para obtener el consentimiento informado o para realizar el ensayo; No estar embarazada o amamantando; Los pacientes fértiles deben usar un procedimiento anticonceptivo efectivo durante y por ≥ 3 meses después de completar el tratamiento del estudio; Ninguna otra neoplasia maligna dentro de los últimos 5 años excepto cánceres in situ o carcinoma de célula basal o de célula escamosa de la piel; Ninguna hipersensibilidad o intolerancia a las estatinas; ninguna otra enfermedad sistémica no maligna que impida la administración de rosuvastatina o un seguimiento prolongado.

Medidas de resultados primarios: tiempo hasta la progresión, supervivencia libre de progresión, respuesta global (RECIST)

Medidas de resultados secundarios: pruebas de función de hígado, biomarcadores tumorales

Los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento son para fines ilustrativos.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad o afección en un mamífero que se beneficiaría de la inhibición o reducción de la actividad de LOXL2,
5 en donde el compuesto es un inhibidor de LOXL2 de molécula pequeña que es al menos 100 veces más selectivo para inhibir o unirse a LOXL2 que para LOX;
en donde el inhibidor de LOXL2 de molécula pequeña es:
(R,R)-trans-3-((4-(aminometil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il)oxi)fenil)(3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;
y
10 en donde la enfermedad o afección es mielofibrosis secundaria.
2. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la *(R,R)-trans*-3-((4-(aminometil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il)oxi)fenil)(3-fluoro-4-hidroxipirrolidin-1-il)metanona se administra al mamífero como sal de mesilato.
- 15 3. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la mielofibrosis es mielofibrosis post policitemia vera o post trombocitemia esencial.
4. El compuesto para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde:
el mamífero es un humano.

Figura 1

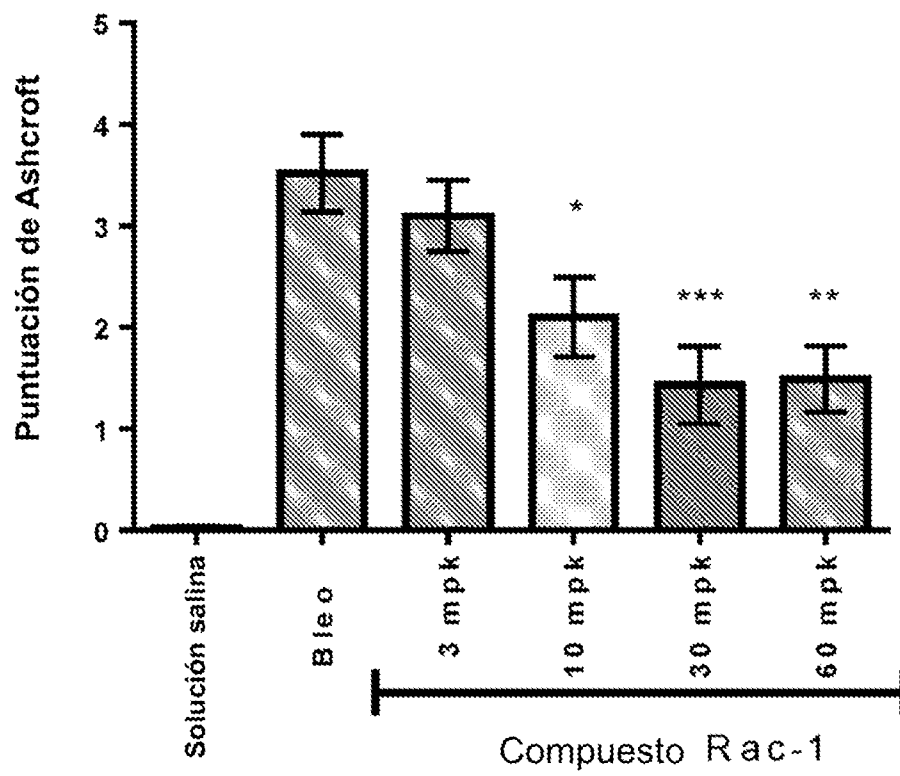


Figura 2

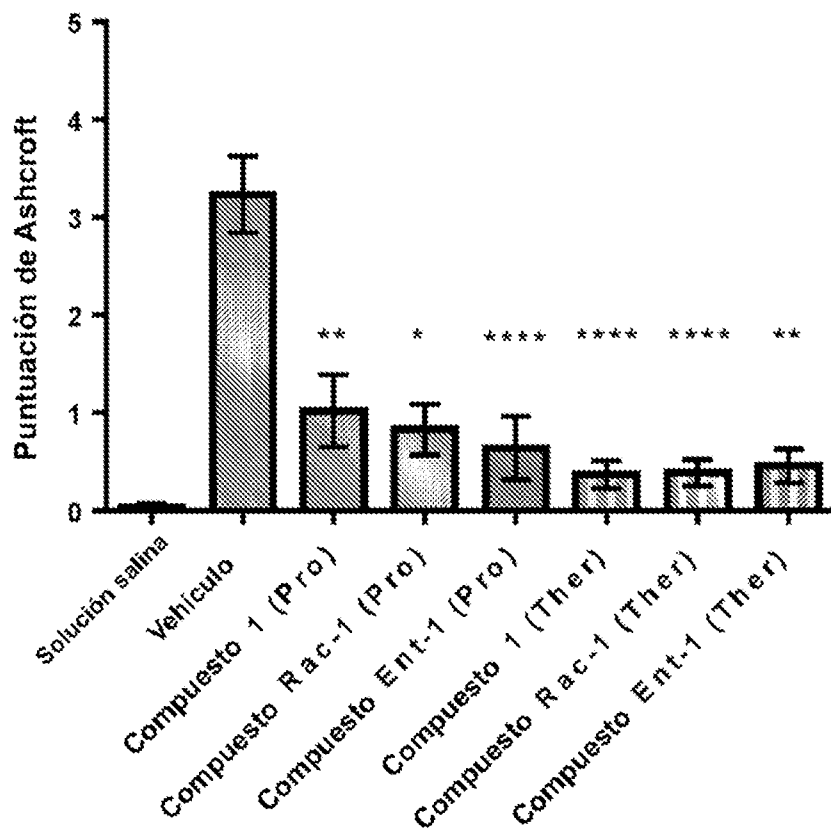


Figura 3

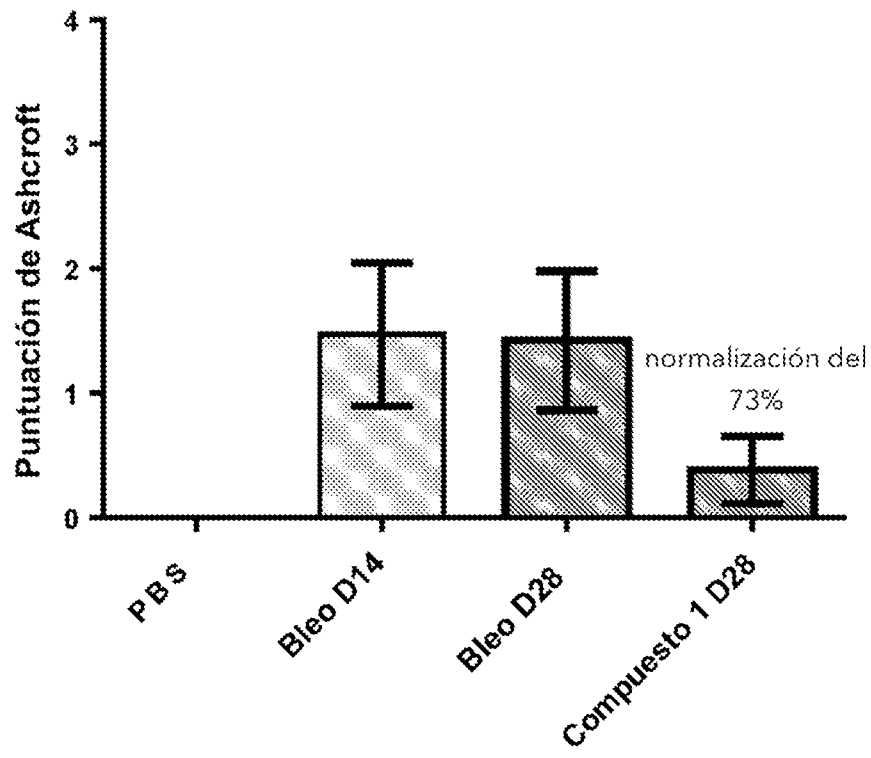


Figura 4

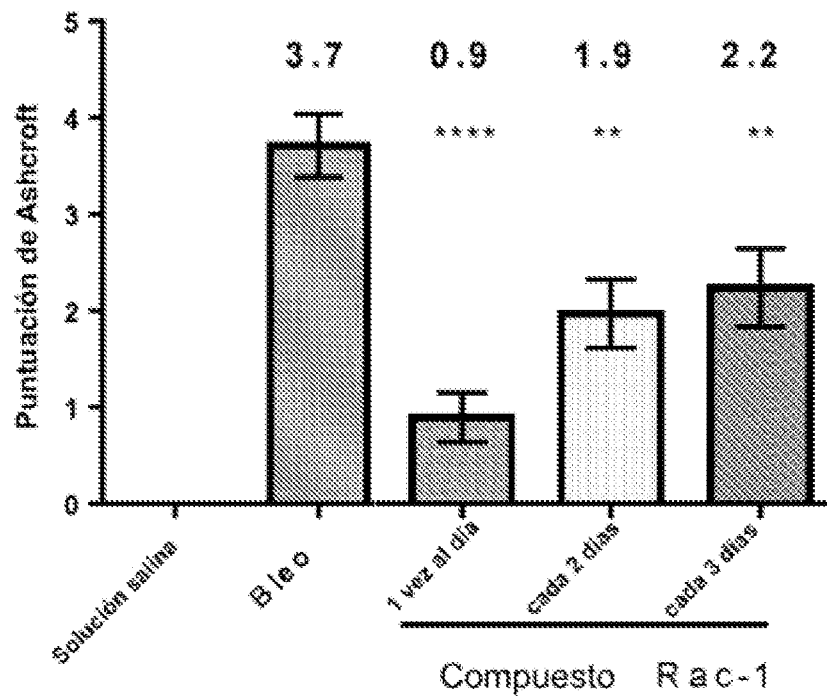


Figura 5

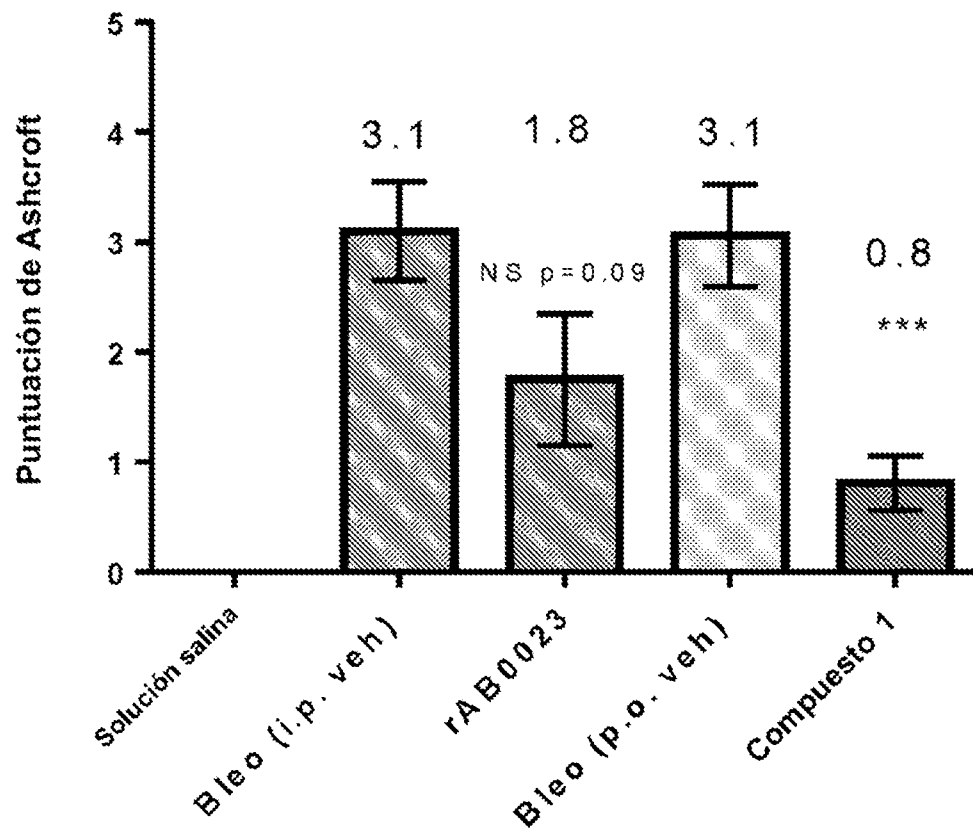


Figura 6a

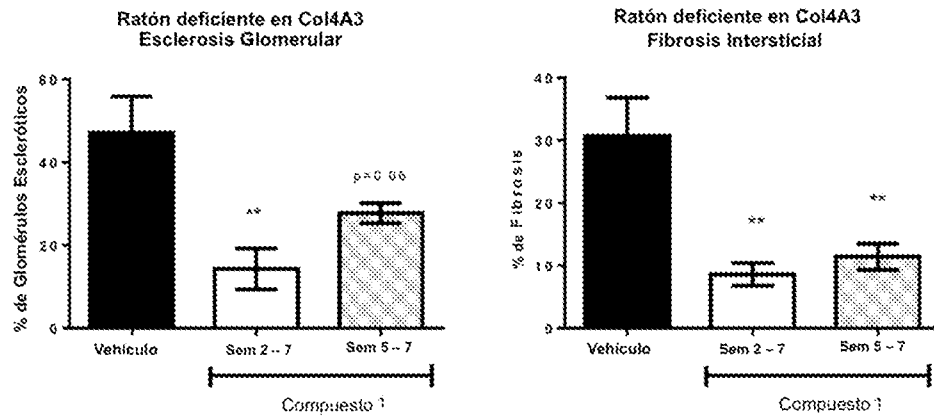


Figura 6b

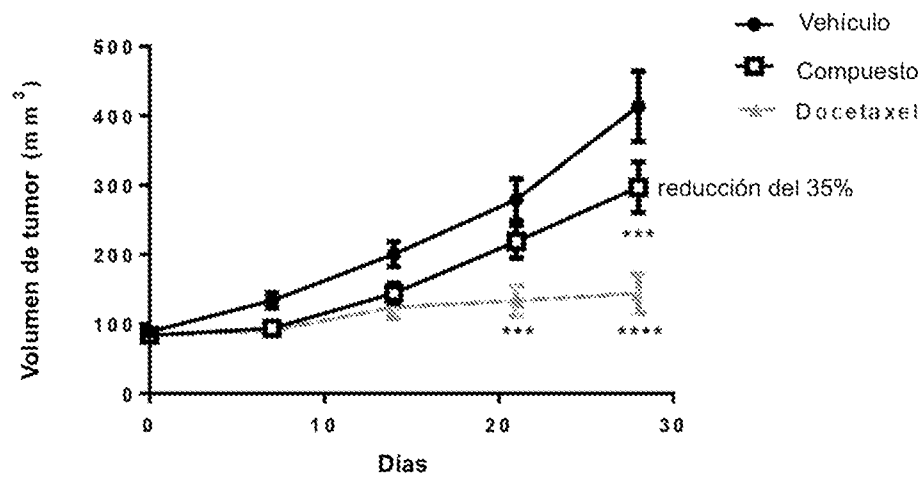


Figura 7

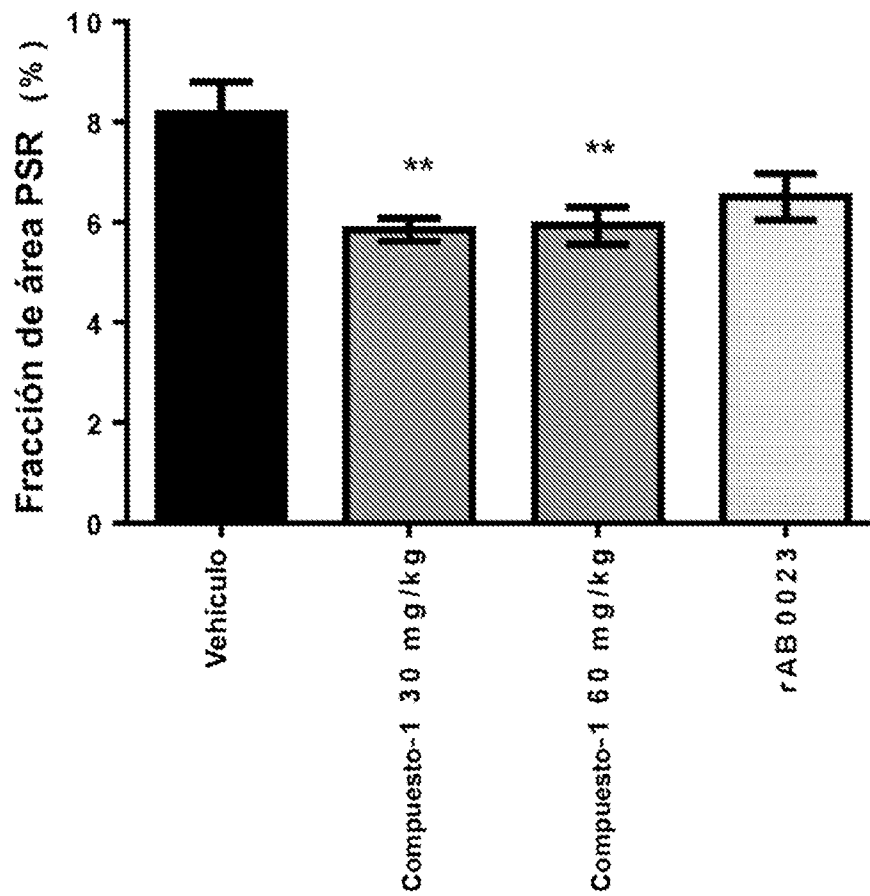


Figura 8

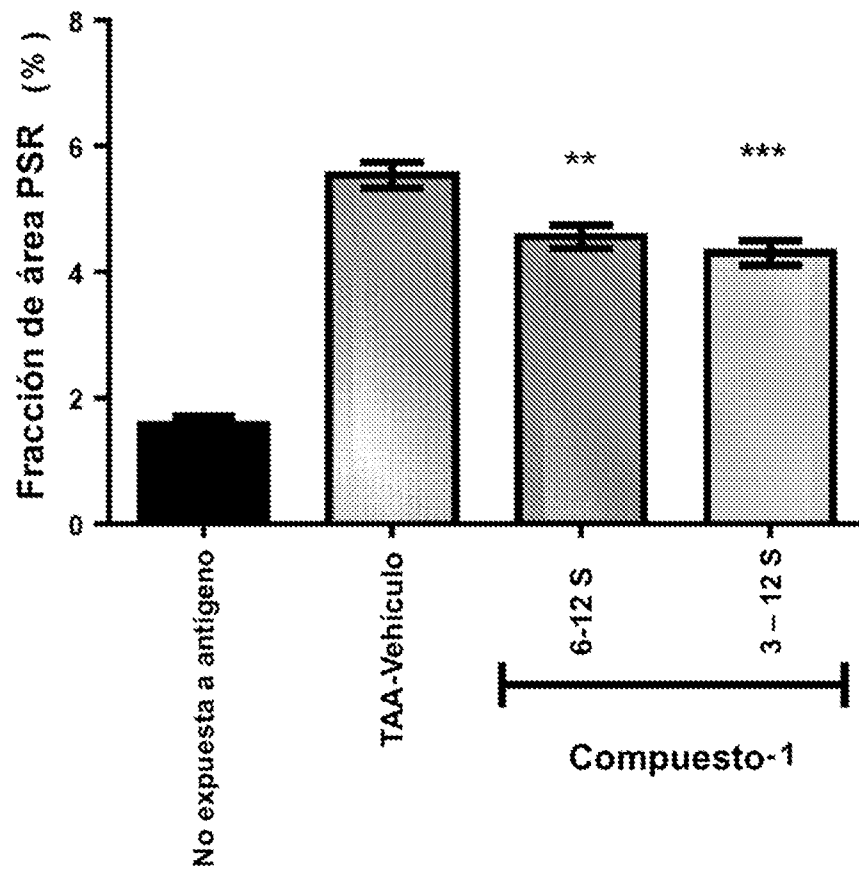


Figura 9

