

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 016 982**

51 Int. Cl.:

C07D 403/12	(2006.01) A61P 27/02	(2006.01)
C07D 413/12	(2006.01) A61P 29/00	(2006.01)
C07D 249/08	(2006.01) A61P 31/12	(2006.01)
A61P 1/00	(2006.01) A61P 35/00	(2006.01)
A61P 3/04	(2006.01) A61P 35/02	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01) A61P 37/02	(2006.01)
A61P 11/00	(2006.01) A61P 37/06	(2006.01)
A61P 17/02	(2006.01) A61P 37/08	(2006.01)
A61P 25/00	(2006.01) A61P 43/00	(2006.01)
A61P 25/28	(2006.01) A61K 31/4196	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2013 E 20153455 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2024 EP 3663291**

54 Título: **Moduladores del transporte nuclear y usos de los mismos**

30 Prioridad:

09.05.2012 US 201261644802 P
15.03.2013 US 201361798188 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2025

73 Titular/es:

KARYOPHARM THERAPEUTICS INC. (100.00%)
85 Wells Avenue
Newton, MA 02459, US

72 Inventor/es:

SANDANAYAKA, VINCENT, P.;
SHECHTER, SHARON;
SHACHAM, SHARON;
MCCAULEY, DILARA y
BALOGLU, ERKAN

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 3 016 982 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

Moduladores del transporte nuclear y usos de los mismos

Aplicaciones relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud provisional estadounidense Núm. 61/644,802, presentada el 9 de mayo de 2012 y de la Solicitud provisional estadounidense Núm. 61/798,188, presentada el 15 de marzo de 2013.

Antecedentes de la invención

10 Las células de la mayoría de las principales neoplasias malignas sólidas y hematológicas humanas muestran una localización celular anormal de una variedad de proteínas oncogénicas, proteínas supresoras de tumores y reguladores del ciclo celular (Cronshaw et al, 2004, Falini et al 2006). Por ejemplo, ciertas mutaciones de p53 conducen a su localización en el citoplasma en lugar de en el núcleo. El resultado es la pérdida de la regulación normal del crecimiento, a pesar de la función supresora de tumores intacta. En otros tumores, el p53 de tipo salvaje se secuestra en el citoplasma o se degrada rápidamente, lo que conduce de nuevo a la pérdida de su función supresora. La restauración de la localización nuclear adecuada de la proteína p53 funcional puede normalizar algunas propiedades de las células neoplásicas (Cai et al, 2008; Hoshino et al 2008; Lain et al 1999a; Lain et al 1999b; Smart et al 1999), puede restaurar la sensibilidad de las células cancerosas a los agentes que dañan el ADN (Cai et al, 2008), y puede conducir a la regresión de tumores establecidos (Sharpless & DePinho 2007, Xue et al, 2007). Se han obtenido datos similares para otras proteínas supresoras de tumores tales como la cabeza de horquilla (Turner y Sullivan 2008) y c-Abl (Vignari y Wang 2001). Además, la localización anormal de varias proteínas supresoras de tumores y reguladoras del crecimiento puede estar implicada en la patogénesis de enfermedades autoinmunes (Davis 2007, Nakahara 2009). La inhibición de Crm1 puede tener una utilidad especialmente interesante en los síndromes de cáncer familiar (por ejemplo, el síndrome de Li-Fraumeni debido a la pérdida de un alelo de p53, los síndromes de cáncer BRCA1 o 2), en los que proteínas supresoras tumorales (PST) específicas están suprimidas o son disfuncionales y en los que el aumento de los niveles de PST por medio de la administración sistémica (o local) de inhibidores de Crm1 podría ayudar a restaurar la función supresora tumoral normal.

30 Proteínas y ARN específicos son transportados dentro y fuera del núcleo por moléculas de transporte especializadas, que se clasifican como importinas si transportan moléculas al núcleo, y exportinas si transportan moléculas fuera del núcleo (Terry et al, 2007; Sorokin et al 2007). Las proteínas que se transportan al núcleo o fuera de él contienen secuencias de importación/localización nuclear (SLN) o exportación (SEN) que les permiten interactuar con los transportadores correspondientes. El Crm1 (Mantenimiento de región cromosómica 1), también llamado exportina-1 o Xpo1, es una exportina importante.

35 Se ha notificado la sobreexpresión de Crm1 en varios tumores, incluidos el cáncer de ovario humano (Noske et al, 2008), el cáncer de cuello uterino (van der Watt et al, 2009), el cáncer de páncreas (Huang et al, 2009), el carcinoma hepatocelular (Pascale et al, 2005) y el osteosarcoma (Yao et al, 2009) y se correlaciona de forma independiente con malos resultados clínicos en estos tipos de tumores.

40 La inhibición de Crm1 bloquea el éxodo de proteínas supresoras de tumores y/o reguladoras del crecimiento tales como p53, c-Abl, p21, p27, pRB, BRCA1, IκB, ICP27, E2F4, KLF5, YAP1, ZAP, KLF5, HDAC4, HDAC5 o proteínas cabeza de horquilla (por ejemplo FOXO3a) del núcleo que están asociadas con la expresión génica, la proliferación celular, la angiogénesis y la epigenética. Se ha demostrado que los inhibidores de la Crm1 inducen la apoptosis de las células cancerosas incluso en presencia de señales oncogénicas activadoras o estimuladoras del crecimiento, al tiempo que preservan las células normales (no transformadas). La mayoría de los estudios sobre la inhibición de Crm1 han utilizado el producto natural inhibidor de Crm1 Leptomomicina B (LMB). El propio LMB es altamente tóxico para las células neoplásicas, pero se tolera mal con una marcada toxicidad gastrointestinal en animales (Roberts et al, 1986) y humanos (Newlands et al, 1996). La derivatización del LMB para mejorar sus propiedades farmacológicas da lugar a compuestos que conservan la actividad antitumoral y son mejor tolerados en modelos tumorales animales (Yang et al, 2007, Yang et al, 2008, Mutka et al, 2009). Por lo tanto, los inhibidores de la exportación nuclear podrían tener efectos beneficiosos en los trastornos neoplásicos y otros trastornos proliferativos. Sin embargo, hasta la fecha, los inhibidores de Crm1 de moléculas pequeñas similares a fármacos para su uso in vitro e in vivo son poco frecuentes.

50 Además de proteínas supresoras de tumores, Crm1 también exporta varias proteínas clave que están implicadas en muchos procesos inflamatorios. Entre ellos se incluyen IκB, NF-κB, Cox-2, RXRα, Commd1, HIF 1, HMGB 1, FOXO, FOXP y otros. La familia de activadores transcripcionales del factor nuclear kappa B (NF-κB/rel), denominada así por el descubrimiento de que impulsa la expresión del gen de la inmunoglobulina kappa, regula la expresión del ARNm de diversos genes implicados en la inflamación, la proliferación, la inmunidad y la supervivencia celular. En condiciones basales, una proteína inhibidora de NF-κB, denominada IκB, se une a NF-κB en el núcleo y el complejo IκB-NF-κB inactiva la función transcripcional de NF-κB. En respuesta a estímulos inflamatorios, IκB se disocia del complejo IκB-NF-κB, lo que libera NF-κB y desenmascara su potente actividad transcripcional. Muchas señales que activan el NF-κB lo hacen dirigiéndose al IκB para su proteólisis (la fosforilación del IκB lo "marca" para su ubiquitinación y posterior proteólisis). El complejo nuclear IκBa-NF-κB puede ser exportado al citoplasma por Crm1, en el que se disocia y NF-

kB puede reactivarse. El IκB biquitinizado también puede disociarse del complejo NF-κB, restaurando la actividad transcripcional NF-κB. La inhibición de la exportación inducida por Crm1 en neutrófilos humanos y células similares a macrófagos (U937) por medio de LMB no sólo da lugar a la acumulación del complejo nuclear IκBa-NF-κB transcripcionalmente inactivo, sino que también impide la activación inicial de NF-κB incluso tras la estimulación celular (Ghosh 2008, Huang 2000). En otro estudio, el tratamiento con LMB inhibió la unión al ADN de NF-κB inducida por IL-1β (la primera etapa en la activación transcripcional de NF-κB), la expresión de IL-8 y la expresión de moléculas de adhesión intercelular en células endoteliales de la microvasculatura pulmonar (Walsh 2008). COMMD1 es otro inhibidor nuclear de la actividad transcripcional tanto de NF-κB como del factor 1 inducible por hipoxia (HIF1). El bloqueo de la exportación nuclear de COMMD1 por medio de la inhibición de Crm1 produce una mayor inhibición de la actividad transcripcional de NF-κB y HIF1 (Muller 2009).

Crm1 también media el transporte del receptor X retinoide α (RXRα). El RXRα está altamente expresado en el hígado y desempeña un papel central en la regulación del metabolismo y la homeostasis de los ácidos biliares, el colesterol, los ácidos grasos, los esteroides y los xenobióticos. Durante la inflamación hepática, los niveles nucleares de RXRα se reducen significativamente, principalmente debido a la exportación nuclear de RXRα mediada por la inflamación por Crm1. La Lep B es capaz de prevenir el aumento citoplasmático de los niveles de RXRα inducido por la IL-1β en células derivadas del hígado humano (Zimmerman 2006).

El papel de la exportación nuclear mediada por Crm1 en la señalización de NF-κB, HIF-1 y RXRα sugiere que el bloqueo de la exportación nuclear puede ser potencialmente beneficioso en muchos procesos inflamatorios a través de múltiples tejidos y órganos incluyendo la vasculatura (vasculitis, arteritis, polimialgia reumática, aterosclerosis), dermatológico (ver arriba), reumatológico (artritis reumatoide y afines, artritis psoriásica, espondiloartropatías, artropatías cristalinas, lupus eritematoso sistémico, enfermedad mixta del tejido conectivo, síndromes de miositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad indiferenciada del tejido conectivo, síndrome de Sjogren, esclerodermia y síndromes de superposición, etc.).

La inhibición de CRM1 afecta a la expresión génica por medio de la inhibición/activación de una serie de factores de transcripción como ICp27, E2F4, KLF5, YAP1, ZAP

La inhibición de Crm1 tiene potenciales efectos terapéuticos a través de muchos síndromes dermatológicos incluyendo dermatosis inflamatorias (atopia, dermatitis alérgica, dermatitis química, psoriasis), daño solar (daño Ultravioleta / UV), e infecciones. La inhibición de CRM1, mejor estudiada con LMB, mostró efectos mínimos en queratinocitos normales, y ejerció actividad antiinflamatoria en queratinocitos sometidos a UV, TNFα u otros estímulos inflamatorios (Kobayashi & Shinkai 2005, Kannan & Jaiswal 2006). La inhibición de Crm1 también regula al alza la actividad de NRF2 (factor nuclear relacionado con el factor eritroide 2), que protege a los queratinocitos (Schafer et al, 2010, Kannan & Jaiswal 2006) y a otros tipos de células (Wang et al, 2009) del daño oxidativo. El LMB induce la apoptosis en queratinocitos infectados con cepas oncogénicas del virus del papiloma humano (VPH), como el VPH16, pero no en queratinocitos no infectados (Jolly et al, 2009).

Crm1 también media el transporte de proteínas neuroprotectoras clave que pueden ser útiles en enfermedades neurodegenerativas incluyendo la Enfermedad de Parkinson (EP), la Enfermedad de Alzheimer y la Esclerosis Lateral Amiotrófica. Por ejemplo, (1) forzando la retención nuclear de reguladores neuroprotectores clave como NRF2 (Wang 2009), FOXA2 (Kittappa et al, 2007), aparcando en células neuronales y/o (2) inhibiendo la actividad transcripcional de NFκB secuestrando IκB al núcleo en células gliales, la inhibición de Crm1 podría ralentizar o prevenir la muerte celular neuronal encontrada en estos trastornos. También hay pruebas que relacionan la proliferación anormal de células gliales con anomalías en los niveles de CRM1 o en la función de CR1 (Shen 2008).

La exportación nuclear intacta, mediada principalmente a través de CRM1, también es necesaria para la maduración intacta de muchos virus. Entre los virus en cuyo ciclo vital se ha implicado la exportación nuclear y/o el propio CRM1 se encuentran el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el adenovirus, el retrovirus simiesco de tipo 1, el virus de la enfermedad de Borna, la gripe (cepas habituales, así como las cepas H1N1 y H5N1 aviar), virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC), virus del papiloma humano (VPH), virus respiratorio sincitial (VRS), Dungee, coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo, virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo Occidental, virus del herpes simple (VHS), citomegalovirus (CMV) y poliomavirus de células de Merkel (MCV). (Bhuvanakantham 2010, Cohen 2010, Whittaker 1998). Se prevé que en un futuro próximo se descubran otras infecciones víricas que dependan de la exportación nuclear intacta.

La proteína Rev del VIH-1, que circula por el nucléolo y se desplaza entre el núcleo y el citoplasma, facilita la exportación de transcritos del VIH empalmados y no empalmados que contienen ARN de elementos de respuesta Rev (ERR) por la vía de exportación CRM1. La inhibición del transporte de ARN mediado por Rev por medio de inhibidores de CRM1 tales como LepB o PKF050-638 puede detener el proceso transcripcional del VIH-1, inhibir la producción de nuevos viriones de VIH-1 y, por tanto, reducir los niveles de VIH-1 (Pollard 1998, Daelemans 2002).

El virus del dengue (VDEN) es el agente causal de la enfermedad vírica común transmitida por artrópodos, la fiebre del dengue (FD), y su más grave y potencialmente mortal fiebre hemorrágica del dengue (FHD). La FHD parece ser el resultado de una respuesta inflamatoria exuberante al VDEN. La NS5 es la proteína más grande y conservada del VDEN. CRM1 regula el transporte de NS5 del núcleo al citoplasma, en el que se desarrollan la mayoría de las funciones

de NS5. La inhibición de la exportación de NS5 mediada por CRM1 altera la cinética de producción del virus y reduce la inducción de la quimiocina inflamatoria interleucina-8 (IL-8), lo que abre una nueva vía para el tratamiento de las enfermedades causadas por el VDEN y otros flavivirus de importancia médica, como el virus de la hepatitis C (Rawlinson 2009).

- 5 Otras proteínas de unión a ARN codificadas por virus que utilizan CRM1 para salir del núcleo incluyen la proteína del tegumento del VHS tipo 1 (VP13/14, o hUL47), la proteína pp65 del CMV humano, la proteína ORF 3b del coronavirus del SARS y la proteína de la matriz (M) del VRS (Williams 2008, Sánchez 2007, Freundt 2009, Ghildyal 2009).

Curiosamente, muchos de estos virus están asociados con tipos específicos de cáncer humano, incluyendo el carcinoma hepatocelular (CHC) debido a la infección crónica por VHB o VHC, el cáncer de cuello uterino debido al VPH y el carcinoma de células de Merkel asociado al VCM. Por lo tanto, los inhibidores de CRM1 podrían tener efectos beneficiosos tanto en el proceso infeccioso viral como en el proceso de transformación neoplásica debido a estos virus.

10 CRM1 controla la localización nuclear y, por tanto, la actividad de múltiples enzimas metabolizadoras del ADN, incluidas las histonas desacetilasas (HDAC), las histonas acetiltransferasas (HAT) y las histonas metiltransferasas (HMT). Se ha demostrado la supresión de la hipertrofia de cardiomiocitos con inhibidores irreversibles de CRM1 y se cree que está relacionada con la retención nuclear (y activación) de HDAC 5, una enzima conocida por suprimir un programa genético hipertrófico (Monovich et al, 2009). Así pues, la inhibición de CRM1 puede tener efectos beneficiosos en los síndromes hipertróficos, incluidas ciertas formas de insuficiencia cardíaca congestiva y miocardiopatías hipertróficas.

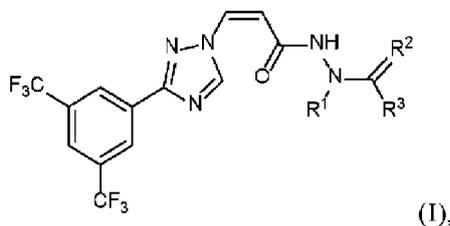
15 CRM1 también se ha relacionado con otros trastornos. El trastorno de Leber, un trastorno hereditario caracterizado por la degeneración de las células ganglionares de la retina y la pérdida visual, está asociado a la inacción del interruptor CRM1 (Gupta N 2008). También hay pruebas que relacionan los trastornos neurodegenerativos con anomalías en el transporte nuclear. El documento WO 2011/109799 se publicó el 9 de septiembre de 2011 y desvela compuestos azólicos heterocíclicos sustituidos, de los que se dice que son inhibidores de CRM1.

20 En vista de lo anterior, es deseable el descubrimiento de compuestos que modulen el transporte nuclear.

La descripción puede abarcar materia que se extiende más allá del alcance de las reivindicaciones. Sin embargo, el alcance de la invención y de la protección se define únicamente por las reivindicaciones adjuntas y no se extenderá más allá de su ámbito. En particular, el ámbito de protección no incluirá ningún procedimiento de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal, incluso si dicha materia se desvela o está implícita en la presente memoria descriptiva.

30 Sumario de la invención

La presente invención se relaciona con una forma de dosificación aceptable por vía oral que comprende un compuesto, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, que es útil como modulador del transporte nuclear, y procedimientos de uso de dichas formas de dosificación aceptables por vía oral en el tratamiento de diversos trastornos. Ahora se ha descubierto que las formas de dosificación aceptables por vía oral que comprenden un modulador del transporte nuclear de la presente invención, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, proporcionan una exposición in vivo deseable, medida por el ABC en ratón, al tiempo que presentan niveles más bajos de penetración cerebral en comparación con otros moduladores. Los compuestos de la invención tienen la fórmula general I:



o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que cada variable es como se define y describe en la reivindicación 1.

45 Las formas de dosificación oralmente aceptables de la presente invención son útiles para tratar una variedad de enfermedades, trastornos o afecciones, asociadas con respuestas celulares anormales desencadenadas por un transporte nuclear inadecuado. Dichas enfermedades, trastornos o afecciones incluyen las descritas en la presente memoria descriptiva.

Los compuestos proporcionados por la presente invención también son útiles para el estudio de la modulación del transporte nuclear en fenómenos biológicos y patológicos; el estudio de vías de transducción de señales intracelulares mediadas por dichas quinasas; y la evaluación comparativa de nuevos moduladores del transporte nuclear.

Breve descripción de las figuras

Lo anterior se desprenderá de la siguiente descripción más particular de realizaciones de ejemplo de la invención.

- 5 La FIG. 1 es un gráfico del volumen tumoral medio frente al tiempo, y muestra el volumen medio de grupo de los tumores xenoinjertados Z-138 en ratones tratados con vehículo, 80 mg/kg de ciclofosfamida, 15 mg/kg de Compuesto 2 o 7,5 mg/kg de Compuesto 2 (las barras de error representan la SEM para cada grupo).
- La FIG. 2 es un gráfico del volumen tumoral medio frente al tiempo, y muestra el volumen medio de grupo de los tumores xenoinjertados A549 en ratones tratados con vehículo, 5 mg/kg de cisplatino, 10 mg/kg de Compuesto 2 o 5 mg/kg de Compuesto 2 (las barras de error representan la SEM para cada grupo).
- 10 La FIG. 3A es un gráfico de la puntuación total de artritis frente al tiempo, y muestra la puntuación clínica de artritis inducida por anticuerpos anticolágeno en ratones BALB/c machos con artritis tratados con vehículo, dexametasona, 4 mg/kg de Compuesto 2 o 7,5 mg/kg de Compuesto 2 durante un período de observación de 12 días (¥ = grupo tratado con dexametasona significativamente diferente del grupo tratado con vehículo; # = grupo tratado con 7,5 mg/kg de Compuesto 2 significativamente diferente del grupo tratado con vehículo; † = grupo tratado con 4 mg/kg de Compuesto 2 significativamente diferente del grupo tratado con vehículo).
- 15 La FIG. 3B es un gráfico de la media de la pata trasera frente al tiempo, y muestra el espesor medio de la pata trasera del grupo de ratones BALB/c machos con artritis inducida por anticuerpos anticolágeno tratados con vehículo, dexametasona, 4 mg/kg de Compuesto 2 o 75 mg/kg de Compuesto 2 durante un periodo de observación de 12 días (¥ = grupo tratado con dexametasona significativamente diferente del grupo tratado con vehículo; # = grupo tratado con 7,5 mg/kg de Compuesto 2 significativamente diferente del grupo tratado con vehículo; † = grupo tratado con 4 mg/kg de Compuesto 2 significativamente diferente del grupo tratado con vehículo).
- 20 La FIG. 4A es un gráfico de la inflamación articular frente al tiempo, y muestra la inflamación articular medida en una escala de 0-4 en ratas ingenuas y ratas tratadas de acuerdo con el modelo AIC, con control positivo, o con el Compuesto 2.
- La FIG. 4B es un gráfico de las puntuaciones clínicas en función del tiempo, y muestra las puntuaciones clínicas de artritis de ratas ingenuas y ratas tratadas de acuerdo con el modelo AIC, con control positivo, o con el Compuesto 2.
- La FIG. 5 son imágenes representativas de cada grupo de tratamiento en el modelo AIC, y muestran la histopatología de las patas traseras de ratas ingenuas y ratas tratadas de acuerdo con el modelo, con control positivo, o con el Compuesto 2.
- 30 La FIG. 6A es un gráfico del espesor de la oreja frente al tiempo, y muestra el espesor medio de la oreja izquierda del grupo de ratones BALB/c hembra tratados con vehículo, PMA y vehículo, PMA y Compuesto 2 o PMA y betametasona.
- La FIG. 6B es un gráfico del espesor de la oreja frente al tiempo, y muestra el espesor medio del grupo de la oreja derecha de ratones BALB/c hembra tratados con vehículo, PMA y vehículo, PMA y Compuesto 2 o PMA y betametasona.
- 35 La FIG. 6C es un gráfico de la actividad de la enfermedad frente al tiempo, y muestra la media de grupo de la actividad de la enfermedad en el oído izquierdo de ratones BALB/c hembra tratados con vehículo, PMA y vehículo, PMA y Compuesto 2 o PMA y betametasona.
- La FIG. 6D es un gráfico de la actividad de la enfermedad frente al tiempo, y muestra la media de grupo de la actividad de la enfermedad en el oído derecho de ratones BALB/c hembra tratados con vehículo, PMA y vehículo, PMA y Compuesto 2 o PMA y betametasona.
- 40 La FIG. 7A es un gráfico del índice de actividad de la enfermedad frente al tiempo, y muestra la actividad de la enfermedad de ratones BALB/c macho tratados con vehículo, IMQ y vehículo, IMQ y 1 µM de Compuesto 2, o IMQ y 10 mg/kg de ciclofosfamida antes de la administración de IMQ.
- La FIG. 7B es un gráfico del índice de actividad de la enfermedad frente al tiempo, y muestra la actividad de la enfermedad de ratones BALB/c macho tratados con vehículo, IMQ y vehículo, IMQ y 1 µM de Compuesto 2, o IMQ y 10 mg/kg de ciclofosfamida tras la administración de IMQ.
- 45 La FIG. 8A es un gráfico de la ingesta acumulativa de alimentos frente al tiempo, y muestra la ingesta acumulativa de alimentos de ratas Zucker delgadas y ratas Zucker obesas tratadas con vehículo (VEH), 1,5 mg/kg de Compuesto 2 o 3,0 mg/kg de Compuesto 2.
- 50 La FIG. 8B es un gráfico de la ingesta media de alimentos frente al tiempo, y muestra la ingesta media de alimentos de ratas Zucker delgadas y ratas Zucker obesas tratadas con vehículo (VEH), 1,5 mg/kg de Compuesto 2 o 3,0 mg/kg de Compuesto 2.

- La FIG. 9 es un gráfico de barras del cambio porcentual del peso corporal frente al tiempo, y muestra el cambio porcentual del peso corporal de ratas Zucker delgadas y ratas Zucker obesas tratadas con vehículo (VEH), 1,5 mg/kg de Compuesto 1 o 3,0 mg/kg de Compuesto 2 durante el periodo de tratamiento (Días de estudio 10 y 17) y durante el periodo de lavado (Día de estudio 24) del experimento.
- 5 La FIG. 10A es un gráfico de la ingesta acumulativa de alimentos frente al tiempo, y muestra la ingesta acumulativa de alimentos de ratas alimentadas con pienso normal y ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con vehículo, 1,5 mg/kg de Compuesto 1 o 3,0 mg/kg de Compuesto 2 durante las fases basal, de tratamiento y de lavado del estudio.
- 10 La FIG. 10B es un gráfico del peso corporal medio frente al tiempo, y muestra el peso corporal medio de ratas alimentadas con pienso normal y ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con vehículo, 1,5 mg/kg de Compuesto 1 o 3,0 mg/kg de Compuesto 2 durante las fases basal, de tratamiento y de lavado del estudio.
- La FIG. 11 es un gráfico de barras de la variación porcentual del peso corporal frente al tiempo, y muestra la variación porcentual del peso corporal de ratas alimentadas con pienso normal y ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con vehículo, 1,5 mg/kg de Compuesto 1 o 3,0 mg/kg de Compuesto 2.
- 15 La FIG. 12A es un gráfico de la expresión de Nrf2 bajo una variedad de condiciones, incluyendo condiciones de knock-down.
- La FIG. 12B es un gráfico de la expresión de NQO1 bajo una variedad de condiciones, incluyendo condiciones de knock-down.
- 20 La FIG. 12C es un gráfico de la expresión de EPHX1 bajo una variedad de condiciones, incluyendo condiciones de knock-down.
- La FIG. 13A es un gráfico de barras del cambio de pliegues de la expresión del ARNm de la COX-2, y muestra que el Compuesto 1 no afecta a la transcripción de la COX-2. El análisis de la expresión del ARNm de COX-2 por medio de qTR-PCR de células HeLa no tratadas (control) se comparó con el de células HeLa tratadas con 10 μ M de compuesto 1, 20 ng/ml de TNF α o 10 μ M de compuesto 1 + 20 ng/ml de TNF α .
- 25 La FIG. 13B es un gráfico de la intensidad de la expresión de la proteína COX-2, y muestra que el Compuesto 1 inhibe la expresión de la proteína COX-2 inducida por TNF α .
- La FIG. 14A es una imagen de células tratadas con DMSO, 20 ng/mL TNF α , o Compuesto 1 + 20 ng/mL TNF α , y muestra la localización de una variedad de proteínas de carga CRM1 relacionadas con la inflamación.
- 30 La FIG. 14B es una imagen de células tratadas con DMSO, 20 ng/mL TNF α , o Compuesto 1 + 20 ng/mL TNF α , y muestra la localización de I κ B, NF κ B, NRF2, PPAR γ y RXR α .
- La FIG. 15A es un gráfico de la latencia para alcanzar la plataforma en la prueba LAM en función del tiempo, y muestra el efecto del tratamiento simulado, el tratamiento de control, el tratamiento con progesterona y las dosis variables del Compuesto 1 sobre la latencia de los ratones para alcanzar la plataforma durante la fase de adquisición de la prueba LAM (los datos representan la media \pm SEM).
- 35 La FIG. 15B es un gráfico de concentración de citoquinas, y muestra la concentración de varias citoquinas en plasma de rata.
- La FIG. 15C son fotografías de cerebros enteros de animales que recibieron lesiones simuladas (Sham), CCI + vehículo (Control), o CCI + Compuesto 1 (6 mg/kg), y muestra los resultados de una inspección visual cualitativa de cerebros enteros antes del seccionamiento con vibratomo. La inspección indicó que ninguno (0 de 4) de los animales Sham presentaba daños en el tejido cortical dorso-medial. En marcado contraste, los cuatro controles de CCI mostraron lesiones bilaterales graves restringidas a esta región del córtex. Los animales CCI que recibieron el Compuesto 1 mostraron daños de moderados a mínimos. Cabe destacar que el cerebro que presentaba la lesión más grave en el grupo del compuesto 1 era menos dramático que todos los cerebros del grupo de control de la CCI.
- 40 La FIG. 15D es una micrografía de baja potencia del marcaje NeuN de la zona cortical dorsal y la zona cortical ventral de animales tratados con sham (Sham), CCI + vehículo (Control), y CCI + Compuesto 1 (KPT).
- 45 La FIG. 15E son fotomicrografías de marcaje inmunofluorescente de IgG de rata y TNF α en animales tratados con sham (Sham), CCI + tratado con vehículo (Control), y CCI + tratado con Compuesto 1 (KPT).
- 50 La FIG. 16A es un gráfico de la puntuación clínica en función del tiempo, y muestra las puntuaciones clínicas de artritis de ratas hembra Lewis ingenuas, ratas hembra Lewis artríticas de control, o ratas hembra Lewis artríticas tratadas con el Compuesto 2.

La FIG. 16B es un gráfico de la inflamación articular en función del tiempo, y muestra la inflamación articular medida en una escala de 0-4 en ratas Lewis hembra ingenuas, ratas Lewis hembra artríticas de control, o ratas Lewis hembra artríticas tratadas con el Compuesto 2.

5 La FIG. 17A es un gráfico de la densidad mineral ósea (DMO) de los huesos tarsianos de ratas Lewis hembra ingenuas, ratas Lewis hembra artríticas de control y ratas Lewis artríticas tratadas con el Compuesto 2.

La FIG. 17B es una visualización por medio de microtomografía computarizada tridimensional de las patas traseras de ratas Lewis hembra ingenuas, ratas Lewis hembra artríticas de control y ratas Lewis hembra artríticas tratadas con el compuesto 2.

10 La FIG. 17C es un gráfico de la concentración de IL-1 β en el líquido sinovial en función del tiempo, y muestra la concentración de IL-1 β en el líquido sinovial recogido de ratas del Grupo A (ingenuas), Grupo B (modelo) y Grupo C (Compuesto 2 a 5 mg/kg QoD) en los Días 21 y 27 del Estudio AIC Núm. 2.

La FIG. 17D es un gráfico de la concentración de IL-6 en el líquido sinovial en función del tiempo, y muestra la concentración de IL-6 en el líquido sinovial recogido de ratas del Grupo A (ingenuas), Grupo B (modelo) y Grupo C (Compuesto 2 a 5 mg/kg QoD) en los Días 21 y 27 del Estudio AIC Núm. 2.

15 La FIG. 17E es un gráfico de la concentración de MCP-1 en el líquido sinovial en función del tiempo, y muestra la concentración de MCP-1 en el líquido sinovial recogido de ratas del Grupo A (ingenuas), Grupo B (modelo) y Grupo C (Compuesto 2 a 5 mg/kg QoD) en los Días 21 y 27 del Estudio AIC Núm. 2.

20 La FIG. 17F es un gráfico de la concentración de PCR en el líquido sinovial en función del tiempo, y muestra la concentración de PCR en el líquido sinovial recogido de ratas del Grupo A (ingenuas), Grupo B (modelo) y Grupo C (Compuesto 2 a 5 mg/kg QoD) en los Días 21 y 27 del Estudio AIC Núm. 2.

La FIG. 17G es un gráfico de la concentración de IL-1 β en suero en función del tiempo, y muestra la concentración de IL-1 β en muestras de suero de rata recogidas de ratas del Grupo A (ingenuas), Grupo B (modelo) y Grupo C (Compuesto 2 a 5 mg/kg QoD) en los Días 15, 21 y 27 del Estudio AIC Núm. 2.

25 La FIG. 18A es un esquema del modelo murino de EAE inducida por MOG en ratones hembra descrito en la presente memoria descriptiva.

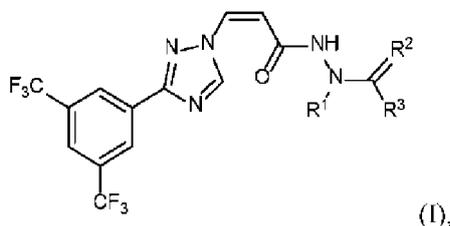
La FIG. 18B es un gráfico de la puntuación clínica en función del día de estudio, y muestra los efectos del tratamiento con vehículo, el tratamiento con dexametasona y el tratamiento con el Compuesto 1 sobre la puntuación clínica de ratones hembra en el modelo murino de EAE inducida por MOG descrito en la presente memoria descriptiva.

30 La FIG. 19 son fotografías de heridas tratadas tópicamente o sistémicamente con el Compuesto 1 o su vehículo apropiado, y muestra los resultados de una evaluación morfológica de la herida realizada el Día 5 tras la herida.

Descripción detallada de la invención

Compuestos de la invención

Una primera realización proporciona una forma de dosificación aceptable por vía oral que comprende un compuesto de fórmula I:



35

o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del mismo, en el que:

R¹ se selecciona entre hidrógeno y C₁-C₄ alquilo;

R² se selecciona entre O y S; y

40 R³ se selecciona entre -N(R⁴)-(C₃-C₆ cicloalquilo), -C₁-C₆ alquilo, -(C₀-C₄ alquilen)-heterociclilo, y -(C₀-C₄ alquilen)-heteroarilo, en el que cualquier porción de alquilo o alquilen de R³ está opcional e independientemente sustituida con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en oxo, -OH, -SH, nitro, halógeno, amino, ciano, C₁-C₁₂ alquilo, C₂-C₁₂ alqueniilo, C₂-C₁₂ alquiniilo, C₁-C₁₂ alcoxi, C₁-C₁₂ haloalquilo, C₁-C₁₂ haloalcoxi y C₁-C₁₂ alquil sulfanilo;

- cualquier porción heterociclífica de R³ comprende al menos un átomo de nitrógeno en un anillo, y está opcionalmente sustituida con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en oxo, -OH, -SH, nitro, halógeno, amino, ciano, C₁-C₁₂ alquilo, C₂-C₁₂ alqueno, C₂-C₁₂ alquino, C₁-C₁₂ alcoxi, C₁-C₁₂ haloalquilo, C₁-C₁₂ haloalcoxi y C₁-C₁₂ alquilsulfanilo; y
- 5 cualquier porción heteroarilo de R³ comprende al menos un átomo de nitrógeno en un anillo y está opcionalmente sustituido con uno o más -OH, -SH, nitro, halógeno, amino, ciano, C₁-C₁₂ alquilo, C₂-C₁₂ alqueno, C₂-C₁₂ alquino, C₁-C₁₂ alcoxi, C₁-C₁₂ haloalquilo, C₁-C₁₂ haloalcoxi y C₁-C₁₂ alquil sulfanilo; y
- R⁴ se selecciona entre hidrógeno y C₁-C₄ alquilo; y
- un portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 En un primer aspecto de la primera realización, R¹ se selecciona entre hidrógeno y metilo. Los valores de las demás variables son los descritos en la primera realización.
- En un segundo aspecto de la primera realización, R¹ es hidrógeno. Los valores de las demás variables son los descritos en la primera realización.
- 15 En un tercer aspecto de la primera realización, R² es O. Los valores para las variables restantes son como se describen en la primera realización, o primer o segundo aspecto de la misma.
- En un cuarto aspecto de la primera realización, R² es S. Los valores para las variables restantes son como se describen en la primera realización, o en los aspectos primero a tercero de la misma.
- En un quinto aspecto de la primera realización, R⁴ es hidrógeno.
- 20 En un sexto aspecto de la primera realización, R³ se selecciona de -N(R⁴)-(C₃-C₆ cicloalquilo), -C₃-C₆ alquilo, -(C₀-C₁ alqueno)-heterociclilo, y -(C₀-C₁ alqueno)-heteroarilo, en el que cualquier porción de alquilo o alqueno de R³ está opcionalmente sustituida con -N(R⁵)₂, en el que cada R⁵ se selecciona independientemente entre hidrógeno y C₁-C₄ alquilo; cualquier porción heterociclífica y heteroarílica de R³ comprende al menos un átomo de nitrógeno en un anillo; y cualquier porción heterociclífica y heteroarílica de R³ está opcionalmente sustituida con C₁-C₄ alquilo. Los valores de las variables restantes son los descritos en la primera realización, o en los aspectos primero a quinto de la misma.
- 25 En un séptimo aspecto de la primera realización, R³ se selecciona de -C(CH₃)₃, -CH(NH₂)-CH(CH₃)₂, -NH-ciclopropilo, -(CH₂)₀₋₁-pirazinilo, piperidinilo, hidroxipiperidinilo, N-metilpiperidinilo, -CH₂-morfolin-4-ilo y metilpirazolilo. Los valores de las variables restantes son los descritos en la primera realización, o en los aspectos primero a quinto de la misma.
- 30 En un octavo aspecto de la primera realización, R³ se selecciona de -C(CH₃)₃, -CH(NH₂)-CH(CH₃)₂, -NH-ciclopropil, -(CH₂)₀₋₁-pirazin-2-il, piperidin-3-il, -CH₂-morfolin-4-il, y 5-metil-1-*H*-pirazol-4-il. Los valores de las variables restantes son los descritos en la primera realización, o en los aspectos primero a quinto de la misma.
- En un noveno aspecto de la primera realización, R³ se selecciona de -C(CH₃)₃, -NH-ciclopropil, -CH₂-pirazin-2-il, -pirazin-2-il, -CH₂-morfolin-4-il, y 5-metil-1-*H*-pirazol-4-il. Los valores de las variables restantes son los descritos en la primera realización, o en los aspectos primero a quinto de la misma.
- 35 Una segunda realización es una forma de dosificación aceptable por vía oral que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R³ se selecciona de -N(R⁴)-(C₃-C₆ cicloalquilo), -C₃-C₆ alquilo, -(C₀-C₁ alqueno)-heterociclilo, y -(C₀-C₁ alqueno)-heteroarilo, en el que:
- cualquier porción de alquilo o alqueno de R³ está opcionalmente sustituida con -N(R⁵)₂, en el que cada R⁵ se selecciona independientemente entre hidrógeno y C₁-C₄ alquilo;
- 40 cualquier porción heterociclífica y heteroarílica de R³ comprende al menos un átomo de nitrógeno en un anillo; y cualquier heterociclo, y la porción heteroarilo de R³ está opcionalmente sustituida con C₁-C₄ alquilo.
- En un primer aspecto de la segunda realización, R³ se selecciona de -C(CH₃)₃, -CH(NH₂)-CH(CH₃)₂, -NH-ciclopropilo, -(CH₂)₀₋₁-pirazinilo, piperidinilo, hidroxipiperidinilo, N-metilpiperidinilo, -CH₂-morfolin-4-ilo y metilpirazolilo.
- 45 En un segundo aspecto de la segunda realización, R³ se selecciona de -C(CH₃)₃, -CH(NH₂)-CH(CH₃)₂, -NH-ciclopropil, -(CH₂)₀₋₁-pirazin-2-il, piperidin-3-il, -CH₂-morfolin-4-il, y 5-metil-1-*H*-pirazol-4-il.
- En un tercer aspecto de la segunda realización, R³ se selecciona de -C(CH₃)₃, -NH-ciclopropil, -CH₂-pirazin-2-il, -pirazin-2-il, -CH₂-morfolin-4-il, y 5-metil-1-*H*-pirazol-4-il.
- Una tercera realización proporciona una forma de dosificación aceptable por vía oral que comprende un compuesto de fórmula I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R³ se selecciona de -N(R⁴)-(C₃-C₆ cicloalquilo), -C₃-C₆ alquilo, -(C₀-C₁ alqueno)-heterociclilo, y -(C₀-C₁ alqueno)-heteroarilo, en el que:
- 50

cualquier porción de alquilo o alquileo de cualquier R³ está opcional e independientemente sustituida con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en oxo y -N(R⁵)₂, en el que cada R⁵ se selecciona independientemente de hidrógeno y C₁-C₄ alquilo;

5 cualquier porción heterociclífica de R³ comprende al menos un átomo de nitrógeno en un anillo, y está opcionalmente sustituida con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo formado por C₁-C₄ alquilo y oxo; y

cualquier porción heteroarilo de R³ comprende al menos un átomo de nitrógeno en un anillo y está opcionalmente sustituido con uno o más C₁-C₄ alquilo. Los valores de las variables restantes son los descritos en la primera realización, o en los aspectos primero a quinto de la misma.

10 En un primer aspecto de la tercera realización, R³ es -(C₀-C₁ alquileo)-heterociclilo. Los valores de las variables restantes son los descritos en la primera realización, o en los aspectos primero a quinto de la misma.

En un segundo aspecto de la tercera realización, R³ es -(C₀-C₁ alquileo)-heterociclilo, en el que el heterociclilo se selecciona entre pirazinilo, piperidinilo, morfolinilo y pirazolilo. Los valores de las variables restantes son los descritos en la primera realización, o en los aspectos primero a quinto de la misma.

15 En un tercer aspecto de la tercera realización, R³ es -(C₀-C₁ alquileo)-heterociclilo, en el que el heterociclilo es morfolinilo. Los valores de las variables restantes son los descritos en la primera realización, o en los aspectos primero a quinto de la misma.

En un cuarto aspecto de la tercera realización, R³ es -(C₁ alquileo)-heterociclilo. Los valores de las variables restantes son los descritos en la primera realización, o en los aspectos primero a quinto de la misma.

20 En un quinto aspecto de la tercera realización, R³ es -(C₁ alquileo)-morfolinilo. Los valores de las variables restantes son los descritos en la primera realización, o en los aspectos primero a quinto de la misma.

En la Tabla 1 se exponen compuestos ejemplares de fórmula I.

Tabla 1. Compuestos ejemplares de fórmula I.

Núm. Cmpd	Estructura del compuesto	Datos físicos (¹ H RMN y LCMS (M+H) ⁺)
1		¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆ , ppm) δ = 10,35 (s, 1H), 9,66 (s, 1H), 9,64 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,28 (s, 1H), 7,48-7,50 (d, J=8 Hz, 1H), 6,00-6,03 (d, J=12 Hz, 1H), 1,15 (s, 9H). LCMS calcd: 450,36, encontrado: 450,19 (tiempo de retención 2,89 min, pureza: 94,5%).
2		¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆ , ppm) δ = 10,56 (s, 1H), 9,94 (s, 1H), 9,61 (s, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,28 (s, 2H), 7,48-7,51 (d, J=10,8 Hz, 1H), 6,01-6,03 (d, J=10,4 Hz, 1H), 3,60-3,62 (t, 4H), 3,08 (s, 2H). LCMS calcd: 493,38, encontrado: 493,24 (tiempo de retención 2,29 min, pureza: 99,48%).
3		¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆ , ppm) δ = 13,01 (bs, 1H), 10,47 (bs, 1H), 10,03 (s, 1H), 9,70 (s, 1H), 8,56 (s, 2H), 8,28 (s, 1H), 7,97 (bs, 1H), 7,51-7,54 (d, J=10,8 Hz, 1H), 6,06-6,08 (d, J=10,4 Hz, 1H), 2,41 (s, 3H). LCMS calcd: 474,34, encontrado: 474,14 (tiempo de retención 2,51 min, pureza: 99,88%).
4		¹ H RMN (400 MHz, MeOD, ppm) δ = 9,67 (s, 1H), 8,66 (s, 2H), 8,09 (s, 1H), 7,44-7,47 (d, J=10,8 Hz, 1H), 6,02 (m, 1H), 4,64 (s, 1H), 3,33 (m, 1H), 2,88 (m, 1H), 0,91 (m, 2H), 0,79 (m, 2H). LCMS calcd para: C ₁₇ H ₁₅ F ₆ N ₆ OS [M+H] ⁺ : 465,40, encontrado: 465,19 (tiempo de retención 2,78 min, pureza: 99,63%).
5		¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆ , ppm) δ = 10,36 (s, 1H), 9,10 (s, 1H), 8,53 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,32-7,34 (d, J=10,0 Hz, 1H), 6,05-6,07 (d, J=10,0 Hz, 1H), 3,56 (s, 4H), 3,10 (s, 3H), 3,05 (s, 2H), 2,51 (s, 4H). LCMS calcd para: C ₂₀ H ₂₁ F ₆ N ₆ O ₃ [M+H] ⁺ : 507,41, encontrado: 507,24 (tiempo de retención 2,40 min, pureza: 99,61%).

ES 3 016 982 T3

6		¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , ppm) δ = 9,73 (s, 1H), 8,56 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,41-7,44 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 5,98-6,00 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 2,91 (d, 1H), 2,81 (d, 1H), 2,34-2,58 (m, 4H), 1,77 (m, 1H), 1,54 (m, 2H), 1,34 (m, 1H), 1,23 (s, 2H). LCMS calcd: 477,38, encontrado: 477,24 (tiempo de retención 2,38 min, pureza: 95,46%).
7		¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , ppm) δ = 10,88 (s, 1H), 10,76 (s, 1H), 9,58 (s, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,31 (s, 1H), 8,24 (s, 2H), 7,53-7,56 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 6,06-6,09 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 3,69 (s, 1H), 2,13 (m, 1H), 1,01 (d, 6H). LCMS calcd: 465,37, encontrado: 465,24 (tiempo de retención 2,45 min, pureza: 95,19%).
8		¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , ppm) δ = 10,95 (s, 1H), 10,82 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 9,22 (s, 1H), 8,95 (s, 1H), 8,81 (s, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,56-7,53 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 6,10-6,08 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H). LCMS calcd: 472,32, encontrado: 472,14 (tiempo de retención 2,68 min, pureza: 93,5%).
9		¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , ppm) δ = 10,61 (s, 1H), 10,26 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,30 (s, 1H), 7,52-7,49 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 6,02-6,05 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 3,38 (m, 3H), 2,91 (m, 2H), 2,70 (s, 3H), 1,80 (m, 2H), 1,76 (m, 2H). LCMS calcd: 491,41, encontrado: 491,24 (tiempo de retención 2,28 min, pureza: 99,97%).
10		¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , ppm) δ = 10,88 (s, 1H), 10,76 (s, 1H), 9,58 (s, 1H), 8,55 (s, 2H), 8,31 (s, 1H), 8,24 (s, 2H), 7,53-7,56 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 6,06-6,09 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 3,69 (s, 1H), 2,13 (m, 1H), 1,01 (d, 6H). LCMS calcd: 465,37, encontrado: 465,24 (tiempo de retención 2,45 min, pureza: 95,19%).
11		¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , ppm) δ = 10,69 (s, 1H), 10,54 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,58 (m, 2H), 8,56 (s, 2H), 8,28 (s, 1H), 7,49-7,51 (d, <i>J</i> =10,8 Hz, 1H), 6,01-6,04 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 3,84 (s, 2H). LCMS calcd: 486,35, encontrado: 486,29 (tiempo de retención 2,49 min, pureza: 99,96%).
12		¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10,70-10,88 (m, 2H), 9,56 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,52-7,55 (d, <i>J</i> = 10,4 Hz, 1H), 6,0-6,03 (d, <i>J</i> = 10,4 Hz, 1H), 3,51-3,64 (m, 8H). LCMS <i>m/z</i> 507,25 [M+H] ⁺ , <i>t_R</i> = 2,012 min.
13		¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10,58 (s, 1H), 9,83 (s, 1H), 9,56 (s, 1H), 8,54-8,56 (m, 2H), 8,25-8,30(m, 1H), 7,49-7,51 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 6,01-6,04 (d, <i>J</i> =10,4 Hz, 1H), 3,44-3,57 (m, 2H), 3,28-3,34 (m, 2H), 3,21 (s, 1H), 3,15 (s, 1H), 2,84-2,88 (m, 2H), 0,93-1,04(m, 6H): LCMS <i>m/z</i> 521,18 [M+H] ⁺ , <i>t_R</i> 1,898 min.
14		¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10,33 (bs, 2H), 9,63 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,30 (s, 1H), 7,50-7,52 (d, <i>J</i> = 8 Hz, 1H)), 6,01-6,03 (d, <i>J</i> = 8 Hz, 1H), 4,08-4,12 (m, 4H), 3,85-3,87 (m, 2H), 3,41-3,44 (m, 2H). LCMS <i>m/z</i> 507,13 [M+H] ⁺ , <i>t_R</i> 1,950 min.
15		¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10,55 (s, 1H), 9,81 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,56 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,49-7,51 (d, <i>J</i> = 10,4 Hz, 1H)), 6,01-6,03 (d, <i>J</i> = 10,4 Hz, 1H), 3,65-3,67 (m, 2H), 3,30-3,34 (m, 2H), 3,08 (bs, 2H), 2,55-2,58 (m, 2H), 0,96 (s, 6H). LCMS <i>m/z</i> 521,18 [M+H] ⁺ , <i>t_R</i> 1,937 min.

En algunas realizaciones, el compuesto de la invención se selecciona de uno cualquiera de los compuestos 1 a 11. En un aspecto de estas realizaciones, el compuesto se selecciona de uno cualquiera de los compuestos 1, 2, 3, 4, 8 y 11. En un aspecto de estas realizaciones, el compuesto se selecciona de cualquiera de los compuestos 1, 2, 3, 4, 8, 11, 12 y 13 o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 La farmacocinética (FC) desempeña un papel cada vez más importante en el descubrimiento y desarrollo de fármacos. La farmacocinética es el estudio cuantitativo del curso temporal de la absorción, distribución, metabolismo y/o excreción de los fármacos. Cuando se administra un fármaco, se distribuye rápidamente desde el lugar de administración a la circulación sanguínea sistémica. Una medida del grado de distribución de un agente terapéutico es el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (ABC), calculada hasta la última concentración medida (ABC_t) y extrapolada hasta el infinito (ABC_{inf}). Así pues, la ABC es una métrica utilizada con frecuencia para cuantificar la exposición a los fármacos.

10 En general, cuanto mayor es la exposición de un agente terapéutico, mayores son los efectos del agente. Sin embargo, una exposición elevada a un agente terapéutico puede tener efectos nocivos en determinados tejidos, como el cerebro. Si bien la barrera hematoencefálica (BHE), una red protectora formada por uniones estrechas entre células endoteliales, restringe la difusión de moléculas hidrofílicas y/o de gran tamaño, los fármacos con una ABC elevada siguen siendo capaces de penetrar la BHE y/o el líquido cefalorraquídeo. Esta penetración suele ser indeseable y puede provocar efectos secundarios no deseados. Los esfuerzos actuales de descubrimiento de fármacos se dirigen, en parte, a lograr un equilibrio entre la maximización de la exposición al fármaco (es decir, ABC) y la minimización de la penetración cerebral.

15 La relación cerebro/plasma (B:P) es uno de estos procedimientos para cuantificar la distribución relativa de un agente terapéutico en el tejido cerebral con respecto a la de la circulación. Dicha proporción proporciona una indicación de la penetración cerebral de un determinado agente terapéutico. Se prefiere una elevada proporción cerebro/plasma cuando se atacan enfermedades localizadas en el sistema nervioso central (SNC), incluidos el cerebro y el líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, suele ser preferente una relación cerebro/plasma más baja para los agentes terapéuticos no relacionados con el SNC, a fin de minimizar la penetración cerebral y evitar posibles efectos secundarios. Por lo tanto, es preferente una relación cerebro/plasma baja para evitar la acumulación no deseada de agentes terapéuticos en el cerebro y el tejido del SNC.

20 Como se expone con más detalle en la sección Ejemplo, los compuestos de la presente invención muestran un ABC más alto y/o un B:P más bajo en comparación con otros inhibidores del transporte nuclear, tales como los desvelados en la solicitud de patente cotitular de Estados Unidos Núm. 13/041,377, presentada el 5 de marzo de 2011 y publicada como US 2009/0275607 el 10 de noviembre de 2011. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I, en el que el compuesto tiene <math><1\mu\text{M}</math> (menos de inf de más de aproximadamente 3500; y un B:P de menos de aproximadamente 2,5 cuando se dosifica en un ratón a 10 mg/kg po.

25 Las características novedosas de la presente invención se harán evidentes para los expertos en la materia al examinar la siguiente descripción detallada de la invención.

Compuestos y definiciones

Los compuestos de la presente invención incluyen los descritos en general anteriormente, y se ilustran además por las clases, subclases y especies desveladas en la presente memoria descriptiva. A menos que se indique lo contrario, se aplicarán las siguientes definiciones. A efectos de la presente invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed. Además, los principios generales de la química orgánica se describen en "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, y "March's Advanced Organic Chemistry", 5^a Ed., Ed.: Smith, M.B. y March, J., John Wiley & Sons, Nueva York: 2001.

45 A menos que se especifique lo contrario dentro de esta especificación, la nomenclatura usada en esta especificación sigue generalmente los ejemplos y reglas indicados en Nomenclatura de Química Orgánica, Secciones A, B, C, D, E, F, y H, Pergamon Press, Oxford, 1979. Opcionalmente, el nombre de un compuesto puede generarse mediante el uso de un programa de nomenclatura química: ACD/ChemSketch, Version 5.09/September 2001, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada.

50 Los compuestos de la presente invención pueden tener centros asimétricos, ejes quirales y planos quirales (por ejemplo, como se describe en: E. L. Eliel y S. H. Wilen, Stereo-chemistry of Carbon Compounds, John Wiley & Sons, Nueva York, 1994, páginas 1119-1190), y se presentan como racematos, mezclas racémicas y como diastereómeros o enantiómeros individuales, incluyéndose en la presente invención todos los isómeros y mezclas de los mismos posibles, incluidos los isómeros ópticos.

55 El término "halo" o "halógeno", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, significa halógeno e incluye, por ejemplo, y sin estar limitado a ello, fluro, cloro, bromo, yodo y similares, tanto en formas radiactivas como no radiactivas.

El término "alquilo", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario, significa radicales hidrocarbonados monovalentes saturados rectos o ramificados, típicamente C₁-C₁₂, preferentemente C₁-C₆. Como tal, "C₁-C₆ alquilo" significa un radical hidrocarbonado monovalente saturado, recto o ramificado, que tiene de uno a seis átomos de carbono (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6). Algunos ejemplos de grupos alquilo son, entre otros, metilo, etilo, propilo, isopropilo y t-butilo.

Se entiende que los sustituyentes y los patrones de sustitución en los compuestos de la invención pueden seleccionarse por alguien con conocimientos ordinarios en la materia para proporcionar compuestos que sean químicamente estables y que puedan sintetizarse fácilmente por medio de técnicas conocidas en la materia, así como aquellos procedimientos que se exponen a continuación. En general, el término "sustituido", tanto si va precedido del término "opcionalmente" como si no, significa que uno o más hidrógenos de la fracción designada se sustituyen por un sustituyente adecuado. A menos que se indique lo contrario, un "grupo opcionalmente sustituido" puede tener un sustituyente adecuado en cada posición sustituible del grupo y, cuando más de una posición en cualquier estructura dada pueda sustituirse con más de un sustituyente seleccionado de un grupo especificado, el sustituyente puede ser el mismo o diferente en cada posición. Alternativamente, un "grupo opcionalmente sustituido" puede no estar sustituido.

Las combinaciones de sustituyentes previstas por la presente invención son preferentemente aquellas que dan lugar a la formación de compuestos estables o químicamente viables. Si un sustituyente está a su vez sustituido con más de un grupo, se entiende que estos grupos múltiples pueden estar en el mismo átomo de carbono o en átomos de carbono diferentes, siempre que resulte una estructura estable. El término "estable", tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se relaciona con compuestos que no se alteran sustancialmente cuando se someten a condiciones que permiten su producción, detección y, en determinadas realizaciones, su recuperación, purificación y uso para uno o más de los fines aquí descritos.

Los sustituyentes monovalentes adecuados en un átomo de carbono sustituible de un "grupo opcionalmente sustituido" son independientemente halógeno; -(CH₂)₀₋₄R°; -(CH₂)₀₋₄OR°; -O(CH₂)₀₋₄R°, -O-(CH₂)₀₋₄C(O)OR°; -(CH₂)₀₋₄CH(OR°)₂; -(CH₂)₀₋₄SR°; -(CH₂)₀₋₄Ph, que puede sustituirse con R°; -(CH₂)₀₋₄O(CH₂)₀₋₁Ph, que puede estar sustituido con R°; -CH=CHPh, que puede estar sustituido con R°; -(CH₂)₀₋₄O(CH₂)₀₋₁-piridilo que puede estar sustituido con R°; -NO₂; -CN; -N₃; -(CH₂)₀₋₄N(R°)₂; -(CH₂)₀₋₄N(R°)C(O)R°; -N(R°)C(S)R°; -(CH₂)₀₋₄N(R°)C(O)NR°₂; -N(R°)C(S)NR°₂; -(CH₂)₀₋₄N(R°)C(O)OR°; -N(R°)N(R°)C(O)R°; -N(R°)N(R°)C(O)NR°₂; -N(R°)N(R°)C(O)OR°; -(CH₂)₀₋₄C(O)R°; -C(S)R°; -(CH₂)₀₋₄C(O)OR°; -(CH₂)₀₋₄C(O)SR°; -(CH₂)₀₋₄C(O)OSiR°₃; -(CH₂)₀₋₄OC(O)R°; -OC(O)(CH₂)₀₋₄SR-, SC(S)SR°; -(CH₂)₀₋₄SC(O)R°; -(CH₂)₀₋₄C(O)NR°₂; -C(S)NR°₂; -C(S)SR°; -SC(S)SR°; -(CH₂)₀₋₄OC(O)NR°₂; -C(O)N(OR°)R°; -C(O)C(O)R°; -C(O)CH₂C(O)R°; -C(NOR°)R°; -(CH₂)₀₋₄SSR°; -(CH₂)₀₋₄S(O)₂R°; -(CH₂)₀₋₄S(O)₂OR°; -(CH₂)₀₋₄OS(O)₂R°; -S(O)₂NR°₂; -(CH₂)₀₋₄S(O)R°; -N(R°)S(O)₂NR°₂; -N(R°)S(O)₂R°; -N(OR°)R°; -C(NH)NR°₂; -P(O)₂R°; -P(O)R°₂; -OP(O)R°₂; -OP(O)(OR°)₂; SiR°₃; -(C₁₋₄ alquileo recto o ramificado)O-N(R°)₂; o -(C₁₋₄ alquileo recto o ramificado)C(O)O-N(R°)₂, en el que cada R° puede estar sustituido como se define a continuación y es independientemente hidrógeno, C₁₋₆ alifático, -CH₂Ph, -O(CH₂)₀₋₁Ph, -CH₂-(anillo heteroarilo de 5-6 miembros), o un anillo de 5-6 miembros saturado, parcialmente insaturado, o arilo con 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno y azufre, o, no obstante la definición anterior, dos apariciones independientes de R°, junto con su(s) átomo(s) intermedio(s), forman un anillo monocíclico o bicíclico saturado, parcialmente insaturado o arilo de 3-12 miembros con 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno y azufre, que puede estar sustituido como se define a continuación.

Los sustituyentes monovalentes adecuados en R° (o el anillo formado tomando dos ocurrencias independientes de R° junto con sus átomos intermedios), son independientemente halógeno, -(CH₂)₀₋₂R°, -(haloR°), -(CH₂)₀₋₂OH, -(CH₂)₀₋₂OR°, -(CH₂)₀₋₂CH(OR°)₂; -O(haloR°), -CN, -N₃, -(CH₂)₀₋₂C(O)R°, -(CH₂)₀₋₂C(O)OH, -(CH₂)₀₋₂C(O)OR°, -(CH₂)₀₋₂SR°, -(CH₂)₀₋₂SH, -(CH₂)₀₋₂NH₂, -(CH₂)₀₋₂NHR°, -(CH₂)₀₋₂NR°₂, -NO₂, -SiR°₃, -OSiR°₃, -C(O)SR°, -(C₁₋₄ alquileo recto o ramificado)C(O)OR°, o -SSR° en el que cada R° está sin sustituir o donde precedido por "halo" está sustituido sólo con uno o más halógenos, y se selecciona independientemente entre C₁₋₄ alifáticos, -CH₂Ph, -O(CH₂)₀₋₁Ph, o un anillo saturado, parcialmente insaturado o arilo de 5-6 miembros con 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno y azufre. Los sustituyentes divalentes adecuados en un átomo de carbono saturado de R° incluyen =O y =S.

Los sustituyentes divalentes adecuados en un átomo de carbono saturado de un "grupo opcionalmente sustituido" incluyen los siguientes: =O, =S, =NNR°₂, =NNHC(O)R°, =NNHC(O)OR°, =NNHS(O)₂R°, =NR°, =NOR°, -O(C(R°)₂)₂₋₃O-, y -S(C(R°)₂)₂₋₃S-, en el que cada ocurrencia independiente de R° se selecciona entre hidrógeno, C₁₋₆ alifático que puede estar sustituido como se define a continuación, o un anillo saturado, parcialmente insaturado o arílico de 5-6 miembros no sustituido que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno y azufre. Los sustituyentes divalentes adecuados que se unen a los carbonos sustituibles vicinales de un grupo "opcionalmente sustituido" incluyen: -O(CR°₂)₂₋₃O-, en el que cada ocurrencia independiente de R° se selecciona entre hidrógeno, C₁₋₆ alifático que puede estar sustituido como se define a continuación, o un anillo saturado, parcialmente insaturado o arilo de 5-6 miembros no sustituido que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno y azufre.

Los sustituyentes adecuados en el grupo alifático de R° incluyen halógeno, -R°, -(haloR°), -OH, -OR°, -O(haloR°), -CN, -C(O)OH, -C(O)OR°, -NH₂, -NHR°, -NR°₂, y -NO₂, en los que cada R° no está sustituido o, cuando está precedido por

"halo", está sustituido únicamente por uno o más halógenos, y es independientemente C₁₋₄ alifático, -CH₂Ph, -O(CH₂)₀₋₁Ph, o un anillo saturado, parcialmente insaturado o arilo de 5-6 miembros con 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno y azufre.

5 Los sustituyentes adecuados en un nitrógeno sustituible de un "grupo opcionalmente sustituido" incluyen -R[†], -NR^{†2}, -C(O)R[†], -C(O)OR[†], -C(O)C(O)R[†], -C(O)CH₂C(O)R[†], -S(O)₂R[†], -S(O)₂NR^{†2}, -C(S)NR^{†2}, -C(NH)NR^{†2}, y -N(R[†])S(O)₂R[†]; en el que cada R[†] es independientemente hidrógeno, C₁₋₆ alifático que puede estar sustituido como se define a continuación, -OPh no sustituido, o un anillo saturado, parcialmente insaturado o arilo de 5-6 miembros no sustituido que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno y azufre, o, no obstante la definición anterior, dos apariciones independientes de R[†], junto con su(s) átomo(s) intermedio(s), forman un anillo monocíclico o bicíclico saturado, parcialmente insaturado o arílico de 3-12 miembros no sustituido con 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno y azufre.

10 Los sustituyentes adecuados en el grupo alifático de R[†] son independientemente halógeno, -R*, -(haloR⁻), -OH, -OR⁻, -O(haloR⁻), -CN, -C(O)OH, -C(O)OR⁻, -NH₂, -NHR⁻, -NR⁻², o -NO₂, en el que cada R⁻ no está sustituido o, cuando está precedido por "halo", está sustituido sólo con uno o más halógenos, y es independientemente C₁₋₄ alifático, -CH₂Ph, -O(CH₂)₀₋₁Ph, o un anillo saturado, parcialmente insaturado o arilo de 5-6 miembros con 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno y azufre.

15 Los sustituyentes preferentes en el heteroarilo pueden seleccionarse del grupo que consiste en -OH, -SH, nitro, halógeno, amino, ciano, C₁-C₁₂ alquilo, C₂-C₁₂ alquenilo, C₂-C₁₂ alquinilo, C₁-C₁₂ alcoxi, C₁-C₁₂ haloalquilo, C₁-C₁₂ haloalcoxi y C₁-C₁₂ alquil sulfanilo. Los sustituyentes preferentes en alquilo, alquilenos y heterociclilo incluyen los sustituyentes preferentes en heteroarilo y oxo. En una realización, el sustituyente en un alquilo, alquilenos, heterociclilo o heteroarilo es un grupo amino que tiene la fórmula -N(R⁵)₂, en la que cada R⁵ se selecciona independientemente entre hidrógeno y C₁-C₄ alquilo.

20 Los sustituyentes en alquilo, alquilenos, heterociclilo y heteroarilo pueden seleccionarse entre -OH, -SH, nitro, halógeno, amino, ciano, C₁-C₁₂ alquilo, C₂-C₁₂ alquenilo, C₂-C₁₂ grupo alquinilo, C₁-C₁₂ alcoxi, C₁-C₁₂ haloalquilo, C₁-C₁₂ haloalcoxi y C₁-C₁₂ alquil sulfanilo. En una realización, el sustituyente es un grupo amino que tiene la fórmula -N(R⁵)₂, en la que cada R⁵ se selecciona independientemente entre hidrógeno y C₁-C₄ alquilo.

25 El término "cicloalquilo", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, significa hidrocarburos cíclicos saturados, es decir, compuestos en los que todos los átomos del anillo son carbonos. Ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo. En algunas realizaciones, el cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre -OH, -SH, halógeno, amino, nitro, ciano, C₁-C₁₂ alquilo, C₂-C₁₂ alquenilo o C₂-C₁₂ alquinilo, C₁-C₁₂ alcoxi, C₁-C₁₂ haloalquilo, y C₁-C₁₂ haloalcoxi.

30 El término "heteroarilo", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se relaciona con grupos aromáticos que contienen uno o más heteroátomos (O, S o N). Un grupo heteroarilo puede ser monocíclico o policíclico, por ejemplo, un anillo heteroarilo monocíclico fusionado a uno o más grupos aromáticos carbocíclicos o a otros grupos heteroarilos monocíclicos. Los grupos heteroarilo de esta invención también pueden incluir sistemas de anillos sustituidos con uno o más motivos oxo. Ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, piridinilo, piridazinilo, imidazolilo, pirimidinilo, pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, quinolilo, isoquinolilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolilo, bencimidazolilo, benzofuranoilo, cinolinilo, indazolilo, indolizínilo, ftalazinilo, piridazinilo, triazinilo, isoindolilo, purinilo, oxadiazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotiriazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, dihidroquinolilo, tetrahidroquinolilo, dihidroisoquinolilo, tetrahidroisoquinolilo, benzofurilo, furopiridinilo, pirolopirimidinilo y azaindolilo.

35 Los grupos heteroarilo anteriores pueden estar unidos a C o unidos a N (cuando sea posible). Por ejemplo, un grupo derivado del pirrol puede ser pirrol-1-ilo (N-acoplado) o pirrol-3-ilo (C-acoplado).

"Heterociclilo" significa un anillo alifático cíclico saturado o insaturado de 4-13 miembros que contiene 1, 2, 3, 4 o 5 heteroátomos seleccionados independientemente entre N, O o S. Cuando un heteroátomo es S, puede estar opcionalmente mono- o di-oxigenado (es decir, -S(O)- o -S(O)₂-). El heterociclilo puede ser monocíclico, bicíclico fusionado, bicíclico con puente, espirobicíclico o policíclico.

50 "Oxo" significa =O.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "alquenilo" significa un hidrocarburo no cíclico de cadena recta o ramificada saturado que tiene de 2 a 12 átomos de carbono y que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los grupos alquenilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "alquinilo" significa un hidrocarburo no cíclico de cadena recta o ramificada saturado que tiene de 2 a 12 átomos de carbono y que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los grupos alquinilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "alquileo" se relaciona con un grupo alquilo que tiene dos puntos de unión con el resto del compuesto. Ejemplos no limitantes de grupos alquileo incluyen metileno (-CH₂-), etileno (-CH₂CH₂-), n-propileno (-CH₂CH₂CH₂-), isopropileno (-CH₂CH(CH₃)-), y similares. Los grupos alquileo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes.

- 5 El término "haloalquilo", como se usa en la presente memoria descriptiva, incluye un alquilo sustituido con uno o más F, Cl, Br, o I, donde alquilo se define anteriormente.

Los términos "alcoxi", tal como se utilizan en la presente memoria descriptiva, significan un grupo "alquilo-O-", en el que alquilo se define anteriormente. Ejemplos de grupo alcoxi son los grupos metoxi o etoxi.

- 10 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se relaciona con aquellas sales que son, dentro del ámbito del buen juicio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, y son proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge y otros, describen sales farmacéuticamente aceptables en detalle en J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen las derivadas de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos adecuados. Ejemplos de sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables y no tóxicas son las sales de un grupo amino formadas con ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico, el ácido bromhídrico, el ácido fosfórico, el ácido sulfúrico y el ácido perclórico o con ácidos orgánicos tales como el ácido acético, el ácido trifluoroacético (ácido 2,2,2-trifluoroacético), el ácido oxálico, el ácido maleico, el ácido tartárico, el ácido cítrico, el ácido succínico o el ácido malónico, o por medio de otros procedimientos utilizados en la técnica, tal como el intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, trifluoroacetato (2,2,2-trifluoroacetato), undecanoato, sales de valerato y similares.

- 25 Las sales derivadas de bases apropiadas incluyen sales de metal alcalino, metal alcalinotérreo, amonio y N⁺(C₁₋₄alquilo)₄. Las sales representativas de metales alcalinos o alcalinotérreos incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen, en su caso, amonio no tóxico, amonio cuaternario y cationes de amina formados por medio de contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato de alquilo inferior y sulfonato de arilo.

- 30 A menos que se indique lo contrario, las estructuras representadas en la presente memoria descriptiva también se entiende que incluyen todas las formas isoméricas (por ejemplo, enantioméricas, diastereoméricas y geométricas (o conformacionales)) de la estructura; por ejemplo, las configuraciones R y S para cada centro asimétrico, isómeros de doble enlace Z y E, e isómeros conformacionales Z y E. Por lo tanto, los isómeros estereoquímicos simples, así como las mezclas enantioméricas, diastereoméricas y geométricas (o conformacionales) de los presentes compuestos están dentro del alcance de la invención. A menos que se indique lo contrario, todas las formas tautoméricas de los compuestos de la invención están dentro del alcance de la invención. Además, a menos que se indique lo contrario, las estructuras aquí representadas también incluyen compuestos que difieren únicamente en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras incluyendo la sustitución de hidrógeno por deuterio o tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido en ¹³C- o ¹⁴C están dentro del alcance de esta invención. Tales compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas analíticas, como sondas en ensayos biológicos o como agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención.

- 35 El término "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal de adición ácida o una sal de adición básica que es compatible con el tratamiento de pacientes.

- 40 En algunas realizaciones, los ácidos inorgánicos ejemplares que forman sales adecuadas incluyen, pero no se limitan a ellos, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico y sales metálicas ácidas tales como ortofosfato monohidrógeno de sodio y sulfato ácido de potasio. Los ácidos orgánicos ilustrativos que forman sales adecuadas incluyen los ácidos mono-, di- y tricarbónicos. Son ilustrativos de tales ácidos, por ejemplo, el acético, el trifluoroacético (ácido 2,2,2-trifluoroacético), el glicólico, el láctico, el pirúvico, el malónico, el succínico, el glutárico, el fumárico, el málico, el tartárico, el cítrico, el ascórbico, maléico, hidroximaleico, benzoico, hidroxibenzoico, fenilacético, cinámico, salicílico, 2-fenoxibenzoico, p-toluenosulfónico y otros ácidos sulfónicos tales como el metanosulfónico y el 2-hidroxietanosulfónico. Pueden formarse sales mono o diácidas, y tales sales pueden existir en forma hidratada, solvatada o sustancialmente anhidra. En general, las sales de adición ácida de estos compuestos son más solubles en agua y en varios disolventes orgánicos hidrófilos, y suelen presentar puntos de fusión más altos en comparación con sus formas de base libre. Otras sales no farmacéuticamente aceptables, por ejemplo los oxalatos, pueden utilizarse, por ejemplo, en el aislamiento de compuestos de Fórmula I para uso en laboratorio, o para su posterior conversión en una sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable.

Una "sal de adición básica farmacéuticamente aceptable" es cualquier sal de adición de base orgánica o inorgánica no tóxica de los compuestos ácidos representados por la Fórmula I o cualquiera de sus intermedios. Las bases inorgánicas ilustrativas que forman sales adecuadas incluyen, entre otros, hidróxidos de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio o bario. Las bases orgánicas ilustrativas que forman sales adecuadas incluyen amins orgánicas alifáticas, alicíclicas o aromáticas como la metilamina, la trimetilamina y la picolina o el amoníaco. La selección de la sal adecuada puede ser importante para que no se hidrolice una funcionalidad de éster, si existe, en otra parte de la molécula. Los criterios de selección de la sal adecuada serán conocidos por los expertos en la materia.

Las sales de adición ácida de los compuestos de Fórmula I se forman más adecuadamente a partir de ácidos farmacéuticamente aceptables, e incluyen por ejemplo las formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico, y ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido succínico, ácido maleico, ácido acético, ácido trifluoroacético o ácido fumárico. Otras sales no farmacéuticamente aceptables, por ejemplo los oxalatos, pueden utilizarse, por ejemplo, en el aislamiento de compuestos de Fórmula I para uso en laboratorio, o para su posterior conversión en una sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable. También se incluyen en el ámbito de la invención las sales de adición de bases (tales como las sales de sodio, potasio y amonio), los solvatos y los hidratos de compuestos de la invención. La conversión de una sal compuesta dada en una sal compuesta deseada se consigue aplicando técnicas estándar, bien conocidas por los expertos en la materia.

El término "estereoisómeros" es un término general para todos los isómeros de las moléculas individuales que difieren sólo en la orientación de sus átomos en el espacio. Incluye los isómeros de imagen especular (enantiómeros), los isómeros geométricos (cis/trans) y los isómeros de compuestos con más de un centro quiral que no son imágenes especulares entre sí (diastereómeros).

El término "tratar" significa aliviar los síntomas, eliminar la causalidad de los síntomas ya sea de forma temporal o permanente, o prevenir o ralentizar la aparición de los síntomas del trastorno o afección mencionados.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad del compuesto que es eficaz para tratar o disminuir la gravedad de uno o más síntomas de un trastorno o afección.

Al introducir elementos desvelados en la presente memoria descriptiva, los artículos "un", "una", "el", "la", "dicha" y "dicho" pretenden significar que hay uno o más de los elementos. Los términos "que comprenda", "que tenga", "que incluya" tienen un significado abierto y significan que puede haber otros elementos además de los enumerados.

Usos, formulación y administración

Composiciones farmacéuticamente aceptables

La invención proporciona una forma de dosificación aceptable por vía oral que comprende un compuesto de esta invención o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. La cantidad de compuesto en una forma de dosificación oralmente aceptable de esta invención es tal que es eficaz para inhibir mensurablemente CRM1, en una muestra biológica o en un paciente. En ciertas realizaciones, se formula una forma de dosificación oralmente aceptable de esta invención para su administración a un paciente que necesite tal forma de dosificación. El término "paciente", tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se relaciona con un animal. En algunas realizaciones, el animal es un mamífero. En ciertas realizaciones, el paciente es un paciente veterinario (es decir, un paciente mamífero no humano). En algunas realizaciones, el paciente es un perro. En otras realizaciones, el paciente es un ser humano.

El término "portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable" se relaciona con un portador, adyuvante o vehículo no tóxico que no destruye la actividad farmacológica del compuesto con el que se formula. Los portadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse en las formas de dosificación oralmente aceptables de esta invención incluyen, entre otros, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, como albúmina sérica humana, sustancias amortiguadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana.

Las composiciones aquí descritas pueden administrarse por vía oral, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica), por pulverización inhalatoria, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o a través de un reservorio implantado. En algunos ejemplos, los compuestos o composiciones proporcionados son administrables por vía intravenosa y/o intraperitoneal.

El término "parenteral" tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraocular, intravítrea, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intraperitoneal intralesional e intracraneal. Preferentemente, las composiciones se administran por vía oral. Las formas inyectables estériles de las composiciones aquí desveladas pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la materia mediante el

uso de agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable para los padres, por ejemplo como solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro sódico. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como disolvente o medio de suspensión.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable incluyendo, pero sin limitarse a, cápsulas, comprimidos, suspensiones acuosas o soluciones. En el caso de los comprimidos para uso oral, los soportes utilizados habitualmente son la lactosa y el almidón de maíz. También suelen añadirse agentes lubricantes, tal como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el principio activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también pueden añadirse determinados agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes. En algunas realizaciones, una formulación oral proporcionada está formulada para liberación inmediata o liberación sostenida/retardada. En algunas realizaciones, la composición es adecuada para la administración bucal o sublingual, incluyendo tabletas, pastillas y pastillas. Un compuesto proporcionado también puede estar en forma microencapsulada.

Alternativamente, las composiciones farmacéuticamente aceptables aquí desveladas pueden administrarse en forma de supositorios para administración rectal. Las composiciones farmacéuticamente aceptables aquí desveladas también pueden administrarse por vía tópica, especialmente cuando el objetivo del tratamiento incluye zonas u órganos fácilmente accesibles por medio de aplicación tópica, incluidas enfermedades oculares, cutáneas o del tracto intestinal inferior. Se preparan fácilmente formulaciones tópicas adecuadas para cada una de estas zonas u órganos.

La aplicación tópica para el tracto intestinal inferior puede efectuarse en una formulación de supositorio rectal (véase más arriba) o en una formulación de enema adecuada. También pueden utilizarse parches tópicos transdérmicos.

Para uso oftálmico, las composiciones farmacéuticamente aceptables proporcionadas pueden formularse como suspensiones micronizadas o en una pomada tal como vaselina.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables aquí desveladas también pueden administrarse por medio de aerosol nasal o inhalación.

En algunos ejemplos, las composiciones farmacéuticamente aceptables desveladas en la presente memoria descriptiva pueden formularse para administración intraperitoneal.

La cantidad de compuestos de la presente invención que puede combinarse con los materiales de soporte para producir una forma de dosificación oralmente aceptable en una única forma de dosificación variará dependiendo del huésped tratado, el modo particular de administración. En una realización, las formas de dosificación oralmente aceptables proporcionadas deben formularse de forma que pueda administrarse una dosis de entre 0,01 - 100 mg/kg de peso corporal/día del inhibidor a un paciente que reciba estas formas de dosificación oralmente aceptables. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, o entre 1 mg y 1000 mg/dosis, cada 4 a 120 horas, o de acuerdo con los requisitos del fármaco en particular. Típicamente, la forma de dosificación oralmente aceptable de esta invención se administrará de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 veces al día.

También debe entenderse que una dosis específica y un régimen de tratamiento para cualquier paciente particular dependerán de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, y el juicio del médico tratante y la gravedad de la enfermedad particular que se está tratando. La cantidad de un compuesto de la presente invención en la forma de dosificación oralmente aceptable también dependerá del compuesto particular en la forma de dosificación oralmente aceptable.

Tras la mejoría del estado de un paciente, puede administrarse una dosis de mantenimiento de una forma de dosificación oralmente aceptable de esta invención, si es necesario. Posteriormente, la dosis o la frecuencia de administración, o ambas, pueden reducirse, en función de los síntomas, hasta un nivel en el que se mantenga el estado mejorado cuando los síntomas se hayan aliviado hasta el nivel deseado. Sin embargo, los pacientes pueden requerir un tratamiento intermitente a largo plazo en caso de reaparición de los síntomas de la enfermedad.

Usos de los compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables

Los compuestos, las formas de dosificación oralmente aceptables y las composiciones descritas en la presente memoria descriptiva son generalmente útiles para la inhibición de CRM1 y son por lo tanto útiles para tratar uno o más trastornos asociados con la actividad de CRM1. Así, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar un trastorno mediado por CRM1 que comprende el paso de administrar a un paciente que lo necesite una forma de dosificación oralmente aceptable de la presente invención. Los compuestos, las formas de dosificación oralmente aceptables y las composiciones descritas en la presente memoria descriptiva también pueden

administrarse a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*, o a un sujeto, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y/o diagnosticar una variedad de trastornos, incluidos los descritos en la presente memoria descriptiva.

5 La actividad de un compuesto utilizado en la presente invención como inhibidor de CRM1 puede ensayarse *in vitro*, *in vivo* o en una línea celular. Las condiciones detalladas para ensayar un compuesto utilizado en esta invención como inhibidor de CRM1 se exponen en los Ejemplos siguientes.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término trastorno o afección "mediado por CRM1", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, significa cualquier enfermedad u otra afección deletérea en la que se sabe que CRM1 desempeña un papel. En consecuencia, otra realización de la presente invención se relaciona con tratar o disminuir la gravedad de una o más enfermedades en las que se sabe que CRM1 desempeña un papel. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para tratar una enfermedad asociada con la expresión o actividad de p53, p73, p21, pRB, p27, IκB, NFκB, c-Abl, proteínas FOXO, COX-2, o una HDAC (histona desacetilasas) en un sujeto que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito en la presente memoria descriptiva. En otra realización, la presente invención se relaciona con un procedimiento para tratar o disminuir la gravedad de una enfermedad o afección seleccionada entre un trastorno proliferativo (por ejemplo, cáncer), un trastorno inflamatorio, un trastorno autoinmune, una infección viral, un trastorno oftalmológico o un trastorno neurodegenerativo, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un paciente que lo necesite una forma de dosificación oralmente aceptable de acuerdo con la presente invención. En una realización más específica, la presente invención se relaciona con un procedimiento para tratar o disminuir la gravedad del cáncer. A continuación se detallan ejemplos específicos de los trastornos mencionados.

20 Los cánceres tratables por los compuestos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, neoplasias hematológicas (leucemias, linfomas, mielomas incluyendo mieloma múltiple, síndromes mielodisplásicos y mieloproliferativos) y tumores sólidos (carcinomas tales como próstata, mama, pulmón, colon, páncreas, renal, ovario así como tejido blando y osteosarcomas, y tumores estromales). El cáncer de mama (CM) puede incluir el cáncer de mama de tipo basal (CMTB), el cáncer de mama triple negativo (CMTN) y el cáncer de mama que es a la vez CMTB y CMTN. Además, el
25 cáncer de mama puede incluir el carcinoma ductal o lobulillar invasivo o no invasivo, el carcinoma tubular, medular, mucinoso, papilar, cribiforme de mama, el cáncer de mama masculino, el cáncer de mama recurrente o metastásico, el tumor filoides de mama y la enfermedad de Paget del pezón.

30 Los trastornos inflamatorios tratables por los compuestos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad articular degenerativa, lupus sistémico, esclerosis sistémica, síndromes de vasculitis (de pequeño, mediano y gran vaso), aterosclerosis, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, colitis mucosa, colitis ulcerosa, gastritis, sepsis, psoriasis y otros trastornos inflamatorios dermatológicos (tales como eczema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, urticaria, esclerodermia y dermatosis con componentes inflamatorios agudos, pénfigo, penfigoide, dermatitis alérgica), y síndromes urticariales.

35 Las enfermedades víricas tratables por los compuestos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, faringitis febril aguda, fiebre faringoconjuntival, queratoconjuntivitis epidémica, gastroenteritis infantil, infecciones por Coxsackie, mononucleosis infecciosa, linfoma de Burkitt, hepatitis aguda, hepatitis crónica, cirrosis hepática, carcinoma hepatocelular, infección primaria por VHS-1 (por ejemplo, gingivostomatitis en niños, amigdalitis y faringitis en adultos, queratoconjuntivitis), infección latente por VHS-1 (por ejemplo, herpes labial y herpes labial), infección primaria por VHS-2, infección latente por VHS-2, meningitis aséptica, mononucleosis infecciosa, enfermedad de inclusión
40 citomegálica, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman multicéntrica, linfoma de efusión primaria, SIDA, gripe, síndrome de Reye, sarampión, encefalomiélitis postinfecciosa, parotiditis, lesiones epiteliales hiperplásicas (por ejemplo, verrugas comunes, planas, plantares y anogenitales, papilomas laríngeos, epidermodisplasia verruciforme), carcinoma cervical, carcinomas de células escamosas, crup, neumonía, bronquiolitis, resfriado común, poliomiélitis, rabia, síndrome gripal, bronquiolitis grave con neumonía, sarampión alemán, rubéola congénita, varicela y herpes zóster. Las enfermedades víricas tratables por medio de los compuestos de esta invención también incluyen las infecciones víricas crónicas, incluidas la hepatitis B y la hepatitis C.

45 Trastornos oftalmológicos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, edema macular (edema macular diabético y no diabético), degeneración macular relacionada con la edad formas húmedas y secas, degeneración macular disciforme envejecida, edema macular cistoide, edema palpebral, edema de retina, retinopatía diabética, coriorretinopatía, maculopatía neovascular, glaucoma neovascular, uveítis, iritis, vasculitis retiniana, endoftalmitis, panoftalmitis, oftalmia metastásica, coroiditis, epitelitis pigmentaria retiniana, conjuntivitis, ciclitis, escleritis, epiescleritis, neuritis óptica, neuritis óptica retrobulbar, queratitis, blefaritis, desprendimiento de retina exudativo, úlcera corneal, úlcera conjuntival, queratitis numular crónica, enfermedad oftálmica asociada a hipoxia o isquemia, retinopatía del prematuro, retinopatía diabética proliferativa, vasculopatía coroidea polipoidea, proliferación angiomasosa retiniana, oclusión arterial retiniana,
50 oclusión venosa retiniana, enfermedad de Coats, vitreoretinopatía exudativa familiar, enfermedad sin pulso (enfermedad de Takayasu), enfermedad de Eales, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, retinopatía leucémica, síndrome de hiperviscosidad sanguínea, macroglobulinemia, retinopatía asociada al interferón, retinopatía hipertensiva, retinopatía por radiación, deficiencia de células madre epiteliales corneales o catarata.

60 Las enfermedades neurodegenerativas tratables por medio de un compuesto de Fórmula I incluyen, pero no se limitan a, Parkinson, Alzheimer y Huntington, y esclerosis lateral amiotrófica (ELA/Enfermedad de Lou Gehrig).

Los compuestos, formas de dosificación oralmente aceptables y composiciones descritos en la presente memoria descriptiva también pueden usarse para tratar trastornos de crecimiento tisular anormal y fibrosis incluyendo cardiomiopatía dilatativa, cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía restrictiva, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, glomerulonefritis, trastorno renal poliquistico (TRP) y otros trastornos renales.

- 5 Los compuestos, las formas de dosificación oralmente aceptables y las composiciones descritas en la presente memoria descriptiva también pueden usarse para tratar trastornos relacionados con la ingesta de alimentos tales como obesidad e hiperfagia.

En otra realización, una forma de dosificación oralmente aceptable descrita en la presente memoria descriptiva puede usarse para tratar o prevenir alergias y trastornos respiratorios, incluyendo asma, bronquitis, fibrosis pulmonar, rinitis alérgica, toxicidad de oxígeno, enfisema, bronquitis crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda y cualquier enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

En algunas realizaciones, el trastorno o afección asociado con la actividad de CRM1 es distrofia muscular, artritis, por ejemplo, osteoartritis y artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, lesión cerebral traumática, lesión medular, sepsis, enfermedad reumática, aterosclerosis cancerosa, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, enfermedad renal leptospirosis, glaucoma, enfermedad retiniana, envejecimiento, cefalea, dolor, síndrome de dolor regional complejo, hipertrofia cardiaca, desgaste muscular, trastornos catabólicos, obesidad, retraso del crecimiento fetal, hipercolesterolemia, cardiopatía, insuficiencia cardiaca crónica, isquemia/reperfusión, apoplejía, aneurisma cerebral, angina de pecho, enfermedad pulmonar, fibrosis quística, lesión pulmonar inducida por ácido, hipertensión pulmonar, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de Sjogren, enfermedad de la membrana hialina, enfermedad renal, enfermedad glomerular, enfermedad hepática alcohólica, enfermedades intestinales, endometriosis peritoneal, enfermedades cutáneas, sinusitis nasal, mesotelioma, displasia ecodérmica anhidrótica-ID, enfermedad de behcet, incontinencia pigmentaria, tuberculosis, asma, enfermedad de Crohn, colitis, alergia ocular, apendicitis, enfermedad de Paget, pancreatitis, periodonitis, endometriosis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad inflamatoria pulmonar, enfermedades inducidas por sílice, apnea del sueño, sida, VIH-1, enfermedades autoinmunes, síndrome antifosfolípido, lupus, nefritis lúpica, fiebre mediterránea familiar, síndrome de fiebre periódica hereditaria, enfermedades por estrés psicosocial, enfermedades neuropatológicas, polineuropatía amiloidótica familiar, neuropatía inflamatoria, enfermedad de parkinson, esclerosis múltiple, enfermedad de alzheimer, esclerosis lateral amiotrópica, enfermedad de huntington, cataratas o pérdida de audición.

En otras realizaciones, el trastorno o afección asociado con la actividad de CRM1 es lesión craneal, uveítis, dolor inflamatorio, asma inducida por alérgenos, asma no inducida por alérgenos, nefritis glomerular, colitis ulcerosa, enterocolitis necrotizante, hiperinmunoglobulinemia D con fiebre recurrente (HIDS), Síndrome periódico asociado a receptores TNF (TRAPS), síndromes periódicos asociados a criopirina, síndrome de Muckle-Wells (urticaria sordera amiloidosis), urticaria por frío familiar, enfermedad inflamatoria multisistémica de aparición neonatal (NOMID), fiebre periódica, estomatitis aftosa, faringitis y adenitis (síndrome PFAPA), síndrome de Blau, artritis estéril piógena, pioderma gangrenoso, acné (PAPA), deficiencia del antagonista del receptor de interleucina-1 (DIRA), hemorragia subaracnoidea, poliquistosis renal, trasplante, trasplante de órganos, trasplante de tejidos, síndrome mielodisplásico, inflamación inducida por irritantes, inflamación inducida por irritantes vegetales, inflamación inducida por hiedra venenosa/aceite de urushiol, inflamación inducida por irritantes químicos, inflamación inducida por picaduras de abeja, inflamación inducida por picaduras de insectos, quemaduras solares, quemaduras, dermatitis, endotoxemia, lesión pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria aguda, hepatitis alcohólica o lesión renal causada por infecciones parasitarias.

En aspectos adicionales, la presente invención proporciona un uso de un compuesto de fórmula I para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión o actividad de p53, p73, p21, pRB, p27, IκB, NFκB, c-Abl, proteínas FOXO, COX-2 o una HDAC en un sujeto. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un uso de un compuesto de fórmula I en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cualquiera de cáncer y/o trastornos neoplásicos, angiogénesis, trastornos autoinmunes, trastornos y/o enfermedades inflamatorias, epigenética, trastornos y/o enfermedades hormonales, enfermedades víricas, trastornos y/o enfermedades neurodegenerativas, heridas y trastornos oftalmológicos.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento para inhibir CRM1 en una muestra biológica que comprende poner en contacto la muestra biológica con, o administrar al paciente, forma de dosificación oralmente aceptable que comprende un compuesto de Fórmula I.

Trastornos neoplásicos

Un compuesto, forma de dosificación oralmente aceptable o composición descritos en la presente memoria descriptiva pueden usarse para tratar un trastorno neoplásico. Un "trastorno neoplásico" es una enfermedad o trastorno caracterizado por células que tienen capacidad de crecimiento o replicación autónomos, por ejemplo, un estado o afección anormal caracterizado por un crecimiento celular proliferativo. Los trastornos neoplásicos ejemplares incluyen: carcinoma, sarcoma, trastornos metastásicos, por ejemplo, tumores de próstata, cerebro, hueso, colon, pulmón, mama, ovario e hígado, trastornos neoplásicos hematopoyéticos, por ejemplo, leucemias, linfomas, mieloma y otros trastornos malignos de células plasmáticas, y tumores metastásicos. Los cánceres más frecuentes son: mama,

próstata, colon, pulmón, hígado y páncreas. El tratamiento con el compuesto puede ser en una cantidad eficaz para mejorar al menos un síntoma del trastorno neoplásico, por ejemplo, reducción de la proliferación celular, reducción de la masa tumoral, etc.

5 Los procedimientos desvelados son útiles en la prevención y tratamiento del cáncer, incluyendo por ejemplo, tumores sólidos, tumores de tejidos blandos, y metástasis de los mismos, así como en síndromes de cáncer familiar tales como Síndrome de Li Fraumeni, Síndromes de Cáncer de Mama-Ovario Familiar (mutaciones BRCA1 o BRAC2), y otros. Los procedimientos desvelados también son útiles en el tratamiento de cánceres no sólidos. Los tumores sólidos
10 ejemplares incluyen neoplasias malignas (por ejemplo, sarcomas, adenocarcinomas y carcinomas) de los varios sistemas orgánicos, tales como los de pulmón, mama, linfoides, gastrointestinales (por ejemplo, colon) y genitourinarios (por ejemplo, tumores renales, uroteliales o testiculares), faringe, próstata y ovario. Entre los adenocarcinomas ejemplares se incluyen los cánceres colorrectales, el carcinoma de células renales, el cáncer de hígado, el carcinoma de células no pequeñas de pulmón y el cáncer de intestino delgado.

15 Los cánceres ejemplares descritos por el Instituto Nacional del Cáncer incluyen: Leucemia Linfoblástica Aguda, Adulto; Leucemia Linfoblástica Aguda, Infantil; Leucemia Mieloide Aguda, Adulto; Carcinoma Adrenocortical; Carcinoma Adrenocortical, Infantil; Linfoma Relacionado con el SIDA; Neoplasias Malignas Relacionadas con el SIDA; Cáncer Anal; Astrocitoma Cerebeloso Infantil; Astrocitoma Cerebral Infantil; Cáncer de Vías Biliares, Extrahepático; Cáncer de Vejiga; Cáncer de Vejiga, Infantil; Cáncer Óseo, Osteosarcoma/Histiocitoma Fibroso Maligno; Glioma de Tallo Cerebral, Infantil; Tumor Cerebral, Adulto; Tumor Cerebral, Glioma de Tallo Cerebral, Infantil; Tumor Cerebral, Astrocitoma Cerebeloso, Infantil; Tumor Cerebral, Astrocitoma Cerebral/Glioma Maligno, Infantil; Tumor Cerebral, Ependimoma, Infantil; Tumor Cerebral, Meduloblastoma, Infantil; Tumor Cerebral, Tumores Neuroectodérmicos Primitivos
20 Supratentoriales, Infantil; Tumor cerebral, vía visual y glioma hipotalámico, infantil; Tumor cerebral, infantil (otros); Cáncer de mama; Cáncer de mama y embarazo; Cáncer de mama, infantil; Cáncer de mama, masculino; Adenomas/Carcinoides bronquiales, infantil; Tumor carcinoide, infantil; Tumor carcinoide, gastrointestinal; Carcinoma, adrenocortical; Carcinoma, de células de los islotes; Carcinoma de tumor primario desconocido; Linfoma primario del sistema nervioso central; Astrocitoma Cerebeloso, Infantil; Astrocitoma Cerebral/Glioma Maligno, Infantil; Cáncer de Cuello de Útero; Cánceres Infantiles; Leucemia Linfocítica Crónica; Leucemia Mielógena Crónica; Trastornos Mieloproliferativos Crónicos; Sarcoma de Células Claras de las Vainas Tendinosas; Cáncer de Colon; Cáncer Colorrectal Infantil; Linfoma Cutáneo de Células T; Cáncer de Endometrio; Ependimoma Infantil; Cáncer Epitelial de Ovario; Cáncer de esófago; Cáncer de esófago, infantil; Tumor de células germinales extracraneal, infantil; Tumor extragonadal de células germinales; Cáncer de vías biliares extrahepáticas; Cáncer ocular, melanoma intraocular; Cáncer ocular, retinoblastoma; Cáncer de vesícula biliar; Cáncer gástrico (de estómago); Cáncer gástrico (de estómago), infantil; Tumor carcinoide gastrointestinal; Tumor extracraneal de células germinales, infantil; Tumor de células germinales, extragonadal; Tumor de células germinales, ovárico; Tumor trofoblástico gestacional; Glioma, tronco cerebral infantil; Glioma, vía visual e hipotalámico infantil; Leucemia de células pilosas; Cáncer de cabeza y
35 cuello; Cáncer hepatocelular (hígado), adulto (primario); Cáncer hepatocelular (hígado), infantil (primario); Linfoma de Hodgkin, adulto; Linfoma de Hodgkin, infantil; Linfoma de Hodgkin durante el embarazo; Cáncer hipofaríngeo; Glioma hipotalámico y de la vía visual, infantil; Melanoma intraocular; Carcinoma de células de los islotes (páncreas endocrino); Sarcoma de Kaposi; Cáncer renal; Cáncer laríngeo; Cáncer de Laringe, Infantil; Leucemia, Linfoblástica Aguda, Adulto; Leucemia, Linfoblástica Aguda, Infantil; Leucemia, Mieloide Aguda, Adulto; Leucemia, Mieloide Aguda, Infantil; Leucemia, Linfocítica Crónica; Leucemia, Mielógena Crónica; Leucemia, Células Peludas; Cáncer de Labio y Cavidad Oral; Cáncer de Hígado, Adulto (Primario); Cáncer de Hígado, Infantil (Primario); Cáncer de Pulmón, Células No Pequeñas; Cáncer de Pulmón, Células Pequeñas; Leucemia Linfoblástica, Aguda Adulta; Leucemia Linfoblástica, Aguda Infantil; Leucemia Linfocítica, Crónica; Linfoma, Relacionado con el SIDA; Linfoma, Sistema Nervioso Central (Primario); Linfoma, Cutáneo de Células T; Linfoma, Hodgkin, Adulto; Linfoma, Hodgkin, Infantil; Linfoma, Hodgkin durante el Embarazo; Linfoma, No Hodgkin, Adulto; Linfoma, No Hodgkin, Infantil; Linfoma, No Hodgkin durante el Embarazo; Linfoma, Sistema Nervioso Central Primario; Macroglobulinemia, Waldenstrom's; Cáncer de Mama Masculino; Mesotelioma Maligno, Adulto; Mesotelioma Maligno, Infantil; Timoma Maligno; Meduloblastoma, Infantil; Melanoma; Melanoma intraocular; Carcinoma de células de Merkel; Mesotelioma maligno; Cáncer escamoso metastásico de cuello con tumor primario oculto; Síndrome de neoplasia endocrina múltiple infantil; Mieloma múltiple/Neoplasia de células plasmáticas; Micosis fungoide; Síndromes mielodisplásicos; Leucemia mielógena crónica; Leucemia mielóide aguda infantil; Mieloma múltiple; Trastornos mieloproliferativos crónicos; Cáncer de la Cavidad Nasal y Senos Paranasales; Cáncer Nasofaríngeo; Cáncer Nasofaríngeo Infantil; Neuroblastoma; Linfoma No Hodgkin, Adulto; Linfoma No Hodgkin, Infantil; Linfoma No Hodgkin Durante el Embarazo; Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas; Cáncer Oral, Infantil; Cáncer de Cavidad Oral y Labio; Cáncer Orofaringeo; Osteosarcoma/Histiocitoma Fibroso Maligno Óseo; Cáncer de Ovario, Infantil; Cáncer epitelial de ovario; Tumor de células germinales de ovario; Tumor de ovario de bajo potencial maligno; Cáncer de páncreas; Cáncer de páncreas infantil; Cáncer de páncreas de células de los islotes; Cáncer de seno paranasal y cavidad nasal; Cáncer de paratiroides; Cáncer de pene; Feocromocitoma; Tumores neuroectodérmicos primitivos pineales y supratentoriales infantiles; Tumor hipofisario; Neoplasia de células plasmáticas/Mieloma múltiple; Blastoma pleuropulmonar; Embarazo y cáncer de mama; Embarazo y linfoma de Hodgkin; Embarazo y linfoma no Hodgkin; Linfoma primario del sistema nervioso central; Cáncer primario de hígado, adulto; Cáncer primario de hígado, infantil; Cáncer de próstata; Cáncer rectal; Cáncer de células renales (riñón); Cáncer de células renales, infantil; Cáncer de células de transición de pelvis renal y uréter; Retinoblastoma; Rabdomyosarcoma, Infantil; Cáncer de Glándulas Salivales; Cáncer de Glándulas Salivales, Infantil; Sarcoma, Familia de Tumores de Ewing; Sarcoma, Kaposi; Sarcoma (Osteosarcoma)/Histiocitoma

Fibroso Maligno Óseo; Sarcoma, Rhabdiosarcoma, Infantil; Sarcoma, Tejidos Blandos, Adulto; Sarcoma, Tejidos Blandos, Infantil; Síndrome de Sezary; Cáncer de Piel; Cáncer de Piel, Infantil; Cáncer de Piel (Melanoma); Carcinoma de Piel, Células de Merkel; Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas; Cáncer de Intestino Delgado; Sarcoma de Tejidos Blandos, Adulto; Sarcoma de Tejidos Blandos, Infantil; Cáncer Escamoso de Cuello con Primario Oculto, Metastásico; 5
Cáncer de Estómago (Gástrico); Cáncer de Estómago (Gástrico), Infantil; Tumores Neuroectodérmicos Primitivos Supratentoriales, Infantil; Linfoma de Células T, Cutáneo; Cáncer Testicular; Timoma, Infantil; Timoma, Maligno; Cáncer de Tiroides; Cáncer de tiroides, infantil; Cáncer de células de transición de pelvis renal y uréter; Tumor trofoblástico, gestacional; Cáncer de sitio primario desconocido, infantil; Cánceres inusuales de la infancia; Cáncer de células de transición de uréter y pelvis renal; Cáncer uretral; Sarcoma uterino; Cáncer vaginal; Glioma de la vía visual e 10
hipotalámico, infantil; Cáncer vulvar; Macroglobulinemia de Waldenstrom; y Tumor de Wilms.

Otros cánceres ejemplares incluyen linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) y linfoma de células del manto (LCM).

Las metástasis de los cánceres mencionados también pueden tratarse o prevenirse de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva.

15 **Terapias combinadas**

En algunas realizaciones, un compuesto descrito en la presente memoria descriptiva se administra junto con un "segundo" agente terapéutico o tratamiento adicional. La elección del segundo agente terapéutico puede realizarse a partir de cualquier agente que se utilice habitualmente en monoterapia para tratar la enfermedad o afección indicada. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "administrados conjuntamente" y términos 20
relacionados se relaciona con la administración simultánea o secuencial de agentes terapéuticos de acuerdo con esta invención. Por ejemplo, un compuesto de la presente invención puede administrarse con otro agente terapéutico simultánea o secuencialmente en formas farmacéuticas unitarias separadas o juntas en una única forma farmacéutica unitaria. En consecuencia, la presente invención proporciona una forma de dosificación unitaria que comprende un compuesto de fórmula I, un agente terapéutico adicional y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente 25
aceptable.

En una realización de la invención, cuando se administra un segundo agente terapéutico a un sujeto, la cantidad eficaz del compuesto de esta invención es menor que su cantidad eficaz sería cuando no se administra el segundo agente terapéutico. En otra realización, la cantidad efectiva del segundo agente terapéutico es inferior a la que sería su cantidad efectiva cuando no se administra el compuesto de esta invención. De este modo, se pueden minimizar los efectos secundarios no deseados asociados a dosis elevadas de cualquiera de los agentes. Otras ventajas potenciales (incluyendo, sin limitación, la mejora de los regímenes de dosificación y/o la reducción del coste del medicamento) serán evidentes para los expertos en la materia. Los agentes adicionales pueden administrarse por separado, como parte de un régimen de dosis múltiples, de los compuestos de esta invención. Alternativamente, dichos agentes pueden formar parte de una única forma de dosificación, mezclados junto con los compuestos de esta invención en una única 30
forma de dosificación oralmente aceptable.

35 **Terapias combinadas contra el cáncer**

En algunas realizaciones, un compuesto descrito en la presente memoria descriptiva se administra junto con un tratamiento adicional contra el cáncer. Entre los tratamientos adicionales ejemplares contra el cáncer se incluyen, por ejemplo: quimioterapia, terapias dirigidas tales como terapias con anticuerpos, inhibidores de quinasas, inmunoterapia 40
y terapia hormonal, terapia epigenética, inhibidores de proteosomas y terapias antiangiogénicas. A continuación se ofrecen ejemplos de cada uno de estos tratamientos. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "combinación", "combinado" y otros términos relacionados se relacionan con la administración simultánea o secuencial de agentes terapéuticos de acuerdo con esta invención. Por ejemplo, un compuesto de la presente invención puede administrarse con otro agente terapéutico simultánea o secuencialmente en formas farmacéuticas unitarias separadas o juntas en una única forma farmacéutica unitaria. En consecuencia, la presente invención proporciona una forma de dosificación unitaria que comprende un compuesto de la invención, un agente terapéutico adicional y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. 45

La cantidad tanto de una forma de dosificación oralmente aceptable de la invención como de agente terapéutico adicional (en aquellas composiciones que comprenden un agente terapéutico adicional como se ha descrito anteriormente) que puede combinarse con los materiales de soporte para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del huésped tratado y del modo de administración particular. Preferentemente, las formas de dosificación oralmente aceptables de esta invención deben formularse de forma que pueda administrarse una dosis de entre 0,01 - 100 mg/kg de peso corporal/día de un compuesto de la invención. 50

Quimioterapia

En algunas realizaciones, un compuesto descrito en la presente memoria descriptiva se administra con una quimioterapia. La quimioterapia es el tratamiento del cáncer con fármacos capaces de destruir las células cancerosas. "Quimioterapia" suele referirse a los fármacos citotóxicos que afectan a las células que se dividen rápidamente en general, en contraste con la terapia dirigida. Los fármacos quimioterapéuticos interfieren en la división celular de varias 55

formas posibles, por ejemplo, en la duplicación del ADN o en la separación de los cromosomas recién formados. La mayoría de las formas de quimioterapia se dirigen a todas las células que se dividen rápidamente y no son específicas para las células cancerosas, aunque cierto grado de especificidad puede provenir de la incapacidad de muchas células cancerosas para reparar los daños en el ADN, mientras que las células normales generalmente sí pueden hacerlo.

- 5 Ejemplos de agentes quimioterapéuticos usados en la terapia del cáncer incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, ácido fólico, purina y derivados de pirimidina) y agentes alquilantes (por ejemplo, mostazas nitrogenadas, nitrosoureas, platino, alquil sulfonatos, hidrazinas, triazenos, aziridinas, veneno de huso, agentes citotóxicos, inhibidores de topoisomerasa y otros). Algunos agentes ejemplares son Aclarubicina, Actinomicina, Alitretinoína, Altretamina, Aminopterina, Ácido aminolevulínico, Amrubicina, Amsacrina, Anagrelida, Trióxido de arsénico, Asparaginasa, Atrasentán, Belotecán, Bexaroteno, Bendamustina, Bleomicina, Bortezomib, Busulfán, Camptotecina, Capecitabina, Carboplatino, Carboquona, Carmofur, Carmustina, Celecoxib, Clorambucil, Clormetina, Cisplatino, Cladribina, Clofarabina, Crisantaspasa, Ciclofosfamida, Citarabina, Dacarbazina, Dactinomicina, Daunorrubicina, Decitabina, Demecolcina, Docetaxel, Doxorrubicina, Efavoxirina, Elesclomol, Elsamitrucin, Enocitabina, Epirubicina, Estramustina, Etoposido, Floxuridina, Fludarabina, Fluorouracilo (5FU), Fotemustina, Gemcitabina, Implantes Gliadel, Hidroxicarbamida, Hidroxiurea, Idarubicina, Ifosfamida, Irinotecán, Irofulven, Ixabepilona, Larotaxel, Leucovorina, Doxorrubicina liposomal, Daunorrubicina liposomal, Lonidamina, Lomustina, Lucantona, Mannosulfán, Masoprocol, Melfalán, Mercaptopurina, Mesna, Metotrexato, Metil aminolevulinato, Mitobronitol, Mitoguazona, Mitotano, Mitomicina, Mitoxantrona, Nedaplatino, Nimustina, Oblimersen, Omacetaxina, Ortataxel, Oxaliplatino, Paclitaxel, Pegaspargasa, Pemetrexed, Pentostatina, Pirarubicina, Pixantrona, Plicamicina, Porfimer sódico, Prednimustina, Procarbazona, Raltitrexed, Ranimustina, Rubitecan, Sapacitabina, Semustina, Sitimagene ceradenovec, Estrataplato, Estreptozocina, Talaporfina, Tegafur-uracilo, Temoporfina, Temozolomida, Teniposida, Tesetaxel, Testolactona, Tetranitrato, Tiotepa, Tiazofurina, Tioguanina, Tipifarnib, Topotecán, Trabectedina, Triaziquona, Trietilenemelamina, Triplatino, Tretinoína, Treosulfán, Trofosfamida, Uramustina, Valrubicina, Verteporfina, Vinblastina, Vincristina, Vindesina, Vinflunina, Vinorelbina, Vorinostat, Zorubicina y otros agentes citostáticos o citotóxicos descritos en la presente memoria descriptiva.

Dado que algunos fármacos actúan mejor juntos que solos, a menudo se administran dos o más fármacos al mismo tiempo. A menudo, se utilizan dos o más agentes quimioterápicos como quimioterapia combinada. En algunas realizaciones, los agentes quimioterapéuticos (incluida la quimioterapia combinada) pueden utilizarse en combinación con un compuesto descrito en la presente memoria descriptiva.

30 **Terapia dirigida**

La terapia dirigida constituye el uso de agentes específicos para las proteínas desreguladas de las células cancerosas. Los fármacos de moléculas pequeñas para terapias dirigidas suelen ser inhibidores de dominios enzimáticos de proteínas mutadas, sobreexpresadas o críticas para la célula cancerosa. Ejemplos destacados son los inhibidores de la tirosina cinasa tales como Axitinib, Bosutinib, Cediranib, dasatinib, erlotinib, imatinib, gefitinib, lapatinib, Lestaurtinib, Nilotinib, Semaxanib, Sorafenib, Sunitinib y Vandetanib, y también los inhibidores de la cinasa dependiente de ciclina como Alvocidib y Seliciclib. La terapia con anticuerpos monoclonales es otra estrategia en la que el agente terapéutico es un anticuerpo que se une específicamente a una proteína de la superficie de las células cancerosas. Algunos ejemplos son el anticuerpo anti-HER2/neu trastuzumab (Herceptin®), utilizado habitualmente en el cáncer de mama, y el anticuerpo anti-CD20 rituximab y Tositumomab, utilizados habitualmente en diversas neoplasias de células B. Otros anticuerpos ejemplares incluyen Cetuximab, Panitumumab, Trastuzumab, Alemtuzumab, Bevacizumab, Edrecolomab y Gemtuzumab. Las proteínas de fusión ejemplares incluyen Aflibercept y Denileukin difitox. En algunas realizaciones, la terapia dirigida puede utilizarse en combinación con un compuesto descrito en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, Gleevec (Vignari y Wang 2001).

45 La terapia dirigida también puede implicar pequeños péptidos como "dispositivos de localización" que pueden unirse a receptores de la superficie celular o a la matriz extracelular afectada que rodea al tumor. Los radionucleidos que se unen a estos péptidos (por ejemplo, los RGD) acaban matando a la célula cancerosa si el nucleido decae en las proximidades de la célula. Un ejemplo de dicha terapia incluye BEXXAR®.

Angiogénesis

50 Los compuestos y procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva pueden utilizarse para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con la angiogénesis. Entre las enfermedades asociadas a la angiogénesis figuran el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la degeneración macular.

55 La angiogénesis es el proceso fisiológico que implica el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. La angiogénesis es un proceso normal y vital en el crecimiento y el desarrollo, así como en la cicatrización de heridas y en el tejido de granulación. Sin embargo, también es una etapa fundamental en la transición de los tumores de un estado latente a uno maligno. La angiogénesis puede ser una diana para combatir enfermedades caracterizadas por una vascularización deficiente o una vasculatura anormal.

La aplicación de compuestos específicos que pueden inhibir o inducir la creación de nuevos vasos sanguíneos en el organismo puede ayudar a combatir dichas enfermedades. La presencia de vasos sanguíneos donde no debería

haberlos puede afectar a las propiedades mecánicas de un tejido, aumentando la probabilidad de fallo. La ausencia de vasos sanguíneos en un tejido reparador o metabólicamente activo puede inhibir la reparación u otras funciones esenciales. Varias enfermedades, tales como las heridas crónicas isquémicas, son el resultado de un fallo o de una formación insuficiente de vasos sanguíneos y pueden tratarse por medio de una expansión local de los vasos sanguíneos, aportando así nuevos nutrientes al lugar, lo que facilita la reparación. Otras enfermedades, tal como la degeneración macular asociada a la edad, pueden deberse a una expansión local de los vasos sanguíneos, que interfiere en los procesos fisiológicos normales.

Se ha demostrado que el factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) contribuye en gran medida a la angiogénesis, aumentando el número de capilares en una red dada. El aumento del FCEV es un componente importante de la respuesta fisiológica al ejercicio y se sospecha que su papel en la angiogénesis puede ser un posible tratamiento en las lesiones vasculares. *Los estudios in vitro* demuestran claramente que el FCEV es un potente estimulador de la angiogénesis porque, en presencia de este factor de crecimiento, las células endoteliales en placas proliferarán y migrarán, formando finalmente estructuras tubulares parecidas a capilares.

Los tumores inducen el crecimiento de vasos sanguíneos (angiogénesis) por medio de la secreción de varios factores de crecimiento (*por ejemplo*, FCEV). Factores de crecimiento tales como el bFGF y el FCEV pueden inducir el crecimiento de capilares en el tumor, que algunos investigadores sospechan que suministran los nutrientes necesarios, permitiendo la expansión del tumor.

La angiogénesis representa una diana terapéutica excelente para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Se trata de un potente proceso fisiológico que subyace a la forma natural en que nuestro cuerpo responde a una disminución del suministro de sangre a los órganos vitales, a saber, la producción de nuevos vasos colaterales para superar la lesión isquémica.

La sobreexpresión de FCEV provoca un aumento de la permeabilidad en los vasos sanguíneos además de estimular la angiogénesis. En la degeneración macular húmeda, el FCEV provoca la proliferación de capilares en la retina. Dado que el aumento de la angiogénesis también provoca edema, la sangre y otros fluidos retinianos se filtran en la retina, causando pérdida de visión.

La terapia antiangiogénica puede incluir inhibidores de la cinasa dirigidos contra el factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) tal como sunitinib, sorafenib, o anticuerpos monoclonales o "señuelos" del receptor del FCEV o del receptor del FCEV incluyendo bevacizumab o FCEV-Trampa, o talidomida o sus análogos (lenalidomida, pomalidomida), o agentes dirigidos a dianas angiogénicas no FCEV, como el factor de crecimiento de fibroblastos (FCF), angiopoyetinas, o angiostatina o endostatina.

Epigenética

Los compuestos y procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva pueden usarse para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con la epigenética. La epigenética es el estudio de los cambios hereditarios en el fenotipo o la expresión génica causados por mecanismos distintos a los cambios en la secuencia de ADN subyacente. Un ejemplo de cambios epigenéticos en biología eucariota es el proceso de diferenciación celular. Durante la morfogénesis, las células madre se convierten en las distintas líneas celulares del embrión que, a su vez, se convierten en células plenamente diferenciadas. En otras palabras, un único óvulo fecundado se transforma en muchos tipos de células, como neuronas, células musculares, epitelio, vasos sanguíneos, etc., a medida que continúa dividiéndose. Lo hace activando algunos genes e inhibiendo otros.

Los cambios epigenéticos se conservan cuando las células se dividen. La mayoría de los cambios epigenéticos sólo se producen en el transcurso de la vida de un organismo individual, pero, si se ha producido una mutación en el ADN del espermatozoide o del óvulo que da lugar a la fecundación, algunos cambios epigenéticos se heredan de una generación a la siguiente. Entre los procesos epigenéticos específicos figuran la paramutación, el marcaje, la impronta, el silenciamiento génico, la inactivación del cromosoma X, el efecto de posición, la reprogramación, la transvección, los efectos maternos, el progreso de la carcinogénesis, muchos efectos de los teratógenos, la regulación de las modificaciones de las histonas y la heterocromatina, y las limitaciones técnicas que afectan a la partenogénesis y la clonación.

Entre las enfermedades ejemplares asociadas con la epigenética se incluyen el síndrome ATR, el síndrome X frágil, el síndrome ICF, el síndrome de Angelman, el síndrome de Prader-Wills, el síndrome BWS, el síndrome de Rett, la α -talasemia, el cáncer, la leucemia, el síndrome de Rubinstein-Taybi y el síndrome de Coffin-Lowry.

La primera enfermedad humana que se relacionó con la epigenética fue el cáncer. Los investigadores descubrieron que el tejido enfermo de pacientes con cáncer colorrectal presentaba menos metilación del ADN que el tejido normal de los mismos pacientes. Dado que los genes metilados suelen estar desactivados, la pérdida de metilación del ADN puede causar una activación génica anormalmente alta al alterar la disposición de la cromatina. Por otro lado, un exceso de metilación puede deshacer el trabajo de los genes protectores supresores de tumores.

La metilación del ADN se produce en sitios CpG, y una mayoría de las citosinas CpG están metiladas en mamíferos. Sin embargo, hay tramos de ADN cerca de las regiones promotoras que tienen mayores concentraciones de sitios

CpG (conocidos como islas CpG) que están libres de metilación en las células normales. Estas islas CpG se metilan en exceso en las células cancerosas, lo que provoca la desactivación de genes que no deberían silenciarse. Esta anomalía es el cambio epigenético característico de los tumores y se produce en las primeras fases del desarrollo del cáncer. La hipermetilación de las islas CpG puede causar tumores al desactivar genes supresores de tumores. De hecho, este tipo de cambios pueden ser más frecuentes en el cáncer humano que las mutaciones de la secuencia de ADN.

Además, aunque los cambios epigenéticos no alteran la secuencia del ADN, pueden causar mutaciones. Aproximadamente la mitad de los genes que causan formas familiares o hereditarias de cáncer se desactivan por metilación. La mayoría de estos genes normalmente suprimen la formación de tumores y ayudan a reparar el ADN, entre ellos la 06-metilguanina-ADN metiltransferasa (*MGMT*), el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2B *MLH1* (*CDKN2B*) y el *RASSF1A*. Por ejemplo, la hipermetilación del promotor de *MGMT* hace que aumente el número de mutaciones de G a A.

La hipermetilación también puede conducir a la inestabilidad de los microsatélites, que son secuencias repetidas de ADN. Los microsatélites son comunes en individuos normales y suelen consistir en repeticiones del dinucleótido CA. Demasiada metilación del promotor del gen de reparación del ADN *MLH1* puede hacer inestable un microsatélite y alargarlo o acortarlo. La inestabilidad de microsatélites se ha relacionado con muchos tipos de cáncer, incluyendo el colorrectal, el de endometrio, el de ovario y el gástrico.

El síndrome del cromosoma X frágil es la discapacidad mental hereditaria más frecuente, sobre todo en varones. Esta enfermedad puede afectar a ambos sexos, pero como los varones sólo tienen un cromosoma X, un X frágil les afectará más gravemente. De hecho, el síndrome del cromosoma X frágil se da aproximadamente en 1 de cada 4.000 varones y 1 de cada 8.000 mujeres. Las personas con este síndrome presentan discapacidad intelectual grave, retraso en el desarrollo verbal y comportamiento "similar al autismo".

El síndrome del cromosoma X frágil debe su nombre al aspecto que presenta al microscopio la parte del cromosoma X que contiene la anomalía genética; suele aparecer como si colgara de un hilo y fuera fácilmente rompible. El síndrome está causado por una anomalía en el gen *FMR1* (Retardamiento mental X frágil 1). Las personas que no padecen el síndrome X frágil tienen entre 6 y 50 repeticiones del trinucleótido CGG en su gen *FMR1*. Sin embargo, los individuos con más de 200 repeticiones tienen una mutación completa, y suelen mostrar síntomas del síndrome. Demasiados CGG hacen que las islas CpG de la región promotora del gen *FMR1* se metilen; normalmente, no lo están. Esta metilación desactiva el gen, impidiendo que el gen *FMR1* produzca una importante proteína llamada proteína del retraso mental por X frágil. La pérdida de esta proteína específica causa el síndrome del cromosoma X frágil. Aunque se ha prestado mucha atención a la mutación de expansión CGG como causa del síndrome X frágil, el cambio epigenético asociado a la metilación de *FMR1* es el verdadero culpable del síndrome.

El síndrome del cromosoma X frágil no es el único trastorno asociado al retraso mental que implica cambios epigenéticos. Otras afecciones de este tipo son los síndromes de Rubenstein-Taybi, Coffin-Lowry, Prader-Willi, Angelman, Beckwith-Wiedemann, ATR-X y Rett.

Las terapias epigenéticas incluyen inhibidores de enzimas que controlan modificaciones epigenéticas, específicamente ADN metiltransferasas e histonas desacetilasas, que han mostrado efectos antitumorígenicos prometedores para algunas neoplasias malignas, así como oligonucleótidos antisentido y ARNs.

Inmunoterapia

En algunas realizaciones, un compuesto descrito en la presente memoria descriptiva se administra con una inmunoterapia. La inmunoterapia del cáncer hace referencia a un conjunto diverso de estrategias terapéuticas diseñadas para inducir al propio sistema inmunitario del paciente a combatir el tumor. Los procedimientos contemporáneos para generar una respuesta inmunitaria contra los tumores incluyen la inmunoterapia BCG intravesicular para el cáncer superficial de vejiga, la vacuna Provenge contra el cáncer de próstata y el uso de interferones y otras citoquinas para inducir una respuesta inmunitaria en pacientes con carcinoma de células renales y melanoma.

El trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas puede considerarse una forma de inmunoterapia, ya que las células inmunitarias del donante atacarán a menudo al tumor en un efecto de injerto contra tumor. En algunas realizaciones, los agentes de inmunoterapia pueden utilizarse en combinación con un compuesto descrito en la presente memoria descriptiva.

Terapia hormonal

En algunas realizaciones, un compuesto descrito en la presente memoria descriptiva se administra con una terapia hormonal. El crecimiento de algunos cánceres puede inhibirse proporcionando o bloqueando determinadas hormonas. Algunos ejemplos comunes de tumores sensibles a las hormonas son ciertos tipos de cáncer de mama y de próstata, así como ciertos tipos de leucemia que responden a determinados retinoides/ácidos retinoicos. La eliminación o el bloqueo de estrógenos o testosterona suele ser un tratamiento adicional importante. En ciertos tipos de cáncer, la administración de agonistas hormonales, tales como los progestágenos, puede ser terapéuticamente beneficiosa. En

algunas realizaciones, los agentes de terapia hormonal pueden utilizarse en combinación con un compuesto descrito en la presente memoria descriptiva.

Los agentes de terapia hormonal incluyen la administración de agonistas hormonales o antagonistas hormonales e incluyen retinoides/ácido retinoico, compuestos que inhiben el estrógeno o la testosterona, así como la administración de progestágenos.

Inflamación y enfermedades autoinmunes

Los compuestos y procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva pueden utilizarse para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con la inflamación, particularmente en seres humanos y otros mamíferos. Un compuesto descrito en la presente memoria descriptiva puede administrarse antes, durante o después del inicio de la inflamación. Cuando se utilizan profilácticamente, los compuestos se administran preferentemente antes de que se produzca cualquier respuesta inflamatoria o síntoma. La administración de los compuestos puede prevenir o atenuar las respuestas inflamatorias o los síntomas. Entre las afecciones inflamatorias ejemplares se incluyen, por ejemplo, la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, la artritis psoriásica, las enfermedades articulares degenerativas, las espondiloartropatías, otras artritis inflamatorias seronegativas, la polimialgia reumática, varias vasculideces (por ejemplo, arteritis de células gigantes, vasculitis ANCA+), artritis gotosa, lupus eritematoso sistémico, artritis juvenil, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, osteoporosis, diabetes (por ejemplo, diabetes mellitus insulino dependiente o diabetes de inicio juvenil), dolores menstruales, fibrosis quística, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, colitis mucosa, colitis ulcerosa, gastritis, esofagitis, pancreatitis, peritonitis, enfermedad de Alzheimer, shock, espondilitis anquilosante, gastritis, conjuntivitis, pancreatitis (aguda o crónica), síndrome de lesión orgánica múltiple (por ejemplo, secundaria a septicemia o traumatismo), infarto de miocardio, aterosclerosis, accidente cerebrovascular, lesión por reperfusión (por ejemplo, debida a bypass cardiopulmonar o diálisis renal), glomerulonefritis aguda, lesión térmica (por ejemplo, quemadura solar), enterocolitis necrotizante, síndrome asociado a transfusión de granulocitos y/o síndrome de Sjogren. Las afecciones inflamatorias de la piel ejemplares incluyen, por ejemplo, eczema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, urticaria, esclerodermia, psoriasis y dermatosis con componentes inflamatorios agudos.

En otra realización, un compuesto o procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva puede usarse para tratar o prevenir alergias y afecciones respiratorias, incluyendo asma, bronquitis, fibrosis pulmonar, rinitis alérgica, toxicidad de oxígeno, enfisema, bronquitis crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda y cualquier enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Los compuestos pueden utilizarse para tratar la infección crónica por hepatitis, incluidas la hepatitis B y la hepatitis C.

Además, un compuesto o procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva puede usarse para tratar enfermedades autoinmunes y/o inflamación asociada con enfermedades autoinmunes, tales como enfermedades autoinmunes de órgano-tejido (por ejemplo, síndrome de Raynaud), esclerodermia, miastenia gravis, rechazo de trasplantes, shock endotoxínico, sepsis, psoriasis, eczema, dermatitis, esclerosis múltiple, tiroiditis autoinmune, uveítis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Addison, enfermedad poliglandular autoinmune (también conocida como síndrome poliglandular autoinmune) y enfermedad de Grave.

En una realización particular, los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva pueden usarse para tratar la esclerosis múltiple. En un aspecto específico, el compuesto utilizado para tratar la esclerosis múltiple es el Compuesto 1: (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-1-(3,3-difluoroazetidín-1-il)prop-2-en-1-ona).

Terapia combinada

En ciertas realizaciones, un compuesto descrito en la presente memoria descriptiva puede administrarse solo o en combinación con otros compuestos útiles para tratar o prevenir la inflamación. Los agentes antiinflamatorios ejemplares incluyen, por ejemplo, esteroides (*por ejemplo*, cortisol, cortisona, fludrocortisona, prednisona, 6[alfa]-metilprednisona, triamcinolona, betametasona o dexametasona), antiinflamatorios no esteroideos (AINE (*por ejemplo*, aspirina, paracetamol, tolmetina, ibuprofeno, ácido mefenámico, piroxicam, nabumetona, rofecoxib, celecoxib, etodolac o nimesulida). En otra realización, el otro agente terapéutico es un antibiótico (por ejemplo, vancomicina, penicilina, amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona, cefixima, rifampicametronidazol, doxiciclina o estreptomycin). En otra realización, el otro agente terapéutico es un inhibidor de la PDE4 (*por ejemplo*, roflumilast o rolipram). En otra realización, el otro agente terapéutico es un antihistamínico (*por ejemplo*, ciclizina, hidroxizina, prometazina o difenhidramina). En otra realización, el otro agente terapéutico es un antipalúdico (*por ejemplo*, artemisinina, arteméter, artsunato, fosfato de cloroquina, clorhidrato de mefloquina, hclato de doxiciclina, clorhidrato de proguanil, atovaquona o halofantrina). En una realización, el otro compuesto es drotrecogina alfa.

Otros ejemplos de agentes antiinflamatorios incluyen, por ejemplo, aceclofenaco, acetaminofeno, acetaminosalol, acetanilida, ácido acetilsalicílico, S-adenosilmetionina, alclofenaco, alclometasona, alfentanilo, algestone, alilprodina, alminoprofeno, aloxiprin, alfaprodina, bis(acetilsalicilato) de aluminio, amcinonida, amfenaco, aminocloritienoxazina, ácido 3-amino-4-hidroxitúterico, 2-amino-4-picolina, aminopropileno, aminopirina, amixetrina, salicilato de amonio, ampiroxicam, amtometina guacil, anileridina, antipirina, antrafenina, apazona, beclometasona, bendazac, benorilato, benoxaprofeno, benzpiperilon,

benzidamina, benzilmorfina, bermoprofeno, betametasona, betametasona- 17-valerato, bezitramida, [alfa]-bisabolol, bromfenac, p-bromoacetanilida, acetato de ácido 5-bromosalicílico, bromosaligenina, bucetina, ácido buclórico, bucolome, budesonida, bufexamac, bumadizon, buprenorfina, butacetina, butibufen, butorfanol, carbamazepina, carbifeno, caiprofeno, carsalam, clorobutanol, cloroprednisona, clortenoxazina, salicilato de colina, cinofeno, cinmetacina, ciramadol, clidanac, clobetasol, clocortolona, clometacina, clonitazeno, clonixina, clopirac, cloprednol, clavo de olor, codeína, bromuro de metilo de codeína, fosfato de codeína, sulfato de codeína, cortisona, cortivazol, cropropamida, cretamida, ciclozocina, deflazacort, dehidrotestosterona, desomorfina, desonida, desoximetasona, dexametasona, dexametasona-21-isonicotinato, dexoxadrol, dextromoramida, dextropropoxifeno, deoxicorticosterona, dezocina, diampromida, diamorfona, diclofenaco, difenamizol, difenpiramida, diflorasona, diflucortolona, diflunisal, difluprednato, dihidrocodeína, acetato de dihidrocodeinona enol, dihidromorfina, acetilsalicilato de dihidroxialuminio, dimenoxadol, dimefepantol, dimetiltiambuteno, butirato de dioxafetil, dipipanona, diprocetil, dipirona, ditazol, droxicam, emorfazona, ácido enfenámico, enoxolona, epirizol, eptazocina, etersalato, etenzamida, etoheptazina, etoxazeno, etilmetiltiambuteno, etilmorfina, etodolac, etofenamato, etonitazeno, ugenol, felbinac, fenbufeno, ácido fenclozico, fendosal, fenoprofeno, fentanilo, fentiazac, fepradinol, feprazona, floctafenina, fluazacort, flucloronida, ácido flufenámico, flumetasona, flunisolidina, flunixinina, flunoxaprofeno, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, acetónido de fluocinolona, butil fluocortina, fluocoitolona, fluoresona, fluorometolona, fluperolona, flupirtina, fluprednido, fluprednisolona, fluproquazona, flurandrenolida, flurbiprofeno, fluticasona, formocortal, fosfosal, ácido gentísico, glafenina, glucametacina, salicilato de glicol, guaiazuleno, halcinónido, halobetasol, halometasona, haloprednona, heroína, hidrocodona, hidrocortamato, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, succinato de hidrocortisona, hemisuccinato de hidrocortisona, 21-lisinato de hidrocortisona, cipionato de hidrocortisona, hidromorfona, hidroxipetamina, ibufenaco, ibuprofeno, ibuproxam, salicilato de imidazol, indometacina, indoprofeno, isofezolaco, isoflupredona, acetato de isoflupredona, isoladol, isometadona, isonixina, isoxepac, isoxicam, ketobemidone, ketoprofen, ketorolac, p-lactofenetida, lefetamina, levallorfan, levorfanol, levofenacil-morfan, lofantaniol, lonazolac, lornoxicam, loxoprofeno, acetilsalicilato de lisina, mazipredona, ácido meclofenámico, medrisona, ácido mefenámico, meloxicam, meperidina, meprednisona, meptazinol, mesalamina, metazocina, metadona, metotrimoprazina, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, succinato sódico de metilprednisolona, sulepnato de metilprednisolona, ácido metiazínico, metofolina, metopón, mofebutazona, mofezolac, mometasona, morazona, morfina, clorhidrato de morfina, sulfato de morfina, salicilato de morfina, mirofina, nabumetona, nalbufina, nalorfina, salicilato de 1-naftilo, naproxeno, narceína, nefopam, nicomorfina, nifenazona, ácido niflúmico, nimesulida, 5'-nitro-2'-propoxiacetanilida, norlevorfanol, normetadona, normorfina, norpiperanona, olsalazina, opio, oxaceprol, oxametacina, oxaprozina, oxicodona, oximorfona, oxifenbutazona, papaveretum, parametasona, paranilina, parsalmida, pentazocina, perisoxal, fenacetina, fenadoxona, fenazocina, clorhidrato de fenazopiridina, fenocoll, fenoperidina, fenopirazona, fenomorfano, acetilsalicilato de fenilo, fenilbutazona, salicilato de fenilo, feniramidol, piketoprofeno, pimindodina, pipebuzona, piperilona, pirazolaco, piritramida, piroxicam, pirprofeno, pranoprofeno, prednicarbo, prednisolona, prednisona, prednival, prednilideno, proglumetacina, proheptazina, promedol, propacetamol, properidina, propiram, propoxifeno, propifenazona, proquazona, ácido protizínico, proxazol, ramifenazona, remifentanilo, metilsulfato de rimazolol, salacetamida, salicina, salicilamida, salicilamida ácido o-acético, ácido salicílico, ácido salicilsulfúrico, salsalato, salverina, simetrida, sufentanilo, sulfasalazina, sulindac, superóxido dismutasa, suprofen, suxibuzona, talniflumato, tenidap, tenoxicam, terofenamato, tetrandrina, tiazolinobutazona, ácido tiaprofénico, tiaramida, tilidina, tinoridina, tixocortol, ácido tolfenámico, tolmetina, tramadol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, tropesina, viminol, xenbucin, ximoprofeno, zaltoprofeno y zomepirac.

En una realización, un compuesto descrito en la presente memoria descriptiva puede administrarse con un inhibidor selectivo de COX-2 para tratar o prevenir la inflamación. Los inhibidores selectivos de la COX-2 ejemplares incluyen, por ejemplo, deracoxib, parecoxib, celecoxib, valdecoxib, rofecoxib, etoricoxib y lumiracoxib.

En algunas realizaciones, un compuesto proporcionado se administra en combinación con una antraciclina o un inhibidor de Topo II. En ciertas realizaciones, un compuesto proporcionado se administra en combinación con Doxorubicina (Dox). En ciertas realizaciones, un compuesto proporcionado se administra en combinación con bortezomib (y más ampliamente incluyendo carfilzomib). Se descubrió sorprendentemente que un compuesto proporcionado en combinación con Dox o bortezomib daba lugar a un efecto sinérgico (*es decir*, más que aditivo).

50 **Infecciones víricas**

Los compuestos y procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva pueden usarse para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con una infección viral, particularmente en seres humanos y otros mamíferos. Un compuesto descrito en la presente memoria descriptiva puede administrarse antes, durante o después del inicio de la infección vírica. Cuando se utilizan profilácticamente, los compuestos se administran preferentemente antes de que se produzca cualquier infección vírica o síntoma de la misma.

Las enfermedades víricas ejemplares incluyen faringitis febril aguda, fiebre faringoconjuntival, queratoconjuntivitis epidémica, gastroenteritis infantil, infecciones por Coxsackie, mononucleosis infecciosa, linfoma de Burkitt, hepatitis aguda, hepatitis crónica, cirrosis hepática, carcinoma hepatocelular, infección primaria por VHS-1 (*por ejemplo*, gingivoestomatitis en niños, amigdalitis y faringitis en adultos, queratoconjuntivitis), infección latente por VHS-1 (*por ejemplo* herpes labial y herpes labial), infección primaria por VHS-2, infección latente por VHS-2, meningitis aséptica, mononucleosis infecciosa, enfermedad de inclusión citomegálica, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castlemann multicéntrica, linfoma de efusión primaria, SIDA, gripe, síndrome de Reye, sarampión, encefalomielititis postinfecciosa,

parotiditis, lesiones epiteliales hiperplásicas (*por ejemplo*, verrugas comunes, planas, plantares y anogenitales, papilomas laríngeos, epidermodisplasia verruciforme), carcinoma cervical, carcinomas de células escamosas, crup, neumonía, bronquiolitis, resfriado común, poliomielitis, rabia, síndrome pseudogripal, bronquiolitis grave con neumonía, sarampión alemán, rubéola congénita, varicela y herpes zóster.

5 Los patógenos virales ejemplares incluyen Adenovirus, Coxsackievirus, Virus del dengue, Virus de la encefalitis, Virus de Epstein-Barr, Virus de la hepatitis A, Virus de la hepatitis B, Virus de la hepatitis C, Virus del herpes simple tipo 1, Virus del herpes simple tipo 2, Citomegalovirus, herpesvirus humano de tipo 8, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la gripe, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano, virus de la parainfluenza, poliovirus, virus de la rabia, virus sincitial respiratorio, virus de la rubéola, virus de la varicela-zóster, virus del Nilo Occidental, virus Dungee y virus de la fiebre amarilla. Los patógenos virales también pueden incluir virus que causan infecciones virales resistentes.

15 Los medicamentos antivirales son una clase de medicamentos utilizados específicamente para tratar infecciones víricas. La acción antiviral generalmente cae en uno de tres mecanismos: interferencia con la habilidad de un virus de infiltrarse en una célula diana (*por ejemplo*, amantadina, rimantadina y pleconaril), inhibición de la síntesis de virus (*por ejemplo*, análogos nucleósidos, *por ejemplo*, aciclovir y zidovudina (AZT), e inhibición de la liberación de virus (*por ejemplo*, zanamivir y oseltamivir).

Oftalmología

20 Los compuestos y procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva pueden utilizarse para tratar o prevenir un trastorno oftalmológico. Los trastornos oftalmológicos ejemplares incluyen edema macular (edema macular diabético y no diabético), degeneración macular relacionada con la edad formas húmedas y secas, degeneración macular disciforme envejecida, edema macular cistoide, edema palpebral, edema de retina, retinopatía diabética, coriorretinopatía, maculopatía neovascular, glaucoma neovascular, uveítis, iritis, vasculitis retiniana, endoftalmitis, panoftalmitis, oftalmia metastásica, coroiditis, epitelitis retiniana pigmentaria, conjuntivitis, ciclitis, escleritis, epiescleritis, neuritis óptica, neuritis óptica retrobulbar, queratitis, blefaritis, desprendimiento de retina exudativo, úlcera corneal, úlcera conjuntival, queratitis numular crónica, enfermedad oftálmica asociada a hipoxia o isquemia, retinopatía del prematuro, retinopatía diabética proliferativa, vasculopatía coroidea polipoidea, proliferación angiomasosa retiniana, oclusión arterial retiniana, oclusión venosa retiniana, enfermedad de Coats, vitreorretinopatía exudativa familiar, enfermedad sin pulso (enfermedad de Takayasu), enfermedad de Eales, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, retinopatía leucémica, síndrome de hiperviscosidad sanguínea, macroglobulinemia, retinopatía asociada al interferón, retinopatía hipertensiva, retinopatía por radiación, deficiencia de células madre epiteliales corneales y catarata.

Otros trastornos oftalmológicos tratables usando los compuestos y procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva incluyen vitreorretinopatía proliferativa y desprendimiento de retina crónico.

35 Las enfermedades oculares inflamatorias también son tratables usando los compuestos y procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva.

Enfermedad neurodegenerativa

40 Neurodegeneración es el término general para la pérdida progresiva de la estructura o función de las neuronas, incluyendo la muerte de las neuronas. Muchas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo el Parkinson, el Alzheimer y el Huntington, se producen como resultado de procesos neurodegenerativos. A medida que avanza la investigación, aparecen muchas similitudes que relacionan estas enfermedades entre sí a nivel subcelular. Descubrir estas similitudes ofrece esperanzas de avances terapéuticos que podrían mejorar muchas enfermedades simultáneamente. Existen muchos paralelismos entre los distintos trastornos neurodegenerativos, incluidos los ensamblajes atípicos de proteínas, así como la muerte celular inducida.

45 La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la pérdida de neuronas y sinapsis en la corteza cerebral y ciertas regiones subcorticales. Esta pérdida provoca una atrofia macroscópica de las regiones afectadas, incluida la degeneración del lóbulo temporal y del lóbulo parietal, así como de partes del córtex frontal y del giro cingulado.

50 La enfermedad de Huntington causa astrogliosis y pérdida de neuronas espinosas medias. Las zonas del cerebro se ven afectadas de acuerdo con su estructura y los tipos de neuronas que contienen, reduciéndose de tamaño a medida que pierden células de forma acumulativa. Las zonas afectadas se encuentran principalmente en el cuerpo estriado, pero también en las cortezas frontal y temporal. Los núcleos subtalámicos del cuerpo estriado envían señales de control al globo pálido, que inicia y modula el movimiento. Así, las señales más débiles de los núcleos subtalámicos provocan una menor iniciación y modulación del movimiento, lo que da lugar a los movimientos característicos del trastorno. Algunos tratamientos ejemplares de la enfermedad de Huntington son la tetrabenazina, los neurolépticos, las benzodiacepinas, la amantadina, la remacemida, el ácido valproico, los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), la mirtazapina y los antipsicóticos.

55 El mecanismo por el que se pierden las células cerebrales en el Parkinson puede consistir en una acumulación anormal de la proteína alfa-sinucleína unida a ubiquitina en las células dañadas. El complejo alfa-sinucleína-ubiquitina no puede

dirigirse al proteosoma. Esta acumulación de proteínas forma inclusiones citoplasmáticas proteicas denominadas cuerpos de Lewy. Las últimas investigaciones sobre la patogénesis de la enfermedad han demostrado que la muerte de neuronas dopaminérgicas por alfa-sinucleína se debe a un defecto en la maquinaria que transporta proteínas entre dos importantes orgánulos celulares: el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi. Ciertas proteínas como Rab1 pueden revertir este defecto causado por la alfa-sinucleína en modelos animales. Las terapias ejemplares para la enfermedad de Parkinson incluyen levodopa, agonistas dopaminérgicos como bromocriptina, pergolida, pramipexol, ropinirol, piribedil, cabergolina, apomorfina y lisurida, inhibidores de la dopa decarboxilato, inhibidores de la MAO-B como selegileno y rasagileno, anticolinérgicos y amantadina.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA/Enfermedad de Lou Gehrig) es una enfermedad en la que las neuronas motoras son selectivamente objeto de degeneración. Algunos ejemplos de terapias contra la ELA son el riluzol, el baclofeno, el diazepam, el trihexifenidilo y la amitriptilina.

Otras terapéuticas neurodegenerativas ejemplares incluyen oligonucleótidos antisentido y células madre.

Curación de heridas

Las heridas son un tipo de afección caracterizada por daño celular o tisular. La cicatrización de heridas es una vía dinámica que conduce de forma óptima al restablecimiento de la integridad y la función de los tejidos. El proceso de cicatrización de heridas consta de tres fases superpuestas. La primera es una fase inflamatoria, que se caracteriza por la homeostasis, la agregación plaquetaria y la degranulación. Las plaquetas, como primera respuesta, liberan múltiples factores de crecimiento para reclutar células inmunitarias, células epiteliales y células endoteliales. La fase inflamatoria suele producirse entre los días 0 y 5. La segunda etapa de la cicatrización de heridas es la fase proliferativa, durante la cual macrófagos y granulocitos invaden la herida. Los fibroblastos infiltrados comienzan a producir colágeno. Las principales características de esta fase son la epitelización, la angiogénesis, la formación de tejido de granulación y la producción de colágeno. La fase proliferativa suele producirse entre los días 3 y 14. La tercera fase es la de remodelación, en la que se produce la formación de la matriz. Los fibroblastos, las células epiteliales y las células endoteliales siguen produciendo colágeno y colagenasa, así como metaloproteasas de matriz (MPM) para la remodelación. Se produce la reticulación del colágeno y la herida se contrae. La fase de remodelación suele producirse entre el séptimo día y el año.

Los compuestos, las formas de dosificación oralmente aceptables y las composiciones descritas en la presente memoria descriptiva pueden usarse para promover la cicatrización de heridas (por ejemplo, promover o acelerar el cierre de heridas y/o la cicatrización de heridas, mitigar la fibrosis cicatricial del tejido de y/o alrededor de la herida, inhibir la apoptosis de las células que rodean o están próximas a la herida). Así, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento para promover la cicatrización de heridas en un sujeto, que comprende administrar al individuo una forma de dosificación aceptable por vía oral que comprende un compuesto (*por ejemplo*, un inhibidor de CRM1), o sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo. No es necesario que el procedimiento logre la cicatrización o el cierre completo de la herida; basta con que el procedimiento promueva cualquier grado de cierre de la herida. En este sentido, el procedimiento puede emplearse solo o como complemento de otros procedimientos de curación de tejidos heridos.

Los compuestos, formas de dosificación oralmente aceptables y composiciones descritos en la presente memoria descriptiva pueden utilizarse para tratar heridas durante la fase inflamatoria (o temprana), durante la fase proliferativa (o media) de cicatrización de heridas, y/o durante la fase de remodelación (o tardía) de cicatrización de heridas.

En algunas realizaciones, el individuo que necesita cicatrizar la herida es un humano o un animal, por ejemplo, un caballo, un cerdo o un roedor, tal como un ratón.

En algunos ejemplos, los compuestos y composiciones aquí descritos útiles para la cicatrización de heridas se administran tópicamente, por ejemplo, próximos al sitio de la herida, o sistémicamente.

Más específicamente, el compuesto o la composición descrito en la presente memoria descriptiva puede ser administrado (opcionalmente en combinación con otros agentes) al sitio de la herida cubriendo la herida o aplicando un vendaje, material de empaque, puntos, etc., que estén cubiertos o tratados con el compuesto o la composición descrito en la presente memoria descriptiva. Como tales, los compuestos y composiciones aquí descritos pueden formularse para administración tópica para tratar heridas superficiales. Las formulaciones tópicas incluyen aquellas para administración por vía oral (bucal) y a la piel de tal manera que una capa de la piel (*es decir*, la epidermis, la dermis y/o la capa subcutánea) se pone en contacto con el compuesto o la composición descritos en la presente memoria descriptiva. Los sistemas de administración tópica pueden utilizarse para administrar formulaciones tópicas de los compuestos y composiciones aquí descritos.

Alternativamente, los compuestos y composiciones descritos en la presente memoria descriptiva pueden administrarse en o cerca del sitio de la herida por medio de, por ejemplo, inyección de una solución, inyección de una formulación de liberación prolongada o introducción de un implante biodegradable que comprende el compuesto o composición descritos en la presente memoria descriptiva.

- 5 Los compuestos y composiciones aquí descritos pueden usarse para tratar heridas agudas o heridas crónicas. Una herida crónica se produce cuando se interrumpe el proceso normal de reparación. Las heridas crónicas pueden desarrollarse a partir de lesiones agudas como resultado de infecciones persistentes no reconocidas o de un tratamiento primario inadecuado. Sin embargo, en la mayoría de los casos, las lesiones crónicas son la fase final de una descomposición tisular progresiva debida a enfermedades vasculares venosas, arteriales o metabólicas, úlceras por presión, daños por radiación o tumores.
- 10 En las heridas crónicas, la cicatrización no se produce por una variedad de razones, incluyendo una circulación inadecuada en úlceras diabéticas, necrosis significativa, tal como en las quemaduras, e infecciones. En estas heridas crónicas, la viabilidad o la fase de recuperación suele ser el paso limitante. Las células ya no son viables y, por tanto, la fase de recuperación inicial se prolonga debido al entorno desfavorable del lecho de la herida.
- Las heridas crónicas incluyen, pero no se limitan a lo siguiente: lesiones cutáneas isquémicas crónicas; úlceras de esclerodermia; úlceras arteriales; úlceras de pie diabético; úlceras por presión; úlceras venosas; heridas de extremidades inferiores que no cicatrizan; úlceras debidas a afecciones inflamatorias; y/o heridas de larga duración.
- 15 En una realización particular, las formas de dosificación oralmente aceptables descritas en la presente memoria descriptiva pueden usarse para la cicatrización de heridas diabéticas o para acelerar la cicatrización de úlceras de piernas y pies secundarias a diabetes o isquemia en un individuo.
- En una realización, la herida es una herida superficial. En otra realización, la herida es una herida quirúrgica (*por ejemplo*, herida quirúrgica abdominal o gastrointestinal). En otra realización, la herida es una quemadura. En otra realización, la herida es el resultado de la exposición a la radiación.
- 20 Los compuestos, las formas de dosificación oralmente aceptables y las composiciones descritas en la presente memoria descriptiva también pueden utilizarse para la cicatrización de heridas diabéticas, la cicatrización de heridas gastrointestinales o la cicatrización de una adherencia debida, por ejemplo, a una operación.
- 25 Los compuestos, formas de dosificación oralmente aceptables y composiciones descritos en la presente memoria descriptiva también pueden usarse para curar heridas que son secundarias a otra enfermedad. Por ejemplo, en las enfermedades inflamatorias de la piel, como la psoriasis y la dermatitis, se producen numerosos incidentes de lesiones cutáneas secundarias a la enfermedad, causadas por el agrietamiento profundo de la piel o el rascado de la misma. Los compuestos, las formas de dosificación oralmente aceptables y las composiciones aquí descritas pueden utilizarse para curar heridas secundarias a estas enfermedades, por ejemplo, enfermedades inflamatorias de la piel, tales como la psoriasis y la dermatitis.
- 30 En otra realización, la herida es una herida interna. En un aspecto específico, la herida interna es una herida crónica. En otro aspecto específico, la herida es una herida vascular. En otro aspecto específico, la herida interna es una úlcera.
- Ejemplos de heridas incluyen, pero no se limitan a, abrasiones, avulsiones, heridas por soplado (es decir, neumotórax abierto), heridas por quemadura, contusiones, heridas por arma de fuego, heridas incisivas, heridas abiertas, heridas penetrantes, heridas perforantes, heridas por punción, heridas por septón, heridas por arma blanca, heridas quirúrgicas, heridas subcutáneas, lesiones diabéticas o heridas tangenciales. Ejemplos adicionales de heridas que pueden ser tratadas por los compuestos, formas de dosificación oralmente aceptables y composiciones aquí descritas incluyen afecciones o heridas agudas, tales como quemaduras térmicas, quemaduras químicas, quemaduras por radiación, quemaduras causadas por la exposición excesiva a la radiación ultravioleta (por ejemplo, quemaduras solares); daños en tejidos corporales, tales como el perineo como resultado del parto; lesiones sufridas durante procedimientos médicos, tales como episiotomías; lesiones inducidas por traumatismos, incluyendo cortes, incisiones, excoiaciones; lesiones sufridas en accidentes; lesiones posquirúrgicas, así como afecciones crónicas, tales como úlceras por presión, úlceras por decúbito, afecciones relacionadas con la diabetes y la mala circulación, y todos los tipos de acné. Además, la herida puede incluir dermatitis, tal como impétigo, intertrigo, foliculitis y eczema, heridas tras cirugía dental; enfermedad periodontal; heridas tras traumatismos; y heridas asociadas a tumores. Otros ejemplos de heridas incluyen mordeduras de animales, enfermedades arteriales, picaduras y mordeduras de insectos, infecciones óseas, injertos de piel/músculo comprometidos, gangrena, desgarros o laceraciones de la piel, envejecimiento de la piel, incisiones quirúrgicas, incluidas heridas quirúrgicas lentas o que no cicatrizan, hemorragia intracerebral, aneurisma, astenia dérmica e infecciones postoperatorias.
- 35 40 45 50 En realizaciones preferentes, la herida se selecciona del grupo que consiste en una herida por quemadura, una herida incisa, una herida abierta, una herida quirúrgica o posquirúrgica, una lesión diabética, una quemadura térmica, una quemadura química, una quemadura por radiación, una úlcera por presión, una úlcera de decúbito y una afección relacionada con la diabetes o la mala circulación.
- 55 La presente divulgación también se relaciona con procedimientos y composiciones para reducir la formación de cicatrices durante la cicatrización de heridas en un sujeto. Los compuestos y composiciones aquí descritos pueden administrarse directamente a la herida o a las células próximas a la herida en una cantidad eficaz para reducir la formación de cicatrices en y/o alrededor de la herida.

La herida puede incluir cualquier lesión en cualquier porción del cuerpo de un sujeto. De acuerdo con realizaciones, se proporcionan procedimientos para mejorar, reducir o disminuir la formación de cicatrices en un sujeto que ha sufrido una lesión por quemadura. De acuerdo con realizaciones preferentes, se proporcionan procedimientos para tratar, reducir la aparición de, o reducir la probabilidad de desarrollar cicatrices hipertróficas en un sujeto que ha sufrido una herida o lesión aguda o crónica.

Otros trastornos

Los compuestos, las formas de dosificación oralmente aceptables y las composiciones descritas en la presente memoria descriptiva también pueden usarse para tratar trastornos de crecimiento tisular anormal y fibrosis, incluyendo cardiomiopatía dilatativa, cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía restrictiva, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, glomerulonefritis y otros trastornos renales.

Radioterapia combinada

Los compuestos, formas de dosificación oralmente aceptables y composiciones descritos en la presente memoria descriptiva son útiles como radiosensibilizadores. Por lo tanto, los compuestos, las formas de dosificación oralmente aceptables y las composiciones aquí descritas pueden administrarse en combinación con radioterapia. La radioterapia es el uso médico de radiaciones de alta energía (por ejemplo, rayos X, rayos gamma o partículas cargadas) para reducir tumores y destruir células malignas. La radioterapia destruye las células malignas dañando su ADN.

La radioterapia puede administrarse a un paciente de varias maneras. Por ejemplo, la radiación puede administrarse desde una fuente externa, tal como una máquina situada fuera del cuerpo del paciente, como en la radioterapia de haz externo. La radioterapia de haz externo para el tratamiento del cáncer utiliza una fuente de radiación externa al paciente, normalmente un radioisótopo, tal como ⁶⁰Co, ¹³⁷Cs, o una fuente de rayos X de alta energía, tal como un acelerador lineal. La fuente externa produce un haz colimado dirigido hacia el interior del paciente, hacia la zona del tumor. La radioterapia de fuente externa evita algunos de los problemas de la radioterapia de fuente interna, pero irradia indeseable y necesariamente un volumen significativo de tejido no tumoral o sano en la trayectoria del haz de radiación junto con el tejido tumoral.

El efecto adverso de la irradiación del tejido sano puede reducirse, manteniendo al mismo tiempo una dosis dada de radiación en el tejido tumoral, proyectando el haz de radiación externa en el paciente en una variedad de ángulos de "gantry" con los haces convergiendo en el sitio del tumor. Los elementos de volumen particular de tejido sano, a lo largo de la trayectoria del haz de radiación, cambian, reduciendo la dosis total a cada uno de tales elementos de tejido sano durante todo el tratamiento.

La irradiación del tejido sano también puede reducirse colimando estrechamente el haz de radiación a la sección transversal general del tumor tomada perpendicularmente al eje del haz de radiación. Existen numerosos sistemas para producir tal colimación circunferencial, algunos de los cuales utilizan múltiples obturadores deslizantes que, por partes, pueden generar una máscara radioopaca de contorno arbitrario.

Para la administración de radiación de haz externo, la cantidad puede ser de al menos aproximadamente 1 Gray (Gy) fracciones al menos una vez cada dos días a un volumen de tratamiento. En una realización particular, la radiación se administra en al menos aproximadamente 2 Gray (Gy) fracciones al menos una vez al día a un volumen de tratamiento. En otra realización particular, la radiación se administra en al menos aproximadamente 2 Gray (Gy) fracciones al menos una vez al día a un volumen de tratamiento durante cinco días consecutivos por semana. En otra realización particular, la radiación se administra en fracciones de 10 Gy en días alternos, tres veces por semana a un volumen de tratamiento. En otra realización particular, se administra un total de al menos 20 Gy a un paciente que lo necesite. En otra realización particular, se administran al menos unos 30 Gy a un paciente que los necesite. En otra realización particular, se administran al menos unos 40 Gy a un paciente que los necesite.

Normalmente, el paciente recibe radioterapia externa cuatro o cinco veces por semana. Un ciclo completo de tratamiento suele durar de una a siete semanas, dependiendo del tipo de cáncer y del objetivo del tratamiento. Por ejemplo, un paciente puede recibir una dosis de 2 Gy/día durante 30 días.

La radioterapia interna es una radioterapia localizada, lo que significa que la fuente de radiación se coloca en el lugar del tumor o de la zona afectada. La radioterapia interna puede administrarse colocando una fuente de radiación en el interior o junto a la zona que requiere tratamiento. La radioterapia interna también se denomina braquiterapia. La braquiterapia incluye el tratamiento intercavitario y el tratamiento intersticial. En el tratamiento intracavitario, se colocan contenedores que contienen fuentes radiactivas en el tumor o cerca de él. Las fuentes se introducen en las cavidades corporales. En el tratamiento intersticial, sólo se introducen las fuentes radiactivas en el tumor. Estas fuentes radiactivas pueden permanecer en el paciente de forma permanente. Normalmente, las fuentes radiactivas se retiran del paciente al cabo de varios días. Las fuentes radiactivas están en contenedores.

Existen varios procedimientos para la administración de un agente radiofarmacéutico. Por ejemplo, el agente radiofarmacéutico puede administrarse por administración dirigida o por administración sistémica de conjugados radiactivos dirigidos, tales como un anticuerpo radiomarcado, un péptido radiomarcado y un sistema de administración liposomal. En una realización particular de administración dirigida, el agente farmacéutico radiomarcado puede ser un

anticuerpo radiomarcado. Véase, por ejemplo, Ballangrud A. M., et al. Cancer Res., 2001; 61:2008-2014 y Goldenber, D.M. J. Nucl. Med., 2002; 43(5):693-713.

5 En otra realización particular de administración dirigida, el agente radiofarmacéutico puede administrarse en forma de sistemas de administración liposomal, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden formarse a partir de diversos fosfolípidos, como el colesterol, la estearilamina o las fosfatidilcolinas. Véase, por ejemplo, Emfietzoglou D, Kostarelos K, Sgouros G. An analytical dosimetry study for the use of radionuclide-liposome conjugates in internal radiotherapy. J Nucl Med 2001; 42:499-504.

10 En otra realización particular de administración dirigida, el agente farmacéutico radiomarcado puede ser un péptido radiomarcado. Véase, por ejemplo, Weiner RE, Thakur ML. Péptidos radiomarcados en el diagnóstico y la terapia de enfermedades oncológicas. Appl Radiat Isot 2002 Nov;57(5):749-63.

15 Además de la administración dirigida, la bracyterapia puede utilizarse para administrar el agente radiofarmacéutico al lugar diana. La braquiterapia es una técnica que sitúa las fuentes de radiación lo más cerca posible de la zona tumoral. A menudo, la fuente se inserta directamente en el tumor. Las fuentes radiactivas pueden tener forma de alambres, semillas o varillas. Generalmente, se utilizan el cesio, el iridio o el yodo.

La radioterapia sistémica es otro tipo de radioterapia e implica el uso de sustancias radiactivas en la sangre. La radioterapia sistémica es una forma de terapia dirigida. En la radioterapia sistémica, el paciente suele ingerir o recibir una inyección de una sustancia radiactiva, tal como yodo radiactivo o una sustancia radiactiva unida a un anticuerpo monoclonal.

20 Un "agente radiofarmacéutico", tal como se define en la presente memoria descriptiva, se relaciona con un agente farmacéutico que contiene al menos un radioisótopo emisor de radiación. Los agentes radiofarmacéuticos se utilizan habitualmente en medicina nuclear para el diagnóstico y/o tratamiento de diversas enfermedades. El agente farmacéutico radiomarcado, por ejemplo, un anticuerpo radiomarcado, contiene un radioisótopo (RI) que sirve como fuente de radiación. Tal y como se contempla en la presente memoria descriptiva, el término "radioisótopo" incluye radioisótopos metálicos y no metálicos. El radioisótopo se elige en función de la aplicación médica de los agentes farmacéuticos radiomarcados. Cuando el radioisótopo es metálico, se suele emplear un quelante para unir el radioisótopo metálico al resto de la molécula. Cuando el radioisótopo es un radioisótopo no metálico, el radioisótopo no metálico suele estar unido directamente, o por medio de un enlazador, al resto de la molécula.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, un "radioisótopo metálico" es cualquier radioisótopo metálico adecuado útil en un procedimiento terapéutico o de diagnóstico *in vivo* o *in vitro*. Los radioisótopos metálicos adecuados incluyen, entre otros: Actinio-225, Antimonio-124, Antimonio-125, Arsénico-74, Bario-103, Bario-140, Berilio-7, Bismuto-206, Bismuto-207, Bismuto-212, Bismuto-213, Cadmio-109, Cadmio-115m, Calcio-45, Cerio-139, Cerio-141, Cerio-144, Cesio-137, Cromo-51, Cobalto-55, Cobalto-56, Cobalto-57, Cobalto-58, Cobalto-60, Cobalto-64, Cobre-60, Cobre-62, Cobre-64, Cobre-67, Erblio-169, Europio-152, Galio-64, Galio-67, Galio-68, Gadolinio-153, Gadolinio-157, Oro-195, Oro-199, Hafnio-175, Hafnio-175-181, Holmio-166, Indio-110, Indio-111, Iridio-192, Hierro-55, Hierro-59, Criptón-85, Plomo-203, Plomo-210, Lutecio-177, Manganeso-54, Mercurio-197, Mercurio-203, Molibdeno-99, Neodimio-147, Neptunio-237, Níquel-63, Niobio-95, Osmio-185+191, Paladio-103, Paladio-109, Platino-195m, Praseodimio-143, Prometio-147, Prometio-149, Protactinio-233, Radio-226, Renio-186, Renio-188, Rubidio-86, Rutenio-97, Rutenio-103, Rutenio-105, Rutenio-106, Samario-153, Escandio-44, Escandio-46, Escandio-47, Selenio-75, Plata-110m, Plata-111, Sodio-22, Estroncio-85, Estroncio-89, Estroncio-90, Azufre-35, Tantalio-182, Tecnecio-99m, Telurio-125, Telurio-132, Talio-204, Torio-228, Torio-232, Talio-170, Estaño-113, estaño-114, estaño-117m, titanio-44, wolframio-185, vanadio-48, vanadio-49, iterbio-169, itrio-86, itrio-88, itrio-90, itrio-91, zinc-65, circonio-89 y circonio-95.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, un "radioisótopo no metálico" es cualquier radioisótopo no metálico adecuado (radioisótopo no metálico) útil en un procedimiento terapéutico o de diagnóstico *in vivo* o *in vitro*. Los radioisótopos no metálicos adecuados incluyen, pero no se limitan a: Yodo-131, Yodo-125, Yodo-123, Fósforo-32, Astatina-211, Flúor-18, Carbono-11, Oxígeno-15, Bromo-76 y Nitrógeno-13.

50 Identificar el isótopo más adecuado para la radioterapia requiere sopesar diversos factores. Entre ellas figuran la captación y retención por el tumor, el aclaramiento sanguíneo, la tasa de administración de la radiación, la semivida y la actividad específica del radioisótopo, y la viabilidad de la producción a gran escala del radioisótopo de forma económica. El punto clave para un radiofármaco terapéutico es administrar la cantidad necesaria de dosis de radiación a las células tumorales y lograr un efecto citotóxico o tumoricida sin causar efectos secundarios inmanejables.

55 Se prefiere que la semivida física del radioisótopo terapéutico sea similar a la semivida biológica del radiofármaco en el lugar del tumor. Por ejemplo, si la semivida del radioisótopo es demasiado corta, gran parte de la desintegración se habrá producido antes de que el radiofármaco haya alcanzado la máxima relación blanco/fondo. Por otro lado, una semivida demasiado larga podría causar una dosis de radiación innecesaria en los tejidos normales. Lo ideal es que el radioisótopo tenga una semivida lo suficientemente larga como para alcanzar una tasa de dosis mínima e irradiar todas las células durante las fases más sensibles a la radiación del ciclo celular. Además, el periodo de

semidesintegración de un radioisótopo tiene que ser lo suficientemente largo como para que haya tiempo suficiente para su fabricación, liberación y transporte.

5 Otras consideraciones prácticas a la hora de seleccionar un radioisótopo para una aplicación determinada en terapia tumoral son la disponibilidad y la calidad. La pureza debe ser suficiente y reproducible, ya que la cantidad de trazas de impurezas pueden afectar al radiomarcado y a la pureza radioquímica del radiofármaco.

Los sitios receptores diana en tumores son típicamente limitados en número. Como tal, se prefiere que el radioisótopo tenga una alta actividad específica. La actividad específica depende principalmente del procedimiento de producción. Los contaminantes de metales traza deben reducirse al mínimo, ya que a menudo compiten con el radioisótopo por el quelante y sus complejos metálicos compiten por la unión del receptor con el agente quelado radiomarcado.

10 El tipo de radiación que es adecuado para su uso en los procedimientos de la presente invención puede variar. Por ejemplo, la radiación puede ser electromagnética o de partículas. La radiación electromagnética útil en la práctica de esta invención incluye, pero no se limita a, rayos X y rayos gamma. La radiación particulada útil en la práctica de esta invención incluye, pero no se limita a, haces de electrones (partículas beta), haces de protones, haces de neutrones, partículas alfa y mesones pi negativos. La radiación puede administrarse por medio de aparatos y procedimientos convencionales de tratamiento radiológico, así como por procedimientos intraoperatorios y estereotácticos. La discusión adicional con respecto a los tratamientos de radiación adecuados para su uso en la práctica de esta invención se puede encontrar a lo largo de Steven A. Leibel et al., *Textbook of Radiation Oncology* (1998) (publ. W. B. Saunders Company), y en particular en los capítulos 13 y 14. La radiación también puede administrarse por otros procedimientos, tal como la administración dirigida, por ejemplo por medio de "semillas" radiactivas, o por medio de la administración sistémica de conjugados radiactivos dirigidos. J. Padawer et al., *Combined Treatment with Radioestradiol lucanthone in Mouse C3HBA Mammary Adenocarcinoma and with Estradiol lucanthone in an Estrogen Bioassay*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Física*. 7:347-357 (1981). Pueden utilizarse otros procedimientos de administración de radiación en la práctica de esta invención.

25 Para la terapia de tumores, se han investigado emisores de partículas α y β . Las partículas alfa son agentes citotóxicos especialmente buenos porque disipan una gran cantidad de energía en uno o dos diámetros celulares. Los emisores de partículas β tienen un intervalo de penetración relativamente largo (2-12 mm en el tejido) dependiendo del nivel de energía. La penetración a larga distancia es especialmente importante en los tumores sólidos que presentan un flujo sanguíneo y/o una expresión de receptores heterogéneos. Los emisores de partículas β producen una distribución de dosis más homogénea incluso cuando están distribuidos heterogéneamente en el tejido diana.

30 En una realización particular, cantidades terapéuticamente eficaces de las formas de dosificación oralmente aceptables descritas en la presente memoria descriptiva se administran en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de radioterapia para tratar el cáncer (*por ejemplo*, cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas). La cantidad de radiación necesaria puede ser determinada por un experto en la materia basándose en las dosis conocidas para un tipo concreto de cáncer. Véase, por ejemplo, *Cancer Medicine 5th ed.*, Edited by R.C. Bast y otros, julio de 2000, BC Decker.

40 La divulgación anterior describe en general la presente invención. Se puede obtener una comprensión más completa haciendo referencia a los siguientes Ejemplos específicos. Estos Ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. Se contemplan cambios de forma y sustitución de equivalentes de acuerdo con sugieran o hagan convenientes las circunstancias. Aunque en la presente memoria descriptiva se emplean términos específicos, éstos tienen un sentido descriptivo y no limitativo.

Ejemplificación

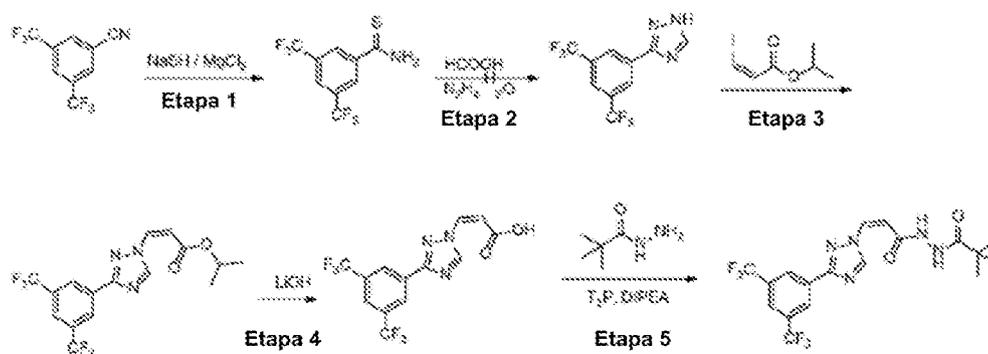
Abreviaturas

aq.	Acuoso
Boc	terc-butoxicarbonilo
45 CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMF	N,N-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
50 eq.	equivalente(s)
EtOAc	Acetato de etilo

	EtOH	Etanol
	H	hora(s)
	HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
	LCMS	Cromatografía líquida Espectrometría de masas
5	LiOH	Hidróxido de litio
	RMN	Resonancia magnética nuclear
	TA	Temperatura ambiente o tiempo de retención
	T3P	Anhídrido propilfosfónico
	TFA	Ácido trifluoroacético
10	THF	Tetrahidrofurano

A lo largo de la siguiente descripción de tales procesos debe entenderse que, cuando sea apropiado, se añadirán grupos protectores adecuados a, y posteriormente se eliminarán de, los varios reactivos e intermedios de una manera que será fácilmente entendida por un experto en el arte de la síntesis orgánica. Los procedimientos convencionales para utilizar tales grupos protectores, así como ejemplos de grupos protectores adecuados, se describen, por ejemplo, en "Grupos protectores en síntesis orgánica", T.W. Green, P.G.M. Wuts, Wiley-Interscience, Nueva York, (1999). También debe entenderse que la transformación de un grupo o sustituyente en otro grupo o sustituyente por medio de manipulación química puede llevarse a cabo en cualquier producto intermedio o final en el camino sintético hacia el producto final, en el que el posible tipo de transformación está limitado únicamente por la incompatibilidad inherente de otras funcionalidades portadas por la molécula en esa etapa a las condiciones o reactivos empleados en la transformación. Los expertos en el arte de la síntesis orgánica comprenderán fácilmente estas incompatibilidades inherentes y las formas de eludir las llevando a cabo las transformaciones y los pasos sintéticos apropiados en un orden adecuado. A continuación se dan ejemplos de transformaciones, y debe entenderse que las transformaciones descritas no se limitan únicamente a los grupos o sustituyentes genéricos para los que se ejemplifican las transformaciones. En "Comprehensive Organic Transformations - A Guide to Functional Group Preparations" R. C. Larock, VHC Publishers, Inc. (1989) se dan referencias y descripciones sobre otras transformaciones adecuadas. Las referencias y descripciones de otras reacciones adecuadas se describen en libros de texto de química orgánica, por ejemplo, "Advanced Organic Chemistry", March, 4th ed., McGraw Hill (1992) o "Organic Synthesis", Smith, McGraw Hill, (1994). McGraw Hill (1992) o "Organic Synthesis", Smith, McGraw Hill, (1994). Las técnicas de purificación de los productos intermedios y finales incluyen, por ejemplo, la cromatografía en fase directa e inversa en columna o plato giratorio, la recristalización, la destilación y la extracción líquido-líquido o sólido-líquido, que serán fácilmente comprendidas por el experto en la materia. Las definiciones de los sustituyentes y los grupos son las mismas que en la fórmula I, salvo que se definan de otro modo. Los términos "temperatura ambiente" y "temperatura ambiente" designan, salvo indicación contraria, una temperatura comprendida entre 16 y 25 °C. El término "reflujo" significará, salvo indicación contraria, en referencia a un disolvente empleado, una temperatura igual o superior al punto de ebullición de dicho disolvente.

Ejemplo 1. Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-pivaloylacrilohidrazida (Compuesto 1). El compuesto 1 se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema:



3,5-bis(trifluorometil)benzotioamida (etapa 1). Se cargó un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 2 L con una solución de 3,5-bis(trifluorometil)benzonitrilo (200 g) en DMF (1 L). A continuación, la solución se trató con NaSH (123,7 g, 2,0 eq.) y MgCl₂ (186,7 g, 1,0 eq.) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 h. La mezcla se vertió en una suspensión de hielo y agua (10 L) y el compuesto se extrajo con EtOAc (3 × 1 L). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa saturada de cloruro sódico (3 × 100 mL), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se

concentraron a presión reducida para obtener 205 g de la 3,5-bis(trifluorometil)benzotiamida cruda deseada (rendimiento: 90 %), que se utilizó sin más purificación en la siguiente etapa.

3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazolo (Etapa 2). Se cargó un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 5 L con una solución de 3,5-bis(trifluorometil)benzotiamida (205,65 g) en DMF (1,03 L). Se añadió gota a gota hidrato de hidracina (73,2 mL, 2,0 eq.) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. Se añadió gota a gota HCOOH (1,03 L) y la mezcla de reacción se sometió a reflujo a 90 °C durante 3 h. Después de dejar enfriar a TA, la mezcla de reacción se vertió en solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (7 L) y se extrajo con EtOAc (3 × 1 L). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa saturada de cloruro sódico (3 × 500 mL), se secaron sobre Na₂SO₄anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida (35 °C, 20 mmHg) para obtener 180 g del producto bruto. El material bruto se agitó con éter de petróleo (3 × 500 mL), se filtró y se secó para obtener 160 g del 3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol deseado obtenido como un sólido amarillo pálido (rendimiento: 75%).

(Z)-isopropil 3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrilato (Etapa 3). Se cargó un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 2 L con una disolución de 3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol (160 g) en DMF (960 mL). La solución se trató con DABCO (127,74 g, 2 eq.) y se agitó durante 30 min antes de añadir (Z)-isopropil 3-yodoacrilato (150,32 g, 1,1 eq.) gota a gota. Tras 1 h, la mezcla de reacción se vertió en una suspensión de hielo y agua (5 L) y se extrajo con EtOAc (3 × 1 L). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de cloruro de sodio acuoso saturada (3 × 100 mL), se secaron sobre Na₂SO₄ anhídrico, filtraron, y concentraron bajo presión reducida (35 °C, 20 mmHg) para obtener 250 g del producto crudo que fue purificado por medio de columna de cromatografía (60/120 gel de sílice) mediante el uso de acetato de gradiente etilo/n-hexano (la columna fue empacada en hexano y el compuesto deseado comenzó eluyendo desde 2 % EtOAc/n-hexano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para obtener (Z)-isopropil 3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrilato (138 g, rendimiento: 61%).

Ácido acrílico (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il) (Etapa 4). En un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 5 L, se disolvió (Z)-isopropil 3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrilato (130 g, 1,0 eq.) en THF (1,3 L). Se añadió gota a gota una solución de LiOH (69,3 g, 5,0 eq.) en agua (1,3 L) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h antes de enfriarla con 400 mL de hielo y agua y acidificarla (pH=2-3) con HCl acuoso diluido. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 × 1 L) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa saturada de cloruro sódico, se secaron sobre Na₂SO₄, y se concentró a presión reducida para obtener 110 g de ácido acrílico (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il) (rendimiento: 94 %), (contenido cis= 90,0 %, contenido trans= 8,2 % por LCMS).

(Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1, 2, 4-triazol-1-il)-N'-pivaloylacrilohidrazida (Compuesto 1).. En un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 50 mL, se disolvió ácido acrílico (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il) (0,2 g, 1,0 eq.) en EtOAc (20 mL) y se enfrió a -60 °C donde se introdujo gota a gota pivalohidrazida (0,08 g, 1,2 eq.). Se añadió gota a gota T3P (50% en EtOAc) (0,4 mL, 4 eq.) seguido de DIPEA (0,4 mL, 4 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para obtener el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado empezó a eluir a partir del 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para obtener (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-pivaloylacrilohidrazida (0,11 g, rendimiento: 43%);

Ejemplo 2. Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-morfolinoacetil)acrilohidrazida (Compuesto 2).

2-morfolinoacetohidrazida. En un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 25 mL, se disolvió 2-morfolinoacetato de metilo (0,25 g, 1,0 eq.) en etanol (5 mL) a temperatura ambiente. El hidrato de hidracina (0,087 g, 1,1 eq.) se introdujo gota a gota a TA y la mezcla de reacción se sometió a reflujo a 95 °C durante 20 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (40 °C, 20 mm Hg) para obtener la 2-morfolinoacetohidrazida bruta (0,23 g) que se utilizó sin purificación adicional en la etapa siguiente.

(Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-morfolinoacetil)acrilohidrazida (Compuesto 2). En un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 50 mL, se disolvió ácido acrílico (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il) (Ejemplo 1, Etapa 4; 0,5 g, 1,0 eq.) se disolvió en CH₂Cl₂: EtOAc (20 mL, 2:1) y se enfrió a -60 °C donde se introdujo gota a gota 2-morfolinoacetohidrazida (0,23 g, 1,0 eq.). Se añadió gota a gota T3P (50% en EtOAc) (1,27 mL, 1,5 eq.) seguido de DIPEA (0,96 mL, 2 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para obtener el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado empezó a eluir a partir del 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para obtener (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-morfolinoacetil)acrilohidrazida (0,1 g, rendimiento: 14%).

Ejemplo 3. Síntesis de (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-5-metil-1H-pirazol-4-carbohidrazida (Compuesto 3).

5 *5-metil-1H-pirazol-4-carbohidrazida*. En un tubo sellado de 25 mL, se disolvió 5-metil-1H-pirazol-4-carboxilato de etilo (0,25 g, 1,0 eq.) en etanol (5 mL) a temperatura ambiente. El hidrato de hidracina (1 mL, 5 eq.) se introdujo gota a gota a TA y la mezcla de reacción se calentó a 120 °C durante 20 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (40 °C, 20 mm Hg) para obtener la 5-metil-1H-pirazol-4-carbohidrazida en bruto (0,24 g) que se utilizó sin purificación adicional en la etapa siguiente.

10 *(Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-5-metil-1H-pirazol-4-carbohidrazida (Compuesto 3)*. En un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 50 mL, se disolvió ácido acrílico *(Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)* (Ejemplo 1, Etapa 4; 0,5 g, 1,0 eq.) se disolvió en EtOAc:EtOH (15 mL, 2:1) y se enfrió a -60 °C en el que se introdujo gota a gota 5-metil-1H-pirazol-4-carbohidrazida (0,24 g, 1,0 eq.). Se añadió gota a gota T3P (50% en EtOAc) (1,69 mL, 1,5 eq.) seguido de DIPEA (2 mL, 8 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para obtener el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado empezó a eluir a partir del 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para obtener *(Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-5-metil-1H-pirazol-4-carbohidrazida* (0,2 g, rendimiento: 42%).

Ejemplo 4. Síntesis de (Z)-2-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-N-ciclopropilhidrazinocarbotiamida (Compuesto 4).

20 En un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 50 mL, se disolvió ácido acrílico *(Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)* (Ejemplo 1, Etapa 4; 0,5 g, 1,0 eq.) se disolvió en EtOAc:EtOH (15 mL, 2:1) y se enfrió a -60 °C, en el que se introdujo gota a gota N ciclopropilhidrazinocarbotiamida (0,22 g, 1,2 eq.). Se añadió gota a gota T3P (50% en EtOAc) (1,69 mL, 2 eq.) seguido de DIPEA (1 mL, 4 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para obtener el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado empezó a eluir a partir del 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para obtener *(Z)-2-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-N-ciclopropilhidrazinocarbotiamida* (0,06 g, rendimiento: 9%).

Ejemplo 5. Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-metil-N'(2-morfolinoacetil)acrilohidrazida (Compuesto 5).

30 *N-metil-2-morfolinoacetohidrazida*. En un tubo sellado de 25 mL, se disolvió 2-morfolinoacetato de metilo (0,5 g, 1,0 eq.) en etanol (5 mL) a TA. La metilhidrazina (0,16 g, 1,1 eq.) se introdujo gota a gota a TA y la mezcla de reacción se sometió a reflujo a 95 °C durante 48 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (40 °C, 20 mm Hg) para obtener la A-metil-2-morfolinoacetohidrazida cruda (0,27 g) que se utilizó sin purificación adicional en el paso siguiente.

35 *(Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-metil N'(2-morfolinoacetil)acrilohidrazida (Compuesto 5)*. En un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 50 mL, se disolvió ácido acrílico *(Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)* (Ejemplo 1, Etapa 4; 0,3 g, 1,0 eq.) en THF: EtOAc (15 mL, 2:1) y se enfrió a -60 °C en el que se introdujo gota a gota N-metil-2-morfolinoacetohidrazida (0,23 g, 1,5 eq.). Se añadió gota a gota T3P (50% en EtOAc) (1,27 mL, 2,5 eq.) seguido de DIPEA (0,45 mL, 3 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para obtener el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado empezó a eluir a partir del 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para obtener *(Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-metil-N'(2-morfolinoacetil)acrilohidrazida* (0,052 g, rendimiento: 12%).

Ejemplo 6. Síntesis de (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)piperidin-3-carbohidrazida (Compuesto 6).

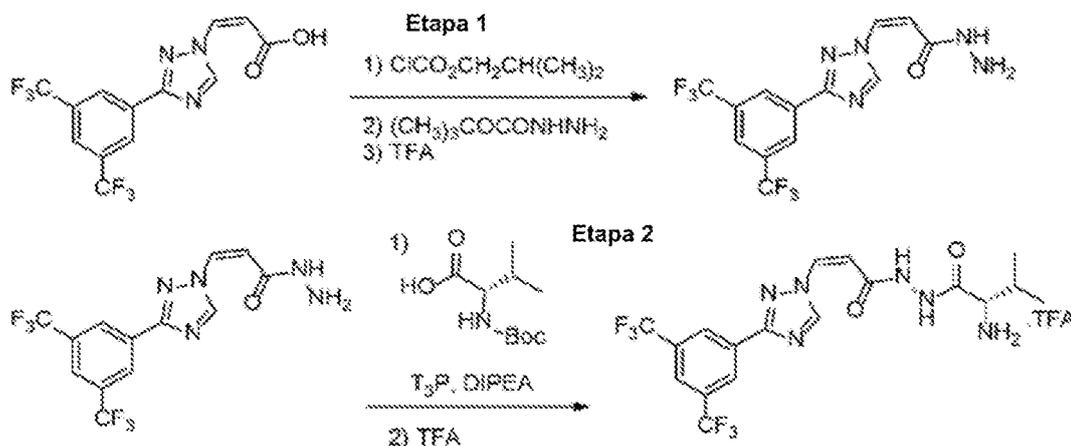
50 *Piperidin-3-carbohidrazida*. En un tubo sellado de 30 mL, se disolvió piperidina-3-carboxilato de etilo (1 g, 1,0 eq.) en etanol (5 mL) a TA. El hidrato de hidracina (1,05 g, 3 eq.) se introdujo gota a gota a TA y la mezcla de reacción se calentó a 120 °C durante 20 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (40 °C, 20 mm Hg) para obtener la piperidina-3-carbohidrazida bruta (0,8 g) que se utilizó sin purificación adicional en el paso siguiente.

55 *(Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)piperidin-3-carbohidrazida (Compuesto 6)*. En un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 50 mL, se disolvió ácido acrílico *(Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)* (Ejemplo 1, Etapa 4; 0,25 g, 1,0 eq.) en THF: EtOAc (15 mL, 2:1) y se enfrió a -60 °C donde se introdujo gota a gota piperidina-3-carbohidrazida (0,113 g, 1,1 eq.). Se añadió gota a gota T3P (50% en EtOAc) (1,69 mL, 4 eq.) seguido de DIPEA (0,25 mL, 2 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para obtener el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado empezó a eluir a partir del 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que

contenían los compuestos deseados se combinaron para obtener (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrililoil)piperidin-3-carbohidrazida (0,01 g, rendimiento: 2,4%).

Ejemplo 7. Síntesis de (S,Z)-2-amino-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrililoil)-3-metilbutanohidrazida 2,2,2-trifluoroacetato (Compuesto 7).

5 El compuesto 7 se sintetizó por medio del siguiente esquema:



(Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrilóihidrazida (Etapa 1). En un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 50 mL, se disolvió ácido acrílico (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il) (Ejemplo 1, Etapa 4; 0,5 g, 1,0 eq.) se disolvió en THF (10 mL) y se enfrió a -10 °C, en el que se añadió NMP (0,3 g, 2,1 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 5 min. A continuación se añadió clorocformato de isobutilo (0,465 g, 2,4 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h. El sólido formado se eliminó por filtración. El filtrado se enfrió a 0 °C y se introdujo la hidrazida de terc-butoxicarbonilo (0,21 g, 1,1 eq.). La mezcla de reacción se dejó calentar hasta TA, en la que se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se vertió en un baño de agua helada y se extrajo con EtOAc (3 × 50 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de cloruro de sodio acuoso saturada (25 mL), secaron sobre Na₂SO₄ anhidrico, filtraron, y se concentraron bajo presión reducida (25 °C, 20 mmHg) para obtener 0,5 g del producto crudo. A continuación, el producto bruto se disolvió en THF (10 mL) y se añadió gota a gota TFA (2 mL) a TA y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mmHg) y el sólido formado se trituroó con pentano para obtener (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrilóihidrazida (0,25 g, rendimiento: 48,5%).

Ácido (S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanoico. En un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 25 mL, se disolvió ácido (S)-2-amino-3-metilbutanoico (0,8 g, 1,0 eq.) en agua (4 mL). Se añadió bicarbonato sódico (0,63 g, 1,1 eq.), seguido de di-tert-butil dicarbonato (2,97 g, 2,0 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h a TA. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (3 × 10 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de cloruro de sodio acuoso saturada (25 mL), secaron sobre Na₂SO₄ anhidrico, filtraron, y se concentraron bajo presión reducida (25 °C, 20 mmHg) para obtener 1,2 del producto crudo que fue purificado por medio de columna de cromatografía (60/120 gel de sílice) mediante el uso de gradiente metanol/diclorometano (la columna se empacó en diclorometano y el compuesto deseado comenzó eluyéndose desde 3 % metanol/diclorometano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para obtener ácido (S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanoico (0,7 g, rendimiento: 47,3%).

(S,Z)-2-amino-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrililoil)-3-metilbutanohidrazida 2,2,2-trifluoroacetato (Compuesto 7). En un matraz de fondo redondo de 10 mL, se disolvió (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrilóihidrazida (0,25 g, 1,0 eq.) se disolvió en THF (5 mL) y se enfrió a -60 °C, en el que se introdujo gota a gota ácido (S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanoico (0,19 g, 1,3 eq.). Se añadió gota a gota T3P (50% en EtOAc) (0,81 mL, 2 eq.) seguido de DIPEA (0,48 mL, 4 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para obtener el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado empezó a eluir a partir del 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para obtener (S,Z)-terc-butil (1-(2-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrililoil)hidrazinil)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato (0,07 g, rendimiento: 18%). En un matraz de fondo redondo de 10 mL, se disolvió (S,Z)-terc-butil (1-(2-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrililoil)hidrazinil)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato en diclorometano (2 mL). Se añadió TFA (0,05 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para obtener el producto bruto (0,01 g), que se trituroó con éter de petróleo y se secó a presión reducida para obtener (S,Z)-2-amino-N'-(3-(3-(3,5-

bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-3-metilbutanohidrazida 2,2,2-trifluoroacetato (0,006 g, rendimiento: 2%).

Ejemplo 8. Síntesis de (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)pirazina-2-carbohidrazida (Compuesto 8).

5 En un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 25 mL, se disolvió ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrilóico (Ejemplo 1, Etapa 4; 0,5 g, 1,0 eq.) se disolvió en diclorometano (5 mL) y se enfrió a -60 °C, donde se introdujo pirazina-2-carbohidrazida (0,216 g, 1,1 eq.). Se añadió gota a gota T3P (50% en EtOAc) (3,39 mL, 4 eq.) seguido de DIPEA (0,5 mL, 2 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para obtener el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado empezó a eluir a partir del 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para obtener (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)pirazina-2-carbohidrazida (0,13 g, rendimiento: 19,4%).

15 **Ejemplo 9. Síntesis de (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-1-metilpiperidin-4-carbohidrazida (Compuesto 9).**

1-metilpiperidin-4-carbohidrazida. En un tubo sellado de 25 mL, se disolvió 1-metilpiperidina-4-carboxilato de metilo (0,2 g, 1,0 eq.) en etanol (5 mL) a TA. El hidrato de hidracina (0,127 g, 2 eq.) se introdujo gota a gota a TA y la mezcla de reacción se calentó a 120 °C durante 20 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (40 °C, 20 mm Hg) para obtener la 1-metilpiperidina-4-carbohidrazida bruta (0,145 g) que se utilizó sin purificación adicional en la etapa siguiente.

(Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-1-metilpiperidin-4-carbohidrazida (Compuesto 9). En un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 50 mL, se disolvió ácido acrílico (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il) (0,25 g, 1,0 eq.) en EtOAc:THF (15 mL; 2:1) y se enfrió a -60 °C donde se introdujo 1-metilpiperidin-4-carbohidrazida (0,123 g, 1,1 eq.). Se añadió gota a gota T3P (50% en EtOAc) (0,85 mL, 2 eq.) seguido de DIPEA (0,31 mL, 2,5 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (35 °C, 20 mm Hg) para obtener el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado empezó a eluir a partir del 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para obtener (Z)-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-1-metilpiperidin-4-carbohidrazida (0,016 g, rendimiento: 4,5%).

Ejemplo 10. Síntesis de (R,Z)-2-amino-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-3-metilbutanohidrazida 2,2,2-trifluoroacetato (Compuesto 10).

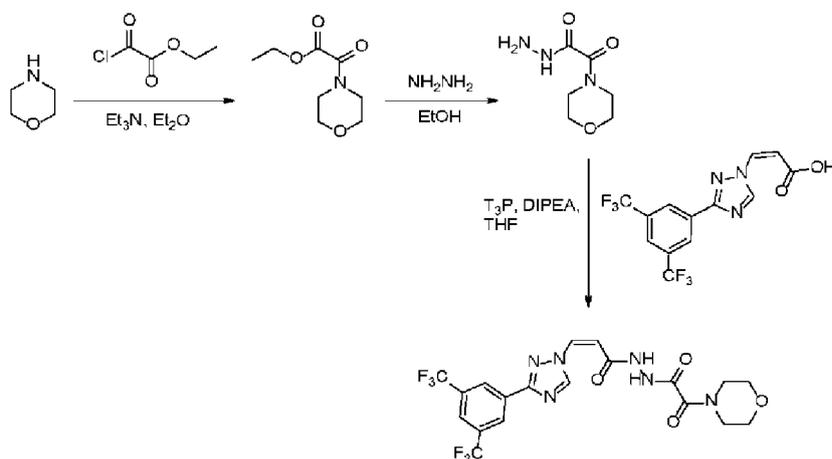
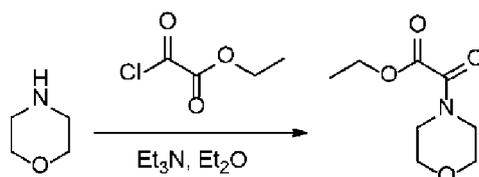
Ácido (R)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanoico. En un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 25 mL, se disolvió ácido (R)-2-amino-3-metilbutanoico (0,8 g, 1,0 eq.) en agua (4 mL). Se añadió bicarbonato sódico (0,394 g, 1,1 eq.), seguido de *di-tert*-butil dicarbonato (1,86 g, 2,0 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h a TA. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (3 × 10 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa saturada de cloruro sódico (25 mL), se secaron sobre Na₂SO₄anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida (25 °C, 20 mmHg) para obtener 0,75 g de producto bruto. 75 g de producto bruto que se purificó por medio de cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado empezó a eluir a partir del 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para obtener el ácido (R)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanoico (0,44 g, rendimiento: 47,3%).

(R,Z)-2-amino-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-3-metilbutanohidrazida 2,2,2-trifluoroacetato (Compuesto 10). En un matraz de fondo redondo de 10 mL, se disolvió (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrilohidrazida (0,05 g, 1,0 eq.) se disolvió en THF (5 mL) y se enfrió a -60 °C, en el que se introdujo gota a gota ácido (R)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-metilbutanoico (0,038 g, 1,3 eq.). Se añadió gota a gota T3P (50% en EtOAc) (0,16 mL, 2 eq.) seguido de DIPEA (0,095 mL, 4 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para obtener el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado empezó a eluir a partir del 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para obtener (R,Z)-*tert*-butil (1-(2-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)hidrazinil)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato (0,017 g, rendimiento: 26%). En un matraz de fondo redondo de 10 mL, se disolvió (R,Z)-*tert*-butil (1-(2-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)hidrazinil)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato en diclorometano (2 mL). Se añadió TFA (0,2 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para obtener el producto bruto (0,02 g), que se trituró con éter de petróleo y se secó a presión reducida para obtener (R,Z)-2-amino-N'-(3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acriloil)-3-metilbutanohidrazida 2,2,2-trifluoroacetato (0,007 g, rendimiento: 35%).

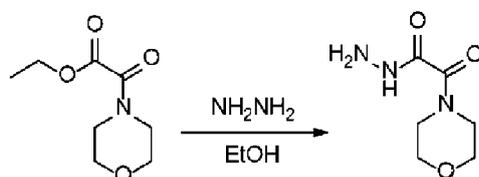
Ejemplo 11. Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(pirazin-2-il)acetil)acrilohidrazida (Compuesto 11).

2-(pirazin-2-il)acetohidrazida. En un tubo sellado de 25 mL, se disolvió 2-(pirazin-2-il)acetato de metilo (0,25 g, 1,0 eq.) en etanol (5 mL) a TA. El hidrato de hidracina (0,33 g, 4 eq.) se introdujo gota a gota a TA y la mezcla de reacción se calentó a 120 °C durante 20 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (40 °C, 20 mm Hg) para obtener la 2-(pirazin-2-il)acetohidrazida bruta (0,2 g) que se utilizó sin purificación en la etapa siguiente.

(Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(pirazin-2-il)acetil)acrilohidrazida (Compuesto 11). En un matraz de fondo redondo de 50 mL y 3 cuellos, se disolvió ácido (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)acrilico (0,3 g, 1,0 eq.) se disolvió en EtOAc:THF (15 mL; 2:1) y se enfrió a -60 °C en el que se introdujo 2-(pirazin-2-il)acetohidrazida (0,129 g, 1,1 eq.). Se añadió gota a gota T3P (50% en EtOAc) (1,01 mL, 2 eq.) seguido de DIPEA (0,35 mL, 2,5 eq.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a -60 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida (25 °C, 20 mm Hg) para obtener el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60/120) usando un gradiente de metanol/diclorometano (la columna se empaquetó en diclorometano y el compuesto deseado empezó a eluir a partir del 3 % de metanol/diclorometano). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron para obtener (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(pirazin-2-il)acetil)acrilohidrazida (0,025 g, rendimiento: 5%).

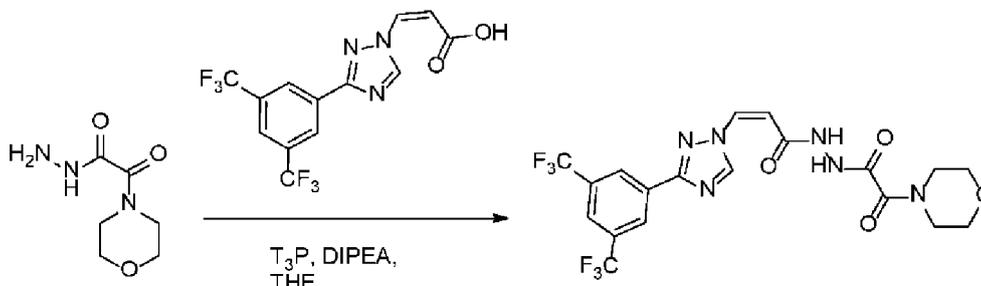
Ejemplo 12. Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-morfolino-2-oxoacetil)acrilohidrazida (Compuesto 12).**20 Síntesis de 2-morfolino-2-oxoacetato de etilo:**

Se añadió gota a gota una solución de 2-cloro-2-oxoacetato de etilo (1,25 g, 9,18 mmol) en éter dietílico (5 mL) a una solución de morfolina (1,0 g, 11,48 mmol) en éter dietílico (20 mL) y trietilamina (1,16 g, 11,48 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El aceite de color amarillo se transfirió a 25 mL de agua helada y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron a presión reducida para dar 1 g de producto bruto, que se siguió mediante el uso de sin purificación. Rendimiento bruto 47%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,33-4,38 (q, 2H), 3,72-3,76 (m, 4H), 3,65-3,68 (m, 2H), 3,47-3,50 (m, 2H), 1,37-1,40 (t, 3H). LCMS *m/z* 187,93 [M+H]⁺, *t_R* = 0,525 min.

30 Síntesis de 2-morfolino-2-oxoacetohidrazida:

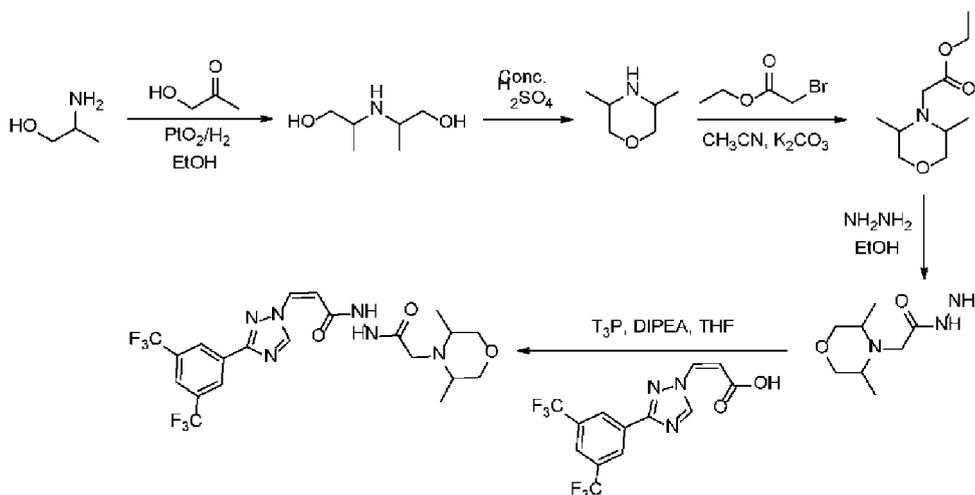
Se disolvió 2-morfolino-2-oxoacetato de etilo (1,0 g, 5,34 mmol) en etanol (7 mL) y se añadió hidrato de hidrazina (0,267 g, 5,34 mmol) gota a gota a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar 0,9 g de producto bruto, que se utilizó sin purificación adicional en el paso siguiente. Rendimiento bruto 90%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,79 (s, 1H), 4,43-4,48 (m, 2H), 3,56-3,61 (m, 4H), 3,40-3,48 (m, 4H). LCMS *m/z* 174,16 [M+H]⁺, *t_R* = 2,031 min.

Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-morfolino-2-oxoacetil)acrilohidrazida:

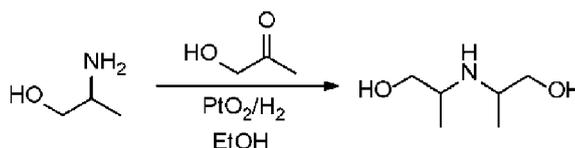


Una solución de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)ácido acrílico (0,2 g, 0,569 mmol) y 2-morfolino-2-oxoacetohidrazida (0,02 g, 0,175 mmol) en THF (3 mL) se enfrió a -60 °C. Se añadió gota a gota T₃P (0,098 g, 0,569 mmol) (0,50 mL) seguido de DIPEA (0,11 g, 0,854 mmol) y se agitó a -60 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se transfirió a 25 mL de agua helada y se extrajo con acetato de etilo (2 × 25 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron a presión reducida para dar 0,3 g de producto bruto, que se purificó por cromatografía (0-4% MeOH/CH₂Cl₂) para dar 0,15 g de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-morfolino-2-oxoacetil) acrilohidrazida (Rendimiento 50 %). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,70-10,88 (m, 2H), 9,56 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,52-7,55 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H), 6,0-6,03 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,51-3,64 (m, 8H). LCMS *m/z* 507,25 [M+H]⁺, *t_R* = 2,012 min.

Ejemplo 13. Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3,5-dimetilmorfolino)acetil)acrilohidrazida (Compuesto 13).

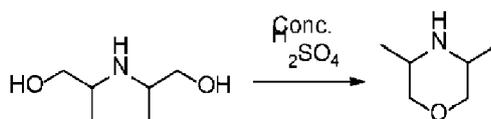


Síntesis de 2,2'-azanedildipropan-1-ol:



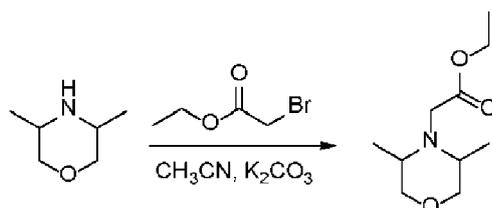
Se disolvieron 2-aminopropan-1-ol (5 g, 66,57 mmol) y 1-hidroxipropan-2-ona (5,77 g, 77,89 mmol) en etanol (115 mL) y se añadieron 50 mg de PtO₂. La mezcla de reacción se agitó a 50 psi de presión de H₂ a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para dar el producto bruto, que se utilizó sin purificación adicional en la etapa siguiente. Rendimiento bruto: 79 %. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,45 (bs, 2H), 3,42-3,43 (m, 1H), 3,16-3,22 (m, 4H), 2,65-2,69 (m, 2H) 0,87-0,91(m, 6H): LCMS *m/z* 133,99 [M+H]⁺, *t_R*: 4,077 min.

Síntesis de 3,5-dimetilmorfolina:



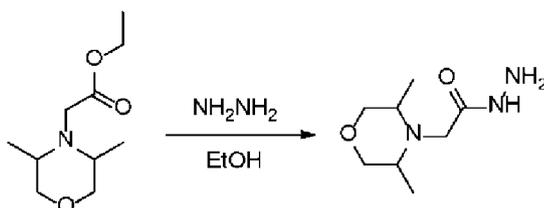
5 Se suspendió 2,2'-Azanediyldipropyl-1-ol (7 g, 52 mmol) en Conc. H₂SO₄ (5,3 mL, 99,8 mmol) a temperatura ambiente y se calentó a 180 °C durante 8 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió gota a gota solución de KOH (11,79 g, 21,02 mmol) en 60 mL de agua. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se extrajo con CHCl₃:MeOH (85:15; 5X50 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron a presión reducida para dar 3,5 g de producto bruto, que se utilizó sin más purificación en el paso siguiente (Rendimiento bruto: 58%).

Síntesis de 2-(3,5-dimetilmorfolino)acetato de etilo:



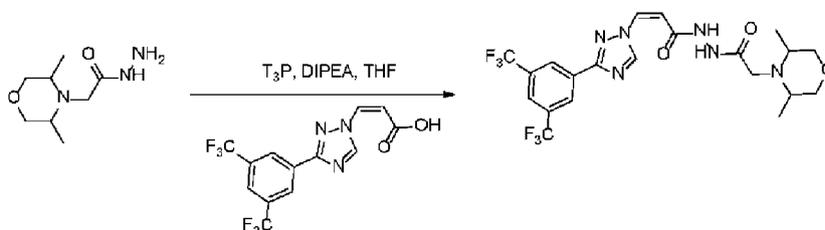
10 Se añadieron carbonato potásico (0,311 g, 2,25 mmol) y bromoacetato de etilo (0,319 g, 1,91 mmol) a la solución de 3,5-dimetilmorfolino (0,2 g, 1,73 mmol) en acetonitrilo (4 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 12 h. La mezcla de reacción se transfirió a agua helada y se extrajo con acetato de etilo (20 mL x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, y se concentraron a presión reducida para dar el producto bruto, que se utilizó en la etapa siguiente sin purificación adicional (Rendimiento bruto: 54%).

Síntesis de 2-(3,5-dimetilmorfolino)acetohidrazida de etilo:



20 Se disolvió etil-2-(3,5-dimetilmorfolino)acetato (0,19 g, 0,944 mmol) en etanol (4 mL) y se añadió hidrato de hidrazina (0,047 g, 0,944 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 20 h y se concentró a presión reducida para obtener el producto bruto, que se utilizó sin más purificación en la etapa siguiente. (Rendimiento bruto: 97%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,95 (s, 2H), 8,84 (s, 1H), 3,60-3,63 (m, 2H), 3,25-3,29 (m, 2H), 3,14 (s, 2H), 3,05 (s, 2H), 0,86-0,88 (m, 6H); LCMS *m/z* 188,12 [M+H]⁺, *t*_R 4,716 min.

Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3,5-dimetilmorfolino)acetil)acrilohidrazida:

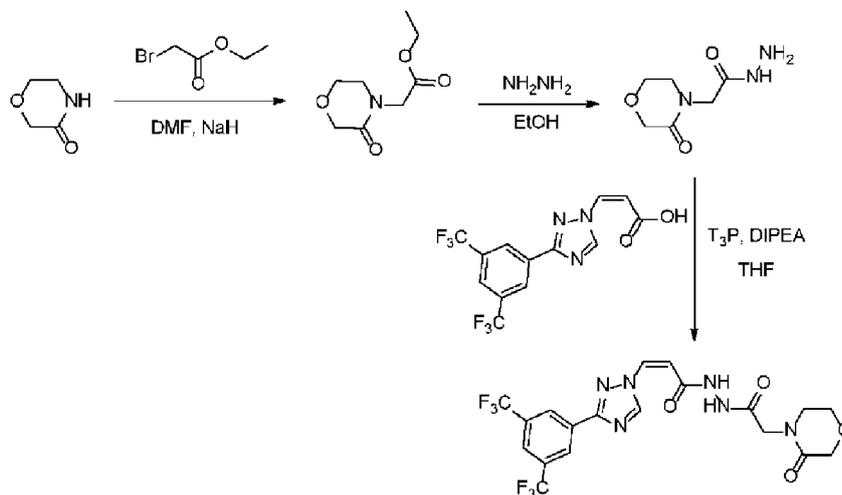


25 A la solución de ácido acrílico (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il) (0,2 g, 0,569 mmol) y 2-(3,5-dimetilmorfolino)acetohidrazida (0,106 g, 0,569 mmol) en THF (10 mL) se añadieron T3P (0,543 g, 0,854 mmol) seguido de DIPEA (0,110 g, 0,854 mmol) a -60 °C y se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se transfirió a 25 mL de agua helada y se extrajo con acetato de etilo (2 x 25 mL) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron a presión reducida para obtener el producto bruto, que se purificó por cromatografía (0-3% MeOH/CH₂Cl₂) para dar 0,02 g de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3,5-dimetilmorfolino)acetil)acrilohidrazida (Rendimiento: 7%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,58 (s, 1H), 9,83 (s, 1H), 9,56 (s, 1H), 8,54-8,56 (m, 2H), 8,25-8,30 (m, 1H), 7,49-7,51 (d, *J*=10,4 Hz, 1H),

30

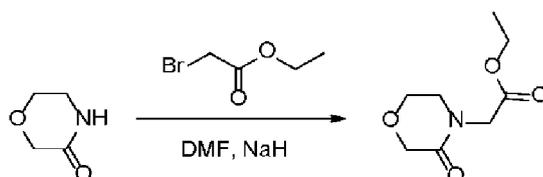
6,01-6,04 (d, J=10,4 Hz, 1H), 3,44-3,57 (m, 2H), 3,28-3,34 (m, 2H), 3,21 (s, 1H), 3,15 (s, 1H), 2,84-2,88 (m, 2H), 0,93-1,04(m, 6H): LCMS m/z 521,18 $[M+H]^+$, t_R 1,898 min.

Ejemplo 14. Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3-oxomorfolino)acetil)acrilohidrazida (Compuesto 14).



5

Síntesis of 2-(3-oxomorfolino) acetato de etilo:

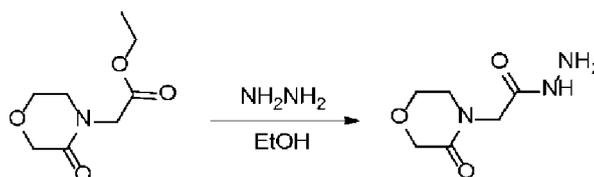


10

La morfolin-3-ona (3 g, 29,67 mmol) se disolvió en DMF (15 mL, 29,67 mmol) y se añadió NaH (1,78 g, 44,51 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min y se añadió gota a gota acetato de etilo y bromo (3,76 mL, 32,64 mmol). La mezcla de reacción se agitó más a temperatura ambiente durante 3 h y se transfirió a 50 mL de agua y se extrajo con EtOAc (3 × 50 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de salmuera (2 × 50 mL), se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron a presión reducida para dar el producto bruto, que se purificó por cromatografía (0-100% acetato de etilo/hexano) para dar 600 mg de etil-2-(3-oxomorfolino)acetato (Rendimiento: 10%). LCMS m/z 187 $[M+H]^+$, t_R 2,505 min.

15

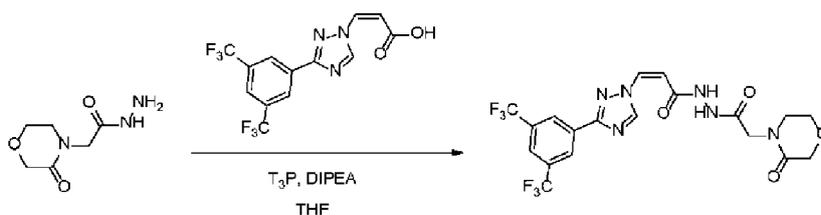
Síntesis de 2-(3-oxomorfolino)acetohidrazida:



20

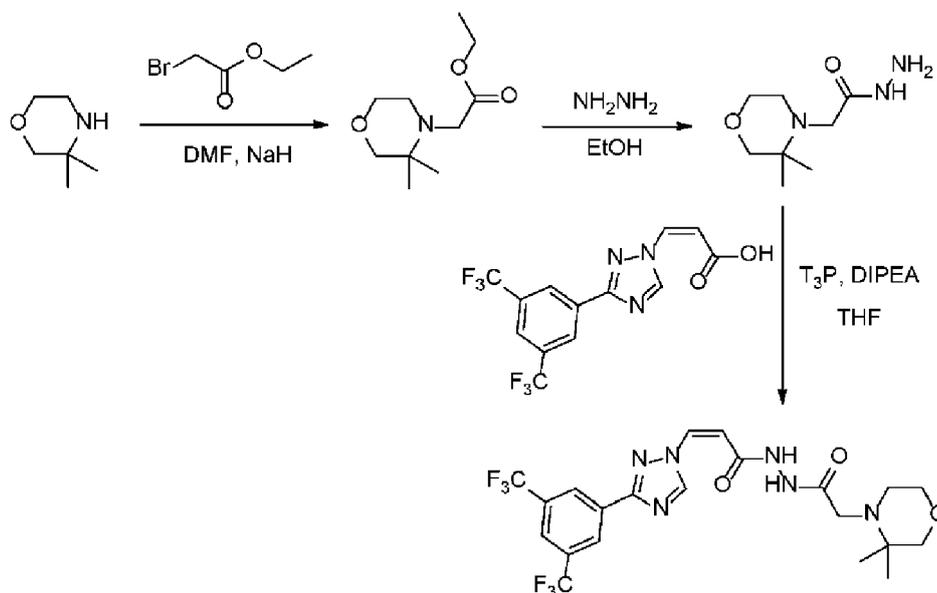
Se disolvió etil-2-(3-oxomorfolino)acetato (600 mg, 3,21 mmol) en etanol (3 mL) y se añadió hidrato de hidrazina (160,46 mg, 3,21 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 80 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se transfirió a 50 mL de agua y se extrajo con EtOAc (3 × 50 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron a presión reducida para obtener el producto bruto, que se utilizó sin más purificación en el paso siguiente (Rendimiento bruto: 54%). LCMS m/z 174,05 $[M+H]^+$ t_R 2,489 min.

Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3-oxomorfolino)acetil)acrilohidrazida:

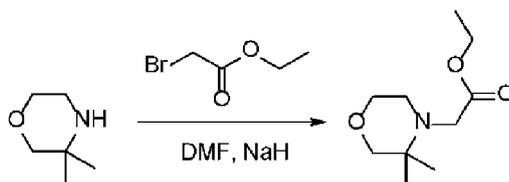


Ácido acrílico (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il) (0,400 g, 1,14 mmol) se disolvió en THF(4 mL) y se añadió 2-(3-oxomorfolino)acetohidrazida (0,295 g, 1,71 mmol). T₃P (1,09 g, 1,71 mmol) se añadió gota a gota seguido de DIPEA (220,80 mg, 1,71 mmol) a -60 °C y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se transfirió a 25 mL de agua helada y se extrajo con EtOAc (2x25 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron a presión reducida para dar el producto bruto que se purificó por cromatografía (0-4% MeOH/CH₂Cl₂) para dar 0,05 g de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3-oxomorfolino)acetil) acrilohidrazida (Rendimiento: 8%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,33 (bs, 2H), 9,63 (s, 1H), 8,57 (s, 2H), 8,30 (s, 1H), 7,50-7,52 (d, J= 8 Hz, 1H), 6,01-6,03 (d, J= 8 Hz, 1H), 4,08-4,12 (m, 4H), 3,85-3,87 (m, 2H), 3,41-3,44 (m, 2H). LCMS *m/z* 507,13 [M+H]⁺, *t*_R 1,950 min.

Ejemplo 15. Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3,3-dimetilmorfolino)acetil)acrilohidrazida (Compuesto 15).

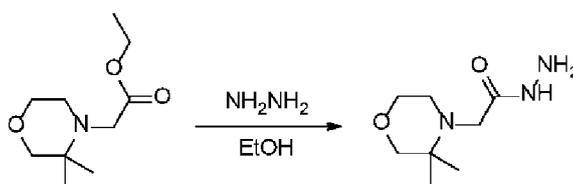


Síntesis de 2-(3,3-dimetilmorfolino)acetato de etilo:



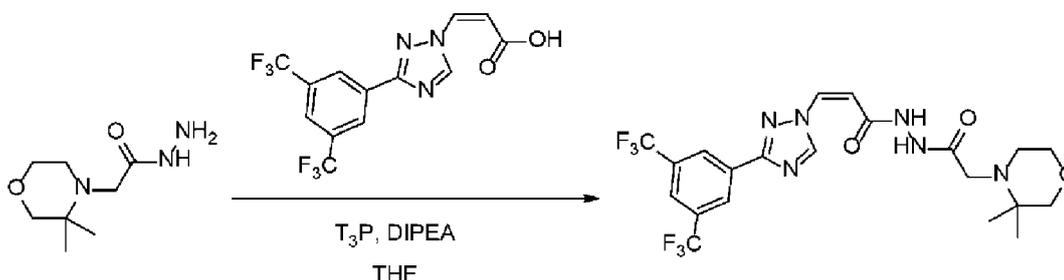
Se disolvió 3,3-dimetilmorfolina (1 g, 8,68 mmol) en acetonitrilo (5 mL) y se añadió carbonato potásico (1,8 g, 13 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min y se añadió acetato de etilbromo (1,1 mL, 9,55 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 1 h. Después, la mezcla de reacción se transfirió a 50 mL de agua y se extrajo con acetato de etilo (3x50 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron a presión reducida para obtener el producto bruto, que se utilizó sin más purificación en el paso siguiente (Rendimiento bruto: 91%). LCMS *m/z* 202,9 [M+H]⁺, *t*_R 2,33 min.

Síntesis de 2-(3,3-dimetilmorfolino)acetohidrazida:



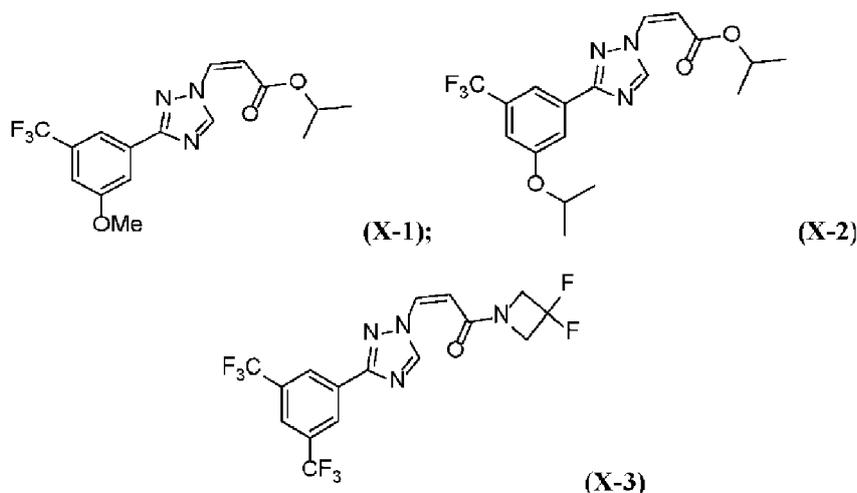
5 A la disolución de 2-(3-oxomorfolino)acetato de etilo (600 mg, 2,98 mmol) en etanol (3 mL) se añadió hidrato de hidrazina (0,20 mL, 2,98 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 80 °C durante 1 h, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se transfirió a 50 mL de agua y se extrajo con acetato de etilo (3x25 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron a presión reducida para obtener el producto bruto, que se utilizó sin más purificación en el siguiente paso (Rendimiento bruto: 28%). LCMS m/z 188 $[M+H]^+$; t_R : 188 min.

Síntesis de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3,3-dimetilmorfolino)acetil)acrilohidrazida:



10 A la solución de ácido acrílico (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il) (0,250 g, 0,7 mmol) y 2-(3,3-dimetilmorfolino)acetohidrazida (0,160 g, 0,85 mmol) en THF (2,5 mL). Se añadió gota a gota T₃P (0,63 mL, 1,06 mmol) seguido de DIPEA (0,18 mL, 1,06 mmol) a -60 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 1 minuto. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h, se transfirió a 25 mL de agua helada y se extrajo con acetato de etilo (2x25 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron a presión reducida para dar el producto bruto, que se purificó por cromatografía (0-4% MeOH:CH₂Cl₂) para dar 0,05 g de (Z)-3-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il)-N'-(2-(3,3-dimetilmorfolino)acetil)acrilohidrazida (Rendimiento: 13%). ¹H RMN (400 MHz, δ 10,55 (s, 1H), 9,81 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,56 (s, 2H), 8,29 (s, 1H), 7,49-7,51 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 6,01-6,03 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 3,65-3,67 (m, 2H), 3,30-3,34 (m, 2H), 3,08 (bs, 2H), 2,55-2,58 (m, 2H), 0,96 (s, 6H). LCMS m/z 521,18 $[M+H]^+$, t_R 1,937 min.

Ejemplo 16. Ensayos. Ciertos compuestos de la invención, junto con los compuestos X-1, X-2 y X-3 (mostrados a continuación) se probaron en diversos ensayos.



25 **Inhibición de la exportación nuclear**

Se determinó la inhibición de la exportación nuclear mediada por CRM1 por compuestos de la invención. Los resultados figuran en la tabla 2. La actividad inhibitoria de los compuestos para la proteína CRM1 se determinó en el ensayo RevGFP. Los compuestos de la invención son activos en el ensayo Rev-GFP con IC₅₀ < 10 μ M con los compuestos más preferentes que tienen actividades con valores de IC₅₀ de 1 μ M.

Protocolo experimental: Rev es una proteína del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y contiene una señal de exportación nuclear (SEN) en su dominio C-terminal y una señal de localización nuclear (SLN) en su dominio N-terminal. La exportación nuclear de la proteína Rev depende de la vía clásica SEN/ CRM1 (Neville et al, 1997, Kau et al, 2003). La acumulación nuclear de Rev se observa en células tratadas con inhibidores específicos de CRM1, tal como LMB (Kau et al, 2003). En este ensayo, las células U2OS-RevGFP se siembran en placas de fondo transparente, negras, de 384 pocillos el día anterior al experimento. Los compuestos se diluyen en serie 1:2 a partir de 40 μM en una placa separada de 384 pocillos en DMEM y, a continuación, se transfieren a las células. Las células se incuban con el compuesto durante ~ 1 h antes de la fijación con formaldehído al 3,7% y la tinción de los núcleos con Hoechst 33258. Se midió la cantidad de GFP en los núcleos celulares y se determinaron los IC_{50} s de los compuestos (Kau et al, 2003).

Ensayo de proliferación celular MTT

Se utilizó el ensayo de proliferación celular CellTiter 96[®] Aqueous One Solution (Promega) en células MM1.S, Jurkat y HCT-116 para estudiar las propiedades citotóxicas y citostáticas de los compuestos. El ensayo se basa en la escisión de la sal de tetrazolio, MTS, en presencia de un reactivo de acoplamiento de electrones PES (etosulfato de fenazina). Las células biorreducen el compuesto de tetrazolio MTS en un producto de formazán coloreado que es soluble en el medio de cultivo tisular. Esta conversión se realiza presumiblemente por medio de NADPH o NADH producidos por enzimas deshidrogenasas en células metabólicamente activas. Los ensayos se realizan añadiendo una pequeña cantidad del reactivo CellTiter 96[®] Aqueous One Solution directamente a los pocillos de cultivo, incubando durante 1-4 horas y registrando a continuación la absorbancia a 490 nm con un lector de placas de 96 pocillos. La absorbancia revelada se correlaciona directamente con el número de células y su actividad metabólica. Las células se sembraron de 5×10^3 a $1,5 \times 10^4$ células (dependiendo del tipo celular) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos en 100 μl de medio de cultivo fresco y se dejó que las células adherentes se fijaran durante una noche. Las soluciones madre de los compuestos se diluyeron en medio de cultivo celular para obtener ocho concentraciones de cada fármaco, que oscilaban entre 1 nM y 30 μM , y se utilizó DMSO a menos del 1% v/v como control negativo. Tras 72 h de tratamiento, se añadieron 20 μl de reactivo CellTiter 96[®] Aqueous en cada pocillo de las placas de ensayo de 96 pocillos y se incubó la placa a 37 °C durante 1-4 horas en una atmósfera humidificada con un 5% de CO_2 . A continuación, se registró la absorbancia de cada pocillo a 490 nm mediante el uso de un lector de placas de 96 pocillos. En la mayoría de los casos, el ensayo se realizó por triplicado y los resultados se presentaron como concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}) descrita a continuación. Se trazó y analizó la densidad óptica frente a la concentración del compuesto por medio de ecuaciones de regresión no lineal (Excel Fit) y se calculó el IC_{50} para cada compuesto. Los resultados figuran en la tabla 2.

Determinación de la farmacocinética (FC) y del cerebro: Relación plasmática Se recogió sangre de ratones (N=3) para contribuir al total de 10 puntos temporales (predosis, 5 min, 15 min, 30 min, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas y 24 horas posdosis). Los ratones fueron sangrados de forma rotatoria, contribuyendo cada ratón con 3 puntos temporales a la extracción de sangre. En los puntos temporales designados, se anestesió a los animales con isoflurano y se recogieron aproximadamente 110 μl de sangre por punto temporal por medio de punción retroorbital en tubos de K_2EDTA (anticoagulante) previamente enfriados. Las muestras de sangre se colocaron en hielo húmedo y se centrifugaron (2000 g, 5 min a 4 °C) para obtener plasma en los 30 minutos siguientes a la recogida de la muestra. Todas las muestras se almacenaron congeladas a aproximadamente -80 °C hasta su análisis. Antes del análisis, las muestras se mezclaron con el patrón interno (dexametasona) en acetonitrilo, se agitaron en vórtex, se centrifugaron y se inyectó el sobrenadante para el análisis. La concentración de compuestos en plasma se determinó por medio de instrumentación LC-MS-MS (API 4000, Triple Quadruple con ionización por electrospray; columna de cromatografía líquida Acuity Ultra Performance C18, con MeOH y ácido fórmico como disolventes orgánicos). Los parámetros FC, incluidos, entre otros, $T_{\text{máx}}$, $C_{\text{máx}}$, $t_{1/2}$, ABC_{last} , ABC_{inf} , se calcularon mediante el uso del paquete informático WinNonlin Professional 6.2, modelo farmacocinético no compartimental NCA200.

Relación Cerebro a Plasma (B:P) Un grupo separado de ratones (N=3) fueron dosificados (PO a 10 mg/kg a menos que se indique lo contrario) y sacrificados en el momento de máxima concentración plasmática ($T_{\text{máx}}$ estimada a las 2 horas postdosis) en el que se recogieron plasma terminal y cerebro. El tejido cerebral recogido se enjuagó con solución salina fría, se secó en papel de filtro, se pesó y se congeló en hielo seco. Todas las muestras se almacenaron congeladas a aproximadamente -80 °C hasta su análisis. En el momento del análisis, el tejido cerebral se homogeneizó (solución homogeneizante PBS, pH 7,4), se mezcló con el patrón interno (dexametasona) en acetonitrilo, se agitó en vórtex, se centrifugó y se inyectó el sobrenadante para analizar la concentración de compuestos por medio de la metodología LC-MS-MS (API 4000, Triple Quadruple con ionización por electrospray; columna de cromatografía líquida Acuity Ultra Performance C18, con MeOH y ácido fórmico como disolventes orgánicos). Las muestras de plasma se trataron con el mismo procedimiento (excepto la etapa de homogeneización) y la concentración del compuesto en cualquiera de las matrices se calculó basándose en las curvas estándar generadas. Los resultados figuran en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados del ensayo de los compuestos de fórmula I y sus comparadores.

Compuesto	Rev Exportación [IC_{50}]	Citotoxicidad [IC_{50}]	ABC_{inf} (hr-ng/mL)*.	B:P*
-----------	--------------------------------------	------------------------------------	--	------

ES 3 016 982 T3

X-1**	< 1µM	< 1µM	209‡	NT
X-2***	< 1µM	< 1µM	68,3†	1,27†
X-3	< 1µM	< 1µM	12300	5,0
1	NT	< 1µM	33100	2,25
2	< 1µM	< 1µM	28900	0,16
3	< 1µM	< 1µM	15200	0,03
4	NT	< 1µM	20929	0,028
5	NT	< 1µM	NT	NT
6	NT	< 1µM	NT	NT
7	NT	< 1µM	NT	NT
8	NT	< 1µM	9150	0,41
19	NT	< 1µM	671****	N/A
10	NT	< 1µM	NT	NT
11	NT	< 1µM	8340	0,095
12	< 1µM	< 1µM	19600	0,06
13	NT	< 1µM	1103	1,5
14	NT	< 1µM	1419	0
15	NT	< 1µM	588	0

Dosificado en ratones a 10 mg/kg po.

** Compuesto 26 del documento US 2009/0275607.

** Compuesto 44 del documento US 2009/0275607.

**** Dosificado en ratones a 5 mg/kg po.

‡ Los valores de ABC_{inf} para el compuesto X-1 dosificado en ratones a 10 mg/kg po estaban por debajo del límite de cuantificación. Datos comunicados para 5 mg/kg iv.† Dosificado en ratas a 10 mg/kg po.

NT = no analizado

N/A= por debajo del límite cuantificable

5 El ABC_{inf} para el compuesto X-1 estuvo por debajo del límite de detección cuando se dosificó en ratones a 10 mg/kg po. Cuando se dosificó a 5 mg/kg iv, el compuesto X-1 mostró una exposición mínima, como indica el bajo ABC_{inf} de 209 hr-ng/mL. No se determinó la relación cerebro/plasma para el compuesto X-1 debido a sus niveles insignificantes (por debajo del límite de cuantificación) en el cerebro cuando se dosifica po.

10 El ABC_{inf} para el compuesto X-2 se calculó en 68,3 hr-ng/mL cuando se dosificó en ratas a 10 mg/kg po. Tales niveles de exposición son excesivamente bajos en comparación con el compuesto X-3 y los compuestos de Fórmula I de la presente invención. Sin embargo, el compuesto X-2 presenta una relación cerebro/plasma moderada. El bajo ABC_{inf} unido a una relación cerebro/plasma no despreciable sugiere que el compuesto X-2 puede atravesar la BBB a pesar de los bajos niveles de exposición. Los solicitantes creen que el compuesto X-2 tendría una relación cerebro/plasma significativamente mayor si se aumentara su ABC_{inf}.

El ABC_{inf} para el compuesto X-3 se calculó en 12300 hr-ng/mL cuando se dosificó en ratas a 10 mg/kg po, lo que indicó una buena exposición. Sin embargo, X-3 mostró una elevada relación B:P de 5,0.

15 Los compuestos de Fórmula I, muestran todos una ABC_{inf} elevada (>3500 hr-ng/mL) y una B:P relativamente baja (<2,5). En general, los mayores niveles de exposición a un agente terapéutico suelen aumentar la probabilidad de

penetración cerebral. Por lo tanto, es sorprendente e inesperado que los compuestos de fórmula I presenten altos niveles de ABC_{inf} mientras que las proporciones cerebro-plasma son relativamente bajas.

Ejemplo 17. Modelos

Evaluación de los efectos del Compuesto 2 sobre el crecimiento tumoral en la línea celular de linfoma Z-138 cultivada como xenoinjerto en ratones SCID.

Las células de linfoma de células del manto Z-138 (ATCC # CRL-3001) se obtuvieron de ATCC. Estas células se cultivaron en medio IMEM suplementado con 10% de suero de caballo, 1% de penicilina y estreptomina, y 2mM de L-glutamina. Las células se subcultivaron por dilución en una proporción de 1:5 a 1:10. Se utilizaron veinticuatro (24) ratones CB-17 SCID hembra (Charles River Labs cepa código 236), de 5 a 6 semanas de edad. Los ratones SCID fueron inoculados en el flanco izquierdo con células Z-138 en un volumen de 0,2 mL, equivalente a 4×10^7 células por ratón.

El tratamiento se inició cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 84,3 mm³. Los ratones se distribuyeron en cuatro (4) grupos de ocho (8) antes del inicio del tratamiento en función del volumen tumoral, de forma que el volumen tumoral medio de cada grupo se situara entre 77 y 92 mm³. Los ratones fueron tratados con vehículo, fármaco de tratamiento estándar/fármaco de control positivo (ciclofosfamida) o el Compuesto 2, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Grupos de estudio iniciales

Grupo	Número de animales	Artículo de prueba	Dosis	Vía de administración	Horario
1	8	Vehículo	10 ml/kg	PO	MWF
2	8	Ciclofosfamida	80 mg/kg	IP	Días 1, 3, 5
3	8	Compuesto 2	15 mg/kg	PO	MWF
4	8	Compuesto 2	7,5 mg/kg	PO	MWF

Los animales fueron alimentados con pienso para roedores Labdiet® 5001 y agua estéril ad libitum. Los tumores se midieron una vez cada dos días con microcalibradores, y el volumen tumoral se calculó como (longitud × anchura × anchura)/2. Todos los animales fueron pesados cada día para evaluar las posibles diferencias de peso entre los grupos de tratamiento como indicio de una posible toxicidad derivada de los tratamientos. Los animales con una pérdida de peso superior al 20% de su peso inicial fueron eutanasiados. Los ratones con una pérdida de peso superior al 15% de su peso inicial no se volvieron a tratar hasta que la pérdida de peso se recuperó por debajo del 5% de su peso inicial. Los animales con un volumen tumoral superior a 1500 mm³ fueron eutanasiados.

Las soluciones de dosificación se prepararon frescas cada día de dosificación. El compuesto 2 se suministró en forma de polvo liofilizado que contenía un 69,61% de compuesto 2 y el resto estaba compuesto por Pluronic F-68 y PVP K29/32. Se preparó disolviendo el polvo liofilizado en agua estéril. La ciclofosfamida se disolvió a 8 mg/mL en agua estéril para inyección. Todos los artículos de prueba se administraron en un volumen de 10 mL/kg de peso corporal.

Las diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento se determinaron por medio de las pruebas de Mann-Whitney Rank Sum o ANOVA con un valor crítico de 0,05.

La FIG. 1 muestra que todos los grupos de tratamiento mostraron reducciones estadísticamente significativas en el crecimiento tumoral en relación con el vehículo cuando se evaluó comparando el área bajo las curvas de crecimiento mediante el uso de una prueba ANOVA tanto para el volumen tumoral como para el porcentaje de volumen tumoral. Estos grupos de tratamiento mostraron reducciones significativas del crecimiento tumoral con $p < 0,0001$. Se observó cierta pérdida de peso en el grupo tratado con el Compuesto 2 a 15 mg/kg y, aunque estadísticamente significativa, en comparación con los controles con vehículo, la pérdida grave de peso se limitó a unos pocos animales.

El compuesto 2, administrado por vía oral, tuvo efecto antitumoral tanto a dosis de 7,5 mg/kg como de 15 mg/kg de manera dependiente de la dosis.

Actividad antitumoral del compuesto 2 en el modelo de carcinoma pulmonar de células pequeñas A549

La línea celular A549 se derivó del cultivo de explantes de tejido de carcinoma alveolar de un varón caucásico de 58 años de edad. Las células se cultivaron en medio de cultivo tisular F12-K de Ham con 10% de suero fetal de ternera y 1% de penicilina/estreptomina. Las células se tripsinizaron rutinariamente y se pasaron 1:10. Se utilizaron treinta y dos (32) ratones CB-17 SCID hembra (Charles River Labs cepa código 236), de entre 5 y 6 semanas de edad, con un peso corporal medio antes del tratamiento de 16,3 gramos. Los ratones se dividieron en cuatro (4) grupos de ocho (8) antes del inicio del tratamiento en función del volumen tumoral. El día de la implantación, las células se lavaron en

PBS, se tripsinizaron y se resuspendieron en medio completo hasta una densidad de 2×10^7 células/mL antes de mezclarlas con un volumen igual de Matrigel. A continuación, esta mezcla se inoculó por vía subcutánea en ratones en un volumen de 0,1 mL mediante el uso de una aguja 23G.

- 5 Los ratones se trataron con vehículo, fármaco de tratamiento estándar/fármaco de control positivo (cisplatino) o Compuesto 2, como se muestra en la Tabla 4. El peso y el estado de los animales se registraron diariamente, y los tumores se midieron los lunes, miércoles y viernes con microcalipers, y el volumen tumoral se calculó como $(\text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{anchura})/2$.

Tabla 4. Grupos de estudio iniciales

Grupo	Número de animales	Artículo de prueba	Dosis	Vía de administración	Horario
1	8	Vehículo	10 ml/kg	PO	MWF
2	8	Cisplatino	5 mg/kg	IP	Días 1, 15
3	8	Compuesto 2	10 mg/kg	PO	MWF
4	8	Compuesto 2	5 mg/kg	PO	MWF

- 10 Los animales con una pérdida de peso superior al 20% de su peso inicial fueron eutanasiados. Los ratones con una pérdida de peso superior al 15% de su peso inicial no se volvieron a tratar hasta que la pérdida de peso se recuperó por debajo del 5% de su peso inicial. Los animales con un volumen tumoral superior a 1500 mm³ fueron eutanasiados.

15 Las soluciones de dosificación se prepararon frescas cada día de dosificación. El compuesto 2 se suministró en forma de polvo liofilizado que contenía un 69,61% de compuesto 2 y el resto estaba compuesto por Pluronic F-68 y PVP K29/32. Se preparó disolviendo el polvo liofilizado en agua estéril. El cisplatino se disolvió a 5 mg/mL en DMSO y se diluyó 1:10 en agua estéril para inyección. Todos los artículos de prueba se administraron en un volumen de 0,1 mL/10g de peso corporal.

Las diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento se determinaron por medio de las pruebas de Mann-Whitney Rank Sum o ANOVA con un valor crítico de 0,05.

- 20 Los datos de cambio de volumen tumoral durante el estudio se muestran en la FIG. 2. El volumen tumoral medio del grupo de control con vehículo aumentó de 95 mm³ en el Día 1 a 1669 mm³ en el Día 29. El grupo tratado con cisplatino tenía un volumen tumoral medio de 104 mm³ el día 1, que aumentó a 1136 mm³ el día 29. Los ratones tratados con el Compuesto 2 a 10 mg/kg PO (Grupo 3) tenían un volumen tumoral medio de 101 mm³ en el Día 1, que aumentó a 686 mm³ en el Día 29. Los ratones tratados con el Compuesto 2 a 5 mg/kg PO (Grupo 6) tenían un volumen tumoral medio de 101 mm³ el Día 1, que aumentó a 1231 mm³ el Día 29.

25 Se realizaron análisis adicionales de los datos de volumen tumoral calculando el área media bajo la curva (ABC) para cada tumor y comparando los grupos por medio de una prueba ANOVA unidireccional. Este análisis indicó que había diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de control con vehículo y el grupo tratado con el Compuesto 2 a 10 mg/kg ($p=0,0005$). Cabe señalar que no hubo una reducción estadísticamente significativa del crecimiento tumoral en el grupo de control positivo (cisplatino).

30 El compuesto 2, administrado por vía oral, tuvo un efecto antitumoral tanto a dosis de 5 mg/kg como de 10 mg/kg de manera dependiente de la dosis. Sin embargo, sólo el grupo de 10 mg/kg mostró una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo tratado con vehículo.

35 **Evaluación del compuesto 2 en el modelo de ratón de artritis reumatoride inducida por anticuerpos anticólageno (CAIA)**

Se utilizaron veinticuatro (24) ratones Balb/c macho, de 6 a 8 semanas de edad. La variación del peso de los animales en el momento de iniciar el tratamiento no superó $\pm 20\%$ del peso medio. Los animales fueron asignados aleatoriamente a 3 grupos que recibirían vehículo, dexametasona o el Compuesto 2. El día 0 del estudio (inicio del estudio), todos los ratones fueron sometidos a una inyección intravenosa de 2 mg de cóctel de anticuerpos ArthritoMAbTM (MD Biosciences #S1203001) seguida de una inyección intraperitoneal de LPS (100µg/ratón) el día 3 del estudio. Los animales del estudio fueron tratados con 7,5 mg/kg de Compuesto 2 o 4 mg/kg de Compuesto 2 por vía oral; 1 mg/kg de dexametasona por vía intraperitoneal; o vehículo por vía oral. Los tratamientos se administraron una vez al día los días 4, 6, 8 y 10 para todos los grupos, excepto cuando se aplicaron vacaciones de dosificación. Si el peso de un animal caía por debajo del 87% de su peso inicial del día 0, no se dosificaba al animal hasta que ganaba un peso equivalente al 90% o más del peso del día 0.

El desarrollo de artritis, los signos clínicos y los pesos corporales se monitorizaron en todos los ratones en los días de estudio 0, 3-8, 10 y 12. Las observaciones incluyeron cambios en la piel, pelaje, ojos, membranas mucosas, aparición

de secreciones y excreciones (por ejemplo, diarrea) y actividad autonómica (por ejemplo, lagrimeo, salivación, piloerección, tamaño de las pupilas, patrón respiratorio inusual). Se examinaron todas las patas (delantera izquierda y derecha, y trasera izquierda y derecha) de cada animal en busca de signos de respuestas artríticas antes de la inducción de la artritis y de la administración del elemento de prueba o de control el Día 0 del estudio y, posteriormente, los Días 3-8, 10 y 12 (finalización del estudio). Las reacciones a la artritis se puntuaron y registraron de acuerdo con una escala de 0-4 en orden ascendente de gravedad, como se muestra en la Tabla 5. También se midió el espesor de la pata con un calibrador de cuadrante (Kroepelin, Munich, Alemania).

Tabla 5. Puntuación clínica de la artritis

Puntuación de artritis	Grado
Sin reacción, normal	0
Enrojecimiento e hinchazón leves pero definidos del tobillo/muñeca o enrojecimiento e hinchazón aparentes limitados a dígitos individuales, independientemente del número de dígitos afectados.	1
Enrojecimiento e hinchazón de moderados a graves del tobillo/muñeca	2
Enrojecimiento e hinchazón de toda la pata, incluidos los dedos	3
Miembro inflamado al máximo con afectación de múltiples articulaciones	4

La dosis administrada se calculó partiendo del supuesto de que los animales pesaban, por término medio, 20 g. Se preparó una solución madre de dexametasona en etanol al 100% y se diluyó hasta la concentración adecuada en PBS antes de su uso. El vehículo para el grupo de control se preparó disolviendo 0,6 g de Pluronic y 0,6 g de PVP en 100 ml de agua destilada desionizada. La solución madre de MAb (10 mg/mL) fue suministrada por MD Biosciences, División de Morwell Diagnostics GmbH. El LPS se diluyó con PBS para alcanzar la concentración adecuada. Antes de inyectarla, era necesario agitarla a fondo. El compuesto 2 se suministró en forma de polvo liofilizado que contenía un 70,71% de compuesto 2 y el resto estaba compuesto por Pluronic F-68 y PVP K29/32. Se administró un volumen fijo de 200µL a cada ratón.

La evaluación se basó principalmente en los valores medios de la puntuación de artritis y las mediciones del espesor de las patas. En su caso, se aplicó el análisis de los datos por medio de ANOVA con análisis post hoc de Tukey para determinar la significación de los efectos de los tratamientos.

Las FIGS. 3A y 3B muestran los resultados de los experimentos con el modelo de ratón CAIA. Los signos clínicos asociados a la administración de LPS se desarrollaron en todos los grupos tras el refuerzo de LPS el día 3. En comparación con los ratones tratados con vehículo, los ratones tratados con 7,5 mg/kg o 4 mg/kg de Compuesto 2 presentaron puntuaciones totales de artritis significativamente reducidas en los días 5-12 y 6-12, respectivamente. El tratamiento con dexametasona redujo significativamente la puntuación total de artritis en comparación con el grupo del vehículo en los días 6-12. En comparación con los ratones tratados con vehículo, los ratones tratados con 7,5 mg/kg o 4 mg/kg de Compuesto 2 presentaron puntuaciones de artritis de la pata trasera significativamente reducidas en los días 5-12. El tratamiento con dexametasona redujo significativamente la puntuación de artritis de la pata trasera en comparación con el grupo del vehículo en los días 5 y 12. No hubo diferencias significativas en el peso corporal entre el grupo tratado con vehículo y los grupos tratados con el elemento de prueba.

A la vista de los resultados del presente estudio, el Compuesto 2 a 7,5 mg/kg o 4 mg/kg administrado por vía oral mostró una actividad antiartrítica significativa en el modelo de artritis reumatoide inducido por anticuerpos anticólageno, con reducciones sostenidas de las puntuaciones medias de artritis y reducciones del espesor de la pata.

Estudio de eficacia del compuesto 2 en la artritis inducida por colágeno (AIC) en ratas Lewis

Cuarenta (40) ratas hembra Lewis (BK), de 6 a 8 semanas de edad con un intervalo de peso corporal previo al tratamiento de 180 a 200g se dividieron aleatoriamente en cuatro (4) grupos (Grupos A-D) a menudo (10) ratas cada uno. Las ratas de los grupos B a D fueron inmunizadas intradérmicamente con CII bovina en IFA en tres sitios cerca de la base de la cola y sobre el lomo con 500 µl de la emulsión el día 0 (200 µl, 200 µl, 100 µl para cada sitio). El día 7, las ratas de los grupos B-D recibieron inyecciones de refuerzo con la misma cantidad de emulsión por vía intradérmica cerca de los puntos de inyección anteriores. En el modelo de tratamiento terapéutico (Grupos C y D), se administró dexametasona o el Compuesto 2 por vía oral a ratas con AIC tras la aparición de la artritis, como se muestra en la Tabla 6. Las ratas se pesaron diariamente y se dio un periodo de descanso del fármaco a un animal cuando la pérdida de peso fue superior al 13%.

Tabla 6. Grupos de estudio iniciales

Grupo	Vacunación	Tratamiento	Administración	n
-------	------------	-------------	----------------	---

A	Ingenuo	PBS	vehículo	PO. QD, desde el inicio hasta el día 28	10
B	Modelo	Col II en IFA	vehículo	PO. QD, desde el inicio hasta el día 28	10
C	DEX (1MPK)	Col II en IFA	DEX (1MPK)	PO. QD, desde el inicio hasta el día 28	10
D	Compuesto 2 (4MPK)	Col II en IFA	Compuesto 2 (4MPK)	PO. QoD, desde el inicio hasta el día 28	10

El desarrollo de AIC se evaluó por medio de puntuación macroscópica y mediciones de la hinchazón de la pata. Esto se evaluó cada día durante los 5 primeros días después de la sensibilización (día 7) y después dos veces por semana (lunes y jueves) durante el tiempo restante con el sistema de puntuación clínica para cada pata que se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Puntuaciones clínicas de artritis

Puntuación de artritis	Grado
No hay evidencia de eritema e hinchazón	0
Eritema e hinchazón limitados a la parte media del pie (tarsos) o a la articulación del tobillo.	1
Eritema e hinchazón leve que se extiende desde el tobillo hasta la parte media del pie.	2
Eritema e hinchazón moderada que se extiende desde el tobillo hasta el metatarso.	3
El eritema y la hinchazón grave abarcan el tobillo, el pie y los dedos	4

El volumen del pie se midió por medio de pletismometría el mismo día de la medición artroscópica durante todo el período de estudio. Se midió el cubicaje de cada pata trasera y la tasa de hinchazón, mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de hinchazón} = \frac{(C_N - C_0)}{C_0} \times 100\%$$

La FIG. 4A es un gráfico de la inflamación articular frente al tiempo, y muestra la inflamación articular medida en una escala de 0-4 en ratas ingenuas y ratas tratadas de acuerdo con el modelo, con control positivo, o con el Compuesto 2.

Se emulsionó CII bovina (en ácido acético 10mM) a 4 mg/mL con un volumen igual de IFA.

Las puntuaciones clínicas se sumaron para cada animal, y la media total de todos los animales de cada grupo se expresó como la puntuación artrítica media. La FIG. 4B es un gráfico de puntuaciones clínicas en función del tiempo, y muestra las puntuaciones clínicas de artritis de ratas ingenuas y ratas tratadas de acuerdo con el modelo, con control positivo, o con el Compuesto 2.

En el día 28 del estudio, se practicó la eutanasia a tres representantes de cada grupo de tratamiento y se recogieron las patas traseras, que se almacenaron en formalina tamponada neutra al 4%. Las secciones preparadas de las patas traseras se sometieron a tinción con hematoxilina y eosina (H&E).

El análisis histopatológico de los animales de control mostró erosión del cartílago y formación de pannus en consonancia con el curso de la enfermedad. Sin embargo, en las ratas tratadas con el Compuesto 2, se encontró un cartílago relativamente intacto en la superficie articular y la formación de pannus fue mínima. Los resultados del análisis histológico se muestran en la FIG. 5.

La puntuación clínica, la inflamación articular y los datos del examen histológico mostraron correlaciones. Los resultados también mostraron la eficacia terapéutica del Compuesto 2 a 4mg/kg (MPK), como demuestran sus efectos sobre las puntuaciones clínicas, la inflamación articular y el examen histológico. Los resultados del modelo AIC en ratas Lewis se representan en las FIGS. 4A y 4B, y FIG. 5.

Actividad antipsoriásica del compuesto 2 en la psoriasis inducida por forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) en ratones BALB/C hembra.

- 5 Se utilizaron veinticuatro (24) ratones BALB/c hembra, de 6 a 8 semanas de edad con un peso corporal entre 22 y 30g. Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en cuatro (4) grupos de ocho (8) ratones cada uno. La agrupación de los animales fue la siguiente: Grupo I (Ingenuo; etanol), Grupo II (PMA; etanol), Grupo III (PMA; Compuesto 2 10µM) y Grupo IV (PMA; betametasona). Se aplicaron tópicamente veinte (20)µL de PMA (4µg/20µL de acetona) en la superficie superior del pabellón auricular de todos los animales del Grupo II al Grupo IV. Se aplicó PMA diariamente en la oreja izquierda y en días alternos (L-V-V) en la oreja derecha del Día 1 al Día 9. Treinta (30) minutos después de la aplicación de PMA, se aplicó tópicamente el vehículo o el compuesto estándar (betametasona) o el Compuesto 2 en las orejas de los animales de los diferentes grupos. Cabe destacar que el vehículo, el compuesto estándar y el compuesto 2 se aplicaron diariamente en ambas orejas de diferentes animales desde el Día 1 hasta el Día 12.
- 10 Los animales se observaron diariamente durante un periodo de 12 días para detectar cualquier síntoma relacionado con el tratamiento. El espesor basal de la oreja se registró en todos los animales (antes de la aplicación de PMA) mediante el uso de un medidor de tornillo digital en el momento T0 (Día 1). Durante toda la duración del estudio, 4 horas después de la aplicación del vehículo, el compuesto estándar o el compuesto 2, se midió diariamente el espesor de las orejas con un calibrador de tornillo digital y se registraron las puntuaciones de eritema, descamación y plegamiento. La gravedad de los daños en el pabellón auricular se evaluó por medio de los sistemas de puntuación que figuran en el cuadro 8.

Tabla 8. Resultados de la psoriasis

Parámetro/Puntuación	0	1	2	3
Eritema	Normal	Leve	Moderado	Grave
Escala				
Plegable				

- 20 A los animales se les suministró pienso granulado autoclave nutricionalmente equilibrado (Nutrivet Life Sciences, Pune (India)) ad libitum y tuvieron acceso a agua potable normal durante todos los periodos experimentales.
- Para preparar las formulaciones se utilizaron DMSO al 100% (Grado LR) y etanol (Grado LR) disponibles comercialmente. La PMA se preparó disolviendo 10 mg de PMA en 50,0mL de acetona. El compuesto 2 se preparó disolviendo 1,47 mg de compuesto 2 en 300µL de DMSO al 100%.
- 25 Los resultados experimentales se expresan en las FIGS. 6A-6D como media ± SEM. No hubo diferencias significativas entre todos los grupos de tratamiento en cuanto al peso corporal y el consumo de alimentos y agua. La aplicación de PMA mostró que (i) el espesor de la oreja izquierda y derecha aumentó (Grupo II frente a Ingenuo) y (ii) el índice de actividad de la enfermedad (IAE) de la oreja izquierda y derecha aumentó (Grupo II frente a Ingenuo). Es importante destacar que la aplicación tópica del Compuesto 2 condujo a una reducción prominente de los aumentos inducidos por la PMA en (i) el espesor de la oreja izquierda y derecha, y (ii) el IAE de la oreja izquierda y derecha. Este efecto fue prominente en los días 6-8 del estudio, cuando más animales tratados con el Compuesto 2 presentaron una reducción del espesor de la oreja izquierda/derecha (en comparación con los animales del Grupo II), y del IAE (en comparación con los animales del Grupo II). Cabe destacar que la reducción mediada por el Compuesto 2 en los aumentos inducidos por la PMA en el espesor de la oreja izquierda/derecha y el DAI disminuyó a medida que avanzaba el estudio (Día 10 y posteriores).
- 35 En un modelo de psoriasis inducida por PMA en ratones, el Compuesto 2 mostró actividad antipsoriásica estadísticamente significativa.

Actividad antipsoriásica del compuesto 2 en la inflamación dérmica inducida por Imiquimod (IMQ)/modelo de psoriasis (ESTUDIO 1).

- 40 Se utilizaron cuarenta (40) ratones BALB/c machos de 6 a 8 semanas de edad con un peso corporal previo al tratamiento de 22 a 30 g. Los ratones BALB/c se distribuyeron aleatoriamente en cuatro (4) grupos de 10 ratones por grupo. Se rasuró cuidadosamente una pequeña zona (unos 2x2 cm²) de piel en el dorso de todos los animales. Los animales del Grupo I sirvieron como animales Ingenuo. Se indujo psoriasis en los Grupos II a IV [Grupo II (IMQ; vehículo), Grupo III (IMQ; Compuesto 2 (1µM)) y Grupo IV (IMQ; ciclofosfamida (10 mg/kg))] por medio de la aplicación tópica de 31,25 mg de crema de IMQ diariamente en el dorso de los animales desde el Día 1 al Día 13. Cuatro horas después de la aplicación de IMQ, se administró vehículo o compuesto estándar (ciclofosfamida) o Compuesto 2 (tópicamente - 30µL; oralmente - de acuerdo con peso corporal) al grupo apropiado desde el Día 1 al Día 13 diariamente. Dos horas después de la administración del vehículo o del compuesto estándar o del compuesto 2, se registraron el eritema, la descamación, el plegamiento y el engrosamiento de la piel para determinar el índice de actividad de la enfermedad (IAE).

Los animales se observaron diariamente durante un periodo de 13 días para detectar cualquier síntoma relacionado con el tratamiento. Las observaciones diarias incluían el peso corporal, la ingesta de pienso, el engrosamiento de la piel, la descamación, los pliegues, el eritema, la secreción nasal, el movimiento, la respiración, el pelo, el abdomen distendido, el estado de la piel, el pelo, las mucosas, la presencia o ausencia de secreciones, el estado de los ojos, la elevación de la cola, la actividad motora, la postura y la marcha. La gravedad del daño en la porción dorsal de la piel se evaluó asignando puntuaciones de eritema, descamación, pliegues y engrosamiento de la piel basadas en observaciones externas de la piel, de acuerdo con la rúbrica de la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados de la psoriasis

Parámetro/Puntuación	0	1	2	3
Eritema	Normal	Leve	Moderado	Grave
Escala				
Plegable				
Engrosamiento de la piel				

Para preparar las formulaciones se utilizaron DMSO al 100% (Grado LR), etanol (Grado LR), ciclofosfamida (CMC), PVP y Pluronic disponibles comercialmente. El compuesto 2 se preparó disolviendo 1,47 mg de compuesto 2 en 300 µl de DMSO al 100%. La ciclofosfamida se preparó disolviendo 500 mg de CMC en 100 mL de agua destilada.

Los resultados experimentales mostrados en las FIGS. 7A y 7B se expresan como media ± SEM.

No hubo diferencias significativas en el peso corporal, el consumo de alimentos y la ingesta de agua en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control durante la duración del estudio. El compuesto 2 disminuyó la manifestación de la enfermedad inducida por IMQ.

El compuesto 2 muestra actividad antipsoriásica, como se evidencia por la reducción del índice de actividad de la enfermedad en comparación con el grupo tratado con vehículo. Además, el compuesto 2 causó este efecto sin afectar negativamente al peso corporal ni a la ingesta de alimentos y agua.

Actividad antipsoriásica del compuesto 2 en la inflamación dérmica inducida por Imiquimod (IMQ)/modelo de psoriasis (ESTUDIO 1).

Cuarenta (40) ratones BALB/c macho (Biological E Limited, Hyderabad (número de registro CPCSEA: 36/99/CPCSEA)) se dividieron en cuatro (4) grupos de 10 ratones cada uno. Los animales se asignaron aleatoriamente en función de su peso corporal. Los grupos fueron designados como Grupo-I (Ingenuo), Grupo-II (IMQ; vehículo (PEG 400 y HPBCD)), Grupo-III (IMQ; Compuesto 2 (2,5 mg/kg)) y Grupo-IX (IMQ; ciclofosfamida (10 mg/kg)).

Se rasuró una pequeña zona en el dorso de cada ratón, asegurándose de que estas zonas fueran de igual tamaño/área. Se indujo psoriasis en los Grupos II a IV por medio de la aplicación tópica de 50 mg de crema IMQ diariamente del Día 1 al Día 6 en el dorso de los animales. El Día 1 y el Día 2 del estudio, cuatro horas después de la aplicación tópica de IMQ, se administró el Compuesto 2 o el control positivo (ciclofosfamida) o vehículo a los animales de los grupos pertinentes. Cabe destacar que a los animales de los Grupos II y III se les aplicaron inyecciones subcutáneas, mientras que a los del Grupo IV se les administró por vía oral. El tratamiento con el Compuesto 2, vehículo y ciclofosfamida finalizó el Día 2. Estos grupos de animales se mantuvieron con tratamientos IMQ diarios hasta el día 6. El día 7, los animales inducidos por la psoriasis se volvieron a distribuir aleatoriamente en 3 grupos de 10 animales cada uno en función del índice de actividad acumulativa de la enfermedad (CDAI). Del Día 7 al Día 9, los animales recibieron vehículo o control positivo o el Compuesto 2. Cabe destacar que en estos días no se trató a los animales con IMQ. Del Día 10 al Día 14, los animales fueron tratados alternativamente con IMQ (Días 10, 12 y 14), o vehículo, control positivo o Compuesto 2 (Días 11, 13).

Todos los animales fueron observados diariamente durante un periodo de 16 días para observaciones macroscópicas, peso corporal e ingesta de alimento y agua. En los días 1 y 2, se registraron las puntuaciones de eritema, descamación, pliegues y engrosamiento de la piel 2 horas después de la administración del vehículo/control positivo/compuestos de ensayo, y en los días 3 a 14 se registraron las puntuaciones 4 horas después de la aplicación de IMQ, o de la administración del control positivo, vehículo o Compuesto 2. La gravedad de la inducción en el dorso del animal se evaluó y puntuó como se muestra en la Tabla 10.

El vehículo se preparó disolviendo 40 mg de HPBCD en 70,0mL de agua destilada. El compuesto 2 se preparó disolviendo 3,59 mg en PVP al 0,5% y Pluronic al 0,5%. La ciclofosfamida se preparó disolviendo 500 mg de CMC en 100 mL de agua destilada.

Los resultados experimentales mostrados en la Tabla 10 se expresan como media \pm SEM. Los datos se evaluaron por medio de ANOVA unidireccional, y el análisis post hoc se realizó por medio de la prueba de Dunnett.

Tabla 10. Tasa de reducción del índice de actividad de enfermedad (IAE)

Tasa de reducción del IAE

	Lecturas pre administración de IMQ/droga								
	% de cambio desde la 1era administración de la dosis (es decir, desde las lecturas previas a la administración de IMQ/droga en el día 7)								
	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Día 15
Ingenuo, vehículo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IMQ, Vehículo	0,0	4,2	-33,3	-66,7	-60,4	-54,2	-45,8	-43,8	-43,8
IMQ, Compuesto 2	0,0	-33,8	-58,8	-86,2	-73,5	-80,9	-61,8	-66,2	-64,7
IMQ, ciclopíramida	0,0	16,3	-39,5	-79,1	-25,8	-39,5	-25,6	-34,9	-41,9

5

	Lecturas 4hrs post administración de IMQ/droga							
	% de cambio desde la 1era administración de la dosis (es decir, desde las lecturas previas a la administración de IMQ/droga en el día 7)							
	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14
Ingenuo, vehículo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IMQ, Vehículo	4,2	8,3	-35,4	-70,8	-58,3	-52,1	-39,6	-41,7
IMQ, Compuesto 2	-30,9	-35,3	-63,2	-88,2	-70,6	-73,5	-60,3	-63,2
IMQ, ciclopíramida	23,3	20,9	-41,9	-86,0	-25,8	-34,9	-32,6	-32,6

Se observó que la tasa de reducción del índice de actividad de la enfermedad en animales tratados con el Compuesto 2 fue significativamente mayor que la observada en animales tratados con vehículo. No hubo diferencias significativas en el peso corporal, el consumo de alimentos y la ingesta de agua en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control durante la duración del estudio.

10

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con el Compuesto 2 disminuyó la manifestación de la enfermedad inducida por IMQ sin afectar en gran medida al consumo de alimento o agua, y por tanto sin mostrar ningún efecto sobre el peso corporal de los animales de los grupos tratados.

Efecto del compuesto 2 en ratas Zucker

- 15 Veintiuna (21) ratas Zucker macho de 7 meses de edad fueron asignadas a 3 grupos de N=7 en función de pesos corporales e ingestas alimentarias equivalentes. Se incluyó como control un grupo adicional de N=7 controles Zucker delgados emparejados por edad. El peso corporal y la ingesta de alimentos y agua se midieron aproximadamente a la misma hora cada día (14:30-15:30h). Los días de tratamiento, la dosificación se realizó a las 14:30-15:30h (aproximadamente 2 horas antes de apagar las luces).
- 20 Los controles Zucker obesos y delgados fueron tratados oralmente con vehículo (10mL/kg volumen de dosis; 0,5% Pluronic F68 y 0,5% PVP K29/32 en agua) cada día de la semana. Ambos grupos del Compuesto 2 (1,5 mg/kg y 3 mg/kg) fueron tratados por vía oral cada día de la semana (volumen de dosis de 10mL/kg; 0,5% Pluronic F68 y 0,5% PVP K29/32 en agua). Antes de la fase de tratamiento, se recogieron datos de referencia de 4 días. La fase de tratamiento duró 16 días y también se incluyó una fase de lavado de 6 días.
- 25 Las FIGS 8A y 8B y FIG. 9 muestran los efectos del Compuesto 2 en ratas Zucker. Al inicio del estudio, no había diferencias significativas en el peso corporal y la ingesta diaria de alimentos entre los 3 grupos de obesos Zucker. Sin embargo, todos los grupos fueron significativamente diferentes del grupo Zucker magro.

5 El compuesto 2 (1,5-3 mg/kg oral) produjo una disminución relacionada con la dosis en la ingesta diaria de alimentos y en el peso corporal durante el periodo de tratamiento de 16 días en comparación con el grupo control Zucker. El tratamiento con el compuesto 2 también aumentó significativamente la ingesta de agua medida durante el mismo periodo. Hubo una diferencia significativa en el aumento de peso corporal entre el grupo de 3 mg/kg de Compuesto 2 y el grupo Zucker con vehículo. No hubo diferencias significativas en el aumento de peso entre el grupo tratado con 1,5 mg/kg de Compuesto 2 y el grupo Zucker con vehículo.

El compuesto 2 mostró una disminución dependiente de la dosis en el efecto alimentario diario siendo la dosis más alta (3mg/kg) más eficaz que la dosis de 1,5mg/kg. Además, el grupo del Compuesto 2 a 3 mg/kg mostró un menor aumento de peso en comparación con el grupo de control Zucker.

10 **Efecto del compuesto 2 en el modelo de obesidad inducida por dieta**

Se sometió a ratas macho Sprague-Dawley de 2 meses de edad a una dieta rica en grasas (Research Diets Inc., código de producto D12492, 60% kcal% grasa) durante 3 meses. Un grupo de ratas de la misma edad fueron alimentadas con pienso normal de laboratorio (LabDiet 5001, ~13% kcal% grasa), estos animales sirvieron de control para el grupo DIO.

15 A la edad de 4 meses, y a los 2 meses de la colocación de la dieta alta en grasas, todas las ratas se asignaron a 3 grupos de N=7 en función de pesos corporales e ingestas de alimentos equivalentes. El peso corporal y la ingesta de alimentos y agua se midieron aproximadamente a la misma hora cada día. En los días de tratamiento, la dosificación se realizó aproximadamente 2 horas antes de apagar las luces.

20 El grupo de control DIO se trató con vehículo (oral, 10mL/kg volumen de dosis; 0,5% Pluronic F68 y 0,5% PVP K29/32 en agua) cada día de la semana. El grupo del Compuesto 2 1,5 mg/kg fue tratado por vía oral cada día de la semana durante toda la fase de tratamiento (dosis 10mL/kg volumen de dosis; 0,5% Pluronic F68 y 0,5% PVP K29/32 en agua). El grupo del Compuesto 2 3 mg/kg (volumen de dosis de 10mL/kg; 0,5% Pluronic F68 y 0,5% PVP K29/32 en agua) fue tratado oralmente inicialmente una vez al día cada día de la semana durante la semana 1, y luego dos veces por semana (lunes, miércoles) durante la semana 2. Durante las semanas de tratamiento 3 y 4, el tratamiento con el Compuesto 2 3 mg/kg continuó dos veces por semana, excepto que la dosificación se realizó los lunes y jueves.

25 Antes de la fase de tratamiento, se recogieron datos basales de 3 días. La fase de tratamiento duró 4 semanas. También se incluyó una fase de lavado de 10 días.

30 El compuesto 2 se suministró en forma de polvo. El compuesto de ensayo tenía un porcentaje activo del 65,89%. El porcentaje activo se ajustó mediante el uso de BEW de 1,437 y se preparó disolviendo en una solución vehículo de Pluronic F-68 al 0,5% p/v y PVP K-29-32 al 0,5% p/v. La solución vehículo se preparó semanalmente, mientras que el Compuesto 2 se preparó fresco cada 2 días y se almacenó a +4°C. Los animales se dosificaron a un volumen de 10 mL/kg. Las dosis individuales se calcularon basándose en los pesos corporales más recientes para proporcionar la dosis adecuada mg/kg/día.

35 Las FIGS. 10A y 10B y la FIG. 11 muestra los efectos del Compuesto 2 en el modelo de obesidad inducida por dieta. Al inicio, no había diferencias significativas en el peso corporal y la ingesta diaria de comida y agua entre los 3 grupos DIO. Sin embargo, todos los grupos DIO fueron significativamente diferentes del grupo de dieta normal. Concretamente, los animales alimentados con la dieta normal tenían un peso corporal significativamente inferior al de las ratas alimentadas con la dieta rica en grasas. Por el contrario, las ratas alimentadas con la dieta rica en grasas consumieron significativamente menos comida y agua al día que las alimentadas con la dieta normal.

40 El compuesto 2 (1,5-3 mg/kg oral) produjo una disminución relacionada con la dosis en la ingesta diaria de alimentos y en el peso corporal durante el periodo de tratamiento de 28 días en comparación con el grupo de control DIO. El tratamiento con el compuesto 2 también aumentó significativamente la ingesta de agua medida durante el mismo periodo ($F_{3,27} = 11,2$, $P < 0,01$).

45 En cuanto al efecto del tratamiento sobre el aumento de peso corporal, éste se midió formalmente como porcentaje de cambio de peso corporal desde el día 3 del estudio. Hubo una reducción significativa del aumento de peso en ambos grupos del Compuesto 2 en comparación con los controles DIO en los días de tratamiento 7 (día de estudio 10) y 14 (día de estudio 17).

50 El peso corporal, la ingesta de alimentos/agua se midieron diariamente durante la fase de lavado. La ingesta de alimentos en los grupos del compuesto 2 fue similar a la de los controles DIO. El peso corporal de los grupos del compuesto 2 siguió siendo inferior al de los controles DIO.

El compuesto 2 disminuye la ingesta diaria de alimentos de forma dependiente de la dosis. El compuesto 2 también afecta al aumento de peso corporal en dosis de 1,5 y 3 mg/kg.

El compuesto 1 induce la vía antiinflamatoria Nrf2

Se utilizaron células THP-1 (células humanas de leucemia monocítica aguda) para evaluar los efectos del Compuesto 1 sobre la vía Nrf2 en un entorno de inflamación. El factor nuclear (eritroide derivado 2) similar a 2 (Nrf2) es un factor de transcripción antiinflamatorio. En condiciones normales, Nrf2 se mantiene en el citoplasma gracias a la proteína 1 asociada a Kelch like-ECH (KEAP1), que degrada Nrf2 por ubiquitinación. Nrf2 también puede desplazarse al núcleo y volver al citoplasma como carga de CRM1. En el presente estudio, se protegió a Nrf2 de la degradación eliminando KEAP1 con siRNA. A continuación, las células sin KEAP1 se trataron con TNF α para inducir inflamación, y se comprobó la capacidad del compuesto 1 para revertir la inflamación por medio de la regulación al alza de la vía Nrf2. Para demostrar la activación de la vía Nrf2, se cuantificó por medio de PCR cuantitativa la expresión de dos de sus genes descendentes NAD(P)H deshidrogenasa [quinona] 1 (NQO1) y epóxido hidrolasa 1 (EPHX1).

Las células THP-1 (leucemia monocítica aguda) se sembraron en dos placas de cultivo de 10 cm (6*10⁶ células/placa) con medio RPMI-1640 (Lonza) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (Invitrogen) y 2-mercaptoetanol a una concentración final de 0,05 mM. Las células de una placa se transfectaron con 50 nM de siRNA KEAP1 (Life Technologies, Silencer Select, siRNA ID# s18982) mediante el uso de Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen), mientras que las células de la otra placa se transfectaron con 50nM de siRNA de control, Block-iT (Invitrogen). Las células transfectadas se dejaron durante 72 h y se calculó la eficacia del knockdown de KEAP1 por medio de PCR cuantitativa mediante el uso de una sonda contra KEAP1.

A continuación, las células de cada uno de los platos se dividieron por igual en 4 pocillos de diferentes placas de 6 pocillos. Uno de los pocillos de cada una de las placas se pretrató con 1 μ M del Compuesto 1 durante 1 h, seguido de 20ng/mL de TNF α durante 24h. Los otros pocillos se trataron con 1 μ M de compuesto 1 o 20 ng/mL de TNF α o ninguno de los dos durante 24 horas. Tras el tratamiento, se extrajo ARN de las células mediante el uso de un kit de extracción de ARN (Qiagen). Las muestras de ARN de cada grupo de tratamiento se transcribieron a la inversa y se realizó una PCR en tiempo real de las secuencias de ADNc correspondientes mediante el uso de sondas contra Nrf2 y dos de sus genes descendentes, NQO1 y EPHX1. Las células THP-1 se transfectaron con ARNsi KEAP1. Se alcanzó una eficacia de noqueo del 40%. Las células KEAP1 knockdown fueron tratadas con 1 μ M del Compuesto 1 o 20ng/mL de TNF α o ambos juntos durante 24h.

La FIG. 12A muestra un aumento de 2,5 veces en la expresión de Nrf2 en las células tratadas con una combinación de TNF α y el Compuesto 1 en comparación con las células no tratadas. Sin embargo, también se observó un aumento similar (de hasta 3 veces) de los niveles de ARNm de Nrf2 en las células tratadas con el compuesto 1 y TNF α sin la desactivación de KEAP1. El compuesto 1 o el TNF α por sí solos no tuvieron ningún efecto significativo sobre la expresión de Nrf2 con o sin el knockdown de KEAP1.

La FIG. 12B muestra la expresión de NAD(P)H deshidrogenasa [quinona] 1 o NQO1 en células con o sin KEAP1 knockdown. La FIG. 12B muestra que el knockdown de KEAP1 tuvo un efecto sobre la expresión de NQO1. Incluso la muestra sin ningún tratamiento mostró un aumento de 2 veces en sus niveles de ARNm tras el knockdown de KEAP1. La combinación del Compuesto 1 y el TNF α dio lugar a un aumento de 4 veces en la expresión de NQO1 para la muestra con KEAP1 knockdown en comparación con un aumento de 2 veces, observado con la misma combinación en células sin KEAP1 knockdown.

La FIG. 12C muestra los niveles de ARNm de la epóxido hidrolasa 1 o EPHX1 en células con o sin KEAP1 knockdown tras el tratamiento con el Compuesto 1 y/o TNF α . La FIG. 12C muestra que el compuesto 1 aumentó la expresión de EPHX1 en presencia o ausencia de TNF α . El knockdown de KEAP1 se sumó al efecto del Compuesto 1, ya que se observó una inducción de hasta 2,5 veces en las muestras con Compuesto 1 y knockdown de KEAP1.

El tratamiento con 1 μ M de Compuesto 1 durante 24 h en presencia de 20 ng/mL de TNF α reguló al alza la señalización de Nrf2. El knockdown de KEAP1 potenció este efecto, como se vio por la mayor inducción de NQO1 (4 frente a 2 veces) y EPHX1 (2,5 frente a 1,5 veces) en relación con sus niveles de expresión sin el knockdown de KEAP1. Los resultados muestran que la inhibición de CRM1 puede activar la vía Nrf2 durante la inflamación, y sugiere que el tratamiento del Compuesto 1 en combinación con inhibidores de KEAP1 podría ser más eficaz que el tratamiento con el Compuesto 1 solo.

Efectos de los compuestos 1, 2 y 12 sobre la actividad transcripcional de NF- κ B

El TNF α puede inducir la actividad de transcripción de NF- κ B. Esta actividad de transcripción se inicia cuando se degrada I κ B, que se une a NF κ B e inhibe su actividad. A continuación, un miembro de la familia de proteínas NF- κ B de clase II, RelA o p65, que forma un heterodímero con un miembro de la familia de clase I, p50, se desplaza al núcleo. La subunidad p65 tiene un dominio de transactivación en su extremo C, que activa la transcripción de genes relacionados con la inflamación. Al igual que el NF- κ B, el I κ B también puede desplazarse al núcleo celular. La acumulación nuclear de I κ B protege a la proteína de la degradación, ya que ésta se produce principalmente en el citoplasma. CRM1 es responsable de la exportación nuclear de I κ B. Por lo tanto, el bloqueo de la exportación nuclear de I κ B por medio de la inhibición de CRM1 minimiza la actividad de NF- κ B, ya que I κ B nuclear se une a NF- κ B e impide que NF- κ B se una a secuencias de ADN.

Los compuestos se ensayaron en células HeLa (adenocarcinoma) para cuantificar su capacidad para inhibir la actividad transcripcional de NF- κ B. Se indujo la actividad NF- κ B en células HeLa por medio de TNF α y, a continuación,

se añadieron los compuestos para inhibir la actividad NF- κ B inducida. Las concentraciones inhibitorias semimáximas (IC₅₀) de varios compuestos, a saber, el compuesto 1, el compuesto 2 y el compuesto 12, se determinaron por medio de estudios de dosis-respuesta.

5 Las células HeLa se sembraron en una placa de 12 pocillos (200.000 células/pocillo) y se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) de Lonza suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (Invitrogen) y 50 μ g/mL de penicilina/estreptomicina (Invitrogen), y se dejaron toda la noche para fijarlas. Las células se pretrataron con compuestos diluidos en serie (comenzando a 30 μ M; dilución 1:3) durante 1 h y luego se expusieron a 20 ng/mL de TNF α (PeproTech) durante 4 h en medio libre de suero. Tras el tratamiento, las células se lavaron con PBS (Invitrogen) y se lisaron con amortiguador RIPA (Thermo Scientific). La actividad de transcripción de NF- κ B en las
10 células se midió con el kit Chemiluminescent Transcription Factor Assay (Thermo Scientific Catalog# 89859), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, 1,5 mg/mL de extracto de células enteras lisadas RIPA de cada tratamiento se incubaron en una placa de 96 pocillos unidas con la secuencia de consenso biotinilada de NF- κ B. El factor de transcripción NF- κ B activo unido a la secuencia consenso se incubó con el anticuerpo primario NF- κ B p65 y después con un anticuerpo secundario conjugado con HRP. Se añadió un sustrato quimioluminiscente a los pocillos y la señal resultante se detectó con un luminómetro. Se analizaron tres experimentos distintos para cada concentración de las curvas IC₅₀. Se utilizó el modelo 205 de XLFit para calcular las curvas IC₅₀.

La inhibición de la actividad transcripcional de NF- κ B se midió por medio de diluciones seriadas del Compuesto 1, Compuesto 2 y Compuesto 12 tras 1 h de pretratamiento con compuestos seguido de 4 h de exposición a 20ng/mL de TNF α . Se realizaron tres experimentos independientes para cada concentración, presentándose aquí la media. El
20 compuesto 1 tenía un valor de IC₅₀ de 1,59 μ M, el compuesto 2 un valor de IC₅₀ de 1,22 μ M, y el compuesto 12 un valor de IC₅₀ de 1,46 μ M.

Evaluación de los efectos del Compuesto 1 sobre la expresión de la proteína proinflamatoria, COX-2, en células HeLa cultivadas in vitro.

25 Las células HeLa se sembraron en una placa de cultivo de 6 pocillos (2,5 \times 10⁵ células/pocillo) con medio EMEM (Lonza) suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (Invitrogen). Dos de los pocillos de la placa se pretrataron con 10 μ M de Compuesto 1 durante 30 minutos, momento en el que uno de los pocillos se expuso a 20ng/ml de TNF α (PreproTech) durante 1 hora. Los otros pocillos se trataron con 20 ng/ml de TNF α o nada durante 1 hora. Tras el tratamiento, se extrajo ARN de las células mediante el uso del kit de extracción de ARN (Qiagen). Las muestras de ARN de cada grupo de tratamiento se transcribieron inversamente y se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (qTR) de las secuencias de ADNc correspondientes mediante el uso de sondas contra COX-2 (Life Technologies).

30 Las células HeLa se sembraron en una placa de cultivo de 6 pocillos (5 \times 10⁵ células/pocillo) con medio EMEM (Lonza) suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (Invitrogen). Dos de los pocillos de la placa se pretrataron con 1 μ M del compuesto 1 durante 30 minutos, momento en el que uno de los pocillos se expuso a 20
35 ng/ml de TNF α (PreproTech) durante 24 horas. Los otros pocillos se trataron con 20 ng/ml de TNF α o nada durante 24 horas. Tras el tratamiento, se generaron lisados de células enteras por medio de lisis con amortiguador RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche). La detección inmunoblot de la proteína COX-2 se realizó mediante el uso de un anticuerpo anti-COX-2 (Cayman). La intensidad de la señal para la proteína COX-2 se normalizó con respecto a la beta-actina (Santa Cruz) para cada muestra y se representó gráficamente como unidades de intensidad arbitrarias.
40

Los datos del análisis de ARNm por medio de qTR-PCR se muestran en la FIG. 13A. Después de 1 hora de tratamiento, el TNF α indujo un aumento de aproximadamente 8 veces en la expresión del ARNm de la COX-2 en comparación con el control, mientras que el compuesto 1 por sí solo no tuvo ningún efecto sobre el nivel de expresión de la COX-2. El compuesto 1 no fue la causa del aumento de la expresión del ARNm de la COX-2.

45 Los datos del análisis de proteínas por inmunotransferencia se muestran en la FIG. 13B. Las células HeLa se dejaron sin tratar, se trataron con 20 ng/ml de TNF α o 1 μ M de Compuesto 1, o con 20 ng/ml de TNF α y 1 μ M de Compuesto 1 durante 24 horas, y a continuación se evaluó la cantidad de proteína COX-2 presente por medio de detección por inmunotransferencia. La proteína COX-2 aumentó a las 24 horas en las células estimuladas con TNF α en comparación con el control no tratado y con las células tratadas con el Compuesto 1, mientras que el Compuesto 1 disminuyó la
50 cantidad de proteína COX-2 en presencia de TNF α . La intensidad de las señales de inmunotransferencia para la proteína COX-2 se normalizó con respecto a la de β -actina para cada muestra y se representó gráficamente.

El compuesto 1 no afecta a la expresión de COX-2 inducida por TNF α , pero sí reduce la cantidad de expresión de proteína COX-2 inducida por TNF α .

El compuesto 1 localiza en el núcleo las cargas CRM1 relacionadas con la inflamación

55 Las células HeLa y THP-1 (leucemia monocítica aguda humana) se trataron con el factor inductor de la inflamación, TNF α , solo o en combinación con 1-10 μ M del Compuesto 1 durante 4-24 h, y después se analizaron por medio de inmunofluorescencia (IF) para la localización nuclear de las proteínas de carga CRM1 relacionadas con la inflamación: I κ B, Nrf2, HMGB1, FoxP3, FOXO1a, RxR α , PPAPy y NEKb (subunidad p65).

Para la detección de la localización de IκB, Nrf2, RxRα y PPARγ, las células se preincubaron con 10 μM de Compuesto 1 durante 30 minutos, seguido de incubación con 20 ng/mL de TNFα durante 4 h en medio libre de suero. Para la detección de HMGB 1, FoxP3 y Foxo1A, las células se preincubaron con 1 μM del Compuesto 1 durante 2 h, seguido de incubación con 20 ng/mL de TNFα durante 24 horas. Para la detección de NFκB, las células se preincubaron con 1 μM de Compuesto 1 durante 2 h, seguido de incubación con 20 ng/mL de TNFα durante 24 horas. Las células se fijaron con metanol (MeOH) helado al 100% y se permeabilizaron/bloquearon con Tween 20 al 0,1%, glicina 0,3 M y BSA al 1% en PBS, o se fijaron con PFA (paraformaldehído al 3% y sacarosa al 2% en PBS) y se permeabilizaron/bloquearon con Triton-X100 al 0,1% y BSA al 1% en PBS. bill se detectó por medio del anticuerpo primario monoclonal de conejo (E130) de Abeam (ab32518); Nrf2 se detectó por medio del anticuerpo primario policlonal de conejo de Santa Cruz (sc722); RxR alfa se detectó por medio del anticuerpo primario policlonal de conejo de Santa Cruz (sc553); PPAR gamma se detectó por medio del anticuerpo primario monoclonal de conejo [E130] de Cell Signaling (#2443); Foxo1A fue detectado por el anticuerpo primario monoclonal de conejo [C29H4] de Cell Signaling (#2880); HMGB1 fue detectado por el anticuerpo primario policlonal de conejo de Abeam (ab 18256); FoxP3 fue detectado por el anticuerpo primario policlonal de conejo de Abeam (ab10563); NFκB-p65 fue detectado por el anticuerpo primario monoclonal de conejo [C22B4] de Cell Signaling (#4764). Para todas las tinciones se utilizó el anticuerpo secundario de conejo Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A11008). Las imágenes se tomaron con un aumento de 20X.

El bloqueo de cargas CRM1 relacionadas con la inflamación en el núcleo tiene efectos adversos sobre la inflamación y, por lo tanto, los ensayos IF pueden servir como biomarcadores de los efectos antiinflamatorios de los inhibidores de CRM1.

bill es el inhibidor de NFκB que induce la expresión de vías proinflamatorias. Dado que la mayor parte de la degradación de bill se produce en el citoplasma, su localización nuclear protege a IκB de la degradación y le permite unirse a NFκB nuclear, bloqueando la actividad proinflamatoria de NFκB. Nrf2 es un factor de transcripción con cremallera de leucina que induce en el núcleo la expresión de la actividad antiinflamatoria. HMGB1 es el factor de la caja 1 del grupo de alta movilidad, y suele estar fuertemente unido a la cromatina. Tras la secreción activa o la liberación pasiva de las células dañadas, la HMGB1 funciona como una citocina e induce la respuesta proinflamatoria. El bloqueo de la HMGB1 en el núcleo evita sus efectos proinflamatorios. FoxP3, cabeza de horquilla box P3, funciona como factor de transcripción maestro en el desarrollo y la función de las células T reguladoras que poseen actividad inmunosupresora. FOXO1a es un factor de transcripción capaz de inducir genes antiinflamatorios, como la angiopoyetina-2. Por lo tanto, la localización nuclear protege a FOXO1a de la fosforilación, exclusión nuclear y posterior degradación. RxRα es un receptor nuclear retinoide que regula la expresión de quimiocinas como Ccl6 y Ccl9 en macrófagos. RxRα es esencial para el reclutamiento de leucocitos a los sitios de inflamación. El atrapamiento nuclear de RxRα provoca el reclutamiento y el agotamiento de coactivadores de transcripción que, de otro modo, servirían para unir factores de transcripción proinflamatorios como NFκB. El PPARγ es un factor de transcripción activado por ligando que pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares y regula la expresión de genes antiinflamatorios.

Los resultados, mostrados en las FIGS. 14A y 14B, demuestran la localización nuclear de las cargas mencionadas, incluso en presencia de TNFα, que se sabe que induce la inflamación. Los resultados indican la capacidad del compuesto 1 de inducir vías antiinflamatorias para superar la inflamación.

Evaluación del efecto del Compuesto 1 sobre los déficits cognitivos tras la lesión ICBC en ratas

La lesión por impacto cortical bilateral controlado (ICBC) en la corteza frontal medial (CFM) de ratas macho Sprague Dawley se indujo por medio de un dispositivo de contusión cortical. Tras la CCI se controló cualquier hemorragia de la superficie cortical y se suturaron la fascia y el cuero cabelludo. Las ratas operadas con simulacro fueron anestesiadas, montadas en el aparato estereotáxico y se les practicó una craneotomía.

Se disolvió progesterona 16 mg/mL en 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina al 22,5% y se administró la inyección inicial (16 mg/kg) *i.p.* 1 h después de la lesión. Las inyecciones restantes (todas de 16 mg/kg) se administraron por vía subcutánea a las 6 h de la lesión y continuaron durante 5 días después de la lesión. Las inyecciones de progesterona se realizaron a una concentración de 1 mL/kg. La progesterona se utilizó como control.

El compuesto 1 0,2, 0,4 y 0,6 mg/mL se suspendió en vehículo (0,6% p/v Pluronic® F-68 y 0,6% p/v PVP K-29/32 en agua) y se administró *p.o* a una concentración de 10 mL/kg, 16 h antes de la lesión y 2 h después de la lesión, y las administraciones se continuaron durante 4 días. Las ratas de control recibieron inyecciones equivalentes del vehículo para el compuesto 1, en los mismos puntos temporales. Los grupos de tratamiento se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Grupos de tratamiento

Grupo	Número de animales	Artículo de prueba	de	Dosis	Vía de administración	Horario
-------	--------------------	--------------------	----	-------	-----------------------	---------

1	8	Vehículo+Sham	N/A	PO	16 h antes de la lesión, 2 h después de la lesión y continuó durante 4 días.
2	8	Vehículo+ICBC	N/A	PO	16 h antes de la lesión, 2 h después de la lesión y continuó durante 4 días.
3	8	Progesterona	16 mg/kg	IP+SC	1 h después de la lesión, [IP] 6 h después de la lesión y continuó durante 5 días después de la lesión [SC].
4	8	Compuesto 1	2 mg/kg	PO	16 h antes de la lesión, 2 h después de la lesión y continuó durante 4 días.
5	8	Compuesto 1	4 mg/kg	PO	16 h antes de la lesión, 2 h después de la lesión y continuó durante 4 días.
6	8	Compuesto 1	6 mg/kg	PO	16 h antes de la lesión, 2 h después de la lesión y continuó durante 4 días.

5 La prueba del laberinto acuático de Morris (LAM) es una tarea de navegación espacial que mide el aprendizaje y la memoria en roedores mediante el uso de señales visuales. Los sujetos aprenden durante días a encontrar una plataforma oculta. Se realizó una prueba LAM dos semanas después de la lesión. Se permitió a las ratas macho Sprague Dawley nadar en la piscina hasta que alcanzaron la plataforma situada en el cuadrante suroeste de un tanque, o hasta que transcurrieron 90 segundos. El comportamiento se siguió con una cámara de vídeo colgada por encima de la piscina y se grabó y analizó con un software de seguimiento de vídeo (ANY-maze).

10 Los efectos del Compuesto 1 y la progesterona sobre la adquisición de la prueba LAM se muestran en la FIG. 15A. El ANOVA de medidas repetidas de dos vías halló un efecto significativo del tratamiento. En comparación con las ratas con lesión simulada, las ratas con lesión ICBC mostraron un déficit significativo de aprendizaje espacial, como indica el aumento significativo de la latencia para encontrar la plataforma oculta durante la fase de adquisición de 5 días (FIG. 15A). En comparación con las ratas lesionadas con ICBC tratadas con vehículo, el Compuesto 1 (2, 4 y 6 mg/kg) mostró una disminución dependiente de la dosis en la latencia para encontrar la plataforma oculta, con efectos significativos en los días 17 y 18 después de la lesión con 6 mg/kg y en el día 18 con 4 mg/kg. Los datos sugieren que
15 el compuesto 1 tiene un efecto neuroprotector.

20 La FIG. 15C son fotografías de cerebros enteros de animales que recibieron lesiones simuladas (Sham), CCI + vehículo (Control), o CCI + Compuesto 1 (6 mg/kg), y muestra los resultados de una inspección visual cualitativa de cerebros enteros antes del seccionamiento con vibratomo. La inspección indicó que ninguno (0 de 4) de los animales Sham presentaba daños en el tejido cortical dorso-medial. En marcado contraste, los cuatro controles de CCI mostraron lesiones bilaterales graves restringidas a esta región del córtex. Los animales CCI que recibieron el Compuesto 1 mostraron daños de moderados a mínimos. Cabe destacar que el cerebro que presentaba la lesión más grave en el grupo del compuesto 1 era menos dramático que todos los cerebros del grupo de control de la CCI.

25 Se midió el nivel de expresión de varias citoquinas en plasma recogido de ratas de cada grupo de tratamiento. Las muestras se recibieron congeladas y se almacenaron a -80 °C. El día del experimento, las muestras se descongelaron, se diluyeron cuatro veces y se analizaron para determinar la expresión de citoquinas en una plataforma Luminex. Las muestras se analizaron para las citocinas GRO/KC, IFN γ , IL-1B, IL-6, IL-10, IL-12p70 y TNF α , mediante el uso de un kit multiplex fabricado por Millipore. Como se muestra en la FIG. 15B, se observaron los mismos patrones en los niveles de expresión entre las muestras. El mayor cambio se produjo en la IL-10. El compuesto 1 a 6 mg/kg redujo la IL-10 en comparación con el grupo de control tratado con vehículo.

30 En muchos casos, la lesión traumática provoca una respuesta de lesión secundaria. En la mayoría de los casos, el resultado será la inflamación. La respuesta inflamatoria está impulsada por citocinas y quimiocinas y se propaga parcialmente por productos derivados del tejido dañado (patrones moleculares asociados al daño).

35 El síndrome de disfunción orgánica múltiple (SDOM), un síndrome poco conocido de pérdida secuencial y gradual de la función orgánica, es la causa más frecuente de muerte tardía tras una lesión, y es responsable de una morbilidad y mortalidad sustanciales. Se considera que el SDOM se debe, en parte, a una activación excesiva o desadaptativa de las vías inflamatorias.

40 Se recogieron medidas cuantitativas de la densidad celular a partir de subsecciones inmunomarcadas con anti-NeuN desde aproximadamente 2-3 mm anteriores al bregma. Se trazaron regiones de interés (RDI) (sin tener en cuenta la condición experimental) alrededor de las capas IV-VI en la región cortical adyacente al lugar de la lesión en los animales tratados con CCI o en la zona equivalente (corteza dorsal) en los animales simulados. También se evaluó una RDI de área similar en una región cortical ventral de la misma sección. La identificación celular se realizó mediante el uso del módulo de recuento celular del software Keyence BZ-II Analyzer. Se determinaron los coeficientes de área

célula-a-materia gris (CG) para cada RDI. Los animales simulados presentaban un etiquetado denso uniforme en las regiones dorsal y ventral. Como era de esperar, los animales de control CCI mostraron coeficientes CG reducidos tanto en las zonas corticales dorsales (-45% en comparación con sham) como ventrales (-30% en comparación con sham) frente a los animales sham (FIG. 15D). La reducción del coeficiente CG inducida por la CCI fue mitigada por el tratamiento con el Compuesto 1 en el córtex ventral (-3% en comparación con la simulación; $p = 0,09$). Aunque el efecto del compuesto 1 frente al tratamiento con vehículo en el córtex ventral no es estadísticamente significativo, se prevé que este efecto supere la significación estadística en un estudio más amplio. No se detectó ningún efecto del Compuesto 1 en la región cortical dorsal (-32% en comparación con el simulacro) inmediatamente adyacente al lugar de la lesión. La diferencia en el efecto observado del Compuesto 1 en la región ventral frente a la dorsal puede ser un efecto umbral relacionado con el grado de lesión, que estaba inversamente relacionado con la distancia desde el lugar de la lesión. Por lo tanto, el daño a la región cortical dorsal podría ser demasiado grave para ser rescatado por el Compuesto 1 en estas condiciones.

Se realizó inmunofluorescencia para evaluar el impacto de TBI en varias vías de respuesta inmunitaria, y para determinar si el Compuesto 1 podría estar mediando sus efectos neuroprotectores a través de una o más de esas vías. Se examinaron medidas semicuantitativas de las respuestas a lesiones secundarias por medio de marcaje inmunofluorescente para IgG anti-rata (un indicador de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE)) y TNF α (un indicador de la inflamación neural). Se tomaron imágenes de todos los marcadores con un aumento de 20X en las zonas de la corteza que rodeaban el lugar de la lesión en subsecciones adyacentes en un radio de 300 μm a las utilizadas para las evaluaciones del etiquetado NeuN. Para cada etiqueta, se trazó una RDI diana dentro de las capas IV-VI adyacentes al lugar de la lesión (o una región equivalente de la corteza dorsal para los animales simulados), y se recogió una RDI de referencia de las mismas láminas en la corteza ventral. Se evaluó la intensidad de fluorescencia normalizada en cada una de las dos RDI. Para todas las etiquetas, se determinó que el sitio de referencia de la corteza ventral no era diferente entre los grupos ($p > 0,5$); por lo tanto, se determinó el porcentaje de objetivo a valor de referencia (IF).

Anti-Rat IgG se expresó en neuronas (indicado por la punta de flecha en la FIG. 15E) en el tejido lesionado. La FIG. 15E muestra que la IgG antirrata se distribuyó dentro del neurofilamento de las zonas dañadas del tejido cortical. La IgG antirrata no estaba presente en el tejido simulado. Células inmunopositivas TNF α (indicadas por la punta de flecha en la FIG. 15E) eran claramente visibles en el tejido dañado que rodeaba el lugar de la lesión en los animales de control. Estos elementos estaban ausentes en gran medida en los animales tratados con el Compuesto 1 y en los simulados. La FIG. 15E muestra que el Compuesto 1 reduce las respuestas a lesiones secundarias en ratas expuestas a lesiones cerebrales.

Artritis inducida por colágeno (AIC) Estudio Núm. 2

Para investigar más a fondo el efecto de los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva sobre los biomarcadores de inflamación, se inició un segundo modelo de AIC. En este modelo, los grupos se designaron como grupo A (ingenuo), grupo B (modelo; tratado con vehículo), grupo C (Compuesto 2 a 5 mg/kg QoD). Las ratas de los grupos B y C fueron inmunizadas intradérmicamente con colágeno bovino de tipo II en IFA el día 0, y se les administró una inyección de refuerzo el día 7. El compuesto 2 se administró por vía oral a ratas con AIC tras el inicio de la artritis (día 11). El desarrollo de la AIC se evaluó por medio de puntuaciones macroscópicas y mediciones de la hinchazón de la pata. Se evaluó cada día durante los 5 primeros días tras la sensibilización (día 7), y después dos veces por semana (lunes y jueves) hasta el día 28, mediante el uso del sistema de puntuación clínica descrito en la Tabla 7. Además, se realizaron ELISAs para CD45, CRP, CCL2/MCP-1, TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-17, y mediciones para catepsina K y elastasa 4 días (Día 15 del estudio) y 10 días (Día 21 del estudio - pico de la enfermedad) después del tratamiento compuesto y al final del estudio (Día 28) en todos los animales del grupo. Además, el último día del estudio (día 28), unos pocos animales representativos de cada grupo fueron sometidos a una microtomodensitometría tridimensional del calcáneo, y se cuantificó la erosión ósea en las patas.

Las FIGS. 16A y 16B muestran que las ratas tratadas con el Compuesto 2 a 5 mg/kg tenían una hinchazón articular significativamente reducida (FIG. 16B) y puntuaciones clínicas (FIG. 16A) en comparación con las ratas tratadas con vehículo.

Las FIGS. 17A y 17B muestran que las ratas tratadas con el Compuesto 2 a 5 mg/kg tenían una erosión ósea significativamente reducida en las patas traseras en comparación con las ratas tratadas con vehículo. El estado de las articulaciones de los animales tratados con el Compuesto 2 era comparable al de los animales ingenuos. En cambio, los animales tratados con vehículo mostraron un aumento estadísticamente significativo de la erosión ósea en las patas traseras.

Se utilizó un ensayo LUMINEX® y ELISA para medir los efectos del Compuesto 2 en los niveles de citocinas proinflamatorias y marcadores de inflamación. Se recogió líquido sinovial el día 21, tras la primera inmunización, de 2 ratas del grupo modelo y 2 ratas del grupo tratado con el compuesto 2, y al final del estudio de 2 ratas del grupo ingenuo, 3 ratas del grupo modelo y 3 ratas del grupo tratado con el compuesto 2.

Las FIGS. 17C-17F muestran que, en comparación con el grupo modelo, el compuesto 2 mostró efectos inhibidores sobre la producción de citocinas proinflamatorias y un marcador de inflamación en muestras de líquido sinovial. Las citocinas reducidas incluyen IL-1 β , IL-6 y MCP-1, y el marcador de inflamación es la proteína C reactiva (PCR).

5 También se utilizó un ensayo LUMINEX[®] para medir los niveles de citoquinas proinflamatorias en suero. Se recogieron muestras de suero (1 mL de sangre por rata) 4 días después del tratamiento con el compuesto (Día 15), 10 días después del tratamiento con el compuesto (normalmente en el pico de la enfermedad - Día 21) y al final del estudio (Día 27).

La FIG. 17G muestra que, en comparación con el grupo modelo, el compuesto 2 mostró un efecto inhibidor sobre la producción de IL-1 β en muestras de suero.

10 **Modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)**

El modelo EAE es un modelo aceptado para el estudio de enfermedades desmielinizantes del SNC humano tales como la esclerosis múltiple. Se investigaron los efectos del Compuesto 1 en un modelo murino de EAE inducida por MOG en ratones C57B 1/6J hembra. Los animales se dividieron en 3 grupos designados como Grupo I (control con vehículo), Grupo II (control con dexametasona) y Grupo III (Compuesto 1 a 7,5 mg/kg). La solución salina, la dexametasona y el Compuesto 1 se administraron de acuerdo con el esquema mostrado en la FIG. 18A. Se administraron solución salina y dexametasona por vía intraperitoneal todos los días a partir del día 0. El compuesto 1 a 7,5 mg/kg se administró por vía oral a partir del día 11 (inicio de la enfermedad) los lunes, miércoles y viernes durante 3 semanas consecutivas. La enfermedad se indujo por medio de una única inyección intradérmica de MOG emulsionado en adyuvante completo de Freund (ACF) el día 0 del estudio, seguida de inmunestimulación suplementaria intraperitoneal con toxina pertussis (PT) realizada el día 0 del estudio, y de nuevo 48 horas después, el día 2 del estudio.

Como se muestra en la FIG. 18B, los primeros signos de la enfermedad se observaron entre 7 y 9 días después de la inmunización con MOG y el pico de la enfermedad se desarrolló el día 17 del estudio. El tratamiento con dexametasona a partir del día 0 a una dosis de 1 mg/kg IP redujo significativamente las puntuaciones clínicas en los días 8-37 del estudio (Grupo II) en comparación con el control con vehículo (Grupo I). El tratamiento con el Compuesto 1 a partir del Día 11 a una dosis de 7,5 mg/kg (Grupo III) disminuyó significativamente la puntuación y la gravedad de la enfermedad. Estos resultados se muestran en la FIG. 18B.

A la vista de los hallazgos obtenidos en las condiciones del presente estudio, el tratamiento con el Compuesto 1 a una dosis de 7,5 mg/kg p.o. a partir del día 11 del estudio dio lugar a una disminución de la puntuación y la gravedad de la enfermedad.

30 **Ejemplo 18. Modelos de cicatrización de heridas**

Materiales

Ratones - Ratones C57BL/6J, machos, de 6-8 semanas de edad, SPF, obtenidos de Harlan Laboratories LTD. Los ratones se mantuvieron en jaulas individuales estériles ventiladas (JIV) con comida y agua disponibles ad libitum, ciclos de 12h/12h de oscuridad y luz, temperatura controlada de 19-21°C, humedad controlada de 40 - 60%, presión de aire positiva dentro de la habitación de los animales, y control de informes sanitarios cada 3 meses, que se realizó en centinelas seleccionados.

40 Cerdos - *sus scrofa domestica*, Cerdo doméstico (principalmente Landrace X blanco grande), hembra, aproximadamente 60 Kg, 4-5 meses de edad, Instituto Lahav de Investigación Animal, Kibbutz Lahav, Israel. Cerdos mantenidos en un entorno limpio y sin factores de riesgo, agua del grifo ad libitum directamente de una fuente pública, alimentos de acuerdo con las recomendaciones de las tablas de crecimiento estándar bajo la supervisión de un veterinario.

ISOFLURANE 99,9% para inhalación, lote 6027962, Abbot Laboratories Ltd, Inglaterra

Agua - agua para inyección, lote 11481012, B. Braun Melsungen AG, Alemania

45 Solución salina - cloruro sódico 0,9% inyectable, lote 12224012, B. Braun Melsungen AG, Alemania

DMSO - dimetilsulfóxido, D2650, Sigma-Aldrich Inc., EE.UU.

PLURONIC[®] F-68

PVP K-29/32

50 **Evaluación de los efectos de la administración sistémica y la aplicación tópica del Compuesto 1 en heridas cutáneas de ratones C57BL**

Los efectos del Compuesto 1 sobre la cicatrización de heridas cutáneas se estudiaron en un modelo de herida por incisión cutánea longitudinal de espesor total en ratón. A su llegada, los animales se identificaron por medio de crotales, se pesaron y se dejaron aclimatar durante varios días antes de iniciar el experimento. El día de la herida, se pesaron los ratones y se dividieron en 6 grupos experimentales con 6 animales por grupo, de acuerdo con una aleatorización estratificada por diferencias de peso. Antes del procedimiento quirúrgico, se anestesió a los ratones con isoflurano y se les recortó el lomo. Se realizaron incisiones longitudinales de espesor total de 20 mm mediante el uso de una hoja de bisturí estándar en el lomo de los animales (paralelas a la columna vertebral). Tres horas después de la herida, debido a la elasticidad de la piel y a la actividad de los animales, las incisiones adquirieron forma elíptica. En esta fase, se midió la zona más ancha de la herida para establecer una anchura de referencia de la herida. La evaluación de la cicatrización de la herida se realizó midiendo la zona más ancha de la herida. Los grupos de tratamiento consistieron en sondaje oral o grupos tópicos. Durante el experimento, se fotografiaron las heridas y se realizaron análisis morfológicos. Al final del experimento, 8 días después de la herida, los ratones fueron sacrificados, se midió la anchura de la herida y se recogieron biopsias de la zona de la herida que se sometieron a análisis.

Tabla 12. Grupos de estudio iniciales

Grupo	Número de ratones	Artículo de prueba	Dosis	Vía de administración	Horario
1	6	Solución acuosa de control al 0,6% p/v de Pluronic® F-68 y al 0,6% p/v de PVP K-29/32	0,2 ml	PO	cada dos días
2	6	Compuesto 1 en PVP/Pluronic® F-68	4 mg/kg	PO	cada dos días
3	6	Compuesto 1 en PVP/Pluronic® F-68	7,5 mg/kg	PO	cada dos días
4	3	Vehículo, agua para inyección	0,2 ml	Tópico	Diario
5	6	Compuesto 1 en agua	2,5 µM	Tópico	Diario
6	6	Compuesto 1 en agua	1 µM	Tópico	Diario

Las soluciones de dosificación se prepararon frescas cada día de dosificación. El compuesto 1 para administración oral se suministró como polvo liofilizado y se reconstituyó en una solución acuosa de 0,6% p/v de Pluronic® F-68 y 0,6% p/v de PVP K-29/32 para obtener una suspensión madre de 0,75 mg/mL. 75 mg/mL, que posteriormente se diluyó con una solución acuosa de Pluronic® F-68 al 0,6% p/v y PVP K-29/32 al 0,6% p/v para preparar soluciones de trabajo de 7,5 mg/kg y 4 mg/kg. El compuesto 1 para aplicación tópica se suministró en forma de polvo liofilizado y se suspendió en agua hasta una concentración de 10 mM, que se volvió a diluir con agua para alcanzar una concentración de trabajo final para aplicación tópica.

Como parte de una evaluación morfológica diaria, se realizó una fotodocumentación mediante el uso de una cámara digital FinePix S700. La FIG. 19 son fotografías de heridas representativas de cada grupo experimental el día 5 después de la herida. La barra de escala negra representa 1 cm. Se realizaron un total de 33 heridas en 33 ratones. La evaluación morfológica demostró el efecto positivo del tratamiento con el Compuesto 1, por vía oral o tópica. Todos los tratamientos indujeron una cicatrización de las heridas superior a la de los controles. Las heridas tratadas eran de menor tamaño y las costras eran más ligeras, finas y homogéneas, sin grietas, lo que indica una fase más tardía de cicatrización de la herida. Cuando se evaluaron el mismo día que los grupos de tratamiento, las heridas de los grupos de control parecían de mayor tamaño y estaban cubiertas de costras gruesas y agrietadas que dejaban al descubierto una zona no cicatrizada de la herida (observada como zonas rojizas y rosadas) tanto en los bordes como en el centro de las heridas.

El análisis morfológico es el principal parámetro utilizado en la evaluación de la cicatrización de heridas en estudios preclínicos en animales y en tratamientos clínicos de heridas humanas. Basándose en el análisis morfológico, el Compuesto 1 mostró eficacia y tuvo un impacto positivo en la cicatrización de heridas. Cabe destacar que tanto la aplicación tópica como la administración sistémica del Compuesto 1 dieron lugar a una mejor cicatrización de las heridas, medida por la reducción del tamaño de la herida y las mejores propiedades de formación de costras.

Evaluación de los efectos de la aplicación tópica de un compuesto de ensayo en heridas de piel de cerdo

- Los efectos de un compuesto de ensayo sobre la cicatrización de heridas cutáneas pueden estudiarse en un modelo de incisión cutánea longitudinal de espesor total en cerdo. A su llegada, los animales se identifican por medio de crotales, se pesan y se dejan aclimatar durante varios días antes de iniciar el experimento. Tres días antes de la cirugía, los cerdos son trasladados al centro de hospitalización para su aclimatación. Doce horas antes de la intervención, se retiran los alimentos. El día de la cirugía, se anestesia al cerdo con ketamina, xilacina, diazepam e isoflurano. El pelo del dorso, el tórax y el abdomen se corta cuidadosamente con una máquina recortadora Oster® (tamaño de hoja 30) y se marcan 20 regiones individuales de 4 cm² cada una en dos filas (10 regiones por fila). Se realizan diez pares de incisiones cutáneas longitudinales de espesor total de 2,5 cm con la hoja de bisturí Núm. 11, a 4 cm de cada lado de la línea media del dorso.
- Tras el procedimiento quirúrgico, las heridas se dividen en grupos experimentales y se tratan diariamente por medio de aplicación tópica en la zona de la herida y en los bordes de la misma. La zona de tratamiento consiste en una superficie de piel hasta una distancia de 2 cm del centro de la herida. Las soluciones de dosificación se aplican gradualmente en cada herida mediante el uso de una pipeta, hasta que el tejido absorba todo el volumen de tratamiento (por ejemplo, 1 ml de solución salina o compuesto de prueba).
- Varias horas después de la herida, debido a la elasticidad de la piel y a la actividad de los animales, las incisiones adoptan formas elípticas. En esta fase, se mide la zona más ancha de la herida para establecer una anchura de referencia de la herida. La evaluación de la cicatrización de la herida se realiza midiendo la zona más ancha de la herida. Durante el experimento, se fotodocumentan las heridas y se realiza un análisis morfológico. Al final del experimento (por ejemplo, 12 días después de la herida), se sacrifica a los cerdos por medio de la administración de anestesia y KCl. Se evalúa la morfología de la herida, se mide su anchura y se toman biopsias de la zona de la herida, que se fijan con paraformaldehído al 4% para su posterior análisis. Tras la fijación, las biopsias de la herida se documentan fotográficamente mediante el uso de una cámara digital de alta resolución, por ejemplo, una FinePix S700, y las biopsias de la zona de la herida se someten a un análisis histopatológico. La evaluación de la cicatrización de la herida se realiza de forma emparejada, en la que cada herida tratada con el compuesto de ensayo se compara directamente con la herida de control en la misma localización anatómica al otro lado de la línea media del dorso. Esta evaluación por pares de la cicatrización es crucial en términos de evaluación objetiva y comparación objetiva de las heridas tratadas con las no tratadas debido a la variabilidad asociada al grado de vascularización y circulación sanguínea en la piel en diferentes zonas del lomo del cerdo. Las heridas situadas en la zona delantera, cerca del cuello, presentan unas propiedades de cicatrización mucho mejores que las heridas situadas en la parte trasera posterior.

Tabla 13. Grupos de estudio iniciales

Grupo	Número de heridas	Artículo de prueba	Dosis	Vía de administración	Horario
1	5 heridas frontales en el lado derecho	Solución salina de control	1 ml	Tópico	Diario
2	5 heridas traseras en el lado derecho	Solución salina de control	1 ml	Tópico	Diario
3	5 heridas frontales en el lado izquierdo	Compuesto de ensayo	3 µM	Tópico	Diario
4	5 heridas traseras en el lado izquierdo	Compuesto de ensayo	1 µM	Tópico	Diario

- Las soluciones de dosificación se preparan frescas cada día de dosificación. El compuesto de ensayo se suministra como polvo liofilizado y se reconstituye en cloruro sódico inyectable al 0,9% para obtener una suspensión madre de 3 mg/mL. La suspensión madre se diluye de nuevo con cloruro sódico inyectable al 0,9% hasta concentraciones finales de 3 µM y 1 µM para aplicación tópica.

- Las superficies de costra homogéneas, finas y uniformemente organizadas sin incidentes de supuración, sangrado o secreción de la herida son indicativas de la cicatrización de la herida. Las costras muy heterogéneas, agrietadas y de color oscuro indican numerosos incidentes de exudación, supuración y hemorragia durante el curso del proceso de cicatrización de la herida.

Evaluación de los efectos de la aplicación tópica de un compuesto de prueba en los procesos tempranos de cicatrización de heridas en cerdos

- Los efectos de un compuesto de ensayo sobre la cicatrización temprana de heridas pueden estudiarse en un modelo de herida de incisión longitudinal de piel de espesor total en cerdos. Se realizan cinco pares de incisiones longitudinales de espesor total de 2,5 cm en la sección frontal del dorso de cerdos anestesiados mediante el uso de hojas de bisturí

del Núm. 11, a 4 cm de cada lado de la línea media del dorso. Tras varias horas después del procedimiento, la incisión longitudinal se convierte en una herida elíptica.

5 Las heridas se dividen en grupos experimentales y se tratan diariamente por medio de aplicación tópica en la zona de la herida (incluidos los bordes y en la zona de la piel próxima a la herida). La fase de tratamiento comienza 24 horas después de la herida. Las soluciones dosificadoras se aplican gradualmente sobre cada herida mediante el uso de una pipeta, hasta que el tejido absorba todo el volumen de tratamiento (por ejemplo, 1 mL de solución salina o de un compuesto de prueba).

10 En el día 5, se evalúa el estado de cicatrización y la morfología de la herida de acuerdo con los siguientes parámetros: hemorragia, supuración, hinchazón, inflamación, secreción de pus y formación de costras. La evaluación se realiza de forma emparejada, en la que cada herida tratada con el compuesto de prueba se compara directamente con la herida de control en la misma localización anatómica al otro lado de la línea media del dorso.

Tabla 14. Grupos de estudio iniciales

Grupo	Número de heridas	Artículo de prueba	Dosis	Vía de administración	Horario
1	5	Solución salina de control	1 ml	Tópico	Diario
2	5	Compuesto de ensayo	3 µM	Tópico	Diario

15 Las soluciones de dosificación se preparan frescas cada día de dosificación. El compuesto de prueba se suministra como polvo liofilizado y se reconstituye en cloruro sódico al 0,9% hasta obtener una suspensión madre de 3 mg/mL. Esta suspensión madre se diluye de nuevo con cloruro sódico al 0,9% para la preparación de la solución tópica final de 3 µM.

20 Se realiza una evaluación morfológica de la cicatrización de la herida en el Día 5 de tratamiento. Se examina la inflamación, se puntúa de acuerdo con la gravedad en cada herida y se documenta como leve, moderada o grave. Las heridas que presentan hinchazón moderada y grave se presentan como porcentaje del total de heridas del grupo experimental. La secreción se examina y puntúa de modo binario: una herida que presentaba una secreción mínima se consideraba positiva y, una herida sin ninguna secreción detectable se considera negativa para este parámetro. Las heridas que presentan secreciones (positivas para este parámetro) se presentan como porcentaje del total de heridas del grupo experimental. Se considera que una costra está completamente formada cuando una capa continua de una formación dura, seca, rojiza, de color amarillo oscuro o marrón cubre toda la zona de la herida y está fuertemente adherida al lecho de la herida y, por lo tanto, proporciona una barrera continua y fuerte entre el entorno externo y los tejidos heridos. La formación de costras se examina y puntúa de modo binario: las heridas que presentaban una costra completamente formada, seca y fuerte se consideran positivas y las heridas sin costra o con costras en una fase anterior se consideran negativas para este parámetro. Las heridas con una costra completamente formada se presentan como porcentaje del total de heridas por grupo.

También se evalúan la hinchazón, la secreción y la formación de costras. La hinchazón y la secreción forman parte de una respuesta inflamatoria excesiva que podría retrasar la reparación de los tejidos e inducir cicatrices antiestéticas.

Evaluación de los efectos de la aplicación tópica de un compuesto de ensayo sobre la cicatrización precoz de heridas en piel de cerdo y sobre las irritaciones y el rascado asociados a la piel dañada o herida

35 El efecto de un compuesto de ensayo sobre la cicatrización de heridas cutáneas puede estudiarse en un modelo de herida longitudinal de incisión cutánea de espesor total en cerdos. Tres días antes de la cirugía, los cerdos son trasladados al centro de hospitalización para su aclimatación. Doce horas antes de la intervención quirúrgica, se retiran los alimentos. El día de la cirugía, se anestesia a los cerdos con ketamina, xilacina, diazepam e isoflurano. El pelo del dorso, el tórax y el abdomen se corta con una máquina recortadora Oster® (hoja de tamaño 30). Se marcan diez pares de secciones de 4 cm² cada una y se realizan incisiones longitudinales en la piel de 2,5 cm de espesor total con una hoja de bisturí del Núm. 11, a ambos lados de la línea media del dorso.

45 Tras el procedimiento quirúrgico, las heridas se dividen en grupos experimentales y se tratan diariamente por medio de aplicación tópica en la zona de la herida (incluidos los bordes y en la zona de la piel próxima a la herida hasta una distancia de 2 cm de la herida en todas las direcciones). Las soluciones de dosificación se aplican gradualmente en cada herida mediante el uso de una pipeta, hasta que el tejido absorba todo el volumen de tratamiento (por ejemplo, 1 mL de vehículo o compuesto de ensayo).

50 Al cabo de varias horas después del procedimiento, la incisión longitudinal se convierte en una herida elíptica debido a la elasticidad de la piel y a la actividad de los animales. Durante el experimento, se fotodocumentan las heridas y se realiza un análisis morfológico. La evaluación de la cicatrización de la herida se realiza de forma emparejada, en la que cada herida tratada con el compuesto de ensayo se compara directamente con la herida de control en la misma

localización anatómica al otro lado de la línea media del dorso. Durante los 5 días siguientes a la herida, se registran la morfología de la herida y el comportamiento de los animales.

Tabla 15. Grupos de estudio iniciales

Grupo	Número de heridas	Artículo de prueba	Dosis	Vía de administración	Calendario
1	5 heridas frontales en el lado derecho	0,02% DMSO en agua	1 ml	Tópico	Diario
2	5 heridas traseras en el lado derecho	0,067% DMSO en agua	1 ml	Tópico	Diario
3	5 heridas frontales en el lado izquierdo	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,02	3 µM	Tópico	Diario
4	5 heridas traseras en el lado izquierdo	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,067	1 µM	Tópico	Diario

5 Las soluciones de dosificación se preparan frescas cada día de dosificación. El compuesto de ensayo se suministra como polvo liofilizado y se disuelve en DMSO al 100% hasta una concentración madre de 15 mM. Se realizan nuevas diluciones en agua inyectable para alcanzar una concentración final de 3µM y 1µM para la aplicación tópica.

10 Como parte de la evaluación morfológica diaria, se realiza una fotodocumentación de las heridas mediante el uso de, por ejemplo, una cámara digital de alta resolución FinePix S700. Además del estado de la herida, se observan zonas de piel irritada y arañada. Por lo general, el rascado no causa daños en las heridas ni interfiere en el proceso de cicatrización, ya que la herida se inflige en el lomo, cerca de la línea media del dorso, de forma que al animal le resulta difícil y casi imposible alcanzar las heridas.

Evaluación de los efectos del compuesto 1 en PVPIPluronic® F-68 y del compuesto 1 en agua sobre el rascado asociado a la cicatrización de la piel en ratones.

15 En los estudios de heridas cutáneas descritos en la presente memoria descriptiva en ratones, también se observó el comportamiento de los animales, y se cuantificaron los intentos de eliminar las cicatrices, los signos de incomodidad y el rascado de la zona de la herida. Se analizaron el comportamiento anormal y las manifestaciones anómalas de rascado y signos de dolor de todos los estudios realizados en ratones. En estos estudios, el tratamiento se realizó mediante el uso del Compuesto 1 en PVP/Pluronic® F-68 y el Compuesto 1 en agua, y los respectivos controles de vehículo.

25 Durante todos los experimentos de cicatrización de heridas en ratones, se realizó un seguimiento de los parámetros de cicatrización asociados con la cicatrización de heridas, signos de irritaciones de la piel y otras afecciones de la piel en la zona cercana a la herida y en la zona de piel tratada. Además, durante la fase de tratamiento de todos los modelos de cicatrización cutánea, se prestó especial atención al comportamiento de los animales, tales como los signos de incomodidad y dolor; y los signos de rascado y manipulación de las heridas y la piel. Los efectos calmantes y tranquilizantes de los compuestos de tratamiento fueron muy evidentes en comparación con los animales de control, que estaban predispuestos a manipular sus heridas.

30 En ratones, el tratamiento con el Compuesto 1 en PVP/Pluronic® F-68 o el Compuesto 1 en agua redujo la incidencia de manipulación de heridas en comparación con los ratones tratados con vehículo (DMSO en agua, solución salina, PVP/pluronic o agua).

En ratones, la manipulación de las heridas solía provocar la eliminación de la costra y hemorragias o daños en el tejido recién formado en el lecho de la herida que estaba fuertemente adherido a la costra. La gran mayoría de estos incidentes se produjeron en los grupos tratados con vehículos (alrededor del 20 - 30% en todos los experimentos).

35 De acuerdo con el sumario de las condiciones de la piel y el comportamiento animal, puede concluirse que el tratamiento de heridas con el Compuesto 1 en PVP/Pluronic® F-68 o el Compuesto 1 en agua previno la manipulación de heridas en ratones, posiblemente, debido a algunos efectos calmantes y suavizantes de los compuestos de tratamiento sobre la piel herida e irritada.

Respuesta a la dosis de un compuesto de ensayo en la cicatrización de heridas cutáneas en ratones

40 Los efectos de un compuesto de ensayo sobre la cicatrización de heridas cutáneas pueden estudiarse en un modelo de herida por incisión cutánea longitudinal de espesor total en ratones. A su llegada, los animales se identifican por medio de crotales, se pesan y se dejan aclimatar durante varios días antes de iniciar el experimento. El día de la herida, se pesan los ratones y se dividen en 7 grupos experimentales (N=6 o N=7), de acuerdo con una aleatorización

estratificada por diferencias de peso. El grupo vehículo recibe DMSO al 0,1% en agua, mientras que el grupo de control positivo se trata con una solución acuosa de Pluronic® F-68 al 0,6% p/v y PVP K-29/32 al 0,6% p/v. Antes del procedimiento quirúrgico, se anestesia a los ratones con isoflurano y se les recorta el pelo del lomo. Se realizan incisiones longitudinales de espesor total de 20 mm mediante el uso de una hoja de bisturí estándar en el lomo de los animales (paralelas a la columna vertebral). Tres horas después de la herida, debido a la elasticidad de la piel y a la actividad de los animales, las incisiones adoptan formas elípticas. En esta fase, se mide la zona más ancha de la herida para establecer una anchura de referencia de la herida. La evaluación de la cicatrización de la herida se realiza midiendo la zona más ancha de la herida. El tratamiento de las heridas se realiza por medio de la aplicación tópica (diaria) de soluciones dosificadoras (por ejemplo, 0,2 ml) directamente sobre las heridas.

10 **Tabla 16. Grupos de estudio iniciales**

Grupo	Número de ratones	Artículo de prueba	Dosis	Vía de administración	Horario
1	7	0,1% DMSO en agua	0,2 ml	Tópico	Diario
2	6	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,1	9 µM	Tópico	Diario
3	6	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,1	3 µM	Tópico	Diario
4	6	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,1	1 µM	Tópico	Diario
5	6	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,1	0,3 µM	Tópico	Diario
6	7	Control acuoso 0,6% p/v Pluronic® F-68 y 0,6% p/v PVP K-29/32	0,2 ml	Tópico	Diario

Las soluciones de dosificación se preparan frescas cada día de dosificación. El compuesto de ensayo se suministra como polvo liofilizado y se reconstituye en DMSO al 0,1% en agua hasta obtener una suspensión madre de 3 mg/mL. La suspensión madre se diluye de nuevo con DMSO al 0,1% en agua para preparar la solución tópica final. Las heridas de los grupos de control se tratan tópicamente con DMSO al 0,1% en agua, o con una solución acuosa de Pluronic® F-68 al 0,6% p/v y PVP K-29/32 al 0,6% p/v.

Al final del experimento, 8 días después de la herida, los ratones se sacrifican por inhalación de CO₂, se miden las anchuras de las heridas y se recogen biopsias de la zona de la herida que se someten a análisis histológico. Las biopsias se fijan con paraformaldehído al 4%. Tras la fijación de toda la zona de la herida, se realiza una disección de 5 mm de la zona más ancha de la herida y estas muestras se someten a incrustación en parafina. Los bloques de parafina se preparan mediante el uso de procedimientos estándar de deshidratación graduada e inclusión en parafina de los tejidos. A continuación, se preparan secciones histológicas y se tiñen los tejidos con la tinción de hematoxilina y eosina (H&E). Se examinan los portaobjetos teñidos con H&E y se evalúa la eficacia de la cicatrización.

El cierre dérmico avanzado se evalúa en el Día 8 por medio del examen de la dermis sana teñida con eosina y los bordes de dermis recién formados en la brecha de la herida. Las heridas con ambos bordes dérmicos observados en el campo de aumento 100x del microscopio (BX41 Olympus o Axiovert 25, Zeiss) se consideran positivas para el parámetro de cicatrización de cierre dérmico avanzado. El número de heridas con cierre dérmico avanzado se presenta como porcentaje del total de heridas en los grupos experimentales.

El cierre epidérmico avanzado se evalúa en el Día 8 por medio de tinción de H&E analizando la sección histológica en la zona más ancha de la herida. Las heridas que muestran la presencia de una capa continua de epidermis que cubre todo el hueco de la herida y las heridas con la migración más avanzada de los bordes epidérmicos observada en el campo del microscopio a 400 aumentos se consideran positivas al parámetro de cierre epidérmico avanzado. Los resultados se presentan como porcentaje del total por grupo experimental.

La migración epidérmica se evalúa el Día 8 por medio de tinción de H&E analizando la epidermis condensada recién formada teñida con hematoxilina en ambos bordes de la herida. Se considera que el borde epidérmico es migratorio cuando el borde epidérmico recién formado cubre aproximadamente el 20-30% del hueco de la herida. Los bordes epidérmicos migratorios de los grupos se cuentan y se presentan como porcentaje del número total de bordes epidérmicos (el doble del número de heridas del grupo). Ambos bordes epidérmicos se consideran migratorios en heridas que presentaban un cierre epidérmico completo o avanzado. Se realizan un total de 62 heridas en 62 ratones.

El tratamiento de las heridas con un compuesto de prueba previene las complicaciones de la cicatrización, tales como la hiperplasia de la epidermis y las adherencias.

Los efectos de un compuesto de ensayo sobre la cicatrización de heridas cutáneas pueden estudiarse en un modelo de herida por incisión cutánea longitudinal de espesor total en ratones. Antes del procedimiento quirúrgico, se anestesia a los ratones con isoflurano y se les afeita el lomo. Se realizan incisiones longitudinales de espesor total de 20 mm con una hoja de bisturí en el lomo (paralelas a la columna vertebral) de los animales. Tres horas después de la herida, debido a la elasticidad de la piel y a la actividad de los animales, las incisiones adoptan formas elípticas. La evaluación de la cicatrización de la herida se realiza midiendo la zona más ancha de la herida. El tratamiento de las heridas se realiza por medio de la aplicación tópica diaria de, por ejemplo, 0,2 mL del compuesto de ensayo directamente sobre las heridas. El proceso de cuidado de las heridas se desarrolla parcialmente en un entorno húmedo: después de cada tratamiento diario, las heridas permanecen húmedas durante algún tiempo. Al final del experimento, 8 días después de la herida, se sacrifica a los ratones, se mide la anchura de la herida y se recogen biopsias de la zona de la herida que se someten a análisis histológico.

Tabla 17. Grupos de estudio iniciales

Grupo	Número de ratones	Artículo de prueba	Dosis	Vía de administración	Horario
1	7	0,1% DMSO en agua	0,2 ml	Tópico	Diario
2	6	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,1	3 µM	Tópico	Diario
3	6	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,1	1 µM	Tópico	Diario
4	7	Control acuoso 0,6% p/v Pluronic® F-68 y 0,6% p/v PVP K-29/32	0,2 ml	Tópico	Diario

Las soluciones de dosificación se preparan frescas cada día de dosificación. El compuesto de ensayo se suministra como polvo liofilizado y se reconstituye en DMSO al 0,1% en agua hasta obtener una suspensión madre de 3 mg/mL, que posteriormente se diluye con DMSO al 0,1% en agua para alcanzar una concentración de trabajo para aplicación tópica. Las heridas de los grupos de control se tratan tópicamente con DMSO al 0,1% en agua o Pluronic® F-68 acuoso al 0,6% p/v y PVP K-29/32 al 0,6% p/v.

Al final de la fase de tratamiento, el día 8 después de la herida, los ratones se sacrifican por inhalación de CO₂ y se recogen biopsias de la zona de la herida. La fijación de los tejidos de la herida se realiza con paraformaldehído al 4%. Tras la fijación de toda la zona de la herida, se realiza una disección de 5 mm de la zona más ancha de la herida y se somete a incrustación en parafina. Los bloques de parafina se preparan mediante el uso de procedimientos estándar de deshidratación graduada. A continuación, se preparan secciones histológicas y los tejidos se tiñen con hematoxilina y eosina (H&E). Se evalúan y representan gráficamente los parámetros de cicatrización de las heridas.

La hiperplasia de la epidermis se evalúa el día 8. Se cuentan los bordes epidérmicos no migratorios e hiperplásicos del grupo y se presentan como porcentaje del número total de bordes epidérmicos (el doble del número de heridas del grupo). Los bordes epidérmicos hiperplásicos se evalúan por medio de tinción de H&E analizando las zonas de la epidermis teñidas con hematoxilina condensada. Cuando el borde epidérmico parece más grueso que la epidermis normal en una zona de piel sana y cuando tal borde epidérmico no muestra migración hacia el sellado de la brecha de la herida, se considera que es hiperplásico y no migratorio.

Las adherencias en la brecha de la herida se evalúan el día 8. Las adherencias se evalúan analizando las estructuras celulares y tisulares en la brecha de la herida. Las adherencias de la herida se puntúan en una escala leve, moderada o grave. Se considera una puntuación negativa cuando hay un coágulo en la brecha de la herida o el tejido de granulación normal está sustituido por otro tejido, tal como músculos esqueléticos o tejidos linfoides extensos. Se consideran graves varias adherencias o una granulación anormal que ocupe más del 40% de la superficie de la brecha de la herida. La adherencia se considera leve cuando no es significativa y no interfiere con la renovación normal del tejido cutáneo. Las heridas con adherencias graves se calculan como porcentaje del total de heridas por grupo experimental y se representan gráficamente como se muestra. Se realiza un total de 32 heridas (64 bordes epidérmicos) en 32 ratones.

Una de las complicaciones más importantes de la cicatrización de heridas es la hiperplasia de la epidermis. Como respuesta a las señales de estrés asociadas a las heridas, se produce una proliferación de células en la capa basal de la epidermis para compensar la pérdida de piel. Normalmente, en la cicatrización de heridas sin complicaciones, las células epidérmicas inician la migración hacia el sellado de la brecha de la herida poco después de la proliferación. Cuando la migración no se produce o se ralentiza, por ejemplo, en las complicaciones cutáneas causadas por la hiperglucemia en las heridas diabéticas, la hiperplasia epidérmica se vuelve prominente y puede causar aún más complicaciones en la cicatrización de las heridas. En las heridas abiertas agudas, como en el modelo empleado en este experimento, o en las heridas agudas suturadas, tales como las heridas posquirúrgicas, una disminución de la cicatrización epidérmica asociada a la hiperplasia de los bordes epidérmicos aumenta el riesgo de contaminación y otras complicaciones de la cicatrización de la herida, tales como la dehiscencia de la herida, el drenaje de líquido de la herida o el tejido que sobresale de la herida.

En un proceso eficaz de cicatrización de heridas, el coágulo sanguíneo primario experimenta cambios graduales con el fin de formar tejido de granulación en la brecha de la herida, el cual, tras su remodelación, se convierte finalmente en tejido cutáneo recién formado con funciones totalmente restauradas. Cuando se produce la adhesión de tejidos no relacionados con la piel en la brecha de la herida, el tejido de granulación no se forma correctamente y, en consecuencia, la remodelación tisular final es limitada. Esto puede causar más limitaciones en las funciones de la piel cicatrizada.

El tratamiento de heridas con un compuesto de prueba en una formulación de base salina mejora la cicatrización de las heridas y previene las adherencias graves

Los efectos de un compuesto de ensayo sobre la cicatrización de heridas cutáneas se estudiaron en un modelo de herida por incisión cutánea longitudinal de espesor total en ratón. Los procedimientos quirúrgicos se realizan en ratones macho C57BL de 7-8 semanas de edad anestesiados con isoflurano. Antes del procedimiento quirúrgico, se anestesia a los ratones con isoflurano y se les corta el pelo. Se realizan incisiones longitudinales de espesor total de 20 mm mediante el uso de una hoja de bisturí estándar. Tres horas después de la herida, debido a la elasticidad de la piel y a la actividad de los animales, las incisiones adoptan formas elípticas. En esta fase, se mide la zona más ancha de la herida para establecer una anchura de referencia de la herida. La evaluación de la cicatrización de la herida se realiza midiendo la zona más ancha de la herida. El tratamiento de las heridas se realiza por medio de la aplicación diaria de una solución tópica de 0,2 ml directamente sobre la herida. El proceso de cuidado de heridas se lleva a cabo parcialmente en un entorno húmedo, ya que después de cada tratamiento diario, las heridas permanecen húmedas durante algún tiempo (3-5 horas). Al final del experimento, 8 días después de la herida, se sacrifica a los ratones, se mide la anchura de la herida y se recogen biopsias de la zona de la herida que se someten a análisis histológico.

Tabla 18. Grupos de estudio iniciales

Grupo	Número de ratones	Artículo de prueba	Dosis	Vía de administración	Horario
1	5	Salina	0,2 ml	Tópico	Diario
2	7	Compuesto de ensayo en solución salina	3 μ M	Tópico	Diario

Las soluciones de dosificación se preparan frescas cada día de dosificación. El compuesto de ensayo se suministra en forma de polvo liofilizado y se reconstituye en solución salina para obtener una suspensión madre de 3 mg/mL, que posteriormente se diluye con solución salina para alcanzar una concentración de trabajo de 3 μ M para aplicación tópica. Las heridas de los grupos de control se tratan tópicamente con solución salina.

Al final de la fase de tratamiento, 8 días después de la herida, los ratones se sacrifican por inhalación de CO₂ y se recogen biopsias de la zona de la herida. La fijación de los tejidos de la herida se realiza con paraformaldehído al 4%. Tras la fijación de toda la zona de la herida, se realiza una disección de 5 mm de la zona más ancha de la herida y la zona disecada se somete a incrustación en parafina. Los bloques de parafina se preparan mediante el uso de procedimientos estándar de deshidratación graduada. A continuación, se preparan secciones histológicas y los tejidos se tiñen con hematoxilina y eosina (H&E). Se evalúan y representan gráficamente los parámetros de cicatrización de las heridas.

El cierre epidérmico se evalúa por medio de tinción de H&E analizando secciones histológicas en la zona más ancha de la herida. Se consideran positivas para el parámetro de cierre epidérmico avanzado las heridas que muestran la presencia de una capa continua de epidermis que cubre toda la brecha de la herida, y las heridas con la migración más avanzada de los bordes epidérmicos cuando ambos bordes se observaron en el campo del microscopio con un aumento de 400x. Los resultados se presentan como porcentaje del total por grupo experimental.

La cicatrización dérmica se evalúa por medio del examen de la dermis sana teñida con eosina y los bordes de dermis recién formados en la brecha de la herida. Las heridas con ambos bordes dérmicos observados en el campo de aumento 100x del microscopio (BX41 Olympus o Axiovert 25, Zeiss) se consideran positivas para el parámetro de cicatrización de cierre dérmico avanzado. El número de heridas con cierres dérmicos avanzados se presenta como porcentaje del total de heridas en los grupos experimentales.

El tejido de granulación se evalúa mediante el uso de tinción de H&E. Cuando el coágulo primario de fibrina es sustituido por tejido conectivo fibroso que contiene adipocitos, nuevos capilares y un infiltrado que contiene células linfoides, macrófagos y células plasmáticas, el tejido de granulación se considera precoz. El tejido de granulación temprano sustituido por tejido con gran abundancia de fibroblastos y fibras de colágeno se considera avanzado. En general, las áreas de tejido de granulación avanzado en la brecha de la herida se documentan como porcentaje del área total de la brecha de la herida. Se considera positiva para este parámetro una brecha de la herida que muestre una formación avanzada de tejido de gr por ejemplo anulación que cubra el 40% de la brecha de la herida. Los resultados se calculan como porcentaje del total de heridas por grupo.

Las adherencias se evalúan analizando las estructuras celulares y tisulares en la brecha de la herida. Las adherencias de la herida se puntúan en una escala leve, moderada o grave. Se considera una puntuación negativa cuando hay un coágulo en la brecha de la herida o el tejido de granulación normal está sustituido por otro tejido, tal como músculos esqueléticos o tejidos linfoides extensos. Se consideran graves varias adherencias o una granulación anormal que ocupe más del 40% de la superficie de la brecha de la herida. La adherencia se considera leve cuando no es significativa y no interfiere con la renovación normal del tejido cutáneo. Las heridas con adherencias graves se calculan como porcentaje del total de heridas por grupo experimental. Se realizaron 19 heridas (38 bordes epidérmicos) en 19 ratones.

Evaluación de los efectos de la aplicación tópica de un compuesto de ensayo sobre el proceso de cicatrización y la formación de cicatrices en las últimas fases de la cicatrización de heridas en piel de cerdo

Se estudian los efectos de un compuesto de ensayo en las fases tardías de la cicatrización de heridas cutáneas en un modelo de herida porcina de incisión longitudinal de espesor total. El día de la cirugía, se anestesia al cerdo con ketamina, xilacina, diazepam e isoflurano. Se corta el pelo del dorso torácico y del abdomen y se realizan 10 pares de incisiones longitudinales en la piel de 2,5 cm de espesor total con una hoja de bisturí Núm. 11, a 4 cm de cada lado de la línea media del dorso. Tras el procedimiento quirúrgico, las heridas se dividen en grupos experimentales y se tratan diariamente por medio de aplicación tópica en la zona de la herida y en los bordes de la herida, incluido el tratamiento de la piel próxima a la zona de la herida hasta una distancia de 2 cm de la herida en todas las direcciones. Las soluciones dosificadoras se aplican gradualmente sobre cada herida mediante el uso de una pipeta, hasta que el tejido absorba todo el volumen de tratamiento (por ejemplo, 1 mL de vehículo o de compuesto de ensayo). La piel próxima a la herida se trata con una gasa empapada en el compuesto de ensayo o en la solución vehículo.

Durante el experimento, se fotodocumentan las heridas y se realiza un análisis morfológico. Al final de la fase de tratamiento (día 19 tras la herida), se sacrifica a los cerdos por medio de una dosis de anestésico y KCl. Se examina la morfología de las heridas, se documentan fotográficamente y se toman biopsias de la zona de la herida para su fijación y posterior análisis morfológico e histológico.

Tabla 19. Grupos de estudio iniciales

Grupo	Número de heridas	Artículo de prueba	Dosis	Vía de administración	Horario
1	5 heridas frontales en el lado derecho	0,02% DMSO en agua	1 ml	Tópico	Diario
2	5 heridas traseras en el lado derecho	0,067% DMSO en agua	1 ml	Tópico	Diario
3	5 heridas frontales en el lado izquierdo	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,02	3 µM	Tópico	Diario
4	5 heridas traseras en el lado izquierdo	Compuesto de ensayo en DMSO al 0,067	1 µM	Tópico	Diario

Las soluciones de dosificación se preparan frescas cada día de dosificación. El compuesto de ensayo se suministra como polvo liofilizado y se disuelve en DMSO al 100% para preparar una solución madre de 15 mM. Posteriormente, se realizan diluciones en agua inyectable para alcanzar concentraciones finales de 3µM y 1µM para aplicación tópica.

Al final de la fase de tratamiento (día 19 postherida), se realiza la evaluación de la cicatrización de la herida. Las heridas completamente cicatrizadas se indican como porcentaje del total de heridas por grupo. También se informa de la anchura media de las cicatrices en las heridas que cicatrizaron completamente y mostraron un desprendimiento completo de la costra. Se midieron las cicatrices (mm) y se calcularon la anchura media de las cicatrices y la desviación estándar. Se realizaron un total de 20 heridas.

Al final de la fase de tratamiento (día 19 después de la herida), se sacrifica a los cerdos por medio de una sobredosis de anestésico y KCl y se recogen biopsias de la zona de la herida. La fijación de las biopsias de heridas se realiza con paraformaldehído al 4%. Tras la fijación, las biopsias de las heridas se documentan fotográficamente mediante el uso de, por ejemplo, una cámara digital FinePix S700 con la máxima resolución.

Bibliografía

Cronshaw JM y Matunis MJ. 2004. El complejo de poros nucleares: asociaciones de enfermedades y correlaciones funcionales TRENDS Endocrin Metab. 15:34-39

Falini B et al. 2006. Tanto el motivo SEN carboxi-terminal como el(los) triptófano(s) mutado(s) son cruciales para la exportación nuclear aberrante de los mutantes leucémicos nucleofosmina en la LMA NPMc+ Blood. 107:4514-4523.

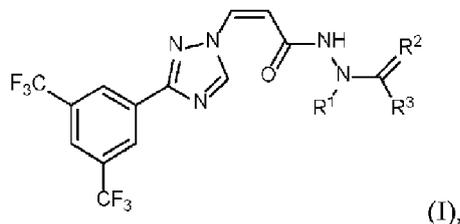
- Cai X y Liu X. 2008. La inhibición de la fosforilación de Thr-55 restaura la localización nuclear de p53 y sensibiliza a las células cancerosas al daño del ADN. *PNAS*. 105:16958-16963.
- Daelemans D, Afonina E, Nilsson J 2002 Un inhibidor sintético del VIH-1 Rev que interfiere con la exportación nuclear mediada por CRM1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(22):14440-5.98052-2517.
- 5 Davis JR et al. 2007. Controlling protein compartmentalization to overcome disease *Pharmaceut Res*. 24:17-27.
- Freundt E, Yu L, Park E, et al 2009 Molecular determinants for subcellular localization of the severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame 3b protein. *J Virol* 83(13):6631-40.
- Ghildyal R, Ho A, Dias M, et al 2009 La proteína matriz del virus respiratorio sincitial posee un mecanismo de exportación nuclear mediado por Crm1. *J Virol* 83(11):5353-62.
- 10 Ghosh CC et al 2008 Analysis of nucleocytoplasmic shuttling of NF kappa B proteins in human leukocytes. *Methods Mol Biol*. 457:279-92.
- Gupta N et al 2008 Retinal tau pathology in human glaucomas. *Can J Ophthalmol*. 2008 Feb;43(1):53-60.
- Hoshino L et al. 2008. Efectos combinados de la terapia génica con p53 y leptomicina B en el carcinoma humano de células escamosas de esófago. *Oncología*. 75:113-119.
- 15 Lain S et al. 1999a Un inhibidor de la exportación nuclear activa la respuesta de p53 e induce la localización de HDM2 y p53 en cuerpos nucleares U1A-positivos asociados a los PODs *Exp Cell Res*. 248:457-472.
- Lain S et al. 1999b. Acumulación de p53 activo en el núcleo por medio de la inhibición de la exportación nuclear: una estrategia novedosa para promover la función supresora tumoral de p53 *Exp Cell Res*. 253:315.
- Muller PA et al. 2009 El transporte nuclear-citosólico de COMMD1 regula la actividad de NF-kappaB y HIF-1. *Traffic* 10(5):514-27.
- 20 Mutka S 2007 Nuclear Export Inhibitors (NEIs) as novel cancer therapies *AACR Annual Meeting*. Poster 5609.
- Mutka S, Yang W, Dong S, et al. 2009. Identificación de inhibidores de la exportación nuclear con potente actividad anticancerígena in vivo. *Cancer Res*. 69: 510-7.
- 25 Nakahara J et al. 2009. Expresión anómala de TIP30 y detención del transporte nucleocitoplasmático en células precursoras de oligodendrocitos en la esclerosis múltiple *J Clin Invest*. 119:169-181.
- Noske A et al. 2008. La expresión de la proteína de exportación nuclear chromosomal region maintenance/exportin 1/Xpo1 es un factor pronóstico en el cáncer de ovario humano. *Cáncer*. 112:1733-1743.
- Pollard V & Malim M. 1998 The HIV-1 Rev protein *Annu Rev Microbiol* 52:491-532.
- 30 Rawlinson S, Pryor M, Wright P, Jans D 2009 CRM1-mediated nuclear export of dengue virus RNA polymerase NS5 modulates interleukin-8 induction and virus production. *J Biol Chem* 284(23):15589-97.
- Sanchez V, Mahr J, Orazio N, et al 2007 Nuclear export of the human cytomegalovirus tegument protein pp65 requires cyclin-dependent kinase activity and the Crm1 exporter. *J Virol* 81(21):11730-6..
- Sorokin AV et al. 2007. Transporte nucleocitoplasmático de proteínas . *Biochemistry* 72:1439-1457.
- 35 Terry LJ et al. 2007. Cruzando la envoltura nuclear: regulación jerárquica del transporte nucleocitoplasmático. *Science* 318:1412-1416.
- Van der Watt PJ et al. 2008. Las proteínas Carioferina, Crm1 y Carioferina beta1, se sobreexpresan en el cáncer de cuello de útero y son fundamentales para la supervivencia y proliferación de las células cancerosas. *Int J Canc*. 124:1829-1840.
- 40 Walsh MD et al. 2008 La inhibición de la exportina 1 atenúa la expresión génica dependiente del factor nuclear-kappaB. *Shock* 29:160-166.
- Williams P, Verhagen J, Elliott G 2008 Caracterización de una señal de exportación nuclear dependiente de CRM1 en la terminación C de la proteína UL47 del tegumento del virus del herpes simple tipo 1. *J Virol* 82(21):10946-52.
- Yang W 2007 Anti-tumor activity of novel nuclear export inhibitors (NEIs) in multiple murine leukemia models. Reunión anual de la AACR. Poster 5597.
- 45 Yao Y et al. 2009. La expresión de CRM1 se asocia con el pronóstico en el osteosarcoma humano. *Oncol Rep*. 21:229-35.

Zimmerman TL et al 2006 Nuclear export of retinoid X receptor alpha in response to interleukin-1beta-mediated cell signaling: roles for JNK and SER260. J Biol Chem281:15434-15440.

5 Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a realizaciones de ejemplo de la misma, se entenderá por los expertos en la materia que pueden realizarse en la misma diversos cambios de forma y detalles sin apartarse del alcance de la invención abarcado por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una forma de dosificación oralmente aceptable que comprende un compuesto de fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del mismo, en el que:

5 R¹ se selecciona entre hidrógeno y C₁-C₄ alquilo;

R² se selecciona entre O y S; y

R³ se selecciona de -N(R⁴)-(C₃-C₆ cicloalquilo), -C₁-C₆ alquilo, -(C₀-C₄ alquilen)-heterociclo, y -(C₀-C₄ alquilen)-heteroarilo, en el que cualquier porción de alquilo, alquilen, heterociclo y heteroarilo de R³ está opcional e independientemente sustituida; y

10 R⁴ se selecciona entre hidrógeno y C₁-C₄ alquilo; y

un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

2. La forma de dosificación oralmente aceptable de la reivindicación 1, en la que:

R² es O; y

15 R³ se selecciona de entre C₁-C₆ alquilo, (C₀-C₄ alquilen)-heterociclo, y (C₀-C₄ alquilen)-heteroarilo, en el que cualquier porción heteroarilo de R³ está sin sustituir o sustituida independientemente con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en -OH, -SH, nitro, halógeno, amino, ciano, C₁-C₁₂ alquilo, C₂-C₁₂ alquilenilo, C₂-C₁₂ alquiniilo, C₁-C₁₂ alcoxi, C₁-C₁₂ haloalquilo, C₁-C₁₂ haloalcoxi y C₁-C₁₂ alquilsulfanilo; y

en la que cualquier porción de alquilo, alquilen o heterociclo de R³ no está sustituida o

20 sustituido independientemente con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en oxo, -OH, -SH, nitro, halógeno, amino, ciano, C₁-C₁₂ alquilo, C₂-C₁₂ alquilenilo, C₂-C₁₂ alquiniilo, C₁-C₁₂ alcoxi, C₁-C₁₂ haloalquilo, C₁-C₁₂ haloalcoxi y C₁-C₁₂ alquil sulfanilo.

3. La forma farmacéutica oralmente aceptable de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en la que

R² es O; y

25 R³ es -C₁-C₆ alquilo, en el que R³ es opcional e independientemente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en -OH, -SH, nitro, halógeno, amino, ciano, C₁-C₁₂ alquilo, C₂-C₁₂ alquilenilo o C₂-C₁₂ grupo alqueniilo, C₁-C₁₂ alcoxi, C₁-C₁₂ haloalquilo, C₁-C₁₂ haloalcoxi y C₁-C₁₂ alquilo sulfonilo.

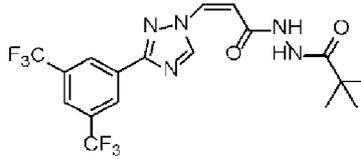
4. La forma de dosificación oralmente aceptable de la reivindicación 1, en la que el compuesto está representado por cualquiera de las fórmulas estructurales que se exponen a continuación:

Núm. Cmpd	Estructura del compuesto	Núm. Cmpd	Estructura del compuesto
1		9	
2		10	

3		11	
4		12	
5		13	
6		14	
7		15	
8			

o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. La forma de dosificación oralmente aceptable de la reivindicación 4, en la que el compuesto se selecciona de cualquiera de los compuestos 1, 2, 3, 4, 8, 11, 12 y 13 o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 5 6. La forma de dosificación oralmente aceptable de la reivindicación 4 o de la reivindicación 5, en la que el compuesto es el compuesto 1 o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.
7. La forma de dosificación oralmente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la forma de dosificación oralmente aceptable es una cápsula, un comprimido, una pastilla, una pastilla, una suspensión acuosa, una forma microencapsulada o una solución acuosa.
- 10 8. La forma de dosificación oralmente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la forma de dosificación oralmente aceptable comprende una forma de dosificación de liberación inmediata.
9. La forma de dosificación oralmente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la forma de dosificación oralmente aceptable comprende una forma de dosificación de liberación sostenida.
10. La forma de dosificación oralmente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la forma de dosificación oralmente aceptable comprende una forma de dosificación de liberación retardada.
- 15 11. La forma de dosificación oralmente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que el compuesto es



o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 12. La forma de dosificación oralmente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que padece una herida o un trastorno seleccionado entre un trastorno proliferativo, un trastorno de la angiogénesis, un trastorno inflamatorio, un trastorno autoinmune, una infección viral, un trastorno oftalmológico, un trastorno neurodegenerativo, un trastorno del crecimiento anormal de los tejidos, un trastorno de la ingesta de alimentos, una alergia, un accidente cerebrovascular, una lesión cerebral traumática y un trastorno respiratorio.
- 10 13. La forma de dosificación oralmente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en un procedimiento de tratamiento del lupus, la esclerosis múltiple, una distrofia muscular o la esclerosis lateral amiotrófica.
- 15 14. La forma de dosificación oralmente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en un procedimiento de tratamiento del lupus.
- 15 15. La forma de dosificación oralmente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en un procedimiento de tratamiento de la esclerosis múltiple.
16. La forma de dosificación oralmente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un cáncer.
17. La forma de dosificación oralmente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en un procedimiento de tratamiento de una distrofia muscular.
- 20 18. La forma de dosificación oralmente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en un procedimiento de tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica.
19. La forma de dosificación oralmente aceptable de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en un procedimiento de tratamiento de la lesión cerebral traumática.

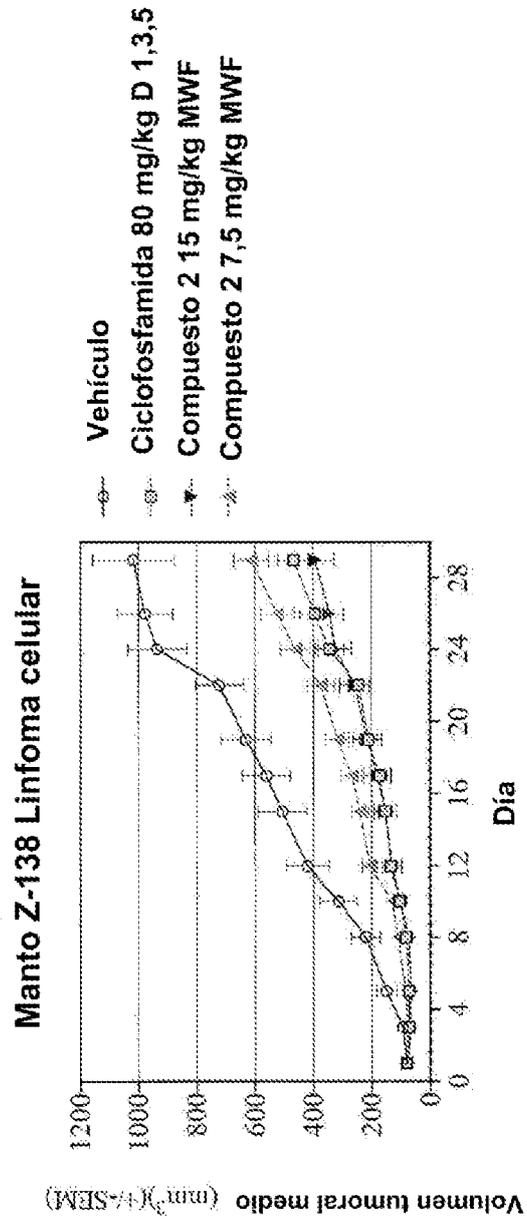


FIG. 1

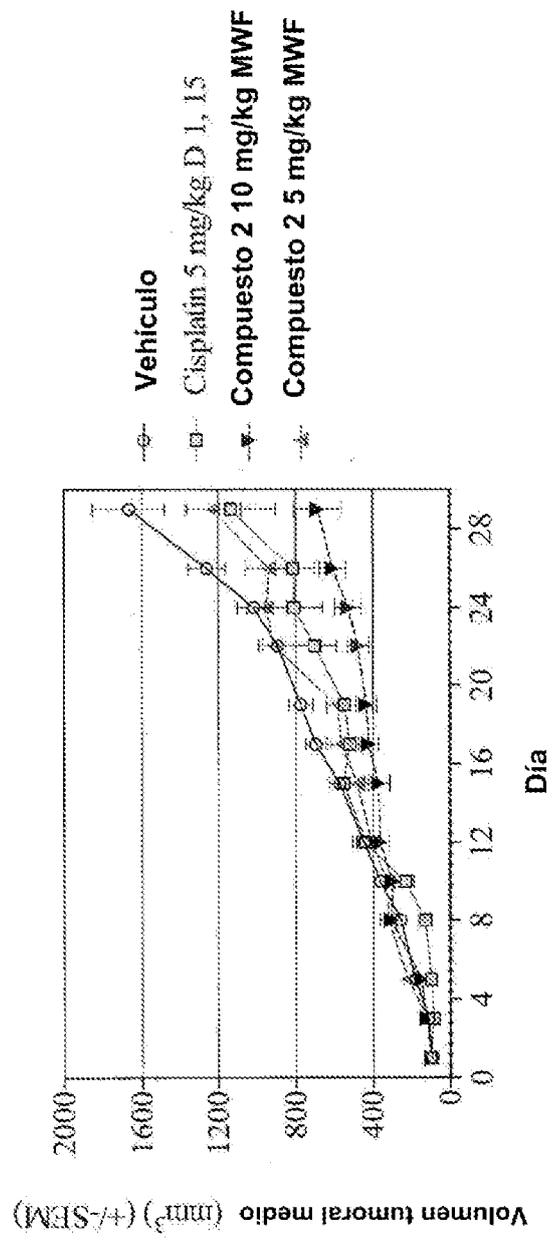


FIG. 2

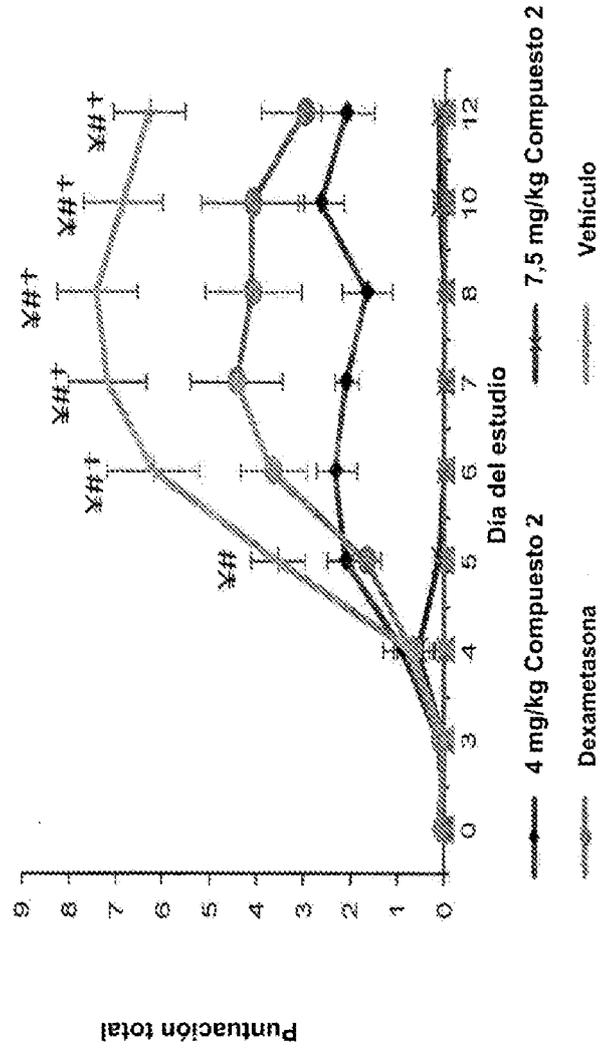


FIG. 3A

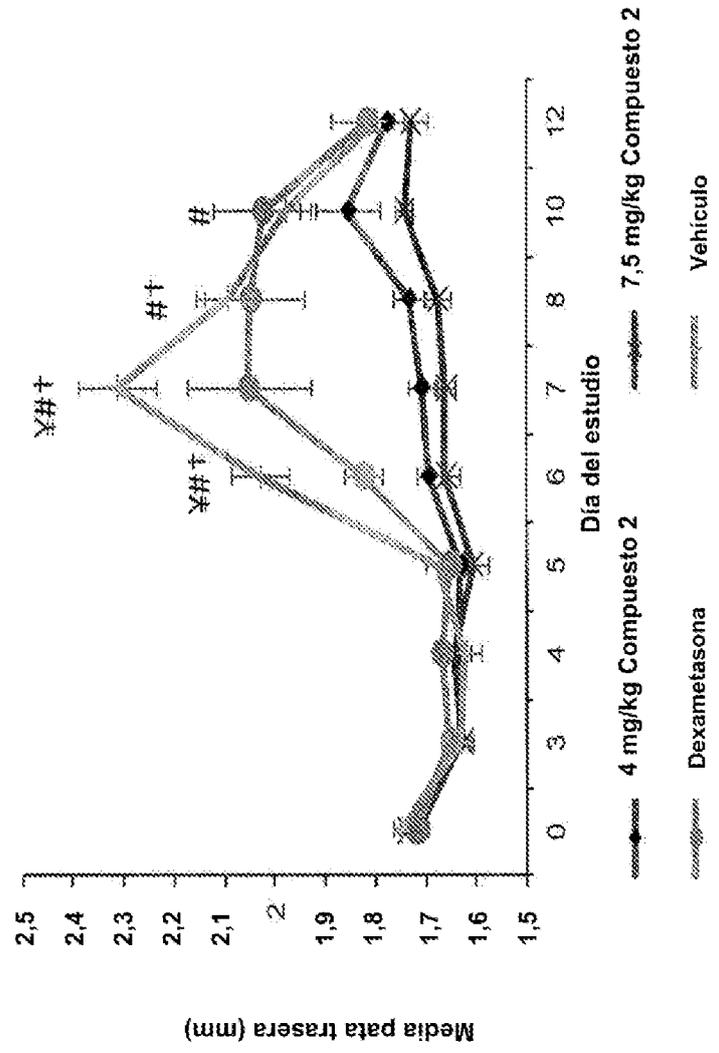


FIG. 3B

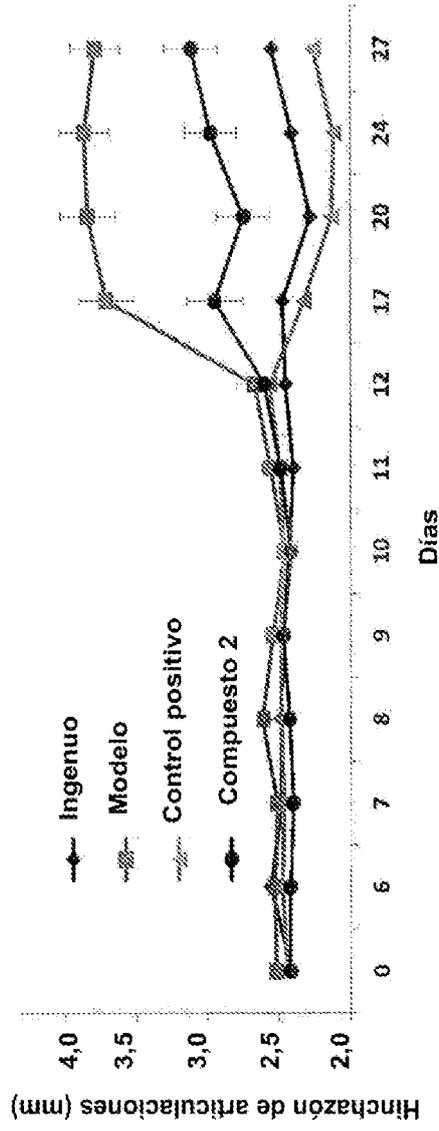


FIG. 4A

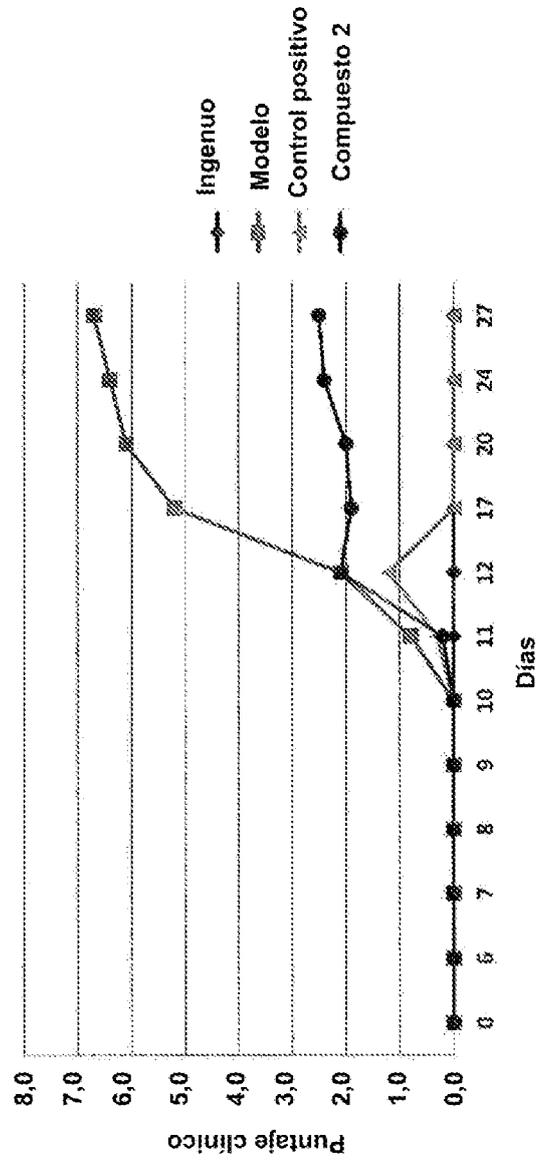


FIG. 4B

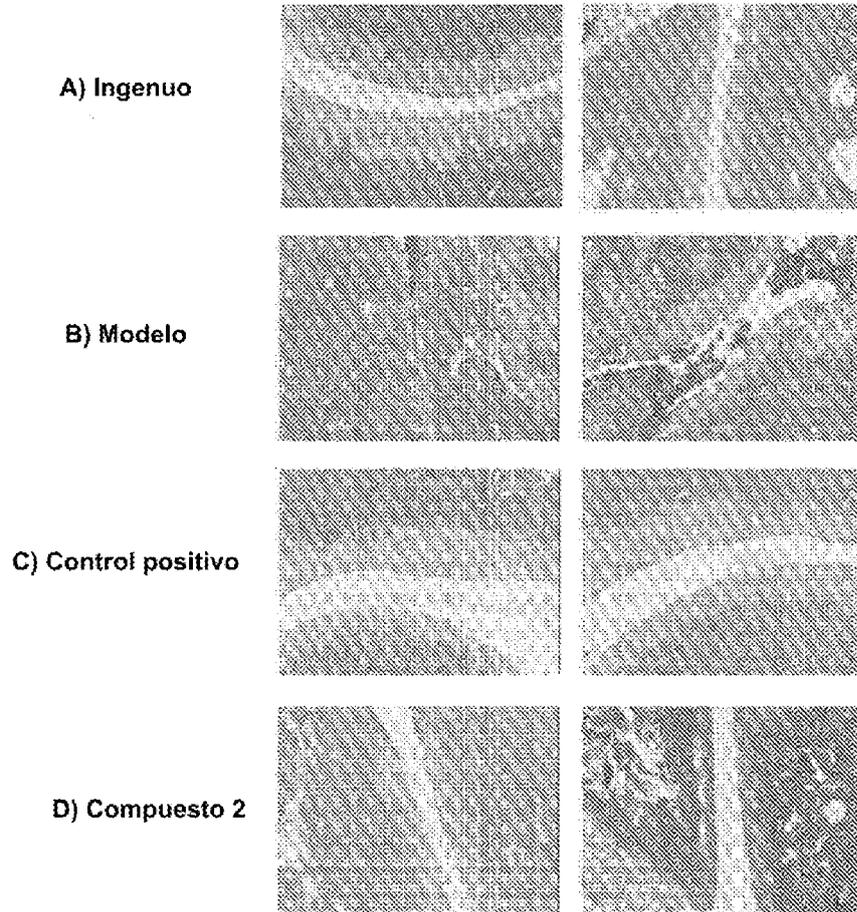


FIG. 5

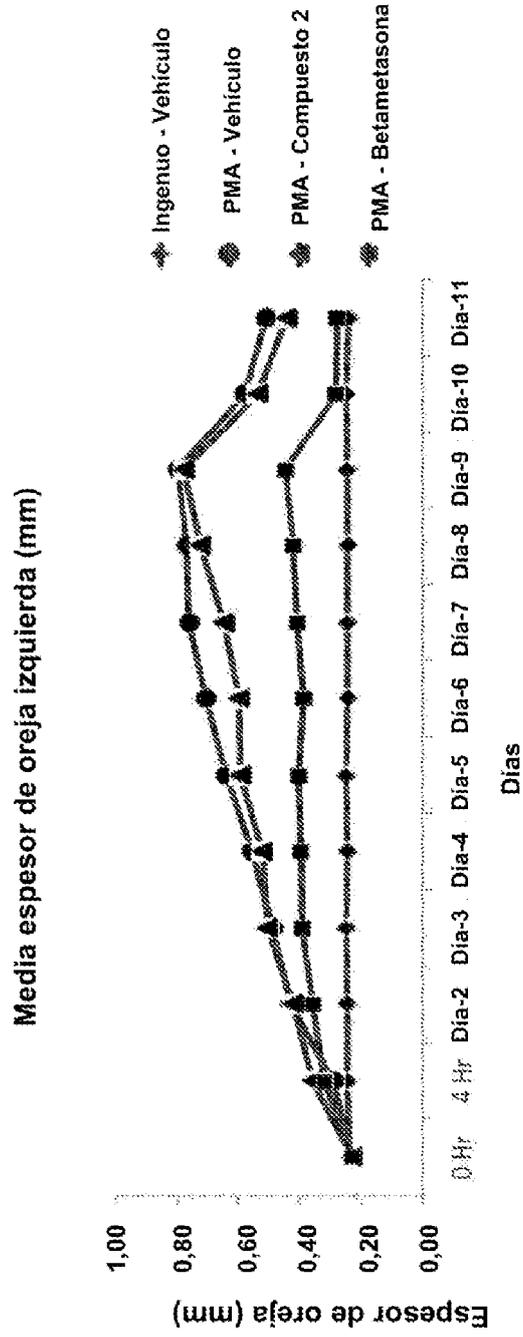


FIG. 6A

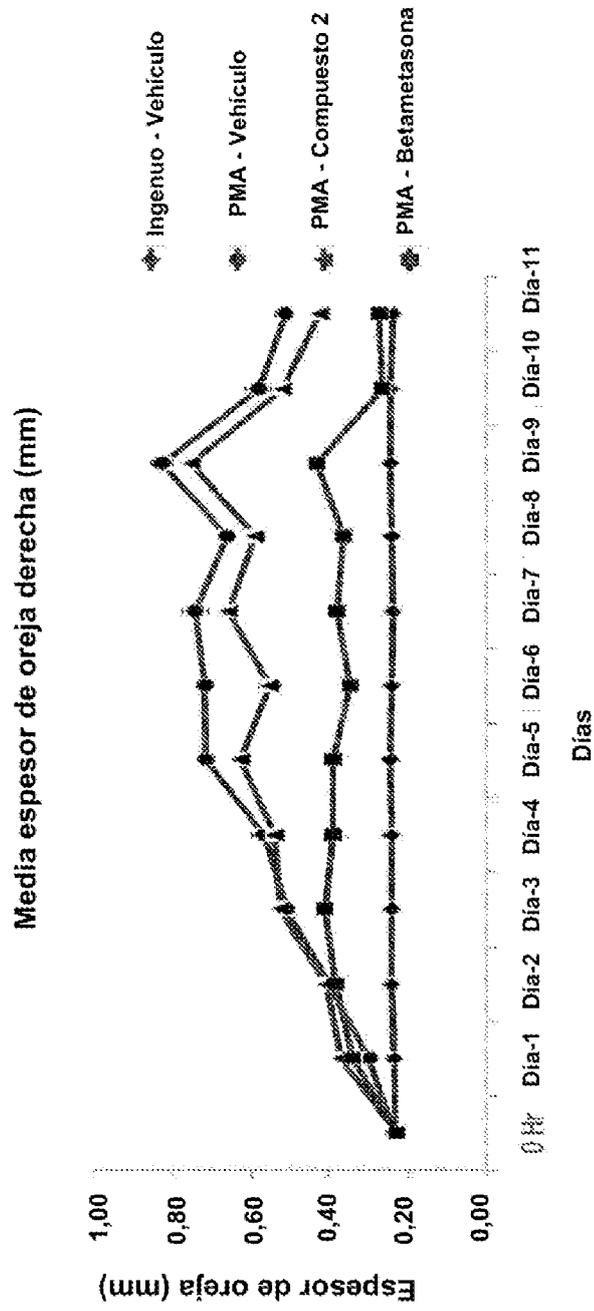


FIG. 6B

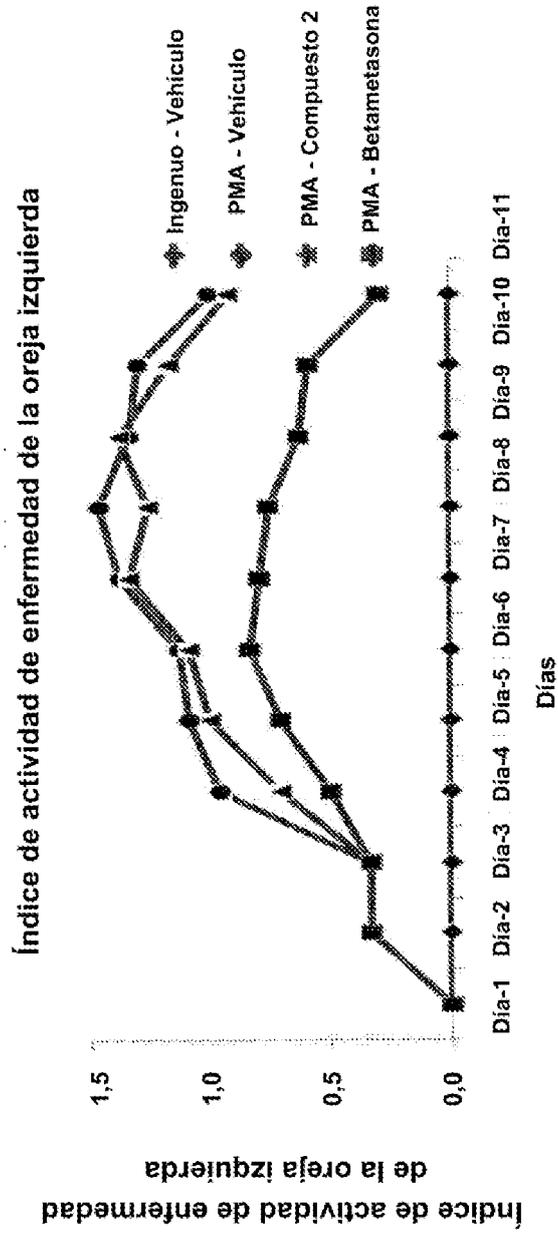


FIG. 6C

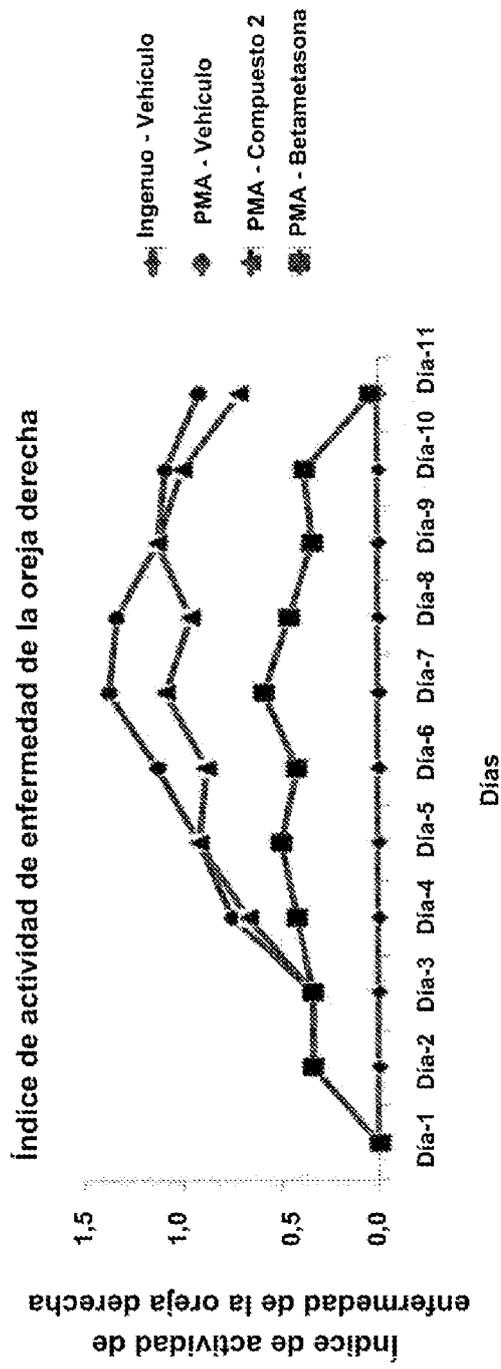


FIG. 6D

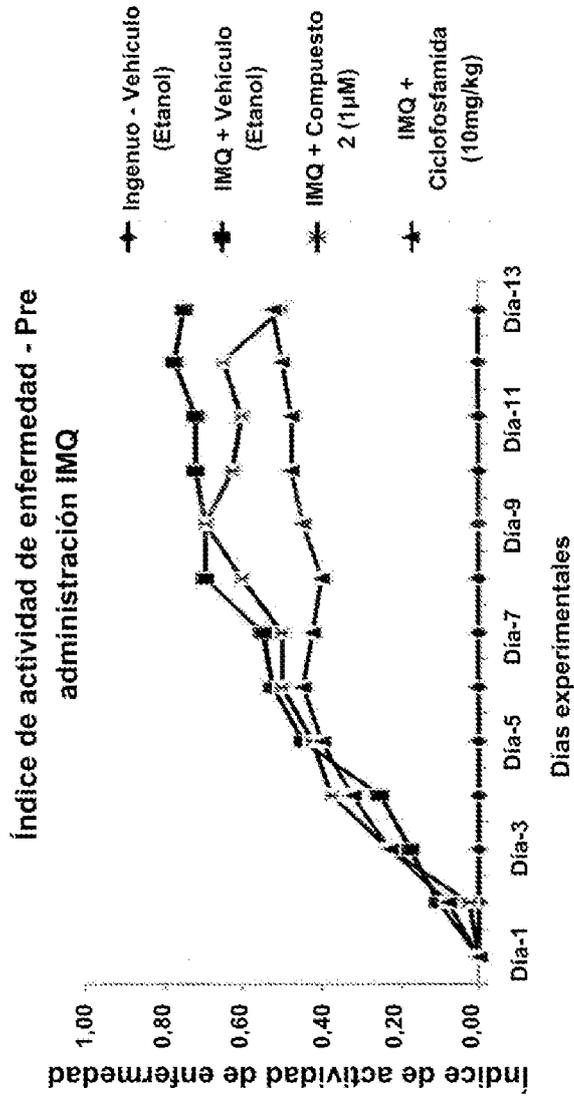


FIG. 7A

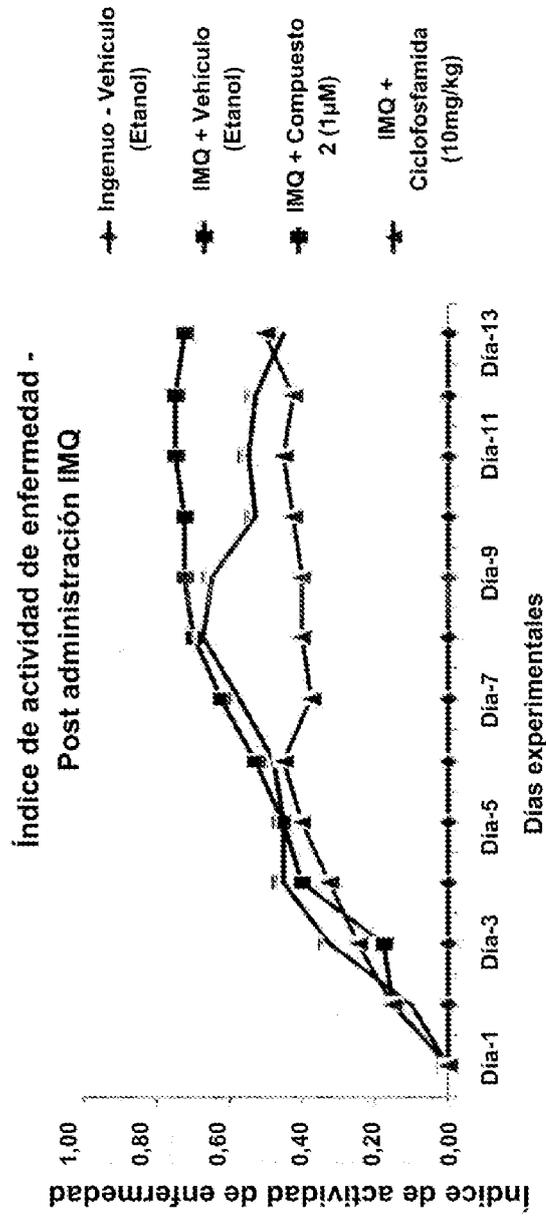


FIG. 7B

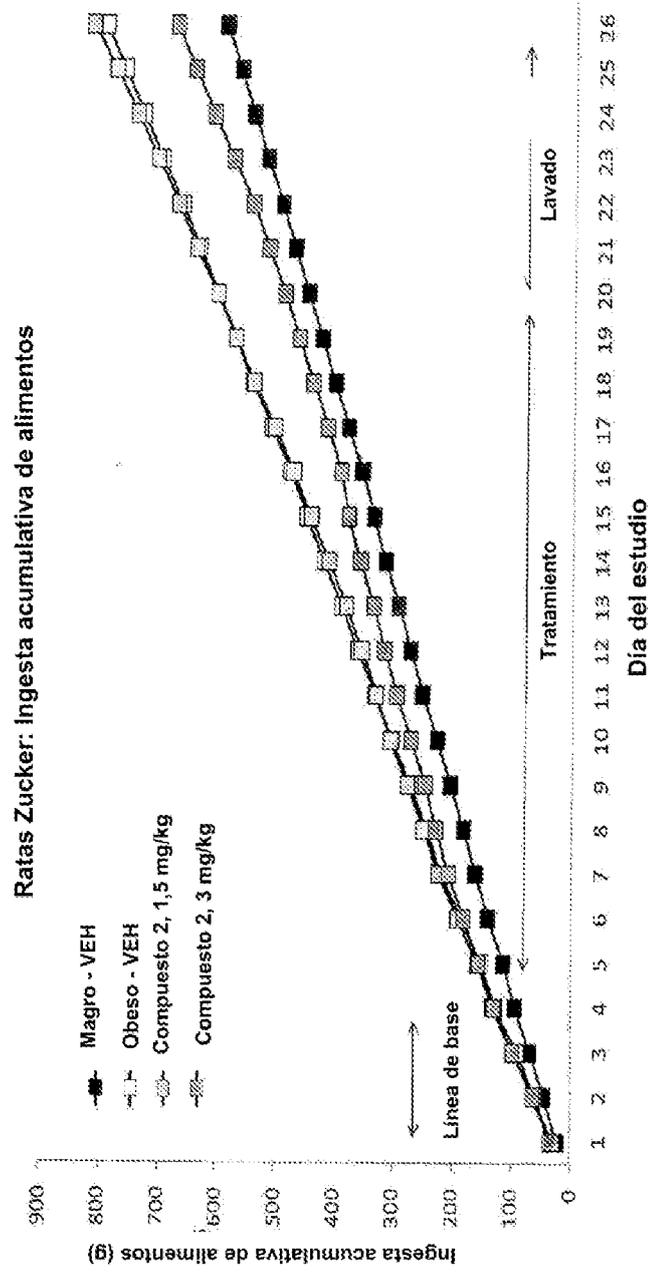


FIG. 8A

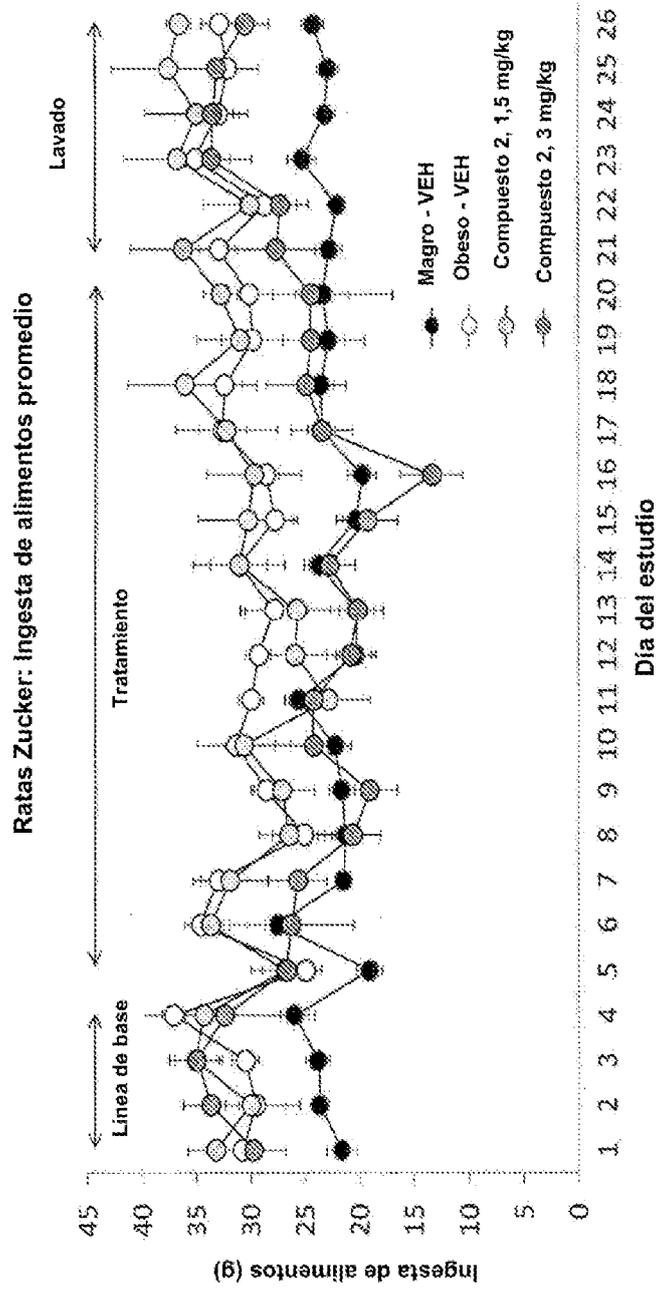


FIG. 8B

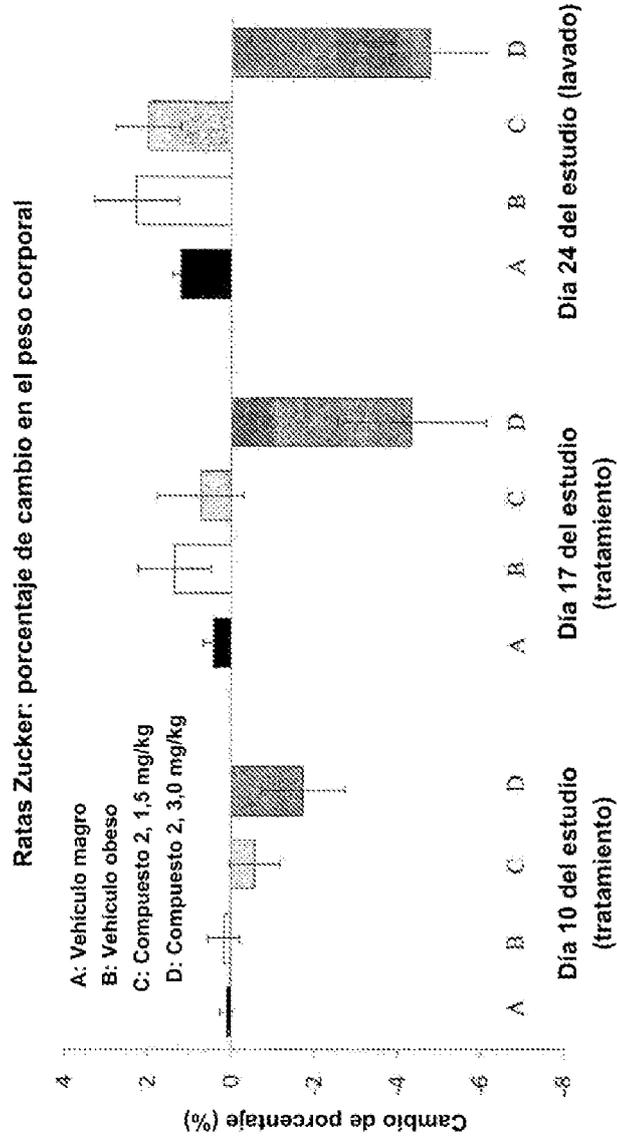


FIG. 9

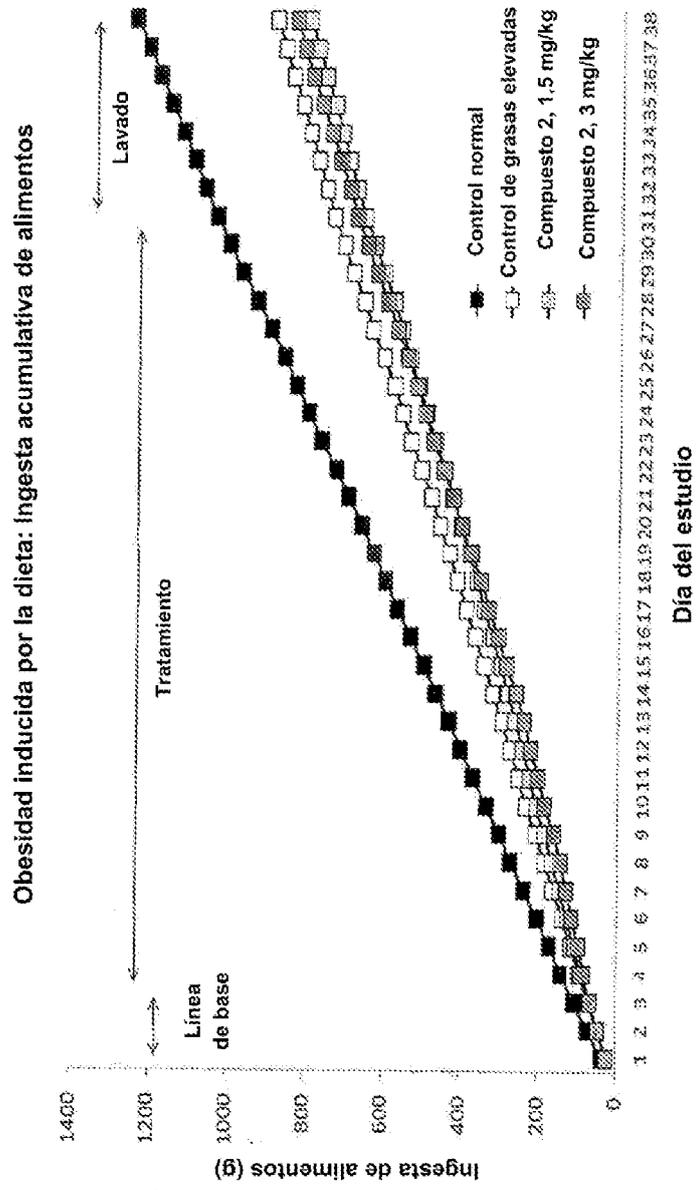


FIG. 10A

Obesidad inducida por la dieta: Peso corporal promedio

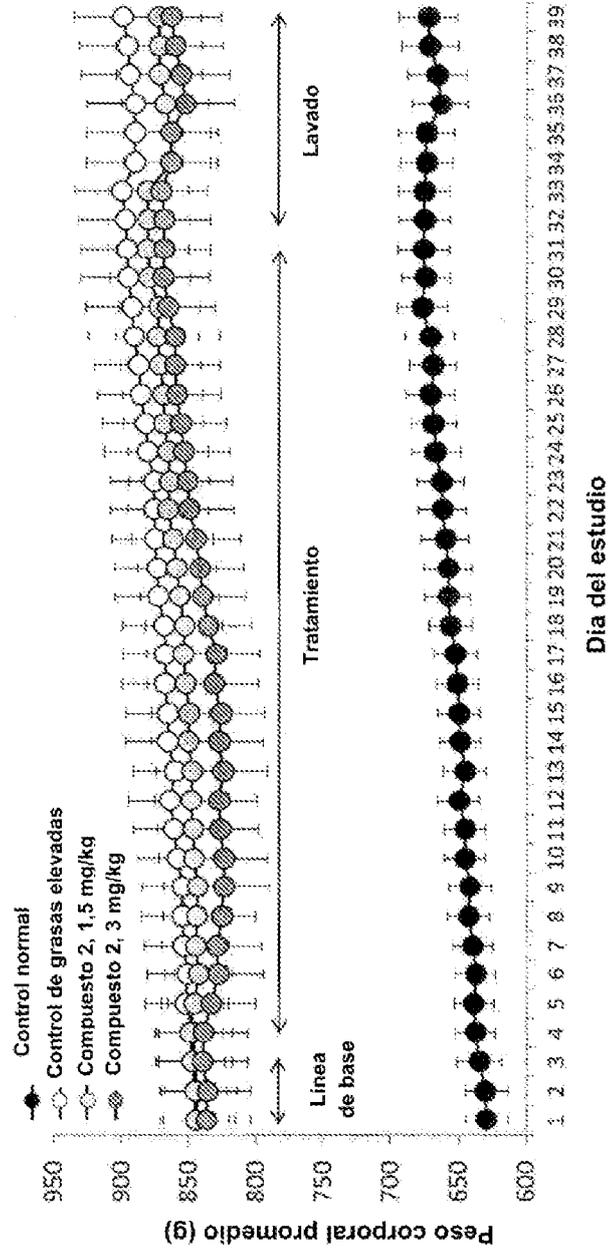


FIG. 10B

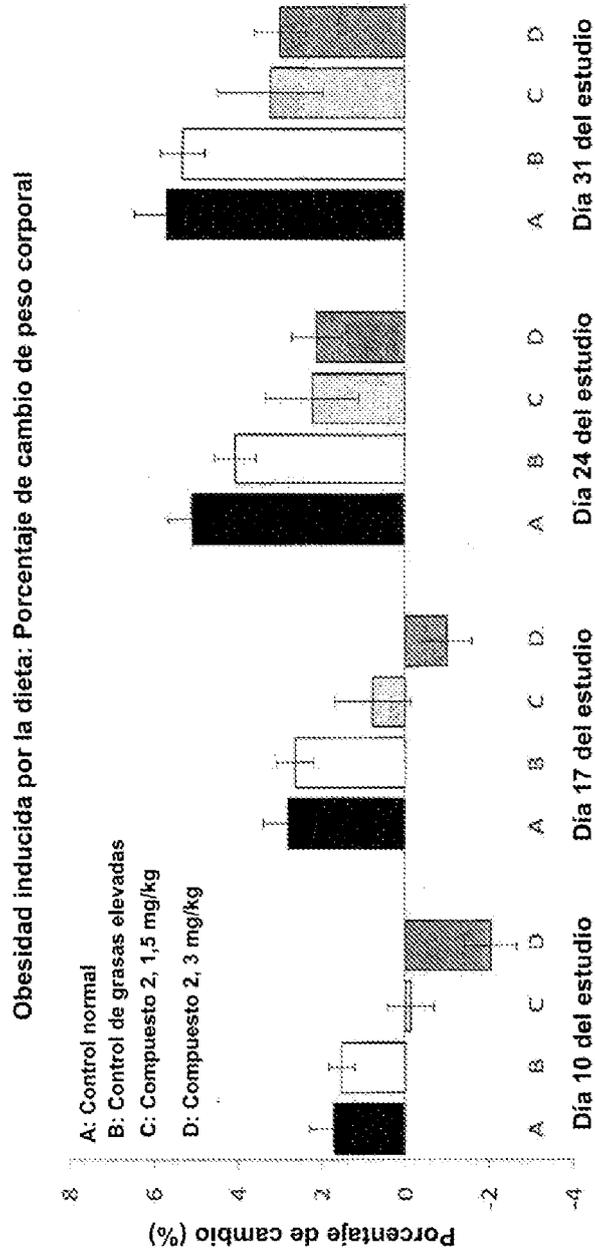


FIG. II

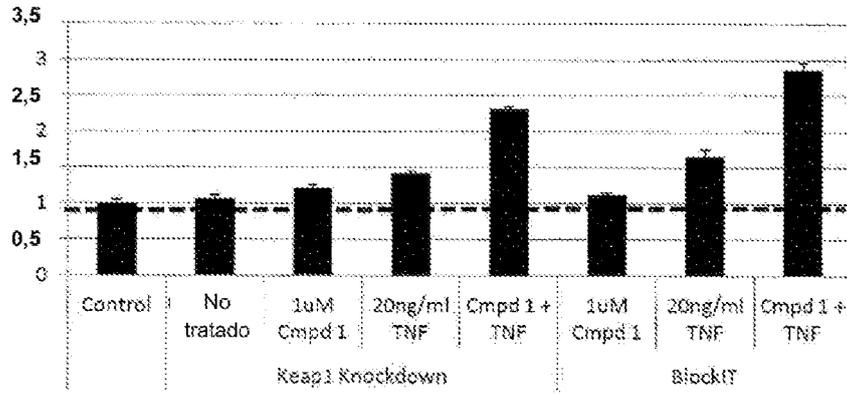


FIG. 12A

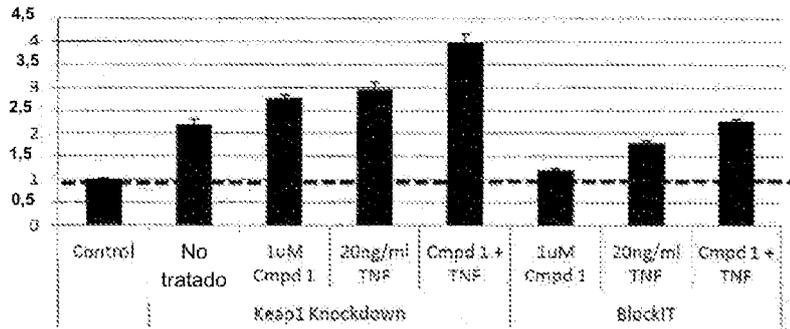


FIG. 12B

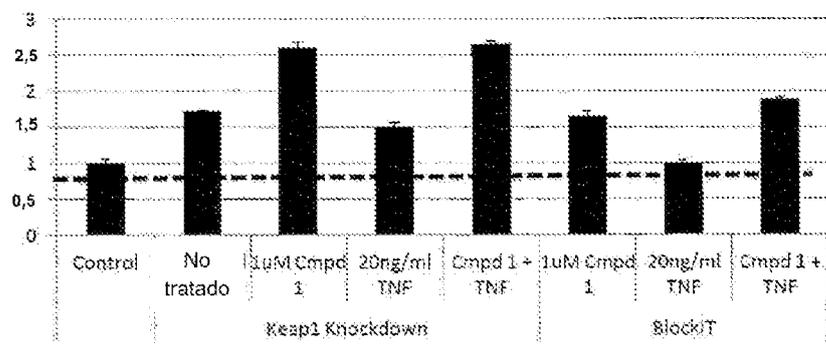


FIG. 12C

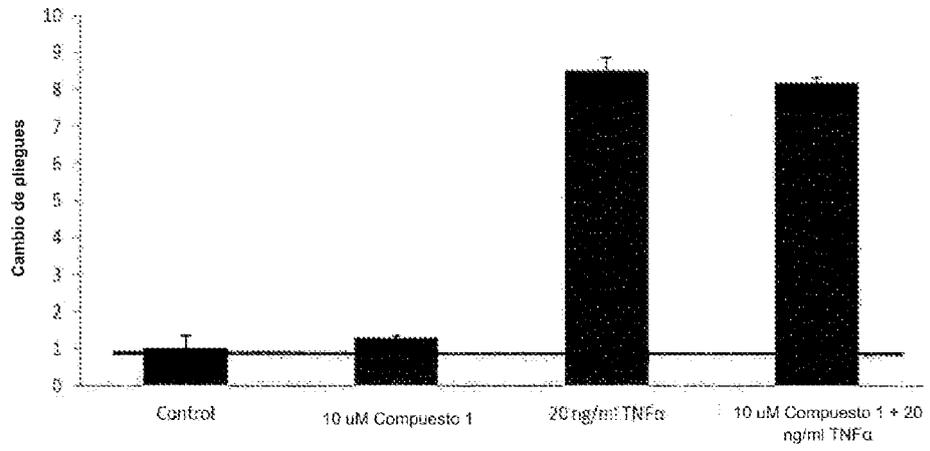


FIG. 13A

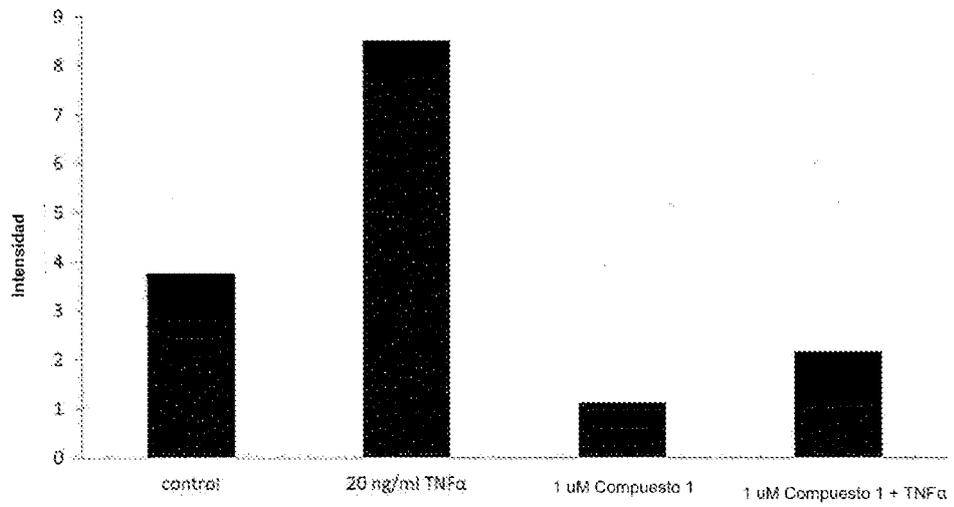


FIG. 13B

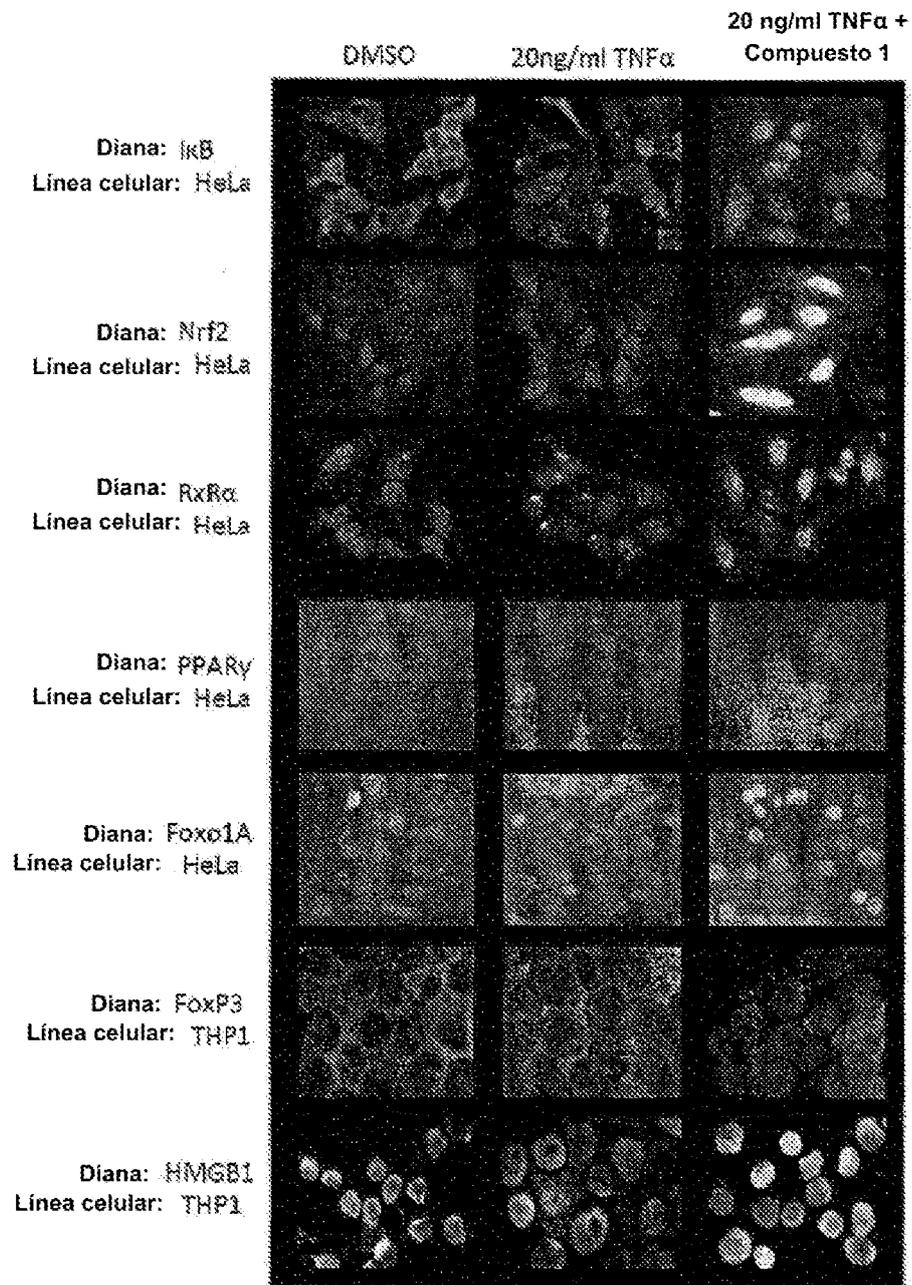


FIG. 14A

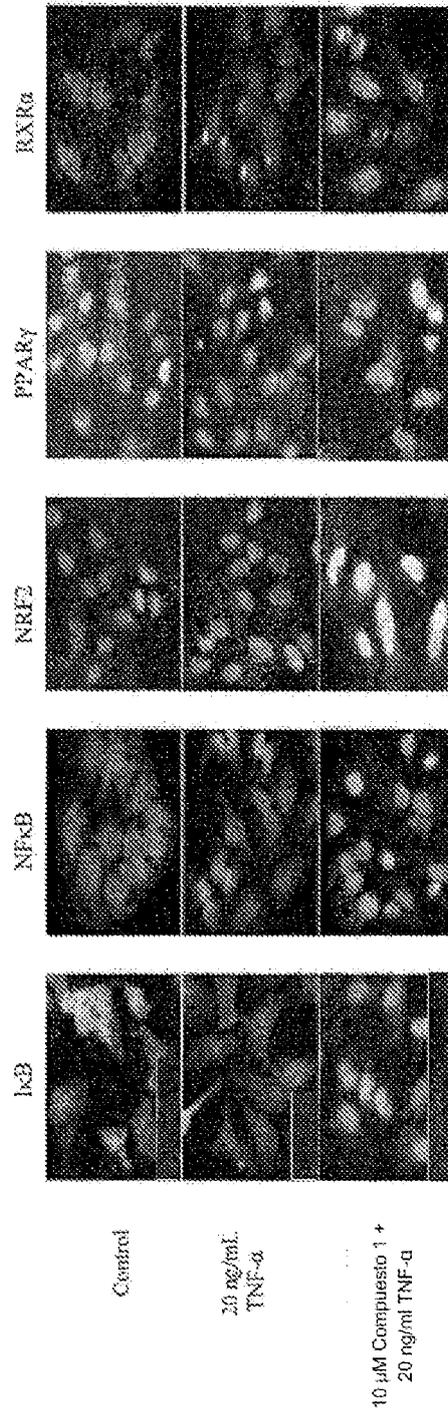


FIG. 14B

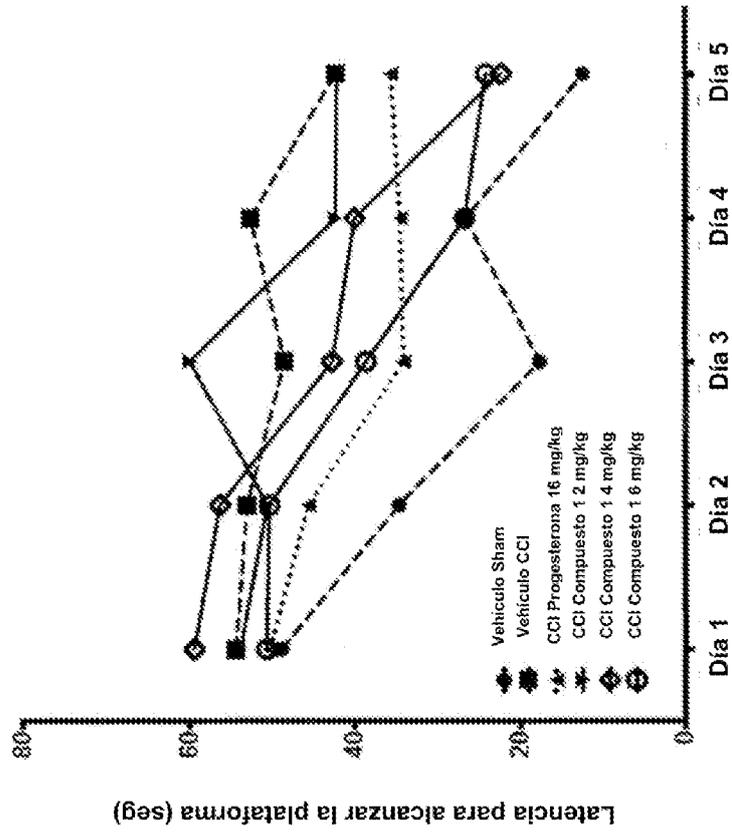


FIG. 15A

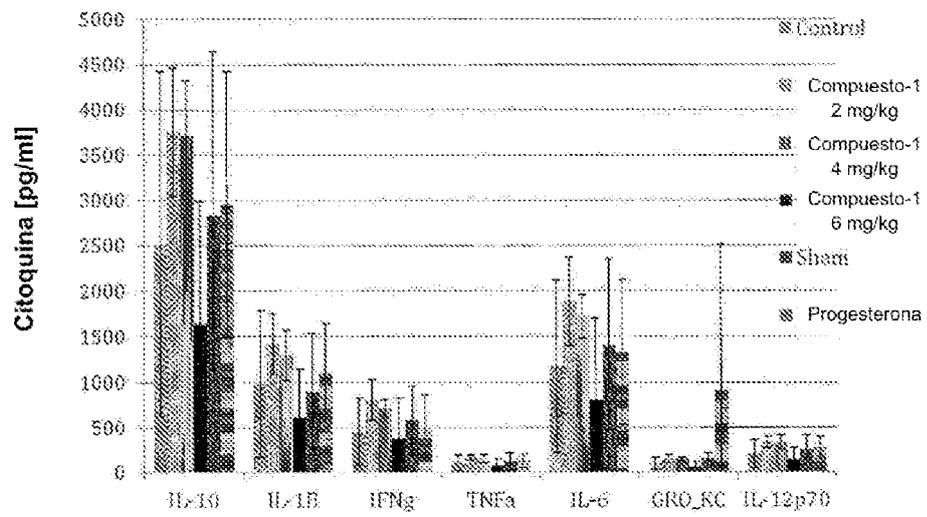


FIG. 15B

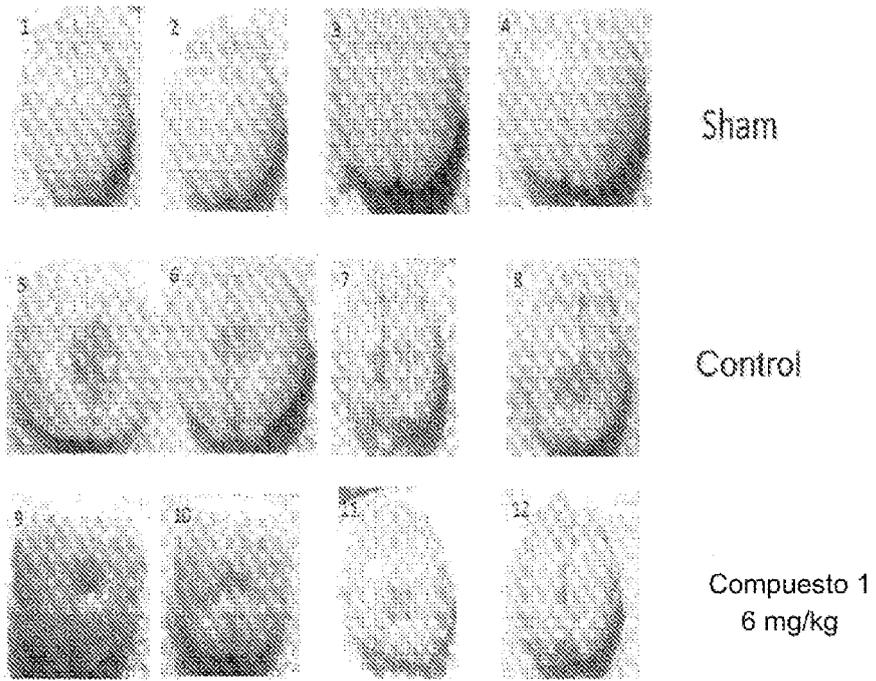


FIG. 15C

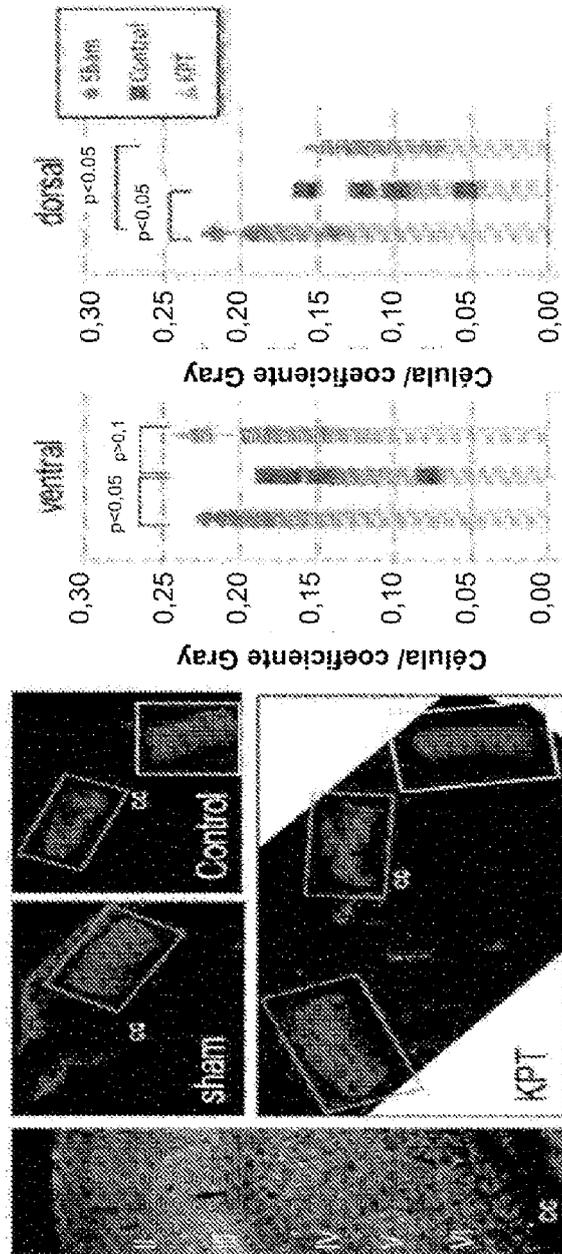


FIG. 15D

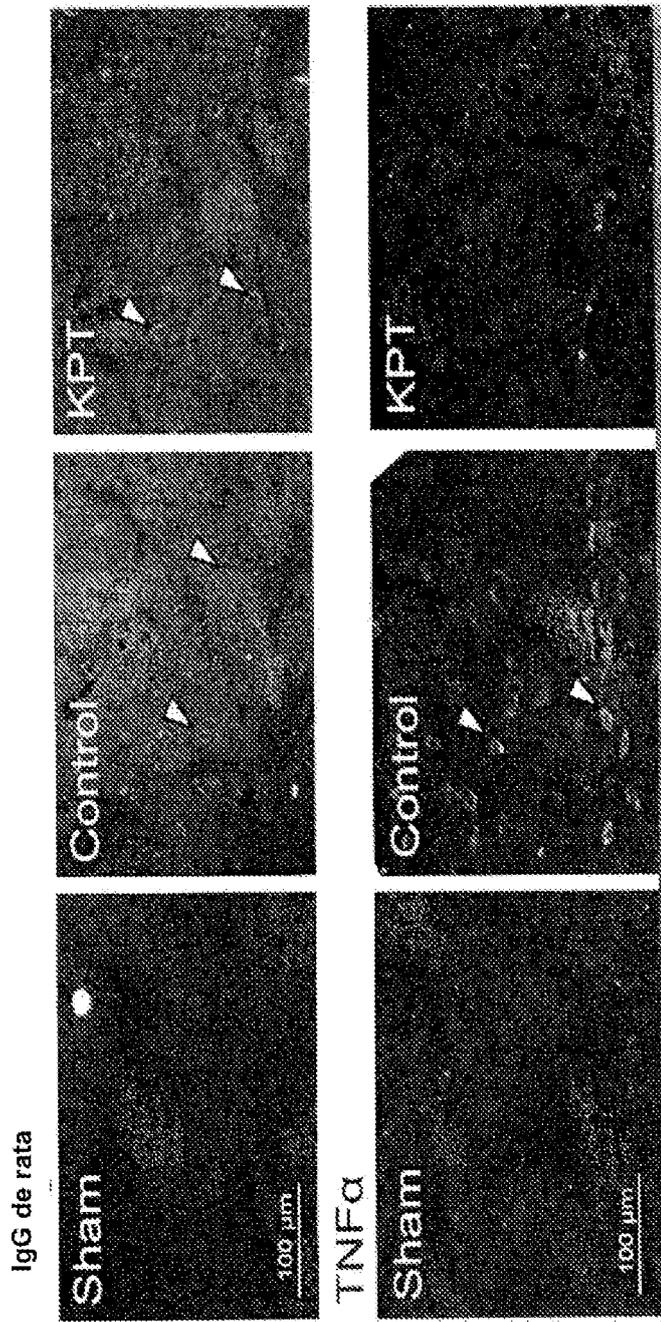


FIG. 15E

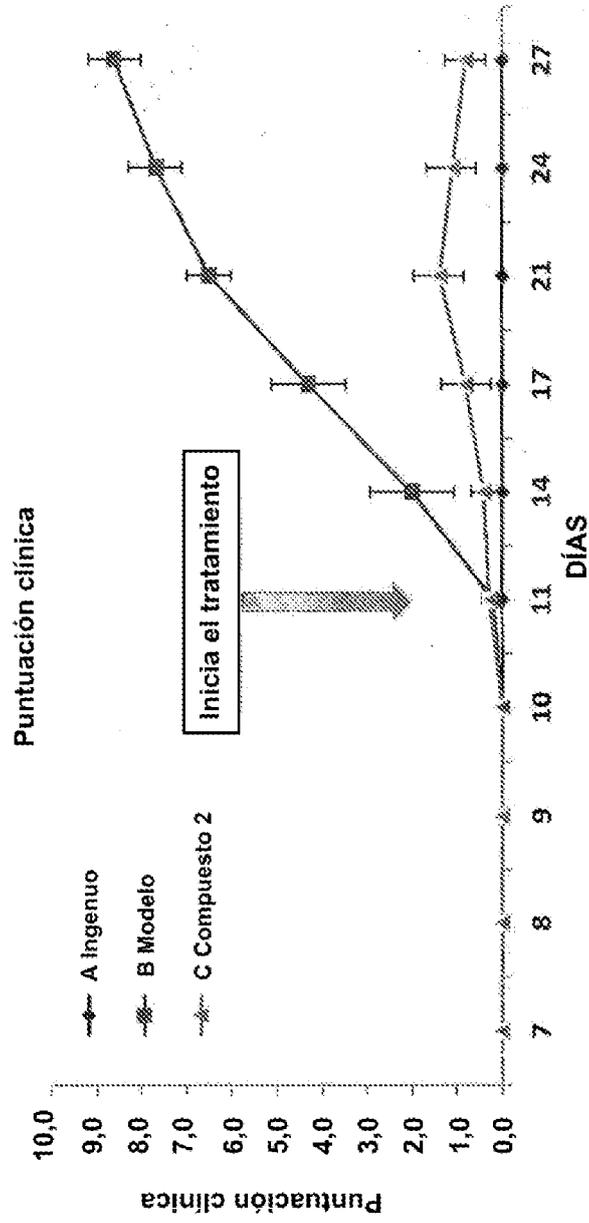


FIG. 16A

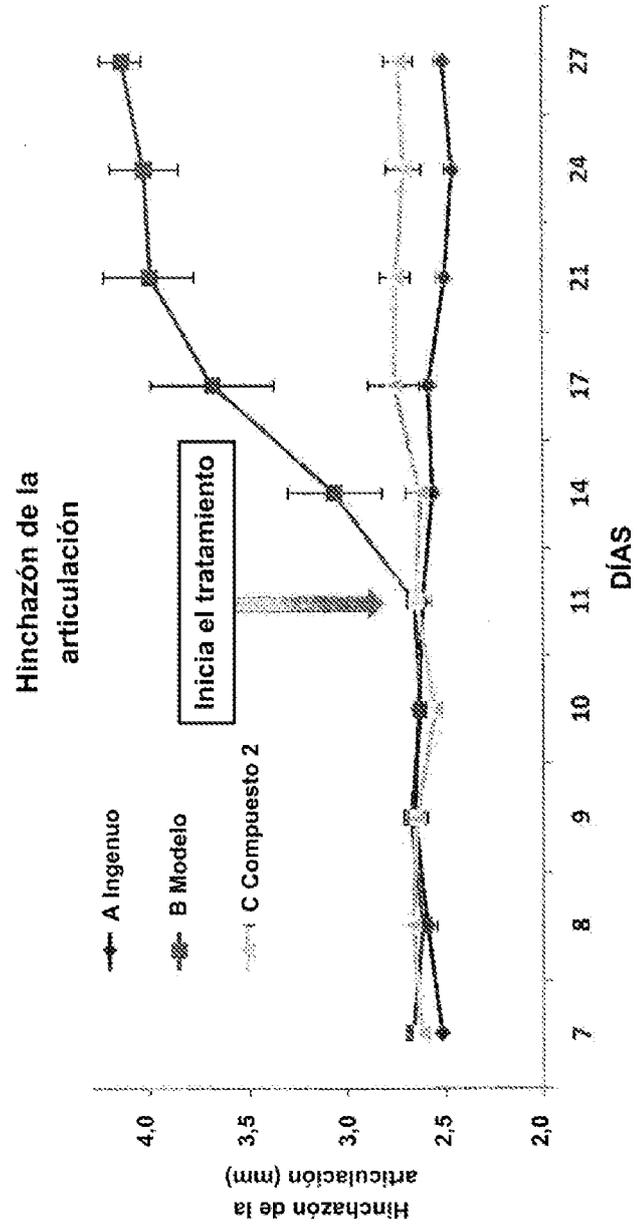


FIG. 16B

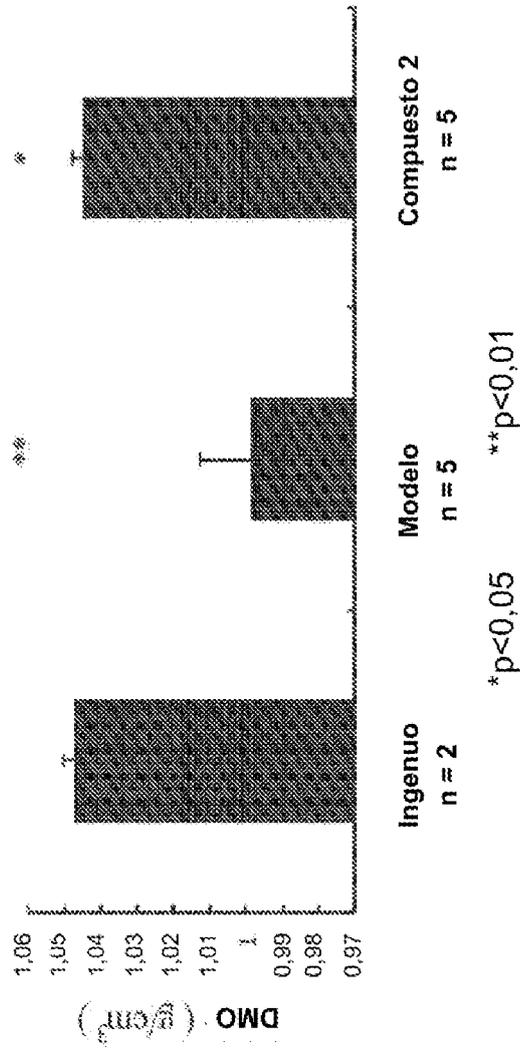


FIG. 17A

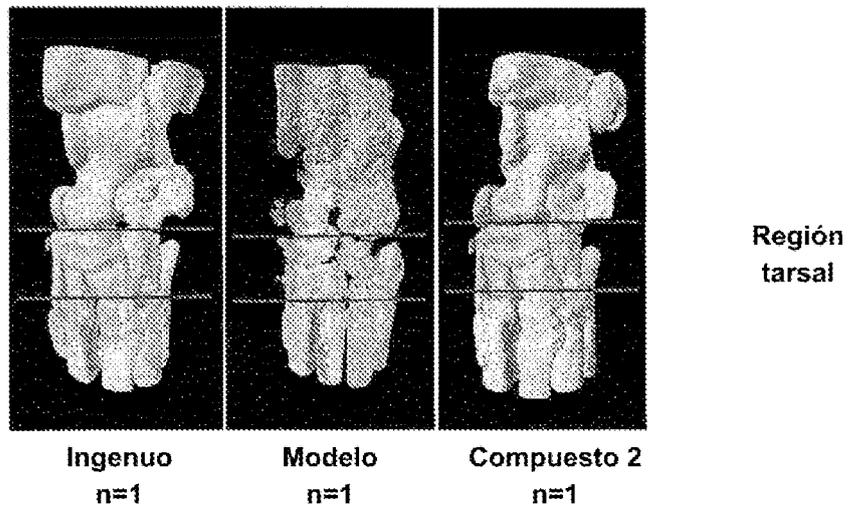


FIG. 17B

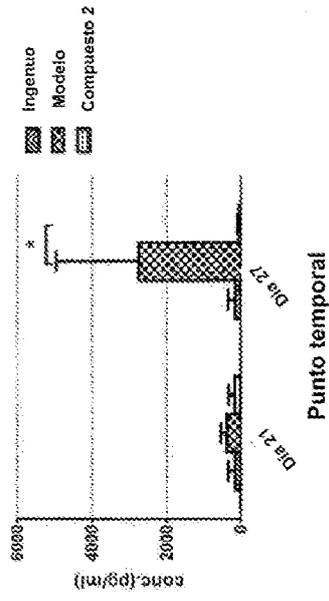


FIG. 17D

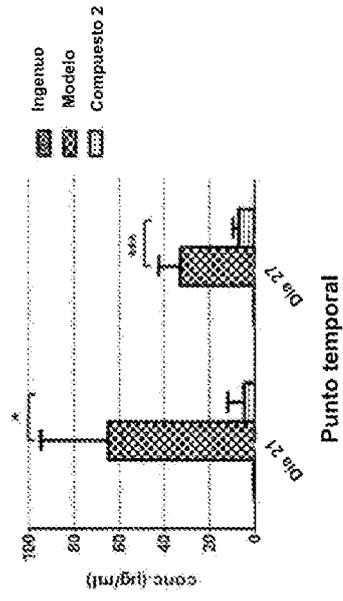


FIG. 17F

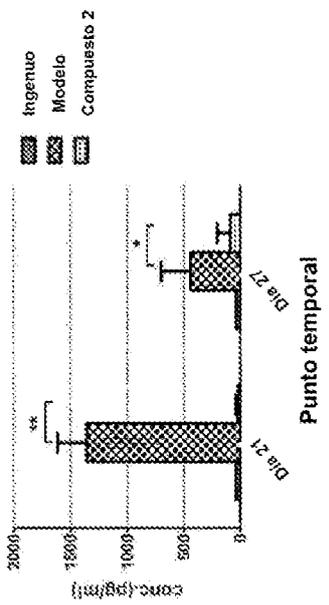


FIG. 17C

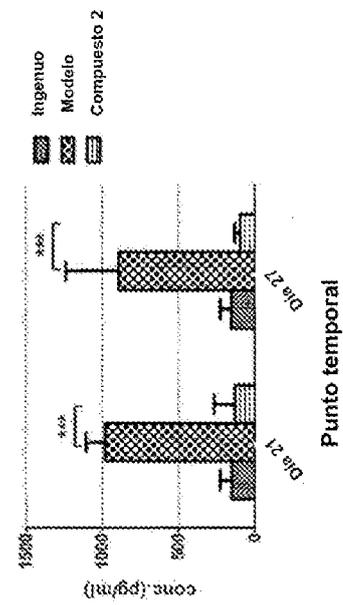


FIG. 17E

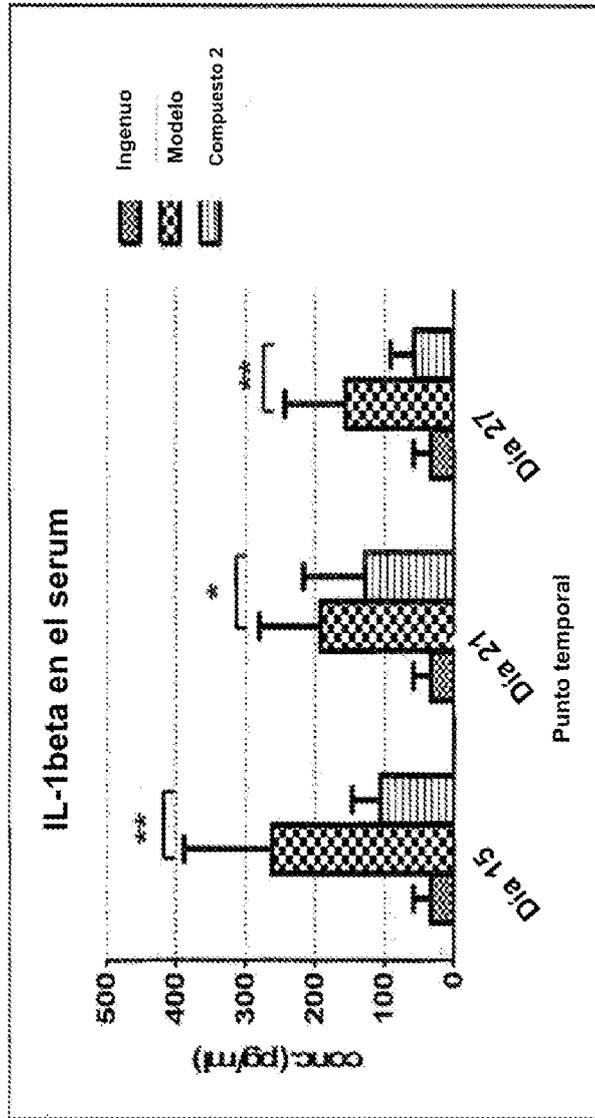


FIG. 17G

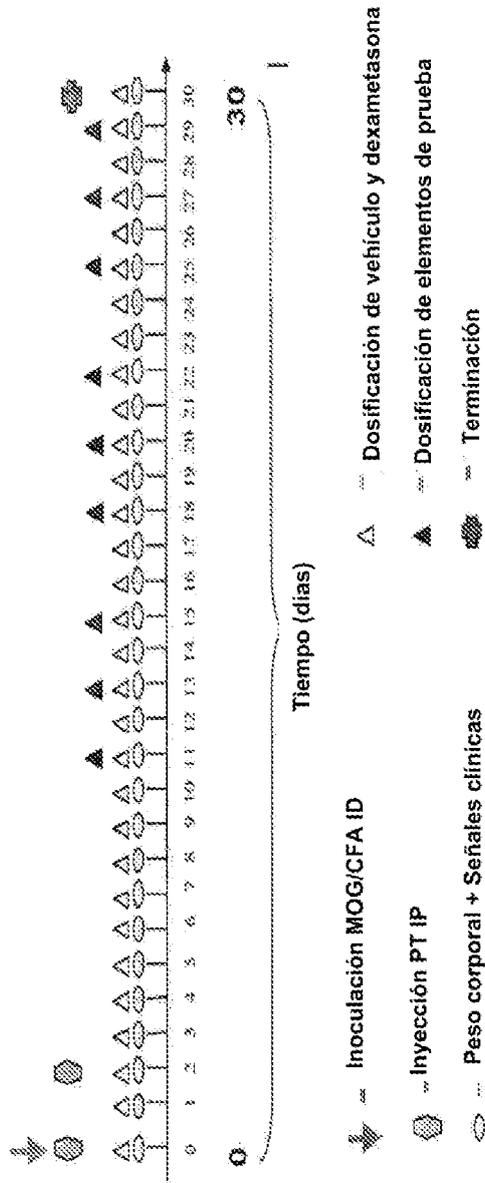


FIG. 18A

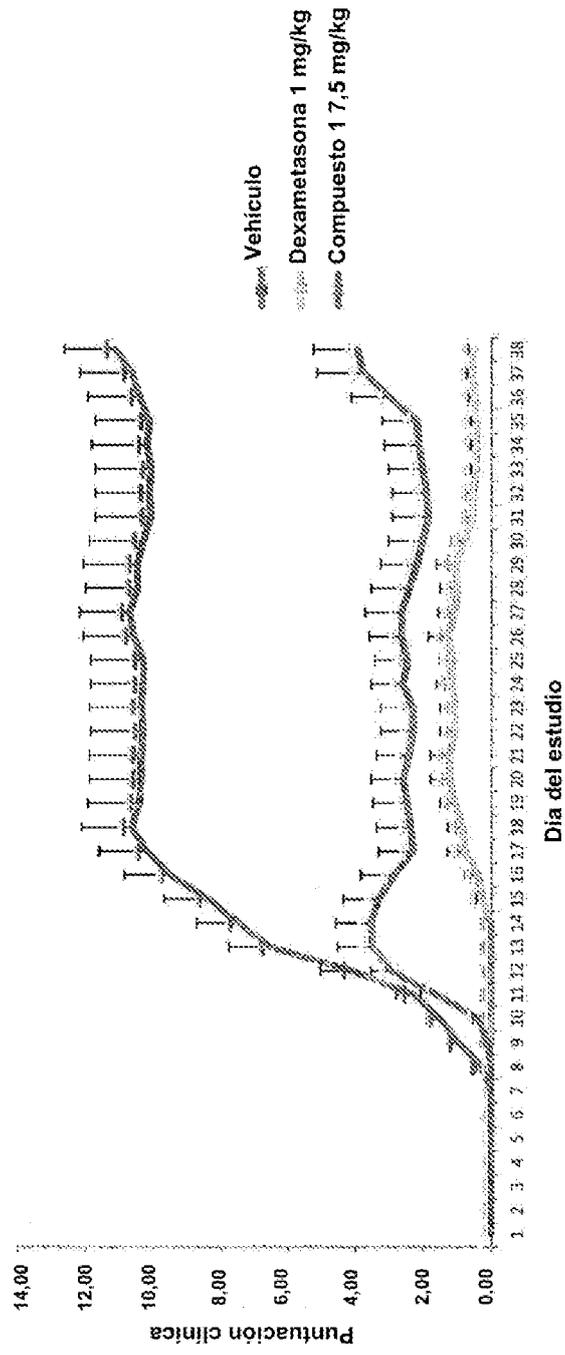
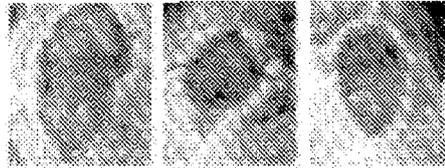


FIG. 18B

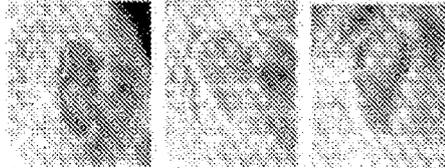
Morfología de la herida Día 5 post-herida

Administración tópica en heridas

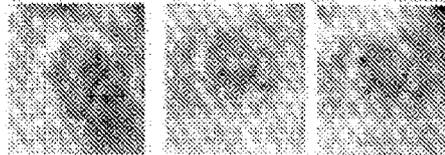
Control, agua
tópica



Compuesto 1
Tópico diario 2,5 μ M

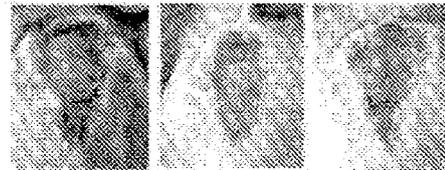


Compuesto 1
Tópico diario 1 μ M

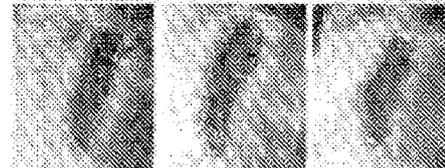


Administración sistema - sondaje oral

PO control PVP/
pluronic



PO Compuesto 1
4 mg/kg, días alternos



PO Compuesto 1
7,5 mg/kg, días
alternos

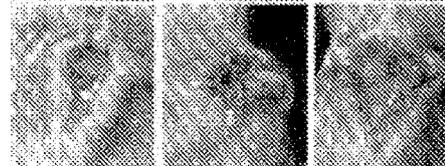


FIG. 19