

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 026**

51 Int. Cl.:

C07C 311/58	(2006.01) A61P 13/12	(2006.01)
A61K 31/64	(2006.01) A61P 29/00	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01) A61P 35/00	(2006.01)
A61P 7/02	(2006.01) A61P 43/00	(2006.01)
A61P 9/00	(2006.01)	
A61P 9/10	(2006.01)	
A61P 9/12	(2006.01)	
A61P 11/00	(2006.01)	
A61P 11/06	(2006.01)	
A61P 13/08	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2016** **E 20212296 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2024** **EP 3865472**

54 Título: **Antagonistas del receptor de tromboxano**

30 Prioridad:

16.06.2015 US 201562180317 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.10.2024

73 Titular/es:

ATXA THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
Temple Chambers 3 Burlington Road
Dublin4, D04RD68, IE

72 Inventor/es:

KINSELLA, B. THERESE y
REID, HELEN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 984 026 T3

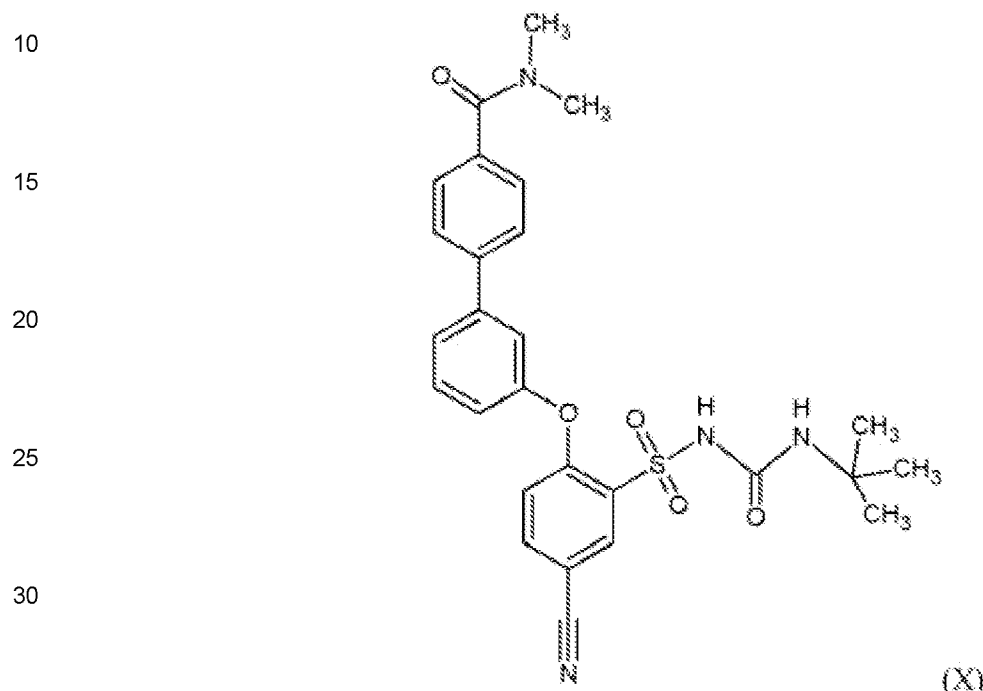
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Antagonistas del receptor de tromboxano

5 Campo técnico

La invención se refiere a un antagonista del receptor prostanoide T (TP) representado por la fórmula (X):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La invención también proporciona una composición que comprende dicho compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar (PAH).

40 Antecedentes

El prostanoide tromboxano (TX) A₂ es un potente mediador de la agregación plaquetaria y constrictor de diversos tipos de músculo liso (SM) que incluyen SM vascular, renal/riñón, pulmonar/bronquial y de próstata. El TXA₂ es además un potente mediador proinflamatorio y agente inmunomodulador, producido abundantemente por plaquetas, por varios tipos de SM, por células endoteliales y además por macrófagos inflamatorios derivados de monocitos. Por tanto, el TXA₂ desempeña una función fundamental en el sistema cardiovascular (CV), renal, pulmonar y prostático y en la inmunidad y la inflamación. Los desequilibrios en la señalización y/o alteraciones en los niveles de TXA₂ o de su receptor TXA₂, que se denomina además receptor prostanoide T o, en forma abreviada, TP, se han implicado en diversas causas cardiovasculares (por ejemplo, la trombosis, aterotrombosis, enfermedad arterial periférica, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y ataque isquémico transitorio/TIA, síndrome coronario agudo/ACS, hipertensión sistémica e inducida por el embarazo), renal (que incluye nefritis glomerular e hipertensión renal), pulmonar (que incluye asma e hipertensión arterial pulmonar/PAH) y enfermedades de la próstata (por ejemplo, hiperplasia benigna de próstata/BPH), y en las diversas enfermedades inflamatorias asociadas con esos sistemas y afecciones. Más recientemente, se ha establecido firmemente la función de TXA₂, TXA₂ sintasa (TXAS) y su receptor, el TP, en la enfermedad neoplásica, que incluye en cánceres de vejiga, próstata, mama y pulmón donde el TXA₂ puede promover la proliferación de células tumorales, migración, invasión, angiogénesis, inflamación e inmunidad, entre otras acciones promotoras de tumores. En los seres humanos, el TXA₂ en realidad envía señales a través de dos (iso)formas de receptor distintas denominadas TPα y TPβ que están codificadas por el mismo gen y que difieren exclusivamente en sus dominios intracelulares de cola carboxilo terminal (C). Los TP (TPα y TPβ) se expresan en una variedad de células en todo el cuerpo, que incluyen las plaquetas, en varios tipos de SM, en células endoteliales y en macrófagos, por ejemplo.

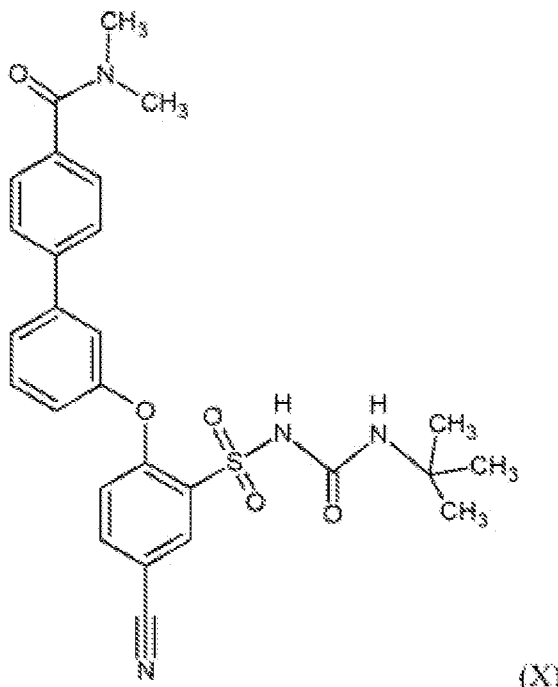
Debido a la función del TXA₂ en los sistemas CV, renal, pulmonar y prostático, existe un interés clínico significativo en el desarrollo de antagonistas de TP, sobre todo para el tratamiento de la aterotrombosis y otros trastornos CV, renales y pulmonares. Los antagonistas de TP tienen además aplicaciones potenciales en el tratamiento de diversos proinflamatorios (que incluyen, pero sin limitarse a, CVD inflamatorias, CVD asociadas con diabetes mellitus tipo 1 y 2, enfermedades renales y pulmonares, infección post viral/microbiana), enfermedades neoplásicas y de próstata

(tales como hiperplasia benigna de próstata/BPH). Otros enfoques terapéuticos tradicionales que se usan actualmente como alternativas a los antagonistas de TP tienen como objetivo inhibir la biosíntesis de TXA_2 . Entre estos se encuentran la clase de inhibidores de la ciclooxigenasa (COX) denominados fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), que incluye aspirina e inhibidores relacionados de COX 1 y/o COX 2. Estos inhibidores de la COX actúan mediante inhibición de la conversión del ácido araquidónico en la endoperóxido prostaglandina (PG) G_2/PGH_2 , la primera etapa enzimática en la síntesis de TXA_2 y de los prostanoideos relacionados que incluyen PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ y PGI_2 /prostaciclina. Como uno de los principales sitios de síntesis de TXA_2 es la plaqueta anucleada, que expresa principalmente COX 1 en oposición a COX 2, la aspirina en dosis bajas se usa ampliamente para reducir/inhibir la síntesis de TXA_2 dentro de las plaquetas sin afectar sustancialmente la síntesis de los otros prostanoideos por la COX 1 o COX 2 en otras células nucleadas. Por lo tanto, la aspirina en dosis bajas se usa ampliamente para prevenir la trombosis excesiva en pacientes con riesgo de episodios CV al inhibir la generación de TXA_2 en la plaqueta anucleada.

El reconocimiento de la necesidad de desarrollar antagonistas de TP ha aumentado en los últimos años principalmente debido al hecho de que los enfoques tradicionales que implican el uso de aspirina en dosis bajas no son suficientemente eficaces, por ejemplo, para reducir la trombosis en pacientes de riesgo y/o debido a sus efectos secundarios asociados debido a su inhibición indiscriminada de la síntesis de los otros prostanoideos (PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ y PGI_2 /prostaciclina). La falta de eficacia también puede ocurrir debido al hecho de que un porcentaje relativamente alto de la población general muestra "resistencia a la aspirina", una incapacidad de reducción de los niveles de TXA_2 en respuesta a la terapia con aspirina. Además, puede producirse una mayor incidencia de episodios cardiovasculares adversos en pacientes que reciben terapia con COXIB (inhibidores selectivos de COX 2), lo que sugiere que un antagonismo del receptor de TP más dirigido, en lugar de la inhibición de COX1/2, puede ser una forma clínicamente más beneficiosa de inhibir los efectos adversos de TXA_2 . Además, los antagonistas de TP, pero no la aspirina u otros AINE o COXIB, inhibirán las acciones de TXA_2 y del isoprostano 8-iso-prostaglandina (PG) $\text{F}_{2\alpha}$ derivado de radicales libres y de todos los demás ligandos de TP incidentales (por ejemplo endoperóxido el $\text{PGG}_2/\text{PGH}_2$, ácido 20-hidroxicicosatetraenoico/20-HETE) que además actúan como agonistas totales o parciales del TP. El documento WO 2013/156871 A2 se refiere a compuestos que funcionan como antagonistas de TP para tratar la trombosis y otras enfermedades cardiovasculares, renales o pulmonares.

Resumen

La invención proporciona un compuesto representado por la fórmula (X):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La invención también proporciona una composición que comprende dicho compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar (PAH). La invención generalmente proporciona compuestos que se unen a los receptores de tromboxano (TXA_2) (TP) e inhiben la trombosis y otros eventos dentro de los sistemas cardiovascular, renal, pulmonar u otros en los que se expresa TP que incluyen, aunque no de forma limitativa, plaquetas, diversos tipos de células de músculo liso (SM), células endoteliales, monocitos/macrófagos y determinadas células del sistema inmunitario. Los compuestos de la invención antagonizan con el TXA_2 y otros ligandos de TP incidentales que incluyen el endoperóxido PGG_2/H_2 , 20-HETE e isoprostanos (por ejemplo, 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$) que se unen al TP y estimulan la activación y agregación plaquetaria, lo que disminuye así el riesgo de un trombo o émbolo clínicamente significativo, o antagonizan con las isoformas $\text{TP}\alpha$ y/o $\text{TP}\beta$.

expresadas en células de los sistemas cardiovascular, renal, pulmonar u otros. Por lo tanto, los antagonistas de TP de la invención proporcionan propiedades farmacéuticas beneficiosas para tratar la trombosis y otros eventos dentro de los sistemas cardiovascular, renal, pulmonar u otros en los que se expresa TP y/o donde sus ligandos están desregulados.

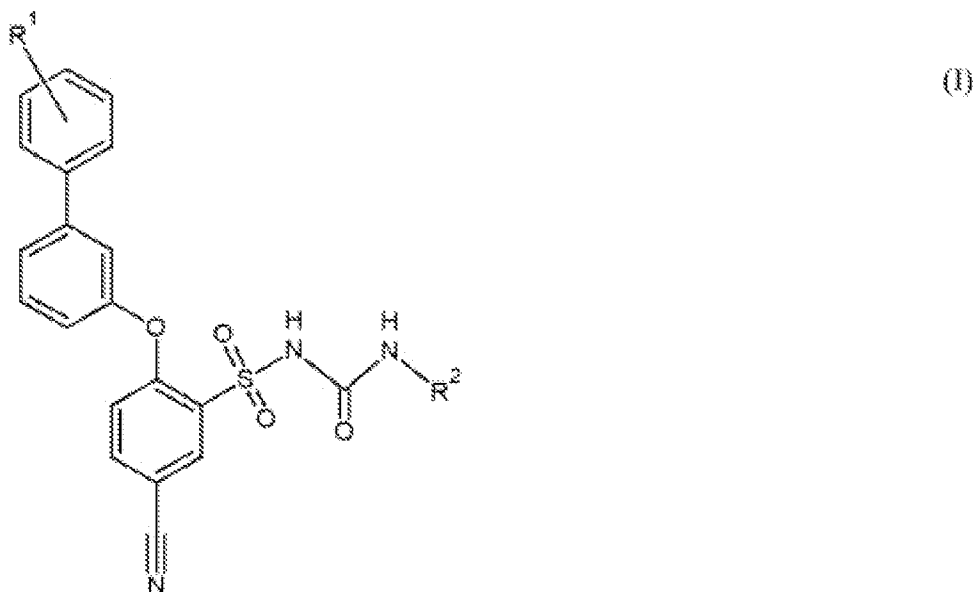
Los compuestos de la invención como antagonistas de TP deben actuar como fármacos terapéuticos para la hipertensión arterial pulmonar (PAH), no solo al inhibir la vasoconstricción excesiva sino también mediante prevención de la microtrombosis y, potencialmente, limitan la remodelación de la arteria pulmonar, la hipertrofia del ventrículo derecho (RV), la disfunción de células endoteliales y la inflamación local encontrada en la PAH. El compuesto de la invención también puede suprimir directamente las vías de inflamación o proliferación implicadas en la PAH. Sumado a esto, dado que el TP además media las acciones del 8-iso-PGF_{2α}, un isoprostano derivado de radicales libres generado en abundancia en el entorno clínico de la PAH, así como también en otras enfermedades que implican estrés oxidativo o lesión y que media de forma similar acciones frente a TXA₂, los compuestos de la invención además antagonizarán estos efectos en la PAH. Además, como el TXA₂ es un potente agente proinflamatorio y mitogénico que promueve la remodelación vascular, la restenosis y/o la hipertrofia y es el principal prostanoide constrictor derivado de la ciclooxigenasa (COX) dentro del pulmón, el compuesto de la invención antagonizará estos efectos.

Por lo tanto, el compuesto de la invención tendría una ventaja adicional sobre otros agentes terapéuticos de PAH utilizados, ya que dichos compuestos no solo inhibirían el TXA₂, la principal prostaglandina vasoconstrictora producida en el pulmón, sino que también inhibirían las acciones adversas del isoprostano derivado del estrés oxidativo 8-iso-PGF_{2α}, además de las del propio TXA₂. Además de la PAH, en otras enfermedades como la aterotrombosis, la sustitución del tratamiento de referencia con aspirina por compuestos de la invención ofrecerá varias ventajas, ya que: (i) no solo bloquean la acción del TXA₂, el PGG₂/PGH₂ y el 20-HETE, sino también de los agonistas del TP insensibles a la aspirina (por ejemplo, el 8-iso-PGF_{2α}, generado en abundancia por los radicales libres durante una lesión oxidativa); (ii) también (a diferencia de la aspirina), inhibirá el TP expresado en las células del lecho vascular y en los macrófagos/monocitos circulantes, presentes durante la aterotrombosis inflamatoria; (iii) superan la *resistencia a la aspirina*, que se estima que ocurre en aproximadamente el 33 % de la población.

Los compuestos de la descripción incluyen una bencenosulfonilurea en la que el benceno está sustituido por un grupo bifenililoxi sustituido (por ejemplo, en la posición 2) y por un grupo nitrilo (por ejemplo, en la posición 5), mostrando dichos compuestos resultados prometedores como antagonistas de TP selectivos de isoforma TP.

Se describen compuestos que incluyen una bencenosulfonilurea en la que el benceno está sustituido en la posición 2 por un grupo bifenililoxi sustituido y en la posición 5 por un grupo nitrilo y la urea está sustituida por un halógeno, un grupo alquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo arilo o un grupo arilo halogenado, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. En los compuestos descritos, el grupo bifenililoxi está sustituido por un grupo alquilo halogenado, un grupo metoxi halogenado, una amida primaria, una amida secundaria, una amida terciaria o un grupo nitrilo.

El compuesto de la descripción se representa mediante la fórmula (I):



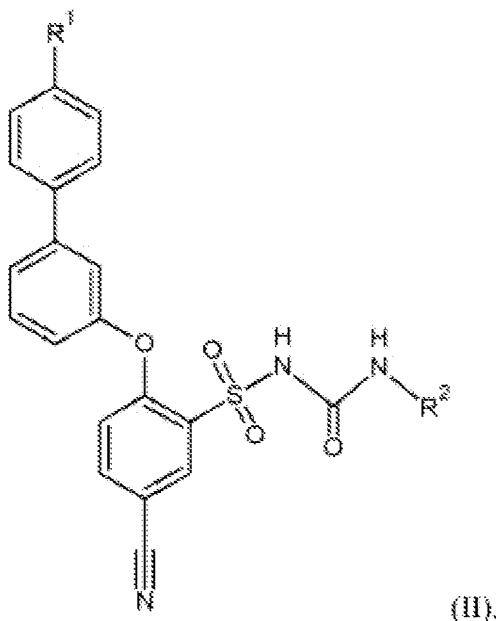
donde R¹ se selecciona del grupo que consiste en: un halógeno, un grupo alquilo, un grupo cicloalquilo, un grupo arilo, un grupo heterocicloalquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo cicloalquilo halogenado, un grupo arilo halogenado, un grupo heterocicloalquilo halogenado, un grupo metoxi halogenado, un grupo etoxi, un grupo isopropoxi, un grupo terc-butoxi, un grupo etoxi halogenado, un grupo isopropoxi halogenado, un grupo terc-butoxi halogenado, una amida

primaria, una amida secundaria, una amida terciaria, OH, un halógeno, CO₂H, metil cetona, un grupo nitrilo, un grupo éster metílico, un grupo éster etílico, un grupo éster isopropílico, un grupo éster terc-butílico, un grupo éster metílico halogenado, un grupo éster etílico halogenado, un grupo éster isopropílico halogenado y un grupo éster terc-butílico halogenado; y R² se selecciona del grupo que consiste en un halógeno, un grupo alquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo arilo y un grupo arilo halogenado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. R¹ puede seleccionarse del grupo que consiste en: un halógeno, un grupo alquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo cicloalquilo halogenado, un grupo arilo halogenado, un grupo heterocicloalquilo halogenado, un grupo metoxi halogenado, un grupo etoxi, un grupo isopropoxi, un grupo terc-butoxi, un grupo etoxi halogenado, un grupo isopropoxi halogenado, un grupo terc-butoxi halogenado, una amida primaria, una amida secundaria, una amida terciaria y un grupo nitrilo; y R² se selecciona del grupo que consiste en un halógeno, un grupo alquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo arilo y un grupo arilo halogenado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. A menos que se indique lo contrario, grupo alquilo significa ramificado o no ramificado (por ejemplo, terc-butilo es un grupo alquilo).

Se describe un compuesto de fórmula (I), en el que R¹ se selecciona del grupo que consiste en: un grupo alquilo halogenado, un grupo metoxi halogenado, una amida primaria, una amida secundaria, una amida terciaria y un grupo nitrilo; y R² se selecciona del grupo que consiste en un grupo alquilo de 3 a 6 carbonos, y un grupo alquilo halogenado de 3 a 6 carbonos, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se describe un compuesto de fórmula (I), en el que R¹ se selecciona del grupo que consiste en: un grupo difluorometilo, un grupo trifluorometilo, un grupo difluorometoxi, un grupo trifluorometoxi, una amida primaria, una amida secundaria, una amida terciaria y un grupo nitrilo; y R² se selecciona del grupo que consiste en un grupo alquilo de 6 o menos carbonos y un grupo alquilo halogenado de 6 o menos carbonos, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se describe un compuesto de fórmula (II):



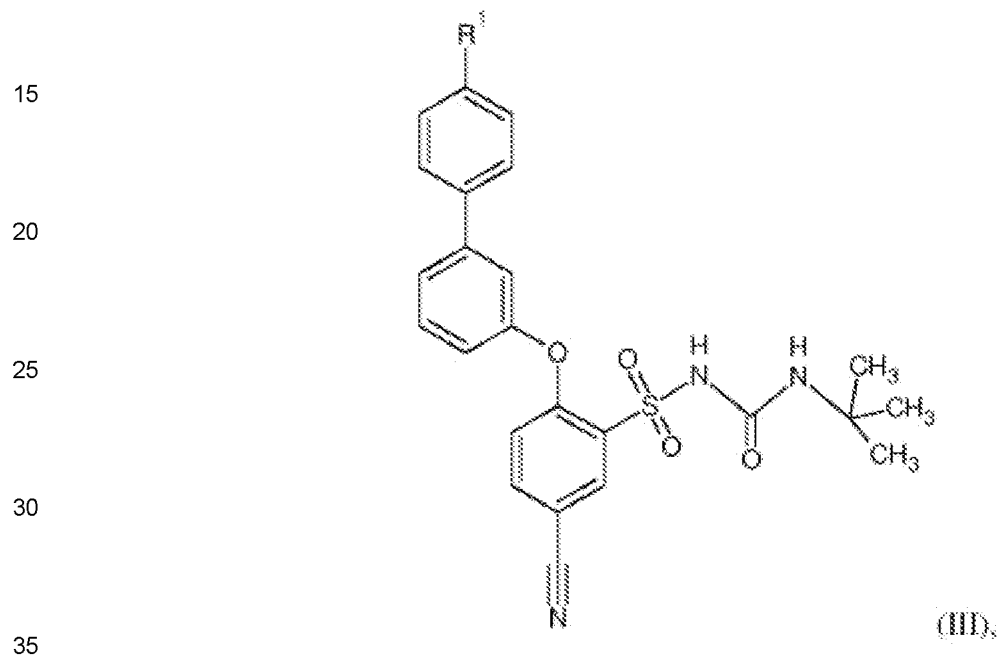
donde R¹ se selecciona del grupo que consiste en: un halógeno, un grupo alquilo, un grupo cicloalquilo, un grupo arilo, un grupo heterocicloalquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo cicloalquilo halogenado, un grupo arilo halogenado, un grupo heterocicloalquilo halogenado, un grupo metoxi halogenado, un grupo etoxi, un grupo isopropoxi, un grupo terc-butoxi, un grupo etoxi halogenado, un grupo isopropoxi halogenado, un grupo terc-butoxi halogenado, una amida primaria, una amida secundaria, una amida terciaria, OH, un halógeno, CO₂H, metil cetona, un grupo nitrilo, un grupo éster metílico, un grupo éster etílico, un grupo éster isopropílico, un grupo éster terc-butílico, un grupo éster metílico halogenado, un grupo éster etílico halogenado, un grupo éster isopropílico halogenado y un grupo éster terc-butílico halogenado; y R² se selecciona del grupo que consiste en un halógeno, un grupo alquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo arilo y un grupo arilo halogenado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se describe un compuesto de fórmula (II), en el que R¹ se selecciona del grupo que consiste en: un halógeno, un grupo alquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo cicloalquilo halogenado, un grupo arilo halogenado, un grupo heterocicloalquilo halogenado, un grupo metoxi halogenado, un grupo etoxi, un grupo isopropoxi, un grupo terc-butoxi, un grupo etoxi halogenado, un grupo isopropoxi halogenado, un grupo terc-butoxi halogenado, una amida primaria, una amida secundaria, una amida terciaria y un grupo nitrilo; y R² se selecciona del grupo que consiste en un grupo alquilo de 2 a 6 carbonos, y un grupo alquilo halogenado de 2 a 6 carbonos, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

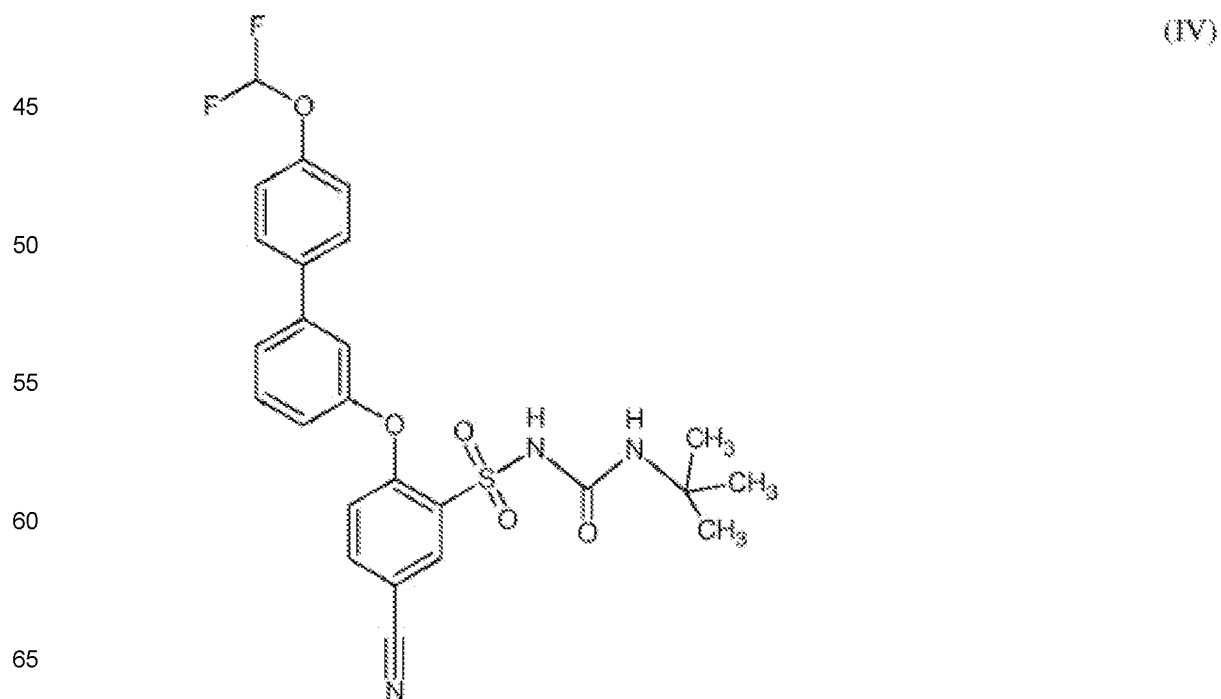
También se describe un compuesto de fórmula (II), en el que R^1 se selecciona del grupo que consiste en: un grupo alquilo halogenado, un grupo metoxi halogenado, una amida primaria, una amida secundaria, una amida terciaria y un grupo nitrilo; y R^2 es un grupo alquilo de 3 a 6 carbonos, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

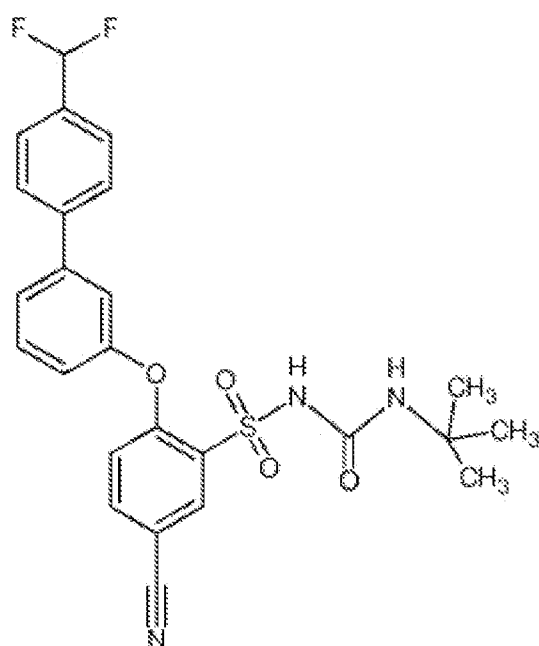
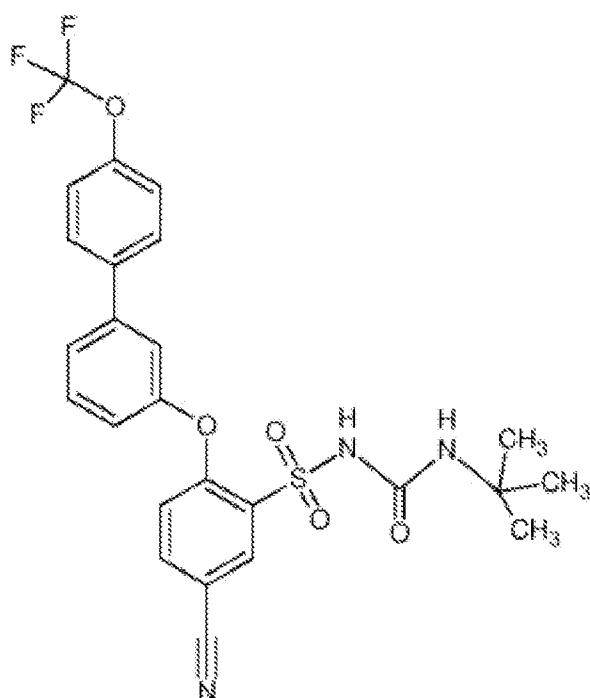
5 También se describe un compuesto de fórmula (I), en el que R^1 se selecciona del grupo que consiste en: un grupo difluorometilo, un grupo trifluorometilo, un grupo difluormetoxi, un grupo trifluormetoxi, una amida primaria, una amida secundaria, una amida terciaria y un grupo nitrilo; y R^2 se selecciona del grupo que consiste en un grupo alquilo de 3 a 5 carbonos y un grupo alquilo halogenado de 3 a 5 carbonos, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

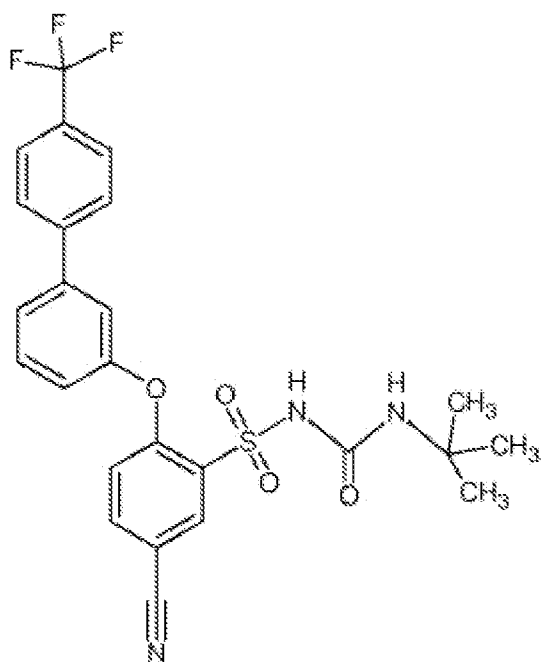
10 Se describe además un compuesto de fórmula (III):



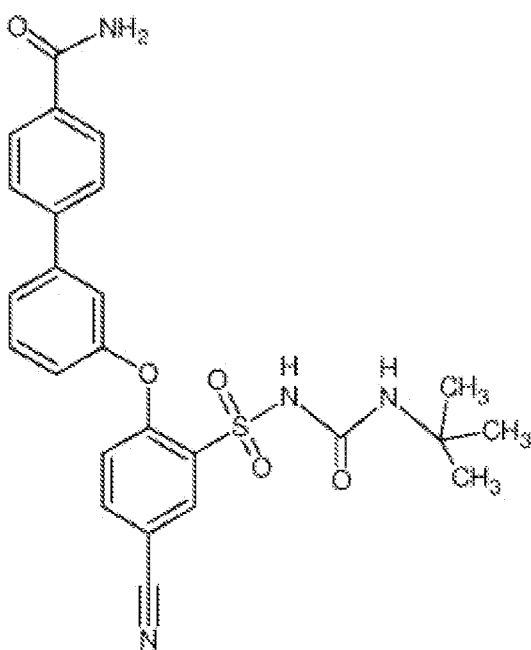
en la que R^1 se selecciona del grupo que consiste en un grupo difluorometilo, un grupo trifluorometilo, un grupo difluormetoxi, un grupo trifluormetoxi, una amida primaria, una amida secundaria, una amida terciaria y un grupo nitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Por ejemplo, el compuesto puede representarse por la Fórmula (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X) u (XI):



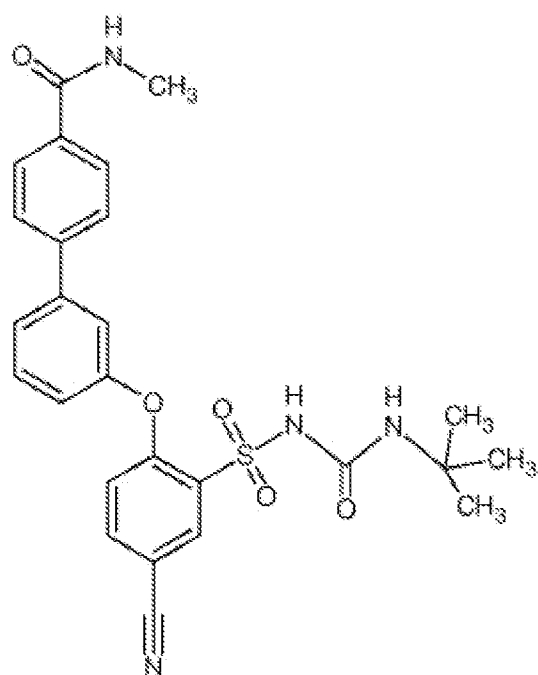




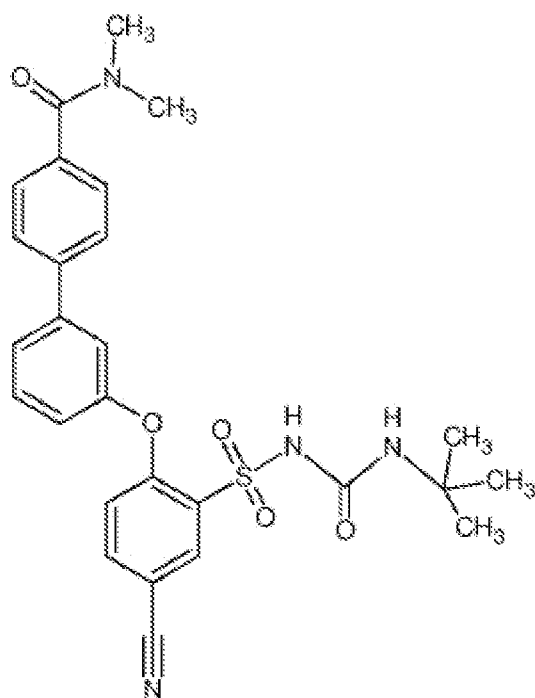
(VII)



(VIII)

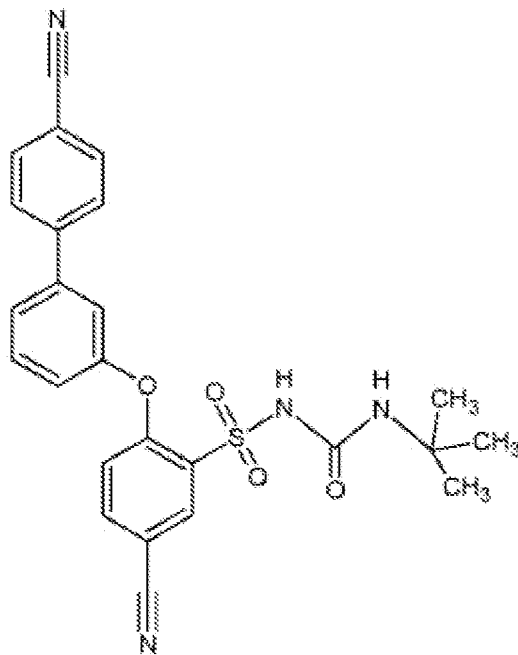


(IX)



(X)

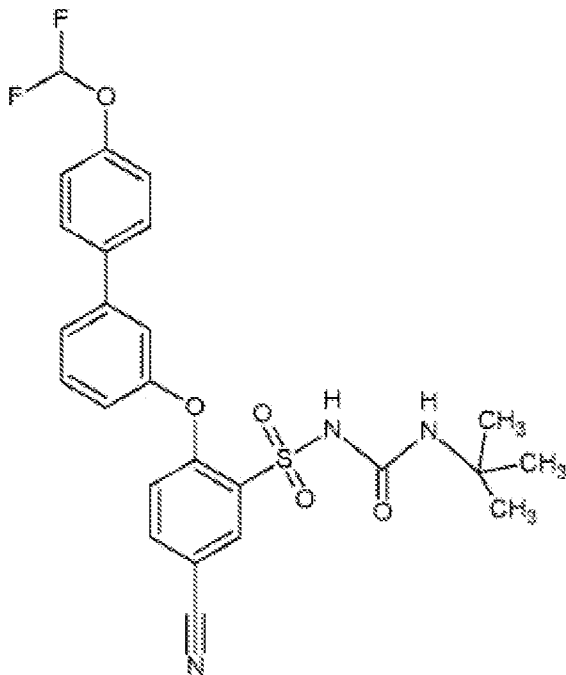
(XI)

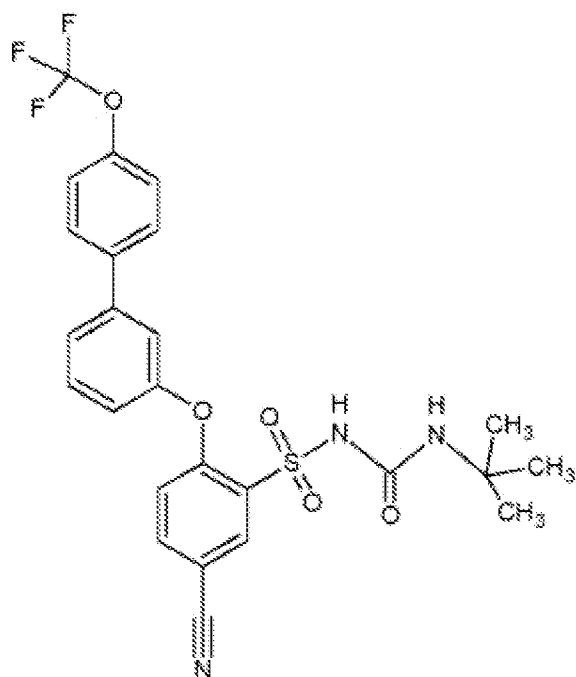


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

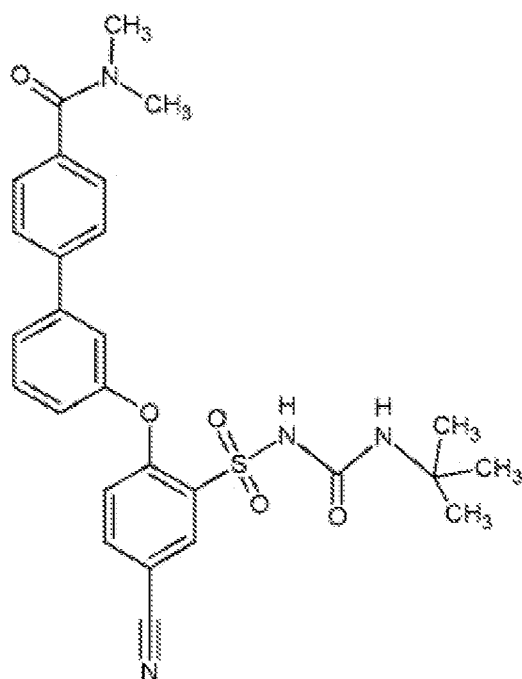
Se describe un compuesto de fórmula (II) y más específicamente se muestra mediante la fórmula (IV), (V) o (X):

(IV)





(V)

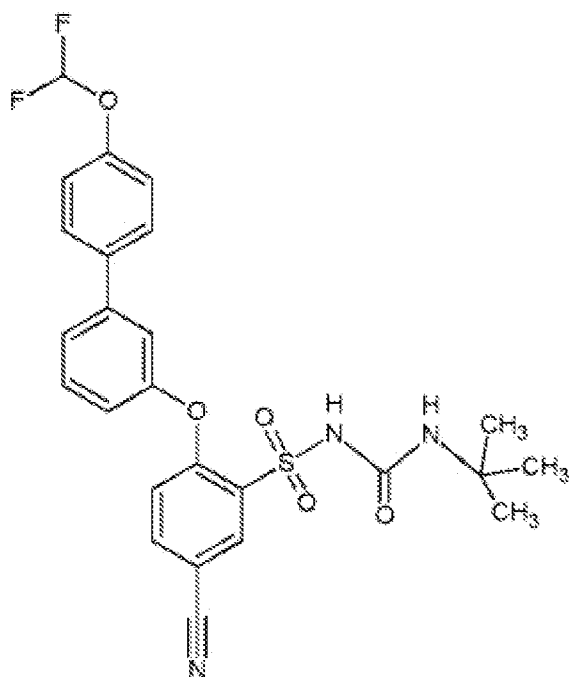


(X)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se describe un compuesto representado por la fórmula (IV):

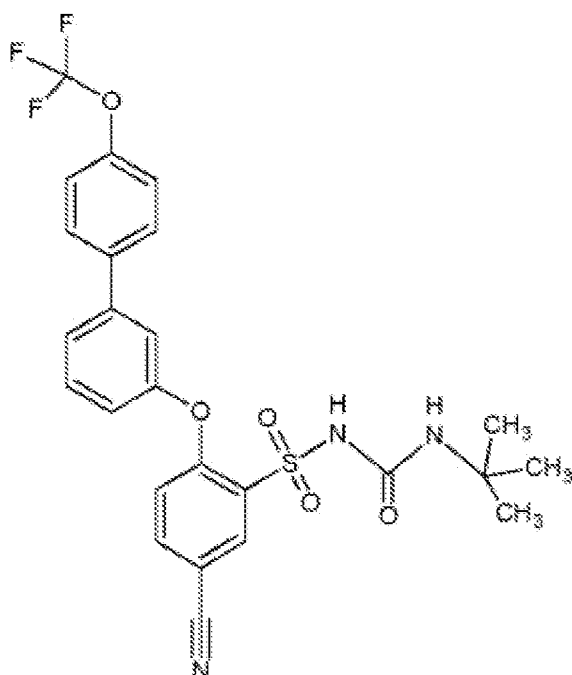
(IV)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

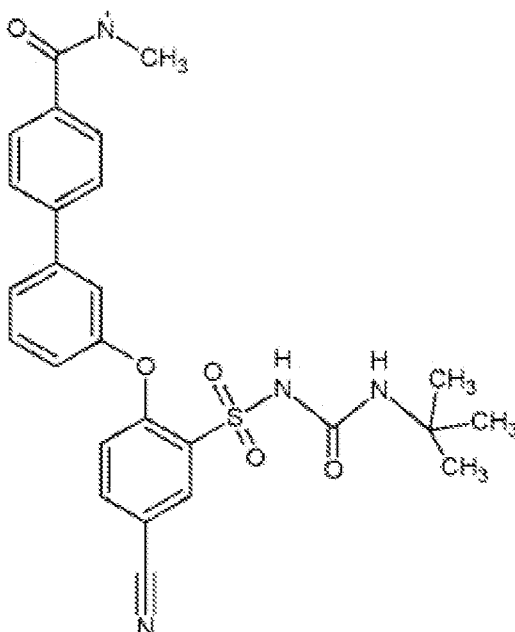
También se describe un compuesto representado por la fórmula (V):

(V)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención proporciona un compuesto representado por la fórmula (X):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los compuestos se pueden usar para tratar enfermedades humanas en las que están implicados los receptores de tromboxano humano (TX) A_2 /receptores prostanoides T/TP.

Los compuestos pueden usarse para tratar enfermedades humanas donde hay una expresión alterada en los niveles de los TP humanos.

Los compuestos se pueden usar para tratar enfermedades humanas en las que hay niveles elevados de TXA_2 .

Los compuestos se pueden usar para tratar enfermedades humanas en las que hay niveles elevados de otras entidades/ligandos bioquímicos (por ejemplo, PGG_2 /PGH₂, 20-HETE o isoprostanos que incluyen 8-iso $PGF_{2\alpha}$) que actúan a través de los TP humanos.

Los compuestos pueden usarse para tratar enfermedades humanas en las que hay niveles elevados de isoprostanos derivados de radicales libres no enzimáticos que señalizan a través de los TP humanos, como el 8-iso- $PGF_{2\alpha}$.

Los compuestos se pueden administrar por diferentes vías de administración que incluyen formulación de depósito oral, inhalación, nebulización, transdérmica, intravenosa, subcutánea, transmusosal, implantable

Los compuestos se pueden utilizar para antagonizar el TP para su uso en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar (PAH).

Los compuestos se pueden usar para tratar la hipertensión arterial pulmonar (PAH) cuando se usan en combinación con otros medicamentos aprobados para tratar esta enfermedad.

Los compuestos se pueden usar en combinación con sensores implantables para medir la presión de la arteria pulmonar, optimizándose o ajustándose la administración terapéutica o la dosificación terapéutica de dichos compuestos a los cambios en dicha presión de la arteria pulmonar medida.

Los compuestos se pueden usar para tratar la trombosis, ya sea solos o en combinación con otros agentes terapéuticos.

Los compuestos se pueden usar para tratar la trombosis de microvasos, ya sea solos o en combinación con otros agentes terapéuticos

Los compuestos se pueden usar para tratar otras enfermedades cardiovasculares, incluidas las ECV asociadas con la diabetes mellitus tipo 1 y 2. Los ejemplos de campos de aplicación, incluyen pero no se limitan a, tratamiento de diversas enfermedades cardiovasculares que incluyen la prevención de aterotrombosis asociada a agregación plaquetaria excesiva, accidente cerebrovascular isquémico, ataque isquémico transitorio (TIA), síndrome coronario agudo. Para estas afecciones, los compuestos de la invención pueden usarse solos o en combinación con otros fármacos terapéuticos.

Los compuestos se pueden usar para tratar otras enfermedades pulmonares, que incluyen, a título enunciativo, asma, y se pueden usar solos o en combinación con otros fármacos terapéuticos.

5 Los compuestos pueden usarse para tratar enfermedades renales y usarse solos o en combinación con otros fármacos terapéuticos.

Los compuestos se pueden usar para tratar enfermedades de la próstata que incluyen, a título enunciativo, hiperplasia benigna de próstata (BPH) y ya sea solos o en combinación con otros fármacos terapéuticos.

10 Los compuestos se pueden usar para tratar enfermedades inflamatorias, y ya sea solos o en combinación con otros fármacos terapéuticos.

Los compuestos pueden usarse para tratar enfermedades neoplásicas que incluyen cánceres, y usarse solos o en combinación con otros fármacos terapéuticos.

15 Los compuestos se pueden usar para tratar el accidente cerebrovascular y el ataque isquémico transitorio (AIT), y se pueden usar solos o en combinación con otros fármacos terapéuticos.

Los compuestos se pueden usar en combinación con moduladores inmunitarios para tratar cánceres.

20 Los compuestos se pueden usar para tratar la función desregulada de las células del músculo liso, tal como, a título enunciativo, varios tipos de hipertensión y colocación de stents posquirúrgicos de restenosis.

Los compuestos se pueden utilizar para tratar la función desregulada de las células endoteliales.

25 Los compuestos se pueden recubrir sobre dispositivos médicos implantables para la administración controlada o local en los sitios de implantación de dichos dispositivos médicos, incluidos stents, balones, injertos de stent, válvulas protésicas, derivaciones, válvulas aórticas abdominales.

30 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra el efecto de los compuestos descritos sobre la movilización de calcio mediada por U46619 en células HEK TP α .

35 La Figura 2 muestra el efecto de los compuestos descritos sobre la movilización de calcio mediada por U46619 en células HEK TP β .

La Figura 3 muestra el efecto de los compuestos descritos sobre la movilización de calcio mediada por U46619 en células HEK TP α .

40 La Figura 4 muestra el efecto de los compuestos descritos sobre la movilización de calcio mediada por U46619 en células HEK TP β .

La Figura 5 muestra el efecto de los compuestos descritos sobre la agregación plaquetaria mediada por U46619.

45 La Figura 6 muestra el efecto de los compuestos descritos sobre la agregación plaquetaria mediada por U46619.

La Figura 7 muestra el efecto de los compuestos descritos sobre la movilización de calcio mediada por Cicaprost en células HEK.hiP.

50 La Figura 8 muestra el efecto de los compuestos descritos sobre la movilización de calcio mediada por EP3/PGE₂ en células HEL 92.1.7.

55 La Figura 9 muestra el efecto de los compuestos descritos sobre la movilización de calcio mediada por 8-iso-PGF_{2 α} en células HEK TP α .

La Figura 10 muestra el efecto de los compuestos descritos sobre la movilización de calcio mediada por 8-iso-PGF_{2 α} en células HEK TP β .

60 La Figura 11 muestra que los compuestos descritos no muestran ningún efecto sobre el receptor DP₁.

La Figura 12 muestra que los compuestos descritos no muestran ningún efecto sobre el receptor EP₁.

La Figura 13 muestra que los compuestos descritos no muestran ningún efecto sobre el receptor EP₂.

65 La Figura 14 muestra que los compuestos descritos no muestran ningún efecto sobre el receptor EP₃.

La Figura 15 muestra que los compuestos descritos no muestran ningún efecto sobre el receptor EP₄.

La Figura 16 muestra que los compuestos descritos no muestran ningún efecto sobre el receptor FP₁.

La Figura 17 muestra que los compuestos descritos no muestran ningún efecto sobre el receptor IP.

La Figura 18 presenta el efecto de los compuestos sobre la señalización mediada por TP o U44069.

La Figura 19 muestra el efecto de los compuestos sobre la presión arterial pulmonar diastólica (dPAP).

La Figura 20 muestra el efecto de los compuestos sobre la presión arterial pulmonar media (mPAP).

La Figura 21 muestra el efecto de los compuestos sobre la presión arterial sistémica media (mAP).

La Figura 22 muestra el efecto de los compuestos sobre el índice de Fulton.

La Figura 23 muestra secciones de tejido pulmonar.

La Figura 24 muestra los efectos de los compuestos sobre la relación diámetro de lumen medio: diámetro del vaso total para las arteriolas totales.

La Figura 25 muestra los efectos de los compuestos sobre la relación diámetro de lumen medio: diámetro del vaso total para las arteriolas pequeñas (< 50 µm).

La Figura 26 muestran los efectos de los compuestos sobre la relación diámetro de lumen medio: diámetro del vaso total para las arteriolas medianas (50-100 µm).

La Figura 27 muestran los efectos de los compuestos sobre la relación diámetro de lumen medio: diámetro del vaso total para arteriolas grandes (> 100 µm).

La Figura 28 muestra secciones de tejido pulmonar FFPE.

La Figura 29 muestra los efectos de los compuestos sobre la remodelación vascular.

Descripción detallada

La invención se refiere a nuevas entidades químicas que actúan como antagonistas del receptor prostanoide T (TP) y a su uso en el tratamiento de enfermedades humanas en las que desempeñan una función el tromboxano (TX) A y todos los demás agentes que actúan como ligandos incidentales del TP, que incluyen el endoperoxido de prostaglandina (PG)G₂/PGH₂, ácido 20-hidroxicicosatetraenoico (20-HETE) y los isoprostanos derivados de radicales libres (por ejemplo, 8-iso-prostaglandina (PG)F_{2α}).

La descripción se refiere generalmente a nuevas entidades/compuestos químicos que actúan como antagonistas del TP para prevenir el TXA₂. PGG₂/H₂, 20-HETE, isoprostanos que incluyen 8-iso-PGF_{2α} o cualquier otro ligando de TP incidental que se una al TP expresado en humanos. Los compuestos de la invención incluyen aquellos que exhiben unión preferencial para el subtipo de receptor TP_α y/o TP_β. Como se analiza en la presente descripción, la invención proporciona compuestos de moléculas pequeñas que, por ejemplo, pero sin limitarse a, propiedades de inhibir la agregación de plaquetas humanas, prevenir la hipertensión arterial pulmonar (PAH) en un modelo preclínico de PAH y exhibir ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción). La descripción proporciona además rutas sintéticas ilustrativas para los nuevos compuestos antagonistas de TP a modo de ejemplo, pero no exhaustivo, de todas las rutas de síntesis. Se describen compuestos ilustrativos

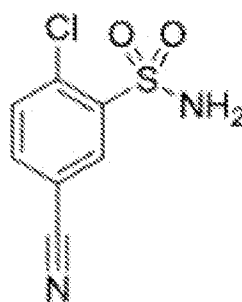
Estos compuestos pueden mostrar una selectividad por el TP significativa y actividad antagonista *ex vivo* en plaquetas humanas y son eficaces para prevenir la hipertensión arterial pulmonar (PAH) en un modelo de enfermedad preclínica de PAH.

Los compuestos inhiben preferentemente la agregación plaquetaria inducida por TXA₂ a una concentración inhibitoria semimáxima (IC₅₀) inferior a 100 nM. Los compuestos inhiben preferentemente la agregación plaquetaria inducida por TXA₂ a una concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) inferior a 50 nM. Los compuestos de la invención preferentemente inhiben la agregación plaquetaria inducida por TXA₂ a una concentración inhibitoria semimáxima (IC₅₀) por debajo de 20 nM. Los compuestos inhiben preferentemente la agregación plaquetaria inducida por TXA₂ a una concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) inferior a 5 nM. Los compuestos previenen la PAH en un modelo preclínico de PAH cuando se usan por debajo de 5 mg/kg/día. Los compuestos pueden inhibir adicionalmente la agregación plaquetaria inducida por TXA₂, pero no la agregación inducida por otros agonistas plaquetarios tales como, por ejemplo, trombina o difosfato de adenosina (ADP). Además, los compuestos

preferiblemente no agonizan o antagonizan la señalización por varios otros receptores acoplados a proteína G, cinasas, fosfatasa o canales iónicos que incluyen el gen relacionado con el gen Ether-a-go-go humano (hERG).

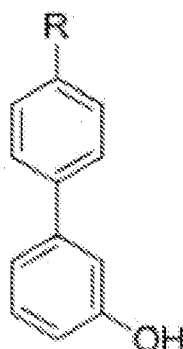
Los compuestos muestran propiedades ADME atractivas. Los compuestos pueden presentar la capacidad de inhibir la movilización de calcio intracelular inducida por agonistas de TP e inhibir la agregación plaquetaria en ensayos *ex vivo*. Los compuestos pueden no mostrar ningún efecto sobre la señalización a través de otros receptores prostanoides (receptor de prostaglandina (PG) D₂, DP; receptores de PGE₂ EP₁ - EP₄; receptor de PGF_{2α}, FP; PGI₂/receptor de prostaciclina, IP) y receptores no prostanoides, incluidos los receptores purinérgicos (ADP) y de trombina (PAR1), también involucrados en la activación plaquetaria similar a las isoformas TP. Además, los compuestos muestran una toxicidad mínima y una permeabilidad celular favorable.

A continuación se muestran ejemplos de métodos de síntesis de los compuestos descritos. Para la síntesis de los compuestos, se hará referencia a SM 8.



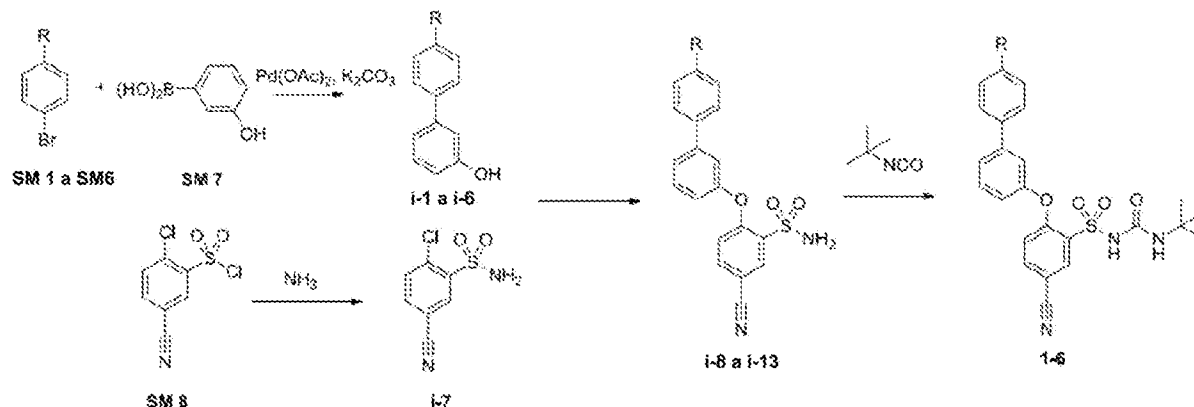
(SM 8)

Además se hará referencia a los intermediarios i-1, i-2, i-3, i-4, i-5, i-6 e i-7.



Donde R = CHF₂ (i-1), R = CF₃ (i-2), R = CONH₂ (i-3), R = CONHMe (i-4), R = CONMe₂ (i-5), R = CN (i-6).

Una ruta sintética se describe en la Ruta 1.

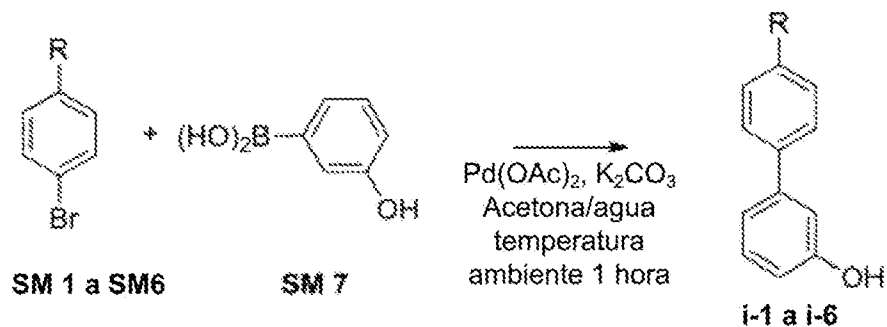


Ruta 1

Una variedad de bromuros de arilo (SM 1 a SM 6) experimenta un acoplamiento mediado por paladio con ácido 3-hidroxifenilborónico (SM 7) para generar intermediarios i-1 a i-6. Los intermedios de fenol i-1 a i-6 se someten a

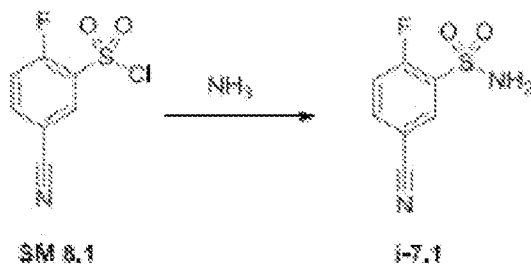
ipso-sustitución del cloro en i-7 (formado a partir de SM 8) para dar i-8 a i-14 que, al reaccionar con isocianato de terc-butilo, proporcionan los compuestos descritos.

Como se muestra en la Ruta del esquema 2, la variedad de bromuros de arilo (SM 1 a SM 6) se acopla mediado por paladio con ácido 3-hidroxifenilborónico (SM 7) para generar intermediarios i-1 a i-6, mientras que i-7 se produce a partir de SM 8.



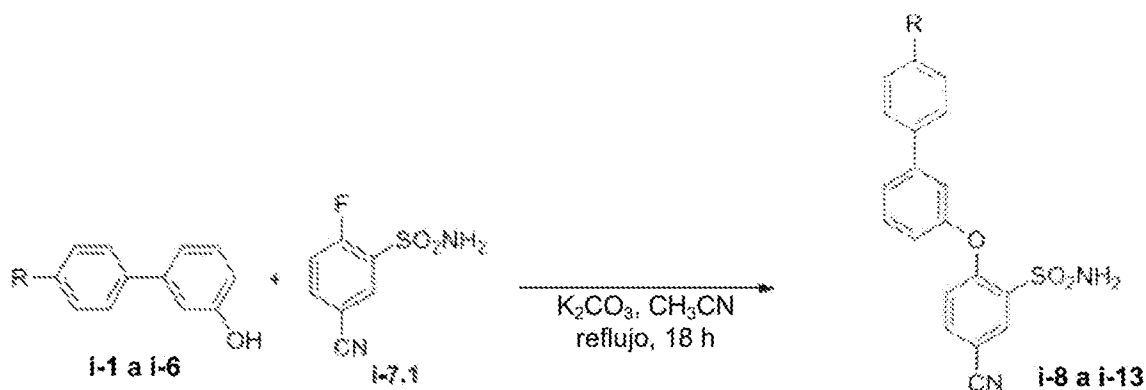
Ruta 2

SM 8.1 se compra y se convierte en la correspondiente sulfonamida i-7.1 mediante el uso de la Ruta 3.



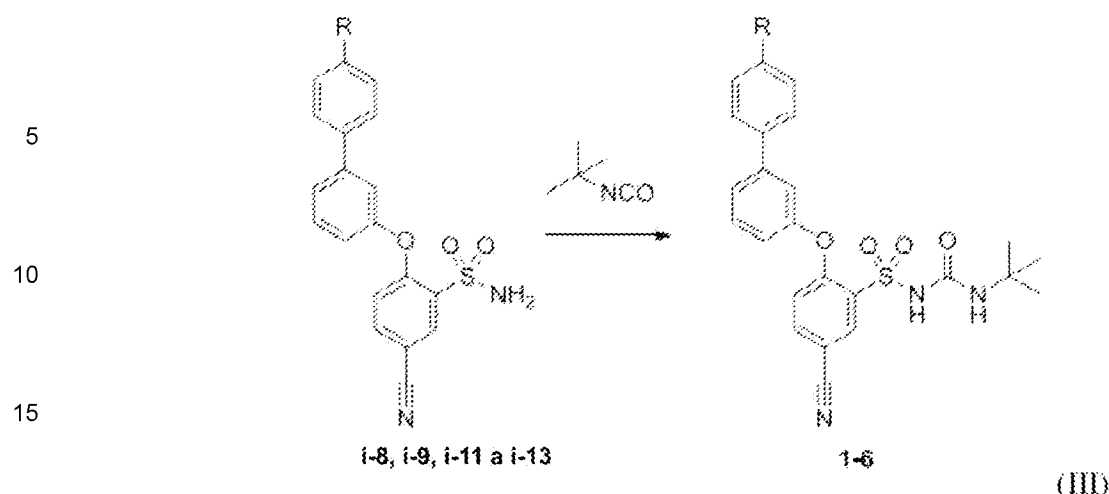
Ruta 3

El intermediario fluorado i-7.1 se hace reaccionar con los seis fenoles i-1 a i-6 como se muestra en la Ruta 4, lo que resulta en conversiones excelentes.



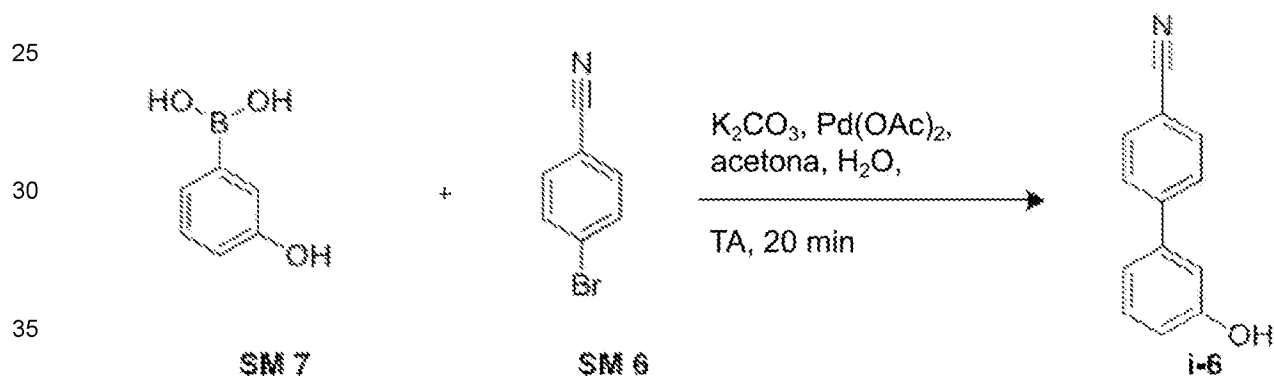
Ruta 4

Los intermediarios i-8, i-9 e i-11 a i-13 se someten a una conversión limpia con isocianato de terc-butilo, Ruta 5, (> 70 % por LCMS) para proporcionar 1, 2, 4 a 6 crudos que se purifican por HPLC preparativa de fase inversa para proporcionar los objetivos con un rendimiento de 40-60 % con purezas superiores a 96 %. La Ruta 5 proporciona un compuesto de Fórmula (III).



Ruta 5

La preparación de 4-(3-hidroxifenil)benzonitrilo (i-6) puede incluir la Ruta 6.

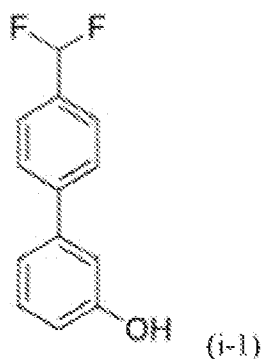


Ruta 6

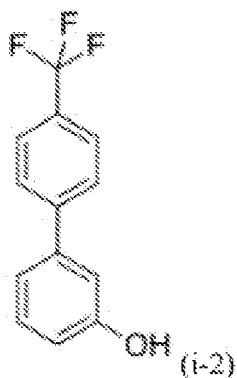
40 Se burbujea nitrógeno a través de una mezcla de ácido 3-hidroxibencenoborónico (SM 7, 2,00 g, 14,5 mmol), 4-bromobenzonitrilo (SM 6, 2,90 g, 15,9 mmol) y carbonato de potasio (2,20 g, 15,9 mmol) en acetona (65 mL) y H₂O (120 mL) durante 5 minutos. Se añade Pd(OAc)₂ (325 mg, 1,45 mmol) y la mezcla se agita bajo una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos, tras lo cual el análisis LC-MS muestra que la reacción se ha completado. La mezcla de reacción se concentra al vacío, se acidifica con una solución acuosa saturada de NH₄Cl (50 mL) y se extrae con DCM (200 mL, después 2 x 75 mL). Las fases orgánicas combinadas se pasan a través de un separador de fases y se concentran hasta sequedad al vacío. El producto crudo se absorbe sobre sílice y se purifica mediante cromatografía MPLC en un cartucho de sílice Biotage de 100 g (que eluye con gradiente de DCM/EtOAc de 0 a 40 %). El compuesto objetivo, 4-(3-hidroxifenil)benzonitrilo (i-6) se aísla como un sólido blanco.

Los compuestos i-1 a i-5 se preparan de forma similar.

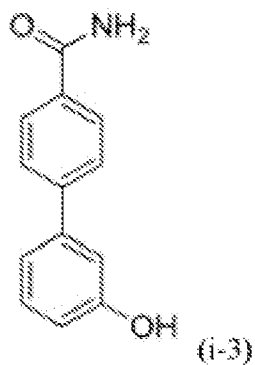
55 Para llegar al 3-[4-(difluorometil)fenil]fenol (I-1) para su uso en los compuestos, se puede usar SM (1,1-bromo-4-(difluorometil)-benceno). (Elución con gradiente de isohexano/DCM de 0 a 100 %). El compuesto objetivo 3-[4-(difluorometil)fenil]fenol (i-1) se aísla como un sólido blanco.



Para el 3-[4-(trifluorometil)fenil]fenol (i-2) para su uso en los compuestos, se puede usar SM 2 (4-bromobenzotrifluoruro). (Elución con gradiente de isohexano/DCM de 0 a 100 %). El compuesto objetivo 3-[4-(trifluorometil)fenil]fenol (i-2) se aísla como un sólido blanco.

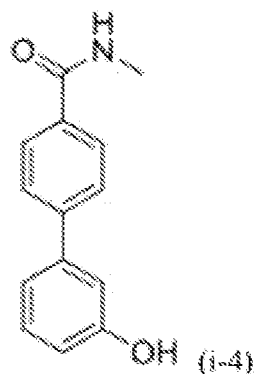


Para preparar 4-(3-hidroxifenil)benzamida (i-3) para su uso en los compuestos, se puede usar SM-3 (4-bromobenzamida). Se modifica el procedimiento genérico y la mezcla de reacción del crudo se recrystaliza en EtOAc). El compuesto objetivo, 4-(3-hidroxifenil)benzamida (i-3) se aísla como un sólido blanco.

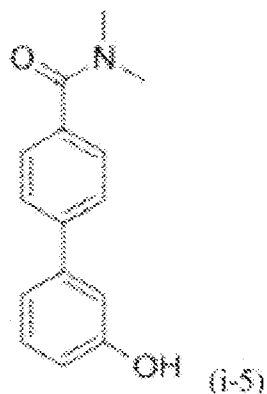


Para preparar 4-(3-hidroxifenil)-N-metil-benzamida (i-4) para su uso en los compuestos, se puede usar SM-4 (N-metil-4-bromobenzamida).

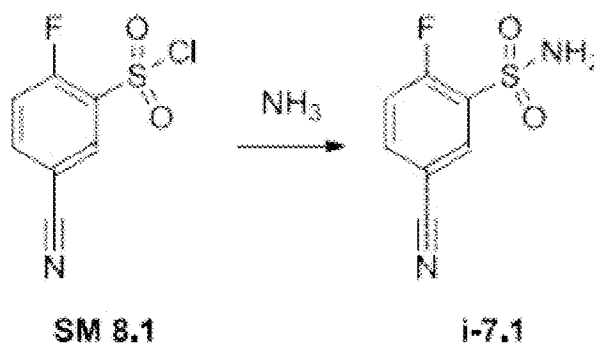
El compuesto objetivo, 4-(3-hidroxifenil)-N-metilbenzamida (i-4) se aísla como un sólido blanco.



Para preparar 4-(3-hidroxifenil)-N,N-dimetil-benzamida (i-5) para su uso en los compuestos, se puede usar SM-5 (N,N-dimetil-4-bromobenzamida). Se modifica el procedimiento genérico y la mezcla de reacción del crudo se recristaliza en EtOAc). El compuesto objetivo, 4-(3-hidroxifenil)-N,N-dimetil-benzamida (i-5) se aísla como un sólido blanco.



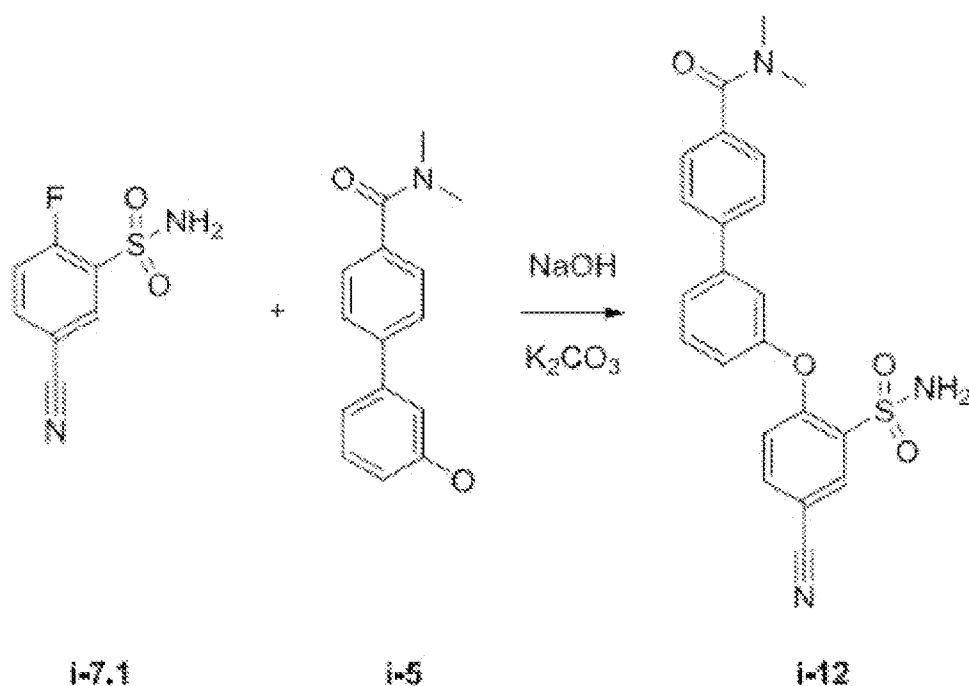
La preparación de 5-ciano-2-fluoro-bencenosulfonamida (i-7.1) puede incluir la Ruta 7.



Ruta 7

Se enfría una solución de amoníaco (7 M en MeOH, 4,5 mL, 31,5 mmol) en agua helada y se añade una solución de cloruro de 5-ciano-2-fluorobencenosulfonilo (SM 8.1, 0,99 g, 4,51 mmol) en THF (20 mL) gota a gota. La mezcla de reacción se agita durante 30 minutos, después de lo cual el análisis LC-MS muestra que la reacción se ha completado. La mezcla de reacción se concentra al vacío, se añade agua (40 mL) y después se extrae con DCM (100 mL y después 2 x 50 mL). Las fases orgánicas se pasan a través de un separador de fases, se combinan y se concentran hasta sequedad al vacío para dar 5-ciano-2-fluoro-bencenosulfonamida (i-7.1) como un sólido blanco que se usa sin purificación adicional.

La preparación de 4-[3-(4-ciano-2-sulfamoil-fenoxi)fenil]-N,N-dimetil-benzamida (i-12) puede incluir la Ruta 8.

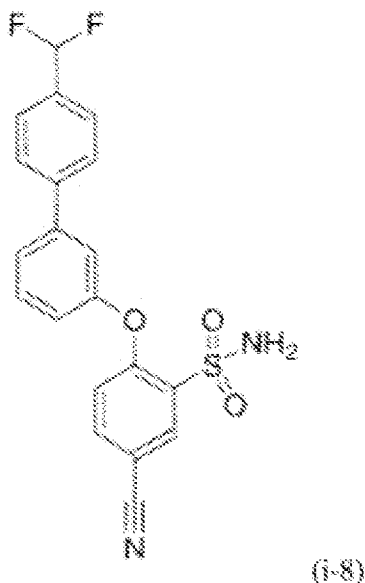


Ruta 8

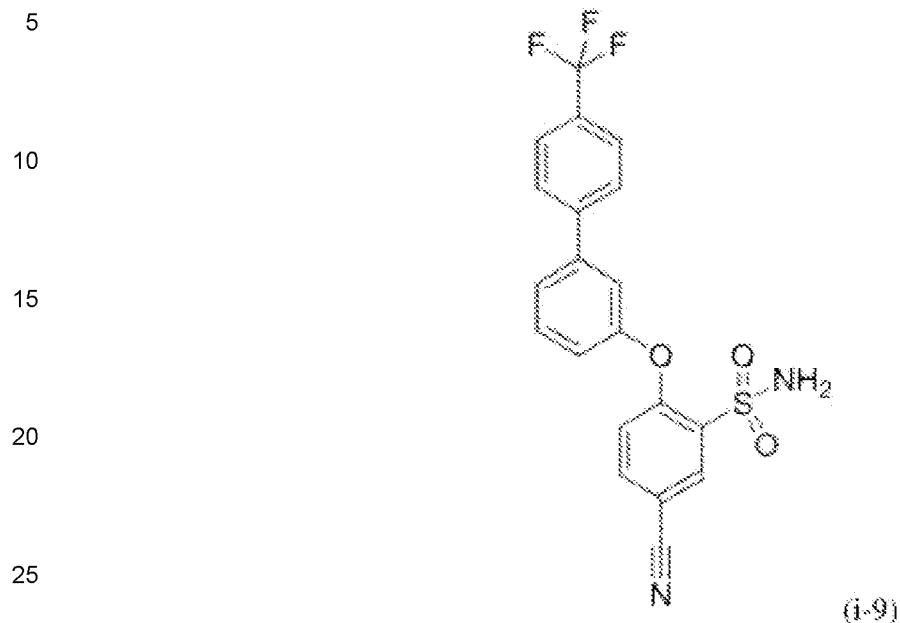
Aquí, se añade NaOH 2,1 M (0,55 mL, 1,15 mmol) a 4-(3-hidroxifenil)-N,N-dimetil-benzamida (253 mg, 1,05 mmol) suspendida en dioxano (7 mL) y se agita durante 5 minutos. La mezcla se concentra hasta sequedad al vacío, se añade acetonitrilo seco (7 mL) seguido de 5-ciano-2-fluoro-bencenosulfonamida (126 mg, 0,63 mmol) y K₂CO₃ (609 mg, 4,41 mmol) y la mezcla de reacción se agita a 85 °C durante la noche. La LC-MS no muestra restos de sulfonamida. La mezcla de reacción se añade a HCl 2 M (10 mL), se diluye con agua (40 mL) y se extrae con EtOAc (30 mL, 2 x 15 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (15 mL), se secan (MgSO₄) y se concentran a sequedad al vacío. La reacción en bruto se purifica mediante cromatografía MPLC en un cartucho de sílice Biotage de 10 g (eluyendo con gradiente de iso-hexano/EtOAc del 40 al 100 %). Se aísla el compuesto objetivo, 4-[3-(4-ciano-2-sulfamoyl-fenoxi) fenil]-N,N-dimetil-benzamida (i-12).

De forma similar se prepararon los compuestos i-8, i-9, i-11 e i-13 a partir de fenoles i-1, i-2, i-4 e i-6 respectivamente.

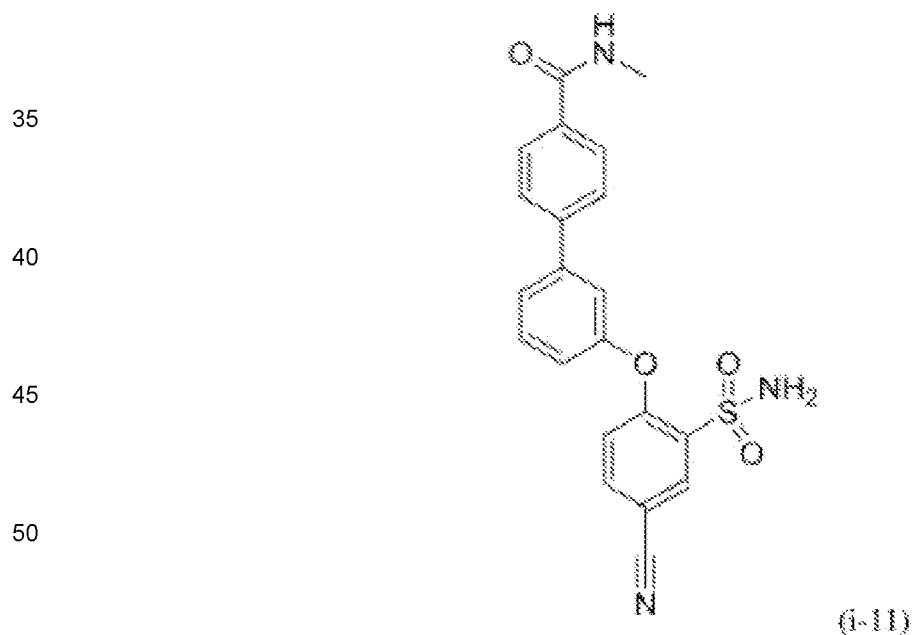
Para la 5-ciano-2-[3-[4-(difluorometil)fenil]fenoxi] bencenosulfonamida (i-8), se usa i-1 (231 mg, 1,05 mmol). (Elución con gradiente de isohexano/EtOAc de 5 a 45 100 %). Se aísla un compuesto, 5-ciano-2-[3-[4-(difluorometil)fenil] fenoxi]bencenosulfonamida (i-8).



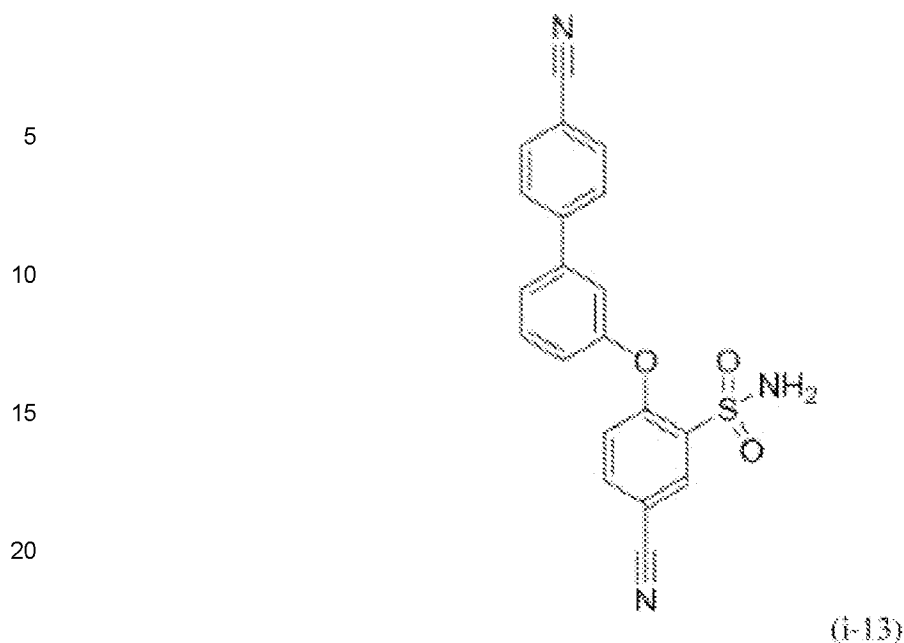
Para 5-ciano-2-[3-[4-(trifluorometil) fenil]fenoxi] bencenosulfonamida (i-9), se usa i-2 (250 mg, 1,05 mmol). (Elución con gradiente de isohexano/EtOAc de 0 a 35 %). Se aísla el compuesto, 5-ciano-2-[3-[4-(trifluorometil)fenil] fenoxi]bencenosulfonamida (i-9).



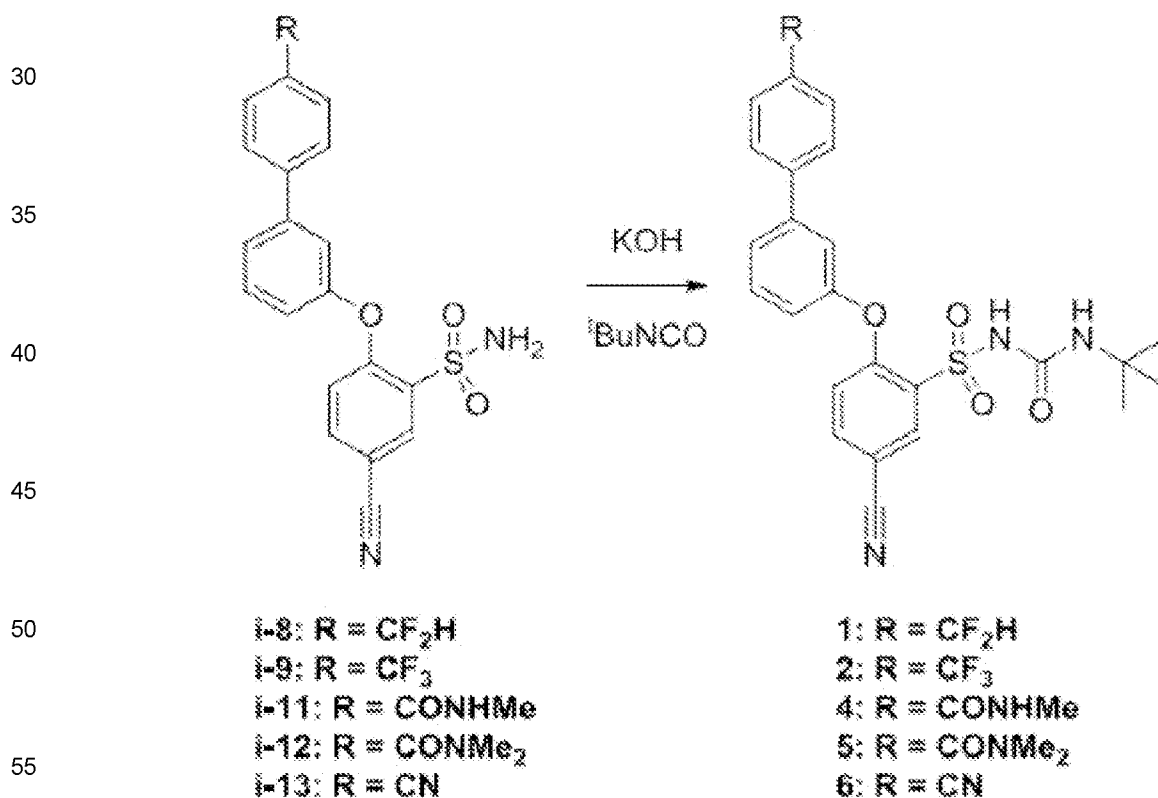
Para 4-[3-(4-Ciano-2-sulfamoi-fenoxi)fenil]-N-metil-benzamida (i-11), se usa i-4 (238 mg, 1,05 mmol). (Elución con gradiente de isohexano/EtOAc de 40 a 100 %). Se aísla el compuesto 4-[3-(4-ciano-2-sulfamoi-fenoxi)fenil]-N-metil-benzamida (i-11).



Para la 5-ciano-2-[3-(4-cianofenil)fenoxi]bencenosulfonamida (i-13), se usa i-6 (205 mg, 1,05 mmol). (Elución con gradiente de isohexano/EtOAc de 10 a 55 %). Se aísla el compuesto, 5-ciano-2-[3-(4-cianofenil) fenoxi]bencenosulfonamida (i-13).



25 Los compuestos descritos en la presente descripción pueden sintetizarse mediante el uso de la Ruta 9 para la preparación genérica de N-(terc-butylcarbamoil)-5-ciano-2-((4'-(sustituido)-[1,1'-bifenil]-3-ilo)oxi)bencenosulfonamidas (1 a 6).

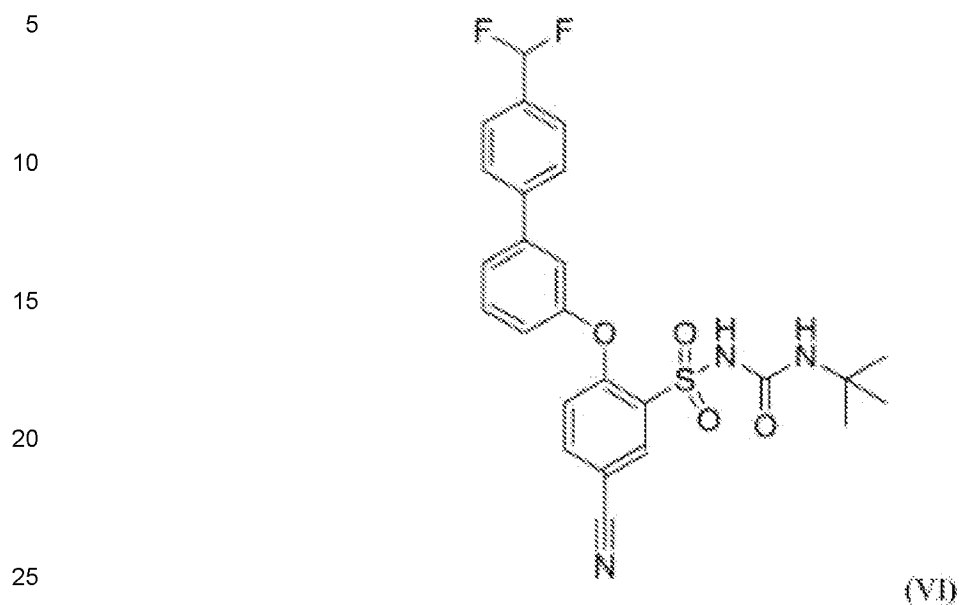


Ruta 9

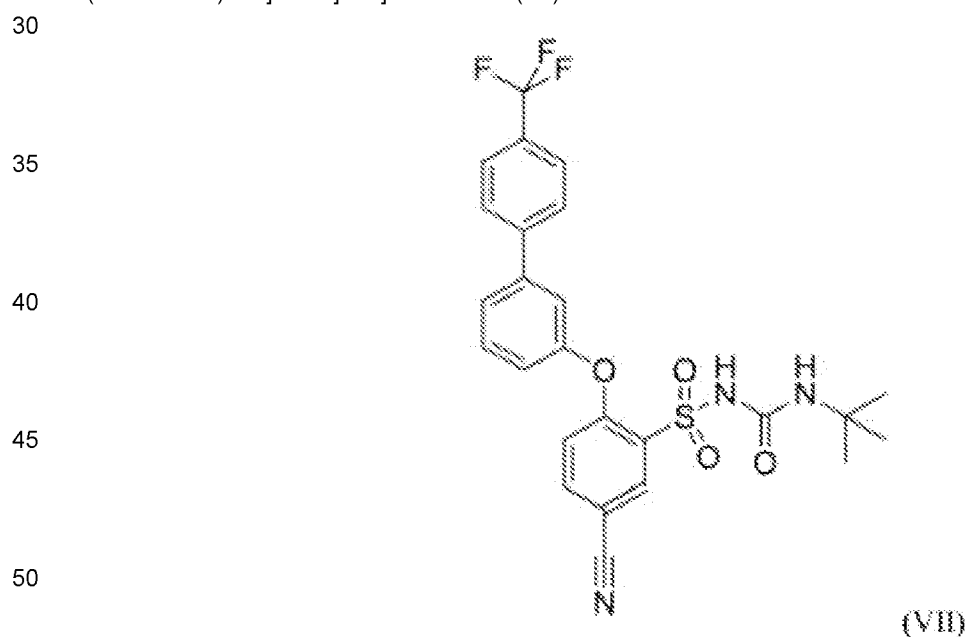
60 Las 5-ciano-2-((4'-(sustituido)-[1,1'-bifenil]-3-ilo)oxi)bencenosulfonamidas (i-8 a i-13) se agitan en dioxano (10 mL por mmol) y se añadió KOH 3,1 M (1,1 eq.). Las mezclas se agitan durante 10 minutos y después se concentran hasta sequedad al vacío. Se añade DMF seca (7 mL por mmol) seguido de isocianato de terc-butilo (2,5 eq.). Y las mezclas de reacción se agitan a temperatura ambiente durante 18 horas. Las mezclas de reacción se concentran al vacío y se añade HCl 2 M (1,7 mL por mmol). Después, se extrae con EtOAc (3 x 7 mL por mmol). Las fases orgánicas se combinan y se concentran a sequedad al vacío. Los residuos se disuelven en DMSO y se purifican mediante HPLC preparativa de fase inversa. Los compuestos diana se aíslan como sólidos blancos con rendimientos de aproximadamente 35-60 %.

65

Los métodos descritos en la presente descripción se pueden usar para producir 1-terc-butil-3-[5-ciano-2- [3-[4-(difluorometil)fenil]fenoxi]fenil]sulfonil-urea (VI).

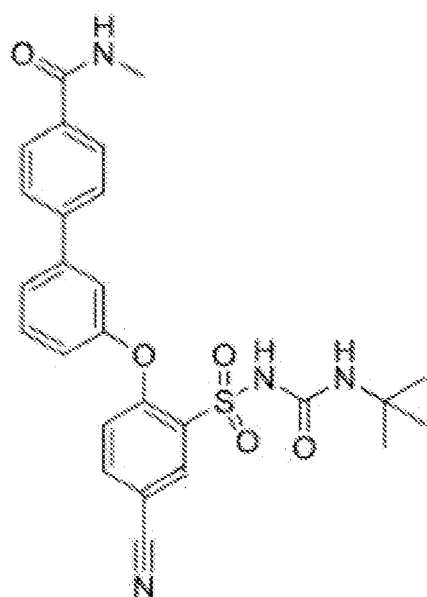


Los métodos descritos en la presente descripción se pueden usar para producir 1-terc-butil-3-[5-ciano-2- [3-[4-(difluorometil)fenil]fenoxi]fenil]sulfonil-urea (VII)



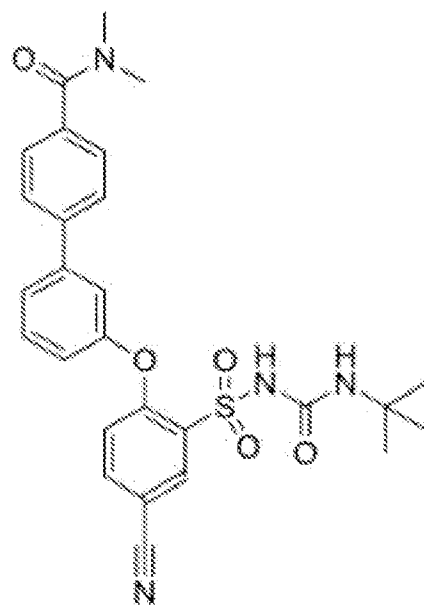
Los métodos descritos en la presente descripción se pueden usar para producir 4-[3-[2-(terc-butilcarbamoilsulfamoil)-4-ciano-fenoxi]fenil]-N-metil-benzamida (IX)

55



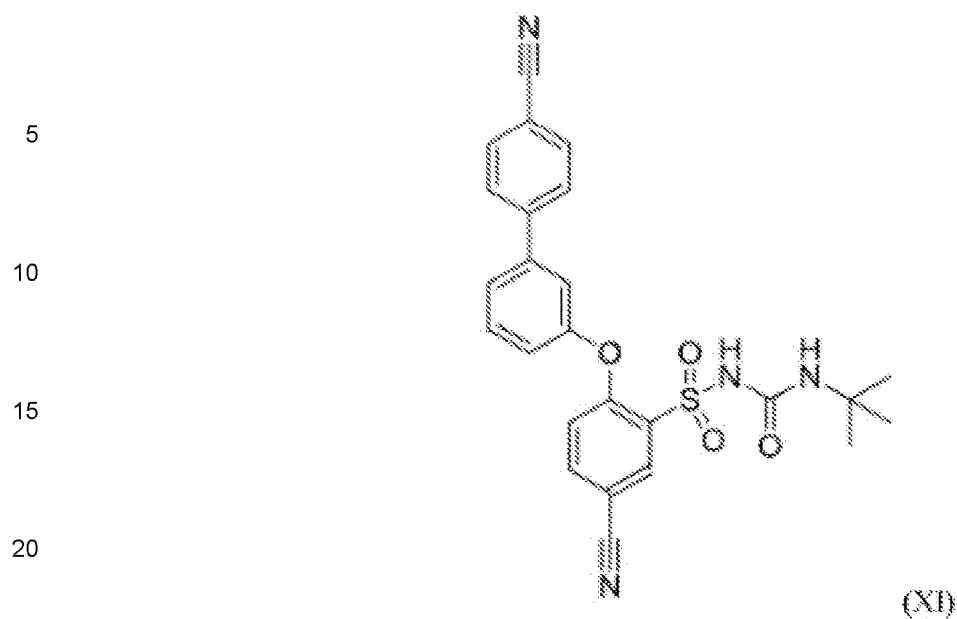
(IX)

Los métodos descritos en la presente descripción se pueden usar para producir 4-[3-[2-(terc-butilcarbamoilsulfamoil)-4-ciano-fenoxi]fenil]-N,N-dimetil-benzamida (X)

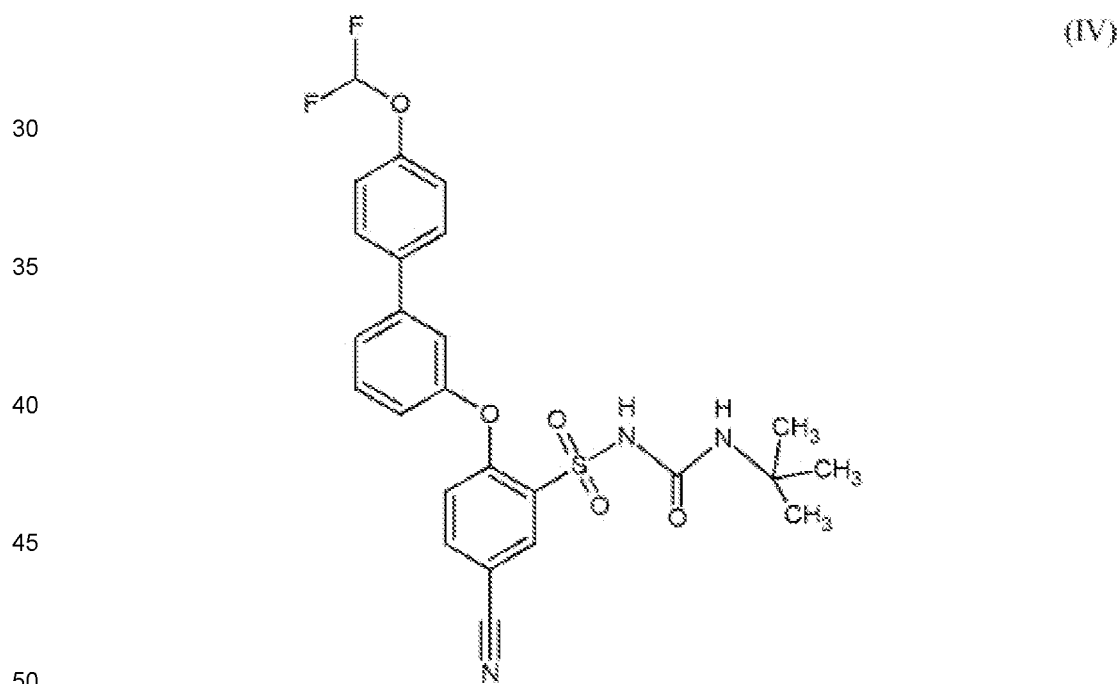


(X)

Los métodos descritos en la presente descripción se pueden usar para producir 1-terc-butil-3-[5-ciano-2-[3-(4-cianofenil)fenoxi]fenil]sulfonil-urea (XI).

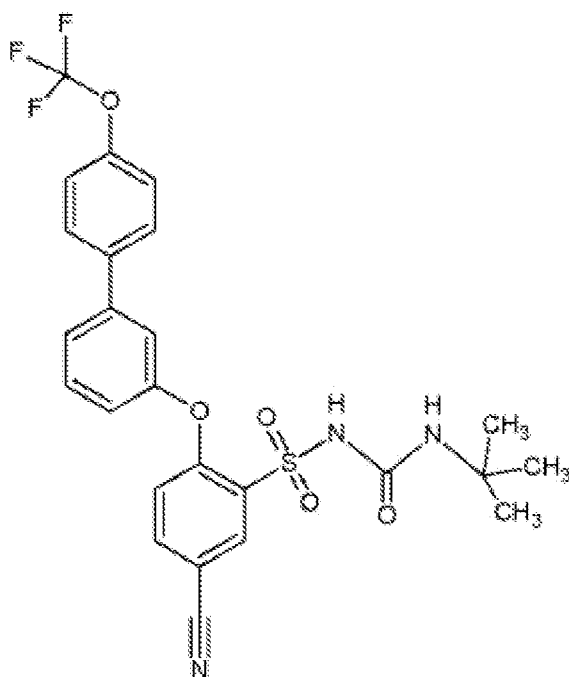


25 Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse en la producción de un compuesto de fórmula (IV).



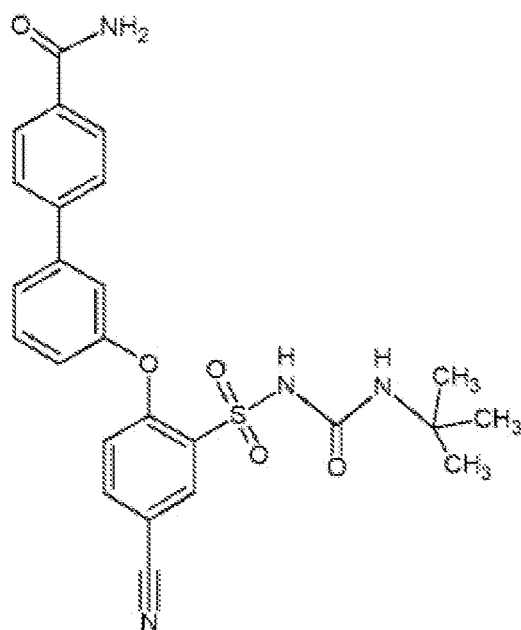
55 Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse en la producción de un compuesto de fórmula (V).

(V)

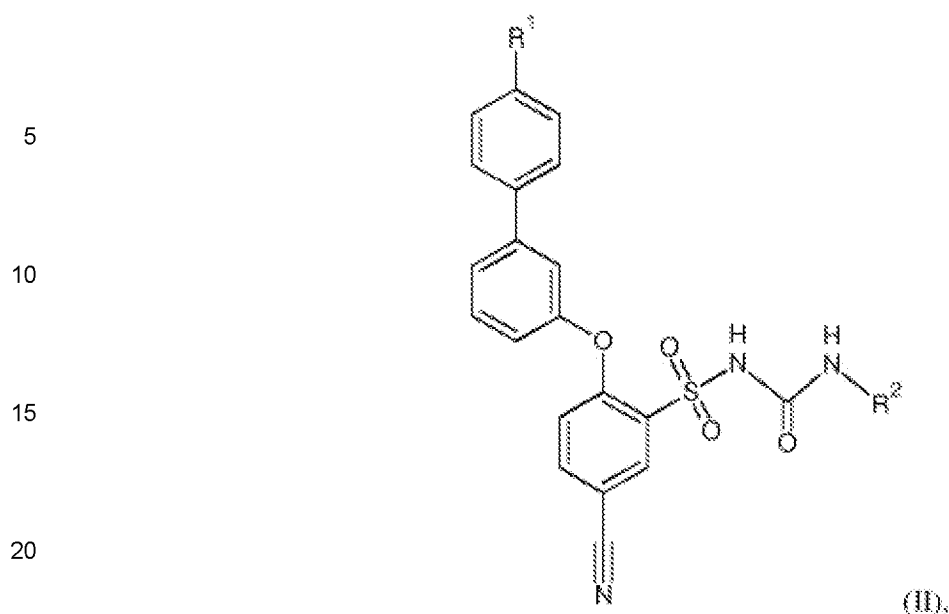


Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse en la producción de un compuesto de fórmula (VIII).

(VIII)



Por lo tanto, puede observarse que los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse en la producción de un compuesto de fórmula (II)



en donde R¹ es un halógeno, un grupo alquilo, un grupo cicloalquilo, un grupo arilo, un grupo heterocicloalquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo cicloalquilo halogenado, un grupo arilo halogenado, un grupo heterocicloalquilo halogenado, un grupo metoxi halogenado, un grupo etoxi, un grupo isopropoxi, un grupo terc-butoxi, un grupo etoxi halogenado, un grupo isopropoxi halogenado, un grupo terc-butoxi halogenado, una amida primaria, una amida secundaria, una amida terciaria, OH, un halógeno, CO₂H, metil cetona, un grupo nitrilo, un grupo éster metílico, un grupo éster etílico, un grupo éster isopropílico, un grupo éster terc-butílico, un grupo éster metílico halogenado, un grupo éster etílico halogenado, un grupo éster isopropílico halogenado o un grupo éster terc-butílico halogenado; y R² es un halógeno, un grupo alquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo arilo o un grupo arilo halogenado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Halogenado puede significar sustituido con uno o más de F, CL, BR, I y At, y preferentemente uno o más de F y Cl.

El compuesto de la invención puede estar en una forma de sal farmacéuticamente aceptable o como la base libre. Las vías de administración adecuadas incluyen oral, bucal, tópica (que incluye transdérmica), inyección, intravenosa, nasal, pulmonar y con o sobre un dispositivo médico implantable (por ejemplo, endoprótesis vascular o equivalentes de catéter con globo o endoprótesis vascular con elución de fármaco).

Un experto en la materia puede determinar fácilmente la dosis eficaz de cada agente, al tener en cuenta factores típicos tales como la edad, el peso, el sexo y la historia clínica del paciente. Una dosis típica podría ser, por ejemplo, 1-1000 mg/kg, preferentemente 5-500 mg/kg por día, o menos de aproximadamente 5 mg/kg, por ejemplo administrada una vez al día, cada dos días, cada pocos días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, o una vez al mes, o un número limitado de veces, como solo una, dos o tres o más veces.

Una composición farmacéutica que contiene cada ingrediente activo puede estar en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo, como tabletas, comprimidos, pastillas, de fusión rápida, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas o jarabes o elixires. Las composiciones destinadas a uso oral pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados entre agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes, con el fin de proporcionar preparaciones de buen gusto y sabrosas farmacéuticamente. Las tabletas contienen el ingrediente activo mezclado con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la fabricación de tabletas. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y disgregantes, por ejemplo, almidón de maíz o ácido alginico; agentes aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina o acacia, y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Las tabletas pueden no estar recubiertas o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración en el estómago y la absorción más abajo en el tracto gastrointestinal y de ese modo proporcionar una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo de tiempo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Pueden recubrirse además mediante las técnicas descritas en las patentes US-4.256.108, US-4.166.452 y US-4.265.874, para formar tabletas terapéuticas osmóticas para el control de la liberación. La preparación y administración de compuestos se describe en la patente US-6.214.841 y la publicación US 2003/0232877, que se incorporan por referencia en la presente descripción en su totalidad.

Las formulaciones para uso oral pueden presentarse además como cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o

caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

- 5 Puede lograrse una formulación oral alternativa, en la que se busca el control de la hidrólisis del compuesto en el tracto gastrointestinal, mediante el uso de una formulación de liberación controlada, en la que un compuesto de la invención se encapsula en un recubrimiento entérico.

10 Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos mezclados con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; agentes dispersantes o humectantes tales como un fosfátido de origen natural, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxietanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como polioxietileno. Las suspensiones 15 derivadas de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitán. Las suspensiones acuosas pueden contener además uno o más conservantes, por ejemplo *p*-hidroxibenzoato de etilo o *n*-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

20 Las suspensiones oleosas pueden formularse mediante suspensión del ingrediente activo en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes edulcorantes como los expuestos anteriormente y agentes aromatizantes para proporcionar una preparación oral agradable. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante como el ácido ascórbico.

25 Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo mezclado con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Se ejemplifican agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados, por ejemplo, pueden estar presentes además agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

30 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo parafina líquida o mezclas de estos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas naturales, por ejemplo goma arábiga o goma tragacanto, fosfátidos naturales, por ejemplo soja, lecitina y ésteres o 35 ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxietileno sorbitán. Las emulsiones pueden contener además agentes edulcorantes y aromatizantes.

40 Los jarabes y elixires pueden formularse con agentes edulcorantes, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Tales formulaciones pueden contener además un demulcente, un conservante y agentes aromatizantes y colorantes. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida mediante el uso de aquellos agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril puede estar además en una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o 45 solvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Adicionalmente, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles como solvente o medio de suspensión. Para este propósito, puede emplearse cualquier aceite fijo suave, que incluye mono o diglicéridos sintéticos. Adicionalmente, los ácidos grasos tal como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

50 Cada agente activo, que incluye el compuesto de la invención, puede administrarse además en forma de supositorios para la administración rectal del fármaco. Estas composiciones pueden prepararse mediante mezcla del fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas ordinarias pero líquido a la temperatura rectal y, por tanto, se derretirá en el recto para liberar el fármaco. Ejemplos de tales materiales son manteca de cacao y polietilenglicoles.

55 Para uso tópico, son adecuadas cremas, ungüentos, gelatinas, tabletas de fusión rápida, soluciones o suspensiones, así como las formas nebulizadas para administración pulmonar. La aplicación tópica incluye el uso de enjuagues bucales y gárgaras.

60 Se describen dispositivos tales como dispositivos médicos implantables que incluyen un compuesto antitrombótico. También se describe un stent (por ejemplo, un stent liberador de fármacos) o balón que comprende un compuesto de la invención o un compuesto de la invención junto con otros fármacos complementarios tales como sirolimus, paclitaxel, tPA, uroquinasa, etc. Un dispositivo puede ser una prótesis de válvula aórtica liberadora de fármacos o una prótesis de válvula mitral liberadora de fármacos. Por consiguiente, se describe la administración de un 65 compuesto de la invención a través de la administración desde un stent, válvula aórtica o válvula mitral. También se describe una válvula aórtica liberadora de fármacos o una válvula mitral liberadora de fármacos.

Se describe un dispositivo médico implantable o balón que comprende un compuesto de la invención para su uso en intervención cardiovascular percutánea (PCI). Un dispositivo puede ser un stent o un globo. También se describen métodos para usar dispositivos que comprenden compuestos antitrombóticos. Los dispositivos y métodos descritos en la presente descripción pueden proporcionar un compuesto antagonista de TP en un stent (por ejemplo, DES), balón, dispositivo implantable o dispositivo quirúrgico o un compuesto de la invención junto con otros fármacos complementarios tales como tPA, uroquinasa, etc. Los dispositivos y compuestos antitrombóticos se analizan en la patente US-7.947.302; patente US-7.618.949; y la publicación US 2006/0122143.

Un stent puede comprender una estructura similar a un tubo de malla, por ejemplo, para usarse junto con la angioplastia para mantener abierta permanentemente una arteria en el sitio estrechado en el vaso sanguíneo, permitiendo el flujo sanguíneo sin restricciones, o para soportar una debilidad o "aneurisma" en la pared de la arteria del vaso sanguíneo. Los stents se describen en la patente US-6.796.998; patente US-6.352.552; publicación US 2005/0015136; publicación US 2005/0010279; y la publicación US 2007/0168015.

El compuesto de la invención puede proporcionar un agente de recubrimiento para stents, stents liberadores de fármacos (DES), stents de bifurcación, stents de vasos de injerto de derivación, balones, dispositivos médicos o dispositivos quirúrgicos utilizados, por ejemplo, para tratar accidentes cerebrovasculares u otros eventos trombóticos. Al antagonizar el receptor TP en plaquetas y macrófagos, estos compuestos evitarán la agregación y secreción plaquetaria en sitios de daño vascular local y contrarrestarán los efectos inflamatorios de niveles elevados de TXA₂ en sitios de daño vascular local. Al antagonizar el TP en las células del músculo liso (SMC), los compuestos evitarán la proliferación de SMC inducida por TXA₂, el engrosamiento de la neointima y la restenosis. Además, dado que el TP media además las acciones adversas del isoprostano 8-iso-prostaglandina (PG)F_{2α}, generado en abundancia a partir del ácido araquidónico de forma no enzimática a partir de radicales libres en situaciones de estrés oxidativo/lesión, incluida la isquemia, los compuestos de la invención pueden inhibir además las acciones indeseables de 8-iso-PGF_{2α} dentro del vaso sanguíneo dañado. La combinación de estos compuestos con niveles muy bajos de sirolimus y/o paclitaxel puede ser sinérgica para prevenir aún más la restenosis y al mismo tiempo eliminar o reducir los efectos adversos asociados con niveles altos locales de sirolimus o paxlitaxol. La combinación del compuesto junto con fármacos de lisis de coágulos tales como tPA, uroquinasa o un tipo de fármaco relacionado puede lisar coágulos en sitios de oclusión y prevenir la formación de nuevos trombos, tales como en el tratamiento de aterotrombosis, accidente cerebrovascular isquémico o cerebral, etc. Los DES se analizan en la patente US-7.135.038; patente US-5.697.967; publicación US 2011/0099785; publicación US 2010/0023115; y la publicación US 2005/0043788. El revestimiento de los stents se describe en la patente US-7.833.544 y la publicación US 2009/0062904.

La invención puede proporcionar un antagonista de TP con aplicaciones novedosas como recubrimiento o componente de un dispositivo utilizado solo o en combinación con niveles muy bajos de sirolimus y/o paxlitaxol. El perfil de liberación y el momento del perfil de liberación tanto del compuesto de la invención junto con sirolimus y/o paxlitaxol pueden optimizarse para maximizar los efectos antitrombóticos y anti-reestenosis. Esto puede resultar en la prevención de la señalización por los niveles elevados de TXA₂ y del isoprostano 8-iso-PGF_{2α}, que se encuentra cerca de los vasos sanguíneos dañados después de la angioplastia y la colocación de endoprótesis vasculares. La prevención de esta señalización previene o reduce el deterioro de la respuesta inmunitaria del huésped que surge debido a niveles elevados de TXA₂ y del isoprostano 8-iso-PGF_{2α}, en la vecindad de vasos sanguíneos dañados después de la angioplastia y la colocación de endoprótesis vasculares. El compuesto de la invención puede prevenir además la restenosis, por ejemplo, al antagonizar la TP en las células del músculo liso. El compuesto de la invención también podría recubrir las válvulas aórtica o mitral que se utilizan en TAVI (intervención de válvula aórtica transcáteter) para tratar la estenosis aórtica. Tal recubrimiento con los compuestos sobre las válvulas aórtica o mitral puede prevenir la aparición de trombos o accidentes cerebrovasculares después de la cirugía de TAVI.

La invención proporciona un compuesto que se puede usar como recubrimiento sobre stents metálicos desnudos, stents entretejidos, stents y balones de elución de fármacos, stents de bifurcación y stents de injerto de derivación, a saber, para su uso como: (a) un agente antirrestenosis, (b) un agente antitrombótico y (c) un agente pro reendotelialización. Los compuestos de la invención se liberarían de dichos dispositivos médicos recubiertos usados en el tratamiento de diversas enfermedades de la vasculatura, incluida la enfermedad arterial coronaria (CAD) y la enfermedad arterial periférica (PAD), de una manera predefinida que incluye liberación de orden cero, liberación de primer orden y/o una combinación de liberación inicial abrupta seguida de liberación controlada durante un período de tiempo definido (por ejemplo, 12 meses). El compuesto de la invención puede ser particularmente beneficioso en pacientes resistentes a la aspirina (~30 % de la población general) que son aún más vulnerables a la trombosis coronaria aguda del stent y que desarrollan niveles elevados de prostanoides tales como TXA₂ después de la colocación del stent (Ruef y Kranzhofer, 2006, J Inter. Cardiol. Vol 19, páginas 507-509). Otras aplicaciones del nuevo fármaco de molécula pequeña como recubrimiento en dispositivos médicos incluyen aplicaciones en (a) endoprótesis vasculares con bifurcación o endoprótesis vasculares de lesiones por injerto de derivación, (b) agentes de disolución de coágulos en dispositivos médicos usados para tratar accidentes cerebrovasculares y prevención adicional de la formación de coágulos en dispositivos médicos para aplicaciones neurológicas, (c) así como también un recubrimiento en los filtros de la vena cava inferior (IVCF) usados para tratar la trombosis venosa profunda (DVT) grave o la embolia pulmonar (PE) en varios tipos de pacientes, que incluyen aquellos que se someten a diversas intervenciones quirúrgicas tal como cirugía bariátrica, cirugía ortopédica, pacientes traumatizados y pacientes diabéticos sometidos a intervención quirúrgica. La administración de fármacos desde dispositivos se describe en la patente US-7.713.538; publicación US 2004/0213818 y la publicación US 2009/031129.

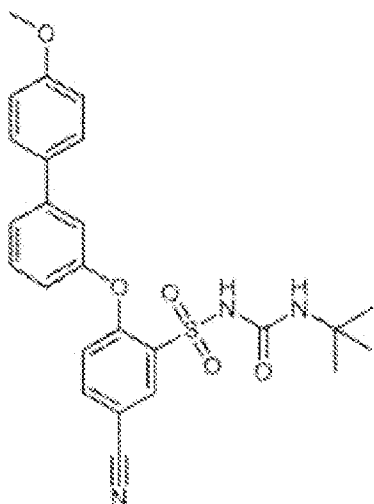
Los compuestos de la invención como antagonistas de TP deben actuar como fármacos terapéuticos para la hipertensión arterial pulmonar (PAH), no solo al inhibir la vasoconstricción excesiva sino también mediante prevención de la microtrombosis y, potencialmente, limitan la remodelación de la arteria pulmonar, la hipertrofia del ventrículo derecho (RV), la disfunción de células endoteliales y la inflamación local encontrada en la PAH. El compuesto de la invención también puede suprimir directamente las vías de inflamación o proliferación implicadas en la PAH. Sumado a esto, dado que el TP además media las acciones del 8-iso-PGF_{2α}, un isoprostano derivado de radicales libres generado en abundancia en el entorno clínico de la PAH, así como también en otras enfermedades que implican estrés oxidativo o lesión y que media de forma similar acciones frente a TXA₂, los compuestos de la invención además antagonizarán estos efectos en la PAH. Además, como el TXA₂ es un potente agente proinflamatorio y mitogénico que promueve la remodelación vascular, la restenosis y/o la hipertrofia y es el principal prostanoide constrictor derivado de la ciclooxigenasa (COX) dentro del pulmón, el compuesto de la invención antagonizará estos efectos.

Por lo tanto, el compuesto de la invención tendría una ventaja adicional sobre otros agentes terapéuticos de PAH utilizados, ya que dicho compuesto no solo inhibiría el TXA₂, la principal prostaglandina vasoconstrictora producida en el pulmón, sino que también inhibiría las acciones adversas del isoprostano derivado del estrés oxidativo 8-iso-PGF_{2α}, además de las del propio TXA₂, su precursor de endoperoxido PGG₂/PGH₂ y 20-HETE, por ejemplo. Además de la PAH, en otras enfermedades como la aterotrombosis, el reemplazo del tratamiento de referencia con aspirina por el compuesto de la invención ofrecerá varias ventajas, ya que: (i) no solo bloquean la acción de TXA₂ sino también de agonistas de TP insensibles a la aspirina (por ejemplo, 8-iso-PGF_{2α}, generados en abundancia por radicales libres durante la lesión oxidativa); (ii) también (a diferencia de la aspirina), inhibirá el TP expresado en las células del lecho vascular y en los macrófagos/monocitos circulantes, presentes durante la aterotrombosis inflamatoria; (iii) superan la resistencia a la aspirina, que se estima que ocurre en aproximadamente el 33 % de la población.

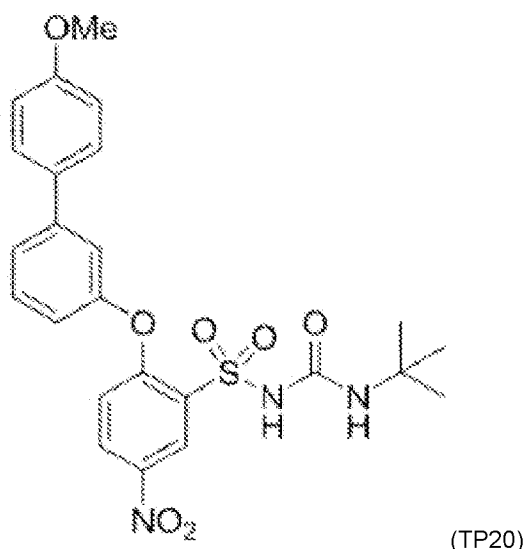
Como varios compuestos de la invención no requieren metabolismo hepático para lograr una forma terapéutica activa, proporcionan el beneficio de un efecto terapéutico inmediato dentro de la vasculatura en el sitio de liberación o entorno local inmediato del dispositivo médico recubierto. Este recubrimiento de fármaco en dispositivos médicos tiene aplicaciones como profilaxis y/o como terapéutico.

Ejemplos

La invención proporciona la síntesis y evaluación biológica de una variedad de compuestos (nuevas entidades químicas, denominadas NTP42 - NTP49) que actúan como antagonistas de las (iso)formas TP α y/o TP β del receptor de tromboxano (TX) A₂ humano, también denominado receptor de prostanoide T o, de forma abreviada, TP. Estos antagonistas del TP inhibirán las acciones (antagonizarán) del tromboxano (TX)A₂, y del isoprostano 8-iso-prostaglandina (PG)F_{2α} derivado de radicales libres y de todos los demás agentes incidentales (por ejemplo, el endoperoxido PGG₂/PGH₂ y 20-HETE) que activan (actúan como agonistas o como agonistas parciales) del TP. El TP se expresa en una variedad de tipos de células en todo el cuerpo y los compuestos (antagonistas de TP) descritos en la presente descripción se dirigen a los TP (que incluyen TP α y/o TP β) que se expresan en todos esos tipos de células. Adicionalmente, la expresión alterada de los TP ocurre en una variedad de situaciones de enfermedad y los compuestos (antagonistas de TP) descritos en la presente descripción se dirigen a los TP (que incluyen TP α y/o TP β) que se expresan en todos esos tipos de células y en diferentes situaciones de enfermedad, que incluyen la inflamación y en el cáncer. Además, los compuestos pueden usarse en cualquier formato de fármaco (tal como, pero sin limitarse a, sistemas de suministro oral, i.v, i.p, dérmico, transdérmico o en dispositivos médicos, como endoprótesis vasculares o endoprótesis vasculares con elución de fármacos). Se hace referencia a compuestos con fórmulas NTP4 y TP20, y además ver Tabla 5, al final.



(NTP4)



Aquí, hemos aumentado con éxito la eficacia de NTP4 al reemplazar un grupo metoxi con difluorometoxi (en NTP42), trifluorometoxi (en NTP43), difluoro (NTP44), trifluoro (NTP45), amida secundaria (-C(=O)NHMe; NTP47), amida terciaria (-C(=O)N(Me)2; NTP48) o nitrilo (NTP49), de los cuales identificamos tres nuevos posibles compuestos altamente potentes, eficaces y deseables, NTP42, NTP43 y NTP48. Estos ejemplos ilustran compuestos que se han sintetizado y examinado para determinar la actividad biológica (por ejemplo, NTP42 -NTP49), donde los compuestos NTP4 y TP20 sirvieron como compuestos de referencia o de control. Hemos llevado a cabo una química medicinal adicional altamente enfocada para mejorar aún más la eficacia de NTP4 mientras se conserva su especificidad como antagonista selectivo de TP. La especificidad de los compuestos líderes como antagonistas específicos de TP se ha confirmado mediante su capacidad para inhibir la movilización de calcio intracelular inducida por agonistas y en ensayos de eficacia mediante su capacidad para inhibir la agregación plaquetaria en ensayos ex vivo. Más específicamente, los resultados establecieron que, al igual que TP20 y NTP4, ni NTP42, NTP43 ni NTP48 presentaron ningún efecto sobre la señalización a través de otros prostanoides (receptor de prostaglandina (PG) D₂, DP; receptores de PGE₂ EP1, EP2, EP3 y EP4; receptor de PGF_{2α}, FP; PGI₂/receptor de prostaciclina, IP) y receptores no prostanoides, incluidos los receptores purinérgicos (ADP) y de trombina (PAR1), también involucrados en la activación plaquetaria similar a las isoformas TP. Se ha confirmado que NTP42, NTP43 y NTP48 no muestran ningún efecto sobre la señalización mediada por DP, EP1-EP4, FP o IP. Los datos han confirmado que NTP42, NTP43 y NTP48 exhiben una toxicidad mínima y una permeabilidad celular favorable.

Hemos desarrollado una nueva serie de antagonistas NTP42-NTP49 altamente específicos de TP (selectivos de TP α y TP β) que han sido sometidos a evaluación biológica. La fórmula III muestra estructuras genéricas de los compuestos NTP42-NTP49, donde R1 puede ser un difluorometoxi (en NTP42), trifluorometoxi (en NTP43), difluoro (en NTP44), trifluoro (en NTP45), amida secundaria (-C(=O)NHMe; en NTP47), amida terciaria (-C(=O)N(Me)2; en NTP48) o por un grupo nitrilo (en NTP49) para generar siete derivaciones nuevas, altamente potentes, eficaces y deseables.

Adicionalmente a la aplicación principal de antagonistas de TP para el tratamiento de diversas enfermedades CV, existen muchas otras indicaciones de enfermedades, que incluyen enfermedades con designaciones de enfermedad huérfana, para uso o desarrollo comercial de nuestra tecnología de antagonistas de TP. Por ejemplo: estos antagonistas de TP inhibirán las acciones del tromboxano (TX)A₂ y del isoprostano 8-iso-prostaglandina (PG)F_{2α} derivado de radicales libres y de todos los demás agentes incidentales (por ejemplo, el endoperoxido PGG₂/PGH₂, 20-HETE) que activan (actúan como agonistas o como agonistas parciales) del TP. Como se indicó, el TP se expresa en una variedad de tipos de células en todo el cuerpo y los compuestos (antagonistas de TP) descritos en la presente descripción se dirigen a los TP (que incluyen TP α y/o TP β) que se expresan en todos esos tipos de células. Adicionalmente, la expresión alterada de los TP ocurre en una variedad de situaciones de enfermedad y los compuestos (antagonistas de TP) descritos en la presente descripción se dirigen a los TP (que incluyen TP α y/o TP β) que se expresan en todos esos tipos de células y en diferentes situaciones de enfermedad, que incluyen la inflamación y en el cáncer. Además, los compuestos pueden usarse en cualquier formato de fármaco (tal como, pero sin limitarse a, sistemas de suministro oral, i.v., i.p., dérmico, transdérmico o en dispositivos médicos, como endoprótesis vasculares o endoprótesis vasculares con elución de fármacos).

Ejemplo 1: Evaluación de NTP42 - NTP49

NTP42-NTP49, variantes del grupo norte de NTP4, se evaluaron mediante ensayos de movilización de calcio mediante el uso de células HEK 293 patentadas que sobreexpresan el receptor de tromboxano (TX)A₂, las isoformas α (TP α) y β (TP β), denominadas células HEK.TP α y HEK.TP β , respectivamente. El cribado inicial implicó ensayos de respuesta a la dosis (concentraciones utilizadas 0,0001 (solo TP β), 0,001, 0,1, 1 y 10 μ M; (TP α y TP β)) seguido de ensayos de respuesta a la dosis completa más centrados (rango de concentración: 0,00001 a 10 μ M) para la determinación de los valores de CI₅₀ donde el efecto de los compuestos sobre el calcio movilizado en respuesta al

mimético de TXA₂ U46619 (1 µM) se realizó en comparación lado a lado con los compuestos principales clave TP20 y NTP4. Los resultados se muestran en las Figuras 1-4 y la Tabla 1 (n ≥ 4).

Conclusiones:

(A) Pruebas iniciales: Ensayos de movilización de calcio: Los nuevos compuestos NTP42 - NTP49 inhiben potentemente la movilización de calcio mediada por TPα y TPβ, donde NTP42 y NTP48 presentan una mayor potencia que TP20, según lo determinado en los ensayos de movilización de calcio de respuesta a la dosis. Ver Figuras 1 a 4, y la Tabla 1 para más detalles. El orden de la escala de potencia de las 2 líneas celulares se indica más abajo:

TPα: NTP48 > NTP42 > NTP43 > TP20 >> NTP4

TPβ: NTP48 > NTP42 > TP20 ≥ NTP43 > NTP4

(B) Ensayos de agregación plaquetaria *ex vivo*: En ensayos preliminares de agregación plaquetaria, realizados utilizando el agregómetro de plaquetas PAP-8E, NTP42, NTP43 y NTP48 han demostrado potencia en la inhibición de la agregación plaquetaria mediada por U46619, donde el orden de clasificación es:

Plaquetas: NTP48 > NTP42 > TP20 > NTP43 ≥ NTP4

Ver Figuras 5 y 6, y la Tabla 2 para más detalles.

(C) Especificidad (ver Figuras 7, 8 y 11-17 para más detalles): En ensayos preliminares para determinar la especificidad de los nuevos compuestos, NTP42-NTP49 no ha mostrado ningún efecto sobre la movilización de calcio mediada por IP/cicaprost o EP/PGE₂. Específicamente, se encontró que NTP42-NTP49 no tuvieron ningún efecto sobre las respuestas de calcio mediadas por hIP/cicaprost o EP/PGE₂. Hasta la fecha, con la excepción de NTP46, se ha probado el efecto de los compuestos NTP44 -NTP49 sobre la señalización por el receptor PGI₂, IP y los receptores PGE₂/EP y, al igual que TP20 y NTP4, se ha confirmado que los nuevos compuestos NTP42, NTP43 y NTP48 no muestran ningún efecto sobre la señalización mediada por IP, EP. Los datos han confirmado que los nuevos compuestos líderes NTP42, NTP43 y NTP48 presentan una toxicidad mínima y una permeabilidad celular favorable.

Además, otras pruebas de especificidad establecieron que ni NTP42 ni NTP48 presentaron ningún efecto sobre la señalización a través de otros receptores prostanoides (receptor de prostaglandina (PG) D₂, DP; receptores de PGE₂ EP1, EP2, EP3 y EP4; receptor de PGF_{2α}, FP; PGI₂/receptor de prostaciclina, IP) y receptores no prostanoides, incluidos los receptores purinérgicos (ADP) y de trombina (PAR1), también involucrados en la activación plaquetaria similar a las isoformas TP. Se ha confirmado que NTP42, NTP43 y NTP48 no muestran ningún efecto sobre la señalización mediada por DP, EP1-EP4, FP o IP. Los datos han confirmado que NTP42, NTP43 y NTP48 exhiben una toxicidad mínima y una permeabilidad celular favorable.

(A) Pruebas iniciales: Efecto de NTP42 - NTP49 en la movilización de calcio mediada por U46619

Como se ha indicado, NTP42 - NTP49 se seleccionaron a través de ensayos de movilización de calcio mediante el uso de células HEK.TPα y HEK.TPβ que sobreexpresan las isoformas α (TPα) y β (TPβ), respectivamente, del receptor de tromboxano (TX)A₂. La selección inicial involucró ensayos de dosis-respuesta donde los compuestos, usados a 0,0001 (solo TPβ), 0,001, 0,1, 1 y 10 µM (TPα y TPβ), se evaluaron por su capacidad para inhibir el mimético U46619 (1 µM) de TXA₂. Los compuestos se probaron en ensayos en paralelo con los compuestos líderes principales TP20 y NTP4 identificados previamente. Los resultados se muestran más abajo.

La Figura 1 muestra el efecto de los antagonistas de TP sobre la movilización de calcio mediada por U46619 en células HEK TPα (Aislado HR#4). Las células HEK.TPα (HR#4), precargadas con Fluo-4, se incubaron con TP20, NTP4, NTP42, NTP43, NTP44, NTP45, NTP47, NTP48 y NTP49, donde cada antagonista se usó a 0,001, 0,1, 1 y hasta 10 µM, como se indica, antes de la estimulación con 1 µM de U46619. Los datos se presentan como el porcentaje medio (± S.E.M.) de la respuesta inducida por el agonista en las células tratadas con vehículo (Porcentaje de control; %) y representa datos de al menos 4 experimentos independientes en los que las células se trataron por duplicado.

La Figura 2 muestra el efecto de los antagonistas de TP sobre la movilización de calcio mediada por U46619 en células HEK TPβ. Las células HEK.TPβ (EM#8), precargadas con Fluo-4, se incubaron con TP20, NTP4, NTP42, NTP43, NTP44, NTP45, NTP47, NTP48 y NTP49 donde cada antagonista se usó a 0,0001, 0,001, 0,1, 1 & a 10 µM, como se indica, antes de la estimulación con 1 µM de U46619. Los datos se presentan como el porcentaje medio (± S.E.M.) de la respuesta inducida por el agonista en las células tratadas con vehículo (Porcentaje de control; %) y representa datos de al menos 4 experimentos independientes en los que las células se trataron por duplicado.

Comentarios:

Consistente con los datos anteriores, los compuestos de referencia/líderes TP20 y NTP4 inhiben la movilización de calcio mediada por U46619 en células HEK.TPα y HEK.TPβ. Asimismo, las nuevas variantes del grupo norte (NTP42-NTP49)

inhiben las respuestas mediadas por U46619 en ambas líneas celulares, aunque en grados variables. Además, en la mayoría de los casos, el nivel de inhibición es mayor que el observado para NTP4. De los datos anteriores, los compuestos nuevos más activos incluyen NTP42, NTP43 & NTP48. Estos compuestos se sometieron a un examen adicional a través de ensayos de respuesta a la dosis completa para determinar los valores de IC₅₀ para la inhibición.

La Figura 3 muestra el efecto de los antagonistas de TP sobre la movilización de calcio mediada por U46619 en células HEK TP α (Aislado HR#4).

Las células HEK.TP α (HR#4), precargadas con Fluo-4, se incubaron con TP20, NTP4, NTP42, NTP43 y NTP48 donde cada antagonista se usó a 0,00001 - 10 μ M, como se indica, antes de la estimulación con 1 μ M de U46619. Los datos se presentan como el porcentaje medio ($\pm$ S.E.M.) de la respuesta inducida por el agonista en las células tratadas con vehículo (Porcentaje de control; %) y representa datos de al menos 3 experimentos independientes en los que las células se trataron por duplicado.

La Figura 4 muestra el efecto de los antagonistas de TP sobre la movilización de calcio mediada por U46619 en células HEK TP β . Las células HEK.TP β (EM#8), precargadas con Fluo-4, se incubaron con TP20, NTP4, NTP42, NTP43 y NTP48 donde cada antagonista se usó a 0,00001 -10 μ M, como se indica, antes de la estimulación con 1 μ M U46619. Los datos se presentan como el porcentaje medio ($\pm$ S.E.M.) de la respuesta inducida por el agonista en las células tratadas con vehículo (Porcentaje de control; %) y representa datos de al menos 4 experimentos independientes en los que las células se trataron por duplicado.

Tabla 1. Valores estimados de IC₅₀ para la inhibición de la movilización de [Ca²⁺]_i mediada por U46619 en células HEK.TP α y HEK.TP β .

Antagonista de TP	Valores de IC ₅₀ para la inhibición de la movilización de [Ca ²⁺] _i mediada por U46619 (nM)	
	TP α	TP β
TP20	125 $\pm$ 11,4 (n = 5)	9,61 $\pm$ 1,46 (n = 6)
NTP4	593 $\pm$ 83,6 (n = 5)	60,4 $\pm$ 8,00 (n = 6)
NTP42	56,2 $\pm$ 4,84 (n = 6)	8,25 $\pm$ 0,73 (n = 10)
NTP43	105 $\pm$ 7,95 (n = 6)	18,4 $\pm$ 1,63 (n = 9)
NTP48	90,1 $\pm$ 6,43 (n = 4)	5,06 $\pm$ 1,50 (n = 6)

Comentario:

A partir de estudios anteriores de SAR, TP20 y NTP4 se identificaron como compuestos líderes principales. De acuerdo con esto, tanto TP20 como NTP4 inhibieron potentemente la movilización de calcio mediada por U46619 en células HEK.TP α y HEK.TP β , donde se determinó que los valores de IC₅₀ para la inhibición de las respuestas mediadas por TP β estaban en el rango nanomolar (consúltese la Tabla 1 para conocer las cifras específicas para cada compuesto en cada línea celular). De manera similar, los compuestos NTP42 - NTP49 inhibieron de manera potente las respuestas mediadas por U46619 en ambas líneas celulares. En particular, los compuestos NTP42, NTP43 y NTP48 fueron los más efectivos y se seleccionaron para un análisis más detallado y la determinación de los valores de IC₅₀. Los valores de IC₅₀ indican que NTP42, NTP43 y NTP48 son más eficaces en antagonizar las respuestas de TP α y TP β que NTP4, es decir, la sustitución del grupo metoxi con una di-, trifluorometoxi o una amida terciaria tiene una eficacia mejorada. Los tres compuestos, NTP42, NTP43 y NTP48, se sometieron a una caracterización adicional mediante ensayos de calcio y agregación plaquetaria.

(B) Efecto de NTP42 a NTP49 en la agregación plaquetaria mediada por U46619:

Para evaluar NTP42 - NTP49 en un segundo ensayo independiente, se examinó el efecto de los compuestos sobre los ensayos de agregación plaquetaria mediados por U46619. Claramente, desde el punto de vista de la eficacia, este es un ensayo importante y, fisiológicamente, el más relevante con respecto a la diana terapéutica.

La selección inicial implicó ensayos de dosis-respuesta donde los compuestos, usados a 7,8125, 15,625, 31,25, 62,5 y 125 nM, se evaluaron por su capacidad para inhibir la agregación plaquetaria inducida por el mimético U46619 de TXA₂ (1 μ M). Los compuestos se probaron en ensayos en paralelo con el compuesto líder principal TP20 previamente identificado mediante el uso del agregómetro de plaquetas PAP-8E. Los resultados se muestran más abajo.

La Figura 5 muestra el efecto de NTP42 a NTP49 sobre la agregación plaquetaria mediada por U46619. El PRP se preparó a partir de sangre extraída de voluntarios sanos en jeringas que contenían citrato de sodio al 3,8 % e indometacina 10 μ M de modo que la relación final de anticoagulante con sangre fuera 1:9. Se preincubaron alícuotas de PRP (300 μ l) durante 10 min con los antagonistas de TP, TP20, NTP42, NTP43, NTP44, NTP45, NTP47, NTP48 y NTP49, donde se prepararon diluciones en serie 1:2 de 0,25 μ M para cada uno, antes de estimular las plaquetas con 1 μ M de U46619, incubadas a 37 °C, con agitación. Los resultados se presentan como porcentaje de agregación

(media $\pm$ S.E.M.), según se determinó por los cambios en la transmisión de la luz a lo largo del tiempo con el uso del perfilador de agregación plaquetaria PAP-8E y representa datos de 4 experimentos independientes ($n = 4$).

Comentarios:

Al igual que el compuesto de referencia TP20, las nuevas entidades químicas NTP42-NTP49 inhiben de forma potente la agregación de plaquetas humanas mediada por U46619 *ex vivo*, donde NTP42, NTP43 y NTP48 son las más eficaces. Por tanto, en ensayos posteriores, el efecto de NTP42, NTP43 y NTP48 y, como compuestos de referencia TP20 y NTP4, sobre la agregación plaquetaria mediada por U46619 en comparaciones en paralelo se realizó mediante el uso del agregómetro de plaquetas PAP-8E.

La Figura 6 muestra el efecto de NTP42, NTP43 y NTP48 sobre la agregación plaquetaria mediada por U46619. El PRP se preparó a partir de sangre extraída de voluntarios sanos en jeringas que contenían citrato de sodio al 3,8 % e indometacina 10 μ M de modo que la relación final de anticoagulante con sangre fuera 1:9. Se preincubaron alícuotas de PRP (300 μ l) durante 10 min con los antagonistas de TP, TP20, NTP4, NTP42, NTP43 y NTP48, donde se prepararon diluciones en serie de 2 veces de 1 μ M para cada una, antes de estimular las plaquetas con 1 μ M de U46619, incubado a 37 °C, con agitación. Los resultados se presentan como porcentaje de agregación (media $\pm$ S.E.M.), según se determinó por los cambios en la transmisión de luz a lo largo del tiempo con el uso del perfilador de agregación plaquetaria PAP-8E y representa datos de al menos 3 experimentos independientes ($n \geq 3$).

Tabla 2. Valores de IC₅₀ estimados para la inhibición de la agregación plaquetaria mediada por U46619.

Antagonista de TP	Valores de IC ₅₀ para la inhibición de la agregación plaquetaria mediada por U46619 (nM)
TP20	4,62 $\pm$ 0,72 ($n = 6$)
NTP4	21,3 $\pm$ 1,01 ($n = 6$)
NTP42	1,01 $\pm$ 1,07 ($n = 6$)
NTP43	22,0 $\pm$ 2,03 ($n = 6$)
NTP48	9,45 $\pm$ 1,38 ($n = 3$)

Comentarios:

Los compuestos NTP42, NTP43 y NTP48 inhibieron las respuestas mediadas por U46619, donde tanto NTP42 como NTP48 fueron más potentes que TP20 o NTP4. NTP43 exhibió una potencia equivalente a NTP4 para inhibir las respuestas mediadas por U46619.

(C) Pruebas de especificidad: Efecto de NTP42 a NTP49 en la movilización de calcio mediada por hIP y EP3

Para confirmar la especificidad de los nuevos compuestos NTP42 a NTP49, se examinó su efecto sobre las respuestas mediadas por hIP (Cicaprost) y EP (PGE₂) en células HEK.hIP y HEL 92.1.7, respectivamente. Los compuestos se probaron a 10 μ M, cuyos resultados se muestran más abajo.

La Figura 7 muestra el efecto de los antagonistas de TP sobre la movilización de calcio mediada por Cicaprost en células HEK.hIP. Las células HEK.hIP, precargadas con Fluo-4, se incubaron con TP20, NTP4, NTP42, NTP43, NTP45, NTP47, NTP48 y NTP49 donde cada antagonista se usó a 10 μ M, como se indica, antes de la estimulación con 1 μ M de Cicaprost. Los datos se presentan como el porcentaje medio ($\pm$ S.E.M.) de la respuesta inducida por el agonista en las células tratadas con vehículo (Porcentaje de control; %) y representa datos de al menos 3 experimentos independientes en los que las células se trataron por triplicado. Células HEK.hIP.

La Figura 8 muestra el efecto de los antagonistas de TP sobre la movilización de calcio mediada por EP/PGE₂ en células HEL 92.1.7. Las células HEL 92.1.7, precargadas con Fluo-4, se incubaron con TP20, NTP4, NTP42 y NTP43 donde cada antagonista se usó a 10 μ M, como se indica, antes de la estimulación con 1 μ M de Cicaprost. Los datos se presentan como el porcentaje medio ($\pm$ S.E.M.) de la respuesta inducida por el agonista en las células tratadas con vehículo (Porcentaje de control; %) y representa los datos de 3 experimentos independientes en los que las células se trataron por triplicado. 1 μ M de PGE₂.

Comentarios: En la presente descripción, los datos indican que NTP42 a NTP49 no tienen problemas con respecto a la especificidad y se ha demostrado que son altamente específicos para el antagonismo de las respuestas mediadas por TP/U46619.

Ejemplo 2: Antagonismo de (PG)F_{2 α}

Demostración de la capacidad de NTP42, NTP43 y NTP48 y, como NTP4 y TP20 de referencia, para antagonizar las acciones de isoprostano 8-iso-prostaglandina (PG)F_{2 α} .

Efecto de NTP42 - NTP48 sobre la movilización de calcio mediada por 8-iso-PGF_{2α}

Adicionalmente, para evaluar los compuestos para antagonizar las respuestas mediadas por U46619, se examinó la capacidad de NTP42 y NTP43 para inhibir el agonista parcial de TP 8-iso-PGF_{2α} mediante ensayos de movilización de calcio en células HEK.TPα y HEK.TPβ.

Las Figuras 9 y 10 muestran el efecto de los antagonistas de TP en la movilización de calcio mediada por 8-iso-PGF_{2α} en células HEK TPβ.

La Figura 9 muestra los resultados después de que las células HEK.TPα, precargadas con Fluo-4, se incubaron con TP20, NTP4, NTP42, NTP43 y NTP48 donde cada antagonista se usó a 0.00001 - 10 μM, como se indica, antes de la estimulación con 10 μM de 8-iso-PGF_{2α}.

La Figura 10 muestra los resultados después de que las células HEK.TPβ, precargadas con Fluo-4, se incubaron con TP20, NTP4, NTP42, NTP43 y NTP48 donde cada antagonista se usó a 0.00001 - 10 μM, como se indica, antes de la estimulación con 10 μM de 8-iso-PGF_{2α}. Los datos se presentan como el porcentaje medio (± S.E.M.) de la respuesta inducida por el agonista en las células tratadas con vehículo (Porcentaje de control; %) y representa datos de al menos 3 experimentos independientes en los que las células se trataron por duplicado, excepto NTP48.

La Tabla 3 presenta los valores estimados de IC₅₀ para la inhibición de la movilización de calcio mediada por 8-iso-PGF_{2α} en células HEK.TPα y HEK.TPβ, donde el agonista parcial en ausencia de antagonista de TP mediaba 112 ± 3,26 (n = 12) y 96,1 ± 2,52 (n = 8) respuestas, respectivamente.

Tabla 3. Valores estimados de IC₅₀ para la inhibición de la movilización de [Ca²⁺]_i mediada por 8-iso-PGF_{2α} en células HEK.TPα y HEK.TPβ.

Antagonista de TP	Valores de IC ₅₀ para la inhibición de la movilización de [Ca ²⁺] _i mediada por 8-iso-PGF _{2α} (nM)	
	TPα	TPβ
TP20	46,4 ± 4,24 (n = 12)	17,0 ± 2,12 (n = 8)
NTP4	103 ± 11,1 (n = 6)	58,0 ± 6,31 (n = 6)
NTP42	12,8 ± 1,42 (n = 6)	8,00 ± 1,00 (n = 6)
NTP43	30,7 ± 5,05 (n = 4)	9,00 ± 1,60 (n = 3)
NTP48	29,3 ± 3,87 (n = 3)	15,4 ± 2,16 (n = 4)

Conclusión:

Los datos han confirmado que los nuevos compuestos líderes principales, específicamente, NTP42, NTP43 y NTP48, son potentes inhibidores de las respuestas de calcio mediadas por 8-iso-PGF_{2α}. Además, los datos (presentados arriba) confirman que NTP42, NTP43 y NTP48 son más potentes que TP20 y NTP4. El orden de clasificación para la inhibición de la movilización de calcio mediada por 8-iso-PGF_{2α} por los antagonistas de TP en cada línea celular es el siguiente:

TPα: NTP42 > NTP48 > NTP43 > TP20 ≥ NTP4

TPβ: NTP42 > NTP43 > NTP48 > TP20 ≥ NTP4

Ejemplo 3: Especificidad

Las Figuras 11-17 son ejemplos de pruebas de especificidad adicionales y muestran que ni NTP42 ni NTP48 presentaron ningún efecto sobre la señalización a través de los otros receptores prostanoideos (es decir, el receptor de prostaglandina (PG) D₂, DP; receptores de PGE₂ EP₁, EP₂, EP₃ y EP₄; receptor de PGF_{2α}, FP; IGP₂/receptor de prostaciclina, IP).

La Figura 11 muestra que NTP42 y NTP48 no muestran ningún efecto sobre el receptor DP₁.

La Figura 12 muestra que NTP42 y NTP48 no muestran ningún efecto sobre el receptor EP₁.

La Figura 13 muestra que NTP42 y NTP48 no muestran ningún efecto sobre el receptor EP₂.

La Figura 14 muestra que NTP42 y NTP48 no muestran ningún efecto sobre el receptor EP₃.

La Figura 15 muestra que NTP42 y NTP48 no muestran ningún efecto sobre el receptor EP₄.

La Figura 16 muestra que NTP42 y NTP48 no muestran ningún efecto sobre el receptor FP₁.

La Figura 17 muestra que NTP42 y NTP48 no presentan ningún efecto sobre el receptor de IP.

Se ha confirmado que NTP42 y NTP48 no muestran ningún efecto sobre la señalización mediada por DP, EP1-EP4, FP o IP.

No hay inhibición, o es mínima, de la mayoría de la señalización no mediada por TP observada en presencia de NTP42 y NTP48. Cuando hay inhibición de la señalización, se observa solo a la concentración de 10 μ M. A modo de ejemplo, NTP42, a 10 μ M solo ejerce una inhibición máxima de DP₁, EP₁, EP₄ e IP, donde el porcentaje de reducción en las respuestas es < 30 %, ~55 %, 40 % y 50 %, respectivamente. En comparación con NTP42, NTP48 tiene menos efecto sobre la señalización de los receptores prostanoideos no TP y, por lo tanto, puede considerarse más favorable en este contexto.

La Figura 18 presenta el efecto de NTP42 y NTP48 en la señalización mediada por TP o U44069 (CEREP usa U44069 relacionada en lugar de U46619), que incluyen los valores de IC₅₀ para la inhibición (ver además la Tabla 4). Estos efectos indican que NTP42 y NTP48 son potentes antagonistas de U46609 o TP. Las diferencias en los valores de IC₅₀ puede atribuirse a las diferencias en las condiciones particulares del ensayo, que incluyen diferencias en el tipo de célula, de agonista, de indicador de calcio, etc.

La Tabla 4 es un ejemplo de los valores de IC₅₀ de NTP42 y NTP48 para antagonizar la movilización de [Ca²⁺]_i mediada por TP después de la estimulación de células con el agonista de TP alternativo U46609.

Tabla 4. Comparación de valores de IC ₅₀ para inhibición	
Compuesto	Valor de IC ₅₀ para la inhibición de la movilización de [Ca ²⁺] _i mediada por U44069
NTP42	3,278 ± 0,34 nM
NTP48	7,712 ± 0,96 nM

Ejemplo 4: Eficacia

Las Figuras 19-23 muestran la eficacia de NTP42 en el modelo de hipertensión arterial pulmonar (PAH) inducida por monocrotolina (MCT) en ratas. En resumen, a ratas macho Wistar/Kyoto se les administró una dosis única de MCT (60 mg/kg, por vía subcutánea) y después se trataron con dosis dos veces al día (dosificación oral) durante 28 días con el vehículo del fármaco, el artículo de prueba NTP42 (0,25 mg/kg/dosis, BID) o con los compuestos de referencia Sildenafil (50 mg/kg/dosis, BID) o TP20 (0,25 mg/kg /dosis, BID). Como control, se dejó sin tratar un grupo de ratas, es decir, sin MCT ni fármacos terapéuticos. En el día 28, después de la inducción de MCT, se anestesió a las ratas para cirugía cardíaca y se registraron los parámetros hemodinámicos. A continuación, se extrajeron *en masa* la tráquea, el corazón y los pulmones, se registraron los pesos húmedos del corazón y los pulmones y, después se extrajeron, fijaron y procesaron los pulmones para histopatología.

La Figura 19 muestra el efecto de los artículos de prueba sobre la presión arterial pulmonar diastólica (dPAP).

La Figura 20 muestra el efecto de los artículos de prueba sobre la presión arterial pulmonar media (mPAP).

La Figura 21 muestra el efecto de los artículos de prueba sobre la presión arterial sistémica media (mAP).

La Figura 22 muestra el efecto de los artículos de prueba en el índice de Fulton.

Para las Figuras 19-22, el control (Ctr) se refiere a animales no tratados con MCT o compuestos de prueba/referencia, mientras que el control negativo (N.C.) se refiere a animales tratados con MCT para inducir PAH pero no tratados con compuestos de prueba/referencia.

La Figura 23 muestra secciones de tejido pulmonar incrustadas en parafina fijadas con formalina (FFPE) seguido de la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y escaneadas mediante el uso del sistema de captura de imágenes Aperio. Las imágenes representativas representan la extensión de la remodelación vascular pulmonar (paneles superiores, flechas blancas) y el espacio aéreo alveolar (paneles inferiores). La barra de escala horizontal en cada imagen corresponde a 100 μ M y todas las imágenes se capturaron con un aumento de 20 $\times$.

Se utilizó el ImageScope de Aperio para analizar las secciones de pulmón teñidas con H&E escaneadas digitalmente, donde se seleccionaron 10 cuadrados aleatorios (tamaño aproximado o cada cuadrado = 1 $\times$ 10⁶ μ m²) por sección inferior, media y superior de tejido pulmonar para su análisis. Dentro de cada cuadrado, todas las arteriolas sanguíneas (las arteriolas completas dentro de cada cuadrado y las que tocan la derecha y la parte inferior se evaluaron, pero no la izquierda o la parte superior de los cuadrados) se midieron en ImageScope para el diámetro del vaso total y luminal donde se determinó la relación diámetro de lumen con el del vaso total para cada arteriola.

Las Figuras 24-27 muestran el efecto de los artículos de prueba en la relación media ($\pm$ S.E.M.) de la luz: diámetro total del vaso para todas las arteriolas (Total) y las arteriolas clasificadas por tamaño: pequeño, $<50 \mu\text{m}$ de diámetro total; medio, $50-100 \mu\text{m}$ y grande, $>100 \mu\text{m}$.

- 5 Las Figuras 24-27 muestran un análisis morfométrico de los efectos de NTP42 sobre la remodelación vascular en la PAH inducida por MCT.

La Figura 24 presenta datos que representan la relación del diámetro de lumen medio ($\pm$ S.E.M.): diámetro del vaso total para las arteriolas totales.

- 10 La Figura 25 presenta datos que representan la relación del diámetro de lumen medio ($\pm$ S.E.M.): diámetro del vaso total para arteriolas pequeñas ($<50 \mu\text{m}$).

- 15 La Figura 26 presenta datos que representan la relación del diámetro de lumen medio ($\pm$ S.E.M.): diámetro del vaso total para arteriolas medianas ($50-100 \mu\text{m}$).

- 20 La Figura 27 presenta datos que representan la relación del diámetro de lumen medio ($\pm$ S.E.M.): diámetro del vaso total para arteriolas grandes ($> 100 \mu\text{m}$). En las Figuras 24-27, los asteriscos indican que la relación luz:diámetro total del vaso de los grupos tratados con MCT disminuye estadísticamente con respecto al grupo Control simulado/sin MCT y las marcas de conteo indican que la relación luz:diámetro total del vaso de los animales tratados con Sildenafil, TP20 y NTP42 aumenta significativamente con respecto a los animales tratados con MCT solo, donde $*/\#$, $p < 0,05$; $**/\#\#$, $p < 0,01$ y $***/\#\#\#$, $p < 0,0001$.

- 25 Para la Figura 28, las secciones de tejido pulmonar FFPE se tiñeron con H&E y se escanearon digitalmente (Aperio Slide Scanner). Las imágenes representativas muestran el grado de remodelación vascular pulmonar en arteriolas pequeñas, medianas y grandes. Las barras de escala horizontales corresponden a $50 \mu\text{m}$ (arteriolas pequeñas y medianas) y $100 \mu\text{m}$ (arteriolas grandes) fueron imágenes que fueron capturadas con aumentos de $40\times$. Las imágenes representativas de la Figura 28 representan la extensión de la remodelación vascular pulmonar en vasos pequeños, medianos y grandes. La barra de escala horizontal en cada imagen corresponde a $50 \mu\text{m}$ (vasos pequeños y medianos) o $100 \mu\text{m}$ (vasos grandes) y todas las imágenes se capturaron con un aumento de $40\times$.

- 30 La Figura 28 muestra secciones de tejido pulmonar FFPE después de inmunohistoquímica (IHC) mediante el uso de un anticuerpo *anti*-alfa actina de músculo liso para detectar células de músculo liso en las paredes de los vasos, como una medida independiente para evaluar la remodelación o regeneración de la musculatura de los vasos. Los portaobjetos teñidos se escanearon mediante el uso del sistema de captura de imágenes Aperio y las imágenes representativas en los paneles superiores muestran el grado de remodelación vascular pulmonar en arteriolas medianas (50 a $100 \mu\text{m}$ de diámetro). La barra de escala horizontal en cada imagen corresponde a $50 \mu\text{m}$ y todas las imágenes se capturaron con un aumento de $20\times$. Los paneles inferiores indican la intensidad de la tinción positiva (amarillo a rojo) y negativa (azul) según se determina por el algoritmo de píxeles positivos de ImageScope v 9.0.

- 35 En conclusión, los compuestos de la invención, ejemplificados por NTP42 en las Figuras 19-28, son eficaces en el modelo de PAH inducida por MCT como se muestra mediante la medición de las características hemodinámicas e histológicas de los animales sometidos a PAH por MCT.

- 45 Ejemplo 5: Remodelación vascular

- La Figura 29 muestra los efectos de NTP42 sobre la remodelación vascular en la PAH inducida por MCT evaluada por α -SMA IHC. Las secciones de tejido pulmonar FFPE se inmunotifieron con un anticuerpo anti- α actina de músculo liso (α -SMA; figura superior, tinción marrón) y núcleos contrateñidos con hematoxilina (Figura superior, núcleos azules) seguido de escaneo digital (Aperio Slide Scanner). Las imágenes representativas superiores muestran la inmunotinción de α -SMA (marrón) de las capas de músculo liso alrededor de las arteriolas y muestran el grado de remodelación vascular pulmonar en arteriolas medianas ($50-100 \mu\text{m}$ de diámetro). Las cifras inferiores indican la tinción negativa (azul) o la intensidad de la tinción positiva (amarillo/rojo) según se evaluó con el algoritmo de píxeles positivos de ImageScope de Aperio v 9.0. Las barras de escala horizontales corresponden a $50 \mu\text{m}$ donde se capturaron imágenes con un aumento de $20\times$.

- 55 Apéndice

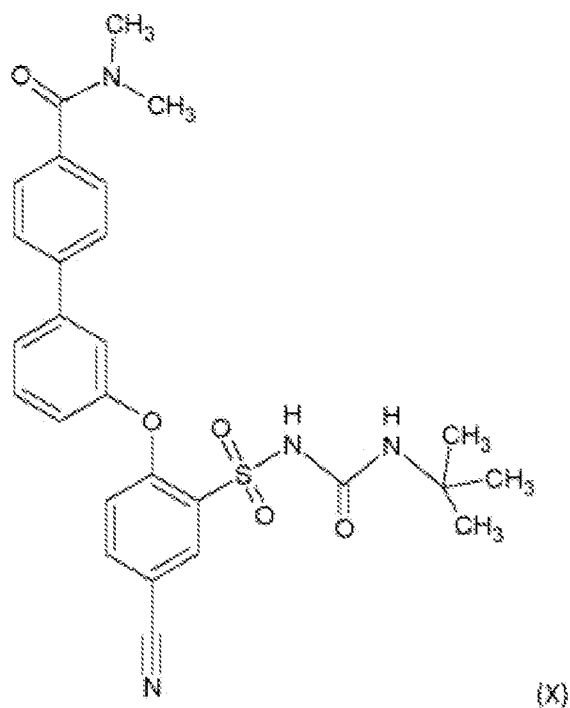
- La Tabla 5 es una concordancia de las referencias de NTP con los números de las fórmulas. Cualquier entrada en la columna de la izquierda se define como la fórmula de la columna de la derecha y viceversa.

- 60

Tabla 5 Correspondencia entre referencias de NTP y los números de las fórmulas	
# NTP	# Fórmula
NTP42	(IV)
NTP43	(V)
NTP44	(VI)
NTP45	(VII)
NTP46	(VIII)
NTP47	(IX)
NTP48	(X)
NTP49	(XI)

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto:—representado por la fórmula (X):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Una composición que comprende un compuesto según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar (HAP).

Células HEK.TP α ; U46619

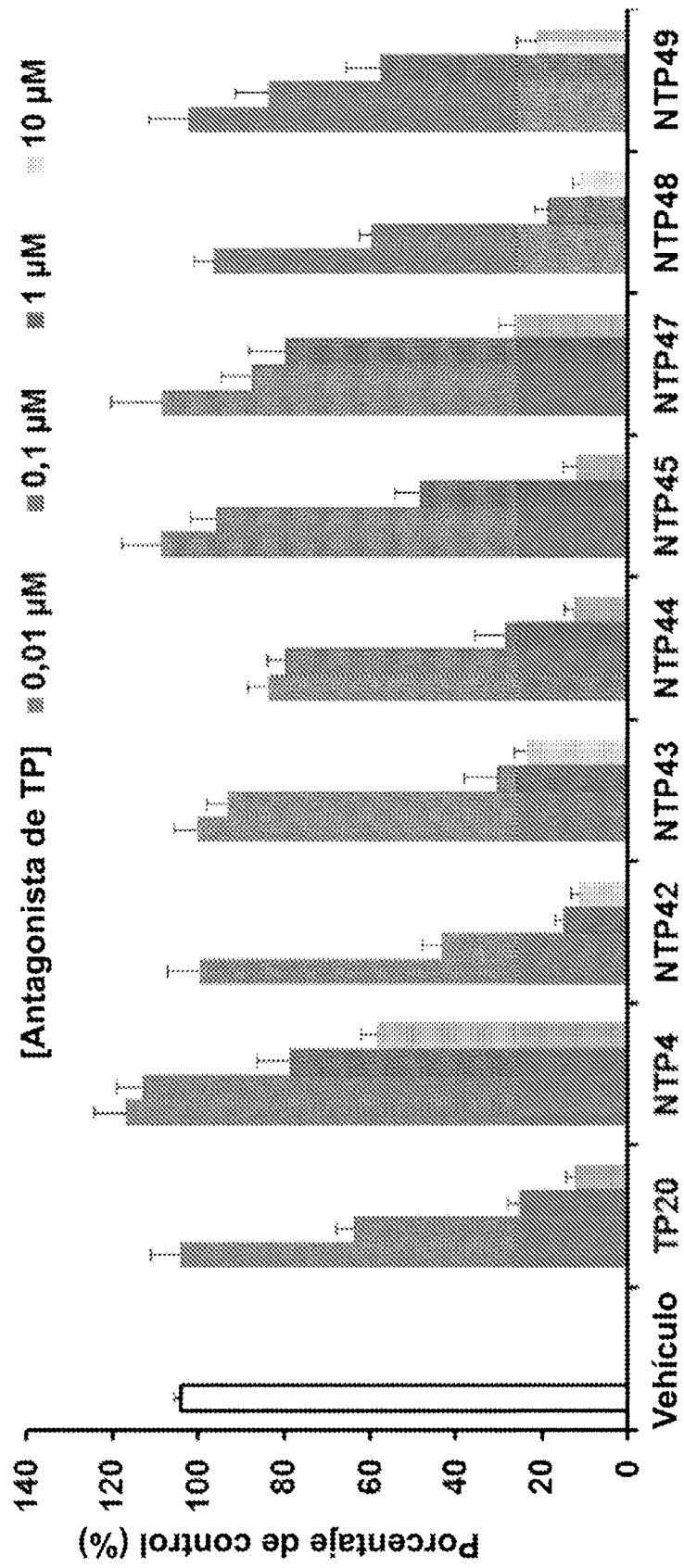


Figura 1

Células HEK.TPβ; U46619

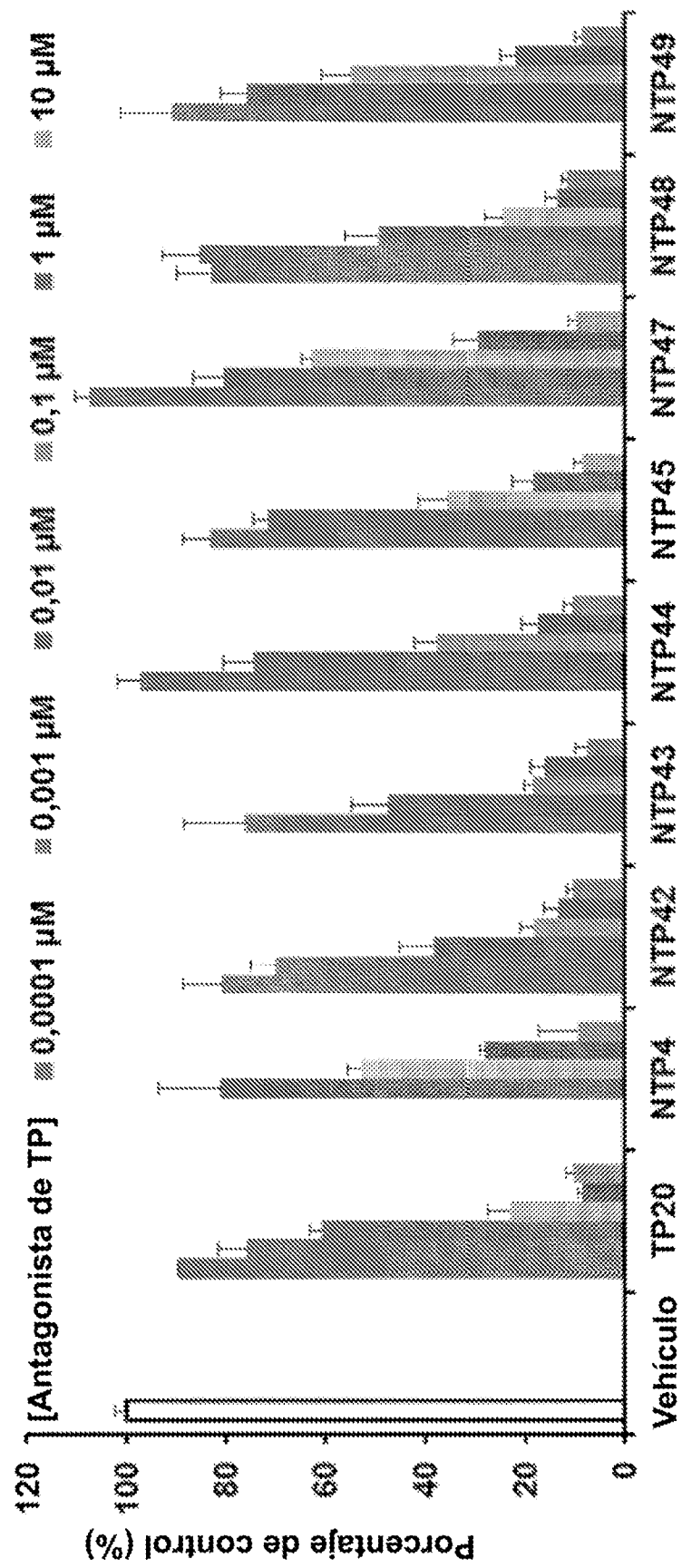


Figura 2

Células HEK.TPα; U46619

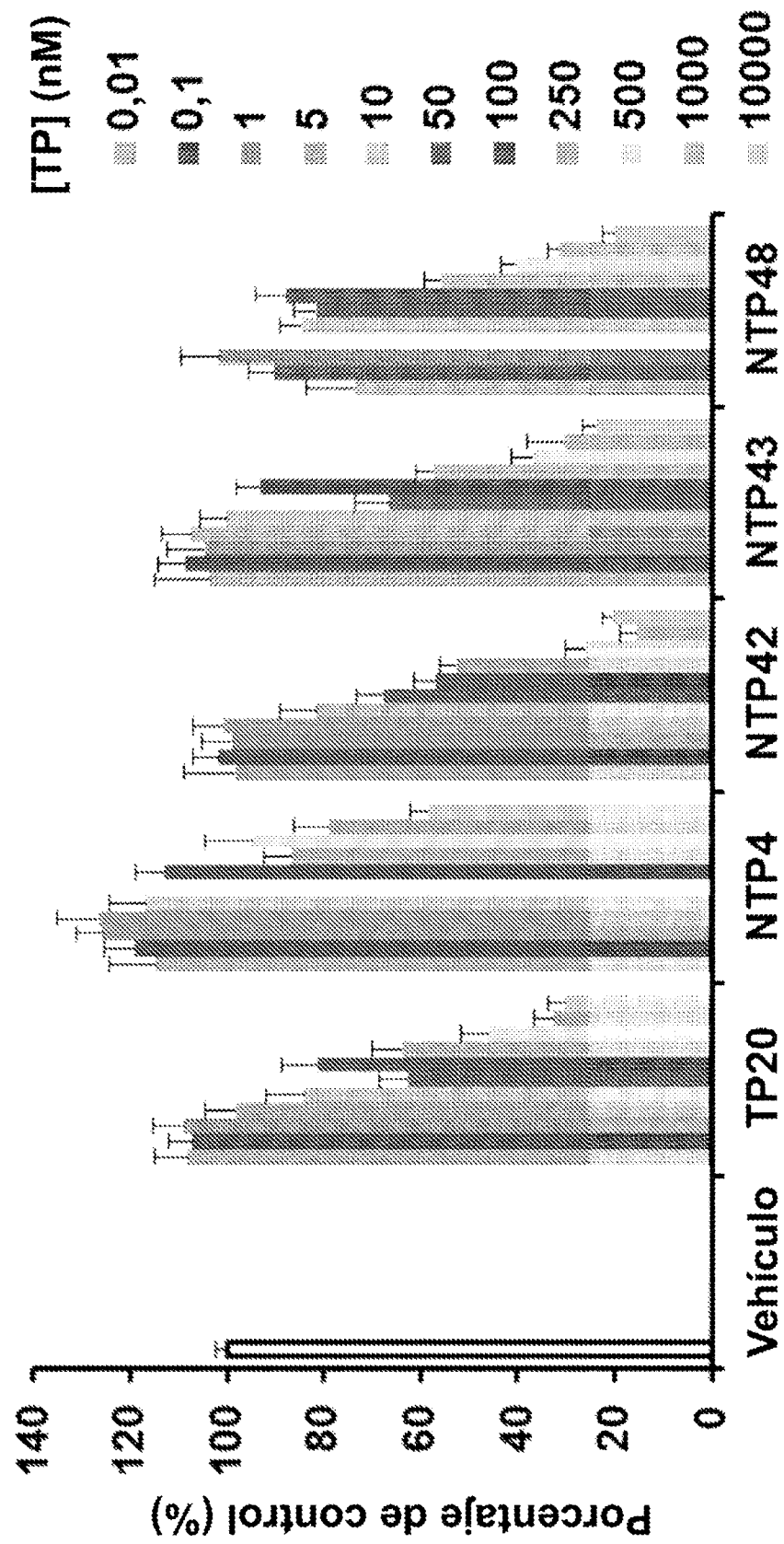


Figura 3

Células HEK.TPβ; U46619

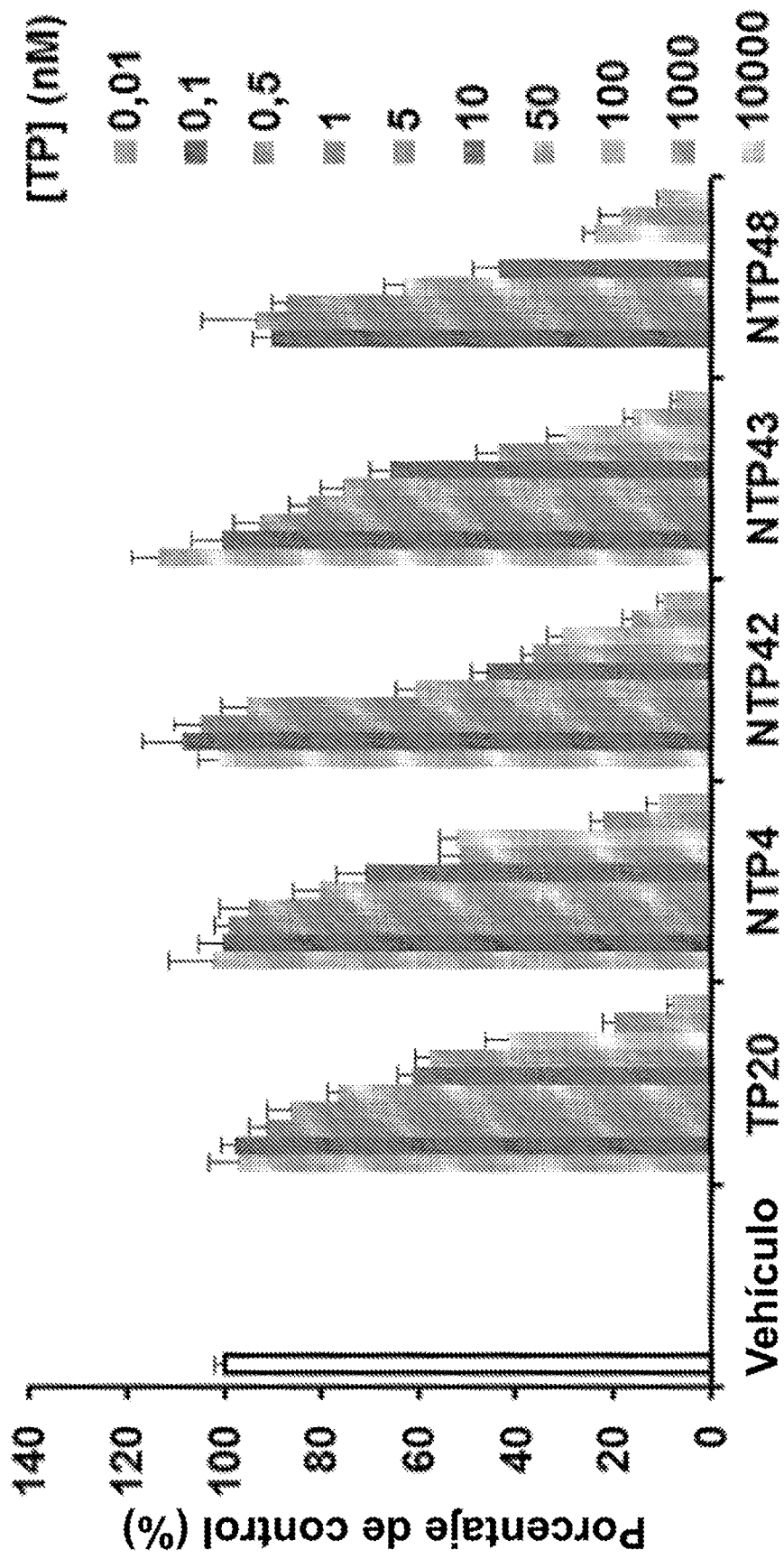


Figura 4

Plaquetas: U46619

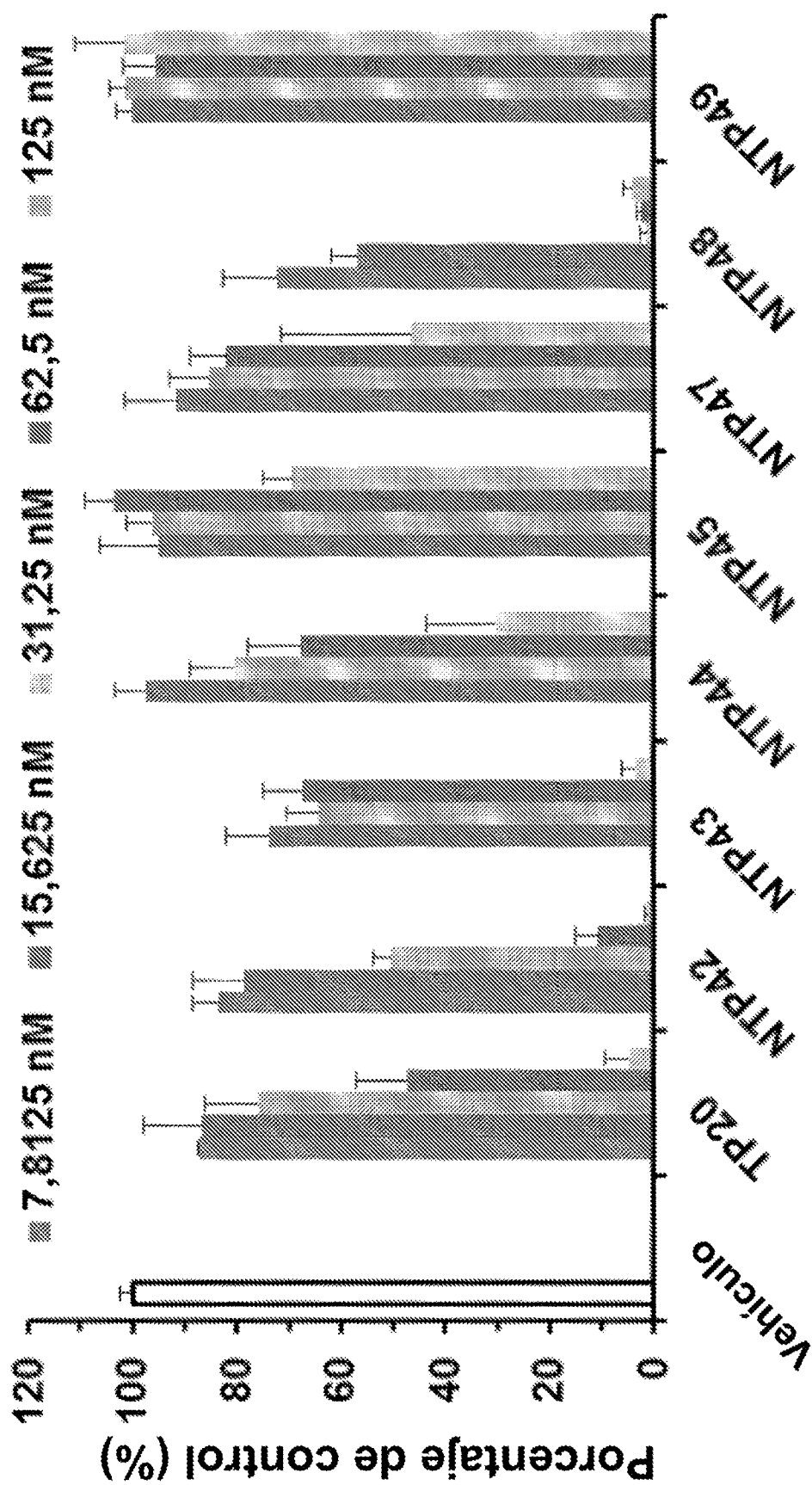


Figura 5

Plaquetas: U46619

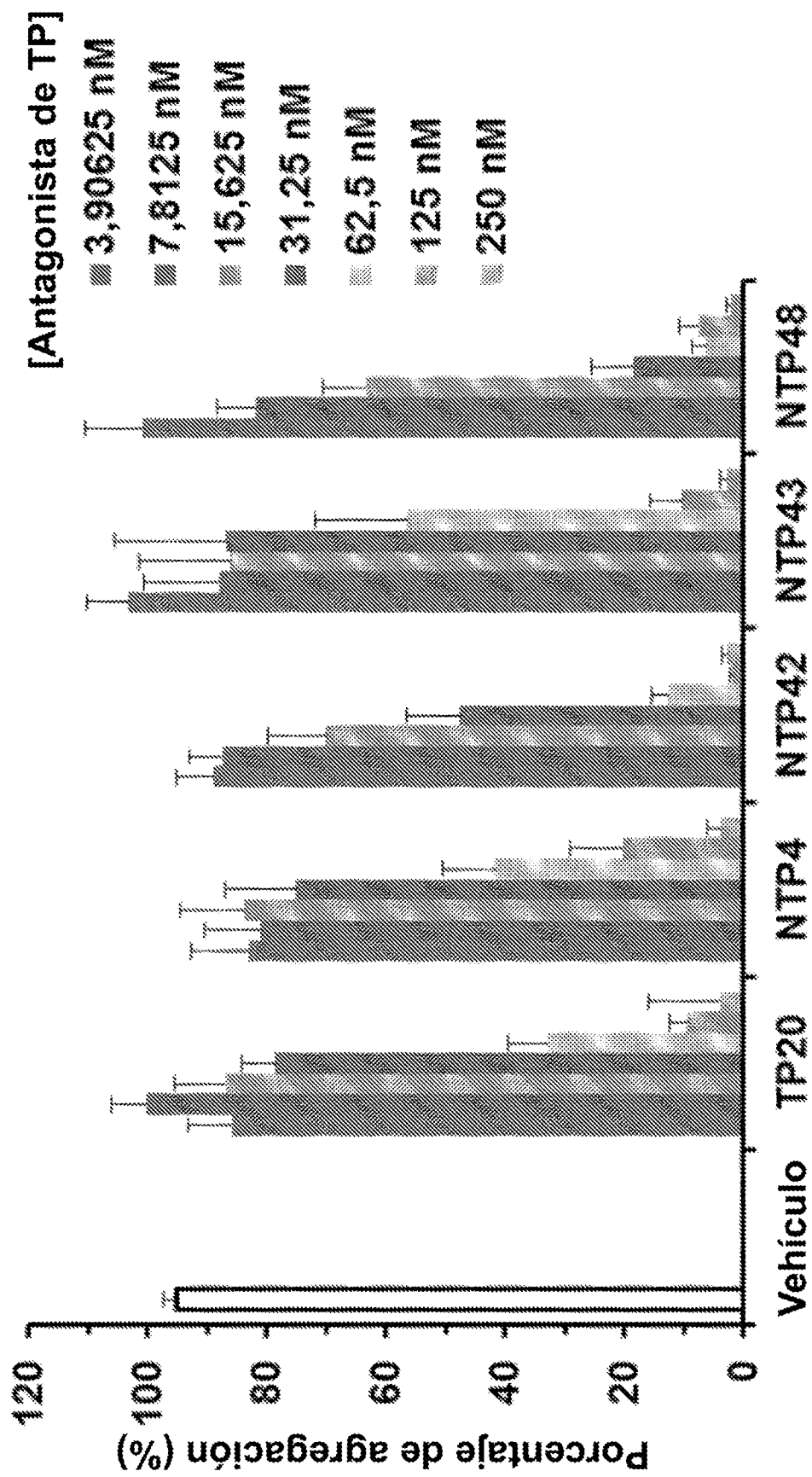


Figura 6

Células HEK.hIP; Cicaprost

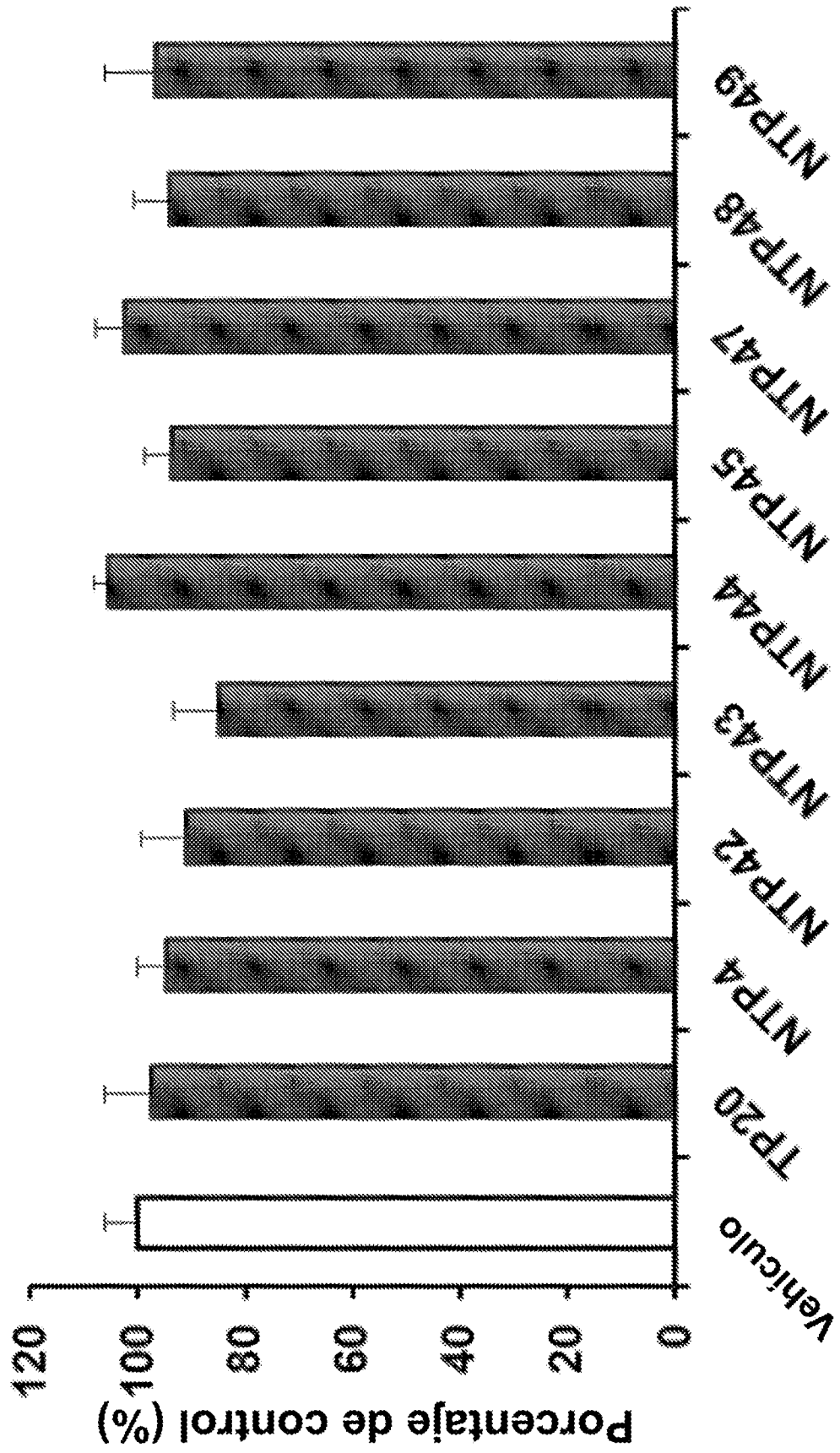


Figura 7

Células HEL 92.1.7; PGE₂

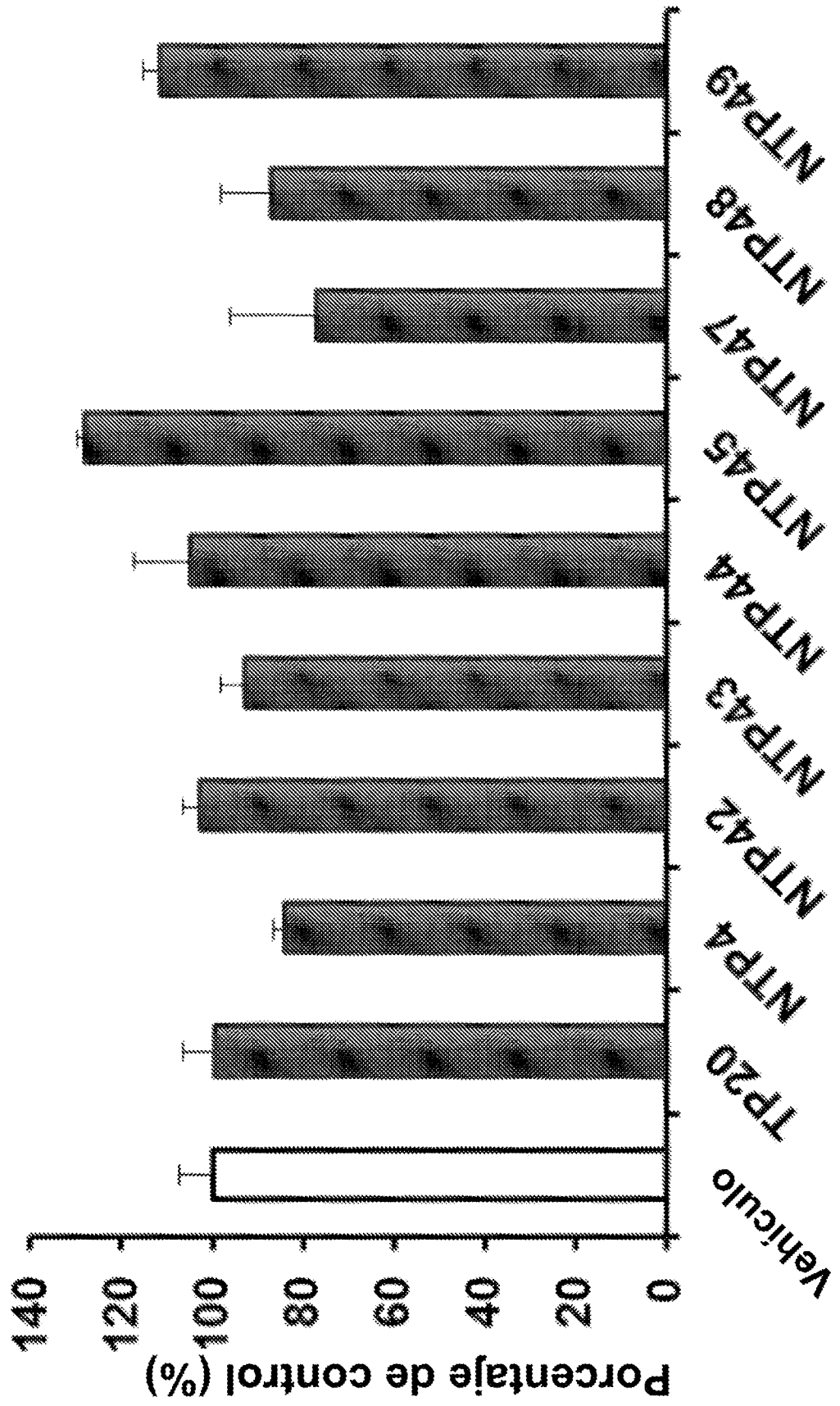


Figura 8

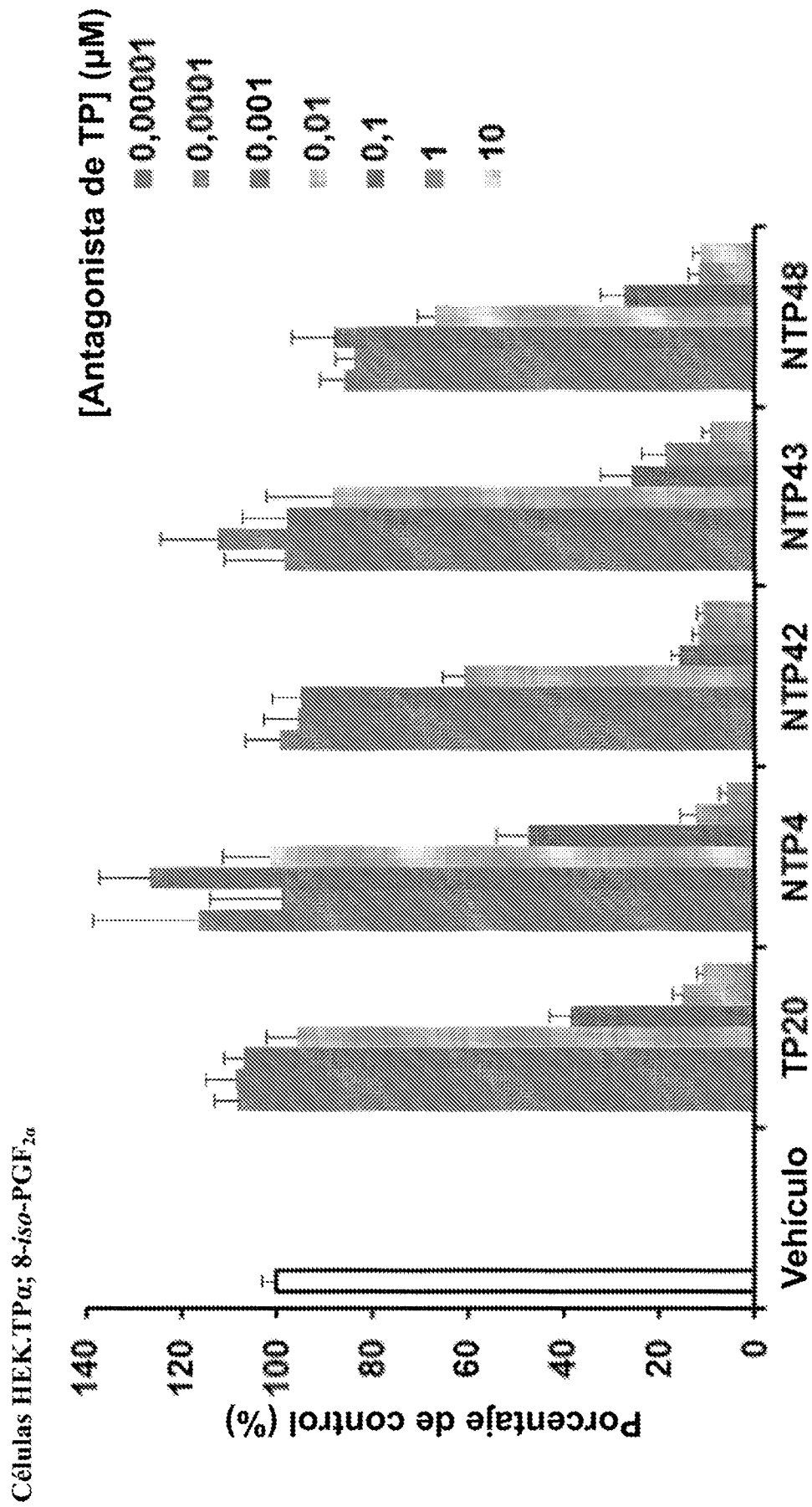


Figura 9

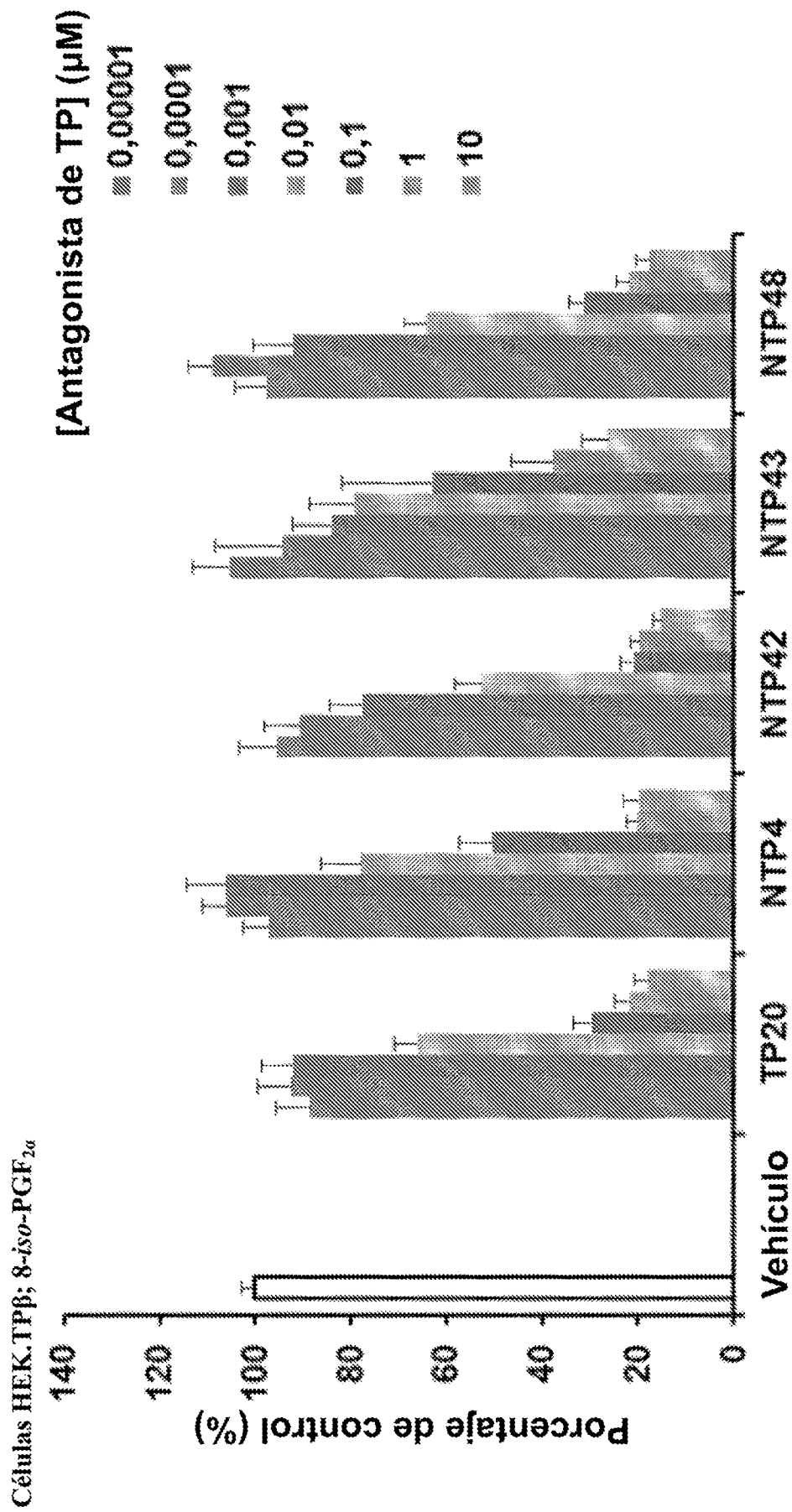


Figura 10

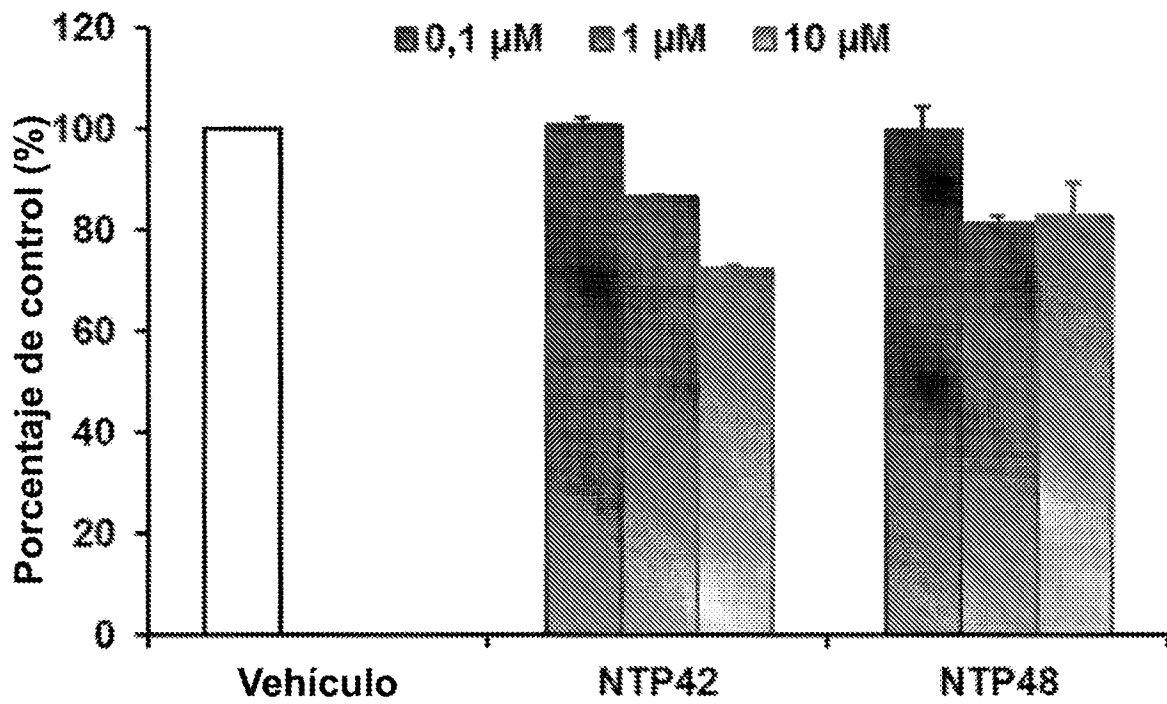
DP₁; AMPc mediado por BW 245C

Figura 11

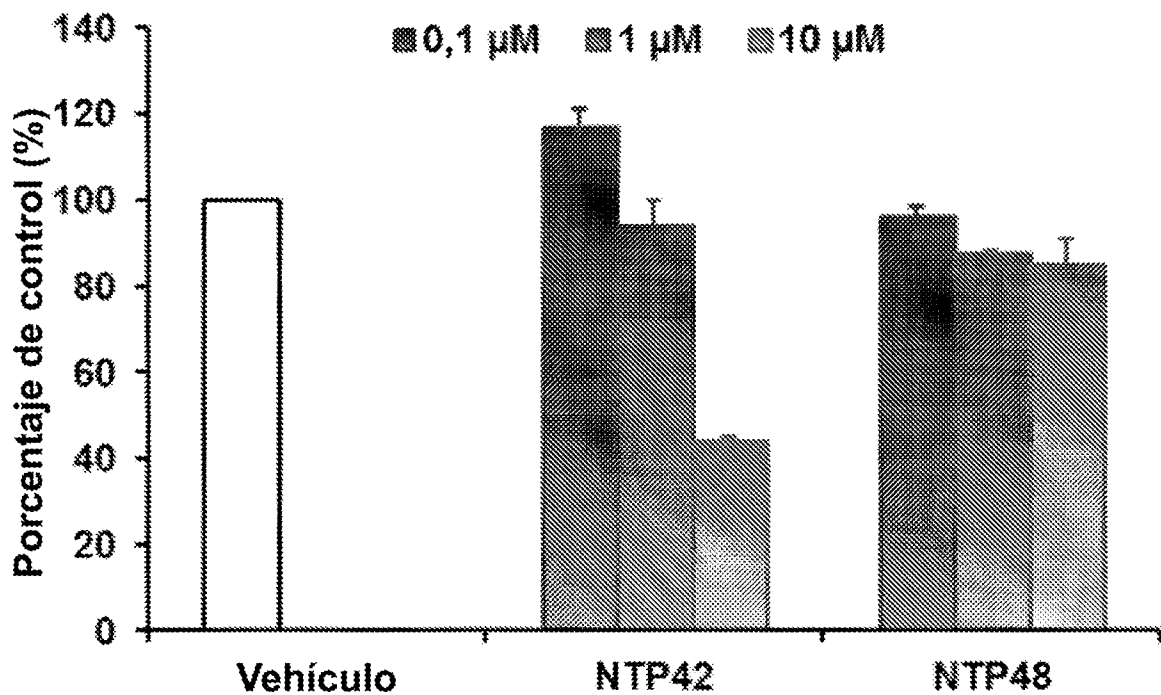
EP₁; Movilización de [Ca²⁺]_i mediada por PGE₂

Figura 12

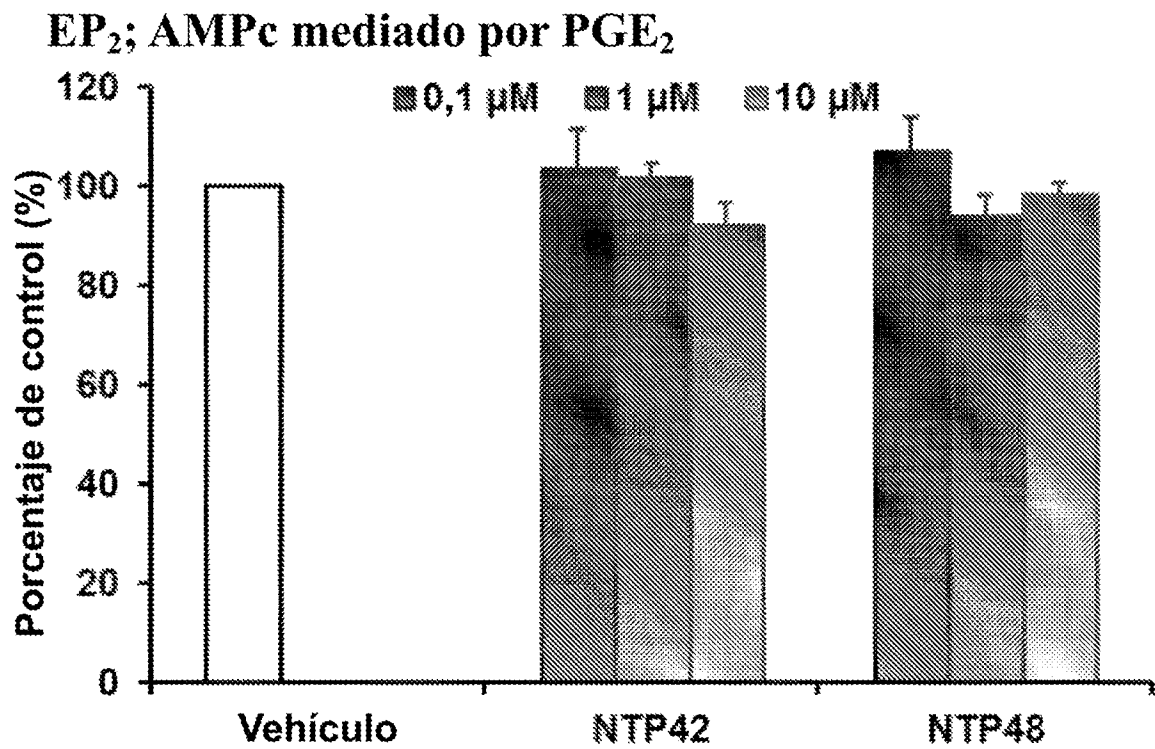


Figura 13

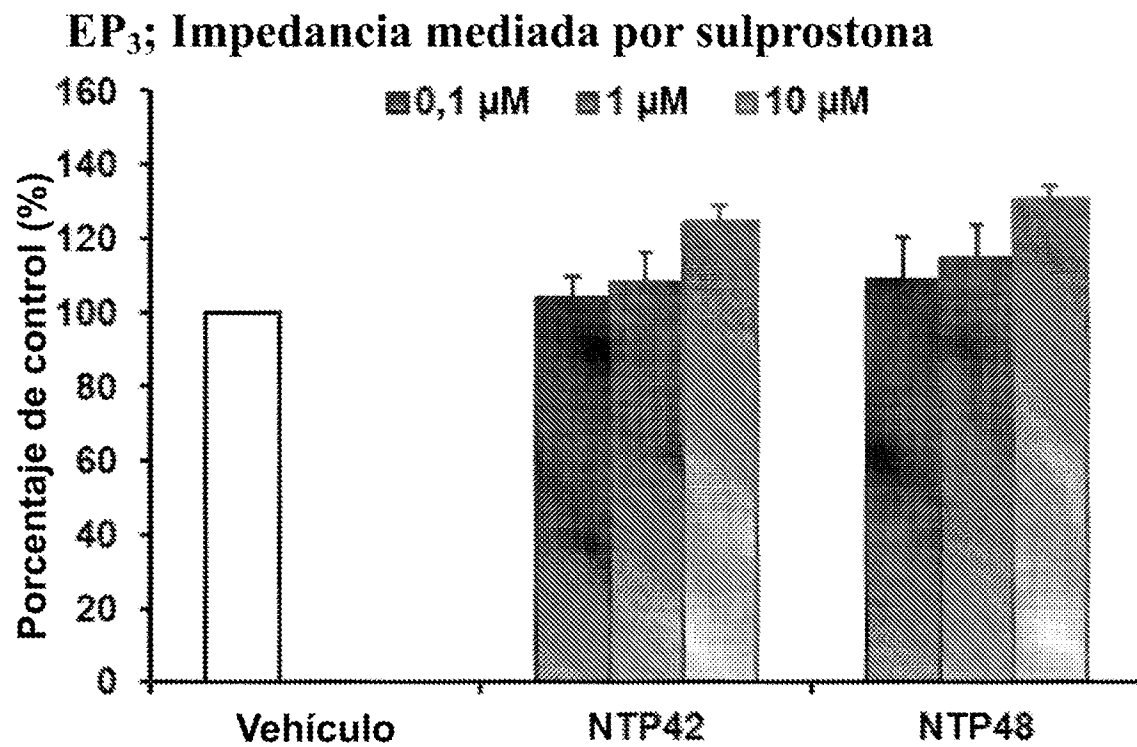


Figura 14

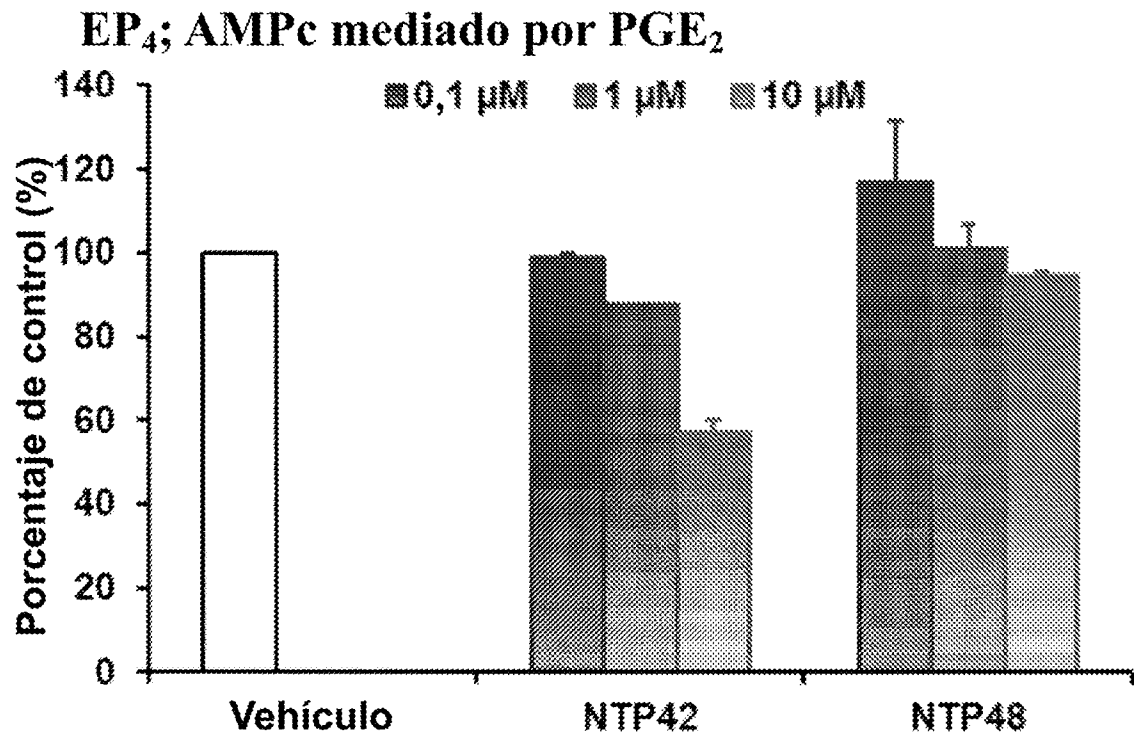


Figura 15

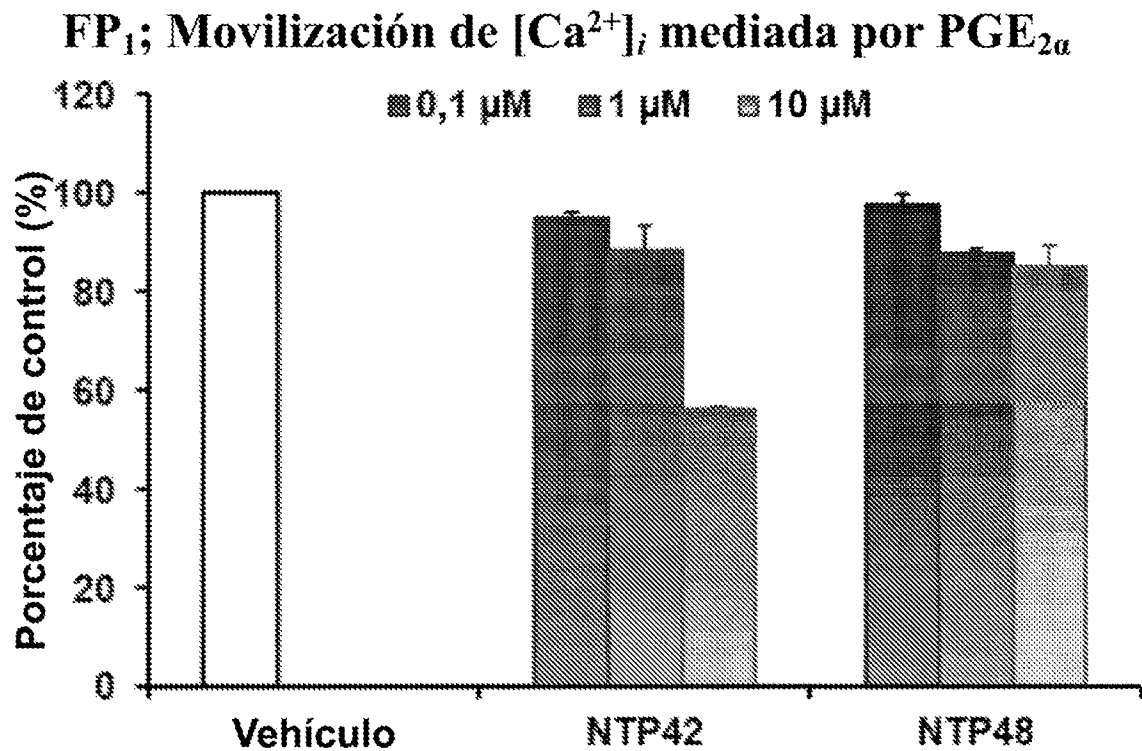


Figura 16

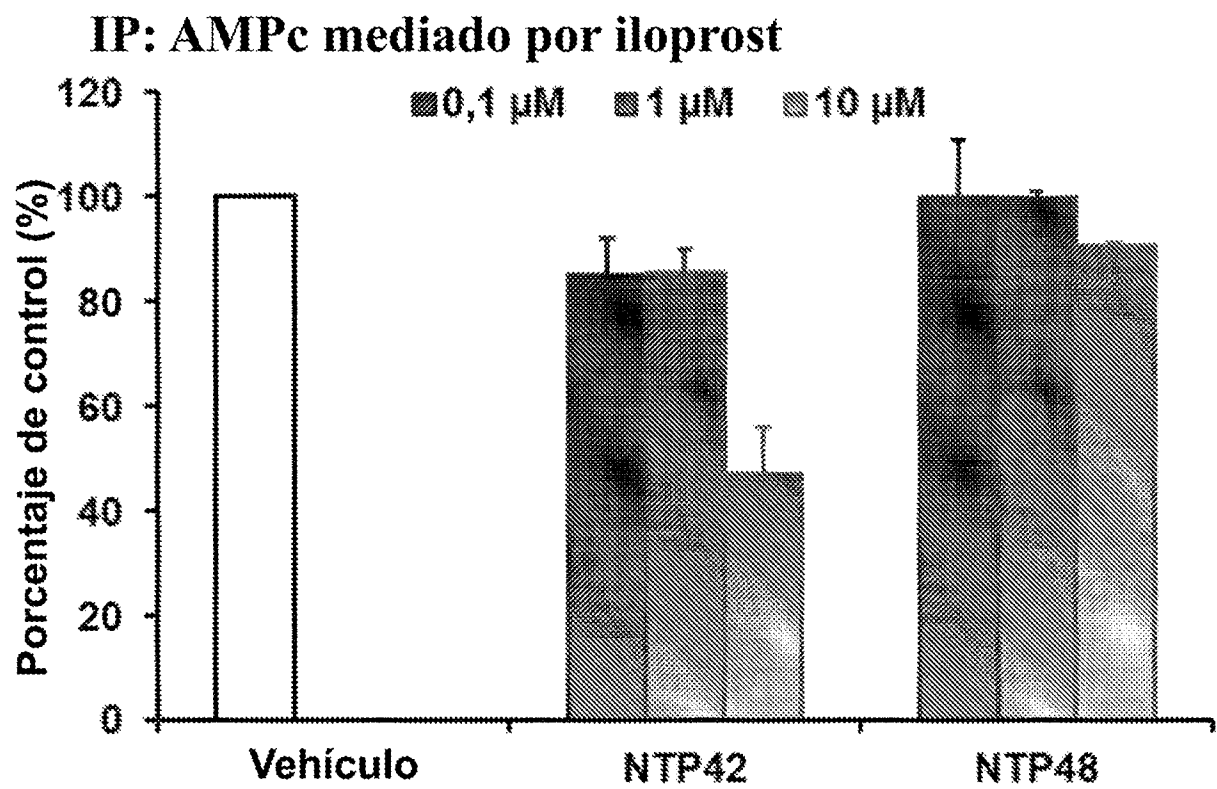


Figura 17

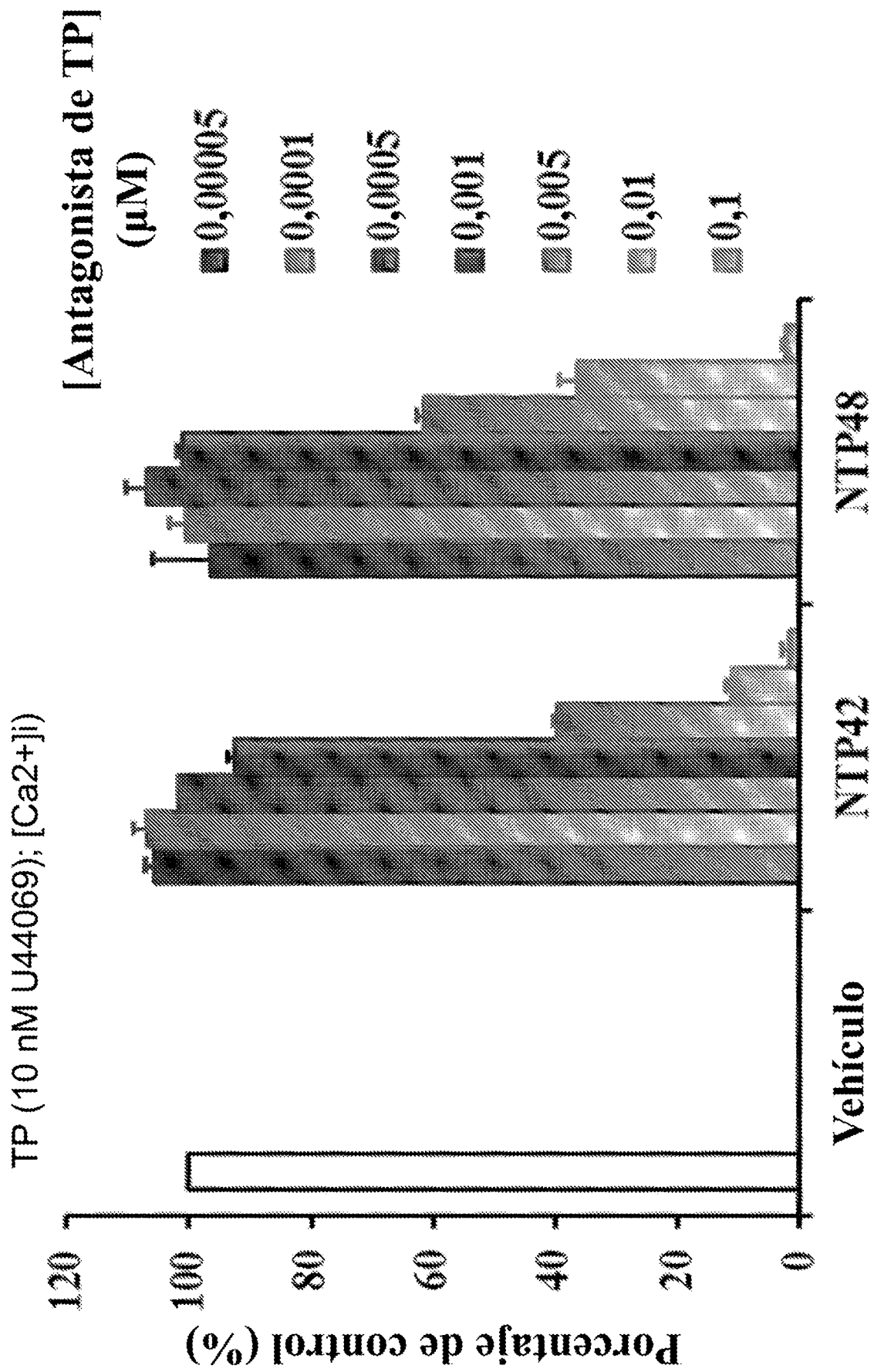


Figura 18

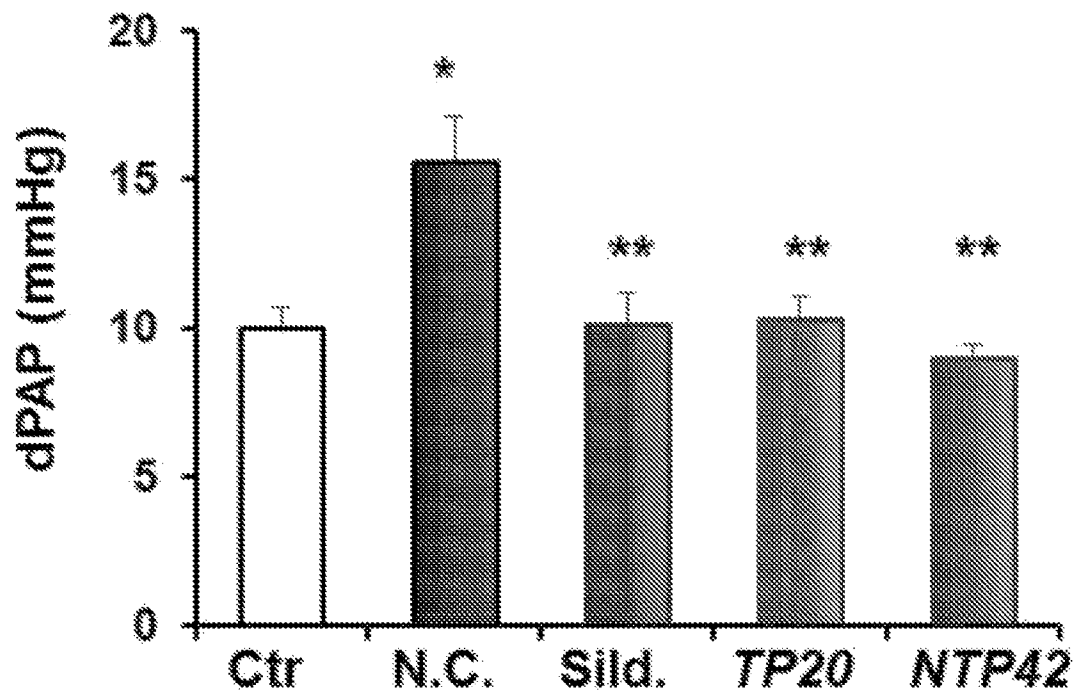
Presión arterial pulmonar diastólica (dPAP)

Figura 19

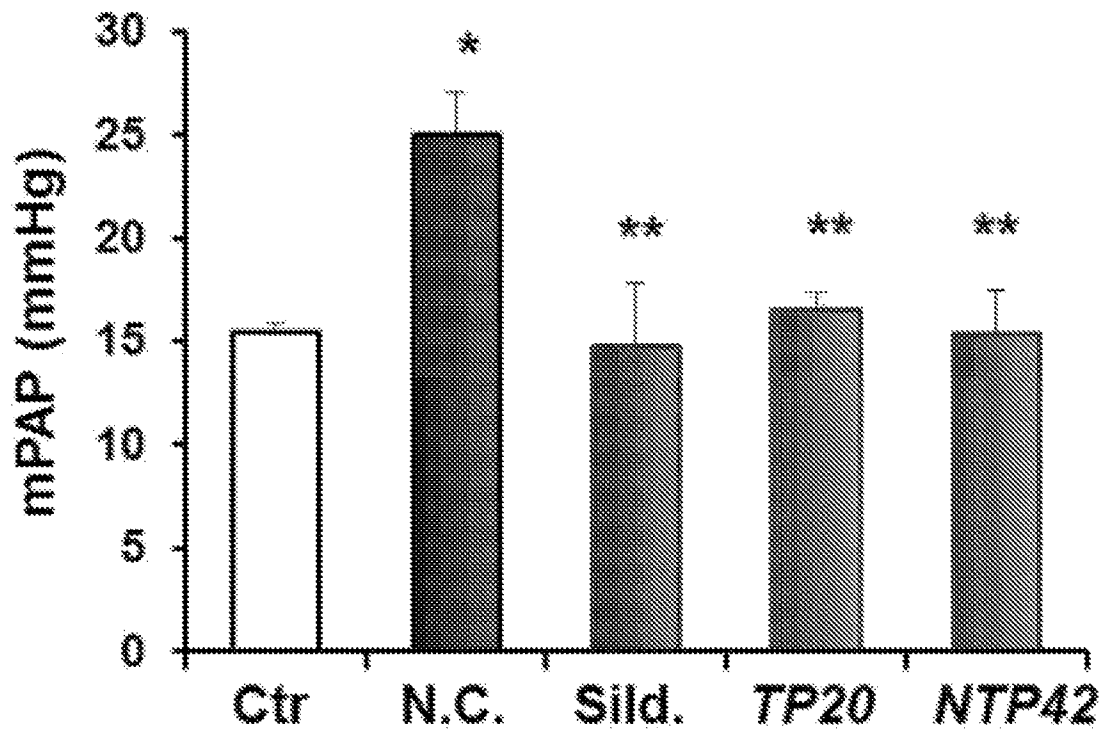
Presión arterial pulmonar media (mPAP)

Figura 20

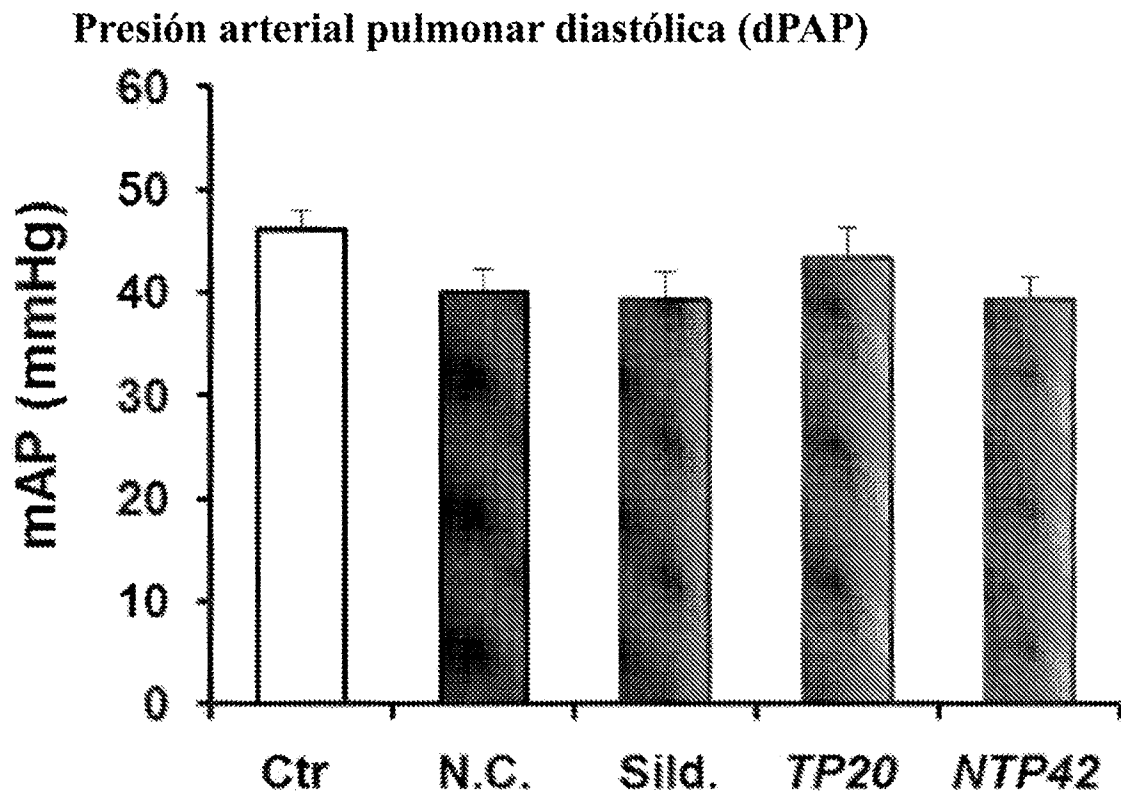


Figura 21

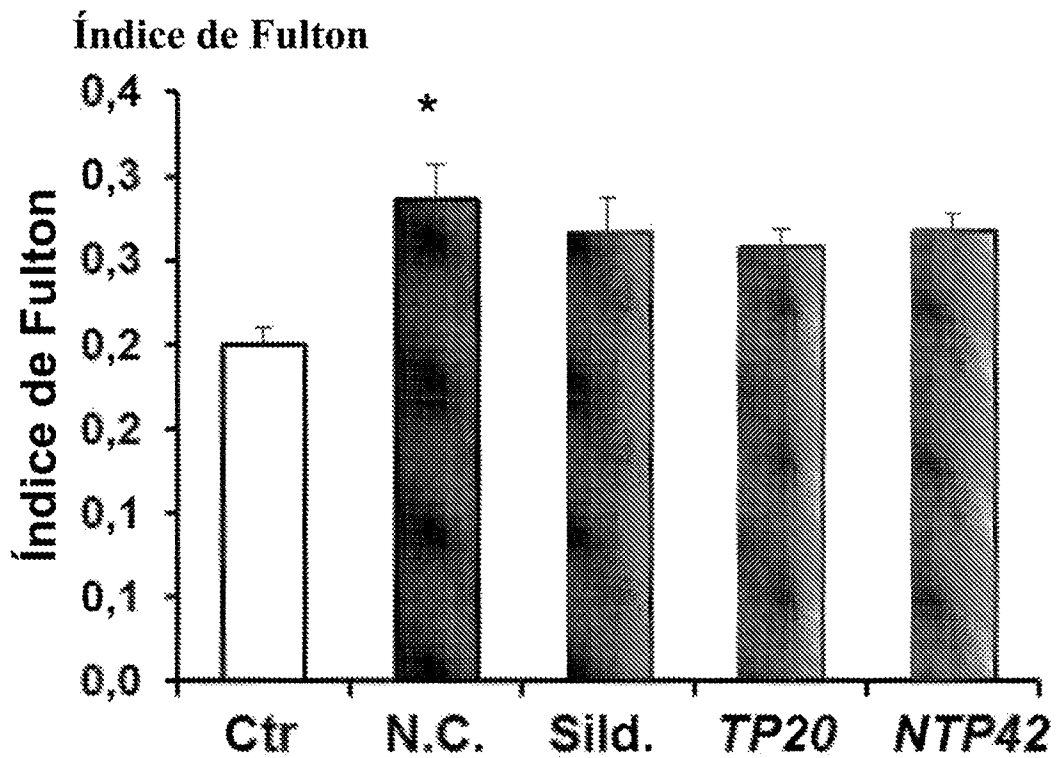


Figura 22

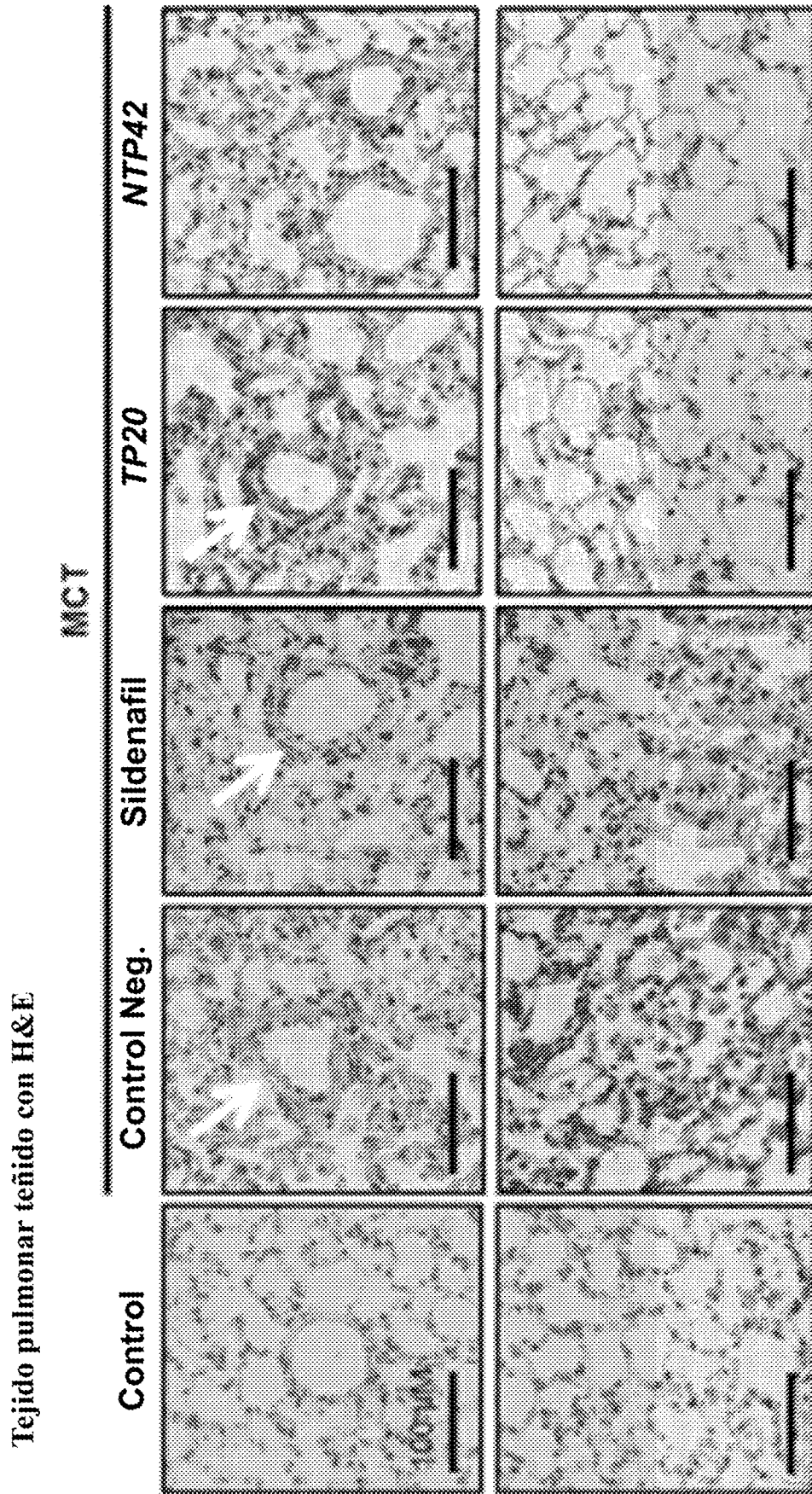


Figura 23

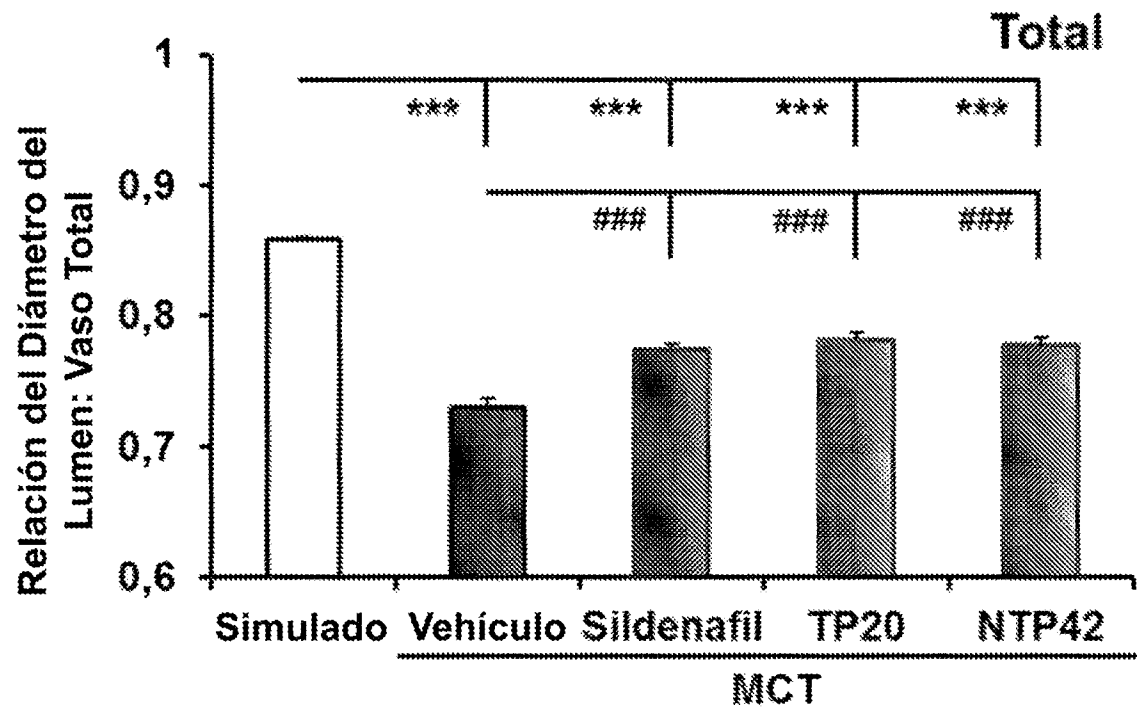


Figura 24

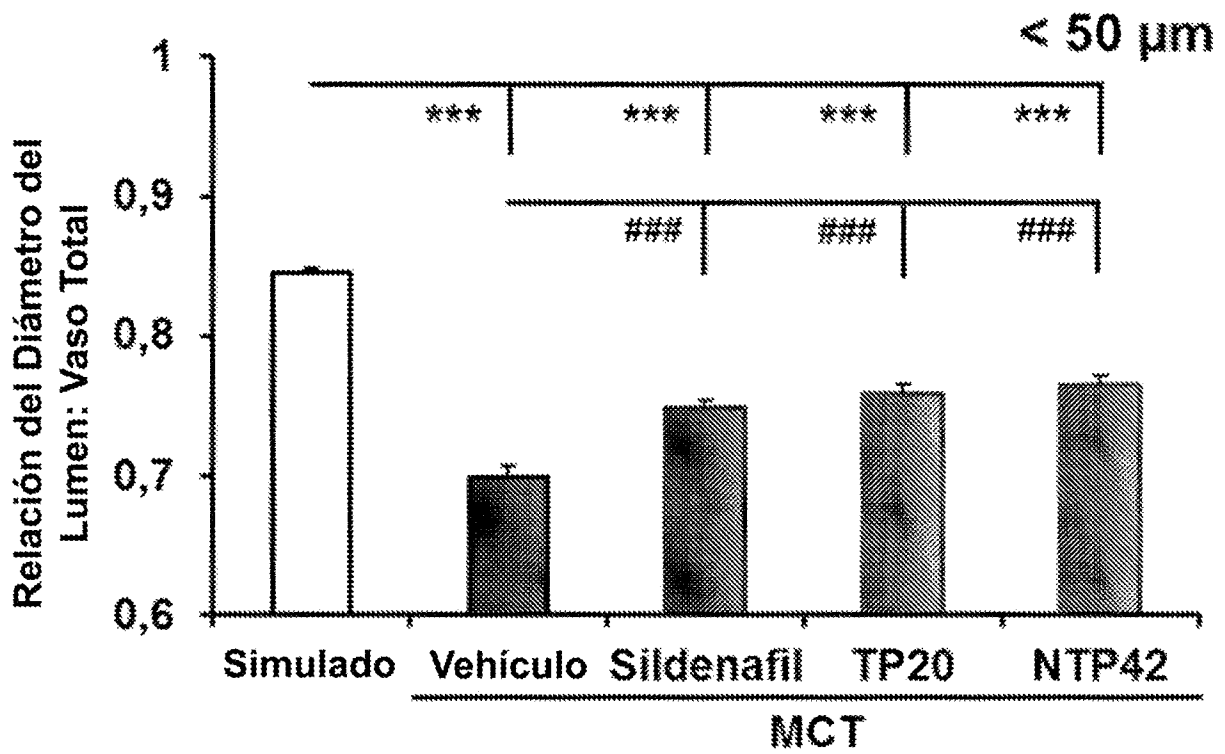


Figura 25

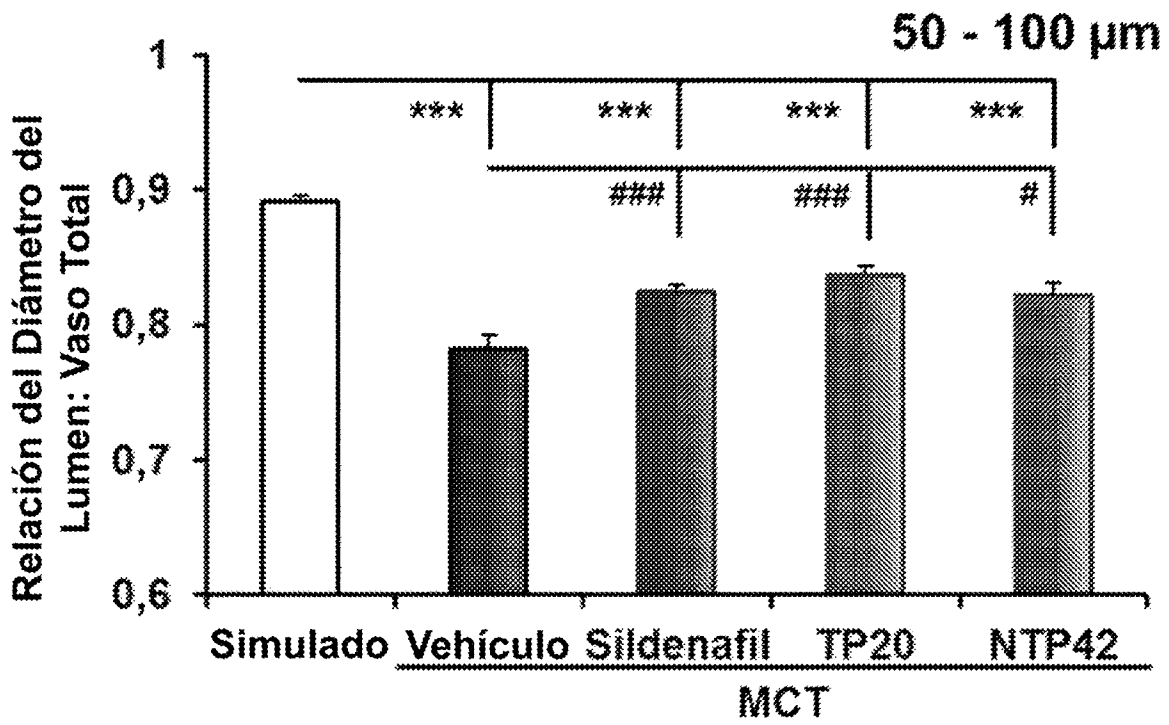


Figura 26

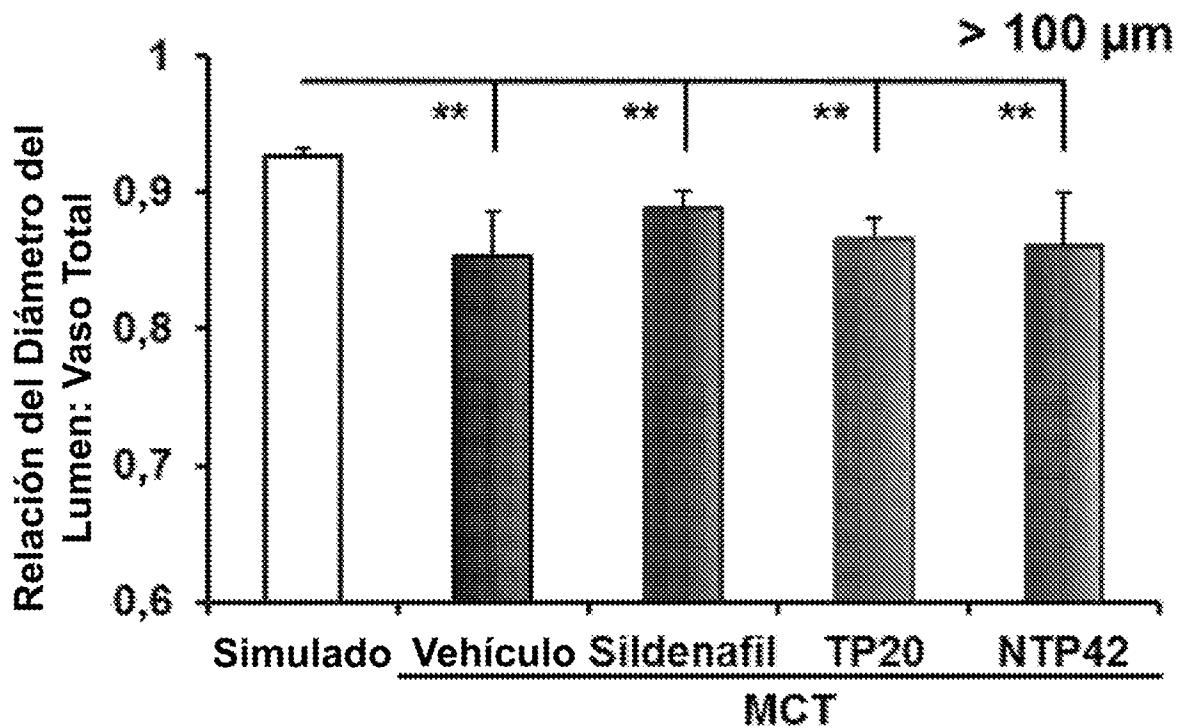


Figura 27

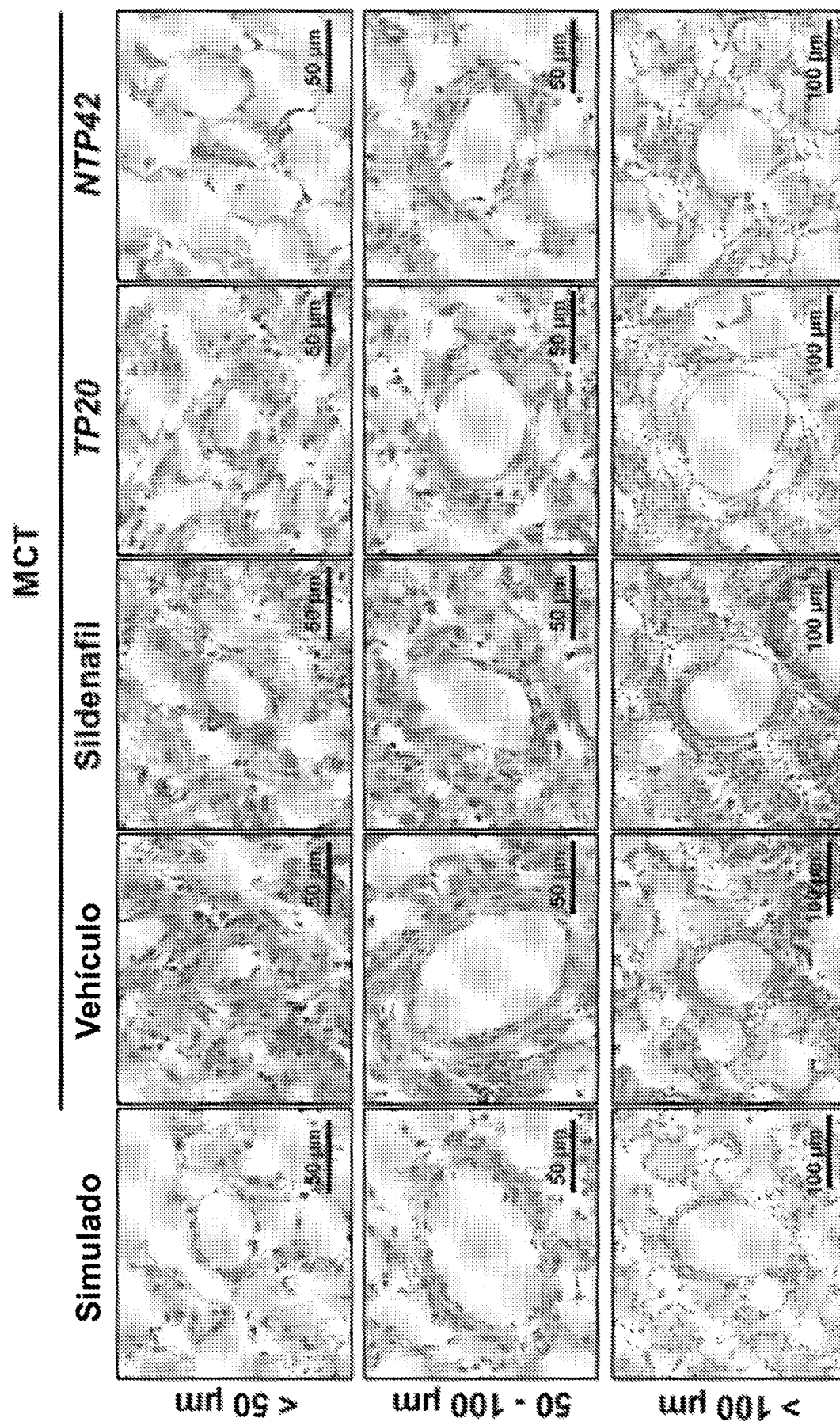


Figura 28

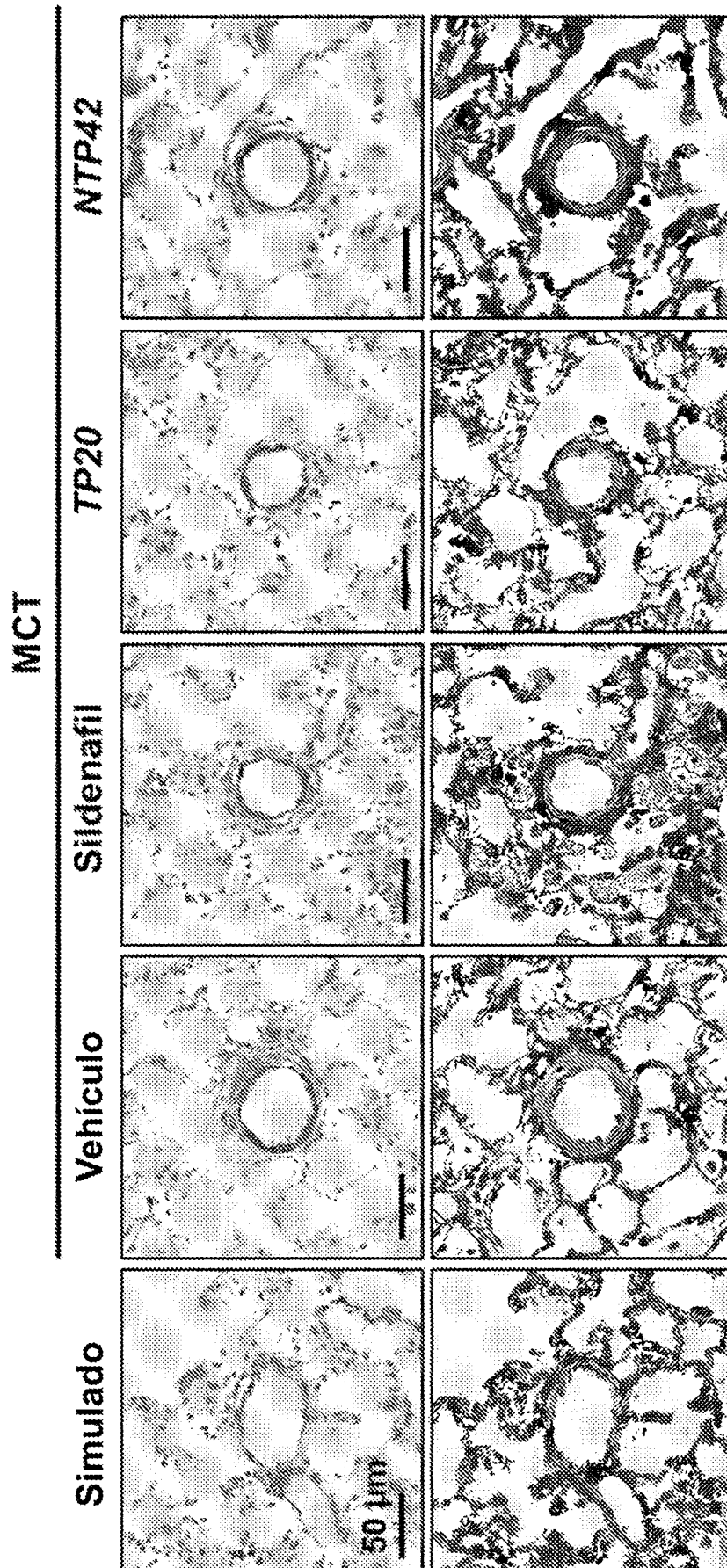


Figura 29