

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 746**

51 Int. Cl.:
C07D 413/12 (2006.01)
C07D 413/14 (2006.01)
A61K 31/42 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08778486 .4**
96 Fecha de presentación: **30.06.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2170876**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2010**

54 Título: **Composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento de la restenosis que comprende los derivados del isoxazol**

30 Prioridad:
29.06.2007 KR 20070065481
30.06.2008 KR 20080062297

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.05.2012

73 Titular/es:
SK Biopharmaceuticals Co., Ltd.
99 Seorin-dong Jongro-gu
Seoul 110-110, KR

72 Inventor/es:
HWANG, Sun Gwan;
CHOI, Sang Rak;
CHO, Jeong Woo;
BAE, Sung Jin;
KOO, Tae Sung;
LEE, So Young;
CHO, Kyung Chul y
GWON, Hyeon Cheol

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

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).

ES 2 379 746 T3

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento de la restenosis que comprende los derivados del isoxazol

Campo Técnico

- 5 La presente invención se relaciona con una composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento de la reestenosis, y más particularmente, con una composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento de la reestenosis, que comprende los derivados del isoxazol o sus sales farmacéuticamente disponibles como componentes efectivos.

Antecedentes de la Técnica

- 10 Como uno de los métodos para tratar las enfermedades isquémicas representadas por angina de pecho o infarto de miocardio, la angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA) recientemente ha sido ampliamente utilizada en lugar de la cirugía del *bypass*. En este caso, la PTCA se realiza por vía transcutánea insertando un catéter especial que tiene un balón unido a un extremo frontal de este, en un sitio estenótico de la arteria coronaria a partir de la arteria periférica y que expande el sitio estenótico mediante la inflamación del balón. La angioplastia coronaria que
15 utiliza el catéter del balón, ha sido evaluada como un excelente terapéutico, dado que tiene una tasa de mejoría relativamente alta de angina de pecho y un riesgo bajo para inducir la aparición del infarto de miocardio. Sin embargo, la reestenosis en el mismo sitio se desarrolla a una frecuencia de 40 a 50% después de la angioplastia coronaria utilizando el catéter del balón. En este caso, la PTCA o la cirugía del *bypass* deben realizarse de nuevo.

- 20 Con el fin de resolver los problemas anteriores, un método que utiliza una cánula endoluminal ha sido utilizado para tratar un vaso sanguíneo estenotado y mantener un flujo sanguíneo normal, insertando una cánula endoluminal metálica de acero inoxidable en un vaso sanguíneo estenotado e inflamando el vaso sanguíneo estenotado en un tamaño original del vaso sanguíneo. Se reportó que esta colocación la cánula endoluminal coronaria reduce la tasa de reestenosis aproximadamente un 10%. Sin embargo, el método utilizando una cánula endoluminal también tiene problemas que la reestenosis vuelve a caer a una frecuencia alta, y también es difícil aplicar una cánula endoluminal
25 a un vaso sanguíneo doblado, ya que el stent pierde la flexibilidad.

- El mecanismo para la aparición de la reestenosis intrastent, se estudió para resolver los problemas anteriores. Como resultado, se reportó que, a diferencia del mecanismo en la intervención utilizando un balón, el mecanismo de la reestenosis después de la operación de colocación de la cánula endoluminal se debe a la hiperplasia neo íntima causada por los barotraumas de la pared del vaso y los estímulos continuos por cuerpos extraños, y la pseudo
30 reestenosis intra-cánula endoluminal puede ocurrir cuando el vaso sanguíneo no se infla suficientemente durante la operación de colocación del stent (ver Hoffman R, et al., *Circulation*, 94:1247-1254, 1996; Dussainllant GR, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 26:720-724, 1995). Recientemente, se conoce que la reacción de hiperplasia con el daño de las células endoteliales se asocia con el polimorfismo de un gen de la enzima convertidora de angiotensina (ACE). En el caso, se observó un rasgo genético D/D en 80% de lesiones restenóticas intrastent difusas, y se encontró en 36% de
35 lesiones focales, lo que indica que el rasgo genético es uno de los factores que pueden afectar la reestenosis (ver Ribichini F, et al., *Circulation*, 97:141-154, 1998). También, se espera que la formación neo íntima causada por la proliferación de células del músculo liso vascular en medio de vaso sanguíneo y la migración de las células del músculo liso vascular en la membrana de pared juegue el papel más importante en el mecanismo de la reestenosis. A partir de estos resultados de la investigación, recientemente se ha considerado que la reestenosis del vaso
40 sanguíneo ocurre debido a la proliferación de células del músculo liso vascular en vaso sanguíneo dañado después de la intervención, la hiperplasia neo íntima causada por los factores de crecimiento y matriz citoplásmica, la remodelación vascular por la reacción de pared del vaso con los cambios dinámicos en vaso sanguíneo, etc. (ver Epstein SE., et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 23:1278-1288, 1994; Glagov S, *Circulation*, 89:28888-28891, 1994).

- 45 La célula del músculo liso vascular normal no crece, pero la división, migración y proliferación de la célula del músculo liso vascular se inducen a través de las cascadas de transducción de señales cuando el medio de la célula endotelial se daña por una operación de colocación de la cánula endoluminal, etc. Los mecanismos de proliferación de la célula del músculo liso vascular incluyen la eliminación de factores de proliferación-inhibición, la activación de factores de promoción-proliferación por el daño de células endoteliales normales, la transducción de las señales de promoción-proliferación a través de los receptores sobre una superficie celular de la célula del músculo liso vascular,
50 y los cambios en ciclo celular por las señales de promoción-proliferación transducidas en el núcleo de la célula del músculo liso vascular, etc. La célula endotelial normal segrega los factores que inhiben la proliferación de célula del músculo liso vascular, pero se ha reportado que, cuando la célula endotelial se daña, la secreción de estos factores se inhibe, y la proliferación de la célula del músculo liso vascular se induce por la trombina, un factor de crecimiento del fibroblasto (FGF) y un factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) que se secretan a partir de la plaqueta activada, y los radicales libres de oxígeno generados por el daño celular (ver Palmer RMJ, et al., *Nature*,
55

327:524-526, 1987; Kinsella MG, Wight TN, J. Cell Biol., 102:678-682, 1986; McNamara CA, et al., J. Clin. Invest., 91:94-98, 1993).

5 Nuevos equipos de PTCA, tales como angioplastia con láser, aterectomía rotacional de alta velocidad y angioplastia coronaria utilizando un balón de corte han sido introducidos para prevenir la reestenosis, y también ha habido intentos para prevenir la reestenosis después de la angioplastia coronaria, utilizando fármacos tales como un agente anti-plaquetas, un agente anti-trombótico, un vasodilatador, un agente citostático, etc. Entre ellos, un stent liberador del fármaco cuya superficie está recubierta con un agente citostático tal como la rapamicina o el paclitaxel, se ha demostrado que es el más efectivo. Estos fármacos inhiben potentemente la división, migración y proliferación de células del músculo liso vascular en vaso sanguíneo, que son la causa de la reestenosis. Se ha reconocido que dos clases de stents liberadores del fármaco tienen dicho excelente efecto para inhibir la reestenosis que los stents liberadores del fármaco toman más del 90% del mercado de angioplastia coronaria en EE.UU., en los dos años después de que los stents liberadores del fármaco fueran lanzados el 2004 por EE. UU.

15 Sin embargo, se reportó que la cánula endoluminal liberadora del fármaco utilizando un agente citostático tiene un riesgo para aumentar la ocurrencia de trombosis de cánula endoluminal tardía en pacientes, después de uno o más meses de la operación de colocación de la cánula endoluminal (2006 World Cardiology Congress in Barcelona). En consecuencia, la FDA recomienda que los pacientes tomen un agente anti-trombótico por al menos un año después de la operación de colocación de la cánula endoluminal, y ser seguidos para chequear el riesgo de trombosis de cánula endoluminal tardía (ver http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/06/briefing/2006-4253b1_01.pdf). Puede haber varias causas de estos efectos secundarios de las cánulas endoluminales liberadores del fármaco, pero una de las causas más importante es que las heridas de la pared del vaso en un sitio con stent durante el procedimiento de colocación de la cánula endoluminal no se cicatrizan o se retrasa su cicatrización (ver Renu Virmani, Circulation 2005; 112:270-278). Los fármacos por sí mismos se consideran como la causa del retraso de cicatrización de la herida en la pared del vaso. Todos los fármacos utilizados recientemente son agentes citostáticos, y estos agentes citostáticos inhiben la división, migración y proliferación de la célula endotelial vascular que sirve para cicatrizar las heridas de la pared del vaso, así como inhiben la división, migración y proliferación de la célula del músculo liso vascular que son las causas de la reestenosis. Es decir, estos fármacos no tienen selectividad hacia la célula del músculo liso, de manera que tienen un efecto para inhibir la reestenosis y también un efecto secundario para retrasar la cicatrización de la herida de la pared del vaso, dado que los fármacos no tienen cierta selectividad contra las células (Sarembok, Drug Discov Today: Dis Mech (2007), doi:10.1016/j.ddmec. 2007.10.007). Por lo tanto, existe una demanda urgente para el desarrollo de los suministros médicos que prevengan la reestenosis y que tampoco tengan efectos secundarios para inhibir la cicatrización de la herida de la pared del vaso.

35 Mientras tanto, se conoce que la proteína "Wnt" es una glicoproteína secretora que tiene un peso molecular de aproximadamente 40kDa y es rica en cisteína, y se asocia con diferentes procesos de desarrollo incluyendo diferenciación y proliferación celular y la polaridad de la célula (Moon RT et al., Science, 2002; Reya T and Clevers H, Nature, 2005). Se ha reportado que 19 proteínas Wnt se identifican en humanos, y también están presentes en humanos 10 proteínas frizzled y 2 co-receptores (LRP5 y 6) que funcionan como un receptor de Wnt (He XC et al., Nat Genet, 2004; Tamai K et al, Mol Cell, 2004; Tamai K et al., Nature, 2000).

40 Recientemente, se reportó que la ruta de transducción de señal de Wnt juega un papel importante en el mantenimiento y diferenciación y promoción del crecimiento de células madre (Reya T et al., Nature., 2003; Trowbridge JJ et al., NatuerMed., 2006), y por lo tanto existen muchos intentos para desarrollar las proteínas Wnt como sustancias para la regeneración de tejidos, prevención de pérdida de cabello, hematopoyesis, y promoción de crecimiento, mantenimiento y diferenciación de células madre.

45 Los presentes inventores han intentado resolver los problemas anteriores, y encontraron que los derivados del isoxazol y las sales farmacéuticamente disponibles de estos que sirven como agonistas que tienen un efecto para agonizar la transducción de la señal Wnt β -catenina, es efectiva para prevenir y tratar la reestenosis. Por lo tanto, la presente invención se completó sobre la base de los hechos anteriores.

Divulgación de la Invención

Problema Técnico

50 La presente invención se diseña para resolver los problemas de la técnica anterior, y por lo tanto es un objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que tiene un efecto para prevenir y tratar la reestenosis, ya que la composición farmacéutica comprende los derivados del isoxazol o sus sales farmacéuticamente disponibles como componentes efectivos.

55 También, es otro objeto de la presente invención proporcionar un método para la prevención o tratamiento de la reestenosis vascular sin ninguno de los efectos secundarios de la trombosis de cánula endoluminal tardía causada por la inhibición de la cicatrización de la herida en la célula endotelial vascular empleando los derivados de los

isoxazoles o sus sales farmacéuticamente disponibles como un componente efectivo para proporcionar la actividad anti-reestenosis y acelerar la re-endotelización.

Solución Técnica

5 Antes de la descripción detallada de esta especificación de la presente invención, los términos válidos utilizados en esta aplicación se definen, de la siguiente manera.

10 a) Grupo alquilo: se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado, saturado o insaturado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, en donde uno o más hidrógenos puede ser sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de un grupo que consiste de acilo, amino, carboalcoxi, carboxi, carboxiamino, -O-carbamil (-O-(C=O)-NH₂), ciano, halo, hidroxilo, nitro, tio, alquilo, cicloalquilo, arilo, alcoxi, ariloxi, sulfoxi y guanido con el número máximo posible, independientemente del orden y la clase de este.

15 b) Grupo cicloalquilo: se refiere a un compuesto hidrocarburo de anillo no-aromático, monocíclico o policíclico, tanto saturado como parcialmente insaturado, que consiste de 3-12 miembros constitucionales del anillo con 0-5 heteroátomos, tales como oxígeno, azufre, nitrógeno, etc., en este. Este puede ser 3-12-gon compuesto de anillo único o compuesto de anillo fusionado en donde uno o más hidrógenos pueden ser sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de un grupo que consiste de acilo, amino, carboalcoxi, carboxi, carboxiamino, -O-carbamoil (-O-(C=O)-NH₂), ciano, halo, hidroxilo, nitro, tio, alquilo, cicloalquilo, arilo, alcoxi, ariloxi, sulfoxi, guanido al número máximo posible, independientemente del orden y la clase de este.

20 Ejemplos concretos del grupo cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, morfolinilo, homomorfolinilo, tiomorfolinilo, homotiomorfolinilo, tiomorfolinilo S-óxido, tiomorfolinilo S,S-dióxido, piperidinilo, homopiperidinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotienilo, oxazolidinonilo, dihidropirazolilo, dihidropirrolilo, dihidropirazinilo, dihidropiridinilo, dihidropirimidinilo, dihidrofurilo, y dihidropiranilo.

25 c) Grupo arilo: se refiere un grupo aromático incluyendo un hidrocarburo de anillo aromático fusionado o único que consiste de 5 a 15 miembros en el anillo y grupo heteroaromático con 1 a 5 heteroátomos, tales como oxígeno, azufre o nitrógeno, en donde uno o más hidrógenos pueden ser sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de un grupo que consiste de acilo, amino, carboalcoxi, carboxi, carboxiamino, -O-carbamoil (-O-(C=O)-NH₂), ciano, halo, hidroxilo, nitro, tio, alquilo, cicloalquilo, arilo, alcoxi, ariloxi, sulfoxi, guanido, y las combinaciones de estos al número máximo posible, independientemente del orden y clase de este.

30 Ejemplos concretos del grupo arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, piridinilo, pirimidinilo, quinolinilo, benzotienilo, indolilo, pirazinilo, isoindolilo, isoquinolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, ftalazinilo, imidazolinilo, isoxazolilo, pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, indolizínilo, indazolilo, benzotiazolilo, benzimidazolilo, benzofuranilo, tienilo, pirrolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolopiridinilo, imidazopiridinilo, isotiazolilo, cinnolinilo, carbazolilo, isocromanilo, cromanilo, tetrahidroisoquinolinilo, isoindolinilo, isobenzotetrahidrofuranilo, isobenzotetrahidrotienilo, isobenzotienilo, benzoxazolilo, piridopiridinilo, benzotetrahidrofuranilo, benzotetrahidrotienilo, purinilo, benzocioxolilo, triazinilo, fenoxazinilo, fenotiazinilo, pteridinilo, benzotiazolilo, imidazopiridinilo, imidazotiazolilo, dihidrobenzisoquinazolinilo, benzisoquinazolinilo, benzoxazinilo, dihidrobenzotiazolilo, benzopiridinilo, benzothiazolilo, coumarinilo, isocoumarinilo, cromonilo, cromanonilo, piridinil-N-óxido, tetrahidroquinolinilo-N-óxido, dihidroquinolinilo, dihidroquinolinonilo, dihidroisoquinolinonilo, dihidrocoumarinilo, dihidroisocoumarinilo, isoindolinonilo, benzodioxanilo, benzoxazolinonilo, pirrolilo-N-óxido, pirimidinilo-N-óxido, pirazinilo-N-óxido, quinolinilo-N-óxido, indolilo-N-óxido, indolinilo-N-óxido, pirazinilo-N-óxido, isoquinolilo-N-óxido, quinazolinilo-N-óxido, quinoxalinilo-N-óxido, ftalazinilo-N-óxido, inidazolilo-N-óxido, isoxazolilo-N-óxido, oxazolilo-N-óxido, tiazolilo-N-óxido, indolizínilo-N-óxido, indazolilo-N-óxido, benzotiazolilo-N-óxido, benzimidazolilo-N-óxido, pirrolilo-N-óxido, oxadiazolilo-N-óxido, tiadiazolilo-N-óxido, triazolilo-N-óxido, y tetrazolilo-N-óxido.

45 d) Halo: generalmente se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

Para conveniencia de la explicación, los términos utilizados en la presente invención serán utilizados en las formas abreviadas definidas a continuación.

- N,N-dimetilformamida: DMF

- tetrahidrofuranilo: THF

50 - 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida: EDC

- 1-hidroxibenzotriazol hidrato: HOBt

- 1,1'-carbonildiimidazol: CDI

- difenilfosforil azida: DPPA

- trietilamina: TEA

- metil: Me

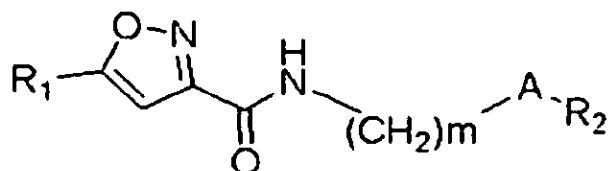
5 - etil: Et

En lo sucesivo, las modalidades ejemplares de la presente invención serán descritas con más detalle.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento de la reestenosis, que comprende una cantidad terapéutica efectiva de los derivados del isoxazol, representados por la siguiente Fórmula 1 o las sales farmacéuticamente disponibles de estos:

10

[Fórmula 1]



15

en donde, R₁ es fenilo, furanilo o tienilo que es sustituido o no-sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de acilo, amino, carboalcoxi, carboxi, carboxiamino, -O-carbamoil (-O-(C=O)-NH₂), ciano, halo, hidroxilo, nitro, tio, alquilo, cicloalquilo, arilo, alcoxi, ariloxi, sulfoxi y guanido,

m es 2 o 3,

A es un enlace, O, S, SO, o S(=O)₂, y

20

R es imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo o piridinilo que es sustituido o no sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de acilo, amino, carboalcoxi, carboxi, carboxiamino, -O-carbamoil (-O-(C=O)-NH₂), ciano, halo, hidroxilo, nitro, tio, alquilo, cicloalquilo, arilo, alcoxi, ariloxi, sulfoxi y guanido.

25

Además de los compuestos representados por la Fórmula Química 1, las sales de adición de ácido o base farmacéuticamente aceptables y los isómeros estereoquímicos de este, están en el rango de los derivados del isoxazol de la presente invención. Mientras se mantiene la actividad del compuesto original en los sujetos administrados con estos sin efectos indeseables, cualquier sal está dentro del alcance de la presente invención, y por consiguiente no se impone una limitación particular. Las sales pueden ser sales orgánicas o inorgánicas. Se prefieren las sales de ácido acético, nítrico, aspártico, sulfónico, sulfúrico, maleico, glutámico, fórmico, succínico, fosfórico, ftálico, tánico, tartárico, bromhídrico, propiónico, bencenosulfónico, benzoico, esteárico, esílico, láctico, bicarbónico, bisulfúrico, bitartárico, oxálico, butírico, edetato cálcico, camsílico, carbónico, clorobenzoico, cítrico, edético, toluenosulfónico, edisílico, esílico, fumárico, glucéptico, pamoico, glucónico, glicolilarsanílico, metilnítrico, poligalacturónico, hexilresorcinoico, malónico, hidrabámico, clorhídrico, yodhídrico, hidroxinaftoico, isetiónico, lactobiónico, mandélico, estólico, metilsulfúrico, múcico, napsílico, mucónico, p-nitrometanosulfónico, hexámico, pantoténico, monohidrógeno fosfórico, fosfórico diácido, salicílico, sulfámico, sulfanílico, metanosulfónico, o teóclico.

30

35

También, la forma de sal básica puede incluir, por ejemplo, sal de amonio, sales de metal alcalino y sales de metal alcalinotérreo tales como sales de litio, sodio, potasio, magnesio y calcio, sales de bases orgánicas, tales como sales de bezatina, N-metil-D-glucamina, de hidrabamina, y aminoácidos tales como arginina y lisina.

Mientras tanto, la forma de sal se puede convertir a formas libres mediante el tratamiento con bases o ácidos apropiados.

40

El término "sal de adición" como se utiliza en este documento significa las sales que incluyen, los solvatos que pueden formar los compuestos de fórmula Química 1 o las sales de estos. Los solvatos se pueden ejemplificar por hidratos y alcoholatos.

5 Como se utiliza en este documento, el término "isómeros estereoquímicos de los compuestos de Fórmula Química 1" se refiere a todas las formas posibles que pueden tener los compuestos de Fórmula Química I. A menos que se especifique o mencione de otra manera, los nombres químicos de los compuestos de Fórmula Química 1, indican mezclas de todos los posibles isómeros estereoquímicos, incluyendo todos los diastereómeros y enantiómeros de estructuras moleculares básicas.

10 Particularmente, cada centro quiral puede tener cualquier configuración R o S-, y los sustituyentes en los radicales cíclicos bivalentes saturados (parcialmente) que tienen una configuración cis- o trans. Los compuestos que tienen dobles enlaces pueden tener estereoquímica E- o Z, si está presente. Todos los isómeros estereoquímicos de los compuestos representados por la Fórmula Química 1, tienen la intención de ser incluidos dentro del alcance de la presente invención.

Entre los derivados del isoxazol de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención, ejemplos más preferidos de los derivados del isoxazol incluyen, pero no se limitan particularmente a, los siguiente derivados (1) a (70).

Derivado 1: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida

15 Derivado 2: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-piridin-2-il-etil)-amida

Derivado 3: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-piridin-3-il-etil)-amida

Derivado 4: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-imidazol-1-il-etil)-amida

Derivado 5: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-piridin-4-il-etil)-amida

Derivado 6: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico [2-(2-metil-imidazol-1-il)-etil]-amida

20 Derivado 7: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico [2-(5-metil-imidazol-1-il)-etil]-amida

Derivado 8: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico [2-(4-metil-imidazol-1-il)-etil]-amida

Derivado 9: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,4] triazol-1-il-etil)-amida

Derivado 10: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-pirazol-1-il-etil)-amida

Derivado 11: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,3] triazol-1-il-etil)-amida

25 Derivado 12: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,3] triazol-2-il-etil)-amida

Derivado 13: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-tetrazol-2-il-etil)-amida

Derivado 14: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2- tetrazol-1-il-etil)-amida

Derivado 15: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico [3-(2-metil-imidazol-1-il)-propil]-amida

Derivado 16: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-pirazol-1-il-propil)-amida

30 Derivado 17: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-[1,2,3] triazol-1-il-propil)-amida

Derivado 18: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-[1,2,3] triazol-2-il-propil)-amida

Derivado 19: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-[1,2,4] triazol-1-il-propil)-amida

Derivado 20: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-tetrazol-1-il-propil)-amida

Derivado 21: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-tetrazol-2-il-propil)-amida

35 Derivado 22: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico [3-(4-metil-imidazol-1-il)-propil]-amida

Derivado 23: ácido 5-fenil-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida

ES 2 379 746 T3

- Derivado 24: ácido 5-fenil-isoxazol-3-carboxílico (2-imidazol-1-il-etil)-amida
- Derivado 25: ácido 5-o-tolil-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- Derivado 26: ácido 5-m-tolil-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- Derivado 27: ácido 5-p-tolil-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- 5 Derivado 28: ácido 5-(2-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- Derivado 29: ácido 5-(3-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- Derivado 30: ácido 5-(4-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- Derivado 31: ácido 5-(4-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-[1,2,4] triazol-1-il-propil)-amida
- Derivado 32: ácido 5-(2-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (2-imidazol-1-il-etil)-amida
- 10 Derivado 33: ácido 5-(4-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (2-imidazol-1-il-etil)-amida
- Derivado 34: ácido 5-(4-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (2-pirazol-1-il-etil)-amida
- Derivado 35: ácido 5-(4-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,4] triazol-1-il-etil)-amida
- Derivado 36: ácido 5-(4-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,3] triazol-2-il-etil)-amida
- Derivado 37: ácido 5-(4-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,3] triazol-1-il-etil)-amida
- 15 Derivado 38: ácido 5-(4-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (2-tetrazol-2-il-etil)-amida
- Derivado 39: ácido 5-(4-cloro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-[1,2,4] triazol-1-il-propil)-amida
- Derivado 40: ácido 5-(4-cloro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,4] triazol-1-il-etil)-amida
- Derivado 41: ácido 5-(4-cloro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- Derivado 42: ácido 5-(2-metoxi-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- 20 Derivado 43: ácido 5-(3-metoxi-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- Derivado 44: ácido 5-(4-metoxi-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- Derivado 45: ácido 5-(3-nitro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- Derivado 46: ácido 5-(4-nitro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- Derivado 47: ácido 5-(3-amino-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- 25 Derivado 48: ácido 5-(4-amino-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- Derivado 49: ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-)-il-propil)-amida
- Derivado 50: ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-[1,2,4]-triazol-1-il-propil)-amida
- Derivado 51: ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-imidazol-1-il-etil)-amida
- Derivado 52: ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-pirazol-1-il-etil)-amida
- 30 Derivado 53: ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,4] triazol-1-il-etil)-amida
- Derivado 54: ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,3] triazol-1-il-etil)-amida

Derivado 55: ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,3] triazol-2-il-etil)-amida

Derivado 56: ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-piridin-3-il-etil)-amida

Derivado 57: ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-piridin-4-il-etil)-amida

Derivado 58: ácido 5-(5-bromo-tiofen-2-il)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida

5 Derivado 59: ácido 5-furan-3-il-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida

Derivado 60: ácido 5-furan-3-il-isoxazol-3-carboxílico (3-[1,2,4] - triazol-1-il-propil)-amida

Derivado 61: ácido 5-furan-3-il-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,4] - triazol-1-il-etil)-amida

Derivado 62: ácido 5-tiofen-3-il-isoxazol-3-carboxílico (3-[1,2,4] - triazol-1-il-propil)-amida

Derivado 63: ácido 5-tiofen-3-il-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida

10 Derivado 64: ácido 5-tiofen-3-il-isoxazol-3-carboxílico (2-imidazol-1-il-etil)-amida

Derivado 65: ácido 5-tiofen-3-il-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,4] - tiazol-1-il-etil)-amida

Derivado 66: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico [2-(piridin-2-il-oxi)-etil] - amida

Derivado 67: ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico [2-(piridin-2-il-oxi)-etil]-amida

Derivado 68: ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico [2-(1-metil-1H-tetrazol-5-il-sulfanil)-etil]-amida

15 Derivado 69: ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico [3-(4H-[1,2,4] triazol-3-il-sulfanil)-propil]-amida

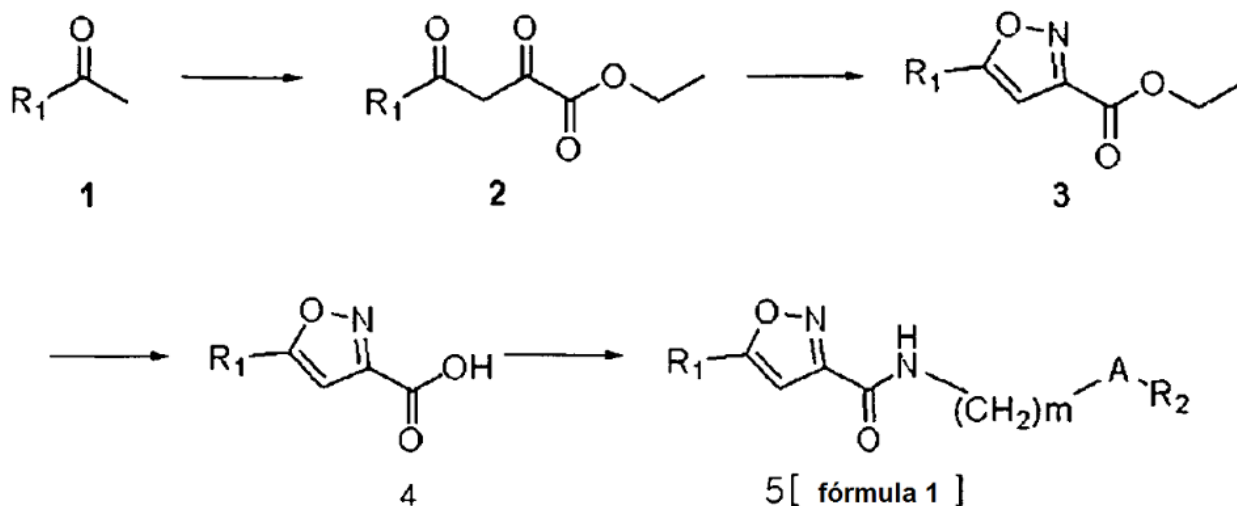
Derivado 70: ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico [2-(4-metil-4H-[1,2,4] triazol-3-il-sulfonil)- etil]-amida

20 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, también se proporciona un método para la prevención o tratamiento de la reestenosis vascular sin ninguno de los efectos secundarios de trombosis de stent tardía, empleando los derivados de los isoxazoles representados por la fórmula 1 o sus sales farmacéuticamente disponibles como un componente efectivo para proporcionar la actividad de la antireestenosis y acelerar la re-
endotelización.

25 La reestenosis vascular puede incluir, pero no se limita particularmente a, reestenosis coronaria después de angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA), reestenosis después de una intervención percutánea de enfermedades vasculares cerebrales y periféricas, estenosis vascular después de varias cirugías vasculares, estenosis vascular después de una operación de bypass y angioplastia de fistula arteriovenosa, estenosis después de trasplante del vaso sanguíneo del mismo individuo y vaso sanguíneo artificial, y la arteriosclerosis.

30 Los derivados del isoxazol de la Fórmula 1, de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención se pueden preparar a partir de compuestos conocidos, o los compuestos que se pueden preparar fácilmente a partir de los compuestos conocidos por un experto que tenga conocimiento en el campo de síntesis de compuestos en la técnica a la cual la presente invención pertenece. Por lo tanto, la descripción de un método de preparación de derivados del isoxazol propuesto en este documento, es solo un ejemplo preferible solamente con el propósito de ilustración y el orden de las operaciones unitarias se pueden cambiar selectivamente, si es necesario, no tienen la intención de limitar el alcance de la invención.

35 En primer lugar, el método de preparación de los derivados del isoxazol de Fórmula 1, será descrito con detalle con referencia al siguiente Esquema 1.

[Esquema 1]

5 El material inicial (1) disponible comercialmente se puede tratar, preferiblemente con etóxido de sodio 1.0 M, en una solución de etanol absoluto, y se hace reaccionar con dietil oxalato para obtener un intermedio (2). Después, el intermedio (2) se puede tratar con hidroxilamina en una solución de etanol absoluto para obtener un isoxazol intermedio (3). Luego, el intermedio (3) se puede tratar, preferiblemente con una solución acuosa de hidróxido de litio 1N, en la presencia de los solventes THF y metanol para sintetizar un ácido carboxílico intermedio (4). El intermedio (4) puede reaccionar con la amina deseada para obtener el compuesto final isoxazol (5) (los compuestos representados por la fórmula 1).

15 También, los compuestos de la Fórmula 1 de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención, tienen un efecto para agonizar la transducción de la señal Wnt/ β -catenina, como se ve de los resultados de los Ejemplos descritos a continuación. Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición que tiene un efecto para agonizar la transducción de la señal Wnt/ β -catenina, que esencialmente comprende una cantidad terapéutica efectiva de los derivados del isoxazol representados por la Fórmula 1, o las sales farmacéuticamente disponibles y los portadores farmacéuticamente disponibles de estos.

En la preparación de la composición farmacéutica, los portadores se pueden seleccionar de acuerdo con las formulaciones que serán preparadas, y las formulaciones se pueden preparar mezclando el portador con los componentes activos, derivados del isoxazol de la Fórmula 1, a una relación de mezcla apropiada.

20 Es decir, los componentes activos se pueden formular en una formulación oral, parenteral, inyectable o transcutánea de acuerdo con los usos deseados, y se preparan en una forma de dosificación por unidad en el aspecto de la administración fácil y la uniformidad de dosis.

25 La administración de la composición farmacéutica de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención puede comprender administraciones por vía intraperitoneal, intramuscular y subcutánea, así como la administración oral, pero se prefiere la administración parenteral. Por ejemplo, una composición farmacéutica se puede administrar con liberación controlada, insertando una bomba osmótica en humanos, y también ser administrada tópicamente por vía parenteral en una cánula endoluminal en la forma de un agente de recubrimiento. También, se prefiere administrar por vía tópica la composición farmacéutica de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención en la forma de un agente de recubrimiento, solo o en combinación de los otros fármacos convencionales.

30 En este caso, un método de recubrimiento después de un método convencional de recubrimiento de la cánula endoluminal con un fármaco. Como el método de recubrimiento, un método se puede utilizar, por ejemplo incluyendo: la mezcla de un fármaco con varios polímeros utilizados para recubrir la cánula endoluminal, recubriendo la cánula endoluminal con una mezcla del fármaco utilizando un método de recubrimiento tal como caída y centrifugado y esterilización del stent recubierto.

35 Más preferiblemente, la composición farmacéutica de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención puede ser administrada tópicamente por vía parenteral en la forma de un agente de recubrimiento de la cánula endoluminal.

Se pueden utilizar portadores farmacéuticos convencionales, para la preparación de formulaciones orales. Por ejemplo, se pueden utilizar agua, glicol, aceite, alcohol y similares, como portadores en el caso de las formulaciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires y Soluciones, y se pueden utilizar almidón, azúcar, caolín, lubricantes, aglutinantes, desintegrantes y similares, como portadores en el caso de las formulaciones sólidas tales como polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos. Los comprimidos y las cápsulas están en la forma de dosificación más conveniente en consideración de la fácil administración, y es más preferido preparar comprimidos y píldoras en la forma de una formulación entérica.

En el caso de las formulaciones parenterales, generalmente se utiliza agua estéril como portador. En este caso, las formulaciones parenterales además pueden comprender otros componentes tales como un solubilizador.

La formulación inyectable, por ejemplo una suspensión oleosa o acuosa inyectable estéril, se puede preparar con un apropiado agente dispersante, de humectación o suspensión de acuerdo con los métodos conocidos. El solvente que se puede utilizar en este documento incluye agua, solución de Ringer y solución de NaCl isotónica, y un aceite fijo estéril, por lo general, también se utiliza como el solvente o medio suspendido. Cualquiera de los aceites fijos no-pungentes que contienen mono- o di-glicéridos se pueden utilizar para este propósito, y se pueden utilizar otros ácidos grasos tales como ácido oleico para la formulación inyectable.

En el caso de la formulación transcutánea, como portadores se pueden utilizar promotores de infiltración y/o agentes de humectación apropiados opcionalmente junto con aditivos apropiados que no tengan ninguna irritación con la piel. No existe limitación particular en los aditivos cuando los aditivos son de ayuda para promover su administración a través de la piel o preparar una composición deseada. También, la formulación transcutánea puede ser administrada en varias formas tales como parches transcutáneos, cremas o ungüentos.

Mientras tanto, con el fin de prevenir que los componentes activos, de acuerdo con la presente invención, sean eliminados rápidamente del cuerpo humano, la composición que comprende los derivados del isoxazol de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención, se pueden formular en una formulación de liberación controlada. En este caso, ejemplos de portadores específicos que se pueden utilizar en este documento incluyen implantes, sistemas de administración microencapsulados, polímeros biodegradables/biocompatibles, etc. que se conocen en la técnica.

La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad de un componente activo que es efectiva para aliviar o reducir los síntomas de enfermedades que necesitan el tratamiento, o reducir o retrasar la aparición de marcadores clínicos o síntomas de enfermedades que necesitan de la prevención. La cantidad terapéuticamente efectiva se puede determinar de las experiencias realizando los experimentos en los compuestos correspondientes en los conocidos sistemas de modelo *in vivo* y *ex vivo* para enfermedades que necesitan el tratamiento.

Cuando el componente activo, particularmente los derivados del isoxazol de Fórmula 1, en la composición de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención se administran a los efectos clínicos, una dosificación diaria donde los componentes activos se pueden administrar a huéspedes en dosis únicas o divididas, es más preferible en un rango a partir de 0.1 a 100 mg por 1 kg de peso corporal, pero la dosis equivalente para ciertos pacientes se puede variar con ciertos compuestos que se utilizan, con el peso, el género y el estado de salud de los pacientes, la dieta, el tiempo de administración de fármacos, las rutas de administración, la velocidad de excreción, la mezcla de fármacos, la gravedad de las enfermedades, etc.

Los derivados del isoxazol de Fórmula 1, se pueden utilizar para formular una composición farmacéutica efectiva en sus formas de profármaco, etc., cuando sea necesario.

También, la composición de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención, además puede comprender otro componente que no inhiba, o suplemente la acción de los componentes activos, y se pueden formular en otras varias formas conocidas en la técnica. La composición de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención, además preferiblemente puede comprender un inhibidor de la reestenosis del vaso sanguíneo tal como rapamicina o paclitaxel, conocido en la técnica anterior.

Efectos Ventajosos

Como se describe anteriormente, la composición farmacéutica de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención puede ser útil para prevenir la trombosis de stent tardía, que es uno de los efectos secundarios de los convencionales stents liberadores del fármaco, ya que la composición farmacéutica muestra una actividad anti-reestenosis y acelera la reendotelización.

Breve Descripción de los Dibujos

FIG. 1 es un diagrama que ilustra una estructura del gen diseñada para determinar un efecto del derivado del isoxazol en la actividad de la β -catenina.

5 FIG. 2 es una vista conceptual que ilustra un sistema de selección de la línea celular, construida para evaluar un efecto de los derivados del isoxazol en la actividad de la β -catenina.

FIG. 3 es una gráfica que ilustra los resultados en los cuales, se determina una acción del sistema de selección como se muestra en la FIG. 2 utilizando cloruro de litio, que es un agonista de la transducción de la señal Wnt/ β -catenina.

10 FIG. 4 es un diagrama que ilustra los resultados en los cuales, se determina una cantidad de β -catenina acumulada en las células, a través de un experimento western blot utilizando un anticuerpo β -catenina humano, cuando la célula HEK293 se trata con varias concentraciones de un derivado del isoxazol.

FIG. 5 es una gráfica que ilustra un efecto del derivado del isoxazol de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención y los convencionales inhibidores de la reestenosis, el paclitaxel y la rapamicina, en la proliferación de la célula endotelial y la proliferación de la célula del músculo liso.

15 FIG. 6 es una gráfica que ilustra un efecto en la proliferación de la célula endotelial y la proliferación de la célula del músculo liso vascular, cuando cada célula se trata con el derivado del isoxazol y la rapamicina juntos.

FIG. 7 es una gráfica que ilustra un efecto en la proliferación de la célula endotelial, cuando cada célula se trata con el derivado del isoxazol y el paclitaxel juntos.

20 FIG. 8 es una gráfica que ilustra un efecto de varios derivados del isoxazol de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención en la proliferación de la célula endotelial.

FIG. 9 es una gráfica que ilustra un efecto de varios derivados del isoxazol de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención en la proliferación de la célula endotelial.

FIG. 10 es una gráfica que ilustra un efecto de varios derivados del isoxazol de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención en la proliferación de la célula endotelial.

25 FIG. 11 es un diagrama que ilustra un efecto en la inhibición de la reestenosis, cuando cada célula se trata con el derivado del isoxazol y la rapamicina juntos, utilizando un modelo de lesión de la arteria carótida de rata.

FIG. 12 es un diagrama que ilustra un efecto del derivado del isoxazol de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención en la re-endotelización utilizando un modelo de lesión de la arteria carótida de rata.

30 FIG. 13 es un diagrama que ilustra un efecto en la re-endotelización, cuando cada célula se trata con el derivado del isoxazol y la rapamicina juntos, utilizando un modelo de lesión de la arteria carótida de rata.

FIG. 14 es un diagrama que ilustra un efecto de los derivados del isoxazol de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención en la inhibición de la reestenosis utilizando un modelo porcino de cánula endoluminal coronaria.

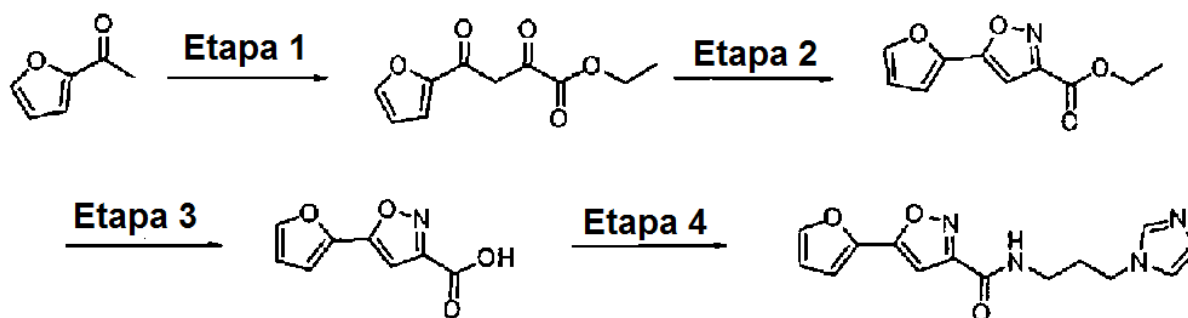
35 FIG. 15 es un diagrama que ilustra un efecto del derivado del isoxazol de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención en la re-endotelización, utilizando un modelo porcino de cánula endoluminal coronaria.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

En lo sucesivo, las modalidades ejemplares de la presente invención serán descritas con más detalle. Sin embargo, se entiende que la descripción propuesta en este documento es solo un ejemplo preferible, solamente con el propósito de ilustración, no tiene la intención de limitar el alcance de la invención.

40 **Ejemplo preparativo 1: Preparación del ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3- carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida**

El ácido 5-Furan-2-il-isoxazol-3- carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida (derivado 1) se preparó a través de la ruta representada por el siguiente Esquema 2. Cada etapa de la ruta de reacción se describe con más detalle, como sigue.

[Esquema 2]**1) Etapa 1: Preparación del ácido 4-furan-2-il-2,4-dioxo-butírico etil éster**

5 A una solución de etóxido de sodio (6.81 g) en etanol absoluto (200 mL), se le adicionó lentamente 2-acetilfuran (5.01 mL) a 0°C. La solución resultante se agitó a 0°C durante 2 horas, y se adicionó lentamente dietil oxalato (9.30 mL) a la solución. La solución resultante se agitó durante 18 horas, y la reacción se apagó con solución de ácido clorhídrico 1N. La mezcla resultante se concentró bajo presión reducida, y luego el residuo fue extraído con cloruro de metileno. Una fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y a continuación se concentró bajo presión reducida para proporcionar 10.0 g del ácido 4-furan-2-il-2,4-dioxo-butírico etil éster. Este concentrado se utilizó en las siguientes etapas sin otra purificación.

¹H-NMR (acetona-d₆, 200MHz), ppm(δ): 8.02~7.99(m, 1H), 7.62~7.55(m, 1H), 6.98~6.94(m, 1H), 6.83~6.77 (m, 1H), 4.40(q, 2H), 1.38(t, 3H)

2) Etapa 2: Preparación del ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3- carboxílico etil éster

15 Una suspensión del ácido 4-furan-2-il-2,4-dioxo-butírico etil (10.0 g) y la sal clorhidrato de hidroxilamina en EtOH se agitó a 85°C durante 2 horas, y la mezcla resultante se concentró bajo presión reducida. El concentrado se disolvió en cloruro de metileno y agua destilada, y una fase orgánica se separó. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró a través de un cojín de silica gel, y a continuación se concentró bajo presión reducida para proporcionar 8.01 g del ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3- carboxílico etil éster (producción: 77%). Este concentrado se utilizó en las siguientes etapas sin otra purificación.

20 ¹H-NMR(acetona-d₆, 200MHz), ppm(δ): 7.90~7.86(m, 1H), 7.20(d, 1H), 7.00(s, 1H), 6.77~6.73(m, 1H), 4.45 (q, 2H), 1.41(t, 3H)

3) Etapa 3: Preparación del ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3- carboxílico

25 A una solución del ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3- carboxílico etil éster (4.14 g) en THF (130 mL) y metanol (25 mL), se le adicionó lentamente solución acuosa de hidróxido de litio 1N (80 mL). La mezcla resultante se agitó durante 15 horas, y a continuación se concentró bajo presión reducida. La solución remanente se acidificó con ácido clorhídrico 1 N para formar un sólido, y el sólido se filtró, se lavó con agua destilada, se secó para proporcionar 3.22 g del ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3- carboxílico (producción: 90 %) como un sólido de color blanco.

¹H-NMR(acetona-d₆, 200MHz), ppm(δ): 7.90~7.86(m, 1H), 7.19(d, 1H), 7.00(s, 1H), 6.77~6.73(m, 1H)

4) Etapa 4: Preparación del ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3- carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida (derivado 1)

30 A una solución del ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3- carboxílico (7 mg) y 3-imidazol-1-il-propilamina (0.005 mL) en DMF se le adicionaron HOBt (8 mg), EDC (9 mg) y TEA (0.014 mL). La solución resultante se agitó a un temperatura ambiente durante 18 horas, y a continuación se concentró bajo presión reducida. El concentrado resultante se purificó con HPLC preparativa para proporcionar 4 mg del ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3- carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida (producción: 35 %).

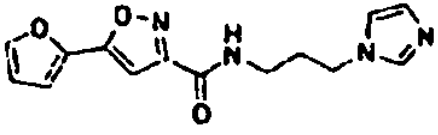
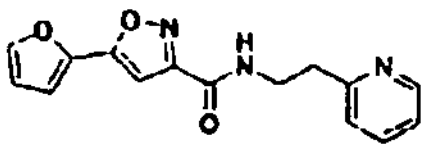
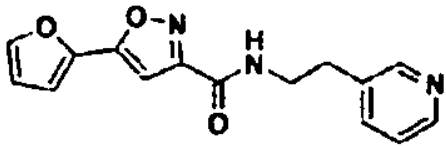
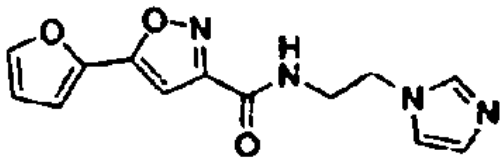
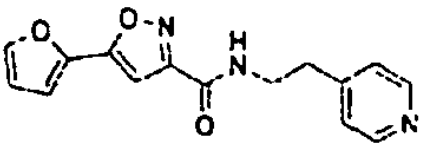
35 ¹H-NMR(acetona-d₆, 200MHz), ppm(δ): 8.16(bs, 1H), 7.86~7.84(m, 1H), 7.65~7.61(m, 1H), 7.19~7.12(m, 2H), 6.97~6.89(m, 2H), 6.78~6.71(m, 1H), 4.18(t, 2H), 3.48(q, 2H), 2.24~2.07(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 286.11 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)⁺ : 287

Los siguientes derivados 2 a 70, fueron preparados de la misma manera como en la síntesis del derivado del isoxazol 1, excepto para el uso de un apropiado material inicial. Los resultados de NMR se enumeran en la siguiente Tabla 1.

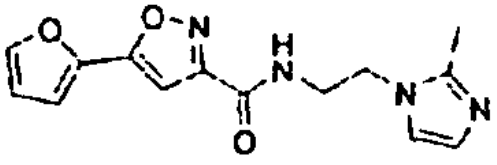
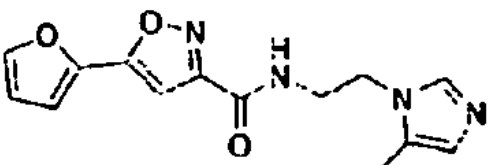
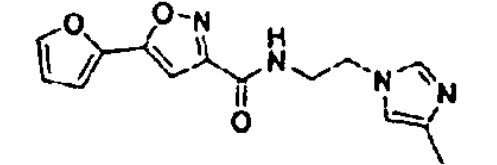
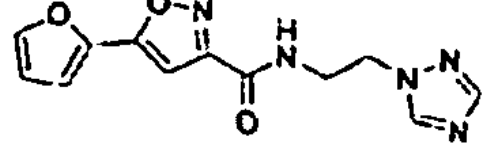
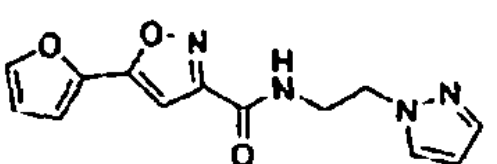
Tabla

5

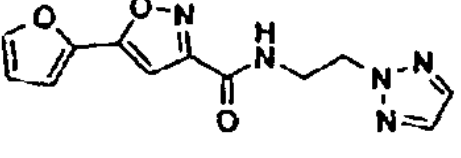
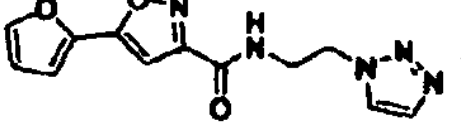
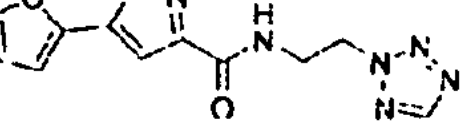
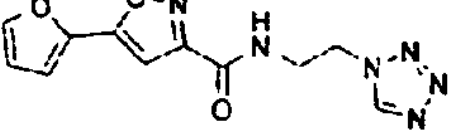
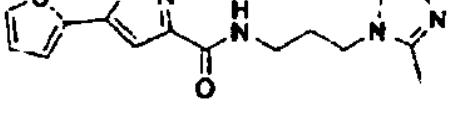
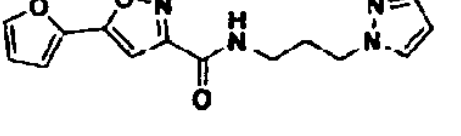
[Tabla 1]

No.	Estructura Química	Resultados NMR
1		$^1\text{H-NMR}$ (acetona- d_6 , 200MHz), ppm(δ): 8.16(bs, 1H), 7.86~7.84(m, 1H), 7.65~7.61(m, 1H), 7.19~7.12(m, 2H), 6.97/~6.89(m, 2H), 6.78~6.71(m, 1H), 4.18(t, 2H), 3.48(q, 2H), 2.24~2.07(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 286.11 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) + : 287
2		$^1\text{H-NMR}$ (acetona- d_6 , 200MHz), ppm(δ): 8.78~8.06(m, 2H), 8.00~7.53(m, 2H), 7.50~6.60(m, 5H), 3.83(q, 2H), 3.14(t, 2H) Masa Exacta (calc.): 283.10 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 284
3		$^1\text{H-NMR}$ (acetona- d_6 , 200MHz), ppm(δ): 8.56~8.42(m, 2H), 8.09(bs, 1H), 7.88~7.84(m, 1H), 7.75~7.67(m, 1H), 7.35~7.26(m, 1H), 7.18~7.13(m, 1H), 6.91(s, 1H), 6.76~6.71(m, 1H), 3.73 (q, 2H), 3.02(t, 2H) Masa Exacta (calc.): 283.10 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+: 284
4		$^1\text{H-NMR}$ (acetona- d_6 , 200MHz), ppm(δ): 8.20(bs, 1H), 7.91~7.84(m, 1H), 7.63~7.54(m, 1H), 7.22~7.12(m, 2H), 6.98~6.88(m, 2H), 6.78~6.70(m, 1H), 4.34(t, 2H), 3.82(q, 2H) Masa Exacta (calc.) : 272.09LC-MS(ESI+)m/e(M+1)+ : 273
5		$^1\text{H-NMR}$ (acetona- d_6 , 200MHz), ppm(δ) : 8.53~8.48(m, 2H), 8.05(bis, 1H), 7.88~7.83(m, 1H), 7.33~7.25(m, 2H), 7.17~7.14(m, 1H), 6.91(s, 1H), 6.75~6.70(m, 1H), 3.75(q, 2H), 3.02(t, 2H) Masa Exacta (calc.): 283.10 LCMS (ESI+) m/e (M+1)+: 284

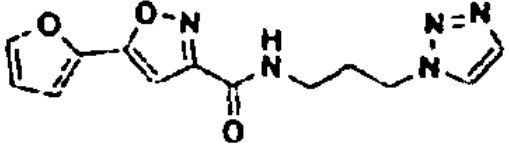
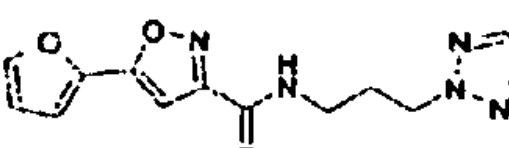
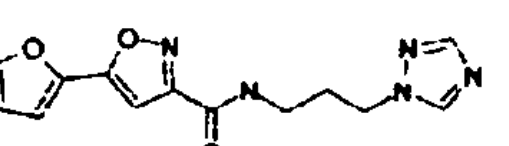
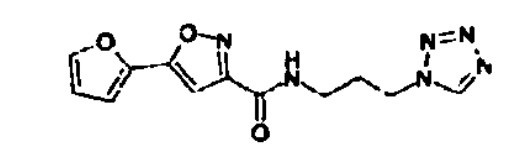
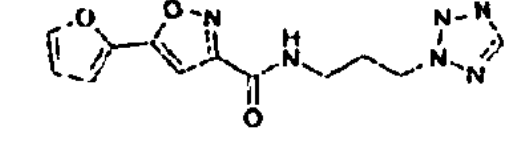
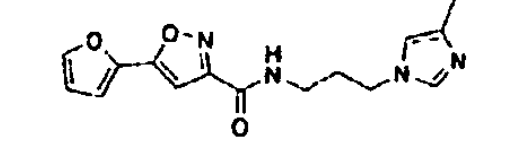
(continuación)

No.	Estructura Química	Resultados NMR
6		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ) : 8.25(bs, 1H), 7.88~7.85(m, 1H), 7.18~7.16(m, 1H), 7.02~6.97(m, 1H), 6.93(s, 1H), 6.76~6.71(m, 2H), 4.21(t, 2H), 3.77(q, 2H), 2.34(s, 3H) Masa Exacta (calc.): 286.11 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 287
7		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.22(bs, 1H), 7.89~7.84(m, 1H), 7.45~7.3(m, 1H), 7.19~7.13(m, 1H), 6.93(s, 1H), 6.76~6.71(m, 1H), 6.65~6.61(m, 1H), 4.24(t, 2H), 3.74(q, 2H), 2.25(s, 3H) Masa Exacta (calc.): 286.11 LCMS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 287
8		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.22(bs, 1H), 7.89~7.84(m, 1H), 7.45~7.38(m, 1H), 7.19~7.13(m, 1H), 6.93(s, 1H), 6.86~6.82(m, 1H), 6.76~6.71(m, 1H), 4.29(t, 2H), 3.74(q, 2H), 2.10(s, 3H) Masa Exacta (calc.): 286.11 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 287
9		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.40(s, 1H), 8.20(bs, 1H), 7.91~7.83(m, 2H), 7.18~7.16(m, 1H), 6.92(s, 1H), 6.76~6.71(m, 1H), 4.54(t, 2H), 3.90(q, 2H) Masa Exacta (calc.): 273.09 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 274
10		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.14(bs, 1H), 7.89~7.85(m, 1H), 7.71~7.66(m, 1H), 7.49~7.94(m, 1H), 7.19~7.14(m, 1H), 6.93(s, 1H), 6.76~6.12(m, 1H), 6.28~6.22(m, 1H), 4.45(t, J=5.80, 2H), 3.92~3.81(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 272.26 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 273

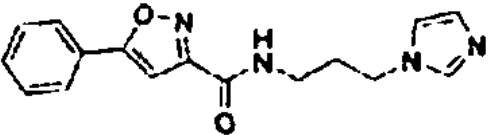
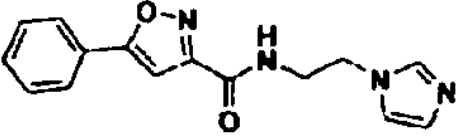
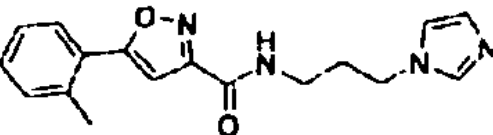
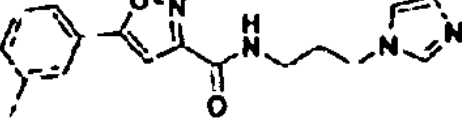
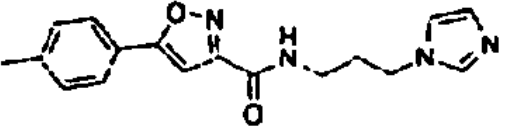
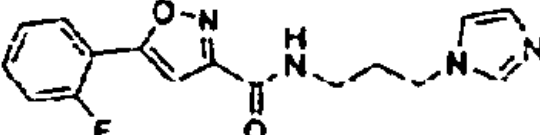
(continuación)

No.	Estructura Química	Resultados NMR
11		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.13(bs, 1H), 7.89~7.84(m, 1H), 7.71 (s, 2H), 7.19~7.14(m, 1H), 6.92(s, 1H), 6.76~6.72(m, 1H), 4.74(t, J=5.80, 2H), 4.01~3.90(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 273.25 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 274
12		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.20(bs, 1H), 8.03s, 1H), 7.89~7.84 (m, 1H), 7.67(s, 1H), 7.19~7.19(m, 1H), 6.92(s, 1H), 6.76~6.72(m, 1H), 4.74 (t, J=5.80, 2H), 4.01~3.91(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 273.25 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 274
13		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.74(s, 1H), 8.24(bs, 1H), 7.89~7.85 (m, 1H), 7.19~7.14(m, 1H), 6.91(s, 1H), 6.76~6.72(m, 1H), 5.02(t, J=5.80, 2H), 4.25~3.99(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 274.24 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 275
14		¹ H-NMR(DMSO-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 9.41(s, 1H), 9.04(t, J=5.40, 1H), 8.01~7.94(m, 1H) 7.38~7.23(m, 1H), 7.03(s, 1H), 6.78~6.72(m, 1H), 4.66(t, J=5.40, 2H), 3.72(q, J=5.40, 2H) Masa Exacta (calc.): 274.24 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 275
15		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.15(bs, 1H), 7.89~7.80(m, 1H), 7.19~7.14(m, 1H), 7.10~7.04(m, 1H), 6.94(s, 1H), 6.79~6.71(m, 2H), 4.06(t, J=6.00, 2H), 3.57~3.43(m, 2H), 2.33(s, 3H), 2.19~2.07(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 300.32 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 301
16		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.08(bs, 1H), 7.89~7.84(m, 1H), 7.74~7.67(m, 1H), 7.47~7.42(m, 1H), 7.19~7.14(m, 1H), 6.93(s, 1H), 6.76~6.71(m, 1H), 6.26~6.22(m, 1H), 4.30(t, J=7.00, 2H), 3.52~3.40(m, 2H), 2.27~2.11(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 286.29 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 287

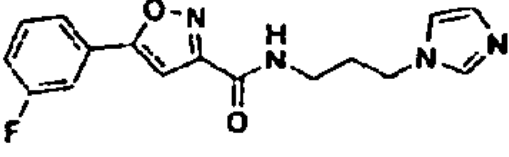
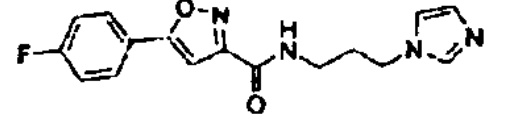
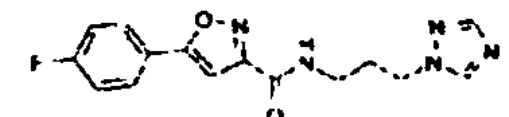
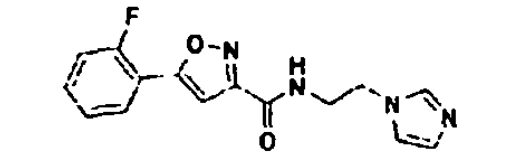
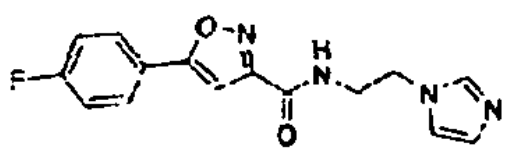
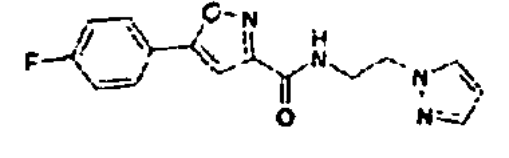
(continuación)

17		¹ H-NMR(DMSO-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.92(bs, 1H), 8.16~8.12(m, 1H), 7.98~7.94(m, 1H), 7.71~7.67(m, 1H), 7.25~7.20(m, 1H), 7.04(s, 1H), 6.73~6.71(m, 1H), 4.41(t, J=6.00, 2H), 3.27~3.21(m, 2H), 2.10~2.02(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 287.28 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 288
18		¹ H-NMR(DMSO-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 9.00~6.95(m, 1H), 7.98(s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.23(m, 1H), 7.04(s, 1H), 6.74(m, 1H), 4.47(t, 2H), 3.29~3.25(m, 2H), 2.20~2.05(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 287.10LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 288
19		¹ H-NMR(DMSO-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 9.00~8.95(m, 1H), 8.51(s, 1H), 7.97 (m, 2H), 7.24(m, 1H), 7.06(s, 1H), 6.75 (m, 1H), 4.23(t, 2H), 3.30~3.20(m, 2H), 2.10~2.04(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 287.10 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) + : 288
20		¹ H-NMR(DMSO-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 9.39(s, 1H), 9.00~8.95(m, 1H), 7.97(s, 1H), 7.23(m, 1H), 7.05(s, 1H), 6.79(m, 1H), 4.50(t, 2H), 3.29~3.25(m, 2H), 2.15~2.08(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 288. 10 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 289
21		¹ H-NMR(DMSO-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.96(m, 2H), 7.97(s, 1H), 7.24(s, 1H), 7.06(s, 1H), 6.80~6.70(m, 1H), 4.80~4.64 (m, 2H), 3.29~3.25(m, 2H), 2.22~2.05(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 288.10 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 289
22		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.18(bs, 1H), 7.99~7.84(m, 1H), 7.19~7.14(m, 1H), 7.09~7.04(m, 1H), 6.94(s, 1H), 6.79~6.71(m, 2H), 4.06(t, J=7.40, 2H), 3.57~3.43(m, 2H), 2.32(s, 3H), 2.21~2.07(m, 2H); Masa Exacta (calc.): 300.32 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 301

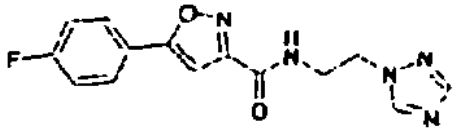
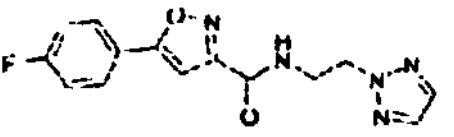
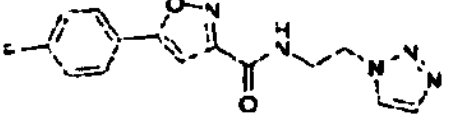
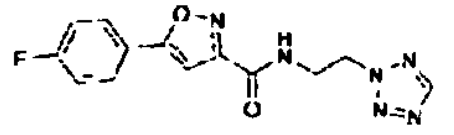
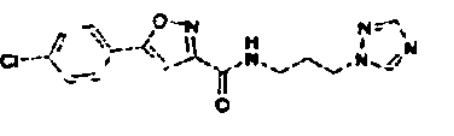
(continuación)

No.	Estructura Química	Resultados NMR
23		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.17(bs, 1H), 8.01~7.92(m, 2H), 7.69~7.53(m, 4H), 7.24~7.17(m, 2H), 7.01~6.73(m, 1H), 4.19(t, 2H), 3.47(q, 2H), 2.24~2.06(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 296.13 LC-MS (ESI+) m/c (M+1)+ : 297
24		¹ NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.15(bs, 1H), 7.99~7.91(m, 2H), 7.62~7.50(m, 4H), 7.19~7.12(m, 2H), 6.93~6.86(m, 1H), 4.34(t, J=5.80, 2H), 3.87~3.77(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 282.30 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 283
25		¹ H-NMR (acetona-d ₆ , 200MHz), ppm (δ): 8.12(bs, 1H), 7.83~7.76(m, 1H), 7.66~7.62(m, 1H), 7.48~7.36(m, 3H), 7.22~7.18(m, 1H), 7.01~6.93(m, 2H), 4.19(t, 2H), 3.50(q, 2H), 2.56(s, 3H), 2.25~2.13(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 310.14 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 311
26		¹ H-NMR (acetona-d ₆ , 200MHz), ppm (δ) : 8.15(bs, 1H), 7.82~7.62(m, 3H), 7.52~7.34(m, 2H), 7.23~7.15(m, 2H), 6.95~6.74 (m, 1H), 4.19(t, 2H), 3.49(q, 2H), 2.45(s, 3H), 2.43~2.05(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 310.14 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 311
27		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm (δ) : 8.10(bs, 1H), 7.88~7.81(m, 2H), 7.66~7.62(m, 1H), 7.95~7.36(m, 2H), 7.22~7.17(m, 1H), 7.11(s, 1H), 6.95~6.40(m, 1H), 4.18(t, 2H), 3.43(q, 2H), 2.43(s, 3H), 2.25~2.03(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 310.14 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 311
28		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.25~7.96(m, 2H), 7.72~7.35(m, 4H), 7.26~6.91(m, 3H), 4.20(t, 2H), 3.50(q, 2H), 2.29~2.07(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 314.12 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 315

(continuación)

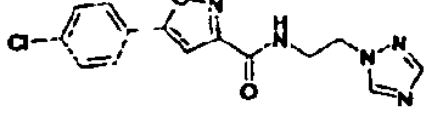
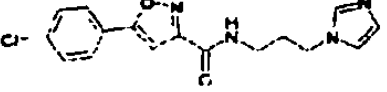
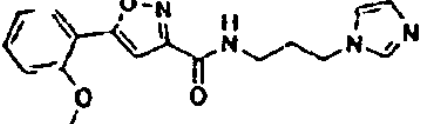
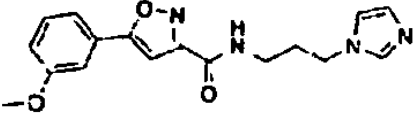
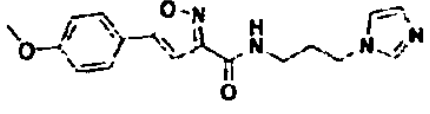
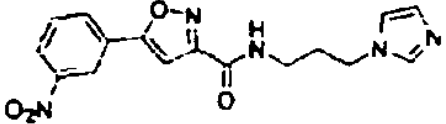
No.	Estructura Química	Resultados NMR
29		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.26~7.06(m, 1H), 7.9~7.54(m, 4H), 7.44~7.12(m, 3H), ¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz),ppm(δ): 7.06~6.76(m, 1H), 4.20(t, 2H), 3.50(q, 2H), 2.24~2.07(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 314.12 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 315
30		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm (δ) : 8.21~7.951m, 2H), 7.67~7.58(m, 1H), 7.44~7.28(m, 2H), 7.24~7.12(m, 1H), 6.94(s, 1H), 4.17(t, 2H), 3.48(q, 2H), 2.23~2.06(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 314.12 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 315
31		¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 200MHz), ppm(δ) : 8.97~8.92(m, 1H), 8.51(s, 1H), 8.02~7.95 (m, 3H), 7.43~7.34(m, 3H), 4.21 (t, 2H), 3.29~3.22(m, 2H), 2.02(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 315.11LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 316
32		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.26(bs, 1H), 8.07~7.96(m, 1H), 7.72~7.35(m, 4H), 7.19~7.04(m, 2H), 6.92(s, 1H), 4.35(t, J=6.00, 2H), 3.88~3.76(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 300.29 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 301
33		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.15(bs, 1H), 8.09~7.96(m, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.99~7.30(m, 2H), 7.19~7.08(m, 2H), 6.92(s, 1H), 4.34(t, J=5.80, 2H), 3.88~3.75(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 300.29 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 301
34		¹ H-NMR(DMSO-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.95(m, 1H), 7.99(m, 2H), 7.70(s, 1H), 7.44~7.34(m, 4H), 6.22(m, 1H), 4.31(t, 2H), 3.65(m, 2H) Masa Exacta (calc.):300.10 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 301

(continuación)

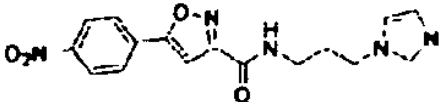
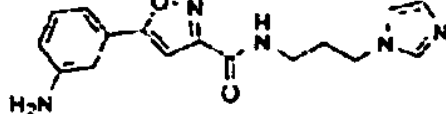
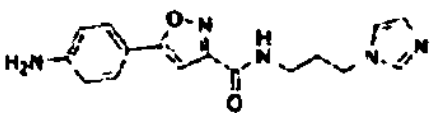
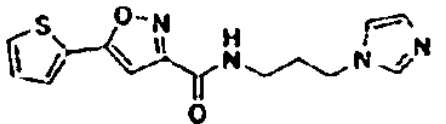
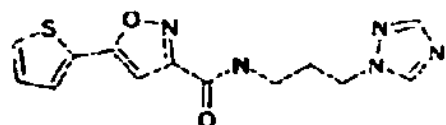
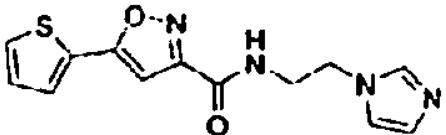
35		¹ H-NMR(DMSO-d ₆ , 200MHz), ppm (δ) : 8.43(m, 1H), 8.20(br, 1H), 8.06~7.99 (m, 2H), 7.91(m, 1H), 7.41~7.33(2H, m), 7.17(m, 1H), 4.55(m, 2H), 3.93(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 301.10 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 302
36		¹ H-NMR(DMSO-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.95(br, 1H), 8.05~7.95(m, 2H), 7.75 (s, 2H), 7.50~7.34(m, 3H), 4.61(s, 2H), 3.78~3.62(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 301.10 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 302
37		¹ H-NMR(DMSO-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.95(m, 1H), 8.11(s, 1H), 8.00~7.96 (m, 2H), 7.71(s, 1H), 7.45~7.34(m, 3H), 4.59(t, 2H), 3.78~3.62(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 301.10 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) + : 302
38		¹ H-NMR(DMSO-d ₆ , 200MHz), ppm (δ) : 8.96(m, 2H), 8.02~7.94(m, 2H), 7.45~7.33 (m, 3H), 4.90(t, 2H), 3.85~3.73(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 302.09 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) + : 303
39		¹ H-NMR(DMSO-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.90(m, 1H), 8.49(s, 1H), 7.95~7.91 (m, 3H), 7.62~7.58(m, 2H), 7.39(s, 1H), 4.20 (t, 2H), 3.29~3.25(m, 2H), 2.05~1.98(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 331.08 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 332

ES 2 379 746 T3

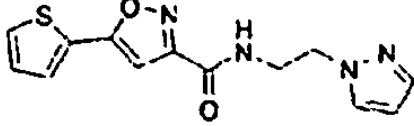
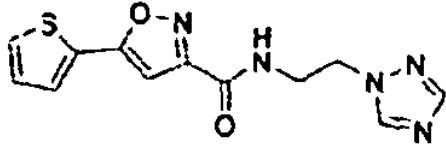
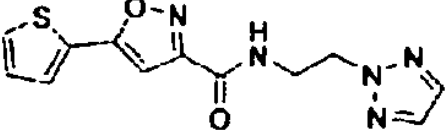
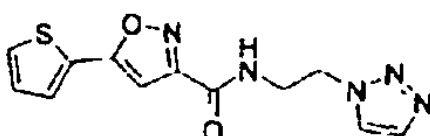
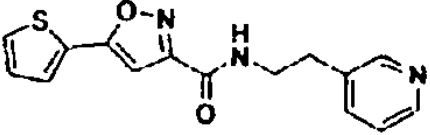
(continuación)

No.	Estructura Química	Resultados NMR
40		¹ H-NMR(DMSO-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.95~8.84(m, 1H), 8.46(s, 1H), 7.95~7.91 (m, 3H), 7.62~7.58(m, 2H), 7.36(s, 1H), 4.36(m, 2H), 3.66(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 317.07 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 318
41		¹ H-NMR(DMSO-d ₆ , 500MHz), ppm(δ): 9.00(t, 1H), 7.97 (m, 2H), 7.66 (m, 2H), 7.44(s, 1H), 7.22(s, 1H), 6.90(s, 1H) 4.03(t, 2H), 3.31(q, 2H), 2.00(q, 2H) Masa Exacta (calc.) : 330.09 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 331
42		¹ H-NMR(acetona-d ₆ ,200MHz),ppm(δ): 8.27~7.81(m, 2H), 7.77~7.42(m, 2H), 7.90~6.82(m, 5H), 4.11(t, 2H), 4.05(s, 3H), 3.48(q, 2H), 2.23~2.02(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 326.14 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 327
43		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.23(bs, 1H), 7.79~6.89(m, 8H), 4.24 (t, 2H), 3.91(s, 3H), 3.47(c, 2H), 2.39~2.12(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 326.14 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 327
44		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.32~7.42(m, 4H), 7.38~6.90(m, 5H), 4.19(t, 2H), 3.96(s, 3H), 3.46(q, 2H), 2.39~2.02(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 326.14 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 327
45		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.19~8.96(m, 2H), 7.85~7.54(m, 5H), 7.19(s, 1H), 6.96~6.88(m, 1H), 4.21(t, 2H), 3.42(q, 2H), 2.21~2.06(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 341.11 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 342

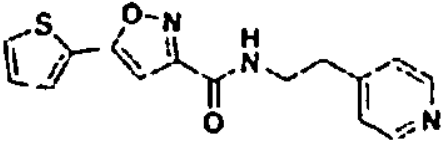
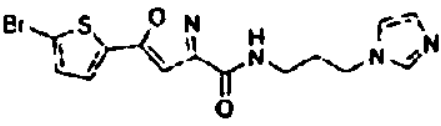
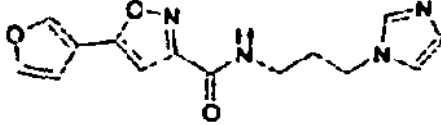
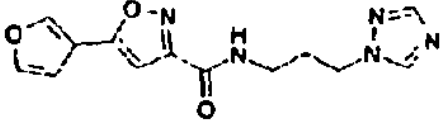
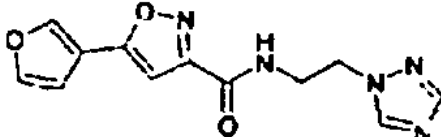
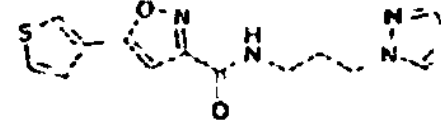
(continuación)

No.	Estructura Química	Resultados NMR
46		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.50~8.05(m, 5H), 7.66~7.45(m, 2H), 7.21~7.17(m, 1H), 6.94(s, 1H), 4.19(t, 2H), 3.49(q, 2H), 2.22~2.00(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 341.11 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 342
47		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ) : 7.76~7.65(m, 1H), 7.55~6.95(m, 6H), 6.79~6.56(m, 2H), 4.15(t, 2H), 3.23(q, 2H), 2.35~2.20(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 311.14 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ . 312
48		¹ H-NMR(acetona-d ₆ ,200MHz), ppm(δ): 7.69~7.56(m, 1H), 7.35~7.26(m, 1H), 7.18~7.02(m, 3H), 6.92(s, 1H), 6.74~6.56(m, 3H), 4.09(t, 2H), 3.21(q, 2H), 2.22~1.99(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 311.14 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 312
49		¹ H-NMR(acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.13(bs, 1H), 7.64~7.66(m, 2H), 7.66~7.61(m, 1H), 7.32~7.26 (m, 1H), 7.21~7.18(m, 1H), 7.03(s, 1H), 6.77~6.72(m, 1H), 4.18(t, 2H), 3.48(q, 2H), 2.24~2.06(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 302.08 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 303
50		¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.91(m, 1H), 8.52(s, 1H), 7.97(s, 1H), 7.83(m, 1H), 7.79(m, 1H), 7.29~7.25(m, 1H), 7.19(s, 1H), 4.23(t, 2H), 3.29~3.23 (m, 2H), 2.07~2.00 (m,2H) Masa Exacta(calc.): 303.08LC-MS(ESI+) m/e (M+1)+ : 304
51		¹ H-NMR (acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.15(bs, 1H), 7.86~7.76(m, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.32~7.25(m, 1H), 7.16~7.12(m, 1H), 7.01(s, 1H), 6.93~6.89 (m, 1H), 4.33 (t, J=5.80, 2H), 3.88~3.76(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 288. 33 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 289

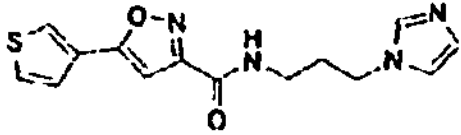
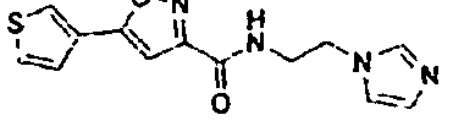
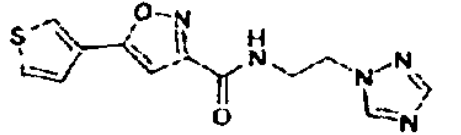
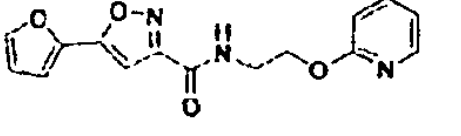
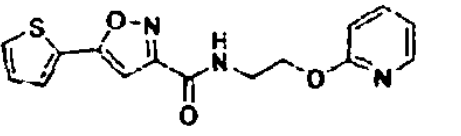
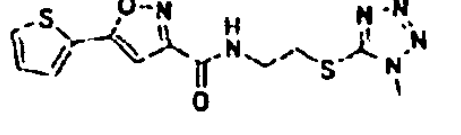
(continuación)

No.	Estructura Química	Resultados NMR
52		¹ H-NMR (acetona-d ₆ , 200MHz), ppm (δ): 8.10(bs, 7H), 7.86~7.76(m, 2H), 7.72~7.66(m, 1H), 7.49~7.46(m, 1H), 7.33~7.26(m, 1H), 7.02(s, 1H), 6.27~6.23(m, 1H), 4.44(t, J=5.80, 2H), 3.92~3.81(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 288.33 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 289
53		¹ H-NMR (acetona-d ₆ , 200MHz), ppm (δ): 8.40(s, 1H), 8.18(bs, 1H), 7.90(s, 1H), 7.84~7.76(m, 2H), 7.32~7.26(m, 1H), 7.01(s, 1H), 4.54(t, J=5.40, 2H), 3.96~3.83(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 289.32 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 290
54		¹ H-NMR (acetona-d ₆ , 200MHz), ppm(δ): 8.10(bs, 1H), 7.85~7.76(m, 2H), 7.71 (s, 2H), 7.32~7.26(m, 1H), 7.02(s, 1H), 4.74(t, J=5.80, 2H), 4.04~3.90(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 289.32 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 290
55		¹ H-MMR (acetona-d ₆ , 200MHz), ppm (δ): 8.19 (bs, 1H), 8.03(s, 1H), 7.84~7.76 (m, 2H), 7.67(s, 1H), 7.32~7.26(m, 1H), 7.01(s, 1H), 4.74(t, J=5.40, 2H), 4.01~3.88(m, 2H) Masa Exacta (calc.): 289.32 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 290
56		¹ H-NMR (acetona-d ₆ , 200MHz), ppm (δ) : 8.53~8.42(m, 2H), 8.07(bs, 1H), 7.83~ 7.68(m, 3H), 7.35~7.25(m, 2H), 7.00 (s, 1H), 3.73(q, 2H), 3.01(t, 2H) Masa Exacta (calc.) : 299.07 LC-MS (ESI+) m/e (M+1)+ : 300

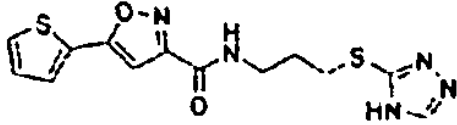
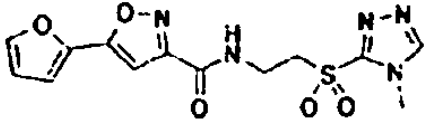
(continuación)

No.	Estructura Química	Resultados NMR
57		¹ H-NMR (acetona-d ₆ , 200MHz), ppm (δ) : 8.53~8.43 (m, 2H), 8.08(bs, 1H), 7.84~ 7.53 (m, 2H), 7.38~7.11 (m, 3H), 7.01 (s, 1H), 3.74 (q, 2H), 3.02 (t, 2H) Masa Exacta (calc.) : 299.07 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 300
58		¹ H-NMR (acetona-d ₆ , 200MHz), ppm (δ) : 8.15 (bs, 1H), 7.90~7.72 (m, 1H), 7.65~7.58 (m, 1H), 7.39~21 (m, 21H), 7.16~7.01 (m, 2H), 4.23 (t, 2H), 3.46 (q, 2H), 2.27~2.12 (m, 211) Masa Exacta (calc.) : 379.99 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 381
59		¹ H-NMR(DMSO-d ₆ , 500MHz), ppm(δ): 8.89 (m, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.90 (m, 1H), 7.66 (m, 1H), 7.21(s, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.03 (m, 1H), 6.90 (s, 1H), 4.02 (t, 2H), 3.24(q, 2H), 1.97 (quintet, 2H) Masa Exacta (calc.) : 286.11 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 287
60		¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz), ppm (δ): 8.91(m, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.90(m, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.03(m, 1H), 4.24 (t, 2H), 3.26 (q, 2H), 2.05 (m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 287.10 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 288
61		¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz), ppm (δ) : 8.91(m, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.90 (m, 1H), 7.07 (s, 1H), 7.03 (m, 1H), 4.34 (t, 2H), 3.67 (q, 2H) Masa Exacta (calc.): 273.09 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 274
62		¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz), ppm (δ) : 8.90 (m, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.27 (m, 1H), 7.98(s, 1H), 7.79 (m, 1H), 7.64 (m, 1H), 7.20 (s, 1H), 4.23 (t, 2H), 3.24 (q, 2H), 2.06(m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 303.08 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 304

(continuación)

No.	Estructura Química	Resultados NMR
63		¹ H-NMR (CDCl ₃ , 200MHz), ppm (δ) : 7.80 (dd, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.38~7.45 (m, 3H), 7.07 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 4.05 (t, 2H), 3.47 (q, 2H), 2.13 (td, 2H) Masa Exacta (calc.) : 302.08 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 303
64		¹ H-NMR (CDCl ₃ , 200MHz), ppm (δ) : 7.83 (s, 1H), 7.51(s, 1H), 7.43 (bs, 2H), 7.31 (bs, 1H) , 7.09 (s, 1H) , 6.97(s, 1H) , 6.81 (s, 1H), 4.23(t, 2H), 3.79 (q, 2H) Masa Exacta (calc.) : 288.07 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 289
65		¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz), ppm (δ): 8.92(m, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.26 (m, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.64 (m, 1H), 7.18 (s, 1H), 4.39 (t, 2H), 3.67 (q, 2H) Masa Exacta (calc.): 289. 06 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 290
66		¹ H-NMR (CDCl ₃ , 500MHz), ppm (δ): 8.18 (dd, 1H), 7.76 (bs, 1H), 7.59 (t, 1H), 6.89~6.95 (m, 2H), 6.86 (s, 1H), 6.78 (d, 1H), 6.55 (s, 1H), 4.54 (t, 2H), 3.67 (q, 2H) Masa Exacta (calc.): 299. 09 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 300
67		¹ H-NMR (CDCl ₃ , 500MHz), ppm (δ) : 8.18 (d, 1H) , 7.76 (bs, 1H) , 7.60 (t, 1H), 7.54 (s, 1H) , 7.48 (d, 1H) , 7.14 (t, 1H) , 6.91 (t, 1H) , 6.79 (t, 1H) , 4.54 (t, 2H), 3.87 (q, 2H) Masa Exacta (calc.) : 315. 07 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 316
68		¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz) , ppm (δ) : 315.07 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 316) , 7.8(m, 1H), 7.20 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.64(m, 2H), 3.49 (m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 336.05 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 337

(continuación)

No.	Estructura Química	Resultados NMR
69		¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz), ppm(c.): 336.05 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 337, 7.8 (m, 1H), 7.20(s, 1H) , 3 (m, 1H) , 7.20 (s, 1H) , 3.38 (m, 2H) , 3.33 (m, 2H) , 1.91 (m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 335.05 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 336
70		¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , 500MHz), ppm (C-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 336), 7.8(m, 1H) , 7.20 (s, 1H), 3 (m, 1H), 7.20 (77 (m, 1H) , 3.95 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.73 (m, 2H) Masa Exacta (calc.) : 351. 06 LC-MS (ESI+) m/e (M+1) ⁺ : 352

5 Los compuestos mencionados anteriormente, sintetizados en los ejemplos Preparativos se probaron para un efecto en la inhibición de la reestenosis, de la siguiente manera.

Ejemplo experimental 1: Verificación de la Sustancia Activa para la Transducción de la Señal Wnt/ β -Catenina utilizando una Línea Celular

(1) Construcción del sistema de Medición de la actividad de transducción de la señal wnt/ β -catenina utilizando una línea celular

10 Dos clases de líneas celulares de cáncer humanas HEK293 y SW480 se utilizaron para determinar la actividad *ex vivo* de los compuestos de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención. En este documento, la primera representa una línea celular cuya ruta de transducción de señal de Wnt es intacta, y la última representa una línea celular cuya ruta de transducción de señal de Wnt se sobre expresa constitutivamente (mutación del gen APC).

15 Con el fin de determinar la actividad de la transducción de la señal wnt/ β -catenina en cada línea celular de cáncer, los presentes inventores introdujeron un gen como se muestra en la FIG. 1 en las células, el gen que tiene sitios de enlace (5X TCFs) de proteína de regulación de la transcripción Tcf/Lef a la cual β -catenina se une y que tiene una proteína fluorescente de luciérnaga (luciferasa de luciérnaga) como un marcador que puede determinar la actividad de la proteína de regulación de la transcripción Tcf/Lef. A continuación, los presentes inventores construyeron una sistema de selección agonista Wnt basado en la célula, mediante el tratamiento de las células introducidas del gen con G418 para obtener un clon único de una línea celular cuya proteína de regulación de la transcripción Tcf/Lef se expresa continuamente debido a la introducción del gen. A continuación, los presentes inventores realizaron una selección basada en la célula que determina indirectamente la actividad de la β -catenina, mediante la medición de una cantidad de la proteína fluorescente expresada utilizando el sistema de selección, como se muestra en la FIG. 2.

25 Cuando la línea celular preparada se trató con cloruro de litio (LiCl) que es un control positivo en el sistema de selección agonista Wnt basado en la célula como el control para determinar la actividad agonista Wnt del derivado del isoxazol de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención, se determinó un nivel de expresión de la proteína fluorescente, y se registró en una gráfica como se muestra en la FIG. 3.

(2) Determinación de actividad de la transducción de la señal wnt/ β -catenina del derivado del isoxazol

30 La línea celular cuyo sistema de selección agonista Wnt basado en la célula se construye, fue incubada en un medio de cultivo RPMI 1640 (para SW480) o DMEM (para HEK293) (que contiene suero fetal bovino inactivado mediante el tratamiento de penicilina-estreptomycin (100 Unidades/mL) y tratamiento con calor) con una condición de cultivo estándar (5% de CO₂, 37°C, 100% de humedad relativa (HR)). A continuación, una suspensión de célula única fue obtenida mediante el tratamiento con tripsina y un método de pipeteo. La suspensión de célula única fue diluida con el mismo medio de cultivo hasta que el número de las células estuvo en un rango de 8,000 a 15,000 células por pozo, y se transfirieron a una placa de microtitulación de 96-pozos. Después de las 24-horas de incubación, las células fueron tratadas con varias concentraciones de los derivados del isoxazol preparados en el Ejemplo preparativo. Después de las 24-horas de incubación, se determinaron las actividades de los derivados del isoxazol utilizando un kit de ensayo de luciferasa (Promega, US). La evaluación se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en el manual del fabricante, y las actividades de los derivados del isoxazol preparados en el Ejemplo

preparativo se enumeran en la siguiente Tabla 2 a 3. Se utilizó como control, cloruro de litio (LiCl, 20mM) que se conoce que tiene un efecto para agonizar la transducción de la señal Wnt, y se expresó como porcentaje el valor relativo con el efecto agonista del cloruro de litio.

Tabla 2

5

[Tabla 2]

[Tabla]		
Efectos en Derivados del Isoxazol en las Actividades de β -Catenina en la Línea Celular HEK293		
No Original	Actividad Max. Relativa (%)	Conc. (μ M)
Control (LiCl)	100	20000
Derivado 1	70	60
Derivado 2	32	120
Derivado 3	61	30
Derivado 4	37	15
Derivado 5	109	60
Derivado 6	35	120
Derivado 7	71	120
Derivado 8	44	120
Derivado 17	< 20	30
Derivado 21	< 20	30
Derivado 22	58	15
Derivado 23	47	30
Derivado 24	< 20	30
Derivado 25	42	120
Derivado 26	48	10
Derivado 27	58	120
Derivado 28	869	120
Derivado 29	67	120
Derivado 30	1049	120
Derivado 31	907	30
Derivado 32	< 20	30

(continuación)

[Tabla]		
Efectos en Derivados del Isoxazol en las Actividades de β -Catenina en la Línea Celular HEK293		
No Original	Actividad Max. Relativa (%)	Conc. (μ M)
Derivado 33	< 20	30
Derivado 34	< 20	30
Derivado 35	600	120
Derivado 36	132	30
Derivado 37	92	30
Derivado 38	103	30
Derivado 39	80	120
Derivado 40	53	10
Derivado 41	54	120
Derivado 42	37	120
Derivado 43	59	120
Derivado 44	205	120
Derivado 45	46	120
Derivado 46	31	1
Derivado 47	43	120
Derivado 48	246	120

Tabla 3

5

[Tabla 3]

[Tabla]		
Efectos en Derivados del Isoxazol en las Actividades de β -Catenina en la Línea Celular SW480		
No. Compuesto	Actividad Max. Relativa (%)	Conc. (μ M)
Control 1 (LiCl)	100	20000
Derivado 1	957	120
Derivado 2	1079	120

(continuación)

[Tabla]		
Efectos en Derivados del Isoxazol en las Actividades de β -Catenina en la Línea Celular SW480		
No. Compuesto	Actividad Max. Relativa (%)	Conc. (μ M)
Derivado 3	625	60
Derivado 4	580	120
Derivado 5	1696	60
Derivado 6	130	120
Derivado 7	283	120
Derivado 8	296	120
Derivado 9	551	10
Derivado 10	344	30
Derivado 11	896	30
Derivado 12	676	30
Derivado 13	1192	120
Derivado 14	357	120
Derivado 15	657	120
Derivado 16	1047	30
Derivado 17	< 20	30
Derivado 18	1016	120
Derivado 19	1146	120
Derivado 20	1030	30
Derivado 21	< 20	30
Derivado 22	650	600
Derivado 23	486	60
Derivado 24	< 20	30
Derivado 25	42	120
Derivado 26	48	10
Derivado 27	58	120

(continuación)

[Tabla]		
Efectos en Derivados del Isoxazol en las Actividades de β -Catenina en la Línea Celular SW480		
No. Compuesto	Actividad Max. Relativa (%)	Conc. (μ M)
Derivado 28	869	120
Derivado 29	67	120
Derivado 30	1049	120
Derivado 31	907	30
Derivado 32	< 20	30
Derivado 33	< 20	30
Derivado 34	< 20	30
Derivado 35	600	120
Derivado 36	132	30
Derivado 37	92	30
Derivado 38	103	30
Derivado 39	80	120
Derivado 40	53	10
Derivado 41	54	120
Derivado 42	37	120
Derivado 43	59	120
Derivado 44	205	120
Derivado 45	46	120
Derivado 46	31	1
Derivado 47	43	120
Derivado 48	246	120
Derivado 49	1168	120
Derivado 50	1490	120
Derivado 51	1136	30
Derivado 52	1493	10

(continuación)

[Tabla]		
Efectos en Derivados del Isoxazol en las Actividades de β -Catenina en la Línea Celular SW480		
No. Compuesto	Actividad Max. Relativa (%)	Conc. (μ M)
Derivado 53	945	120
Derivado 54	837	1
Derivado 55	1139	30
Derivado 56	922	30
Derivado 57	1091	30
Derivado 58	93	120
Derivado 59	374	120
Derivado 60	304	10
Derivado 61	113	120
Derivado 62	1060	30
Derivado 63	1287	120
Derivado 64	871	30
Derivado 65	414	120
Derivado 66	1086	10
Derivado 67	1753	120

Ejemplo experimental 2: Verificación de la Actividad de Transducción de la Señal *Ex vivo* Wnt/ β -Catenina de los Derivados del Isoxazol mediante la Determinación de la Cantidad de β -Catenina Acumulada

5 Una línea celular HEK293 fue incubada en un medio de cultivo DMEM (que contiene suero fetal bovino inactivado mediante el tratamiento de penicilina-estreptomicina (100 Unidades/mL) y el tratamiento con calor) con una condición de cultivo estándar (5% de CO₂, 37C, 100% de HR). Un compuesto de prueba se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO), y finalmente se utiliza a una concentración de 30 o 60 μ M. Las células HEK293 (33107) se
 10 incubaron durante 24 horas en un medio de cultivo que contienen el compuesto de prueba y un medio de cultivo libre del compuesto de prueba respectivamente. Con el fin de aislar selectivamente solo el citoplasma a partir de las células HEK293, las células HEK293 fueron lisadas mediante el tratamiento de las células HEK293 con una solución de alta concentración de sal, centrifugando la suspensión celular obtenida a una velocidad de rotación de 200 g (rpm) durante 10 minutos. A continuación, se retiró el pellet de la membrana y el núcleo celular y se recuperó el sobrenadante.
 15

La solución de citoplasma obtenida fue sometida a electroforesis en un gel PAGE al 10 %, y a continuación se sondearon con el anticuerpo β -catenina (Upstate Biotechnology Inc.). El sondeo se llevó a cabo utilizando un sistema de quimioluminiscencia (BCL, Amersham). La proteína actina se utilizó como el control para comparar una cantidad equivalente de la proteína. Los resultados se muestran en la FIG. 4. Como se muestra en la FIG. 4, se
 20 confirmo mediante el ensayo de transferencia western blotting que, cuando las células fueron tratadas con los compuestos, la β -catenina se acumuló en la célula, dependiendo de la concentración de los compuestos.

Ejemplo experimental 3: Prueba Ex vivo de la Proliferación de la Célula Endotelial y la Proliferación de la Célula del Músculo Liso en los Derivados del Isoxazol

(1) Prueba de Proliferación de la Célula Endotelial

Una línea celular HUVBC (célula endotelial de la vena umbilical humana, Cambrex, US) a 3-10 pasajes fue incubada en un medio de cultivo EGM2 (medio de crecimiento endotelial, Cambrex, US) con una condición de cultivo estándar (95% de O₂, 5% de CO₂, 37°C, 100% de HR). 1X10⁴ Células se dividieron en una placa de 24 pozos, y se cultivaron durante un día de manera que las células se puedan fijar en la placa de 24 pozos. Con el fin de permitir que las células entren a la interfase, las células se lavaron tres veces con PBS, y el medio de cultivo EGM2 fue reemplazado por EBM2 (medio basal endotelial, Cambrex) que incluye 1% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco, US), y las células se incubaron durante un día. Después de que el medio utilizado se retirara, se adicionó a las células una solución de EBM2 que incluye 1% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco) suplementada con un fármaco, y luego la solución celular se cultivó durante dos días. Después del cultivo celular, se observó la morfología de las células con un microscopio. A continuación, las células fueron separadas de la placa utilizando tripsina, y se contaron utilizando un hemacitómetro. Se utilizó DMSO al 0.1 % disuelto en solución salina como el vehículo control.

(2) Prueba de Proliferación de la Célula del Músculo Liso Vascular

Una línea celular SMC (célula del músculo liso aórtica de rata) a 3-10 pasajes fue incubada en un medio de cultivo de SmGM (medio de crecimiento de célula del músculo liso Cambrex) que incluye 5% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico antimicótico reactivo (Gibco, US) con una condición de cultivo estándar (95% de O₂, 5% de CO₂, 37°C, 100% de HR). 2X10⁴ Células se dividieron en una placa de 24 pozos, y se cultivaron durante un día, de manera que las células se puedan fijar en la placa de 24 pozos. Las células se lavaron tres veces con PBS, se colocaron en una solución de SmGM que incluye 5% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco), y luego se incubaron durante un día. Después de que el medio utilizado se retirara, se adicionó a las células una solución de SmGM que incluye 5% de suero fetal bovino suplementada con el fármaco correspondiente, y la solución celular luego se cultivó por dos días. Después del cultivo celular, se observó la morfología de las células con un microscopio. A continuación, las células fueron separadas de la placa utilizando tripsina, y se contaron utilizando un hemacitómetro. Se utilizó DMSO al 0.1% disuelto en solución salina como el vehículo control.

(3) Resultados

Los resultados del ensayo se muestran en las FIGS. 5 a 10, respectivamente. Como se muestra en la FIG. 5, se reveló que los convencionales agentes anti-estenosis, el paclitaxel y la rapamicina, inhiben la proliferación de HUVEC cuando las células se tratan con una concentración creciente de los agentes anti-estenosis, pero el derivado 5 de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención incrementa o mantiene la proliferación de HUVEC. También, se observó que, como una concentración del derivado 5 de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención aumenta, el número de células de las células del músculo liso vascular (VSMC) en un medio de cultivo de SmGM (medio de crecimiento de célula del músculo liso Cambrex) que incluye 5% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico-antimicótico reactivo (Gibco, US) con una condición de cultivo estándar (95% de O₂, 5% de CO₂, 37°C, 100% de HR) se reduce. También, como se muestra en la FIG. 6, se reveló que la proliferación de las células endoteliales se recupera, cuando el compuesto se utiliza junto con el fármaco convencional "rapamicina", mientras la proliferación de las células endoteliales se inhibe cuando las células endoteliales se tratan con solo la rapamicina. También, se observó que la proliferación de las células del músculo liso vascular se inhibe más significativamente cuando la rapamicina se utiliza junto con el compuesto que cuando la rapamicina se utiliza sola. De forma similar, se observó que la proliferación de las células endoteliales se recupera cuando el fármaco convencional "paclitaxel" se utiliza junto con el compuesto, mientras que la proliferación de las células endoteliales se inhibe cuando el paclitaxel se utiliza solo, como se muestra en la FIG. 7.

Además del derivado 5, también se determinaron los efectos de los derivados 4, 19, 23, 31, 35, 50, 62, 63, 68, 69 y 70 en la proliferación de las células endoteliales. Como resultado, se reveló que los compuestos inhiben o mantienen la proliferación de las células endoteliales como se muestra en las FIGS. 8 a 10. Por lo tanto, se reveló que los compuestos utilizados en la presente invención son fármacos que son efectivos para prevenir y tratar la reestenosis ya que los compuestos inhiben la proliferación de las células del músculo liso y potencian la proliferación de las células endoteliales.

Ejemplo experimental 4: Efecto del Derivado del Isoxazol en la Inhibición de la Reestenosis en Modelo de Lesión de Arteria Carótida de Rata

Se determinaron los efectos del derivado del isoxazol en la inhibición de la reestenosis utilizando un modelo de lesión de arteria carótida de rata.

Ratas blancas que pesan entre 350 a 400 g fueron anestesiados con ketamina y xileno, y las regiones de cirugía fueron afeitadas y esterilizadas con betadine. La piel en la región del cuello se cortó por aproximadamente 2 cm, y una arteria carótida de la rata se encontró utilizando un mosquito. El flujo sanguíneo fue impedido colgando una hebra en la arteria carótida y una arteria carótida interna, después se ata una arteria carótida externa con una hebra. Un catéter fogarty 2F (Baxter, US) se insertó en un vaso sanguíneo entre la arteria carótida externa y la arteria carótida para herir una región de la arteria carótida tres veces. A continuación, la región herida de la arteria carótida fue atada con una hebra para permitir un flujo sanguíneo a través de la arteria carótida y la arteria carótida interna y prevenir la hemorragia entre la arteria carótida y la arteria carótida externa, y la región de la cirugía se cerró con suturas. Cada una de las pieles de la parte de atrás del cuello, se cortaron por aproximadamente 1 cm, y una bomba osmótica que contiene un fármaco se inserta en el vaso sanguíneo y se cierra con suturas. Después de 1 semana para observar las células endoteliales y 2 semanas para observar la reestenosis, toda la sangre se extrajo de cada rata sujeto utilizando una perfusión, las arterias carótidas se tomaron de las ratas y se hicieron las laminillas del tejido para observar la sección del vaso sanguíneo. El derivado 5 (SKL-2020) se utilizó como el grupo experimental, y 75% de DMF (dimetilformamida) (DMF:H₂O=3:1) se utilizó como el vehículo control. Los resultados experimentales se muestran en la FIG. 11. Como se muestra en la FIG. 11 y FIG. 13, se reveló que una zona reestenótica del vaso sanguíneo se reduce más significativamente en tamaño, cuando se administraron 200mg/kg/día del derivado 5 durante dos semanas, que cuando el derivado 5 no se administró. También, se considera que, dado que el compuesto tiene una inhibición más significativa del efecto de la reestenosis cuando las células fueron tratadas con el compuesto junto con rapamicina, que cuando las células fueron tratadas con el compuesto solo, el compuesto de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención tiene un efecto sinérgico cuando el compuesto se utiliza junto con el inhibidor convencional de la reestenosis.

Ejemplo experimental 5: Observación de la Re-endotelización mediante el Derivado del Isoxazol en Modelo de Lesión de Arteria Carótida de Rata

Con el fin de observar un nivel de re-endotelización por un fármaco, una laminilla de la sección de tejido del vaso sanguíneo se trató con peroxidasa de hidrógeno al 0.1% para retirar la peroxidasa endógena, y se hace reaccionar a 4°C con vWF (factor de von willebrand, DakoCytamation, US) Ab, que tiñe las células endoteliales de ratones. A continuación, la sección del tejido se trató con IgG anti-rata biotinilado (Jackson Immuno Research Laboratories, US) y se tiñeron utilizando un kit peroxidasa- complejo avidina-biotina (ABC) (kit Elite; Vector Laboratories). Se observó la laminilla de la sección de tejido y fue fotografiada con un microscopio. El derivado 5 se utilizó como el grupo experimental, y se utilizó como vehículo control DMF al 75% (dimetilformamida) (DMF:H₂O=3:1). Los resultados experimentales se muestran en la FIG. 12 y FIG. 13. Como se muestra en la FIG. 12, se reveló que la re-endotelización en una superficie de arteria carótida dañada ocurre más significativamente, cuando se administran 200mg/kg/día del derivado 5 durante dos semanas, que cuando el derivado 5 no se administró. Como se muestra en la FIG. 13, también se considera que, dado que la re-endotelización se aumenta más significativamente cuando las células fueron tratadas con el compuesto junto con la rapamicina, que cuando las células fueron tratadas con el compuesto solo, el compuesto de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención tiene un efecto sinérgico cuando el compuesto se utiliza junto con el inhibidor convencional de la reestenosis.

Ejemplo experimental 6: Efecto de Derivado del Isoxazol en la Inhibición de la Reestenosis en un Modelo Porcino de Stent Coronario

Se determinó un efecto del derivado del isoxazol en la inhibición de la reestenosis utilizando un modelo porcino de stent coronario.

Todos los cerdos que recibieron una operación quirúrgica fueron tratados con un agente anti-trombótico "clopidogrel" (35 mg/día) y aspirina (100 mg/día) antes de una semana de la operación quirúrgica. Los cerdos que pesan de 30 a 40 kg fueron anestesiados con ketamina (20 mg/kg IM) y xilazina (2 mg/kg IM), y la anestesia se mantuvo por la conexión de un equipo de perfusión a sus venas de la oreja y permitiendo que una solución de ketamina/xilazina (ketamina 50g+ xilazina 10g/500ml de solución salina) pase en las venas de la oreja de acuerdo con el estado de anestesia. Las regiones de cirugía del cerdo se afeitaron, esterilizaron con betadine. La piel en el cuello se cortó por aproximadamente 5 cm, y una arteria carótida del cerdo se encontró utilizando un mosquito, y se administró 1 ml de heparina (5,000 IU) a los cerdos. Se realizó una angiocardiografía utilizando un angiocardiógrafo SIREMOBIL 245B (disponible comercialmente de Siemens). Se utilizó un stent (diámetro: 3.0 mm; longitud: 15 mm) para la operación quirúrgica en LAD, RAD y RCX mediante la expansión del stent a una relación 1:1.3 del diámetro de vena:stent, y la posición de trasplante del stent se determinó previamente utilizando el sistema de imágenes.

Después de 28 días, los cerdos se inyectaron por vía intravenosa con KCl (40 meq/l) bajo una condición de anestesia convencional, para inducir la cardioplegia en el cerdo, y los corazones se extrajeron de los cerdos. Inmediatamente después de la extracción de los corazones del cerdo, los vasos sanguíneos del corazón del cerdo fueron perfusionados con 500 ml de solución salina fisiológica obtenida mediante la dilución de 1 ml de heparina (5000 IU), y se fijaron en 500 ml de solución de formalina al 10% a través de la perfusión. A continuación, los corazones totales del cerdo se fijaron por la inmersión en una solución de formalina al 10% estandarizada con solución salina fisiológica. Las regiones del vaso sanguíneo RCX, RAD y LAD stent injertado fueron extraídas, se

5 fijaron en una solución de formalina al 10% durante un día, se deshidrataron con etanol, y luego se fijaron con metil metacrilato durante un mes. Después de la inmersión, los vasos sanguíneos del cerdo se cortaron a 10 μm de longitud utilizando un cortador láser, se rallaron a un tamaño de 5 a 7 μm utilizando un papel de lija, y luego se observan bajo un microscopio óptico para determinar la presencia de la reestenosis. En este experimento, se utilizó un stent que no contiene un fármaco y está recubierto con polímero PLGA como el control negativo, y se utilizó un stent que contiene rapamicina en adición al polímero PLGA como el control positivo. Como el grupo experimental se utilizó un stent que contiene una mezcla de 180 mg de rapamicina con una cantidad creciente (45mg, 90mg y 180 mg) del derivado 5.

10 Los resultados del experimento se muestran en la FIG. 14. Como se muestra en la FIG. 14, se reveló que la zonas reestenóticas de los vasos sanguíneos se reducen significativamente de 2.74 mm^2 a 1.80 mm^2 en los grupos tratados con rapamicina, en comparación con el control negativo, y también se confirmó que una pérdida del lumen de vaso sanguíneo además se reduce en los grupos tratados con el derivado 5, en comparación con el grupo tratado con rapamicina.

15 **Ejemplo experimental 7: Observación de Re-entotelización por los Derivados del Isoxazol en un Modelo Porcino de Stent Coronario**

20 Con el fin de observar un nivel de re-entotelización por un fármaco, un portaobjetos de la sección de tejido de vaso sanguíneo del cerdo se hizo reaccionar a 4°C con vWF (factor de von willebrand, DakoCytomation, US) Ab, que tiñe las células endoteliales de ratones. A continuación, la sección del tejido se trató con IgG anti-humano biotinilado (Jackson Immuno Research Laboratories, US) y se tiñeron utilizando un kit peroxidasa- complejo avidina-biotina (ABC). La laminilla de la sección de tejido se observó y fue fotografiada con un microscopio de fluorescencia. Los resultados experimentales se muestran en la FIG. 15.

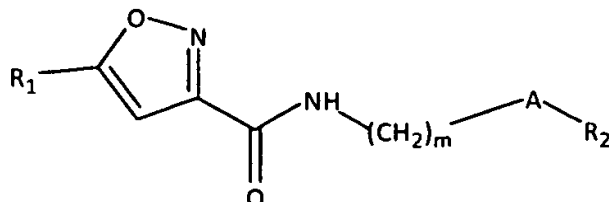
25 Como se muestra en la FIG. 15, se reveló que, cuando el stent está recubierto con el polímero, una tasa de re-entotelización (% de cicatrización) fue del 80.2%, pero la tasa de re-entotelización (% de cicatrización) se reduce a 67.9% por la rapamicina. Se confirmó que, 4 semanas después de que el derivado 5 se administró a los cerdos, la re-entotelización en la superficie de arteria carótida dañada se recuperó de manera significativa a un nivel tal que las células se tratan con la rapamicina. Se considera que, cuando el compuesto de acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente invención se utiliza junto con el inhibidor convencional de la reestenosis, el compuesto funciona para prevenir la trombosis de stent tardía, inhibiendo la reducción de la reentotelización que es causada por los efectos secundarios.

30

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para utilizar en la prevención y el tratamiento de la reestenosis que comprende una cantidad terapéutica efectiva de los derivados del isoxazol representados por la siguiente Fórmula 1, o las sales farmacéuticamente disponibles de este:

5

Fórmula 1

en donde, R₁ es fenilo, furanilo o tienilo que es sustituido o no sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de acilo, amino, carboalcoxi, carboxi, carboxiamino, -O-carbamoil (-O-(C=O)-NH₂), ciano, halo, hidroxilo, nitro, tio, alquilo, cicloalquilo, arilo, alcoxi, ariloxi, sulfoxi y guanido,

10 m es 2 o 3,

A es un enlace, O, S, SO, o S(=O)₂, y

R₂ es imidazolil, pirazolil, triazolil, tetrazolil o piridinil que es sustituido o no sustituido con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que consiste de acilo, amino, carboalcoxi, carboxi, carboxiamino, -O-carbamoil (-O-(C=O)-NH₂), ciano, halo, hidroxilo, nitro, tio, alquilo, cicloalquilo, arilo, alcoxi, ariloxi, sulfoxi y guanido.

15 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en donde los derivados del isoxazol se seleccionan del grupo que consiste de los siguientes compuestos (1) a (70):

(1): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida

(2): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-piridin-2-il-etil)-amida

(3): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-piridin-3-il-etil)-amida

20 (4): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-imidazol-1-il-etil)-amida

(5): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-piridin-4-il-etil)-amida

(6): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico [2-(2-metil-imidazol-1-il)-etil] - amida

(7): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico [2-(5-metil-imidazol-1-il)-etil] - amida

(8): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico [2-(4-metil-imidazol-1-il)-etil] - amida

25 (9): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,4] triazol-1-il-etil)-amida

(10): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-pirazol-1-il-etil)-amida

(11): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,3] triazol-1-il-etil)-amida

(12): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,3] triazol-2-il-etil)-amida

(13): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-tetrazol-2-il-etil)-amida

30 (14): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2- tetrazol-1-il-etil)-amida

(15): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico [3-(2-metil-imidazol-1-il)-propil]-amida

ES 2 379 746 T3

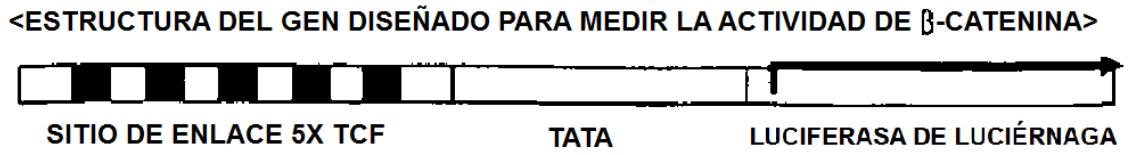
- (16): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-pirazol-1-il-propil)-amida
- (17): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-[1,2,3] triazol-1-il-propil)-amida
- (18): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-[1,2,3] triazol-2-il-propil)-amida
- (19): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-[1,2,4] triazol-1-il-propil)-amida
- 5 (20): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-tetrazol-1-il-propil)-amida
- (21): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-tetrazol-2-il-propil)-amida
- (22): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico [3-(4-metil-imidazol-1-il)-propil]-amida
- (23): ácido 5-fenil-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- (24): ácido 5-fenil-isoxazol-3-carboxílico (2-imidazol-1-il-etil)-amida
- 10 (25): ácido 5-o-tolil-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- (26): ácido 5-m-tolil-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- (27): ácido 5-p-tolil-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- (28): ácido 5-(2-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- (29): ácido 5-(3-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- 15 (30): ácido 5-(4-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- (31): ácido 5-(4-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-[1,2,4] triazol-1-il-propil)-amida
- (32): ácido 5-(2-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (2-imidazol-1-il-etil)-amida
- (33): ácido 5-(4-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (2-imidazol-1-il-etil)-amida
- (34): ácido 5-(4-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (2-pirazol-1-il-etil)-amida
- 20 (35): ácido 5-(4-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,4] triazol-1-il-etil)-amida
- (36): ácido 5-(4-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,3] triazol-2-il-etil)-amida
- (37): ácido 5-(4-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,3] triazol-1-il-etil)-amida
- (38): ácido 5-(4-fluoro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (2-tetrazol-2-il-etil)-amida
- (39): ácido 5-(4-cloro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-[1,2,4] triazol-1-il-propil)-amida
- 25 (40): ácido 5-(4-cloro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,4] triazol-1-il-etil)-amida
- (41): ácido 5-(4-cloro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- (42): ácido 5-(2-metoxi-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- (43): ácido 5-(3-metoxi-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- (44): ácido 5-(4-metoxi-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- 30 (45): ácido 5-(3-nitro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- (46): ácido 5-(4-nitro-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida

- (47): ácido 5-(3-amino-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- (48): ácido 5-(4-amino-fenil)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- (49): ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- (50): ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (3-[1,2,4] -triazol-1-il-propil)-amida
- 5 (51): ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-imidazol-1-il-etil)-amida
- (52): ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-pirazol-1-il-etil)-amida
- (53): ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,4] triazol-1-il-etil)-amida
- (54): ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,3] triazol-2-il-etil)-amida
- (55): ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,3] triazol-1-il-etil)-amida
- 10 (56): ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-piridin-3-il-etil)-amida
- (57): ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico (2-piridin-4-il-etil)-amida
- (58): ácido 5-(5-bromo-tiofen-2-il)-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- (59): ácido 5-furan-3-il-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- (60): ácido 5-furan-3-il-isoxazol-3-carboxílico (3-[1,2,4] - triazol-1-il-propil)-amida
- 15 (61): ácido 5-furan-3-il-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,4] - triazol-1-il-etil)-amida
- (62): ácido 5-tiofen-3-il-isoxazol-3-carboxílico (3-[1,2,4] - triazol-1-il-propil)-amida
- (63): ácido 5-tiofen-3-il-isoxazol-3-carboxílico (3-imidazol-1-il-propil)-amida
- (64): ácido 5-tiofen-3-il-isoxazol-3-carboxílico (2-imidazol-1-il-etil)-amida
- (65): ácido 5-tiofen-3-il-isoxazol-3-carboxílico (2-[1,2,4] - triazol-1-il-etil)-amida
- 20 (66): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico [2-(piridin-2-il-oxi)-etil] - amida
- (67): ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico [2-(piridin-2-il-oxi)-etil] - amida
- (68): ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico [2-(1-metil-1H-tetrazol-5-il-sulfanil)- etil]- amida
- (69): ácido 5-tiofen-2-il-isoxazol-3-carboxílico [3-(4H-[1,2,4] triazol-3-il-sulfanil)-propil]-amida
- (70): ácido 5-furan-2-il-isoxazol-3-carboxílico [2-(4-metil-4H-[1,2,4] triazol-3-sulfonil)-etil]-amida
- 25 **3.** La composición farmacéutica de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, que además comprende la rapamicina o el paclitaxel.
- 4.** La composición farmacéutica de la reivindicación 1, para utilizar en la prevención y el tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste de reestenosis coronaria después de una angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA), reestenosis después de una intervención percutánea de enfermedades vasculares cerebrales y periféricas, estenosis vascular después de varias cirugías vasculares, estenosis vascular después de una operación de bypass y angioplastia de fístula arteriovenosa, estenosis después de trasplante de vaso sanguíneo artificial y del vaso sanguíneo del mismo individuo, y arteriosclerosis.
- 30 **5.** La composición farmacéutica de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, que además comprende un portador farmacéuticamente disponible, que es apropiado para ser formulado en una formulación oral, una formulación parenteral, una formulación inyectable o una formulación transcutánea.
- 35

6. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en donde la composición se administra en la forma de un agente de recubrimiento del stent.

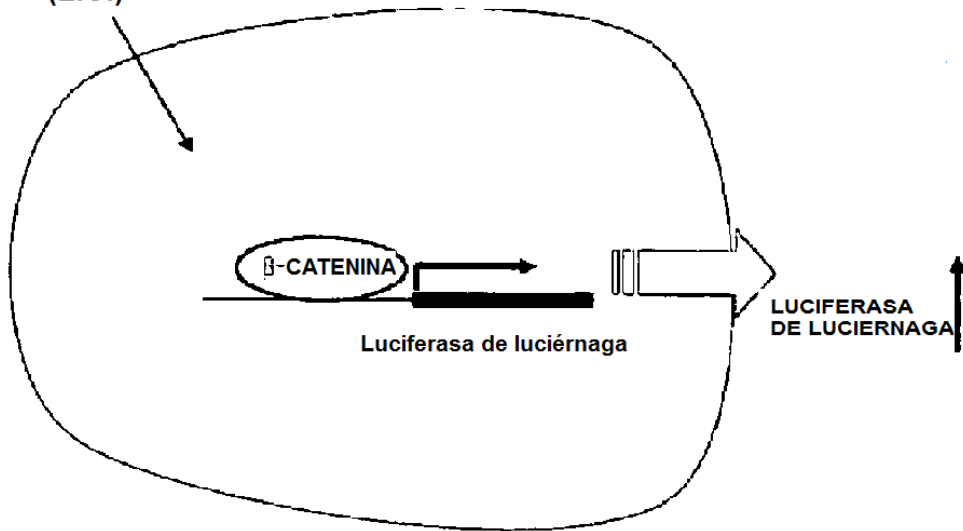
5 7. La composición farmacéutica según se define en la reivindicación 1, para utilizar en un método para la prevención de trombosis de stent tardío, dicho método que comprende la administración de dicha composición farmacéutica a los pacientes para proporcionar la actividad antireestenosis y acelerar la re-endotelización.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

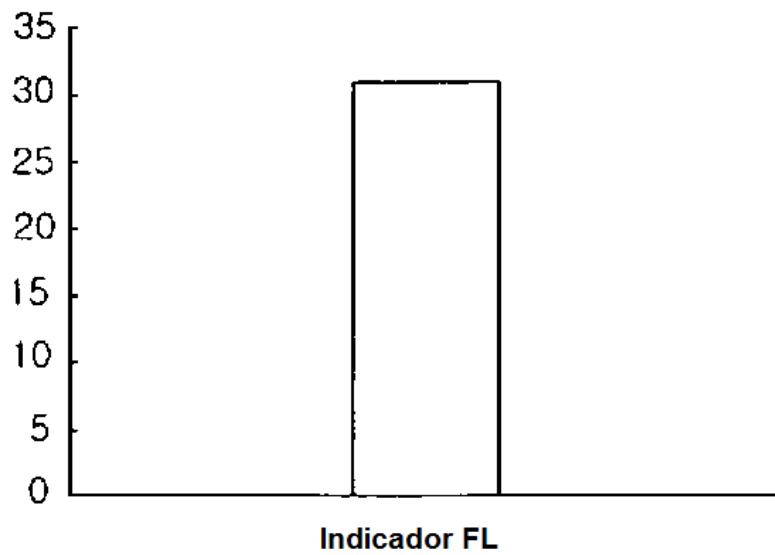
< SISTEMA BASADO EN LA CÉLULA PARA LA SELECCIÓN DEL AGONISTA WNT >
AGONISTA Wnt
(LICI)



[Fig. 3]

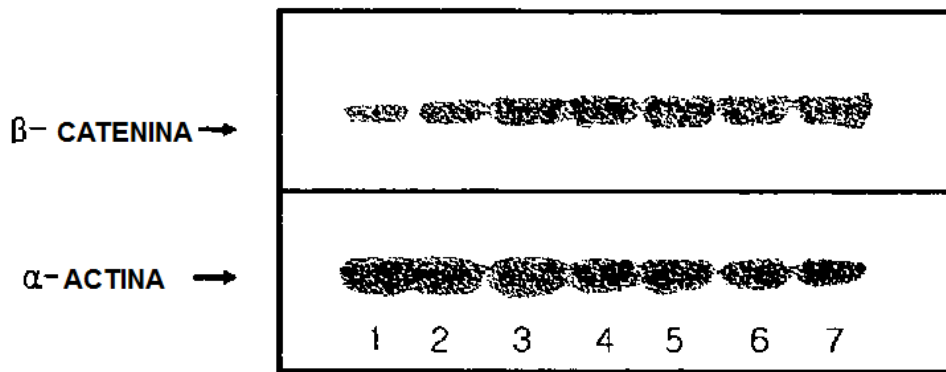
AUMENTO DEL NIVEL DE LA ACTIVIDAD DE LA LUCIFERASA DE LUCIERNAGA MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON LiCl (CONTROL POSITIVO) EN SISTEMA DE SELECCIÓN AGONISTA WNT BASADO EN LA CÉLULA

□ LiCl(20mM)



[Fig. 4]

<EFECTO DE LOS DERIVADOS DEL ISOXAZOL EN LA ACUMULACIÓN DE β -CATENINA EN CITOPLASMA>



1. Control

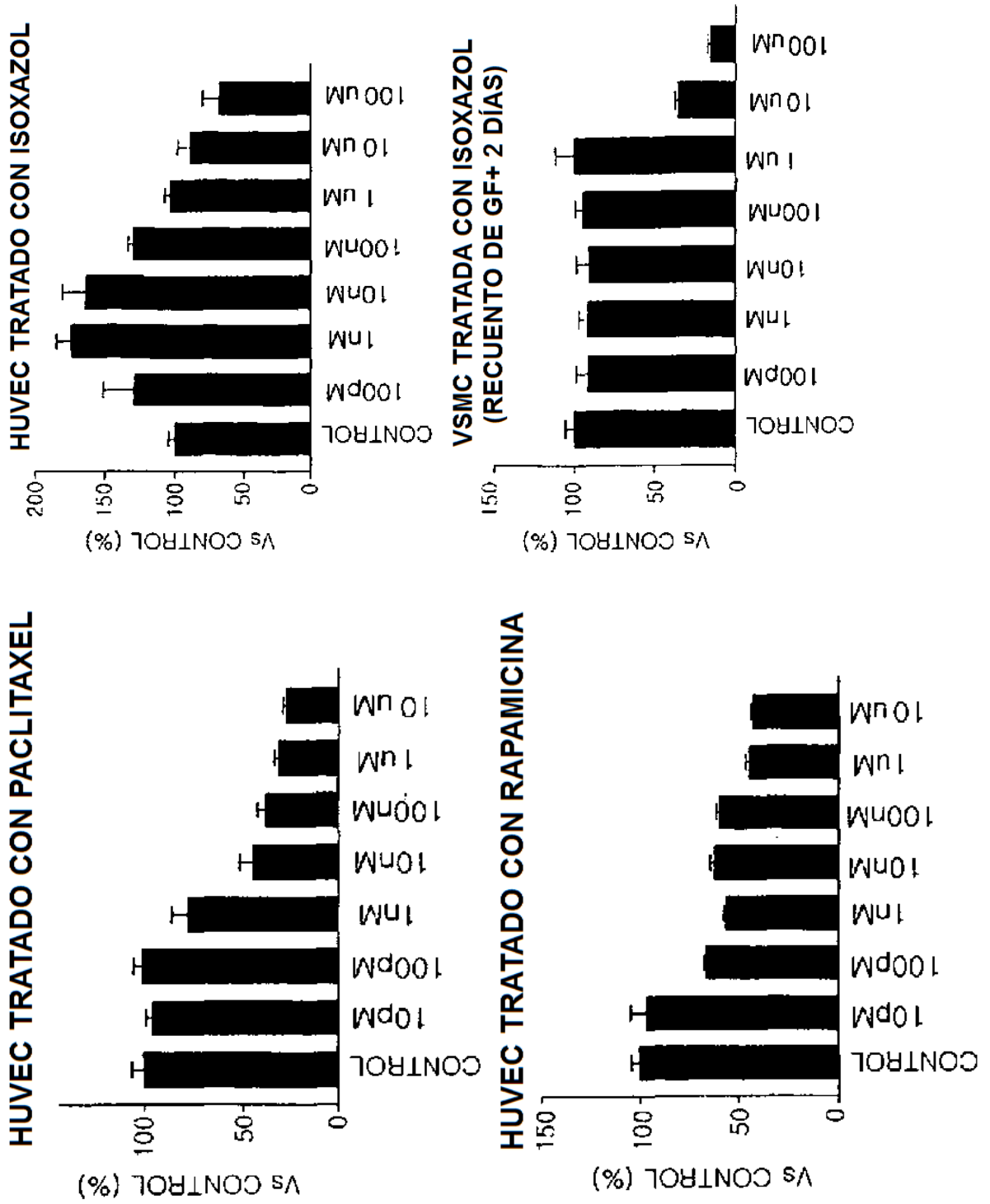
2. LiCl.20mM

3. **DERIVADO 1**, 30 μ M 4. **DERIVADO 1**, 60 μ M

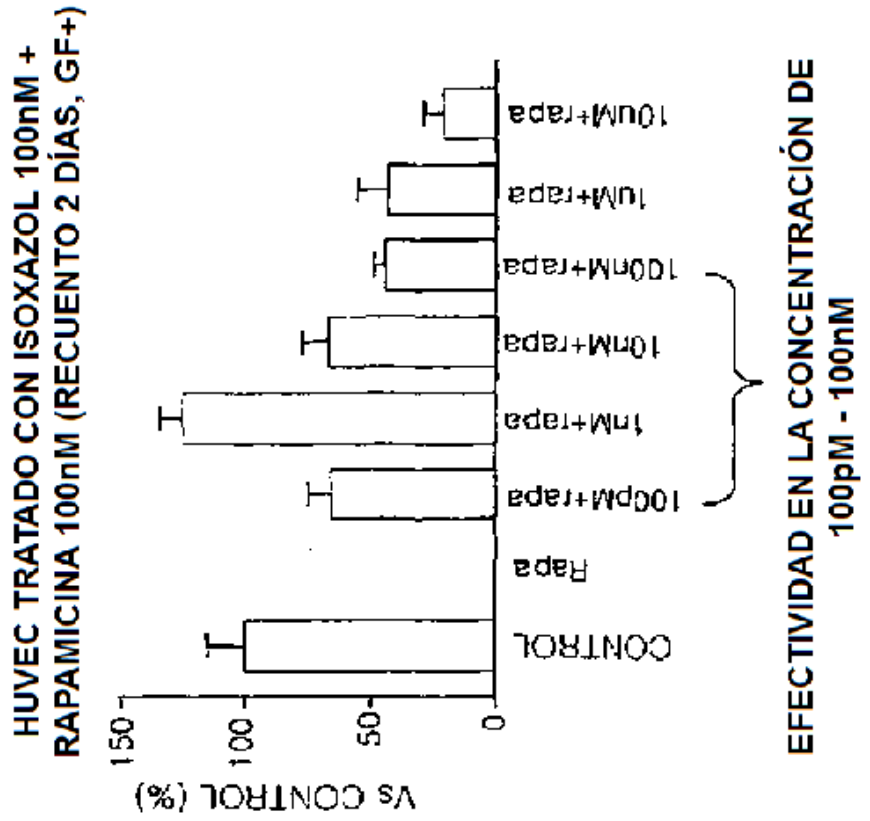
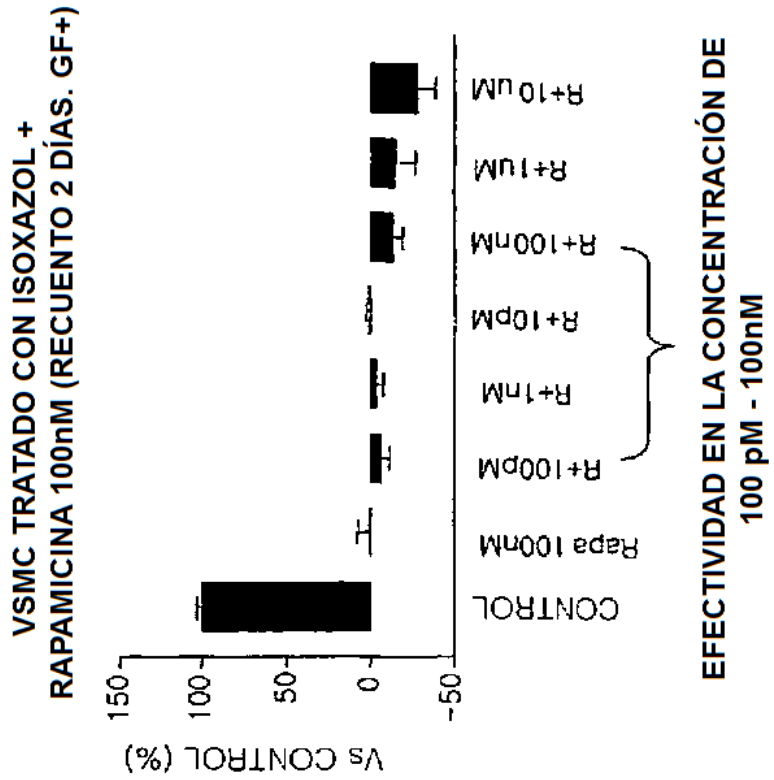
5. **DERIVADO 5**, 30 μ M 6. **DERIVADO 5**, 60 μ M

7. Wnt3a

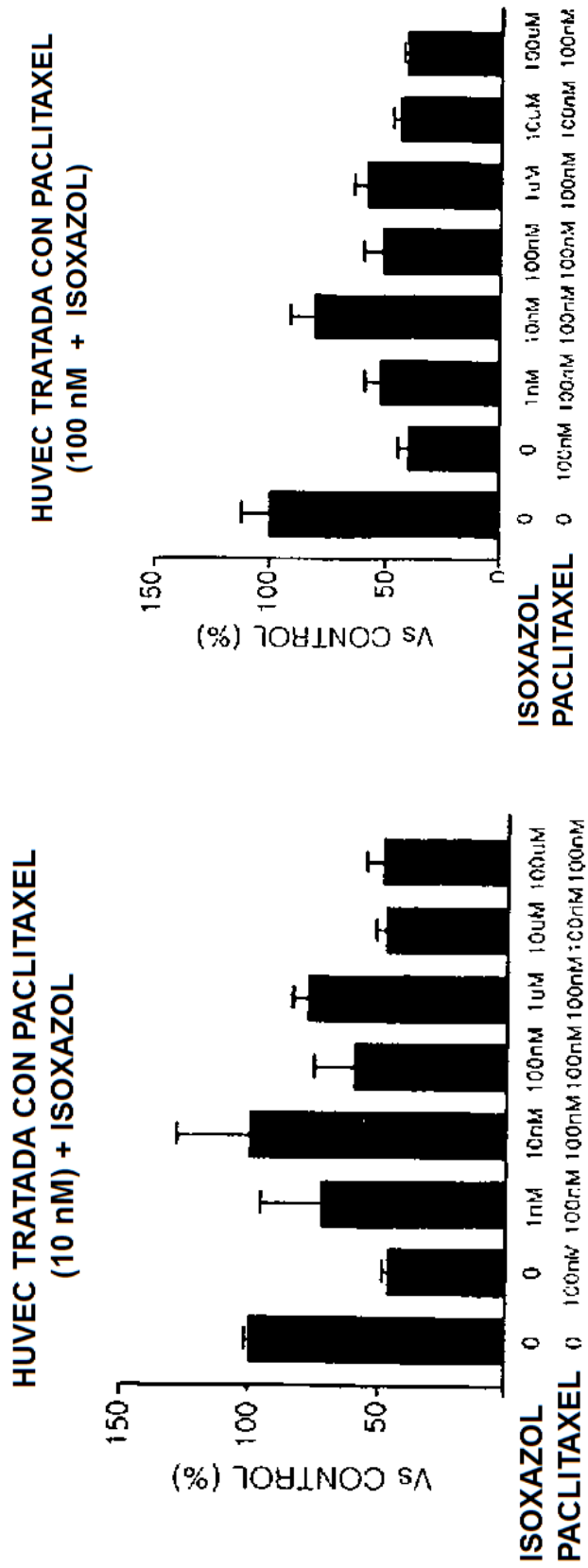
[Fig. 5]



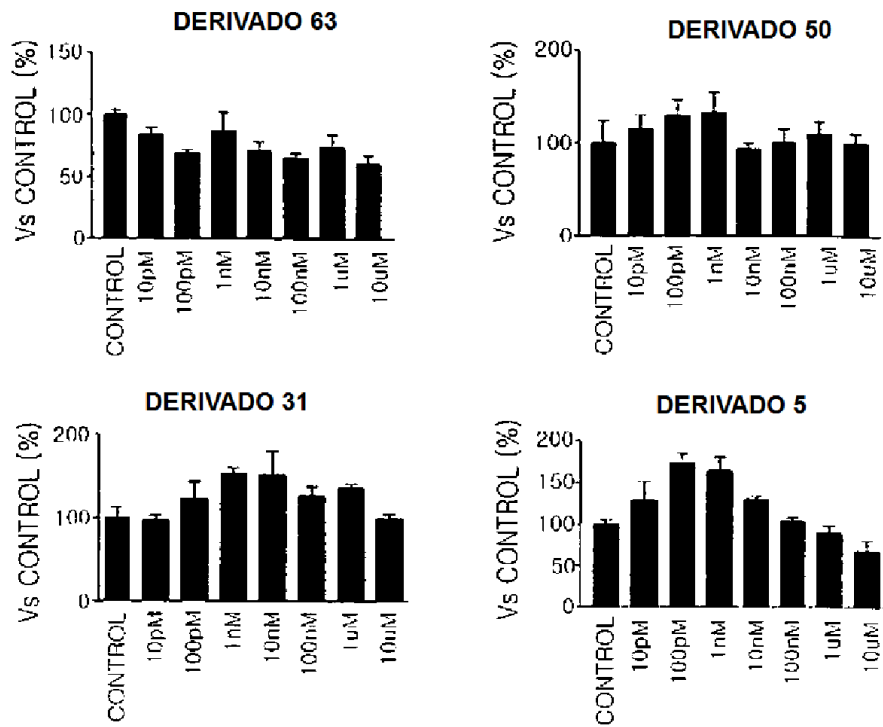
[Fig. 6]



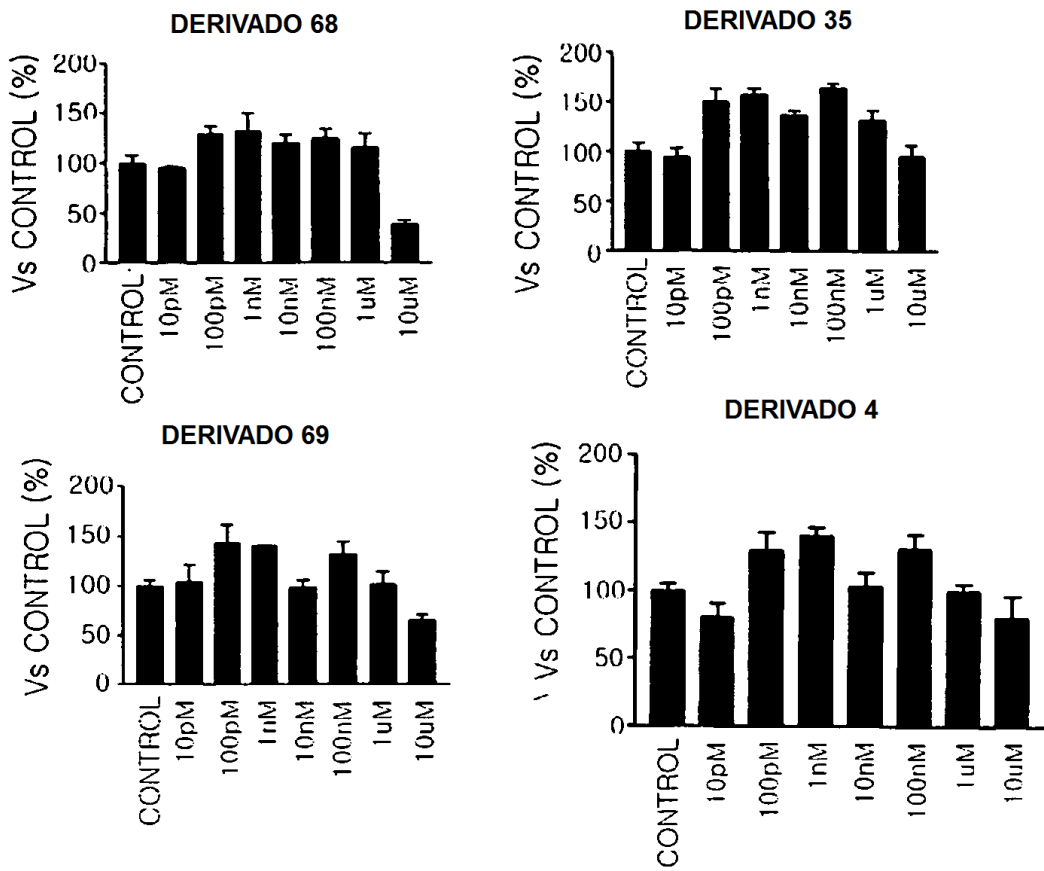
[Fig. 7]



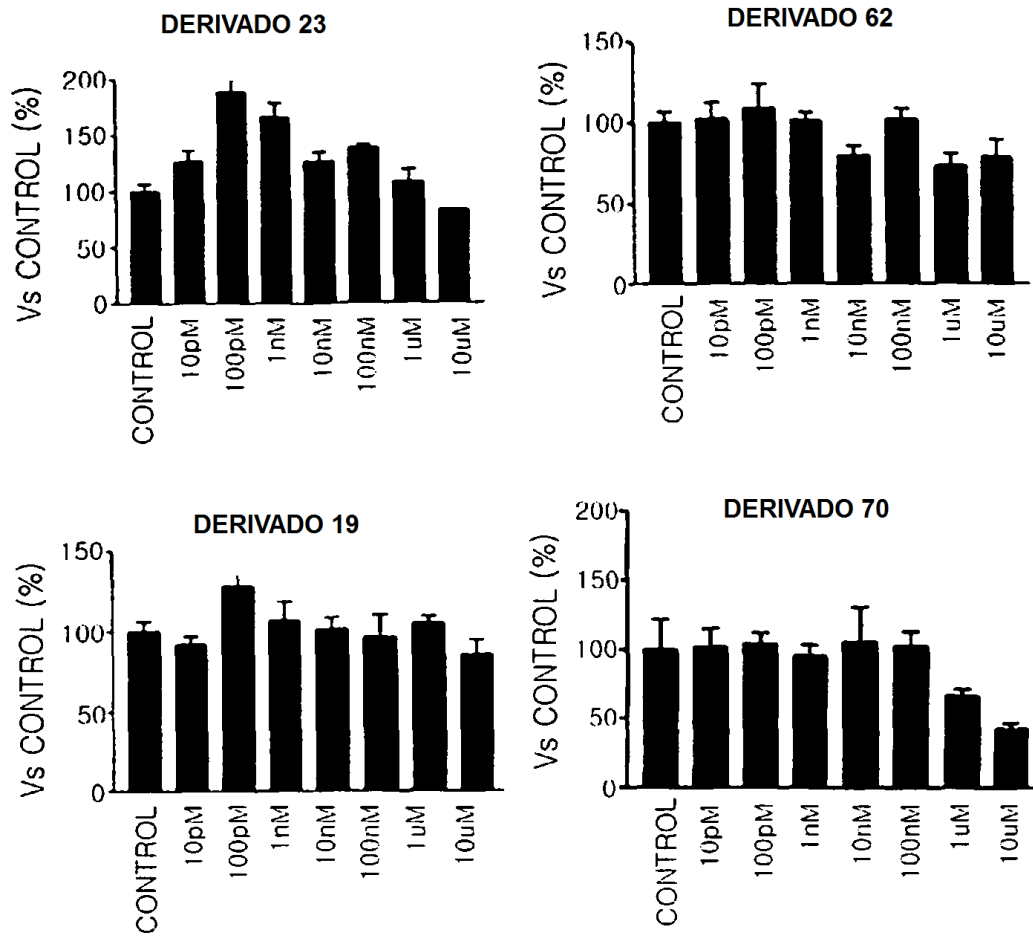
[Fig. 8]



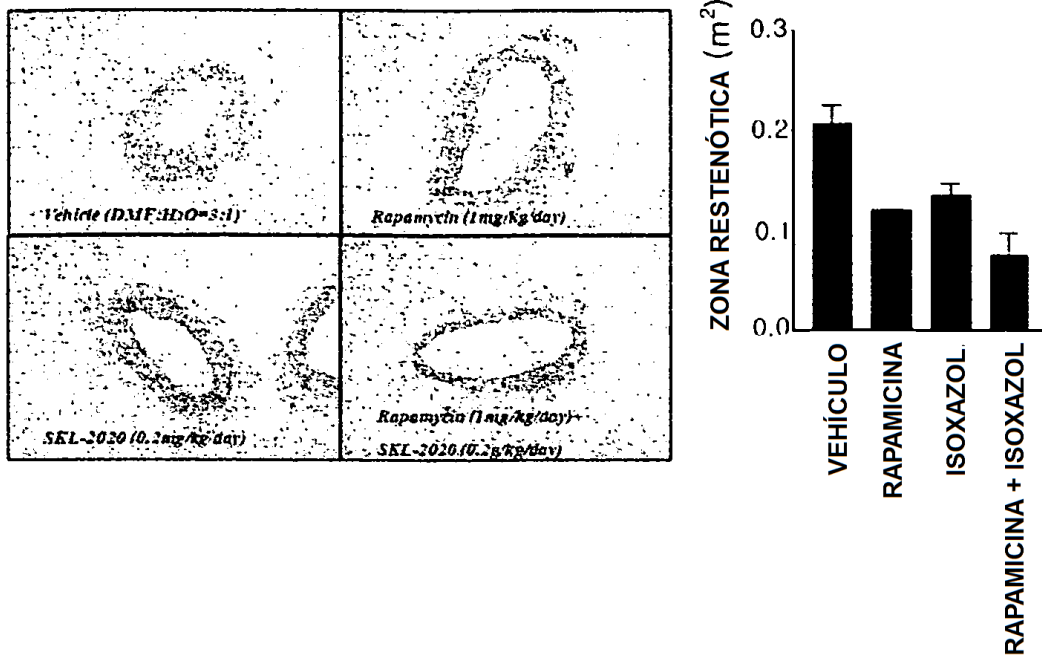
[Fig. 9]



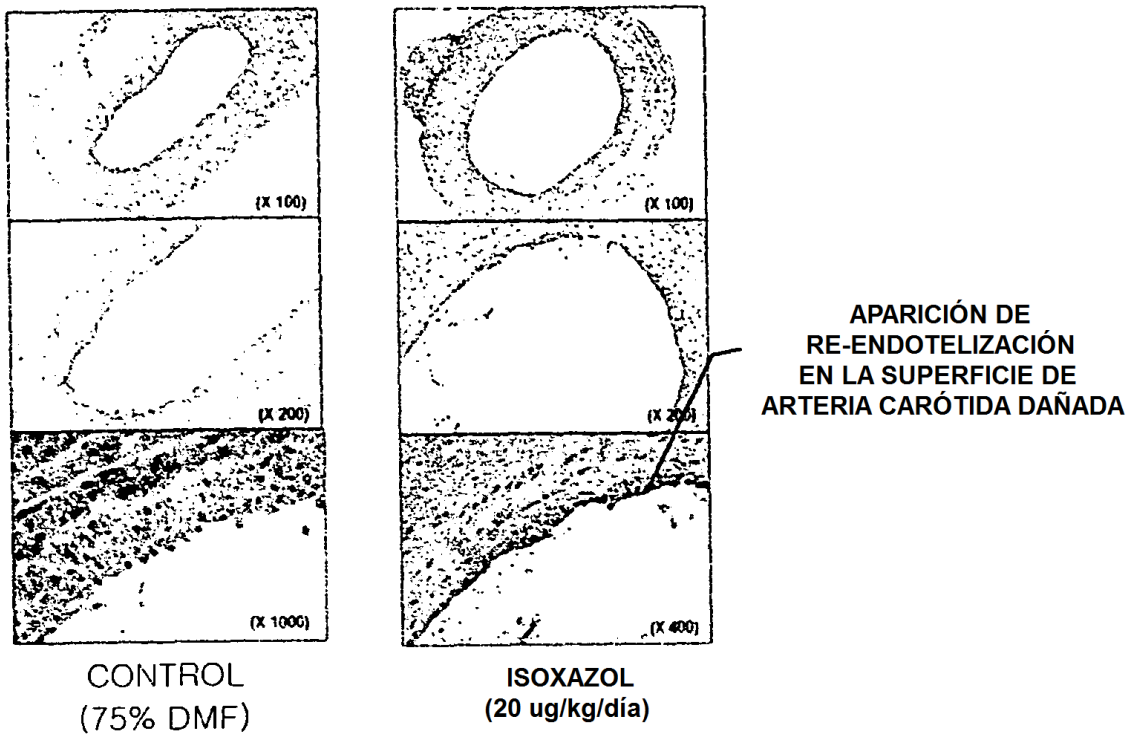
[Fig. 10]



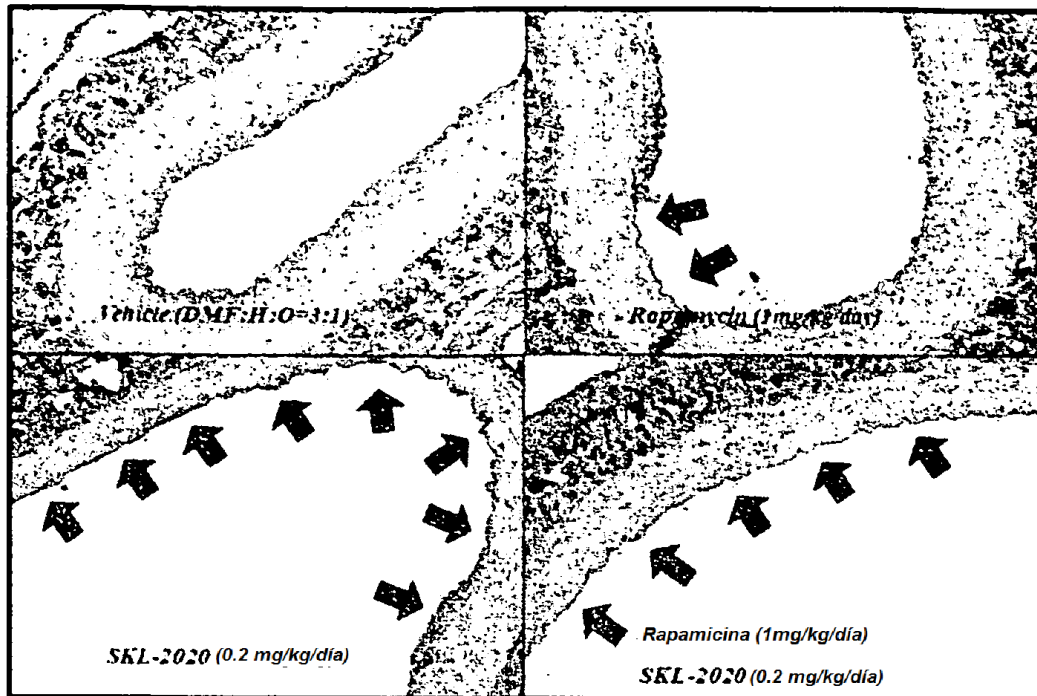
[Fig. 11]



[Fig. 12]

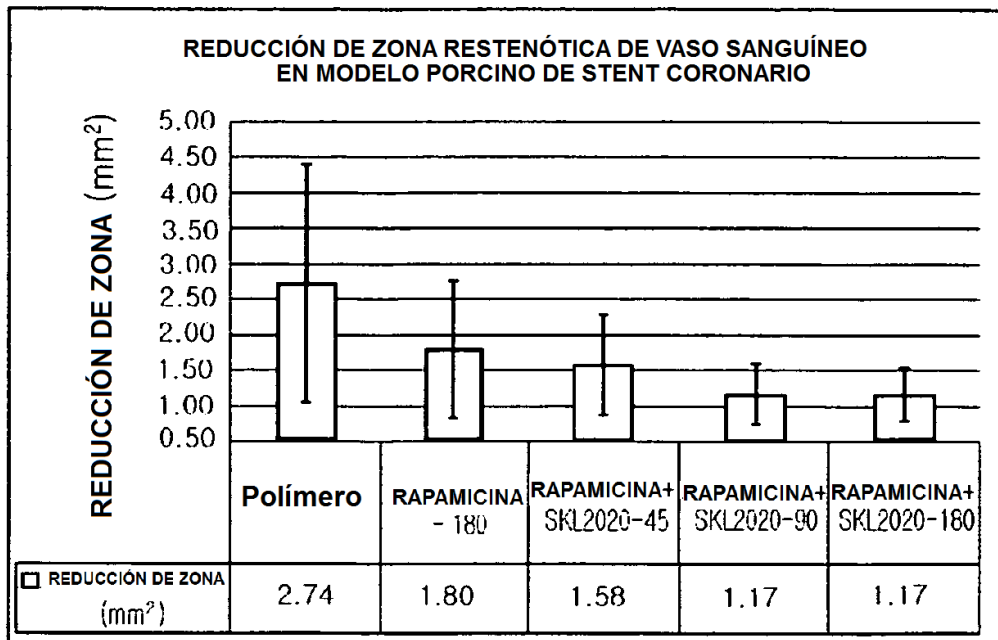
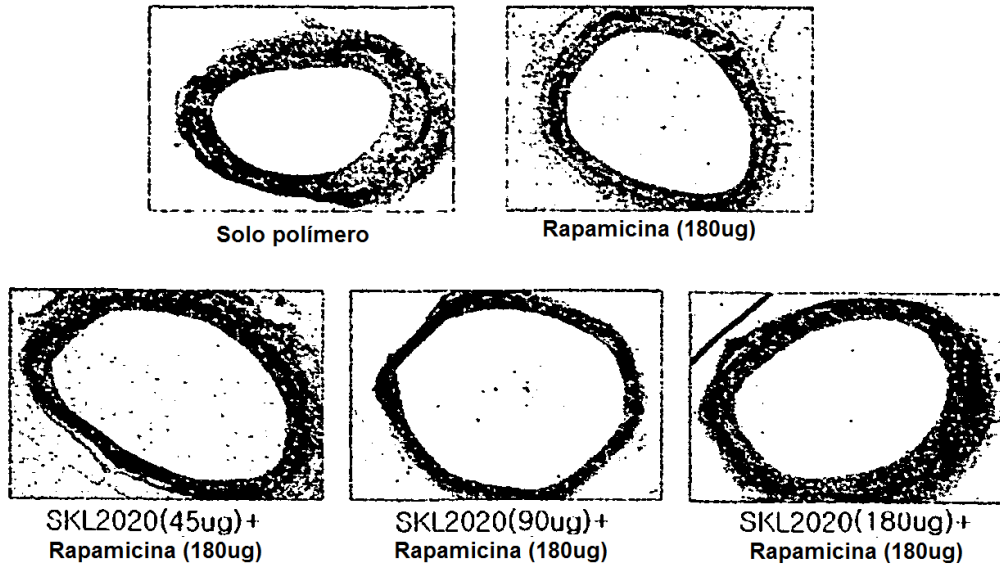


[Fig. 13]



TINCIÓN EC UTILIZANDO ANTI-VWF (FACTOR DE VON WILLEBRAND)

[Fig. 14]



[Fig. 15]

