

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 608**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7028 (2006.01)

A61K 31/7008 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2009 E 09730162 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2268286**

54 Título: **Procedimientos de regulación del reordenamiento del citoesqueleto de actina y formación de espacios intercelulares**

30 Prioridad:

09.04.2008 US 43586 P

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

11.05.2016

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (100.0%)
308 Bynum Hall, Campus Box 4105
Chapel Hill, NC 27599-4105, US**

72 Inventor/es:

EGAN, THOMAS, MICHAEL

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 569 608 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de regulación del reordenamiento del citoesqueleto de actina y formación de espacios intercelulares

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente de EE. UU. N.º de serie 61/043 586, presentada el 9 de abril de 2008, cuya descripción se incorpora en su totalidad en este documento por referencia.

10 CAMPO TÉCNICO

[0002] La materia descrita actualmente se refiere a procedimientos y composiciones para prevenir o evitar el reordenamiento del citoesqueleto de actina y la formación de espacios intercelulares. Los procedimientos pueden utilizarse para prevenir el reordenamiento del citoesqueleto de actina que se produce en respuesta a un acontecimiento de isquemia o a una lesión de isquemia reperusión.

ABREVIATURAS

[0003]

20	°C	= grados centígrados
	AGP	= fosfato de aminoalquil glucosaminida
	SDRA	= síndrome de dificultad respiratoria del adulto
	ATP	= trifosfato de adenosina
25	IF	= isquemia fría
	CO ₂	= dióxido de carbono
	HMVEC	= células endoteliales microvasculares pulmonares humanas
	h	= horas
	LIR	= lesión por isquemia reperusión
30	LDH	= lactato deshidrogenasa
	kg	= kilogramo
	µmol	= micromol
	mg	= miligramo
	min	= minutos
35	O ₂	= oxígeno
	PBS	= solución salina tamponada con fosfato
	SRIS	= síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
	IC	= isquemia caliente

40 ANTECEDENTES

[0004] La lesión pulmonar aguda de una característica de la septicemia, la respuesta inflamatoria sistémica y el síndrome de dificultad respiratoria del adulto. El edema pulmonar no cardiogénico y la alteración del intercambio gaseoso son consecuencias de la lesión pulmonar aguda, independientemente de su etiología. Los mecanismos causantes del edema pulmonar debido a lesión pulmonar aguda no se conocen bien. La lesión por isquemia reperusión (LIR), una forma aguda de lesión pulmonar que se produce inmediatamente después del trasplante pulmonar, es una complicación frecuente que provoca morbilidad y mortalidad. Véase King y col., Ann. Thorac. Surg., 69, 1681-1685 (2000).

[0005] La reperusión tras un intervalo de isquemia tiene como resultado una respuesta inflamatoria que afecta a componentes del sistema inmunitario innato, incluidos el complemento y las cascadas de coagulación. Tanto las células parenquimatosas como las mieloides elaboran radicales libres, óxido nítrico y citocinas pro y antiinflamatorias. Véase de Perrot y col., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 167(4), 490-511 (2003); de Groot y Rauwen, Transplant Proc., 39(2), 481-484 (2007) y Mollen y col., Shock, 26(5), 430-437 (2006).

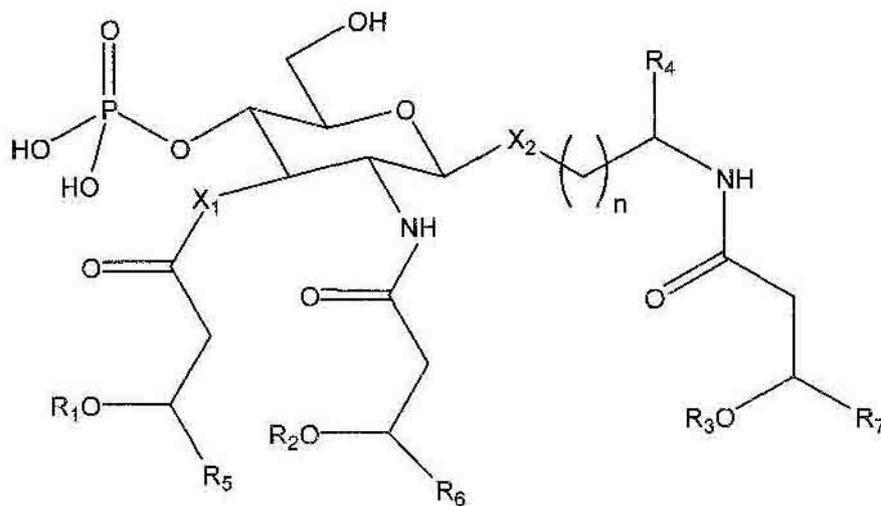
[0006] Un mejor conocimiento de la LIR pulmonar es probablemente de relevancia para muchos tipos de lesiones pulmonares agudas y puede ser beneficioso para un número considerable de pacientes además de para los receptores de un trasplante de pulmón. Este conocimiento también puede usarse potencialmente para facilitar la recuperación de los pulmones de donantes sin latido cardíaco para el trasplante y/o ayudar al rescate de pulmones

de calidad subtrasplante, véase Steen y col. Ann Thorac Surg., 83, 2191-2195 (2007) abordando de este modo la crítica escasez de pulmones para trasplante. Véase Egan y col., Ann. Thorac. Surg., 52, 1113-1121 (1991) y Egan, J. Heart Lung Transplant., 23(1), 3-10 (2004).

5 RESUMEN

[0007] En algunas realizaciones, la materia descrita actualmente proporciona un procedimiento de prevención o reducción del reordenamiento del citoesqueleto de actina en una célula, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I):

10



donde:

- 15 n es un número entero de 1 a 6;
 X₁ es O o S;
 X₂ es O o S;
 R₁, R₂ y R₃ son independientemente acilo C₂-C₁₆, donde al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es acilo C₂-C₇;
 R₄ se selecciona a partir del grupo compuesto por H, hidroxilalquilo, -C(=O)NH₂ y -(CH₂)_mC(=O)OH, donde m es
 20 un número entero de 0 a 2; y
 R₅, R₆ y R₇ son independientemente alquilo C₁₀-C₁₂, o

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 25 **[0008]** En algunas realizaciones, n es 1. En algunas realizaciones, X₁ y X₂ son cada uno O. En algunas realizaciones, R₄ es -C(=O)OH. En algunas realizaciones, R₁, R₂ y R₃ son cada uno acilo C₂-C₇. En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto donde n es 1; X₁ es O; X₂ es O; R₁, R₂ y R₃ son cada uno -C(=O)(CH₂)₄CH₃; R₄ es -C(=O)OH; y R₅, R₆ y R₇ son cada uno -(CH₂)₁₀CH₃, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30

[0009] En algunas realizaciones, la célula es una célula de mamífero. En algunas realizaciones, la célula es una célula endotelial.

[0010] En algunas realizaciones, la prevención o reducción del reordenamiento del citoesqueleto de actina previene o reduce la formación de espacios intercelulares entre la célula y una o más células que rodean a la célula.

35

[0011] En algunas realizaciones, la puesta en contacto con la célula se produce antes de un acontecimiento isquémico o de reperfusión isquémica relacionado, durante la isquemia o después de un intervalo de isquemia, y prevenir o reducir el reordenamiento del citoesqueleto de actina comprende prevenir o reducir el reordenamiento del
 40 citoesqueleto de actina relacionado con un acontecimiento isquémico o de reperfusión isquémica relacionado.

[0012] En algunas realizaciones, la materia descrita actualmente proporciona un procedimiento de prevención o reducción del reordenamiento del citoesqueleto de actina en una o más células en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0013] En algunas realizaciones, la prevención o reducción del reordenamiento del citoesqueleto de actina en una o más células en el sujeto previene o alivia una enfermedad o afección asociada con un aumento del reordenamiento del citoesqueleto de actina, o un síntoma del mismo, en el sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero.

[0014] Es un objeto de la materia descrita actualmente proporcionan procedimientos y composiciones para prevenir o reducir el reordenamiento del citoesqueleto de actina.

[0015] Un objeto de la materia descrita actualmente como se ha establecido anteriormente en este documento, y que se consigue por completo o en parte mediante la materia descrita actualmente, otros objetos resultarán evidentes a medida que avance la descripción cuando se haga referencia a los ejemplos acompañantes y los dibujos como la mejor descripción a continuación en este documento.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0016]

La figura 1A es una serie de fotografías de células endoteliales microvasculares pulmonares humanas (HMVCE) teñidas con faloidina en la que muestra el efecto de la isquemia caliente simulada sin hipoxia sobre el reordenamiento del citoesqueleto de actina y sobre la formación de espacios en la monocapa endotelial microvascular pulmonar humana. Las HMVEC se crecieron hasta confluencia en placas P30 con cubreobjetos integrales y se incubaron con CRX-526 a 1 µg/ml o vehículo antes de 1 hora de isquemia caliente (IC) simulada. Las fotografías muestran células tratadas con CRX-526 y con vehículo antes de la IC (Control), después de 15 o 60 min de IC y después de 15, 60 o 240 min de perfusión simulada (rep). Los experimentos se realizaron por triplicado.

La figura 1 B es una gráfica del % de área de espacios en la monocapa de las células mostradas en la figura 1A. Se analizaron tres campos independientes de cada una de las tres placas P30 (n = 9 fotos/punto temporal). El % de área de espacios en la monocapa se cuantificó mediante el software MetaMorph® (MDS Analytical Technologies, Inc., Sunnyvale, California, Estados Unidos de América). Los datos de las células tratadas con vehículo se muestran como barras sombreadas. Los datos de las células tratadas con CRX-526 se muestran como barras blancas. * = p<0,05, † = p<0,01, ‡ = p<0,001 prueba t no pareada.

La figura 1 C es una gráfica del % de actina anómala en las células mostradas en la figura 1A. Debido a la variabilidad considerable en el citoesqueleto de actina de las células endoteliales microvasculares pulmonares humanas (HMVEC), las células se marcaron como con una distribución de actina "normal" o "anómala" en las imágenes (n = 9 fotos/punto temporal), sin tener en cuenta el grado de intensidad de la anomalía. La evaluación fue realizada por un observador que desconoce la identidad del grupo o del momento de la muestra. A continuación, se calcularon las relaciones de las poblaciones. Los datos de las células tratadas con vehículo se muestran como barras sombreadas. Los datos de las células tratadas con CRX-526 se muestran como barras blancas. ‡= p<0,001 prueba t no pareada.

La figura 2A es una serie de fotografías (de izquierda a derecha) de células endoteliales microvasculares pulmonares humanas (HMVEC) en medio de cultivo celular templado (37 °C) (Control), de HMVEC tras cuatro horas de isquemia fría (IF) en medio de cultivo celular a 4 °C (Medio 4 h IC), de HMVEC tras cuatro horas de isquemia fría en solución de conservación pulmonar PERFADEX™ (Vitrolife, Kungsbacka, Suecia) a 4 °C (Vehículo 4 h IC) y HMVEC que se habían preincubados con CRX-526 y se sometió a cuatro horas de isquemia fría en PERFADEX™ (Vitrolife, Kungsbacka, Suecia) a 4 °C con CRX-526 (CRX-526 4 h IC). Las fotografías representan 9 imágenes tomadas de cada conjunto de condiciones.

La figura 2B es una gráfica del % de área de espacios en la monocapa de células endoteliales microvasculares pulmonares humanas (HMVEC) en medios de cultivo celular (Medio), vehículo (es decir, PERFADEX™ [Vitrolife, Kungsbacka, Suecia]) o un vehículo tras 1 hora de tratamiento previo con CRX-526 y seguido de cuatro horas de isquemia fría (4 h IC), 1 hora de isquemia fría (IF) o seguido de 1 hora de isquemia fría y 15 min, 1 h o 4 h de perfusión (15 min rep, 1 h rep, 4 h rep, respectivamente). Los datos de las HMVEC en medio de cultivo celular sin vehículo se muestran como barras blancas. Los datos de las HMVEC en medio suplementado con vehículo pero sin compuesto se muestran como barras sombreadas oscuras. Los datos de células pretratadas con CRX-

526 se muestran como barras sombreadas claras. El % de área de espacios se cuantificó mediante el software MetaMorph® (MDS Analytical Technologies, Inc., Sunnyvale, California, Estados Unidos de América). * = $p < 0,01$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5

[0017] La materia descrita actualmente se describirá ahora en mayor detalle en este documento en referencia a los ejemplos acompañantes, en los que se muestran realizaciones representativas. Sin embargo, la materia descrita actualmente puede realizarse de diferentes formas y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones mostradas en este documento. Más bien, estas realizaciones se proporcionan para que esta descripción sea minuciosa y completa, y transmitirá completamente el alcance de las realizaciones a los expertos en la materia.

10

[0018] Siempre que no se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta materia descrita actualmente. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en este documento se incorporan en su integridad por referencia.

15

[0019] A lo largo de toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, una fórmula o nombre químico determinado abarcará todos los isómeros ópticos y estereoisómeros, así como las mezclas racémicas, cuando existan tales isómeros y mezclas.

20

I. Definiciones

[0020] Aunque se considera que los siguientes términos pueden ser bien entendidos por un experto normal en la materia, se establecen las siguientes definiciones para facilitar la explicación de la materia describe actualmente.

25

[0021] Siguiendo la convención de la ley de patentes existente desde hace años, los términos "un, una" y "el, la" se refieren a "uno o más" cuando se usan en esta aplicación, incluso en las reivindicaciones. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un compuesto" o "una célula" incluye una gran variedad de estos compuestos o células, etc.

30

[0022] Según se usa en este documento el término "alquilo" se refiere a cadenas de hidrocarburos lineales (es decir, "de cadena recta"), ramificadas o cíclicas, saturadas o al menos parcialmente y en algunos casos completamente insaturadas C_{1-20} inclusive, (es decir, alqueno y alquino), incluyendo, por ejemplo grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *tert*-butilo, pentilo, hexilo, octilo, etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, octenilo, butadienilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo, heptinilo y alenilo. "Ramificado" se refiere a un grupo alquilo en el que un grupo alquilo inferior, como metilo, etilo o propilo, está unido a una cadena alquilo lineal. "Alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo con de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono (es decir, un alquilo C_{1-7}), por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono. "Alquilo superior" se refiere a un grupo alquilo con de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 átomos de carbono, por ejemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 átomos de carbono.

40

[0023] Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos (un "alquilo sustituido") con uno o más sustituyentes del grupo alquilo, que pueden ser el mismo o diferentes. El término "sustituyente de grupo alquilo" incluye, entre otros, alquilo, alquilo sustituido, halo, arilamino, acilo, hidroxilo, ariloxilo, alcoxilo, alquiltio, ariltio, aralquilo, aralquiltio, carboxilo, alcocarbonilo, oxo y cicloalquilo. Opcionalmente pueden tener insertados a lo largo de la cadena alquilo uno o más átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno sustituidos o no sustituidos donde el sustituyente de nitrógeno es hidrógeno, alquilo inferior (también denominado en este documento como "alquilaminoalquilo") o arilo.

45

[0024] Por tanto, según se usa en este documento, el término "alquilo sustituido" incluye grupos alquilo, como se define en este documento, en el que uno o más átomos o grupos funcionales del grupo alquilo están sustituidos con otro átomo o grupo funcional, incluidos por ejemplo, alquilo, alquilo sustituido, halógeno, arilo, arilo sustituido, alcoxilo, hidroxilo, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato y mercapto.

50

[0025] El término "alqueno" se refiere a un grupo alquilo que comprende uno o más enlaces dobles carbono-carbono.

55

[0026] El término "arilo" se usa en este documento para referirse a un sustituyente aromático que puede ser un anillo aromático simple o anillos aromáticos múltiples que se fusionan entre sí, están unidos covalentemente o

están unidos a un grupo común como, pero sin limitaciones, un resto metileno o etileno. El grupo de unión común también puede ser un carbonilo, como en la benzofenona, u oxígeno, como en el difeniléter, o nitrógeno, como en la difenilamina. El término "arilo" abarca específicamente compuestos aromáticos heterocíclicos. Los anillos aromáticos pueden comprender fenilo, naftilo, bifenilo, difeniléter, difenilamina y benzofenona, entre otros. En realizaciones en particular, el término "arilo" significa un compuesto aromático cíclico que comprende de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de carbono, e incluye anillos aromáticos de hidrocarburos y heterocíclicos de 5 y 6 átomos.

[0027] El grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido (un "arilo sustituido") con uno o más sustituyentes de grupo arilo, que pueden ser el mismo o diferentes, donde el "sustituyente de grupo arilo" incluye alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, aralquioxilo, carboxilo, acilo, halo, nitro, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, aralcoxycarbonilo, aciloxilo, acilamino, aroilamino, carbamoilo, alquilcarbamoilo, dialquilcarbamoilo, ariltio, alquiltio, alquilenilo y -NR'R", donde R' y R" pueden ser cada uno independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido y aralquilo.

[0028] Por tanto, según se usa en este documento, el término "arilo sustituido" incluye grupos arilo, como se define en este documento, en el que uno o más átomos o grupos funcionales del grupo arilo están sustituidos con otro átomo o grupo funcional, incluidos por ejemplo, alquilo, alquilo sustituido, halógeno, arilo, arilo sustituido, alcoxilo, hidroxilo, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato y mercapto.

[0029] Entre los ejemplos específicos de grupos arilo se incluyen, pero sin limitaciones, ciclopentadienilo, fenilo, furano, tiofeno, pirrol, pirano, piridina, imidazol, benzimidazol, isotiazol, isoxazol, pirazol, pirazina, triazina, pirimidina, quinolina, isoquinolina, indol, carbazol y similar.

[0030] "Alquilenilo" se refiere a un grupo de hidrocarburo alifático bivalente lineal o ramificado con de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 átomos de carbono. El grupo alquilenilo puede ser lineal, ramificado o cíclico. El grupo alquilenilo también puede ser opcionalmente insaturado y/o estar sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo alquilo". Opcionalmente puede tener insertados a lo largo del grupo alquilenilo uno o más átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno sustituido o no sustituido (también denominado en este documento como "alquilaminoalquilo"), donde el sustituyente de nitrógeno es alquilo como se describió previamente. Entre los ejemplos de grupos alquilenilo se incluyen metileno (-CH₂-); etileno (-CH₂-CH₂-); propileno (-CH₂)₃-; ciclohexileno (-C₆H₁₀-); -CH=CH-CH=CH-; -CH=CH-CH₂-; -(CH₂)_q-N(R)-(CH₂)_r-, donde cada uno de q y r es independientemente un número entero de 0 a aproximadamente 20, por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20, y R es hidrógeno o alquilo inferior; metilendioxilo (-O-CH₂-O-) y etilendioxilo (-O-(CH₂)₂-O-). Un grupo alquilenilo puede tener de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 átomos de carbono y puede además tener de 6 a 20 carbonos.

[0031] "Hidroxi" e "hidroxilo" se refieren al grupo -OH.

[0032] El término "hidroxialquilo" se refiere a un grupo alquilo terminado en hidroxilo. En algunas realizaciones, el grupo hidroxialquilo tiene la estructura -(CH₂)_nOH.

[0033] El término "ácido carboxílico" se refiere al grupo -C(=O)OH. El término "carboxilato" se refiere al anión formado cuando se elimina el H del grupo de ácido carboxílico. Por tanto, "carboxilato" se refiere al grupo -C(=O)O⁻. Los carboxilatos pueden formar sales (es decir, sales de carboxilato) con grupos catiónicos. Los términos "carboxilato de alquilenilo" y "ácido carboxílico alquilenilo" se refieren a grupos monovalentes formados por la unión de un ácido carboxílico o grupo carboxilato a un punto de unión abierto en un grupo alquilenilo (p. ej., los grupos -(CH₂)_nC(=O)OH y -(CH₂)_nC(=O)⁻).

[0034] Según se usa en este documento, el término "acilo" se refiere al grupo -C(=O)R, donde R es un grupo alquilo o arilo según se definió anteriormente en este documento. En algunas realizaciones, la R del grupo acilo es alquilo C₁-C₁₆. En algunas realizaciones, el grupo alquilo del resto acilo es alquilo o alquilenilo de cadena lineal. En algunas realizaciones la R del grupo acilo es alquilo C₁-C₁₆ de cadena lineal.

[0035] El término "fosfato" se refiere al grupo -P(=O)(OH)₂. El término "fosfato" también incluye especies aniónicas formadas por la eliminación de uno o más átomos de hidrógeno del grupo fosfato.

[0036] El término "tio" se refiere a un grupo con la estructura -S-R, donde R es alquilo, acilo o arilo. El término "tio" puede referirse también a un compuesto de estructura H-S-R, donde R es alquilo, acilo o arilo.

[0037] El término "amino" se refiere a un grupo con la estructura $-NR_1R_2$, donde R_1 y R_2 se seleccionan independientemente a partir del grupo H, alquilo, acilo y arilo.

5 **[0038]** El término "carbamoilo" se refiere al grupo $-C(=O)NH_2$.

[0039] El término "monosacárido" se refiere a una unidad monomérica de hidratos de carbono de fórmula $(CH_2O)_{n+m}$ basada en una forma de cadena abierta de un compuesto con la estructura química $H(CHOH)_nC(=O)(CHOH)_mH$, donde la suma de $n + m$ es un número entero entre 2 y 8. Por tanto, entre las unidades
10 monoméricas pueden incluirse triosas, tetrasas, pentosas, hexosas, heptosas, nonosas y sus mezclas. El monosacárido puede estar en una forma cíclica de la estructura química. Por tanto, en algunas realizaciones, el compuesto comprenderá un hemiacetal o un hemicetal. En algunas realizaciones, el término "monosacárido" se refiere a una unidad monomérica cíclica basada en un compuesto con una estructura química $H(CHOH)_nC(=O)(CHOH)_mH$ donde $n + m$ es 4 o 5. Por tanto, entre los monosacáridos se incluyen, pero sin
15 limitaciones, aldohexosas, aldopentosas, cetoheptosas y cetopentosas como arabinosa, lixosa, ribosa, xilosa, ribulosa, xilulosa, alosa, altrosa, galactosa, glucosa, gulosa, idosa, manosa, talosa, fructosa, psicosa, sorbosa y tagatosa.

[0040] El término "análogo de monosacárido" se refiere a un monosacárido donde uno o más grupos hidroxilo del monosacárido se sustituyen por otro grupo químico, como, pero sin limitaciones, un fosfato, una amina, un tiol o un grupo alquilo.

[0041] El término "aminoazúcar" se refiere a un análogo de monosacárido donde uno o más grupos hidroxilo de un monosacárido se sustituyen por una amina. Un ejemplo de aminoazúcar es la glucosamina (es decir, 2-deoxi-
25 2-amino- α -D-glucopiranososa).

[0042] El término "fragmento" según se usa en este documento en relación con un compuesto, se refiere a un compuesto cuya estructura es cualquier parte de la estructura del compuesto denominado originalmente que es menos que la totalidad del compuesto denominado originalmente. Por tanto, un fragmento es más pequeño que el
30 compuesto original, aunque, en general, retiene parte o toda la actividad biológica del compuesto original.

[0043] "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de administración, dentro del alcance del juicio médico, adecuados para el contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otros problemas o complicaciones
35 acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Por tanto, en algunas realizaciones, los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de administración descritos actualmente son farmacéuticamente aceptables para su uso en humanos.

[0044] En general, el término "reduciendo" se refiere a procedimientos para tratar una afección o enfermedad
40 preexistente, por ejemplo, reduciendo o aliviando los síntomas o efectos de la afección o enfermedad en cualquier grado.

[0045] "Previniendo" se refiere a procedimientos para evitar que una posible afección, enfermedad, trastorno o lesión futura, o sus síntomas, se produzcan en cualquier grado. "Previniendo" puede referirse a procedimientos
45 para disminuir los efectos de una afección o lesión futura, de modo que los efectos de la afección o lesión futura sean de menor magnitud o más corta duración que los efectos que podrían producirse en ausencia de la acción preventiva, así como a los procedimientos para evitar por completo que se produzcan los efectos. Por tanto, "previniendo" se refiere a procedimientos profilácticos de tratamiento médico y veterinario.

50 **[0046]** "Isquemia" se refiere a un flujo sanguíneo inadecuado hacia un tejido u órgano biológico, que tiene como resultado la incapacidad del órgano o tejido para cumplir con la demanda metabólica. La reperfusión (recuperación del flujo sanguíneo) hacia el órgano o tejido isquémico puede llevar a la producción de cantidades excesivas de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), produciendo de este modo estrés oxidativo que tiene como resultado una serie de acontecimientos como alteraciones de la fosforilación
55 mitocondrial oxidativa, depleción de ATP (que también se produce durante y como resultado de la isquemia), aumento del calcio intracelular y activación de proteína quinasas, fosfatasas, proteasas, lipasas y nucleasas que llevan a una pérdida de la función o integridad celular.

[0047] La lesión por isquemia reperfusión (LIR) se refiere a una lesión que se produce después de reiniciar la

circulación sanguínea en un tejido orgánico sometido a isquemia (p. ej., cuando un órgano se extirpa mediante intervención quirúrgica y se reimplanta, como sucede en un trasplante o autotrasplante). A modo de ejemplo adicional y no de limitación, esta lesión también se produce cuando se reinicia la circulación sanguínea después de que se haya detenido para el trasplante de un órgano; después de que una arteria coronaria se trate con angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP), stent o derivación tras un infarto de miocardio, y tras la administración de un trombolítico a un paciente de ictus. Otro ejemplo es cuando el flujo sanguíneo hacia el corazón se detiene temporalmente debido a una cirugía cardíaca, a menudo mediante la administración previa de soluciones cardioplégicas. Otro ejemplo es la interrupción del flujo sanguíneo hacia una extremidad para una cirugía sin sangre por un cirujano ortopédico cuando se infla un torniquete en la extremidad. Esta lesión puede producirse en muchos tejidos, como riñón, hígado, pulmones, páncreas, músculo esquelético, tejido blando de músculo liso, piel e intestinos, así como en el corazón y el cerebro. Por tanto, la LIR puede incluir, pero sin limitaciones, lesión por isquemia reperusión cerebral, retinal, hepática, renal, pancreática, de médula espinal, mesentérica, de extremidades, intestinal, cerebral, miocárdica, del sistema nervioso central o pulmonar, o una combinación de las mismas. En especial, la lesión por isquemia reperusión es un problema grave en el trasplante de órganos debido a que el órgano recogido se retira del cuerpo de un donante, se aísla de la fuente de sangre y, por tanto, se desprovee de nutrientes y, a menudo de oxígeno, durante un periodo de tiempo normalmente prolongado.

[0048] "Edema" se refiere a un aumento del líquido intersticial en un tejido u órgano. En el pulmón, "edema" también puede referirse a un aumento del líquido alveolar. En algunas realizaciones, el edema se asocia con una afección que conlleva aumento de la permeabilidad de las células endoteliales.

[0049] "Aumento de la permeabilidad endotelial" se refiere a un aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos en un órgano o tejido al líquido y/o proteínas de la sangre, lo que da lugar a un edema que puede producirse en diversos escenarios clínicos como, pero sin limitaciones, el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA) y el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), y en el ámbito de la infección con diversas bacterias.

II. Consideraciones generales

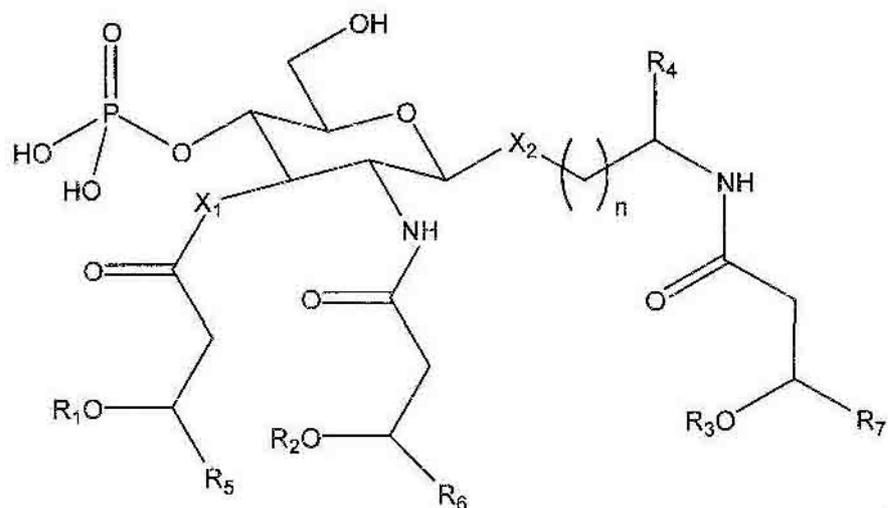
[0050] El citoesqueleto endotelial, especialmente las fibras de tensión de actina, tienen una función importante en la regulación de la permeabilidad vascular pulmonar. Véase Dudek y García, J. Appl. Physiol., 91(4), 1487-1500 (2001). También se ha postulado que el citoesqueleto puede actuar como un sistema de comunicación intracelular o de andamiaje de la señalización. Véase Ingber, Faseb J., 20(7), 811-827, (2006). La materia descrita actualmente se refiere a la observación de que un fosfato de aminoalquil glucosaminida, CRX-526, reduce el reordenamiento del citoesqueleto tras una isquemia simulada.

III. Miméticos del lípido A

[0051] En algunas realizaciones, la materia descrita actualmente se refiere al uso de compuestos miméticos del lípido A que comprenden monosacáridos o análogos de monosacáridos. En algunas realizaciones, el análogo de monosacárido es un aminoazúcar. En algunas realizaciones, el aminoazúcar es glucosamina. En algunas realizaciones, la materia descrita actualmente se refiere al uso de fosfatos de aminoalquil glucosaminida (AGP) o sus sales farmacéuticamente aceptables.

III. A. Compuestos de fórmula (I)

[0052] En general, los AGP son miméticos del lípido A sintéticos (es decir, sintetizados químicamente) y pueden tener una estructura de fórmula (I):



donde:

- 5 n es un número entero de 1 a 6;
 X₁ es O o S;
 X₂ es O o S;
 R₁, R₂ y R₃ son independientemente acilo C₂-C₁₆;
 R₄ se selecciona a partir del grupo compuesto por H, hidroxilalquilo, -C(=O)NH₂ y -(CH₂)_mC(=O)OH, donde m es
 10 un número entero de 0 a 2; y
 R₅, R₆ y R₇ son independientemente alquilo C₁₀-C₁₂ alquilo, o

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 15 **[0053]** En general, el AGP de uso en la materia descrita actualmente incluye al menos una cadena acilo secundaria (es decir, R₁, R₂ o R₃) que tiene menos de ocho carbonos. Por tanto, en algunas realizaciones, al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es -C(=O)R₈, donde R₈ es alquilo C₁-C₆ (es decir, al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es acilo C₂-C₇). En algunas realizaciones, al menos dos de R₁, R₂ y R₃ son acilo C₂-C₇. En algunas realizaciones, al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es -C(=O)R₈, donde R₈ es alquilo C₅. En algunas realizaciones, R₅, R₆ y R₇ son cada uno alquilo C₁₀-C₁₂
 20 de cadena lineal completamente saturada.

[0054] En algunas realizaciones, el compuesto es CRX-526, es decir, el compuesto de fórmula (I) donde n es 1; X₁ y X₂ son cada uno O; R₁, R₂ y R₃ son cada uno -C(=O)(CH₂)₄CH₃; R₄ es -C(=O)OH y R₅, R₆ y R₇ son cada uno -(CH₂)₁₀CH₃, o una sal farmacéuticamente aceptables del mismo.

25

[0055] Se han descrito previamente la síntesis y actividad de diversos AGP. Véase, por ejemplo, Cluff y col., *Infection and Immunity*, 73(5), 3044-3052 (2005); Stöver y col., *J. Biol. Chem.*, 279(6), 4440-4449 (2004) y las referencias citadas en estas. Véase también la patente de EE. UU. N.º 6 113 918 de Johnson y col.

30 **[0056]**

Los compuestos de fórmula (I) tienen átomos de carbono asimétricos y, por tanto, pueden mostrarse como enantiómeros o diastereómeros. Las mezclas diastereoméricas pueden separarse en sus diastereómeros individuales en función de sus diferencias fisicoquímicas mediante procedimientos conocidos per se, por ejemplo, mediante cromatografía y/o cristalización fraccionada. Los enantiómeros pueden separarse convirtiendo la mezcla enantiomérica en una mezcla diastereomérica mediante reacción con un compuesto ópticamente apropiado (p. ej., alcohol), separando los diastereómeros y convirtiendo (p. ej., hidrolizando) los diastereómeros individuales en los correspondientes enantiómeros puros. Todos estos isómeros, incluyendo diastereómeros, enantiómeros y sus mezclas se consideran como parte de la materia descrita actualmente.

35

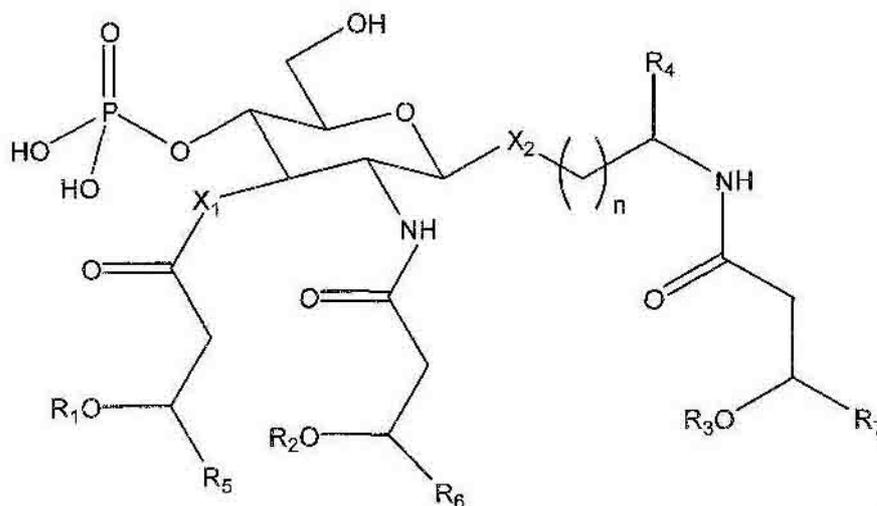
III. B. Sales farmacéuticamente aceptables

[0057] La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" según se usa en este documento en relación con los compuestos de la materia descrita actualmente (p. ej., los compuestos de fórmula (I)) incluye las sales catiónicas farmacéuticamente aceptables. La expresión "sales catiónicas farmacéuticamente aceptables" pretende definir, pero sin limitaciones, a aquellas sales que son sales de metales alcalinos (p. ej., sodio y potasio), sales de metales alcalinotérreos (p. ej., calcio y magnesio), sales de aluminio, sales de amonio y sales con aminas orgánicas como benzatina (N,N'-dibenziletildiamina), colina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglutamina), benetamina (N-bencilfenetilamina), etanolamina, dietilamina, piperazina, trietanolamina (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol) y procaina. En algunas realizaciones, el término "sal farmacéuticamente aceptable" según se usa en este documento se refiere a sales que son farmacéuticamente aceptables en humanos.

[0058] Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) se preparan fácilmente mediante la reacción de la forma de ácido libre de dichos compuestos con una base apropiada, normalmente uno o más equivalentes, en un cosolvente. Entre los cosolventes se pueden incluir, pero sin limitaciones, dietiléter, diglima y acetona. Entre las bases se pueden incluir, entre otras, hidróxido sódico, metóxido sódico, etóxido sódico, hidruro sódico, metóxido de potasio, hidróxido de magnesio, hidróxido de calcio, benzatina, colina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y trietanolamina. La sal se aísla mediante concentración hasta sequedad o adición de un no solvente. En muchos casos, las sales pueden prepararse mezclando una solución del ácido con una solución de una sal diferente del catión (p. ej., etilhexanoato de sodio o potasio, oleato de magnesio) y empleando un cosolvente, como se describió anteriormente, a partir del que precipita la sal catiónica deseada, o puede aislarse de otro modo mediante concentración.

IV. Procedimientos de prevención o reducción del reordenamiento del citoesqueleto de actina en una célula

[0059] En algunas realizaciones, la materia descrita actualmente se refiere a procedimientos para prevenir o reducir el reordenamiento del citoesqueleto de actina. En algunas realizaciones, la materia descrita actualmente proporciona un procedimiento de prevención o reducción del reordenamiento del citoesqueleto de actina en una célula, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I);



donde:

- 35 n es un número entero de 1 a 6;
 X₁ es O o S;
 X₂ es O o S;
 R₁, R₂ y R₃ son independientemente acilo C₂-C₁₆;
 R₄ se selecciona a partir del grupo compuesto por H, hidroxilalquilo, -C(=O)NH₂ y -(CH₂)_mC(=O)OH, donde m es
 40 un número entero de 0 a 2; y
 R₅, R₆ y R₇ son independientemente alquilo C₁₀-C₁₂ alquilo, o

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 **[0060]** En algunas realizaciones, al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es -C(=O)R₈, donde R₈ es alquilo C₅ de cadena lineal completamente saturada. En algunas realizaciones, R₅, R₆ y R₇ son cada uno alquilo C₁₀-C₁₂ de cadena lineal completamente saturada.

10 **[0061]** En algunas realizaciones, n es 1. En algunas realizaciones, X₁ y X₂ son cada uno O. En algunas realizaciones, R₄ es -C(=O)OH. En algunas realizaciones, R₁, R₂ y R₃ son cada uno acilo C₂-C₇.

15 **[0062]** En algunas realizaciones, el compuesto es CRX-526, es decir, el compuesto de fórmula (I) donde n es 1; X₁ y X₂ son cada uno O; R₁, R₂ y R₃ son cada uno -C(=O)(CH₂)₄CH₃; R₄ es -C(=O)OH; y R₅, R₆ y R₇ son cada uno -(CH₂)₁₀CH₃, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 **[0063]** La célula de los procedimientos descritos actualmente puede ser cualquier célula adecuada. Entre las células adecuadas se incluyen, pero sin limitaciones, osteoblastos, osteoclastos, condrocitos, adipocitos, fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, células mesenquimales, células hematopoyéticas, células sensoriales, células glandulares endocrinas y exocrinas, células de la glía, neuronas, oligodendrocitos, células sanguíneas, células intestinales, células cerebrales, células cardíacas, células pulmonares, células hepáticas, células renales, células musculares y células pancreáticas. En algunas realizaciones, la célula es una célula eucariota. En algunas realizaciones, la célula es una célula de mamífero. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana.

25 **[0064]** En algunas realizaciones, la célula es una célula endotelial. En algunas realizaciones, la materia descrita actualmente se refiere a la regulación de la permeabilidad de las células endoteliales. Por tanto, en algunas realizaciones, la materia descrita actualmente proporciona un procedimiento de regulación de la permeabilidad de las células endoteliales, donde el procedimiento comprende poner en contacto una célula endotelial con un compuesto de fórmula (I). La regulación de la permeabilidad celular puede dar lugar al mantenimiento de niveles normales del líquido intersticial (y/o líquido alveolar) que rodea a la célula en contacto o a una disminución del líquido intersticial (y/o líquido alveolar). En algunas realizaciones, la regulación de la permeabilidad celular evita un aumento del líquido intersticial o del líquido alveolar que de otra manera se hubiera producido como resultado de una enfermedad o acontecimiento (como infección o una lesión de isquemia reperfusión).

35 **[0065]** En algunas realizaciones, el procedimiento de prevención o reducción del reordenamiento del citoesqueleto de actina previene o reduce la formación de espacios intercelulares entre la célula y una o más células adicionales que rodean a la célula.

40 **[0066]** El reordenamiento del citoesqueleto de actina puede asociarse con edema, incluido edema pulmonar o edema en otros órganos. El edema puede asociarse con inflamación, infección, traumatismo (p. ej., cirugía), inhalación de una toxina, trastorno circulatorio o exposición a altitudes elevadas. En algunas realizaciones, la prevención o reducción del reordenamiento del citoesqueleto de actina comprende prevenir o reducir el reordenamiento del citoesqueleto de actina que se asocia con una afección caracterizada por un aumento de la permeabilidad endotelial. En algunas realizaciones, el edema que se va a prevenir o reducir se asocia con isquemia reperfusión, como ocurre durante el trasplante de órganos, la embolectomía pulmonar (eliminación de sangre coagulada de las arterias pulmonares) o la tromboendarterectomía pulmonar (eliminación quirúrgica de un coágulo organizado y fibrina de la vasculatura pulmonar).

50 **[0067]** En algunas realizaciones, la célula se pone en contacto con una cantidad eficaz del compuesto de fórmula (I) antes de un acontecimiento isquémico o de isquemia reperfusión simulado o previsto (p. ej., extracción de tejido para trasplante de órganos, trasplante de tejidos, cardioplegia, aplicación de un torniquete, etc.) para evitar o reducir el reordenamiento del citoesqueleto de actina durante la isquemia o reperfusión posterior. En algunas realizaciones, la célula puede ponerse en contacto con el compuesto de fórmula (I) durante la isquemia. En algunas realizaciones, la célula puede ponerse en contacto con el compuesto de fórmula (I) tras un intervalo de isquemia (p. ej., durante la reperfusión).

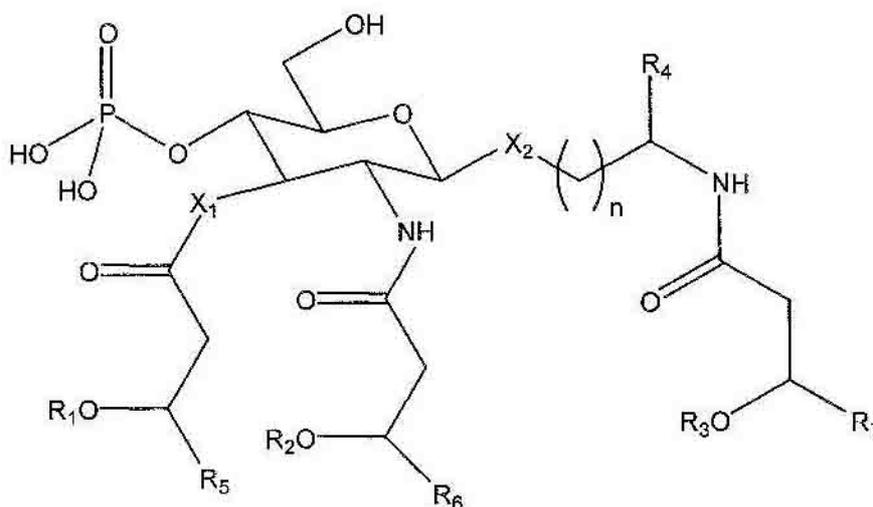
55 **[0068]** En algunas realizaciones, el acontecimiento de isquemia reperfusión está relacionado con el infarto de miocardio o el ictus. En algunas realizaciones, el acontecimiento de isquemia reperfusión está relacionado con la cardioplegia (es decir, cuando se detiene intencionadamente la actividad cardíaca) durante la cirugía cardíaca o con la isquemia en el músculo esquelético como resultado de una cirugía ortopédica (p. ej., cuando se aplica un

torniquete a una pierna para reducir la sangre en el campo quirúrgico).

[0069] En algunas realizaciones, la materia descrita actualmente se refiere a procedimientos *in vitro* o *ex vivo* donde la célula no se localiza en un organismo vivo. Por ejemplo, la célula puede estar presente en un cultivo celular o en un tejido u órgano *ex vivo*. En algunas realizaciones, estos procedimientos *in vitro* o *ex vivo* pueden usarse para determinar la capacidad relativa de los compuestos para prevenir o reducir el reordenamiento del citoesqueleto de actina o determinar la dosis de un compuesto en particular en un tipo de células en particular. En algunas células, puede usarse un procedimiento *ex vivo* para tratar una célula presente en un tejido u órgano destinado al trasplante.

10 V. Procedimientos de prevención o reducción del reordenamiento del citoesqueleto de actina en un sujeto

[0070] En algunas realizaciones, la célula está presente en un organismo vivo. Por tanto, en algunas realizaciones, la materia descrita actualmente proporciona un procedimiento de prevención o reducción del reordenamiento del citoesqueleto de actina en una o más células de un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I):



donde:

- 20 n es un número entero de 1 a 6;
 X₁ es O o S;
 X₂ es O o S;
 R₁, R₂ y R₃ son independientemente acilo C₂-C₁₆;
 25 R₄ se selecciona a partir del grupo compuesto por H, hidroxilalquilo, -C(=O)NH₂ y -(CH₂)_mC(=O)OH, donde m es un número entero de 0 a 2; y
 R₅, R₆ y R₇ son independientemente alquilo C₁₀-C₁₂, o

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 **[0071]** En algunas realizaciones, al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es -C(=O)R₈, donde R₈ es alquilo C₅ de cadena lineal completamente saturada. En algunas realizaciones, R₅, R₆ y R₇ son cada uno alquilo C₁₀-C₁₂ de cadena lineal completamente saturada.

35 **[0072]** En algunas realizaciones, n es 1. En algunas realizaciones, X₁ y X₂ son cada uno O. En algunas realizaciones, R₄ es -C(=O)OH. En algunas realizaciones, R₁, R₂ y R₃ son cada uno acilo C₂-C₇.

[0073] En algunas realizaciones, el compuesto es CRX-526, es decir, el compuesto de fórmula (I) donde n es 1; X₁ y X₂ son cada uno O; R₁, R₂ y R₃ son cada uno -C(=O)(CH₂)₄CH₃; R₄ es -C(=O)OH; y R₅, R₆ y R₇ son cada uno

-(CH₂)₁₀CH₃, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 **[0074]** En algunas realizaciones, la prevención o reducción del reordenamiento del citoesqueleto de actina en una o más células del sujeto previene o alivia una enfermedad o afección asociada con un aumento del reordenamiento del citoesqueleto de actina, o un síntoma del mismo, en el sujeto. La enfermedad o afección puede ser cualquier enfermedad o afección caracterizada por edema. En algunas realizaciones, el edema se asocia con aumento de la permeabilidad de las células endoteliales. Por ejemplo, la enfermedad o afección es SDRA o SRIS.

10 **[0075]** En algunas realizaciones, la enfermedad o afección se asocia con LIR. Por consiguiente, la enfermedad o afección puede estar relacionada con una LIR asociada con el trasplante de órganos o tejidos (incluido xenotrasplante o autotrasplante), cardioplegia, infarto de miocardio, ictus, cirugía ortopédica programada, cirugías hepáticas que conlleven maniobra de Pringle u otras cirugías en las que se limita el flujo sanguíneo a un tejido. En algunas realizaciones, la afección puede estar relacionada con una LIR asociada con el trasplante pulmonar.

15 **[0076]** La administración del compuesto de fórmula (I) puede realizarse a través de cualquier vía adecuada (es decir, oral, intravenosa, parenteral, a través de las vías respiratorias, etc.). El contacto puede tener lugar antes de un acontecimiento isquémico, durante la isquemia o tras un intervalo de isquemia (p. ej., durante la reperfusión).

20 **[0077]** En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano. En algunas realizaciones, la célula o células están presentes en un órgano o tejido seleccionado a partir del grupo que incluye, pero sin limitaciones, un riñón o parte del mismo, un hígado o parte del mismo, un corazón o parte del mismo, una retina, un páncreas o parte del mismo, un intestino o parte del mismo, tejido cerebral, músculo esquelético o un pulmón o parte del mismo.

25 VI. Composiciones farmacéuticas

[0078] Según se usa en este documento el término "compuesto activo" se refiere a cualquier compuesto que puede inhibir el reordenamiento del citoesqueleto y/o la formación de espacios intercelulares. En particular, el término se refiere a compuestos de fórmula (I) y a sus sales. El compuesto activo puede ponerse en contacto con la célula o administrarse al sujeto mediante cualquier técnica adecuada. Según se usa en este documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto activo o compuestos activos que son capaces de inhibir o prevenir diversas afecciones patológicas y sus secuelas, descritas en este documento. Los términos "inhibe" o "inhibiendo" se refieren a prohibir, prevenir, tratar, aliviar, mejorar, detener, restringir, reducir, ralentizar o revertir la progresión, o reducir la gravedad de la enfermedad, como, sin limitaciones, una afección relacionada o resultante de un daño tisular (p. ej., daño del tejido pulmonar) en sujetos que están en riesgo de enfermedades o afecciones relacionadas con el aumento del reordenamiento del citoesqueleto. Como tal, los procedimientos descritos actualmente de administración de compuestos activos incluyen tanto administración médica terapéutica (aguda) como profiláctica (prevención), si procede.

40 **[0079]** La cantidad y momento de aplicación del compuesto activo administrado puede, por supuesto, depender del sujeto que se va a tratar, la gravedad de la afección, la forma de administración y el criterio del médico que prescribe la dosis. Por tanto, debido a la variabilidad entre sujetos, las dosis proporcionada a continuación supone una directriz y el médico puede titular la dosis del compuesto para conseguir el tratamiento que el médico considere apropiado para el sujeto. Considerando el grado de tratamiento deseado, el médico puede balancear diversos factores como la edad del sujeto, la presencia de enfermedad preexistente así como la presencia de otras enfermedades. Las formulaciones farmacéuticas pueden prepararse para su administración oral, intravenosa o aerosol como se describe a continuación con mayor detalle.

50 **[0080]** La administración terapéuticamente eficaz de cualquier compuesto activo específico, cuyo uso está dentro del alcance de las realizaciones descritas en el presente documento, puede variar algo de un compuesto a otro, y entre sujetos, y puede depender de la afección del sujeto y la vía de administración. Como propuesta general, una dosis de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg puede tener eficacia terapéutica, calculándose todos los pesos en función del peso del compuesto activo, incluidos los casos donde se emplea una sal. Los problemas de toxicidad al nivel más alto pueden limitar la administración intravenosa a un nivel menor, como hasta aproximadamente 10 mg/kg, calculándose todos los pesos en función del peso de la base activa, incluidos los casos donde se emplea una sal. Puede emplearse una dosis de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg para su administración oral. Típicamente, puede emplearse una dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg a 5 mg/kg para su inyección intramuscular. En algunas realizaciones, la dosis puede ser de aproximadamente 1 μmol/kg a

aproximadamente 50 $\mu\text{mol/kg}$, u, opcionalmente, entre aproximadamente 22 $\mu\text{mol/kg}$ y aproximadamente 33 $\mu\text{mol/kg}$ del compuesto para su administración intravenosa u oral.

5 **[0081]** Los ensayos *in vitro* e *in vivo* descritos en este documento proporcionan una técnica donde pueden compararse las actividades de los compuestos. Los resultados de estas comparaciones son útiles para determinar los niveles de dosis en mamíferos, incluidos humanos, para inducir la protección frente al reordenamiento del citoesqueleto de actina. Estos ensayos proporcionan la comparación de las actividades de los compuestos de fórmula I y otros compuestos. Los resultados de estas comparaciones son útiles para determinar dichos niveles de dosis.

10 **[0082]** De acuerdo con los procedimientos descritos actualmente, los compuestos farmacéuticamente activos como se describe en el presente documento se pueden administrar por vía oral como un sólido o como un líquido, o pueden administrarse por vía intramuscular, por vía intravenosa o a través de las vías respiratorias (por ejemplo, mediante inhalación) como una solución, suspensión o emulsión. En algunas realizaciones, los compuestos o sales
15 también pueden administrarse mediante inhalación, por vía intravenosa o intramuscular como una suspensión de liposomas. Cuando se administración mediante inhalación, el compuesto activo o su sal puede estar en forma de diversas partículas sólidas o gotitas con un tamaño de partícula de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 micrómetros, y opcionalmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 micrómetros.

20 **[0083]** Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender un compuesto activo descrito en este documento o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable. Si se desea una solución, el agua es el vehículo de elección con respecto a compuestos o sales solubles en agua. Con respecto a los compuestos o sales solubles en agua, puede ser adecuado un vehículo orgánico, como glicerol, propilénglicol, polietilénglicol o mezclas de los mismos. En este último caso, el vehículo orgánico puede contener
25 una cantidad sustancial de agua. En cualquiera de los casos, la solución puede esterilizarse a continuación de una forma adecuada conocida por los expertos en la materia y, típicamente, mediante filtración a través de un filtro de 0,22 micrómetros. Después de la esterilización, la solución puede dispensarse dentro de recipientes adecuados, como viales de vidrio despirogenizados. La dispensación se realiza opcionalmente mediante un procedimiento aséptico. A continuación pueden colocarse cierres esterilizados en los viales y, si se desea, pueden liofilizarse los
30 contenidos de los viales.

[0084] Además de los compuestos activos o sus sales (p. ej., los compuestos de fórmula (I)), las formulaciones farmacéuticas pueden contener otros aditivos, como aditivos para ajustar el pH. En particular, entre los agentes para ajustar el pH se incluyen ácidos, como el ácido clorhídrico, bases o tampones, como lactato sódico, acetato sódico, fosfato sódico, citrato sódico, borato sódico o gluconato sódico. Adicionalmente, las formulaciones
35 pueden contener conservantes antimicrobianos. Entre los conservantes antimicrobianos útiles se incluyen metilparabeno, propilparabeno y alcohol bencílico. El conservante antimicrobiano se emplea típicamente cuando la formulación se coloca en un vial designado para uso como multidosis. Las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento pueden liofilizarse usando técnicas bien conocidas en la materia.

40 **[0085]** Para su administración oral, una composición farmacéutica puede tomar forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos y similares. Los comprimidos que contienen diversos excipientes como citrato sódico, carbonato cálcico y fosfato cálcico se emplean junto con diversos desintegrantes como almidón (p. ej., almidón de patata o tapioca) y determinados silicatos complejos, junto con agentes de unión
45 como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina y goma de acacia. Adicionalmente, los agentes lubricantes como el estearato de magnesio, dodecil sulfato sódico y calco a menudo son muy útiles para los objetivos de formación de comprimidos. Las composiciones sólidas de tipo similar también se emplean como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras. Entre los materiales en conexión con esto también se incluyen lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se desean suspensiones y/o elixires acuosos para
50 administración oral, los compuestos de la materia descrita actualmente pueden combinarse con diversos agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes, agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión, así como diluyentes como agua, etanol, propilénglicol, glicerina y diversas combinaciones de los mismos.

[0086] Aún en otra realización de la materia descrita en este documento, se proporciona una formulación
55 inyectable, estable y estéril que comprende un compuesto activo como se describe en este documento, o una sal del mismo, en una forma de unidad de dosis en un recipiente sellado. El compuesto o sal se proporciona en forma de un liofilizado, que es capaz de reconstituirse con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para formar una formulación líquida adecuada para su inyección a un sujeto. Cuando el compuesto o sal es sustancialmente insoluble en agua, puede emplearse una cantidad suficiente de agente emulsionante, que sea fisiológicamente

aceptable, en una cantidad suficiente para emulsionar el compuesto o sal en un vehículo acuoso. Entre los agentes emulsionantes especialmente útiles se incluyen fosfatidilcolinas y lecitina.

[0087] Realizaciones adicionales proporcionadas en este documento incluyen formulaciones de liposomas de los compuestos activos descritos en este documento. La tecnología para formar suspensiones de liposomas es bien conocida en la materia. Cuando el compuesto es una sal soluble en agua, usando tecnología convencional de liposomas, la misma puede incorporarse dentro de vehículos lipídicos. En tal caso, debido a la solubilidad en agua del compuesto activo, dicho compuesto activo puede ser arrastrado sustancialmente dentro del centro o núcleo hidrófilo de los liposomas. La capa lipídica empleada puede ser de cualquier composición convencional y puede contener colesterol o no contenerlo. Cuando el compuesto activo de interés es insoluble en agua, empleando de nuevo tecnología de formación de liposomas convencional, la sal puede ser arrastrada sustancialmente dentro de la bicapa lipídica hidrófoba que forma la estructura del liposoma. En cualquier caso, los liposomas que se producen pueden tener un tamaño reducido, como los que se obtienen mediante el uso de técnicas de sonicación y homogeneización convencionales. Las formulaciones de liposomas que comprenden los compuestos activos descritos en este documento pueden liofilizarse para obtener un liofilizado, que puede reconstituirse con un vehículo farmacéuticamente aceptable, como agua, para regenerar la suspensión de liposomas.

[0088] También se proporcionan formulaciones farmacéuticas que son adecuadas para su administración como aerosol mediante inhalación. Estas formulaciones comprenden una solución o suspensión de un compuesto deseado descrito en este documento o una sal del mismo, o una gran variedad de partículas sólidas del compuesto o la sal. La formulación deseada puede colocarse en una cámara pequeña y nebulizarse. La nebulización puede conseguirse mediante aire comprimido o mediante energía ultrasónica para formar una gran cantidad de gotitas líquidas o partículas sólidas que comprenden los compuestos o sus sales. Las gotitas líquidas o partículas sólidas deben tener un tamaño de partícula en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 micrómetros y, opcionalmente, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 micrómetros. Las partículas sólidas pueden obtenerse mediante el procesamiento del compuesto sólido o su sal, en cualquier manera apropiada conocida en la materia, como mediante micronización. Opcionalmente, el tamaño de las partículas sólidas o las gotitas puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 micrómetros. A este respecto, hay disponibles nebulizadores comerciales para conseguir este objetivo. Los compuestos pueden administrarse mediante una suspensión en aerosol de partículas respirables en la forma establecida en la patente de EE. UU. N.º 5 628 984, cuya descripción se incorpora en su totalidad en este documento por referencia.

[0089] Cuando la formulación farmacéutica adecuada para su administración como aerosol está en forma líquida, dicha formulación puede comprender un compuesto activo soluble en agua en un vehículo que comprenda agua. Puede estar presente un tensioactivo que reduce la tensión superficial de la formulación lo suficiente para que se produzca la formación de gotitas dentro del intervalo de tamaño deseado cuando se somete a nebulización.

[0090] Como se ha indicado, se proporcionan compuestos activos tanto solubles en agua como insolubles. Según se usa en este documento, el término "soluble en agua" pretende definir cualquier composición que es soluble en agua en una cantidad de aproximadamente 50 mg/ml o superior. También, como se usa en este documento, el término "insoluble en agua" pretende definir cualquier composición que tiene una solubilidad en agua de menos de aproximadamente 20 mg/ml. En algunas realizaciones, pueden ser deseables los compuestos o sus sales solubles en agua mientras que en otras realizaciones pueden ser deseables los compuestos o sus sales insolubles en agua.

[0091] En un modo de administración, los compuestos de la materia descrita actualmente pueden administrarse justo antes de una cirugía (p. ej., durante las veinticuatro horas previas a la cirugía, por ejemplo, una cirugía cardíaca o cirugía de trasplante), durante y/o después de la cirugía (p. ej., durante las veinticuatro horas posteriores a la cirugía) cuando existe riesgo de isquemia. En otro modo de administración, los compuestos activos se administran con una dosis de carga inicial (p. ej., inyección en bolo o infusión) previa a la cirugía seguido de una infusión constante previa, durante o después de la cirugía. Los compuestos activos también pueden administrarse en modo diario prolongado.

[0092] Los procedimientos de preparación de diversas composiciones farmacéuticas y con determinadas cantidades de compuesto activo son conocidos, o pueden determinarse, a la vista de esta memoria descriptiva, por los expertos en la materia. Para obtener ejemplos de procedimientos de preparación de composiciones farmacéuticas, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easter, Pa., 16ª Edición (1980). Las composiciones farmacéuticas según la materia descrita actualmente pueden contener, por ejemplo, del 0,0001% al 95% de los compuestos activos. En cualquier caso, la composición o formulación que se va a administrar

puede contener una cantidad de compuestos activos en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad/afección del sujeto que está siendo tratado.

[0093] En algunas realizaciones, los procedimientos de la materia descrita actualmente pueden usarse para prevenir o reducir el reordenamiento del citoesqueleto de actina y/o la formación de espacios intercelulares en tejidos u órganos extracorpóreos o en tejidos u órganos que se han trasplantado de un donante de tejido u órgano a un receptor del trasplante. Los tejidos u órganos extracorpóreos son tejidos u órganos que no están en un individuo (también denominados *ex vivo*). Para el trasplante de tejidos y órganos, los tejidos y órganos del donante extraídos también son susceptibles de lesión por reperfusión durante su recogida, durante el transporte y tras el trasplante en un receptor. Los procedimientos descritos actualmente pueden usarse para aumentar la viabilidad de un tejido u órgano trasplantable, por ejemplo, suplementando soluciones utilizadas para mantener o conservar los tejidos u órganos trasplantables. Por ejemplo, los procedimientos y composiciones pueden usarse para cubrir el tejido u órgano trasplantable durante el transporte o puede ponerse en contacto con el tejido u órgano trasplantable antes, durante o después del trasplante. En algunas realizaciones, las formulaciones de la materia descrita actualmente pueden ponerse en contacto con un tejido u órgano mientras que el tejido u órgano está presente en el donante.

[0094] Las soluciones de la materia descrita actualmente puede usarse en dispositivos para perfusión (p. ej., circuitos de perfusión *ex vivo*). Un dispositivo para perfusión según se usa en este documento es cualquier dispositivo mecánico que puede usarse para infundir un órgano específico o la circulación sistémica con una solución que comprende un compuesto o composición. Este dispositivo puede contener uno o más depósitos. El dispositivo puede incluir un tubo, catéter o cánula que sale desde el depósito y puede insertarse en un órgano, vena o arteria. El dispositivo puede ser un dispositivo electromecánico con bombas eléctricas y dispositivos para controlar la temperatura, velocidad o volumen de administración de la solución. En determinadas realizaciones, el dispositivo es programable de modo que las una o más soluciones se administran a una temperatura, velocidad o volumen apropiados para una situación clínica, peso del órgano o tamaño del órgano (p. ej., cirugía de derivación cardiopulmonar frente a trasplante renal frente a trasplante hepático) en particular.

VII. Sujetos

[0095] En algunas realizaciones, el sujeto tratado con la materia descrita actualmente es deseablemente un ser humano, aunque se entenderá que los procedimientos descritos en este documento son eficaces con respecto a todas las especies de vertebrados, que se pretende estén incluidos en el término "sujeto". Los procedimientos descritos en este documento son especialmente útiles en el tratamiento y/o prevención del reordenamiento del citoesqueleto de actina en células de vertebrados de sangre caliente. Por tanto, los procedimientos pueden usarse como tratamiento para mamíferos y pájaros. En algunas realizaciones, el sujeto del procedimiento descrito actualmente es el receptor de un trasplante de órgano.

[0096] Más especialmente, en este documento se proporciona el tratamiento de mamíferos, como humanos, así como aquellos mamíferos importantes debido al peligro de extinción (como los tigres siberianos), de importancia económica (animales criados en granjas para el consumo humano) y/o de importancia social (animales utilizados como mascotas o mantenidos en zoológicos) para humanos, por ejemplo, carnívoros distintos a los humanos (como gatos y perros), porcinos (cerdos, puercos y jabalíes), ruminantes (como vacas, bueyes, ovejas, jirafas, ciervos, cabras, bisontes y camellos) y caballos. También se proporciona en este documento el tratamiento para pájaros, que incluyen el tratamiento de aquellos tipos de pájaros que están en peligro de extinción, que viven en zoológicos o se utilizan como mascotas, así como aves de corral, y más especialmente, aves de corral domesticadas, es decir, gallináceas, como pavos, pollos, patos, gansos, pintadas, y similares, ya que también tienen importancia económica para los humanos. Por tanto, las realizaciones de los procedimientos descritos en este documento incluyen el tratamiento del ganado, incluyendo, pero sin limitaciones, cerdos domesticados (cerdos y puercos), ruminantes, caballos, aves de corral, y similares.

EJEMPLOS

[0097] Los ejemplos siguientes proporcionan realizaciones ilustrativas. A la vista de la presente descripción y el nivel general de destreza en la técnica, los expertos pueden apreciar que los siguientes ejemplos pretenden ser tan solo eso y que pueden emplearse numerosos cambios, modificaciones y alteraciones sin apartarse del alcance de la materia descrita actualmente.

EJEMPLO 1

Procedimientos generales*Modelo de cultivo celular de LIR caliente de pulmón*

5 **[0098]** Se desarrolló un modelo normotérmico (37 °C) de LIR *in vitro* en el que se empleó la depleción de nutrientes en oxígeno al 100% para reproducir la isquemia, con la reperfusión reproducida suplementando medio recién preparado a placas de cultivo en recipientes de PLEXIGLAS® sellados. Las células endoteliales microvasculares pulmonares humanas (HMVEC) (Cambrex Bio Science, Walkersville, Maryland, Estados Unidos de América) mantenidas en CLONETICS® EGM-2MV BULLETKITS® (Cambrex Bio Science, Walkersville, Maryland, Estados Unidos de América), a 37°C en un incubador humidificado en CO₂ al 5% se sembraron a 2000 células/cm² en placas con base de vidrio de 30 mm de diámetro recubiertas de colágeno (Mattek Corp., Ashland, Massachusetts, Estados Unidos de América) y se crecieron hasta una confluencia del 100 %. Los recipientes de PLEXIGLAS® sellados que alojaban las placas de cultivo a 37°C se airearon con O₂ al 95 %/CO₂ al 5 %. Para reproducir la isquemia caliente (IC), el medio celular se sustituyó súbitamente por 2 ml de lactato de Ringer de grado clínico sin nutrientes y libre de pirógenos. Las placas se trataron previamente con CRX-526 a 1 µg/ml (GlaxoSmithKline, Duluth, Minnesota, Estados Unidos de América) o vehículo (glicerina al 2 %), durante una hora antes de la IC. CRX-526 o el vehículo se añadieron siempre que se cambió el medio. Tras una hora de IC simulada, el lactato de Ringer se sustituyó por medio EGM2-MV libre de pirógenos para simular la reperfusión, ventilando la cámara con CO₂ 5% en aire ambiente. Se retiraron placas por triplicado durante la IC y la reperfusión que se fijaron inmediatamente con paraformaldehído al 4 % para realizar la tinción con faloidina. Sirvieron de controles las células con inhibidor o vehículo mantenidas en medio EGM2-MV a 37 °C en el incubador humidificado con CO₂ al 5 %. El medio de cultivo se cambió al mismo tiempo que en las placas del experimento. Se insertaron sondas a través de puertos sellados para registrar de forma continua la temperatura y el pH en una placa representativa en la caja de PLEXIGLAS® usando voltímetros y registrando los datos de salida con el software PicoRecorded (Pico Technology, St. Neots, Reino Unido).

Tinción con faloidina y análisis de las imágenes

30 **[0099]** Las HMVEC se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con PBS. Las células se incubaron durante 1 hora con una dilución 1/100 de faloidina ALEXAFLO® 568 (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos de América) en PBS con BSA al 1 % y Tween-20 al 0,05 %. Las placas teñidas para actina F se examinaron inmediatamente en un microscopio invertido de fluorescencia/DIC DMIRB de Leica (Leica Microsystems, Inc., Bannockburn, Illinois, Estados Unidos de América) a 20 y 40 aumentos para evaluar los cambios en la forma celular y en el citoesqueleto de actina F. Para cada placa, se obtuvieron tres fotografías de campos contiguos próximos al centro de la placa a 40 aumentos con una cámara digital Kodak (Rochester, Nueva York, Estados Unidos de América) con el mismo tiempo de exposición. Un observador que desconocía el experimento evaluó el patrón de fibras de tensión de actina de cada célula como normal o anómalo. El análisis cuantitativo de la zona de espacios se realizó mediante el software METAMORPH® (MDS Analytical Technologies, Inc., Sunnyvale, California, Estados Unidos de América).

Determinación de la viabilidad en experimentos de cultivos celulares

45 **[0100]** En experimentos independientes realizados por triplicado, las células HMVEC crecidas hasta la confluencia en placas P35 se sometieron a LIR simulada. En los mismos puntos temporales, se evaluó la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en las células y medios de cultivo celular o lactato de Ringer usando el ensayo de citotoxicidad no radiactivo Cyto Tox96 (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos de América) siguiendo las instrucciones del fabricante. También se tomaron muestras control a tiempo cero y a las 24 horas para evaluar la viabilidad celular aparte del modelo experimental. Se usaron el medio de cultivo y lactato de Ringer como controles del fondo para normalizar el valor de absorbancia con respecto a las otras muestras. La citotoxicidad se calculó como la media de la actividad LDH dividida por la actividad LDH total (sedimento celular más medio). La viabilidad era la inversa y se expresaba como porcentaje de viabilidad en cada punto temporal.

Análisis estadístico

55 **[0101]** Todos los datos se notificaron como la media ± ETM. Los grupos se compararon mediante el análisis ANOVA con una prueba Turkey *a posteriori* usando STATISTICA® (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos de América) o mediante pruebas t pareadas o no pareadas.

EJEMPLO 2

CRX-526 previene el reordenamiento del citoesqueleto de actina relacionado con la isquemia caliente simulada y la formación de espacios en la monocapa endotelial

- 5 **[0102]** Se uso un modelo de isquemia *in vitro* para explorar la inhibición del reordenamiento del citoesqueleto, centrándose en las células endoteliales microvasculares pulmonares. Estudios previos relacionados con la isquemia mostraron un aumento significativo en el coeficiente de filtración y en la relación del peso húmedo/seco de los pulmones de las ratas tras una hora de isquemia, que se atribuyó a la disfunción endotelial (véase Jones y col., J. Appl. Physiol. 83, 247-252 (1997), aunque la alteración del aclaramiento pulmonar de líquidos también puede contribuir al edema pulmonar. Véase Matthay y col., Proc. Am. Thorac. Soc., 2(3), 206-213 (2005). En otros estudios previos se había empleado hipoxia-reoxigenación en modelos de cultivo celular de LIR. Véase Powell y Jackson, Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 285(1), L189-198 (2003) y Zhang, y col., J. Biol. Chem., 278(2), 1248-1258 (2003). No obstante, se observó acidosis pulmonar a pH 6,8 en los pulmones de ratas dejados *in situ* a 37 °C durante 1 hora tras parada cardíaca sin hipoxia significativa. Véase Koukoulis y col., J. Heart Lung Transplant, 15 24(12), 2218-2225 (2005). De este modo, no parece que la hipoxia sea una característica general de la isquemia pulmonar, especialmente en pulmones inflados con oxígeno al 100%. Por tanto se considera que el modelo *in vitro* descrito actualmente refleja con precisión los acontecimientos *in vivo*, aunque la depleción de nutrientes y el desarrollo de acidosis sería más gradual *in vivo*.
- 20 **[0103]** Como se describió en el ejemplo 1, las células HMVEC crecidas hasta la confluencia en placas P30 con portaobjetos integrales se incubaron con CRX-526 a 1 µg/ml o vehículo y se ventiló en O₂ al 95%/CO₂ 5%. El medio se sustituyó por lactato de Ringer templado (37 °C) y se ventiló con O₂ al 100% para estimular la isquemia caliente. Una hora después, se sustituyó el lactato de Ringer por medio de cultivo celular templado y las cámaras se ventilaron con aire ambiente al 95%/CO₂ al 5% para estimular la reperfusión. Durante la isquemia caliente simulada, 25 las fibras de tensión de actina desaparecían o se hacían más periféricas en las células (véanse las flechas sombreadas de la figura 1A), asociado con la formación de espacios en la monocapa endotelial (véanse las flechas blancas de la figura 1A). Cuatro horas después de la reperfusión simulada (240 min rep) y 24 horas después de la reperfusión simulada (no mostrado), las monocapas eran confluentes y el patrón del citoesqueleto de actina era similar a los controles.
- 30 **[0104]** En presencia de CRX-526, el área de espacios en la monocapa se redujo significativamente durante la isquemia y las monocapas recuperaban la confluencia más rápidamente tras la reperfusión simulada. Véase la figura 1 B. El porcentaje de células con el citoesqueleto de actina alterado también disminuyó en las monocapas tratadas con CRX-526. Como se indica en la figura 1C, aproximadamente el 40% de las células tiene cierto grado de 35 orientación periférica del citoesqueleto de actina en las placas control recién preparadas. La orientación periférica de la actina se reducía significativamente en presencia de CRX-526 después de 60 minutos de IC y tras 15 minutos de reperfusión simulada (rep) en comparación con monocapas expuestas al vehículo. La viabilidad celular, cuantificada mediante el ensayo de LDH, era equivalente en los grupos controles y tratados en todos los puntos temporales.
- 40 **[0105]** La sustitución del medio con lactato de Ringer da lugar al descenso súbito del pH de 7,2 a 6,5, que revierte cuando se sustituye el medio. Para abordar si la formación de espacios en las monocapas de células endoteliales era debida exclusivamente a los cambios en el pH, se realizaron experimentos en los que se alteró el pH del medio de cultivo celular durante una hora, mediante aireación de la cámara con CO₂ al 10% (pH 6,8) o mediante la adición de HCl para reducir el pH del medio a 6,5 cuando se ventilaba con O₂ al 100% o a 5,6 cuando se 45 ventilaba con CO₂ al 5%. Los medios alterados se sustituyeron por medio normal para restablecer bruscamente el pH después de una hora. No se observaron cambios aparentes en la integridad de la monocapa cuando solo el pH estaba alterado.

EJEMPLO 3

50 LIR fría simulada

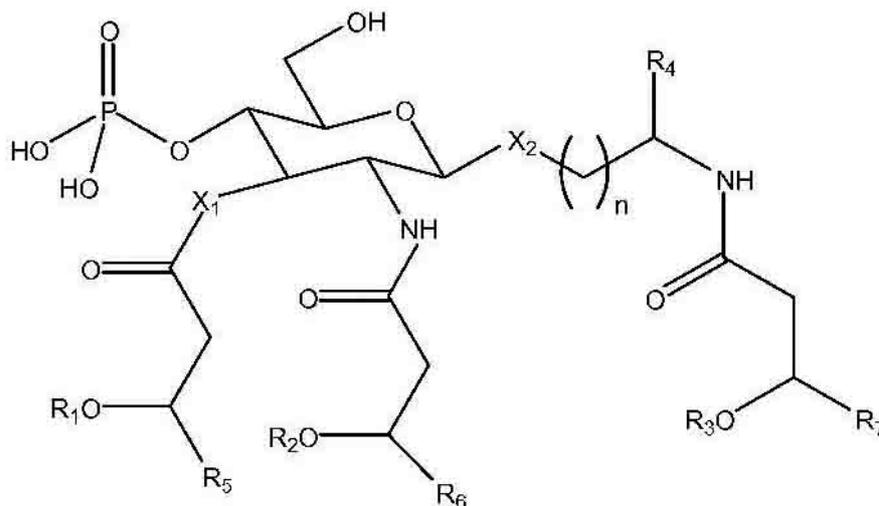
- [0106]** A la vista del sorprendente impacto de CRX-526 sobre el reordenamiento del citoesqueleto de actina y la formación de espacios en las HMVEC sometidas a LIR caliente simulada, descrito anteriormente en el ejemplo 2, 55 los efectos de CRX-526 también se estudiaron en un modelo simulado de LIR fría. En la figura 2A se muestra el efecto de la sustitución del medio de cultivo celular templado por PERFADEX™ (Vitrolife, Kungsbacka, Suecia) fría, la solución de conservación del pulmón más frecuentemente empleada en todo el mundo, sobre las HMVEC. Se necesita aproximadamente una hora por placas de cultivo celular para alcanzar una temperatura de 4°C, por lo que, en la Figura 2A, las fotografías de las células después de 4 horas de "isquemia" fría (IF) representan la aparición de

células cinco horas después de la sustitución de los medios templados por PERFADEX™ (Vitrolife, Kungsbacka, Suecia) frío. Aunque el citoesqueleto de actina está desordenado en todas las placas, los espacios son mucho menos evidentes en las células tratadas con CRX-526. Véase la Figura 2B.

- 5 **[0107]** Se entenderá que diversos detalles de la materia descrita actualmente pueden cambiarse sin alejarse del objetivo de la materia descrita actualmente. Además, la descripción anterior es solo con fines ilustrativos, y no con el fin de limitar la patente.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento realizado durante la isquemia fría para prevenir o reducir la formación de espacios intercelulares en una célula pulmonar en tejidos u órganos extracorpóreos o en tejidos u órganos que están siendo trasplantados a partir de un tejido u órgano donante a un receptor del trasplante, en el que dichos tejidos u órganos no se localizan en un organismo vivo, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la célula, tejido u órgano durante la isquemia fría con una cantidad eficaz de un compuesto representado por la fórmula (I):



10

donde:

n es un número entero de 1 a 6;

X₁ es O o S;

15

X₂ es O o S;

R₁, R₂ y R₃ son independientemente acilo C₂-C₁₆, donde al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es acilo C₂-C₇;

R₄ se selecciona a partir del grupo compuesto por H, hidroxilalquilo, -C(=O)NH₂ y -(CH₂)_mC(=O)OH, donde m es un número entero de 0 a 2; y

R₅, R₆, and R₇ son independientemente alquilo C₁₀-C₁₂, o

20

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que n es 1.

25

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que X₁ y X₂ son cada uno O.

4.

El procedimiento de la reivindicación 1, en el que R₄ es -C(=O)OH.

5.

El procedimiento de la reivindicación 1, en el que R₁, R₂ y R₃ son cada uno acilo C₂-C₇.

30

6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula (I) es un compuesto en el que:

35

n es 1;

X₁ es O;

X₂ es O; R₁, R₂ y R₃ son cada uno -C(=O)(CH₂)₄CH₃;

R₄ es -C(=O)OH; y

R₅, R₆ y R₇ son cada uno -(CH₂)₁₀CH₃, o

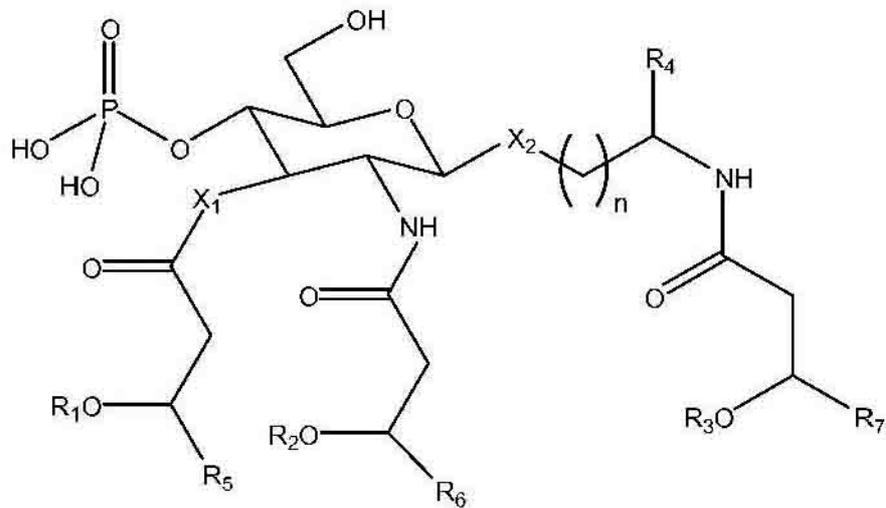
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula es una célula de mamífero, opcionalmente en el que la célula es una célula endotelial.

5

8. Un procedimiento realizado durante la isquemia fría para prevenir o reducir la lesión por isquemia reperfusión previniendo o reduciendo la formación de espacios intercelulares en una célula pulmonar en tejidos u órganos extracorpóreos o en tejidos u órganos que están siendo trasplantados a partir de un tejido u órgano donante a un receptor del trasplante, en el que dichos tejidos u órganos no se localizan en un organismo vivo,

10 comprendiendo el procedimiento poner en contacto la célula, tejido u órgano durante la isquemia fría con una cantidad eficaz de un compuesto representado por la fórmula (I):



15 donde:

n es un número entero de 1 a 6;

X₁ es O o S;

X₂ es O o S;

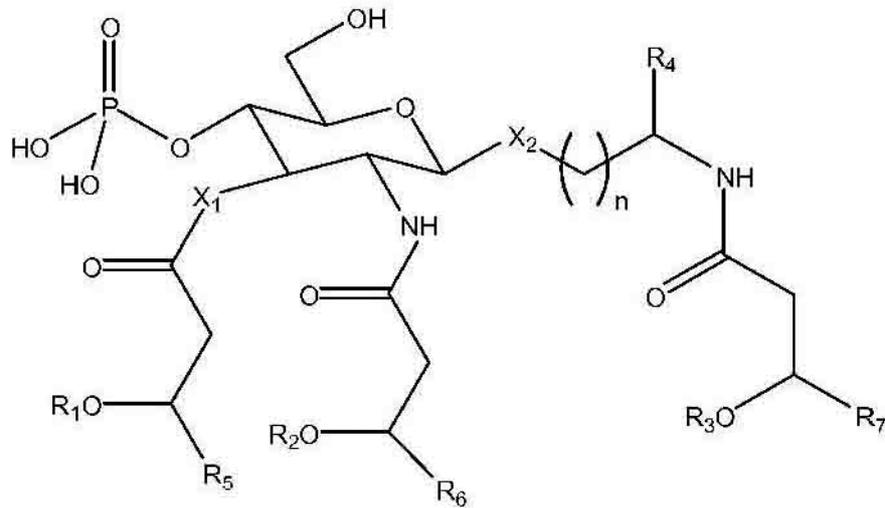
20 R₁, R₂ y R₃ son independientemente acilo C₂-C₁₆, donde al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es acilo C₂-C₇;

R₄ se selecciona a partir del grupo compuesto por H, hidroxilalquilo, -C(=O)NH₂ y -(CH₂)_mC(=O)OH, donde m es un número entero de 0 a 2; y

R₅, R₆ y R₇ son independientemente alquilo C₁₀-C₁₂, o

25 una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. Uso de una cantidad eficaz de un compuesto representado por la fórmula (I):



donde:

- 5 n es un número entero de 1 a 6;
 X₁ es O o S;
 X₂ es O o S;
 R₁, R₂ y R₃ son independientemente acilo C₂-C₁₆, donde al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es acilo C₂-C₇;
 R₄ se selecciona a partir del grupo compuesto por H, hidroxilalquilo, -C(=O)NH₂ y -(CH₂)_mC(=O)OH, donde m es
 10 un número entero de 0 a 2; y
 R₅, R₆, and R₇ son independientemente alquilo C₁₀-C₁₂, o

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la sude soluciones utilizada para mantener o conservar los tejidos pulmonares u órganos pulmonares extracorpóreos trasplantables previniendo o reduciendo la formación de
 15 espacios intercelular.

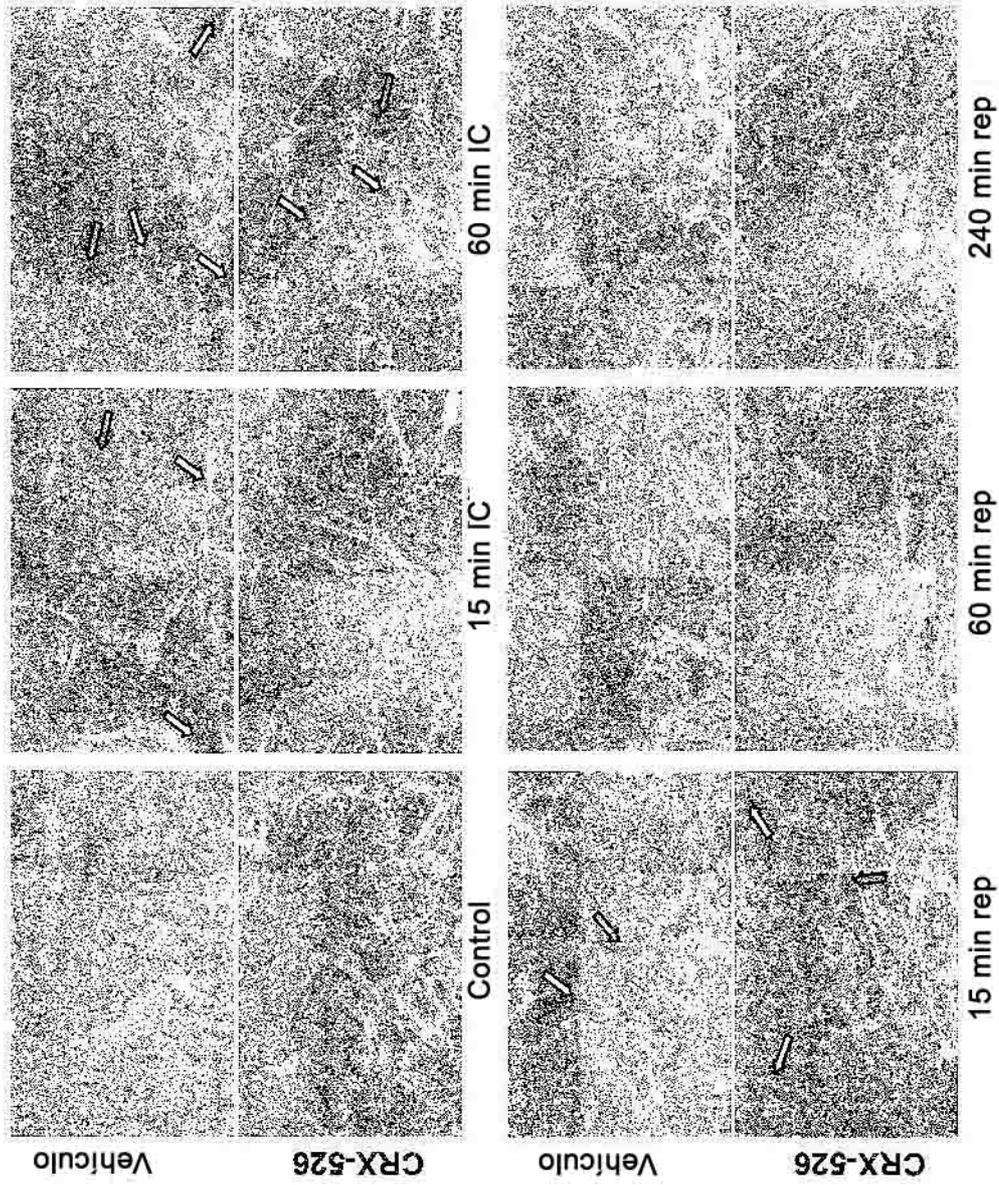


Figura 1A

Figura 1B

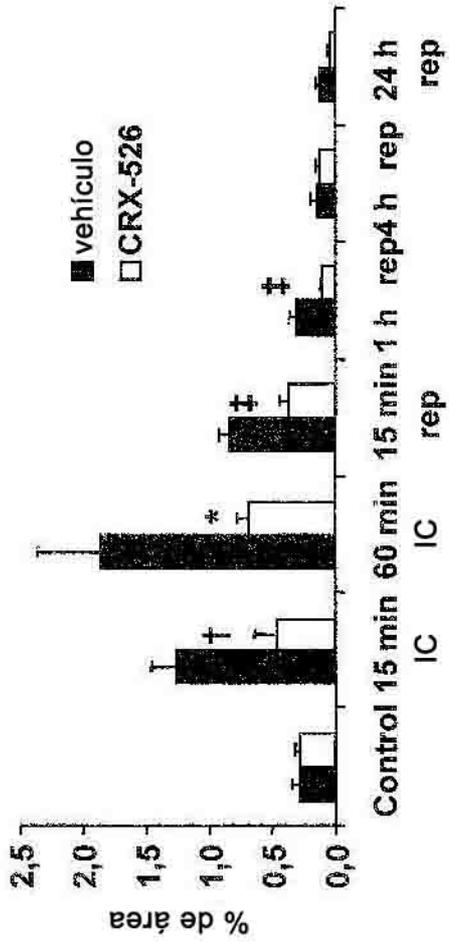
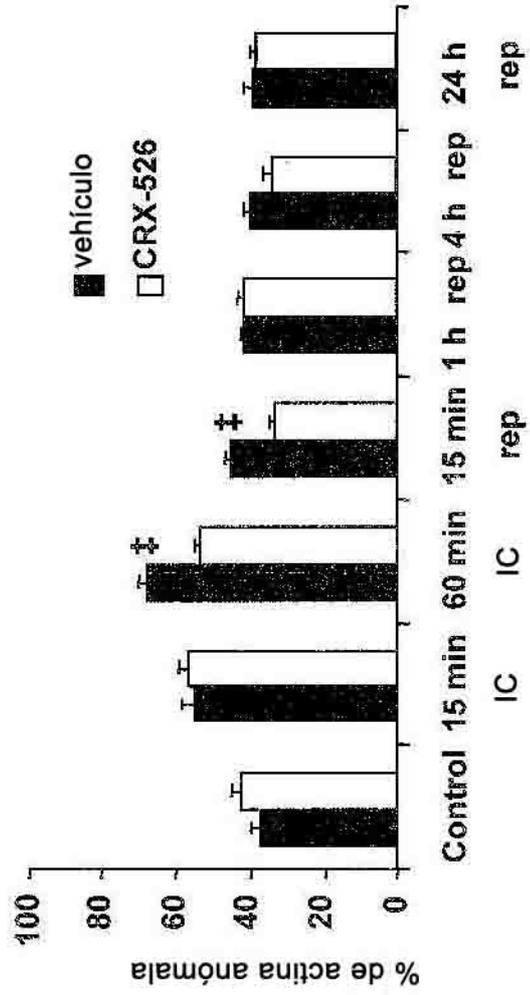


Figura 1C



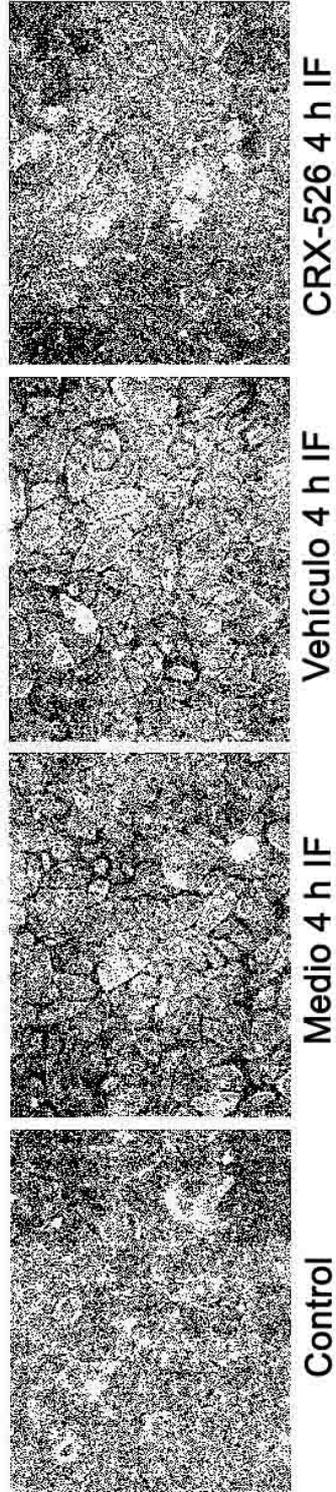


Figura 2A

Fig. 2b

