

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 469**

51 Int. Cl.:

A61K 31/409 (2006.01)
A61K 31/4178 (2006.01)
A61K 31/427 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2009** E 14154916 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016** EP 2732817

54 Título: **Un compuesto para su uso en el tratamiento de lesiones asociadas con la exposición al gas fosgeno o al gas de cloro**

30 Prioridad:

23.05.2008 US 55919 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2017

73 Titular/es:

NATIONAL JEWISH HEALTH (100.0%)
1400 Jackson Street
Denver, CO 80206, US

72 Inventor/es:

DAY, BRIAN J. y
WHITE, CARL W.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 600 469 T3

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

DESCRIPCIÓN

Un compuesto para su uso en el tratamiento de lesiones asociadas con la exposición al gas fosgeno o al gas de cloro

5 La presente invención se refiere a una porfirina sustituida según lo definido en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento de una lesión asociada con la exposición al gas fosgeno o al gas de cloro, o para su uso en la protección de un sujeto de los efectos tóxicos asociados con la exposición al gas fosgeno o al gas de cloro.

10 Antecedentes de la invención

El sulfuro de bis(2-cloroetilo), o mostaza de azufre (SM), se sintetizó por primera vez a finales de 1880, y desde entonces se ha usado como agente de guerra en numerosas ocasiones. La SM se usó por primera vez en la Primera Guerra Mundial, y se ha usado en guerras tan recientes como el conflicto entre Irán e Irak de la década de los 80. 15 Aunque la SM es una menor amenaza en la guerra de lo que lo era antes, todavía supone una amenaza para el personal militar y civil debido a las preocupaciones actuales para su despliegue en un ataque terrorista.

20 Las mostazas de azufre son agentes vesicantes clásicos que afectan principalmente a la piel, a los ojos y al sistema respiratorio. La vigilancia médica de los individuos expuestos al gas mostaza en la década de los 80 ha documentado una serie de afecciones respiratorias, entre las que se incluyen la bronquiolitis obliterante, el asma y la fibrosis pulmonar, que pueden persistir durante todo la vida de las víctimas.

25 En la actualidad, no existe ningún antídoto conocido para el envenenamiento por SM. Tras la exposición, el mejor recurso es la descontaminación y el tratamiento de apoyo. La descontaminación de la piel es relativamente sencilla y beneficiosa, mientras que la exposición interna tal como una inhalación de las mostazas de azufre es mucho más difícil de tratar.

30 Akdur *et al.*, "Toxicology Mechanisms and Methods", 2008, 18, 739-743, investigan los efectos experimentales de la inhalación del gas de cloro en ratas, investigando los efectos de la *N*-acetilcisteína sobre el daño pulmonar. En primer lugar, se administraron 200 ppm de cloro, luego las ratas no de control recibieron 40 mg/kg de *N*-acetilcisteína por vía intraperitoneal. El grado del daño tisular a las 6 h y a las 24 h en las ratas que habían recibido *N*-acetilcisteína fue inferior al del grupo de control.

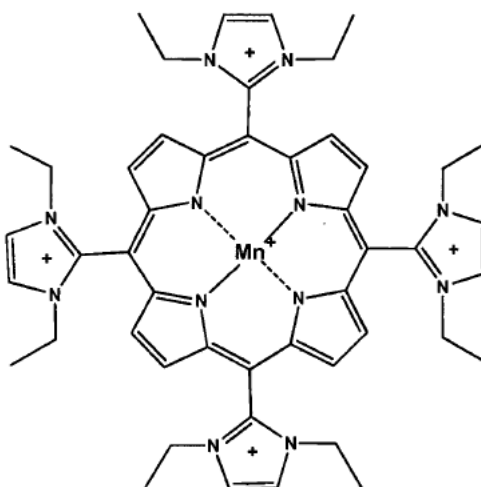
35 El documento WO 00/43395 desvela que se pueden usar porfirinas sustituidas para proteger contra los efectos perjudiciales de los oxidantes, en particular, de los radicales superóxido, del peróxido de hidrógeno y del peroxinitrito, y que dichas porfirinas sustituidas se pueden usar en métodos de tratamiento de enfermedades y trastornos que implican o se producen como consecuencia del estrés oxidativo. También desvela el uso de porfirinas sustituidas para la modulación de los procesos biológicos en los que participan oxidantes.

40 A partir de lo anteriormente expuesto, se puede observar que existe la necesidad de desarrollar agentes que sean capaces de atenuar, prevenir y/o salvar de la lesión de órganos como consecuencia de los efectos perjudiciales resultantes de la exposición a agentes de alquilación (por ejemplo, daño por inhalación) tales como las mostazas de azufre. La invención aborda estas y otras necesidades existentes en la técnica.

45 Breve resumen de la invención

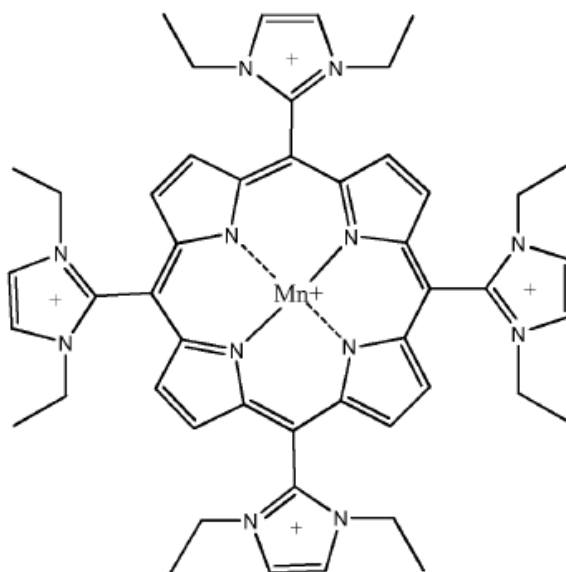
50 En el presente documento, se desvelan, entre otras cosas, métodos para salvar de o prevenir la lesión de órganos tras la exposición a agentes de alquilación mediante el uso de porfirina sustituida como principio activo o protector contra agentes de alquilación. La metodología de la invención se puede poner en práctica de la siguiente manera:

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento de una lesión asociada con la exposición al gas fosgeno o al gas de cloro, o para su uso en la protección de un sujeto de los efectos tóxicos asociados con la exposición al gas fosgeno o al gas de cloro, compuesto que tiene la fórmula:



El compuesto anterior también se conoce como “AEOL 10150”.

- 5 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un uso de un compuesto para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una lesión asociada con la exposición al gas fosgeno o al gas de cloro, o para la protección de un sujeto de los efectos tóxicos asociados con la exposición al gas fosgeno o al gas de cloro, en el que el compuesto tiene la fórmula



- 10 La exposición al gas fosgeno o al gas de cloro puede producir disfunción mitocondrial que, a su vez, puede generar un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno o estrés oxidativo. En particular, la exposición al gas fosgeno o al gas de cloro, con respecto a la no exposición al gas fosgeno o al gas de cloro, provoca un aumento en los niveles de la lactato deshidrogenasa (LDH), un aumento en los niveles de IgM, una disminución de los niveles de glutatión y un aumento en los niveles de la mieloperoxidasa.

- 15 El compuesto se puede administrar mediante administración por inhalación, administración tópica, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intraperitoneal y administración intramuscular. El compuesto se puede administrar al sujeto en el plazo de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 48 horas después de la exposición al gas fosgeno o al gas de cloro. Más concretamente, el compuesto se puede administrar al sujeto en el plazo de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 10 horas después de la exposición al gas fosgeno o al gas de cloro.

- 20 Hay otras características, ventajas y realizaciones adicionales de la divulgación que se pueden establecer o hacer evidentes considerando la siguiente descripción detallada. Por otra parte, se ha de entender que tanto el sumario anterior de la invención como la siguiente descripción detallada son ilustrativos y pretenden proporcionar una explicación adicional. La materia objeto que no está englobada por el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la presente invención reivindicada.

Breve descripción de las figuras

Las figuras adjuntas, que se incluyen para proporcionar una mejor comprensión de la divulgación sirven, junto con la descripción detallada, para explicar los principios de la invención. No pretenden mostrar los detalles estructurales de la invención en mayor profundidad de lo que es necesario para comprender de manera fundamental la invención y los diversos modos en los que se puede poner en práctica.

La Figura 1 muestra las estructuras de sulfuro de bis(2-cloroetilo), conocido como SM, y su sulfuro de cloroetiletilo análogo (CEES).

La Figura 2 es una gráfica que muestra que la exposición a CEES causó una lesión dependiente de la concentración de las células epiteliales de las vías respiratorias humanas. Se cultivaron células 16HBE de pulmón humano hasta aproximadamente el 90 % de confluencia y se trataron con concentraciones de CEES que variaban de 600 a 1000 μM durante 24 h. La viabilidad celular se redujo de una manera dependiente de la dosis según lo medido mediante la cuantificación de la fluorescencia de calceína AM. Los datos se representan como la media \pm ETM, $n = 4$, donde la fluorescencia del grupo de control se definió como el 100 % de viabilidad.

Las Figuras 3A-3C son gráficas que muestran que la exposición a CEES produjo un aumento de los niveles de la disfunción y las ROS mitocondriales. Se trataron células SAE (Grupo A) y células 16HBE (Grupo B) con CEES 900 μM durante 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 h, tras lo que se incubaron las células con la sonda de ROS mitocondriales MitoSOX (Grupo A y Grupo B) durante 1 h. Se incubaron células 16HBE (Grupo C) con el posible indicador Rodamina 123 de la membrana mitocondrial durante 30 min. La fluorescencia de MitoSOX fue proporcional al aumento de las ROS, donde la fluorescencia de la Rodamina 123 fue inversamente proporcional al potencial de la membrana mitocondrial.

La Figura 4 muestra las estructuras químicas de las metaloporfirinas antioxidantes catalíticas ensayadas en ejemplos específicos 1-6 que se presentan más adelante.

La Figura 5 es una gráfica que muestra los efectos protectores de las metaloporfirinas en la lesión celular inducida por CEES. Se cultivaron células 16HBE hasta un 90 % de confluencia y se expusieron a CEES 900 μM durante un total de 24 h. Las células se trataron 1 h después de la exposición inicial a CEES con AEOL 10150, AEOL 10113, AEOL 10303 o MnTBAP a una concentración final de 50 μM en presencia (barras negras) o ausencia (barras blancas) de CEES 900 μM . Los datos se representan como la media \pm ETM, $n = 4$. ***, $p < 0,001$ en comparación con el grupo tratado solo con CEES.

Las Figuras 6A-D son gráficas que muestran el efecto de rescate de AEOL 10150 sobre la muerte celular inducida por CEES. Se expusieron células SAE (Grupo A y Grupo B) y células 16HBE (Grupo C y Grupo D) a CEES 900 μM con AEOL 10150 a concentraciones de 10, 25 y 50 μM añadidas 1 h después de la exposición a CEES. Se midió la viabilidad celular usando tinción tanto con calceína AM (Grupo A y Grupo C) como con MTT (Grupo B y Grupo D), estando los valores de control definidos como el 100 % de viabilidad. Los datos se representan como la media \pm ETM, $n = 4$. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ en comparación con el grupo tratado solo con CEES.

Las Figuras 7A-C son gráficas que muestran que AEOL 10150 salva de los aumentos inducidos por CEES en la disfunción y las ROS mitocondriales. Se expusieron células SAE (Grupo A) y células 16HBE (Grupo B) a CEES 900 μM durante 12 h. Se añadió AEOL 10150 (50 μM) 1 h después de la exposición a CEES. Grupo C, se expusieron células 16HBE de manera similar a la anterior, a excepción de que fue durante 4 h. Se determinó el potencial de membrana mitocondrial usando Rodamina 123, siendo la fluorescencia inversamente proporcional al potencial de la membrana mitocondrial. Se normalizó la media de la fluorescencia con respecto a los niveles de control, siendo los controles el 100 %. Los datos representan la media \pm ETM, $n = 3$ a 6. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ en comparación con los valores de control. ANOVA de dos vías de AEOL 10150, $p = 0,0563$; CEES, $p = 0,0033$; interacción, $p = 0,042$ (A); AEOL 10150, $p = 0,1073$; CEES, $p = 0,0004$; interacción, $p = 0,0001$ (B); y AEOL 10150, $p = 0,2876$; CEES, $p = 0,0007$; interacción, $p = 0,0051$ (C).

Las Figuras 8A-B son gráficas que muestran los efectos de CEES sobre los marcadores de estrés oxidativo celular y la prevención por parte de AEOL 10150 en células 16 HBE. Grupo A: las células expuestas a CEES 900 μM durante 12 h tuvieron una reducción de los niveles de GSH celular totales, y AEOL 10150 (50 μM) salvó de esta disminución con el tratamiento 1 h después de la exposición a CEES. Los niveles de GSH totales se normalizaron con respecto a la cantidad de proteína y se expresaron como nanomoles de GSH por miligramo de proteína. Grupo B: CEES también aumentó los niveles del marcador de la oxidación del ADN 80HdG, y el tratamiento después de la exposición a CEES con AEOL 10150 (50 μM) disminuyó los niveles de oxidación del ADN. Los datos se expresan como una proporción de 80HdG por 10^5 2dG. Los datos se presentan como la media \pm ETM, $n = 4$ a 8. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ en comparación con los niveles de control. Grupo A: ANOVA de dos vías de AEOL 10150, $p = 0,1444$; CEES, $p = 0,0001$; interacción, $p = 0,0481$; Grupo B: ANOVA de dos vías de AEOL 10150, $p = 0,1394$; CEES, $p = 0,0001$; interacción, $p = 0,0004$.

Las Figuras 9A-D son gráficas que muestran los efectos de CEES sobre los marcadores de la lesión, el edema y la inflamación, y la prevención realizada por AEOL 10150 en pulmón de rata. Grupo A: se midió espectrofotométricamente el marcador de la citotoxicidad lactato deshidrogenasa (LDH). Grupo B: se midieron los niveles de proteína que son un marcador del edema y se midió espectrofotométricamente. Grupo C: se midió IgM, que es un marcador de las fugas pulmonares, mediante ELISA. Grupo D: se midieron las células BAL, que son un marcador de la inflamación y la hemorragia, mediante citometría diferencial.

La Figura 10 es una gráfica que muestra el aumento de los niveles de LDH en la BAL como consecuencia de la inhalación de CEES; estos niveles se redujeron hasta los valores de control cuando se administró AEOL 10150 después de CEES. Los niveles de LDH en las fugas de BAL se aumentaron de manera significativa como resultado del CEES, indicando daño epitelial y, por lo tanto, fugas de esas células dañadas. El tratamiento tras la exposición con AEOL 10150 disminuyó significativamente las fugas de LDH de las células. Los datos se presentan como la media \pm ETM, proteína $n = 5$ a 9 . **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Las Figuras 11A-B son gráficas que muestran el efecto protector de AEOL 10150 sobre los aumentos inducidos por CEES en los niveles de proteína BAL e IgM de BAL. A las 1 y 9 horas después de la exposición a CEES, se trataron las ratas con AEOL 10150 (5 mg/kg, SC). A las 18 horas de la exposición, se lavaron las ratas y se midieron los niveles de la proteína BAL e IgM. Grupo A: la exposición a CEES produjo aumentos significativos en la proteína BAL, mientras que el tratamiento de AEOL 10150 con exposición a CEES produjo una disminución significativa de la proteína BAL. Grupo B: muestra un aumento significativo de IgM de BAL como resultado de la exposición a CEES y una posterior disminución significativa de IgM de BAL con tratamiento de AEOL 10150 después de la exposición a CEES. Los datos se presentan como la media \pm ETM, proteína $n = 6$ a 16 . ***, $p < 0,001$; IgM $n = 6$. *** $p < 0,001$.

Las Figuras 12A-C son gráficas que muestran que la inhalación de CEES produjo aumentos en los RBC de BAL y PMN; el tratamiento con AEOL 10150 redujo los RBC de BAL y PMN en BAL. Grupo A: en ratas tratadas con EtOH + PBS o EtOH + AEOL 10150, había niveles muy bajos de RBC. En el grupo de CEES + PBS, las ratas tuvieron un aumento significativo de los RBC en la BAL, lo que indica lesión hemorrágica. Grupo B: los neutrófilos (células polimorfonucleares, PMN) también aumentaron significativamente en las ratas tratadas con CEES + PBS en comparación con ambos grupos de tratamiento con EtOH. El tratamiento con AEOL 10150 tras CEES produjo disminuciones significativas en PMN en comparación con CEES + PBS. Los macrófagos no se modificaron significativamente en ninguno de los grupos de tratamiento. Los datos son la media \pm ETM, $n = 6$ a 13 . *, $p = 0,05$; **, $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

La Figura 13 es una gráfica que muestra que los niveles de mieloperoxidasa en el tejido pulmonar fueron significativamente superiores en el grupo de CEES + PBS; el tratamiento con AEOL 10150 disminuyó significativamente los niveles de mieloperoxidasa pulmonar en comparación con CEES + PBS. Se perfundió el tejido pulmonar y se congeló de forma instantánea en el momento de la eutanasia. Se homogenizó el tejido pulmonar en tampón HTAB. Se siguió la oxidación de tetrametilbenzidina (TMB) durante 3 minutos; estos datos se usaron para calcular una tasa de cambio. Se usó un coeficiente de extinción para TMB de $3,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 652 nm para calcular las unidades de actividad peroxidasa, y se normalizó la actividad con respecto a los niveles de proteína usando el ensayo de proteína BCA. Los datos se muestran como la media \pm ETM, $n = 6$, *, $p = 0,05$; **, $p < 0,01$.

La Figura 14 es una gráfica que muestra que el marcador de la oxidación del ADN, la 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG), aumentó significativamente como resultado de la inhalación de CEES; el tratamiento con AEOL 10150 disminuyó significativamente la oxidación del ADN inducida por CEES. Los datos se muestran como la media \pm ETM, $n = 12$, *, $p = 0,05$; **, $p < 0,01$.

La Figura 15 es una gráfica que muestra que los niveles del marcador de la peroxidación lipídica, 4-hidroxinonenal (4-HNE), se elevaron como resultado de la exposición a CEES; el tratamiento con AEOL 10150 disminuyó significativamente los niveles de 4-HNE. Los datos se muestran como la media \pm ETM, $n = 11$ para EtOH + PBS y CEES + PBS; $n = 5$ para EtOH + 10150 y CEES + 10150, *, $p = 0,05$;

Descripción detallada de la invención

Cabe señalar que, como se usan en el presente documento, las formas en singular "un", "una", "uno", "el" y "la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Así pues, por ejemplo, una referencia a "una célula" es una referencia a una o más células y sus equivalentes conocidos por los expertos en la materia.

A menos que se defina lo contrario, todas las expresiones y los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados comúnmente entendidos por un experto habitual en la materia a la que pertenece la invención. Los aspectos de la divulgación, y las diversas características y los detalles ventajosos de la misma se explican más detalladamente con referencia a los aspectos y a los ejemplos que se describen y/o ilustran en las figuras adjuntas y se detallan en la siguiente descripción. Cabe señalar que las características ilustradas en las figuras no están necesariamente realizadas a escala. Las descripciones de componentes y técnicas de

procesamiento conocidos se pueden omitir con el fin de no oscurecer innecesariamente la divulgación. Los ejemplos usados en el presente documento están destinados simplemente a facilitar la comprensión de las formas en que se puede poner en práctica la invención y permitir además a los expertos en la materia poner en práctica las realizaciones de la invención. Por consiguiente, el alcance de la invención está definido únicamente por las realizaciones anexas.

Por consiguiente, a continuación, se proporciona un apartado de "Definiciones", donde se definen específicamente ciertos términos relacionados con la invención con el objeto de aclarar, pero todas las definiciones coinciden con la forma en la que un experto en la materia entendería estos términos. Se describen métodos, dispositivos y materiales particulares, aunque se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la divulgación.

SM es mostaza de azufre

15 CEES es sulfuro de 2-cloro-etiletilo

SOD es superóxido dismutasa

20 ROS es especies reactivas del oxígeno

RNS es especies reactivas del nitrógeno

GSH es glutatión

25 8OHdG es 8-hidroxidesoxiguanosina

MTT es bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

ANOVA es análisis de la varianza

30 HBE es células epiteliales bronquiales humanas

SAEC es células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas humanas

35 4-HNE es 4-hidroxinonal.

"Agente de alquilación", como se usa en el presente documento, en general, se refiere a compuestos que contienen grupos alquilo que se combinan fácilmente con otras moléculas. Por ejemplo, los agentes de alquilación normalmente contienen grupos alquilo que se unen fácilmente a otras moléculas, formando de este modo un enlace covalente. Este proceso también se puede denominar alquilación. En general, los agentes de alquilación pueden interrumpir la función del ADN a través de diferentes mecanismos tales como: (i) mediante la alquilación de bases de ADN, impidiendo de este modo la síntesis del ADN y la transcripción del ARN; (ii) por mediación de la formación de puentes cruzados, enlaces entre los átomos de la cadena de ADN; o (iii) facilitando el apareamiento erróneo de los nucleótidos en la cadena de ADN, conduciendo así a mutaciones. Además, los agentes de alquilación pueden iniciar el estrés oxidativo dentro de las células del sistema de órganos expuesto, causando una disminución general en el glutatión intracelular (GSH) y el aumento de la oxidación del ADN. La exposición a agentes de alquilación puede causar la formación de ampollas en la piel, daños oculares y daños en el tracto respiratorio. La exposición a agentes de alquilación también puede causar efectos tóxicos sistémicos tales como náuseas y vómitos, reducción tanto de leucocitos como de eritrocitos, tendencias hemorrágicas, edema, agotamiento del glutatión, aumento de mieloperoxidasa (MPO), aumento de la lactato deshidrogenasa (LDH) y aumento de IgM.

"Oxidación," como se usa en el presente documento, es una reacción química que transfiere electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres, que generan estrés oxidativo y, en última instancia, pueden producir la muerte celular.

"Especies reactivas del oxígeno", como se usa en el presente documento, se refiere, en general, a radicales libres, aniones reactivos que contienen átomos de oxígeno, o moléculas que contienen átomos de oxígeno que bien pueden producir radicales libres o ser activadas químicamente por ellos. Las especies reactivas del oxígeno pueden incluir, sin limitación, radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, peroxinitrito, peróxidos de lípidos, radicales hidroxilo, radicales tiolo, anión superóxido, hidroperóxido orgánico, radicales RO• alcoxi y ROO• peroxi, y ácido hipocloroso. La principal fuente de especies reactivas del oxígeno (ROS) *in vivo* es la respiración aeróbica, aunque las especies reactivas del oxígeno también se producen por β -oxidación peroxisomal de los ácidos grasos, metabolismo del citocromo P450 microsomal de compuestos xenobióticos, estimulación de la fagocitosis por patógenos o lipopolisacáridos, metabolismo de la arginina, enzimas específicas de tejido. La acumulación de daño oxidativo también puede afectar a la eficacia de las mitocondrias y aumentar aún más la velocidad de producción de ROS.

5 "Especies reactivas del nitrógeno", como se usa en el presente documento, se refiere, en general, a una familia de biomoléculas derivadas de óxido nítrico (NO•), y se pueden producir en animales a través de la reacción del óxido nítrico (NO•) con superóxido (O₂⁻) para formar peroxinitrito (ONOO⁻). En general, las especies de nitrógeno reactivas actúan junto con las especies reactivas del oxígeno que dañan las células, lo que produce estrés nitrosativo.

10 "Estrés oxidativo", como se usa en el presente documento, se refiere, en general, al daño celular causado por ROS. El daño primario provocado en las células se produce como consecuencia de la alteración inducida por ROS de macromoléculas tales como ácidos grasos poliinsaturados en los lípidos de membrana, en las proteínas esenciales y en el ADN. Como se describe en la patente de EE.UU. N° 7.189.707, el estrés oxidativo y las ROS se han implicado en una serie de estados patológicos tales como la enfermedad de Alzheimer, el cáncer, la diabetes mellitus y el envejecimiento.

15 "Antioxidante", como se usa en el presente documento, se refiere, en general, a moléculas o compuestos con la capacidad de atenuar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Los antioxidantes pueden eliminar los radicales libres generados por la reacción de oxidación e inhibir otras reacciones de oxidación al oxidarse ellos mismos. Los antioxidantes pueden incluir agentes reductores tales como tioles o polifenoles. Además, los antioxidantes pueden incluir, sin limitación, glutatión, vitamina C, vitamina E, catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, otras diversas peroxidases, compuestos de porfirina sustituida de la divulgación y cualquier otra molécula o compuesto que sea capaz de neutralizar las especies reactivas del oxígeno que sea conocido en la técnica.

20 "Salvar de", como se usa en el presente documento, se define, en general, como contrarrestar, recuperar o conferir protección contra los efectos nocivos de las especies reactivas del oxígeno y otros radicales libres en un sujeto, órgano, tejido, célula o biomolécula.

25 "Órgano", como se usa en el presente documento, se refiere, en general, a un tejido que realiza una función o un grupo de funciones específicas en un organismo. Una enumeración a modo de ejemplo de órganos incluye pulmones, corazón, vasos sanguíneos, sangre, glándulas salivales, esófago, estómago, hígado, vesícula biliar, páncreas, intestinos, recto, ano, glándulas endocrinas tales como hipotálamo, hipófisis o glándula pituitaria, cuerpo pineal o glándula pineal, tiroides, paratiroides, suprarrenales, piel, pelo, uñas, linfa, ganglios linfáticos, amígdalas, adenoides, timo, bazo, músculos, cerebro, médula espinal, nervios periféricos, nervios, órganos sexuales tales como ovarios, trompas de Falopio, útero, vagina, glándulas mamarias, testículos, conductos deferentes, vesículas seminales, próstata y pene, faringe, laringe, tráquea, bronquios, diafragma, huesos, cartílagos, ligamentos, tendones, riñones, uréteres, vejiga y uretra.

30 "Sistema de órganos", como se usa en el presente documento, se refiere, en general, a un grupo de órganos relacionados. Los sistemas de órganos incluyen, sin limitación, sistema circulatorio, sistema digestivo, sistema endocrino, sistema tegumentario, sistema linfático, sistema muscular, sistema nervioso, sistema reproductor, sistema respiratorio, sistema esquelético y sistema urinario.

35 "Biomarcador", como se usa en el presente documento, se refiere, en general, a una biomolécula orgánica que se encuentra presente de manera diferencial en una muestra tomada de un sujeto de un estado fenotípico (por ejemplo, en exposición a un agente de alquilación) en comparación con otro estado fenotípico (por ejemplo, sin exposición a un agente de alquilación). Un biomarcador se encuentra presente de manera diferencial entre diferentes estados fenotípicos si la media o mediana del nivel de expresión del biomarcador en los diferentes grupos resulta ser estadísticamente significativa. Las pruebas comunes de significación estadística incluyen, entre otras, ensayo t, ANOVA, Kruskal-Wallis, Wilcoxon, Mann-Whitney y proporción de probabilidades. Los biomarcadores, solos o en combinación, proporcionan medidas del riesgo relativo de que un sujeto pertenezca a un estado fenotípico u a otro. Como tales, son útiles como marcadores de enfermedades (diagnóstico), eficacia terapéutica de un fármaco (40 (teranóstica) y toxicidad del fármaco.

45 "Sujeto", como se usa en el presente documento, incluye individuos que requieren la intervención o manipulación debido a una exposición o una posible exposición a un agente de alquilación que pueda facilitar la lesión de órganos. Además, el término "sujeto" incluye animales y seres humanos.

50 "Principio activo", como se usa en el presente documento, se refiere, en general, a cualquier compuesto capaz de inducir un cambio en el fenotipo o genotipo de una célula, tejido, órgano u organismo cuando entra en contacto con la célula, el tejido, el órgano o el organismo. Por ejemplo, el compuesto puede tener la capacidad de neutralizar las ROS, prevenir o atenuar el estrés oxidativo, y proteger los órganos y sistemas de órganos de una lesión debida a la exposición a un agente de alquilación. El compuesto puede incluir cualquiera de los compuestos de porfirina sustituida de la divulgación tales como un mimético del superóxido, un mimético de la catalasa o un mimético que tenga ambas características.

55 "Vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere, en general, a excipientes farmacéuticos, por ejemplo, sustancias portadoras orgánicas o inorgánica, farmacéutica o fisiológicamente aceptables adecuadas para una aplicación enteral o parenteral que no reaccionen perjudicialmente

con el principio activo.

Quando los grupos sustituyentes son especificados por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, estos abarcan igualmente los sustituyentes químicamente idénticos que se obtendrían escribiendo la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{O}-$ es equivalente a $-\text{OCH}_2-$.

"Dosis eficaz" o "dosis farmacéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere, en general, a la cantidad de la/s porfirina/s sustituida/s descrita/s en el presente documento que produce un efecto terapéutico deseado, tal como contrarrestar los efectos perjudiciales de una exposición a agentes de alquilación. La cantidad exacta de la dosis eficaz de dicho compuesto que producirá los resultados más eficaces en términos de eficacia de tratamiento en un sujeto dado dependerá de la actividad, farmacocinética, farmacodinámica y biodisponibilidad de una determinada porfirina sustituida, la afección fisiológica del sujeto, la naturaleza del vehículo farmacéuticamente aceptable de una formulación y la vía de administración, entre otros posibles factores. Los expertos en las técnicas clínicas y farmacológica serán capaces de determinar estos factores a través de la experimentación rutinaria que consiste en la monitorización del sujeto y el ajuste de la dosis. "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (Gennaro ed. Edición 20. sup, Williams & Wilkins PA, EE.UU.) (2000).

Métodos

Se desvelan métodos para tratar, salvar y/o proteger el órgano y los sistemas de órganos de un sujeto de los efectos nocivos producidos como consecuencia de la exposición a agentes de alquilación usando porfirinas sustituidas. Un método para tratar una lesión asociada con la exposición a un agente de alquilación en un sujeto incluye la administración a un sujeto en necesidad de ello de una cantidad eficaz de AEOL 10150. Un método de la divulgación para la protección de un sujeto de los efectos tóxicos asociados con la exposición a un agente de alquilación incluye la administración profiláctica a un sujeto en necesidad de ello de una cantidad eficaz de AEOL 10150. Los métodos de la divulgación se proporcionan para salvar o proteger de una lesión de un órgano mediante la administración de AEOL 10150 como principio activo de un protector de agentes de alquilación.

El compuesto AEOL 10150 se desvela en la patente de EE.UU. Nº 7.189.707 y la publicación de patente de EE.UU. Nº 2007/0149498.

Agentes de alquilación

Los agentes de alquilación contienen grupos alquilo que se combinan fácilmente, por lo general, a través de unión covalente, con otras moléculas. Los agentes de alquilación pueden interrumpir la función del ADN mediante tres mecanismos: (i) alquilando bases de ADN, impidiendo de este modo la síntesis del ADN y la transcripción del ARN; (ii) mediando la formación de puentes cruzados, enlaces entre los átomos de la cadena de ADN; o (iii) facilitando el apareamiento erróneo de los nucleótidos en la cadena de ADN, generando mutaciones en la cadena de ADN. Además, los agentes de alquilación pueden iniciar el estrés oxidativo dentro de las células del sistema de órganos expuesto, causando una disminución general en el glutatión intracelular (GSH) y el aumento de la oxidación del ADN.

Los agentes de alquilación incluyen, sin limitación, las mostazas de nitrógeno tales como el clorhidrato de mecloretamina, clorambucilo, busulfán, ciclofosfamida y las mostazas de azufre tales como gas de cloro y sulfuro de 2-cloroetiletilo (CEES). La exposición a agentes de alquilación puede causar la formación de ampollas en la piel, daño ocular y daño en el tracto respiratorio. La exposición a agentes de alquilación también puede causar efectos tóxicos sistémicos tales como náuseas y vómitos, tendencias hemorrágicas, edema y una reducción tanto de los leucocitos como de los eritrocitos.

La mostaza de azufre (sulfuro de 2,2'-diclorodietilo) es un potente agente vesicante conocido, y su inhalación produce la apoptosis y la necrosis del epitelio de las vías respiratorias, inflamación, edema y formación de seudomembranas. El sulfuro de 2-cloroetiletilo (CEES, mitad mostaza) es un análogo monofuncional de la SM que se puede utilizar para dilucidar los mecanismos de la lesión y como una selección inicial de agentes terapéuticos. Tanto la SM como el CEES (**Figura 1**) son agentes de alquilación capaces de unir macromoléculas, incluyendo proteínas, ADN y lípidos.

El estrés oxidativo desempeña un papel importante en el daño mediado por SM/CEES. Por ejemplo, la exposición a CEES provoca un desequilibrio en la producción de ROS/RNS y las defensas antioxidantes en favor de las primeras. Hay muchos factores que contribuyen al aumento de ROS tras la exposición a SM/CEES. Por ejemplo, la exposición a SM/CEES facilita la proliferación de células inflamatorias tales como leucocitos polimorfonucleares (PMN), lo que a su vez produce oxidantes, incluyendo superóxido y ácido hipocloroso (HOCl). Por otra parte, la exposición a CEES también provoca la disfunción mitocondrial que posteriormente conduce al aumento de la producción de ROS, y en última instancia, al estrés oxidativo.

Como se ha tratado anteriormente, tras la exposición a SM/CEES, se produce un daño irreparable en las vías respiratorias tal como la apoptosis y la necrosis del epitelio de las vías respiratorias. Sin embargo, la administración de las porfirinas sustituidas desveladas en el presente documento posterior a la exposición al agente de alquilación ha demostrado mejorar significativamente el resultado. Por ejemplo, la administración de AEOL 10150 tras la exposición a CEES ha demostrado salvar a las células pulmonares y las células de las vías respiratorias de la toxicidad inducida por el agente de alquilación, prevenir las ROS y la disfunción mediadas por el agente de alquilación y el estrés oxidativo inducido por el agente de alquilación. AEOL 10150 también ha demostrado reducir la citotoxicidad inducida por el agente de alquilación, reducir los aumentos de proteína e IgM en los pulmones inducidos por el agente de alquilación, reducir los niveles de glóbulos rojos y células inflamatorias en los pulmones, disminuir la acumulación de PMN en los tejidos y evitar el estrés oxidativo inducido por el agente de alquilación.

Formulaciones

La divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de porfirina sustituida de bajo peso molecular o una porfirina sustituida de bajo peso molecular en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un vehículo). Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, soluciones salinas (tales como solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas e hidratos de carbono tales como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Dichos preparados se pueden esterilizar y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes y/o sustancias aromáticas y similares que no reaccionen de forma perjudicial con los compuestos.

Los compuestos (por ejemplo AEOL 10150) se pueden administrar solos o coadministrar al sujeto. La coadministración se entiende que incluye la administración simultánea o secuencial de los compuestos individualmente o en combinación (más de un compuesto). Los preparados también se pueden combinar, cuando se desee, con otras sustancias activas (por ejemplo, antioxidantes). Por ejemplo, los compuestos se pueden administrar conjuntamente con glutatión, vitamina C, vitamina E, catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, otras diversas peroxidases y cualquier otra molécula o compuesto que pueda neutralizar las especies de oxígeno reactivas conocidas por los expertos en la materia.

Los compuestos de porfirina sustituida se pueden preparar y administrar en una amplia variedad de formas de administración orales, parenterales y tópicas. Por lo tanto, los compuestos se pueden administrar por inyección (por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intracutánea, subcutánea, intraduodenal o intraperitoneal). Además, los compuestos descritos en el presente documento se pueden administrar por inhalación, por ejemplo, por vía intranasal. Es más, los compuestos se pueden administrar por vía transdérmica. También se contempla el uso de vías múltiples de administración (por ejemplo, intramuscular, oral, transdérmica) para administrar los compuestos. Por consiguiente, la divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y uno o más compuestos de la divulgación.

Para preparar las composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos de la divulgación, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser bien sólidos o líquidos. Los preparados en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, agentes aromatizantes, aglutinantes, conservantes, agentes de disgregación de comprimidos o un material encapsulante.

En los polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido en una mezcla con el componente activo finamente dividido. En los comprimidos, el componente activo se mezcla con el vehículo que tiene las propiedades de unión necesarias en proporciones adecuadas, y se compacta en la forma y en el tamaño deseados.

Los polvos y comprimidos contienen preferentemente del 5 % al 70 % del compuesto activo. Los vehículos adecuados son carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao, y similares. El término "preparado" pretende incluir la formulación del compuesto activo con material de encapsulación como vehículo que proporcione una cápsula en la que el componente activo, con o sin otros vehículos, esté rodeado por un vehículo, que, a su vez, está asociado con el mismo. De manera similar, se incluyen sellos y grageas. Los comprimidos, polvos, cápsulas, píldoras, sellos y grageas se pueden usar como formas de dosificación sólidas adecuadas para la administración oral.

Para preparar supositorios, primero se funde una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao, y se dispersa homogéneamente el componente activo en la misma, como por agitación. Entonces, se vierte la mezcla homogénea fundida en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar y, de ese modo, solidificar.

Los preparados en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo, agua o soluciones de agua/propilenglicol. Para la inyección parenteral, los preparados líquidos se pueden formular en solución, en una

solución acuosa de polietilenglicol.

5 Cuando se necesita o se desea la aplicación parenteral, las mezclas especialmente adecuadas para los compuestos son soluciones estériles inyectables, preferentemente soluciones oleosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones o implantes, incluyendo supositorios. En particular, los vehículos para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de dextrosa, solución salina, agua pura, etanol, glicerol, propilenglicol, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, polímeros de bloques de polioxietileno, y similares. Las ampollas son formas de dosificación unitarias convenientes. Los compuestos también se pueden incorporar en liposomas o administrarse a través de bombas o parches transdérmicos. Las mezclas farmacéuticas adecuadas para su uso incluyen las que se describen, por ejemplo, en "Pharmaceutical Sciences" (17ª Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA) y el documento WO 10 96/05309.

15 Las soluciones acuosas adecuadas para su uso oral se pueden preparar disolviendo el componente activo en agua y añadiendo colorantes, aromatizantes, estabilizantes y agentes espesantes adecuados cuando se desee. Las suspensiones acuosas adecuadas para su uso oral se pueden preparar dispersando el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y otros agentes de suspensión bien conocidos.

20 También se incluyen en la divulgación preparados en forma sólida que se pretenden convertir, poco antes de su uso, en preparados en forma líquida para la administración oral. Dichas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Estos preparados pueden contener, además del componente activo, colorantes, aromatizantes, estabilizantes, tampones, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes, y similares.

25 **Dosis**

El preparado farmacéutico está preferentemente en forma de dosificación unitaria. En dicha forma, el preparado se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser un preparado envasado, conteniendo el envase cantidades diferenciadas del preparado, tales como comprimidos envasados, cápsulas y polvos en viales o ampollas. Además, la forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, un comprimido, un sello o una gragea, o puede ser un número apropiado de cualquiera de los mismos en forma envasada.

35 La cantidad de componente activo en un preparado de dosis unitaria puede variarse o ajustarse de 0,1 mg a 10.000 mg, más normalmente, de 1,0 mg a 1.000 mg, más normalmente de 10 mg a 500 mg, según la aplicación particular y la potencia del componente activo. La composición puede, si se desea, contener también otros agentes terapéuticos compatibles.

40 Algunos compuestos pueden tener una hidrosolubilidad limitada y, por lo tanto, pueden requerir un tensioactivo u otro codisolvente apropiado en la composición. Dichos codisolventes incluyen: Polisorbato 20, 60, y 80; Pluronic F-68, F-84 y P-103; ciclodextrina; y aceite de ricino polioxil 35. Dichos codisolventes normalmente se emplean a un nivel entre aproximadamente el 0,01% y aproximadamente el 2% en peso.

45 Se puede desear una viscosidad superior a la de las soluciones acuosas simples para reducir la variabilidad en la administración de las formulaciones, para disminuir la separación física de los componentes de una suspensión o emulsión de la formulación, y/o para mejorar de otra manera la formulación. Dichos agentes de viscosidad incluyen, por ejemplo, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, metilcelulosa de hidroxipropilo, celulosa de hidroxietilo, celulosa de carboximetilo, hidroxipropilcelulosa, sulfato de condroitina y sus sales, ácido hialurónico y sus sales, y combinaciones de los anteriores. Dichos agentes normalmente se emplean a un nivel entre 50 aproximadamente el 0,01% y aproximadamente el 2% en peso.

Las composiciones de la divulgación pueden incluir además componentes para proporcionar una liberación sostenida y/o comodidad. Dichos componentes incluyen polímeros mucomiméticos aniónicos, de alto peso molecular, polisacáridos gelificantes, y sustratos de soporte del fármacos finamente divididos. Estos componentes se 55 tratan en mayor detalle en la patente de los EE.UU. n.º 4.911.920; 5.403.841; 5.212.162; y 4.861.760.

La dosis de la composición que se va a administrar se puede determinar sin la necesidad de experimentación, y dependerá de varios factores, incluyendo la naturaleza del agente activo (ya sea unido a metal o exento de metal), la vía de administración, el sujeto y el resultado que se pretenda alcanzar. Cabe esperar que una dosis adecuada del compuesto que se va a administrar IV o por vía tópica esté en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 60 aproximadamente 50 mg/kg/día, y más particularmente, en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día. Para la administración en aerosol, se espera que la dosis esté en el intervalo de aproximadamente 0,001 mg/kg/día a aproximadamente 5 mg/kg/día, y más específicamente, en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg/día a aproximadamente 1 mg/kg/día. Las dosis adecuadas de los compuestos 65 variarán, por ejemplo, con el compuesto y con el resultado buscado.

Los compuestos se pueden administrar profilácticamente para que sirvan como un protector contra la exposición a un agente de alquilación. Los compuestos se pueden administrar en las cantidades de dosificación especificadas por encima de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 48 horas antes de la exposición al agente de alquilación. El compuesto se puede administrar de aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas, más específicamente, de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 horas, más específicamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 horas, y aún más específicamente, de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 horas antes de la exposición al agente de alquilación.

El compuesto se puede administrar en las cantidades de dosificación especificadas por encima de aproximadamente 1 a aproximadamente 48 horas después de la exposición a un agente de alquilación. El compuesto que se va a administrar aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas, más específicamente, aproximadamente 1 a aproximadamente 12 horas, más específicamente aproximadamente 1 a aproximadamente 6 horas, y aún más específicamente, de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 horas después de la exposición al agente de alquilación.

Para cualquier compuesto descrito en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Las concentraciones diana serán aquellas concentraciones de compuesto/s activo/s que sean capaces de contrarrestar los efectos del agente de alquilación, mediante el control de la presencia, ausencia o alteración de los niveles de los biomarcadores indicativos de la exposición al gas fosgeno o al gas de cloro tal como el glutatión, LDH, IgM y 8O-HdG, por ejemplo. Los métodos para medir los niveles de dichos compuestos son conocidos por los expertos en la materia, siendo objeto de la experimentación rutinaria.

Las cantidades terapéuticamente eficaces para su uso en seres humanos se pueden determinar a partir de modelos animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis para seres humanos con la que se alcance una concentración que se haya encontrado eficaz en animales. La dosificación en seres humanos se puede ajustar mediante el control de los niveles de los biomarcadores indicativos de la exposición a un agente de alquilación y el ajuste de la dosis creciente o decreciente.

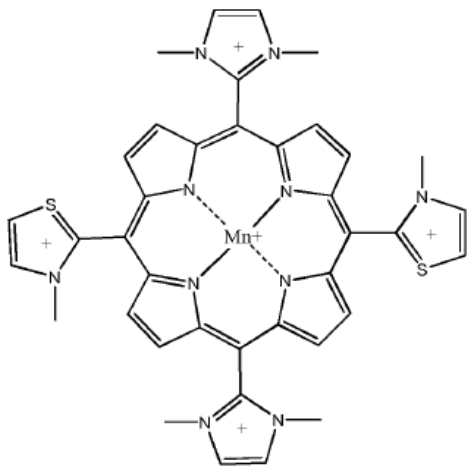
Las dosis pueden variar dependiendo de las necesidades del paciente y del compuesto que se esté empleando. La dosis administrada a un paciente, debe ser suficiente para efectuar una respuesta terapéutica beneficiosa con el tiempo en el paciente. El tamaño de la dosis también estará determinado por la existencia, la naturaleza y el grado de cualquier efecto secundario adverso. En general, el tratamiento se inicia con dosis más pequeñas, que son inferiores a la dosis óptima del compuesto. Tras ello, la dosis se aumenta en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo en las circunstancias.

Las cantidades y los intervalos de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles del compuesto administrado eficaces para la indicación que se esté tratando en particular. Estos proporcionarán un régimen terapéutico que será proporcional a la gravedad de la reacción del individuo tras la exposición al agente de alquilación.

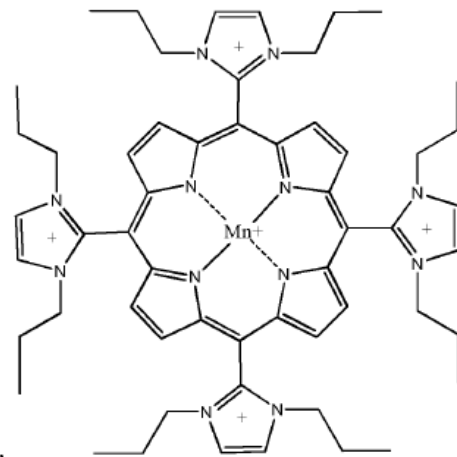
Utilizando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, se puede planificar un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz de acuerdo con la divulgación que no cause una toxicidad sustancial y, sin embargo, sea totalmente eficaz en el tratamiento de los síntomas clínicos demostrados por el paciente en particular. Dicha planificación debe implicar a minuciosa elección de los compuestos activos teniendo en cuenta factores tales como la potencia del compuesto, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la presencia y la gravedad de los efectos secundarios adversos, el modo preferido de administración y el perfil de toxicidad del agente seleccionado.

50 Ejemplos

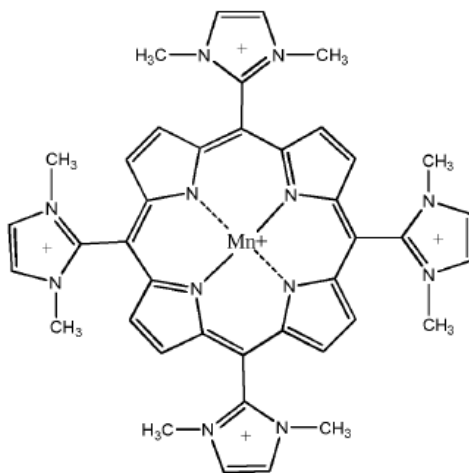
Para el propósito de los siguientes ejemplos de referencia, los compuestos de las Fórmulas IV-X se designarán como se indica en la Tabla 1 que se presenta a continuación:



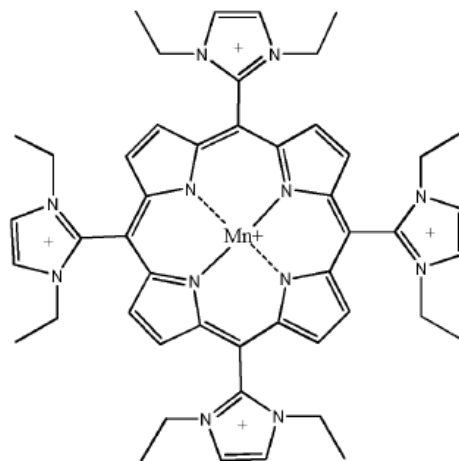
(V),



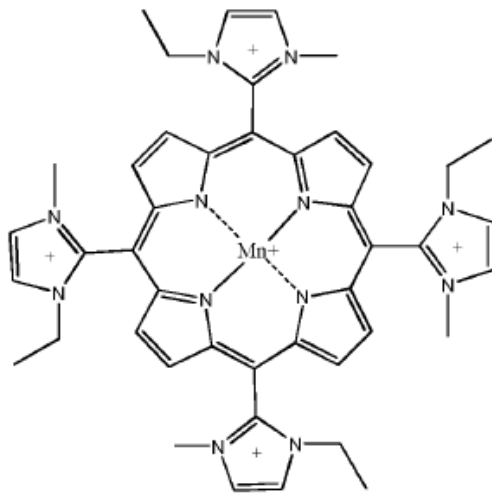
(IV),



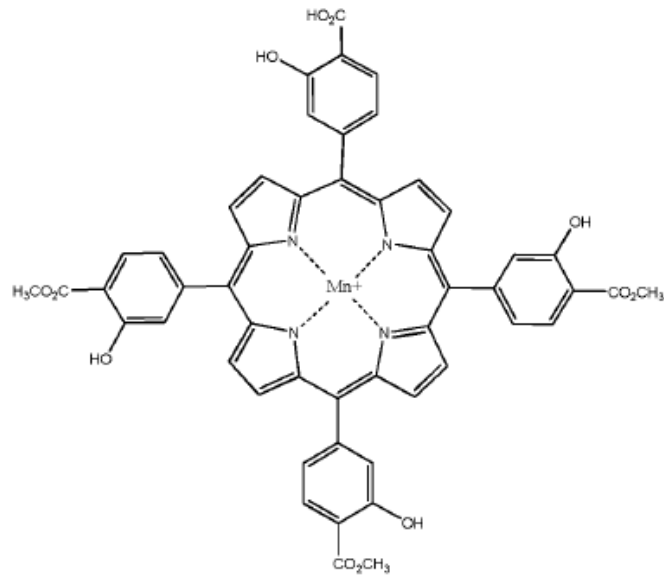
(VII),



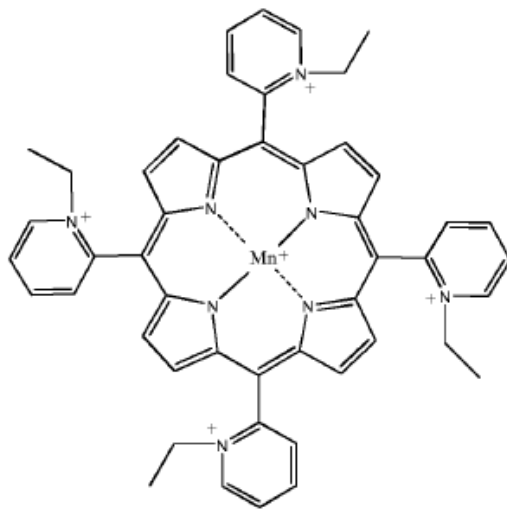
(VI),



(VIII),



(IX) o



(X).

Tabla 1

Compuesto de Fórmula	Designación de AEOL N°
IV	AEOL 10153
V	AEOL 10158
VI	AEOL 10123
VII	AEOL 10150
VIII	AEOL 10151
IX	AEOL 10303
X	AEOL 10113

Ejemplo de referencia 1: Lesión de las células epiteliales de las vías respiratorias inducida por CEES

5 Se cultivaron células 16HBE de pulmón humano hasta aproximadamente el 90 % de confluencia y se trataron con concentraciones crecientes de CEES, que variaban de aproximadamente 600 a aproximadamente 000 μM . Se determinó la viabilidad celular midiendo la fluorescencia de la calceína AM y resultó disminuir de una manera dependiente de la dosis del 80 % con CEES 600 μM hasta menos del 10 % con CEES 1000 μM (**Figura 2**). Se usó CEES 900 μM como la dosis óptima para llevar a cabo los estudios de citoprotección, porque proporcionó una lesión celular suficiente (del aproximadamente 50 %) para que los posibles agentes terapéuticos demostraran su eficacia y la respuesta a la lesión celular más constante en los dos sistemas celulares. Debido al aumento de la resistencia de las células SAE a la toxicidad del CEES observado con las células 16HBE, estas exposiciones se prolongaron hasta 48 h en las células SAE, proporcionando respuestas a las lesiones similares para la comparación de los efectos protectores antioxidantes entre los sistemas celulares.

15

Ejemplo de referencia 2: Aumento retardado de la disfunción y las ROS mitocondriales con la exposición a CEES

Como se ha tratado anteriormente, las mitocondrias son una importante fuente de producción de ROS celulares. Se expusieron tanto células SAE como células 16HBE a CEES 900 μM durante 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 h, tras lo que se incubaron las células con MitoSOX (MitoSOX es una sonda de ROS dirigida mitocondrialmente) y se midió la fluorescencia usando citometría de flujo. La exposición a CEES aumentó los niveles de ROS que llegaron a un máximo a las 12 h, y este aumento dependiente del tiempo se observó tanto en las células SAE (**Figura 3A**) como en las células 16HBE (**Figura 3B**). Como consecuencia de ello, se examinaron más estudios de exposición para medir los marcadores del estrés celular tras 12 h de exposición.

25

Seguidamente, se examinó CEES para determinar si la exposición a CEES estaba asociada con alguna disfunción mitocondrial. Las mitocondrias necesitan mantener un potencial de membrana para fabricar activamente ATP. Para examinar esto, se midió la fluorescencia de Rho 123, que es inversamente proporcional al potencial de membrana mitocondrial. Se expusieron las células 16HBE de pulmón humano a CEES durante 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 h, tras lo que se incubaron las células con Rho 123, y se midió la fluorescencia usando citometría de flujo. Los resultados mostraron que CEES produjo una disminución del potencial de membrana mitocondrial en 4 h, que persistió durante 24 h como así lo evidencia el aumento de la fluorescencia de Rho 123 (**Figura 3C**). En particular, hubo una disminución significativa en la fluorescencia de Rho 123 a las 48 h, que se puede atribuir a la muerte celular que cabría esperar en base a los ensayos de viabilidad celular previos.

35

Ejemplo de referencia 3: Las metaloporfirinas salvan a las células pulmonares humanas de la toxicidad inducida por el CEES

Se exploraron varias metaloporfirinas estructuralmente diferentes (AEOL 10150, AEOL 10113, AEOL 10303 y MnTBAP) en células 16HBE para determinar su eficacia contra la toxicidad de CEES 1 h después de la exposición inicial (**Figura 4**). Se trataron las células con CEES durante 1 h a 37 °C, tras lo que se añadieron los compuestos de Fórmula 10150 (Fórmula VI, anterior), 10113 (Fórmula IX, anterior), 10103 (Fórmula VIII, anterior) y MnTBAP a una concentración final de 50 μM . Tras 24 h, se midió la viabilidad celular usando fluorescencia de calceína AM. Tres compuestos antioxidantes catalíticos aumentaron significativamente la viabilidad celular en las células expuestas a CEES hasta un 60, 56 y 41 % en los grupos 10150, 10113, 10103 en comparación con solo un 20 % en las células expuestas solo a CEES (**Figura 5**). De los cuatro compuestos ensayados, solo MnTBAP no mostró ninguna protección.

Ejemplo de referencia 4: AEOL 10150 salva a las células de las vías respiratorias primarias humanas de la toxicidad inducida por el CEES

50

Se expusieron células SAE y células 16HBE pulmonares humanas primarias a CEES 900 μM durante 48 h. El tratamiento con AEOL 10150 (10, 25 y 50 μM) se produjo 1 h después de la exposición inicial a CEES. AEOL 10150 (50 μM) por sí solo no cambió la viabilidad de las células, según lo medido mediante ensayos tanto con calceína AM (**Figura 6, A y C**) como con MTT (**Figura 6, B y D**). CEES solo produjo una disminución del 50 % en la viabilidad celular, y esto se atenuó significativamente a la mayor concentración de AEOL 10150, hasta el 80 % del control en las células SAE (**Figura 6, A y B**) y casi el 90 % en las células 16HBE (**Figura 6, C y D**). Aunque AEOL 10150

55

10 μM ni 25 μM mostraron un aumento significativo en la viabilidad en las células SAE, AEOL 10150 25 μM sí mostró un aumento significativo en la viabilidad en las células 16HBE. Se obtuvieron resultados similares en los ensayos tanto con calceína AM como con MTT usados para evaluar la viabilidad celular.

5 Ejemplo de referencia 5: AEOL 10150 evita las ROS y la disfunción mitocondriales mediadas por CEES

Se evaluó AEOL 10150 para determinar si sus efectos citoprotectores están asociados con los cambios mediados por CEES en las ROS y la disfunción mitocondriales. Se cultivaron células hasta aproximadamente un 90 % de confluencia y se expusieron a CEES 900 μM con y sin AEOL 10150 (50 μM). Se incubaron las células con MitoSOX 10 12 h después de la exposición a CEES, y se midió la fluorescencia usando citometría de flujo. La adición de AEOL 10150 1 h después de los tratamientos con CEES redujo significativamente las ROS mitocondriales en comparación con las células expuestas a CEES, tanto en las células SAE (**Figura 7A**) como en las células 16HBE (**Figura 7B**). AEOL 10150 por sí solo no causó un cambio en las ROS mitocondriales.

15 Además, se evaluó AEOL 10150 para determinar si se puede proteger a las mitocondrias de una disfunción inducida por CEES. Se expusieron células 16HBE de pulmón a CEES 900 μM durante 4 horas con la adición de AEOL 10150 50 μM 1 h después de la exposición inicial a CEES. Los grupos tratados solo con CEES mostraron un aumento en la fluorescencia de rodamina 123, lo que indica una pérdida significativa del potencial de membrana mitocondrial que se atenuó en las células tratadas con AEOL 10150 (**Figura 7C**).

20 Ejemplo de referencia 6: AEOL 10150 evita el estrés oxidativo inducido por CEES

El estrés oxidativo se puede producir como consecuencia de un desequilibrio entre la producción de oxidantes y la defensa antioxidante. Como se ha tratado anteriormente, el GSH es un importante antioxidante celular. Por lo tanto, 25 se determinó el efecto de CEES sobre los niveles totales de GSH celular, así como si AEOL 10150 alteró los cambios mediados por CEES en los niveles de GSH. Se expusieron células 16HBE pulmonares humanas durante 12 h a CEES y se añadió AEOL 10150 (50 μM) 1 h después del tratamiento con CEES. El AEOL 10150 solo no alteró los niveles de GSH intracelulares, mientras que CEES provocó una disminución significativa de los niveles de GSH intracelular (**Figura 8A**). El tratamiento con AEOL 10150 impidió la disminución inducida por CEES del GSH, lo que implica, además, un desequilibrio en el estado redox de las células causado por CEES que era reversible por AEOL 10150.

Una de las consecuencias del estrés oxidativo es un aumento en la oxidación de las macromoléculas celulares. Un marcador clásico para la oxidación del ADN es la formación de 8-hidroxidesoxiguanosina (8O-HdG), que se 35 determinó 12 h después de la exposición a CEES. CEES provocó un aumento significativo en los niveles de 8OHdG en las células 16HBE pulmonares medido por cromatografía líquida de alta resolución (**Figura 8B**). Por otra parte, AEOL 10150 añadido 1 h después de la exposición a CEES disminuyó la oxidación de ADN mediada por CEES. Estos datos apoyan aún más el papel del estrés oxidativo en la lesión mediada por CEES, que mejora con la metaloporfirina antioxidante catalítica, AEOL 10150.

40 Ejemplo de referencia 7: AEOL 10150 protege de la lesión pulmonar inducida por CEES en ratas

Se expusieron ratas a CEES al 5 % durante 15 minutos y se sacrificaron 18 horas más tarde. Los grupos de ratas recibieron AEOL 10150 (5 mg/kg sc, dos veces al día) 1 hora después de la exposición a CEES. Se lavaron los pulmones de las ratas, y se midieron los marcadores de citotoxicidad, inflamación y edema del líquido de lavado broncoalveolar (BALF). Como se muestra en la **Figura 9**, el CEES causó un aumento significativo de las ROS. Por otra parte, AEOL 10150 añadido 1 h después de la exposición a CEES redujo la oxidación del ADN mediada por CEES. Estos datos apoyan aún más el papel del estrés oxidativo en la lesión mediada por CEES, que mejora con la metaloporfirina antioxidante catalítica, AEOL 10150.

50 Ejemplo de referencia 8: AEOL 10150 reduce la citotoxicidad inducida por CEES medida por la liberación de LDH

La citotoxicidad inducida por CEES se puede evaluar mediante la medición de la liberación de LDH en el pulmón. La liberación de LDH en el fluido de lavado broncoalveolar (BAL) es un marcador de la lesión celular en el epitelio. La 55 **Figura 10** muestra que los niveles de liberación de LDH no fueron diferentes entre los animales tratados con EtOH + PBS y EtOH + AEOL 10150. Tras la exposición a CEES con el tratamiento de PBS, la liberación de LDH se duplicó en comparación con los grupos de control ($p < 0,01$). Cuando se administró AEOL 10150 a las ratas tras la exposición a CEES, los niveles de LDH se atenuaron significativamente en comparación con el grupo de CEES + PBS ($p < 0,001$).

60

Ejemplo de referencia 9: AEOL 10150 reduce los aumentos de BAL inducidos por CEES en proteína e IgM

La administración de AEOL 10150 reduce los aumentos inducidos por el agente de alquilación en proteína e IgM en el pulmón. El BAL en ratas normales consiste en macrófagos y niveles bajos de proteínas de gran tamaño tales como albúmina. La medición de los niveles de proteína en el BAL es una forma de medir la acumulación de proteína extravascular en las vías respiratorias. Como se muestra en la **Figura 11A**, en comparación con EtOH + PBS o EtOH + AEOL 10150, los niveles de proteína en el BAL se aumentaron de manera significativa como resultado del CEES al 5 % + PBS ($p < 0,001$). Los niveles de proteína en el BAL se redujeron significativamente a partir de CEES + PBS cuando los animales recibieron AEOL 10150 ($p < 0,001$). Aunque el aumento de los niveles de proteína en el BAL pueden no ser un indicador claro de la permeabilidad vascular, ya que también pueden indicar la lisis del epitelio dañado como resultado de la exposición a CEES, la presencia de moléculas de peso molecular muy alto, tales como IgM (900 kD), indican claramente un aumento de la permeabilidad vascular. Por consiguiente, la **Figura 11B** demuestra que los niveles de IgM en el BAL se aumentaron significativamente en las ratas de CEES + PBS en comparación con EtOH + PBS o EtOH + AEOL 10150 ($p < 0,001$). Los niveles de IgM se redujeron significativamente con el tratamiento de CEES + AEOL 10150 en comparación con CEES + PBS. Combinados, estos datos demuestran que la administración de AEOL 10150 tras la exposición a CEES disminuyó los niveles de proteína en el BAL, así como los niveles de IgM.

Ejemplo de referencia 10: El tratamiento con AEOL 10150 reduce los niveles de glóbulos rojos y células inflamatorias en el LBA

La administración de AEOL 10150 tras la exposición a un agente de alquilación reduce los niveles de glóbulos rojos y células inflamatorias en el pulmón. Los glóbulos rojos no deben estar presentes en el pulmón a ningún nivel considerable a menos que haya una lesión hemorrágica. La exposición a CEES al 5 % + PBS produce un aumento significativo de la hemorragia como se muestra por el aumento de los niveles de glóbulos rojos en el BAL ($p < 0,001$). Este daño inducido por CEES se mejora con el tratamiento de AEOL 10150 18 horas después de la exposición a CEES ($p < 0,05$). Los niveles de PMN o neutrófilos en el BAL se aumentaron significativamente en las ratas de CEES + PBS en comparación con EtOH + PBS o EtOH + 10150 ($p < 0,001$). Los aumentos de neutrófilos inducidos por CEES se redujeron significativamente con el tratamiento de AEOL 10150 ($p < 0,05$). Si bien hubo una disminución en los niveles de macrófagos con la exposición a CEES, este cambio no fue relevante en comparación con los animales expuestos a EtOH.

Ejemplo de referencia 11: Mieloperoxidasa (MPO) en el homogeneizado pulmonar

La MPO es una glucoproteína expresada en todas las células del linaje mieloide, pero es más abundante en los gránulos azurófilos de los PMN. La liberación de MPO por PMN activados medida en homogeneizado pulmonar entero demuestra la acumulación en el tejido, y es un complemento útil para la medición de los PMN en el BAL. Los niveles de MPO se aumentaron significativamente como resultado de CEES + PBS, lo que indica un aumento en la acumulación de PMN en los tejidos ($p < 0,01$, **Figura 12**). El tratamiento con AEOL 10150 después del tratamiento con CEES disminuyó significativamente la acumulación en los tejidos de PMN ($p < 0,05$).

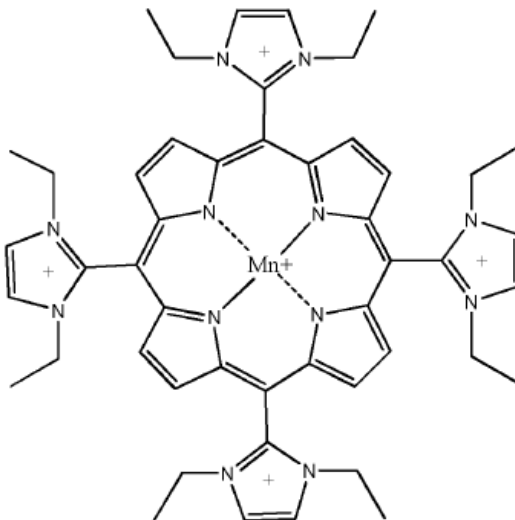
Ejemplo de referencia 12: El AEOL 10150 evita el estrés oxidativo inducido por CEES

El estrés oxidativo se produce cuando la producción de oxidantes supera la defensa antioxidante. Un marcador del daño oxidativo es la oxidación del ADN, que se puede medir por la formación de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8OHdG). La 8OHdG aumentó significativamente en ratas tratadas con CEES + PBS en comparación con los niveles en el tratamiento de EtOH + PBS ($p < 0,01$) o EtOH + 10150 ($p < 0,05$) 18 horas después de la exposición medido por HPLC (**Figura 13**). Cuando se expusieron las ratas a CEES y luego recibieron AEOL 10150, los niveles de 8O-HdG se redujeron significativamente en comparación con CEES + PBS ($p < 0,05$). Estos datos apoyan aún más el papel del estrés oxidativo en la lesión mediada por CEES, que mejora con la metaloporfirina antioxidante catalítica, AEOL 10150.

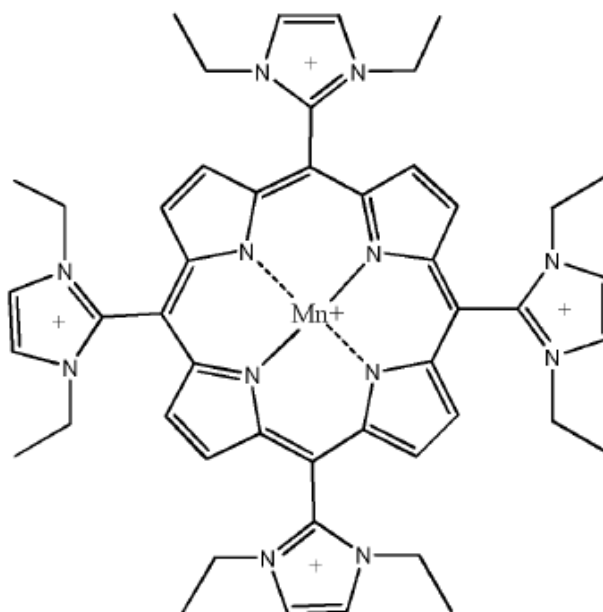
Otro marcador del daño oxidativo es la formación de productos de peroxidación de lípidos, incluyendo 4-hidroxinonenal (4-HNE). El 4-HNE es un producto importante de los aldehídos insaturados totales formados durante la peroxidación de lípidos. La medición de los niveles de 4-HNE en el pulmón 18 horas después de la exposición a CEES resultó en un aumento significativo en comparación con las ratas tratadas con EtOH + PBS (**Figura 14**). El AEOL 10150 inhibió significativamente la peroxidación lipídica inducida por CEES.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para su uso en el tratamiento de una lesión asociada con la exposición al gas fosgeno o al gas de cloro, o para su uso en la protección de un sujeto de los efectos tóxicos asociados con la exposición al gas fosgeno o al gas de cloro, compuesto que tiene la fórmula:



2. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha exposición es a gas fosgeno.
- 10 3. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha exposición es a gas de cloro.
4. El compuesto para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto es para su uso en la administración por inhalación.
- 15 5. El compuesto para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto es para su uso en el tratamiento de una lesión pulmonar inducida por dicho gas fosgeno o gas de cloro.
6. El compuesto para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto es para su uso en la administración tópica.
- 20 7. El compuesto del uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 y 6, en el que el compuesto es para su uso en el tratamiento de lesiones en la piel inducidas por dicho gas fosgeno o gas de cloro.
- 25 8. El compuesto para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la lesión está asociada con la exposición a gas fosgeno.
9. El compuesto para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la lesión está asociada con la exposición al gas de cloro.
- 30 10. El compuesto para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el compuesto es para su uso en la administración en el transcurso de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 48 horas después de la exposición a dicho gas fosgeno o gas de cloro.
- 35 11. El compuesto para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el compuesto es para su uso en la administración en el transcurso de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 10 horas después de la exposición a dicho gas fosgeno o gas de cloro.
- 40 12. El compuesto para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el compuesto es para su uso en la reducción de la citotoxicidad inducida por dicho gas fosgeno o gas de cloro.
13. El uso de un compuesto para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una lesión asociada con la exposición a gas fosgeno o gas de cloro, o para la protección de un sujeto de los efectos tóxicos asociados con la exposición a gas fosgeno o gas de cloro, en el que el compuesto tiene la fórmula



14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que:

- 5 el uso del compuesto es para la fabricación de un medicamento para tratar una lesión asociada con la exposición a gas fosgeno; o
 el uso del compuesto es para la fabricación de un medicamento para proteger a un sujeto de los efectos tóxicos asociados con la exposición a gas fosgeno; o
 el uso del compuesto es para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una lesión pulmonar inducida por dicho gas fosgeno; o
 10 el uso del compuesto es para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una lesión en la piel inducida por dicha exposición a gas fosgeno; o
 el uso del compuesto es para la fabricación de un medicamento para reducir la citotoxicidad inducida por dicho gas fosgeno.

15 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que:

- el uso del compuesto es para la fabricación de un medicamento para tratar una lesión asociada con la exposición a gas de cloro; o
 20 el uso del compuesto es para la fabricación de un medicamento para proteger a un sujeto de los efectos tóxicos asociados con la exposición a gas de cloro; o
 el uso del compuesto es para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una lesión pulmonar inducida por dicho gas de cloro; o
 el uso del compuesto es para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una lesión en la piel inducida por dicha exposición a gas de cloro; o
 25 el uso del compuesto es para la fabricación de un medicamento para reducir la citotoxicidad inducida por dicho gas de cloro.

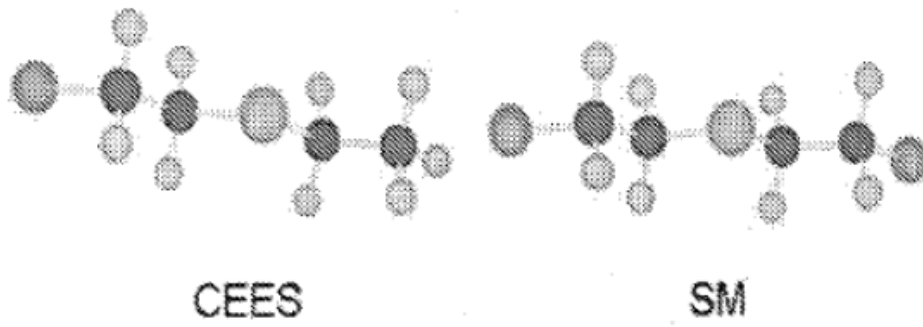


FIGURA 1

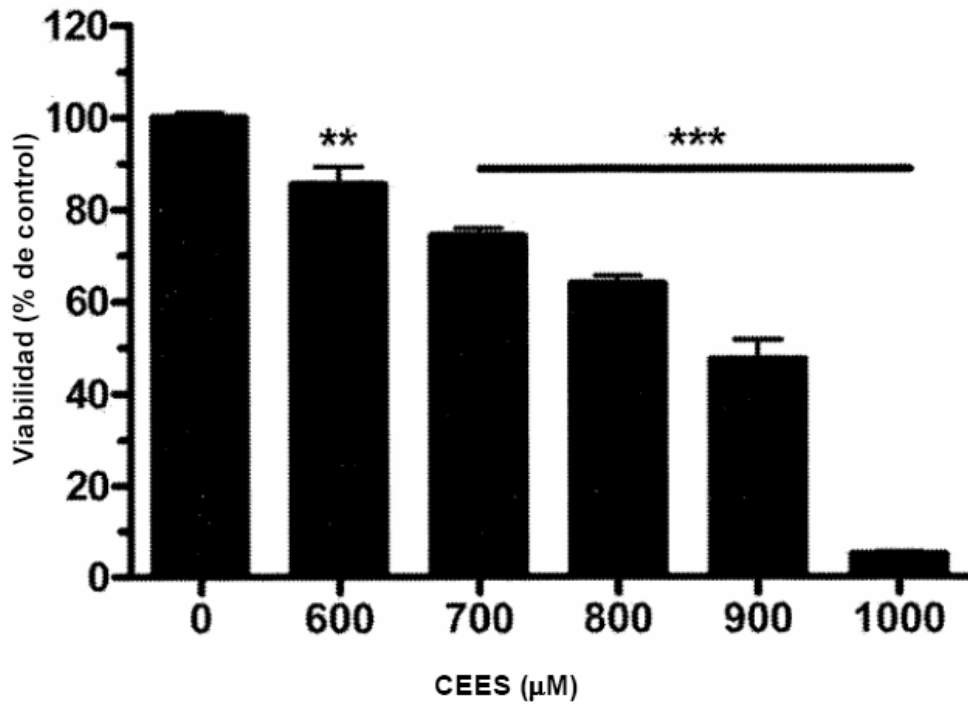


FIGURA 2

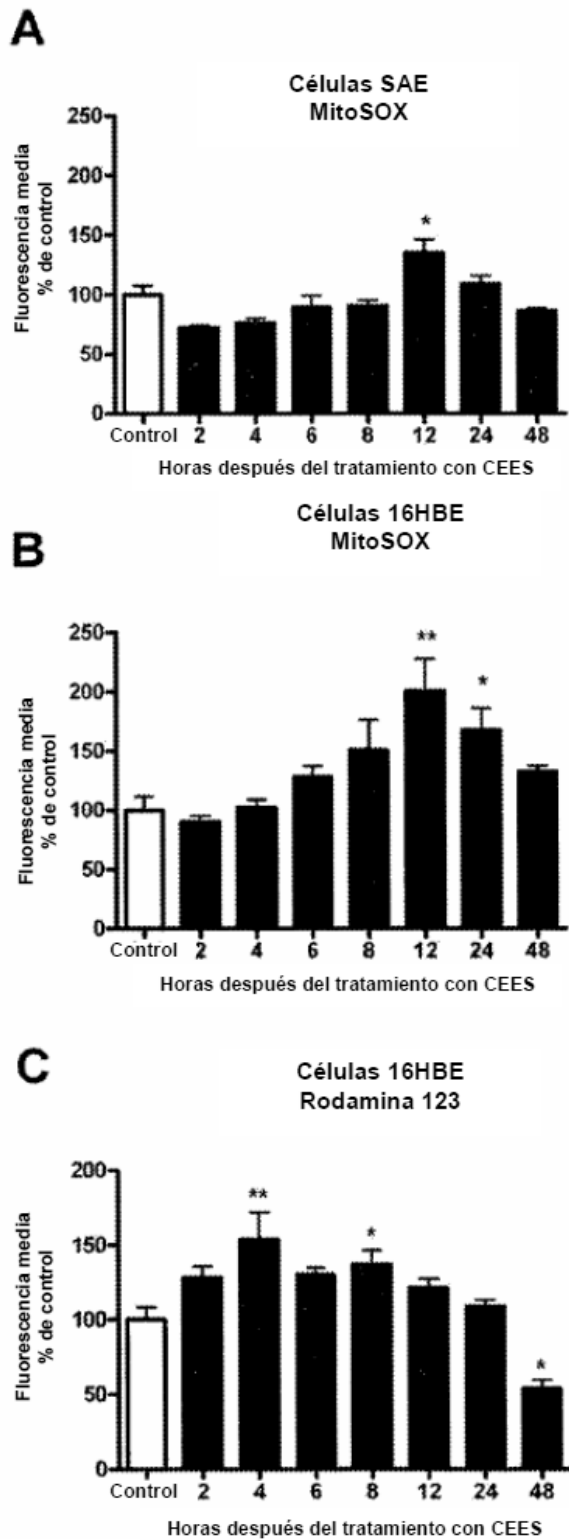


FIGURA 3

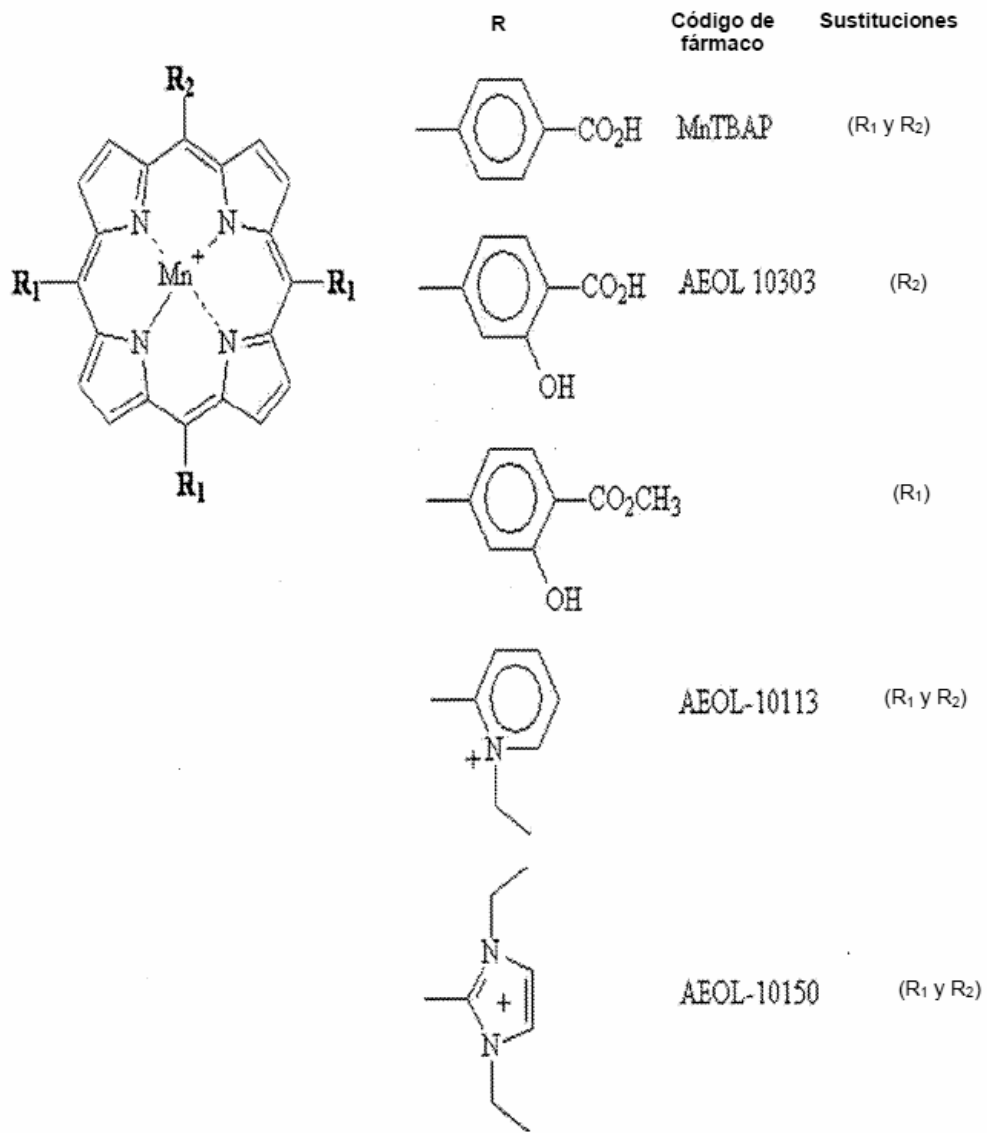


FIGURA 4

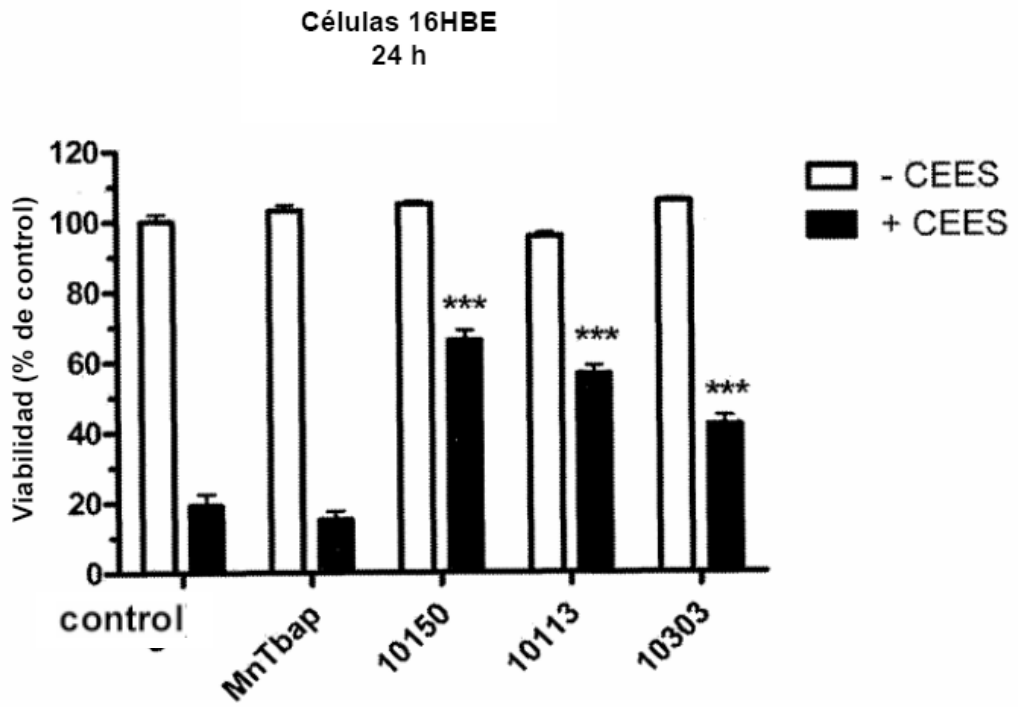


FIGURA 5

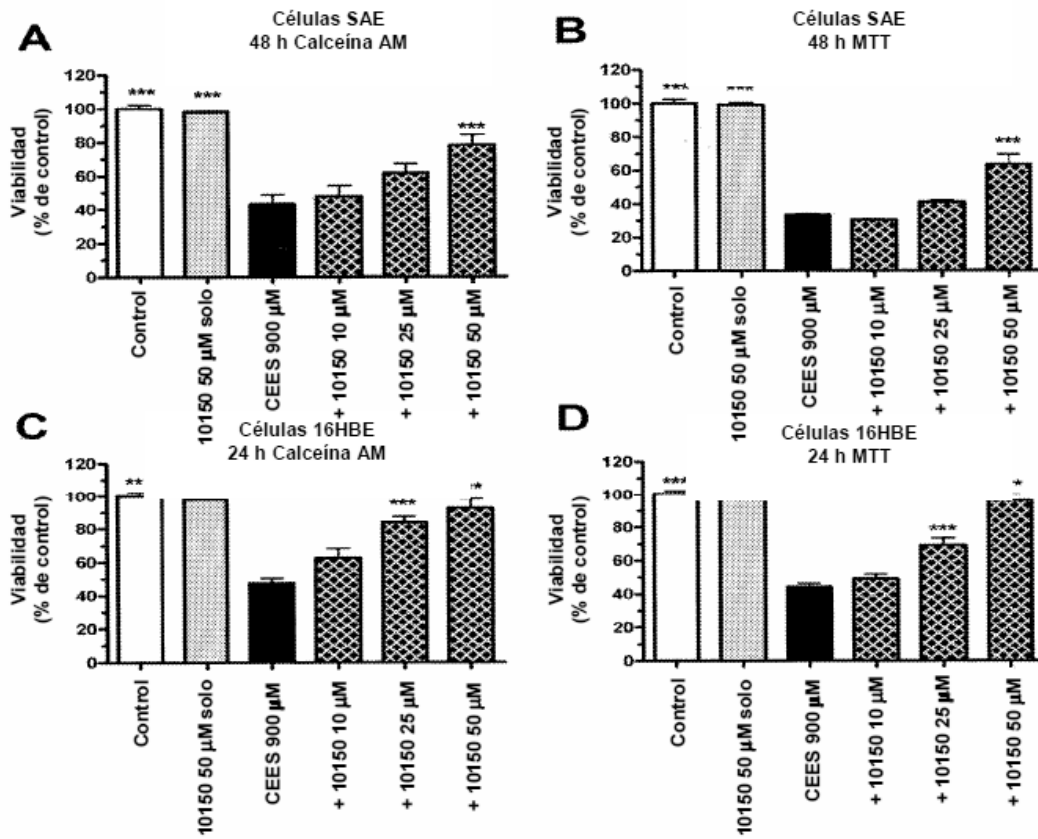


FIGURA 6

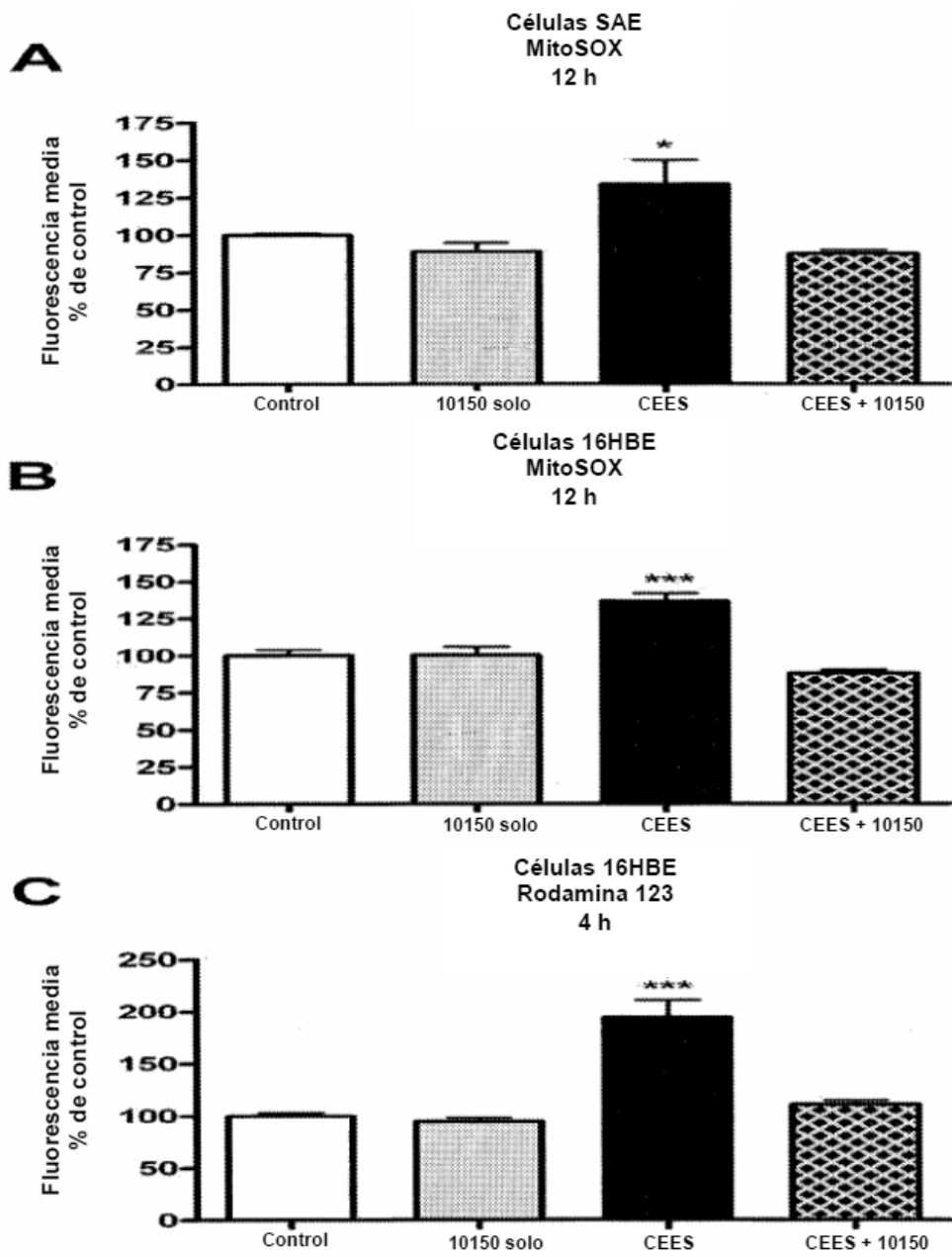


FIGURA 7

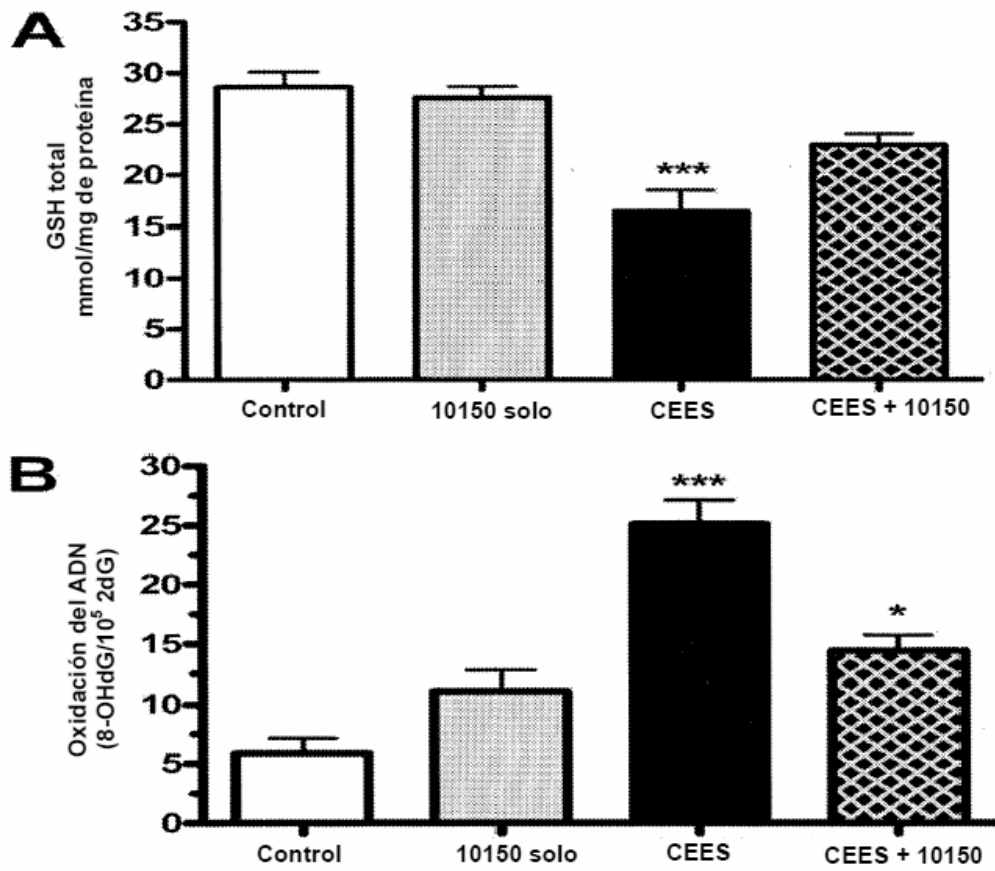


FIGURA 8

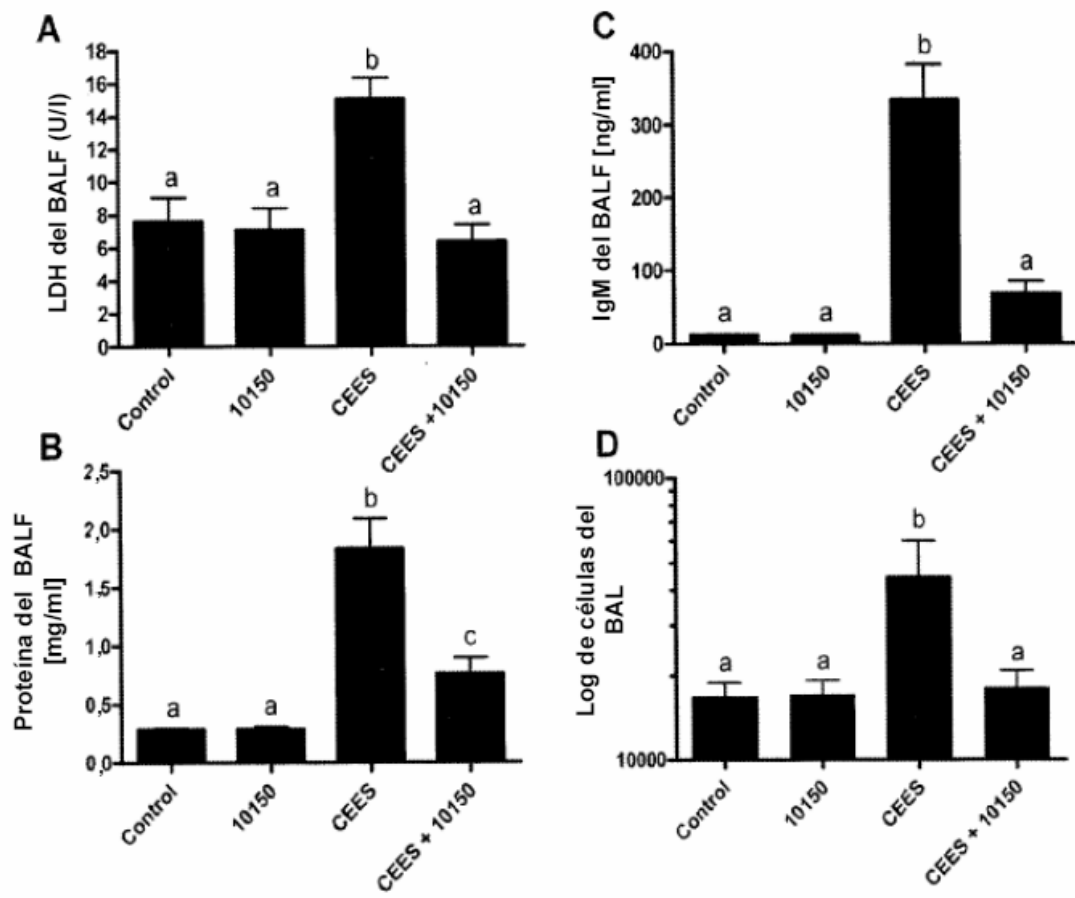


FIGURA 9

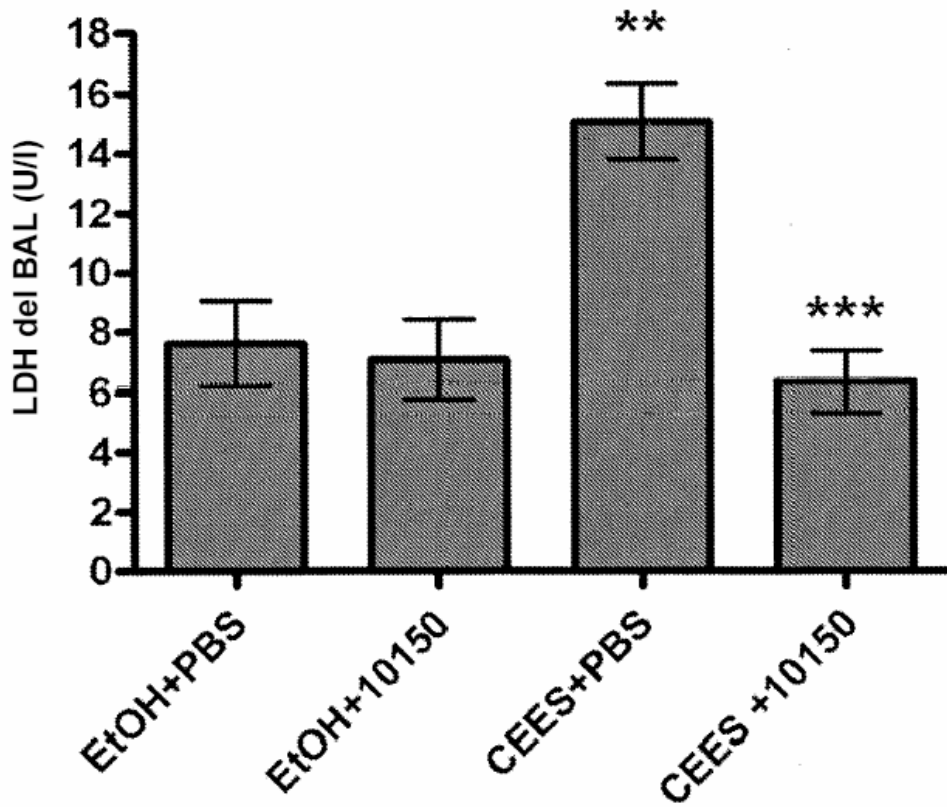


FIGURA 10

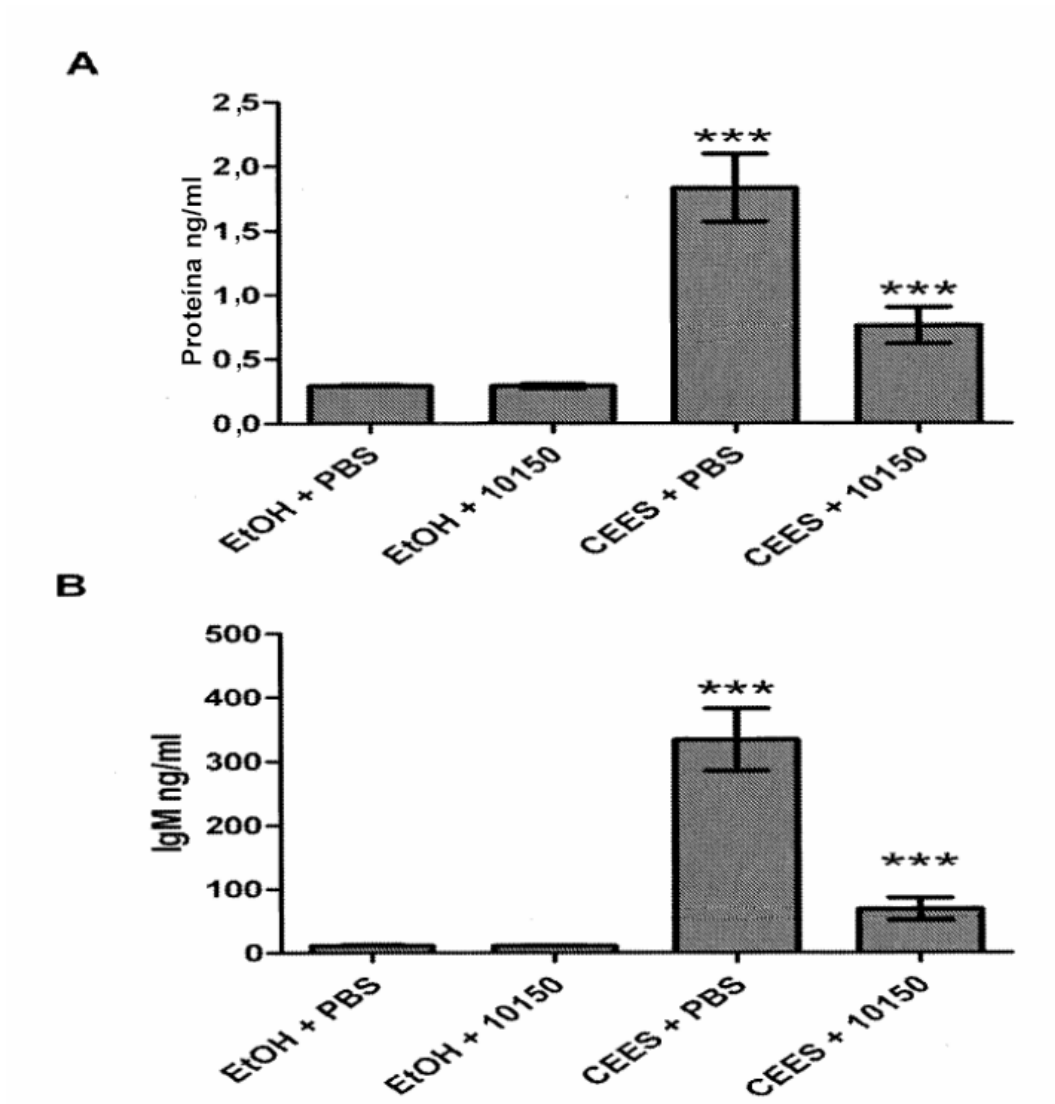


FIGURA 11

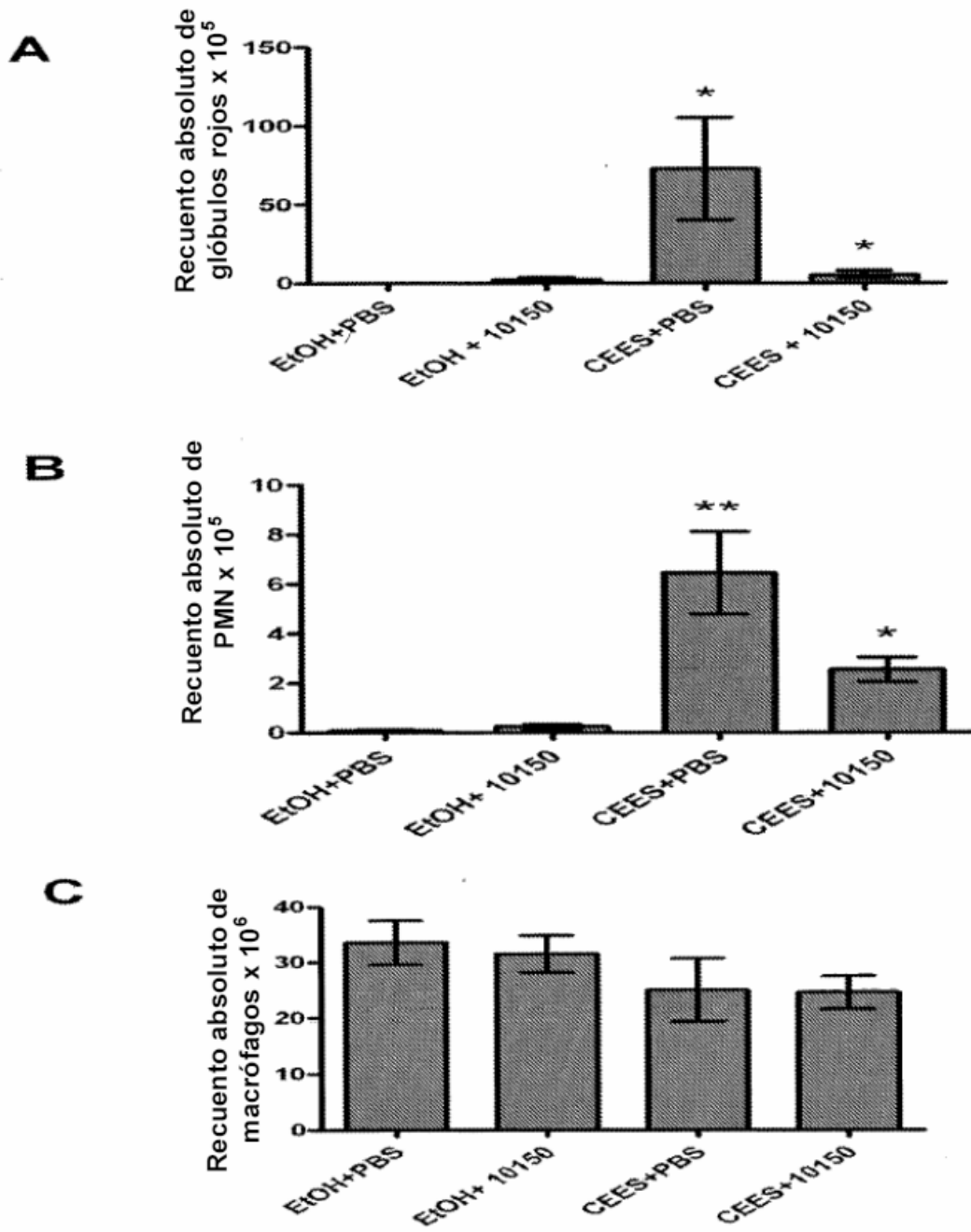


FIGURA 12

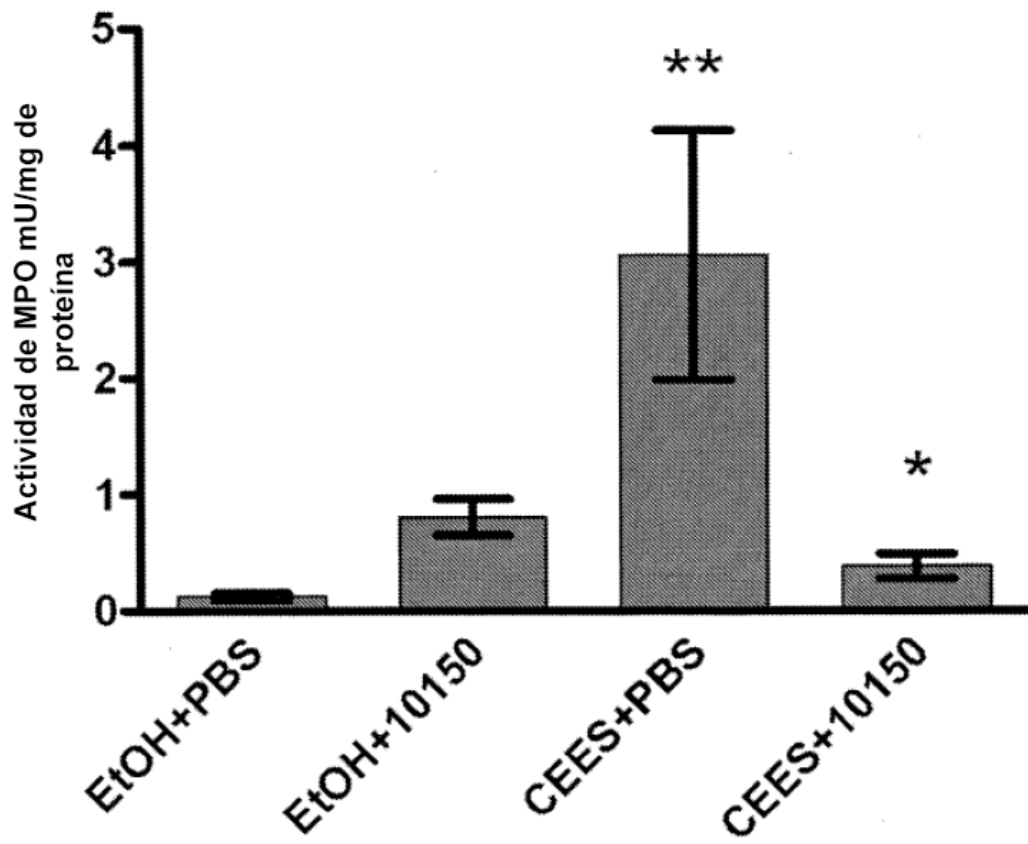


FIGURA 13

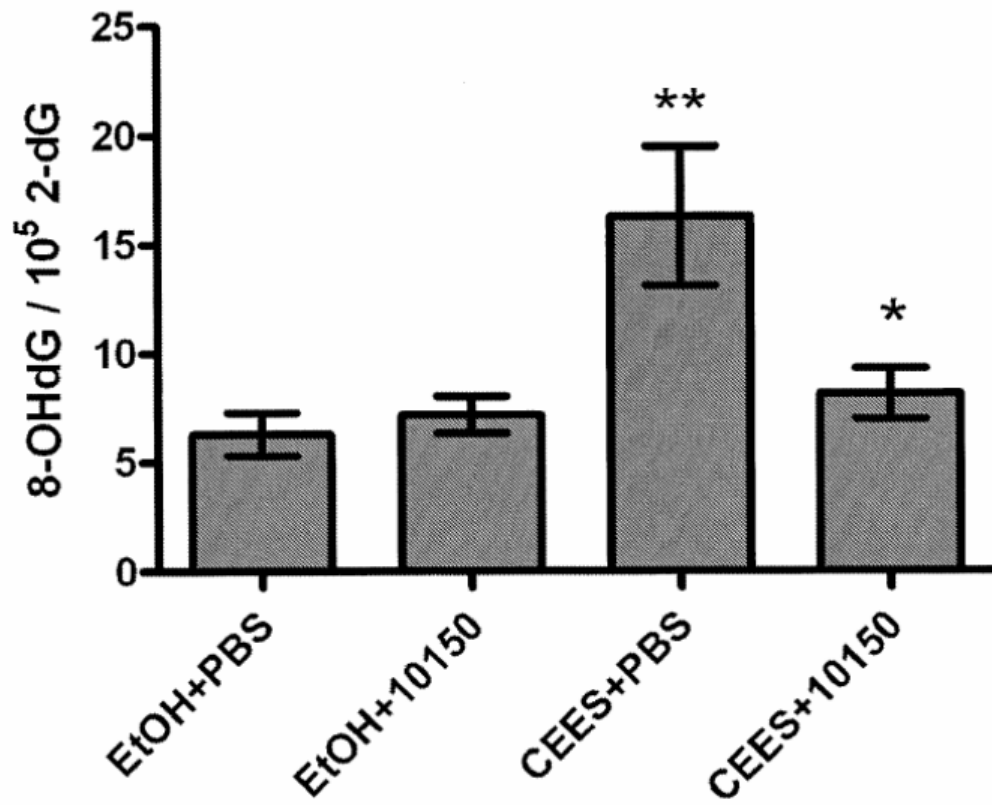


FIGURA 14

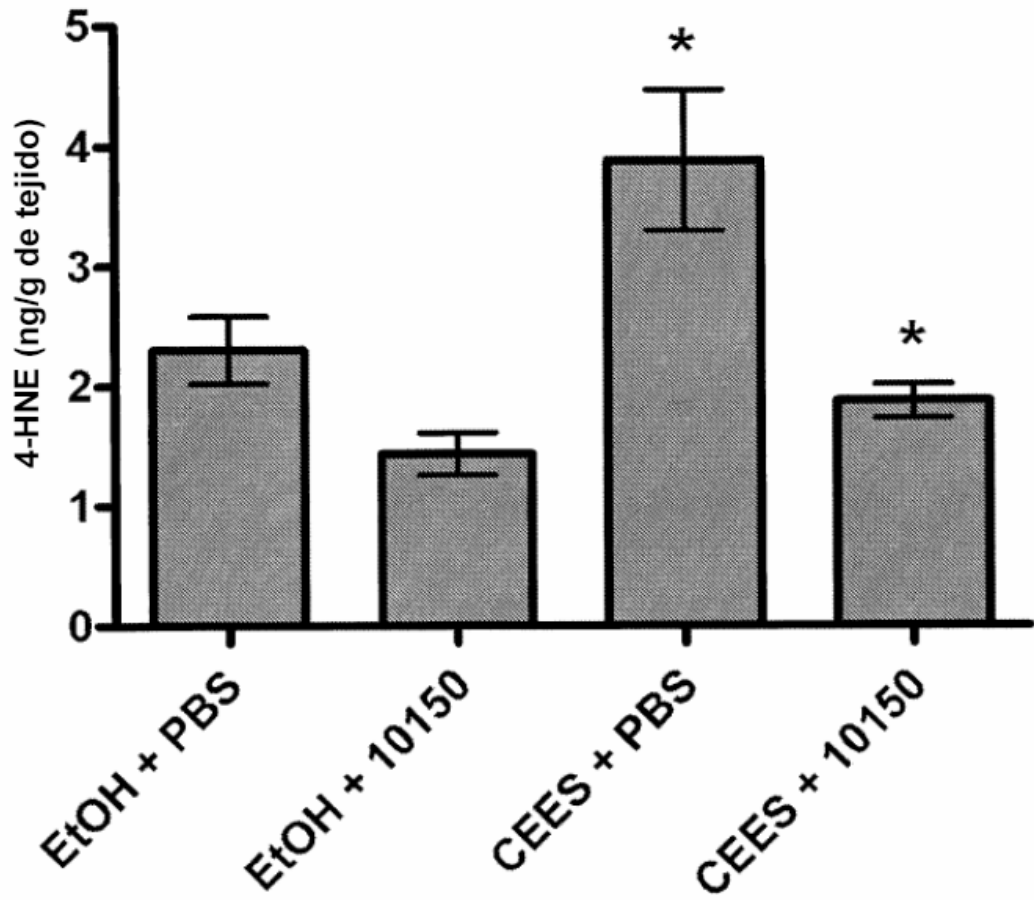


FIGURA 15